维普资讯 http://www.cqvip.com

332-335

(2)

第23卷 第4期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.4
1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

亚急性一氧化碳中毒致小鼠迟发性脑损伤模型的建立

R595.1
R749.102

基础医学院药理教研室 杨俊卿* 周岐新

提 要 本文报道了一种简便安全的亚急性一氧化碳(CO)中毒致迟发性学习记忆障碍的小鼠脑损伤模型。CO 1ml/10g wt i.p.1/d,连续7天。跳台法被动性回避实验提示染毒小鼠出现学习损伤和记忆障碍;病理切片检查显示小鼠海马神经原细胞核固缩、细胞数目明显减少。结果表明本法具有定量可靠、方便、安全的优点。

关键词 亚急性CO中毒;脑损伤;学习记忆障碍;模型
中图分类号 R363.13; R595.1

一氧化碳中毒

虽然急性CO中毒机理已得到一定程度研究，但是长期低农度CO对人的影响以及急性CO中毒致迟发性脑损伤的机理仍未阐明。其原因固然是研究手段严重不足，但缺乏简便、有效和可靠的动物模型也是其原因之一。近年来CO可能是一种内源性神经递质已受到普遍重视，因此有人提出CO中毒所致迟发性脑损伤除与组织缺氧有关外，尚可能涉及其它机理。这就需要建立合适的CO中毒致迟发性脑损伤和慢性CO中毒的实验动物模型。为此，我们在这方面进行了探讨，现将结果报道如下。

1 实验材料和方法

1.1 动物

1级NIH雄性小鼠，18～22g，由本校实验动物中心提供。

1.2 仪器和设备

WX－2型小鼠光电刺激条件反射跳台，由医科院药物所研制。日本岛津UV－260可见紫外分光光度计。自制CO发生及收集装置。

1.3 方法

1.3.1 CO的产生及收集

CO通过甲酸在浓硫酸作催化剂下分解成CO和水，然后用浓硫酸吸收水分而得到纯净的CO，并收集于负压球囊中待用，一般于用前采用定量甲酸和浓硫酸新鲜配制。

1.3.2 小鼠CO i.p的LD_{50}测定和亚急性CO中毒的剂量确定

取NIH小鼠72只随机分成6组，按改良寇氏法实验，组间距为0.8;结果用Bliss法软件处理以确定LD_{50}。以小于LD_5量为亚急性CO中毒的剂量(实用量为LD_5=1ml/10g wt)。

1.3.3 小鼠血碳氧血红蛋白(HbCO)浓度测定

在第1天和第7天CO i.p后30min，取眼球后静脉血，按文献用分光光度法测定血碳氧血红蛋白的浓度[3]。

1.3.4 小鼠脑海马病理学切片检查

参照Nabeshima T[4]等描述的方法，在CO 1 ml/10g wt i.p，1次/日，连续7天后第1、2、7、14天，用戊巴比妥钠麻醉后进行在体灌流，取全脑做病理切片观察，切片厚约4μm,HE染色，观察大脑及海马的神经原细胞结构变化。对照组给予空气1 ml/10g wt i.p.

1.3.5 行为学测定

在给予CO 7天后，再观察7天，用WX－2型小鼠光电刺激条件反射跳台进行被动性回避实验观察学习记忆。电压36v，先把小鼠置于电栅栏上适应5min，然后间断通电，小鼠遭点击后跳上安全平台。以不通电时，小鼠头背对跳台置电栅栏上，小鼠能够迅速跃上平台，并且5min内不跳下平台为学会的标准;以学会所需的训练次数(电击次数)为学习成绩。24h后置小鼠于平台上，不通电，以放置到小鼠走下平台这段时间为潜伏期，以此潜伏期作为记忆成绩。

2 实验结果

2.1 HbCO测定

CO中毒与血中HbCO的浓度有关，为此，我们测定了第1天和第7天CO 1 ml/10g wt i.p后30分

* 男，1969－12出生，硕士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

钟血HbCO浓度，结果分别为53.23±2.86％和51.26±3.95％($\bar{x}\pm s$)。而同一天对照组HbCO浓度分别为2.90±0.18％和1.33±0.34％($\bar{x}\pm s$)。表明CO i.p给予是有效的CO染毒途径。

2.2 小鼠CO i.p的LD_{50}测定和亚急性CO中毒的剂量确定

小鼠CO i.p后各组死亡率如表1所示，经LD_{50}－Bliss法软件处理，得到LD_{50}＝1.985±0.372;95％可信性＝1.648～2.391。为了确保能模拟临床慢性CO中毒的较小剂量，同时又能使CO中毒模型成功，经过多次实验，我们确定以CO 1 ml/10g wt为亚急性CO中毒的剂量。

表1 COi.p的LD_{50}测定

	1	2	3	4	5
剂量(ml)	1.28	1.60	2.00	2.50	3.125
动物数	12	12	12	12	12
死亡数	2	4	4	8	12
死亡率	17	33％	33％	69％	100％

2.3 CO染毒小鼠脑的病理学检查

CO给予7天后，第1天至第14天，病理检查发

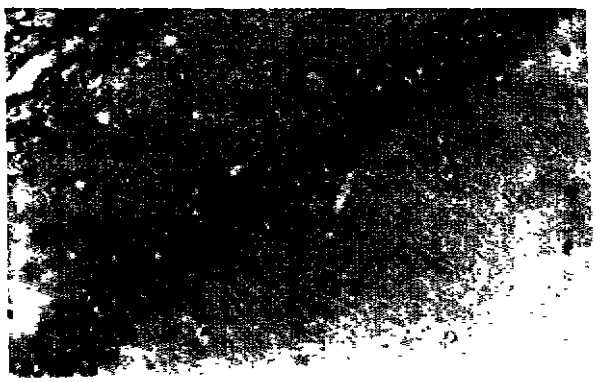


图1 空气对照组，海马CA1区冠状切面照片，切片厚约4μm,HE染色， ×400.

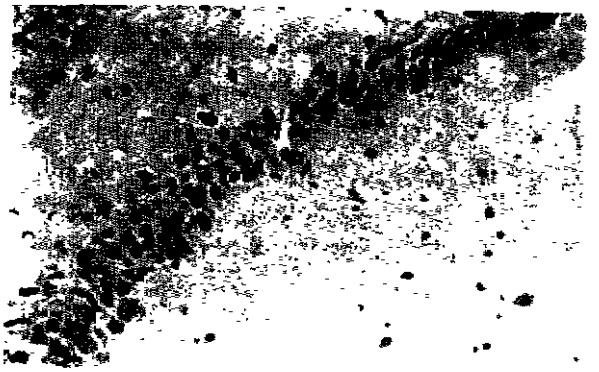


图2 CO染毒后2天，海马CA1区锥体细胞死亡，冠状切面照片，切片厚约4μm,HE染色， ×400

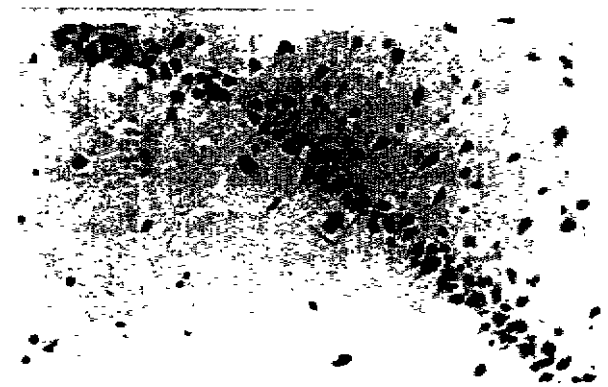


图3 CO染毒后7天，海马CA1区锥体细胞延迟性死亡，冠状切面照片，切片厚约4μm,HE染色． ×400.

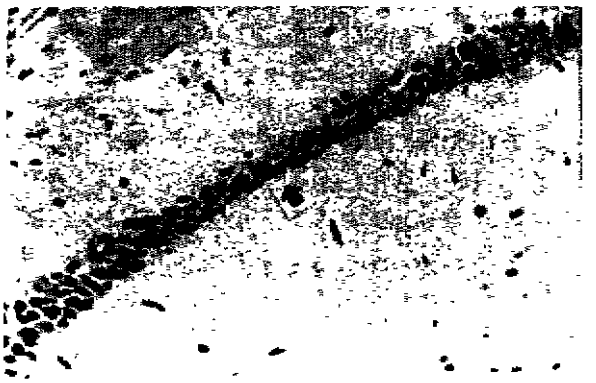


图4 CO染毒后14天，海马CA1区神经细胞层次明显比对照组(图1)减少，冠状切面照片，切片厚约4μm,HE染色，×400.

维普资讯 http://www.cqvip.com

现小鼠海马神经细胞不同程度变性坏死，其主要病理改变为核浓缩和细胞数目减少，而未发现其它脑区神经细胞有明显变性坏死现象。第1天观察仅可见有散在的核浓缩，而第2天CA1和CA3区出现大片的核浓缩(图2)，第7天则为CA1、CA2、CA3区细胞明显核浓缩伴细胞数目减少(图3)，第14天除有核浓缩外细胞数目减少很明显(图4)。有趣的是不同个体海马损伤的部位不太一样，但常常累及CA1区；同一小鼠双侧海马的损伤也不一致，常以一侧损伤为主。

2.4 亚急性CO中毒对小鼠学习记忆影响

由表2可见亚急性CO中毒明显损害小鼠的学习成绩。CO组达到学会所需的训练次数较对照组明显增加。记忆测验表明，CO组24小时潜伏期显著比对照组缩短，在第2和第3天缩短更为明显；但第4至第7天CO组潜伏期均数虽仍比空气组短，但已无统计学差异(见表3)。

表2 CO对小鼠学习能力的影响

	训练次数($\bar{x}\pm s$)	n
对照组	3.22±1.22	13
CO组	7.67±1.40**	9

** CO组与对照组相比，$P<0.01$

表3 CO诱导的小鼠记忆缺失(潜伏期，Sec，$\bar{x}\pm s$)

	第1d	第2d	第3d	第4d	第5d	第6d	第7d
对照组	294.6±16.6	295.4±16.6	268.5±70.9	155.8±122.9	131.9±111.9	139.8±126.7	108.4±124.4
CO组	196.4±132.0*	1230.±133.7**	98.7±134.8**	76.6±126.1	71.8±128.8	73.6±127.8	62.4±180.8

* 和 **，CO组与对照组相比，$P<0.05$和0.01

3 讨论

急性和慢性CO中毒是常见的职业中毒性疾病之一。关于急性CO中毒的机制虽未完全阐明，但多数学者认为CO是通过缺氧途径引起组织病变；也有学者认为CO与细胞色素氧化酶结合，最终使体内自由基含量升高，从而对机体造成损害。而对急性CO中毒致迟发性脑病以及长期接触低浓度CO对机体的影响及其机理的研究未能有大的突破。自1993年Verma[3]首次提出CO可能是神经系统信息传递的信使分子以来，学者们希望从新的角度进行研究。这就要求建立合适的动物模型，以便进一步阐明CO中毒的机理，为迟发性脑病的预防和治疗提供实验依据。

Nabeshima T等[2]用CO流式吸入染毒的方法，建立了急性CO中毒致迟发性神经原死亡、记忆损害的模型。但由于流式吸入染毒的装置造价高，难于普遍推广应用。

我们首次采用CO腹腔注射的方法建立了亚急性CO中毒致迟发性脑损伤学习记忆障碍的小鼠模型。有报道[4]CO静式吸入，随染毒次数(非连续)增加，血HbCO浓度增加。而我们却发现CO染毒第7天的小鼠血HbCO浓度与第1天相近，没有蓄积现象。这与CO在体内的消除特点相一致[5]。我们观察到亚急性CO中毒可引起迟发性的海马神经细胞变性、坏死，导致学习和记忆伤害。同时我们还发现小鼠海马损伤以单侧损伤为主，而每只小鼠并非局限于CA1区，也可是其它区或多区损害，但齿状回损害少见，也未见其他脑区明显损害。其原因有待进一步研究。目前我们已用此模型进行慢性CO中毒、急性CO中毒致迟发性脑损伤的机制研究。与其它CO染毒动物模型相比，我们认为本染毒法具有能定量、操作简单易行、安全和结果可靠等优点。

参考文献

1.高晓云，等.工业卫生与职业病杂志 1986;12(5):275
2.Nabeshima T, et al. J Phamacol Exper Ther 1991;256(1):378
3.Verma, et al. Science 1993;259:383
4.涂荔卿，等.福建医学院学报 1992;26(2):156
5.何凤生，等.工业卫生与职业病杂志 1984;10(5):257

(收稿日期 1998－03－17)

维普资讯 http://www.cqvip.com

An experimental model of delayed cerebral injury induced by subacute carbon monoxide intoxication in mice

Yang Junqing, et al
Department of pharmacology, college of basic medical sciences

The experimental model of delayed cerebral damage was established in mice via CO 1ml/10g wt i.p, once a day, continuously 7 days. In the test of the passive avoidance task, we investigated the impairment of learning and memory function after CO exposure and the delayed neuronal death in hippocampus of mice. The model is simple, reliable, and safe, It perhaps becomes an effective model for us to illustrate the mechanism of delayed injury induced by CO.

KEY WORDS CO; cerebral injury; learning and memory; Model

335-337 (3)

胰岛素诱导的胰岛素抵抗细胞模型的建立和鉴定

R587.1
R735.7

临床学院内分泌科 李晨钟* 张素华 舒昌达
病毒性肝炎研究所 张大志

提 要 本文介绍了高胰岛素诱导培养法复制原代大鼠肝细胞及HepG2肝癌细胞的胰岛素抵抗模型的方法。该方法可明显降低两类细胞的胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用能力，导致胰岛素抵抗，而且简便、易行、重复性好，成功率高，可广泛应用于胰岛素抵抗的研究。

关键词 胰岛素抵抗；细胞模型；肝细胞 肝肿瘤细胞
中图分类号 R587.1

胰岛素抵抗(insulin resistance IR)是一种与多种疾病的发生、发展密切相关的重要病理生理状态[1]。由于IR的研究常常需要取肝脏、骨胳肌等胰岛素靶组织，使在人体的研究不易广泛开展，因此目前国外的大多数IR研究以细胞或动物模型为对象[2,3]，尤其是IR细胞模型，因具有复制周期短、易多次重复、影响因素易控制及价格相对低廉等优点，已被较为广泛的使用。但国内目前尚无IR细胞模型的报道。近来，我们采用高浓度胰岛素诱导培养法复制成功两种IR细胞模型：Wistar大鼠原代肝细胞模型和HepG2肝癌细胞模型。现报道如下：

1 材料和方法

1.1 化学试剂和药品 DMEM培养基、牛血清白蛋白(BSA)、胰蛋白酶及新生小牛血清(美国GIBCO BRL产品)，Ⅳ型胶原酶及D－葡萄糖(美国Sigma产品)，基因工程人胰岛素(美国Lilly产品)，^{3}H－D－葡萄糖(中科院上海原核子研究所，比放射性8 Ci/mmol)，A_{14}－^{125}I单碘猪胰岛素(华西糖尿病应用科技开发研究所，比放射性4×10^7～7×10^7 GB q/mol)，POP和POPOP(上海生化试剂供应站，进口分装产品)，Hank's缓冲液及磷酸缓冲液为我室自配，其余各种化学试剂均为市售分析纯。

1.2 实验动物 雄性成年Wistar大鼠(重庆医科大学实验动物中心)，年龄60～90d，体重250～300g，常规鼠粮喂养，经饮水器自由饮水。

1.3 IR原代大鼠肝细胞模型复制和鉴定

1.3.1 大鼠肝细胞的分离和培养，按文献进行[4]，简述如下：将大鼠用戊巴比妥钠腹腔麻醉(50mg/kg体重)后，打开腹腔进行肝脏灌洗。先用400ml含EDTA(5mM)葡萄糖(5.5mM)的去Ca^{2+} Hank's(pH值7.4)缓冲液反复灌洗，然后用200毫升含$CaCl_2$(2mM)和胶原酶(100mg/150ml)的Hank's液反复灌洗。然后取下大鼠肝脏，夹住肝静脉主干将其转移至培养皿中(装有50ml含胶原酶的缓冲液)，于37°C培养10分钟，随后将细胞经一孔径约6μm的尼龙筛网滤过，并用4°C的Hank's缓冲液(40ml)冲洗四次。将滤过的细胞用含有2nM丙酮和1%BSA的磷酸缓冲液重新悬浮，并将pH值

• 男，1971－01出生，博士研究生