文章编号:1000-5404(2008)16-1535-03

论著

急性缺氧条件下氰化钠中毒对大鼠脑组织能量代谢的影响

赛 燕[1],田 原[2],李云鹏[1],王 涛[2],叶 枫[1],董兆君[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院防化医学教研室,重庆 400038;[2]兰州军区疾病预防和控制中心,兰州 730020)

摘 要:目的 探讨急性高原缺氧条件下氰化钠中毒对大鼠脑组织能量代谢的影响。**方法** 雄性SD大鼠,分为平原组和高原组。平原组动物在本地常规实验室内处理。高原组动物放置于模拟4 000 m海拔高度的低压舱内3 d后开始实验。为大鼠腹腔注射氰化钠(NaCN)3.6 mg/kg染毒,于0、0.5、1、2、4、6 h 6个时相点麻醉后断头取脑。以干湿质量法测定脑组织含水量,伊文思蓝法检测脑组织血管通透性,高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)法测定大鼠脑纹状体和海马组织腺苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)、腺苷二磷酸(adenosine diphosphate,ADP)和腺苷一磷酸(adenosine monophosphate,AMP)含量。**结果** 与平原组比较,高原缺氧环境氰化钠中毒大鼠脑组织含水量增加,纹状体和海马组织ATP和ADP含量减少,AMP含量增加。**结论** 高原缺氧可导致大鼠脑组织腺苷酸能量代谢障碍,缺氧条件下氰化钠中毒可进一步加重脑组织能量代谢障碍,同时脑水肿也进一步加重。

关键词: 高原;低氧;氰化钠;腺苷酸;海马;纹状体
中图法分类号: R322.81;R364.4;R827.172 **文献标识码:** A

Effects of sodium cyanide intoxication on energy metabolism in rat brain tissues under simulated hypoxia

SAI Yan[1], TIAN Yuan[2], LI Yun-peng[1], WANG Tao[2], YE Feng[1], DONG Zhao-jun[1] ([1]Institute of Chemical Defence, Department of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Center for Disease Prevention and Control of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730020, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of sodium cyanide (NaCN) intoxication on brain energy metabolism in rats under hypoxia. **Methods** Male SD rats were randomized equally into normal altitude group and high altitude hypoxia group. The animals in the high altitude hypoxia group were pre-exposed in a hypobaric chamber simulating 4 000 m above sea level for 3 d and were injected with 3.6 mg/kg NaCN intraperitoneally. The rats in the normal altitude group were treated in a routine laboratory in Chongqing (308 m above sea level). The rats were sacrificed, then the brains were isolated, striatum and hippocampus were separated on ice at 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0 h after intoxication. Brain water content was tested by measuring the ratio of dry/wet weight. Evans blue (EB) determination was used to understand the permeability of blood vessels in the brain. HPLC was employed to test the contents of adenosine monophosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP) in hippocampus and corpus striatum of the rat brain. **Results** The brain water was significantly increased in the rats of high altitude hypoxia group by NaCN intoxication, and ATP and ADP contents were significantly decreased in the tissues of hippocampus and corpus striatum either by hypoxia only or by hypoxia and cyanide intoxications, compared with those in the normal altitude group. However, AMP content in the brain tissues was increased by both. **Conclusion** NaCN intoxication under simulated hypoxia can produce energy metabolism turbulence, which may be involved in brain edema formation.

Key words: high altitude simulated 4 000 m; hypoxia; sodium cyanide; adenine nucleotide; hippocampus; corpus striatum

---

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 Project of "Eleventh Five-Year Plan" of PLA(06G077)

作者简介: 赛 燕,女,山东省威海市人,博士,讲师,主要从事化学毒物对神经系统的毒性作用方面的研究。电话:(023)68752356,E-mail:sai2000cn@yahoo.com.cn
通信作者: 董兆君,E-mail:dongzj@163.com

收稿日期: 2007-10-23;**修回日期:** 2007-12-20

高原地区空气氧分压低,影响人体生理功能,严重者可造成脑水肿[1]。目前对高原缺氧复合氰化物中毒的伤情特点了解甚少。本研究以低压舱模拟高原缺氧环境,建立缺氧复合氰化钠中毒的大鼠模型,探讨缺氧条件下氰化钠中毒对脑组织能量代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

氰化钠(NaCN)购自重庆市煌辉化学危险品销售有限公司,纯度>98%,ATP、ADP和AMP为Sigma公司产品,甲醇为国产HPLC色谱纯,高氯酸和盐酸为国产分析纯。高效液湘色谱仪(日本岛津公司),低温冷冻离心机(美国Sigma公司),紫外分光光度计(日本岛津公司),电热恒温干燥箱(上海)。

1.2 实验分组与缺氧条件

大鼠进入实验室检疫观察7 d后用于实验。自由摄食和饮水,温度(20±3)℃条件下饲养,每天7:00-19:00光照12 h。大鼠分为平原组和高原组。高原组动物于低压舱内模拟海拔4 000 m高原[大气压61.6 kPa,氧分压13.0 kPa,舱内温度(20±3)℃]连续缺氧暴露3 d,12 h日光灯照明。平原组动物在本地常规实验室(重庆市,海拔高度为308 m,大气压97.7 kPa,氧分压20.6 kPa)内进行实验。所有动物喂以标准颗粒合成饲料(本校实验动物中心提供),自由饮水。为大鼠腹腔注射NaCN 3.6 mg/kg,于中毒0、0.5、1、2、4、6 h,麻醉处死动物,分离脑组织备用。

1.3 脑含水量测定(干湿质量法)

大鼠麻醉后,断头取脑,分离脑组织,称取左右脑半球湿质量,在110~120 ℃电热恒温干燥箱中烘干24 h至恒质量,称取干质量。按Gotoh公式[2]计算脑含水量。

脑含水量(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%

1.4 血脑屏障通透性检测

大鼠麻醉,尾静脉注射伊文思蓝(Evans blu,EB),向左心室灌注生理盐水直至右心室流出透明液体为止,断头,取全脑,吸干表面水分及血液,称质量,加入3 ml甲酰胺37 ℃水浴48 h,1 500 r/min离心10 min,取上清于波长632 nm进行比色,根据标准曲线计算出EB含量,结果以ng/g表示。

1.5 HPLC测定ATP、ADP和AMP含量

脑组织样品制备:大鼠直接断头,在冰台上剥离出大鼠全脑,分离纹状体,海马,称质量。按5 ml/g加入预冷的0.4 mol/L的$HClO_4$,并于冰浴中迅速制成匀浆液,3 500 r/min离心10 min,取上清液,加入与上清液等体积的1 mol/L的K_2HPO_4,调节pH至6.5,再次3 500 r/min离心10 min,取上清液用0.22 μm滤膜过滤即成测定样品,以上操作在4 ℃完成。色谱条件:ODS HYPERSIL C18色谱分析柱(5 μm,250 mm×4.6 mm),柱温为室温(<25 ℃);流动相为50 mmol/L的磷酸钾缓冲液(pH 6.5),流速1 ml/min;紫外检测波长254 nm;样品进样体积20 μl;实验采用外标法定量。根据进样量和测得的峰面积计算腺苷酸的含量,结果以μg/g表示。

1.6 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行析因设计方差分析和t检验。

2 结果

2.1 高原氰化钠中毒对大鼠脑组织干湿质量比的变化

脑组织含水量测定结果表明,平原组动物氰化钠中毒后各时相点的脑组织含水量均未出现有统计学意义的变化。而高原组动物氰化钠中毒2 h后,脑组织含水量显著高于平原组($P<0.01$,表1)。

表1 氰化钠中毒各时相点高原缺氧大鼠脑组织干湿质量比的变化($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
平原组	78.06±0.88	77.66±0.28	77.54±0.50	77.61±0.35	77.45±0.27	77.68±0.31
高原组	78.51±0.39	78.42±0.27	78.19±0.34	78.34±0.14[a]	78.69±0.31[a]	78.40±0.31[a]

a:$P<0.01$,与平原组比较

2.2 高原氰化钠中毒对大鼠脑组织血管通透性的测定

高原组动物中毒前脑组织EB含量显著高于平原实验组($P<0.01$)。高原组动物氰化钠中毒后,脑组织EB含量随着中毒时间逐渐增加,至中毒4 h达到并维持在较高水平,但无统计学意义(表2)。

表2 氰化钠中毒各时相点高原缺氧大鼠脑组织伊文思蓝含量的测定 ($n=6$,ng/g,$\bar{x}\pm s$)

组别	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
平原组	0.689±0.135	1.013±0.419	1.792±0.229	1.542±0.201	1.348±0.183	1.241±0.168
高原组	1.682±0.312[a]	1.224±0.580	1.557±0.153	1.826±0.155	2.864±0.466	2.817±0.433

a:$P<0.01$,与平原组比较

2.3 高原氰化钠中毒对大鼠脑组织能量代谢的影响

2.3.1 ATP含量 平原组动物纹状体组织ATP含量于氰化钠中毒后6 h显著降低,海马组织ATP含量于2 h即显著降低,6 h降低非常显著。高原组纹状体和海马组织ATP含量均在中毒后0.5 h显著性低于平原组(表3)。

2.3.2 ADP含量 平原组动物纹状体组织ADP含量在中毒后6 h显著降低($P<0.05$),海马则在中毒后6 h出现了非常显著性的降低($P<0.01$);高原组ADP的含量纹状体在中毒后2 h出现了显著性降低,6 h非常显著性降低,海马在中毒后2 h即出现了非常显著性降低;高原环境下纹状体ADP的含量较平原环境均表现为显著性降低,海马则在0、0.5、2 h为显著性降低,6 h非常显著性降低(表4)。

2.3.3 AMP含量 平原组AMP的含量纹状体和海马均在在中毒后6 h出现显著性升高;高原组纹状体在中毒后2 h出现显著性升高,6 h升高更为明显($P<0.01$),海马在中毒后2 h即出现了非常显著性升高;高原环境与平原环境比较无论是海马还是纹状体均显著升高(表5)。

表 3　氰化钠中毒对高原缺氧大鼠脑组织 ATP 含量的影响($n=6$,μg/g,$\bar{x}\pm s$)

组别	纹状体				海马			
	0 h	0.5 h	2 h	6 h	0 h	0.5 h	2 h	6 h
平原组	3.151 ±0.266	2.714 ±0.640	2.123 ±0.776	1.416 ±0.532[c]	3.194 ±0.096	2.932 ±0.230	2.380 ±0.200[c]	1.431 ±0.517[d]
高原组	2.065 ±0.197	1.133 ±0.136[ad]	0.721 ±0.292[ad]	0.462 ±0.107[ad]	2.284 ±0.306	1.893 ±0.217[bd]	1.025 ±0.185[bd]	0.520 ±0.102[bd]

a: $P<0.05$, b:$P<0.01$,与平原组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 0 h 比较

表 4　氰化钠中毒对高原缺氧大鼠脑组织 ADP 含量的影响($n=6$,μg/g,$\bar{x}\pm s$)

组别	纹状体				海马			
	0 h	0.5 h	2 h	6 h	0 h	0.5 h	2 h	6 h
平原组	2.171 ±0.313	2.026 ±0.714	1.761 ±0.450	0.925 ±0.401[c]	2.967 ±0.697	2.234 ±0.337	1.576 ±0.675[c]	1.238 ±0.123[d]
高原组	1.204 ±0.275[a]	0.740 ±0.289[a]	0.431 ±0.358[ac]	0.132 ±0.098[ad]	1.535 ±0.419[a]	1.460 ±0.337[a]	0.411 ±0.215[ad]	0.391 ±0.221[bd]

a: $P<0.05$, b:$P<0.01$,与平原组比较; c:$P<0.05$, d:$P<0.01$,与 0 h 比较

表 5　氰化钠中毒对高原缺氧大鼠脑组织 AMP 含量的影响($n=6$,μg/g,$\bar{x}\pm s$)

组别	纹状体				海马			
	0 h	0.5 h	2 h	6 h	0 h	0.5 h	2 h	6 h
平原组	0.832 ±0.253	1.407 ±0.547	1.772 ±0.651	0.237 ±0.844[b]	0.894 ±0.400	0.974 ±0.286	1.626 ±0.711	2.346 ±0.314[b]
高原组	2.211 ±0.637[a]	2.952 ±0.264[a]	3.277 ±0.556[ab]	3.810 ±0.155[ac]	1.687 ±0.149[a]	1.745 ±0.199[a]	2.976 ±0.350[ac]	3.635 ±0.473[ac]

a: $P<0.05$,与平原组比较; b:$P<0.05$,c:$P<0.01$, 与 0 h 比较

3　讨论

低压缺氧是高原地区的主要环境特征,因缺氧所致的急性高原病和军事作业能力降低是部队急进高原时的主要医学问题。高原脑水肿(high altitude cerebral oedema, HACE)是重要的急性高原病之一,在急性高原病中位居第 3。因 HACE 死亡者约占高原病死亡人数的 14.1%[1]。因此,阐明 HACE 的发生机制及其防治措施是高原医学的重要任务[1]。氰化物进入细胞后可阻断细胞呼吸链电子传递功能,造成氧利用障碍和能量产生不足,最终引起组织缺氧和死亡[3]。进驻高原人员若发生氰化物中毒,两种缺氧因素同时作用于机体,临床表现将更加复杂,救治也会更加困难[4]。为此,本课题组利用本单位的大型低压舱群,研究了高原缺氧复合氰化物中毒对脑组织能量代谢的影响。

实验结果表明,高原实验组动物缺氧 3 d 后,氰化钠中毒 0 h 脑组织干湿质量法结果无明显变化,但脑组织 EB 含量却明显升高,说明脑组织含水量正在增加。高原实验组动物氰化钠中毒后 2 h 开始,脑组织干湿质量比即明显增加。这些数据说明,高原缺氧和氰化物中毒对脑组织血管的通透性有明显的联合效应。

高原缺氧[5]是 HACE 的触发因素,但其确切的病理生理机制仍不清楚。Hackett 等[6]提出了一个模式来解释 HACE 的病理生理:缺氧→低氧血症→脑血流增加,毛细血管压增高和/或脑血量增加和/或血-脑屏障渗透性增加→脑肿胀→脑脊液(CSF)缓冲不充分→HACE。其中,血管内皮的破坏和通透性的增加是脑水肿发生的最直接的病理特征[7]。而引起血管内皮细胞损伤的因素很多,如血管内皮生长因子表达的改变,能量代谢障碍等。

本研究结果表明,急性高原缺氧本身对大鼠脑海马和纹状体组织的 ATP、ADP 和 AMP 含量有明显的影响,当缺氧条件下出现氰化钠中毒时,脑组织 ATP、ADP 和 AMP 含量改变更为明显。提示脑组织在缺氧和氰化物中毒两种因素作用下发生能量代谢障碍,后者通过多种途径影响细胞的正常功能,甚至导致细胞死亡,其作用机制尚待深入研究。

参考文献:

[1] Duplain H, Sartori C, Scherrer U. High-altitude related illness[J]. Rev Med Suisse, 2007, 3(120): 1766 - 1769.

[2] Gotoh O, Asano T, Koide T, *et al*. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I: The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin[J]. Stroke, 1985, 16(1): 101 - 109.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Schoonman G G, Sandor P S, Nirkko A C, *et al*. Hypoxia-induced acute mountain sickness is associated with intracellular cerebral edema: a 3 T magnetic resonance imaging study[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 28(1): 198 - 206.

[6] Hackett P H, Roach R C. High altitude cerebral edema[J]. High Alt Med Biol, 2004, 5(2): 136 - 146.

[7] Tissot-van-Patot M C, Leadbetter G, Keyes L E, *et al*. Greater free plasma VEGF and lower soluble VEGF receptor-1 in acute mountain sickness[J]. J Appl Physiol, 2005, 98(5): 1626 - 1629.

(编辑　龙　亮)