DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.001
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)11-0937-03

论著

缺氧复合梭曼中毒大鼠脑损伤的药物保护研究

林 海[1],赵吉清[1],恽榴红[2],阮金秀[2],董兆君[1] ([1]第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

提 要:目的 研究抗胆碱能药物解磷复方和红景天对低压缺氧复合梭曼中毒大鼠脑损伤的作用效果。方法 72只Wistar大鼠分为缺氧对照、缺氧复合梭曼中毒、解磷复方治疗和解磷复方与红景天复方治疗等共4组。动物梭曼(72 μg/kg,sc)中毒后置低压舱内(62 kPa)缺氧48 h,于12、24、48 h等时间点处死动物取脑组织。用生化法测脑组织伊文思蓝(evans blue, EB)含量和磷脂酶A_2(phospho lipase, PLA_2)活性,放射免疫法测钙调蛋白(Calmodulin, CaM)含量。结果 缺氧复合梭曼中毒明显升高大鼠脑组织EB含量、PLA_2活性和CaM含量。抗胆碱能药物解磷复方能明显降低缺氧复合梭曼中毒引起的大鼠脑组织EB含量、PLA_2活性和CaM含量变化,解磷复方和红景天组成的抗毒复方进一步加强上述作用。结论 解磷复方和解磷复方加红景天复方均可对抗缺氧复合梭曼中毒引起的脑损伤,后者作用比前者强。

关键词:梭曼;缺氧;红景天
中图法分类号:R595;R845.22;R979.3 文献标识码:A

Study of the protective effect of mediccation on rat brain damage induced by soman intoxication combined with hypoxia

LIN Hai[1], ZHAO Ji-qing[1], YUN Liu-hong[2], RUAN Jin-xiu[2], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Academy of Military Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of anticholinergic antidote and rhodosin on the brain injury induced by soman intoxication combined with hypobaric hypoxia in rats. **Methods** A total of 72 Wistar rats were divided into 4 groups: hypoxia control (HC), hypoxia plus soman (HS), hypoxia plus soman plus anticholinergic antidote (HSAA), and hypoxia plus soman plus anticholinergic antidote plus rhodosin (HSAAR). The animals after soman intoxication (72 μg/kg) were placed in a hypobaric (62 kPa) apparatus for hypoxic exposure for 48 h. Rats were sacrificed for brain tissue detachment at the time points of 12, 24, and 48 h. Evans blue (EB) content and PLA_2 activity were detected biochemically. CaM concentration was determined by radioimmuno assay. **Results** Compared with the rats in HC, soman induced significant increases of brain EB, PLA_2, and CaM at 12, 24, and 48 h in HS. Elevated EB, PLA_2, and CaM induced by hypoxia and soman intoxication in rats in group HSAA were obviously attenuated by anticholinergic antidote. More significant decreases of brain EB, PLA_2, and CaM were found in rats in group HSAA. **Conclusion** Both anticholinergic antidote and anticholinergic antidote plus rhodosin have the preventive effect on rat brain damage induced by soman intoxication combined with hypoxia.

Key words: soman; hypoxia; rhodosin

以梭曼为代表的神经性毒剂是最重要的化学战剂之一,中毒病死率极高,抗毒急救措施对降低病死率非常重要。抗胆碱能药物解磷复方是救治神经性毒剂中毒的一个新型抗毒复方药物。我们的前期工作业已证实,常氧条件下,解磷复方对神经性毒剂中毒的救治效果良好,但对低压缺氧条件神经毒中毒的疗效尚待阐明[1]。本实验以大鼠脑组织伊文思蓝(Evans blue, EB)、钙调蛋白(Calmodulin, CaM)含量及磷脂酶A_2(phospholipase A_2, PLA_2)活性为观测指标,对比研究解磷复方和及其与抗缺氧药物红景天组成的抗毒新方对缺氧复合梭曼中毒大鼠脑损伤的保护作用。

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L015)
Supported by the Mandatory Scientific Research Projects of the "Ninth Five-year Plan" of PLA (96L015)
作者简介:林 海(1975-),男,贵州省都匀市人,硕士研究生,助教,主要从事神经毒理机制方面的研究。电话:(023)68752356,E-mail:linhai106@hotmail.com
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2003-10-24;修回日期:2004-03-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 主要药品和仪器

1.1.1 主要药品 梭曼：军事医学科学院六所提供，纯度为 96.4%；抗胆碱能药物解磷复方由军事医学科学院六所提供；红景天购自四川蓝宝石制药公司；CaM 试剂盒购于解放军总医院。伊文思蓝、甲酰胺、卵磷脂、对硝基苯磷酸、苯甲酰磺酰氟：Sigma 产品；去氧胆酸钠：分析纯，SERVA 进口分装；[^{32}P] ATP 由北京福瑞公司提供；其它化学试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器 UV-2201 型紫外分光光度计：岛津，日本；PXJ-1B 型数字式离子计：日本；全自动闪烁计数仪为德国产品。小动物低压舱由本室研制，低压舱内温度、湿度与外界环境相同。

1.2 动物分组和处理

Wistar 大鼠 72 只雌雄不拘，体质量 180～280 g，由本校实验动物中心提供。实验期间动物进食、饮水不限制。将动物分为缺氧对照(Hc 组)、缺氧梭曼中毒(Hs 组)、缺氧梭曼中毒＋解磷复方(Hsaa 组)、缺氧梭曼中毒＋抗毒复方(解磷复方＋红景天 0.5 g/kg)治疗(Hsaar 组)等共 4 组，每组 18 只。分别于致伤或治疗后 12、24 和 48 h 等 3 个时相点处死动物并取材。每组各时相点 6 只大鼠。

各组动物预先在低压舱内(62 kPa)缺氧 6 h 后注射梭曼中毒(72 μg/kg，sc)，Hc、Hs、Hsaa、Hsaar 组实验动物在中毒 3 min 后分别经皮下注射 0.5 g/kg 等剂量生理盐水、解磷复方、抗毒复方，再将动物置于低压舱内继续留置 12、24、48 h。以颈椎脱臼法处死大鼠，置冰上取脑，同时缺氧对照组在相应时相点活杀取脑组织待检。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 脑组织伊文思蓝含量测定 伊文思蓝标记白蛋白的方法和其在脑组织中的含量测定参照文献[2]的方法进行。

1.3.2 脑组织磷脂酶 A_2 的活性的测定 脑组织中磷脂酶 A_2(PLA_2)活力测定按照文献[3]方法。

1.3.3 脑组织 CaM 含量的测定 采用北京解放军总医院提供的 ^{3}H-cGMP 放免试剂盒测定。

1.4 统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析及均数间多重组比较。

2 结果

2.1 脑组织伊文思蓝含量的变化

各组动物脑组织伊文思蓝含量变化见表 1。解磷复方治疗组和抗毒复方治疗组大鼠脑组织伊文思蓝含量在中毒后 12、24、48 h 明显低于缺氧梭曼中毒组；且抗毒复方治疗组明显低于解磷复方治疗组。

表 1 鼠脑组织伊文思蓝含量的变化($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

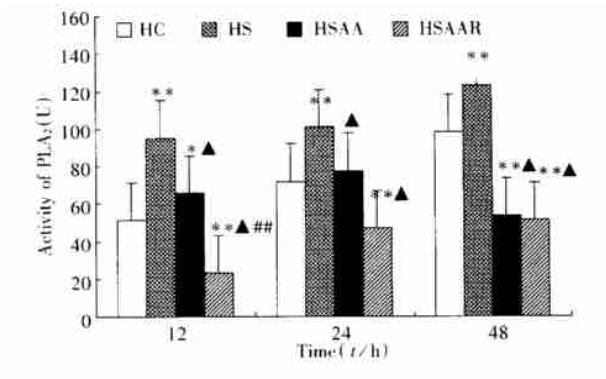
Tab 1 Changes of Evans blue content (μg/100 mg tissue) in rat brain tissue ($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Group	n	Time after soman intoxication (h)		
		12	24	48
HC	6	3.73±0.64	5.31±0.73	7.51±1.31
HS	6	7.85±0.26 *	9.63±0.92 **	11.89±1.11 **
HSAA	6	5.36±0.35 *▲	5.52±0.24 ▲	4.33±0.06 **▲
HSAAR	6	4.07±0.58 ▲#	3.53±0.55 *▲#	2.34±0.18 **▲##

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* HC；▲：$P<0.01$，*vs* HS；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* HSAA

2.2 脑组织 PLA_2 活性的变化

解磷复方治疗组和抗毒复方治疗组脑组织 PLA_2 活性在中毒治疗后 12、24 和 48 h 明显低于缺氧梭曼中毒组；且抗毒复方治疗组在中毒治疗后 12、24 h 明显低于解磷复方治疗组($P<0.01$)见图 1。



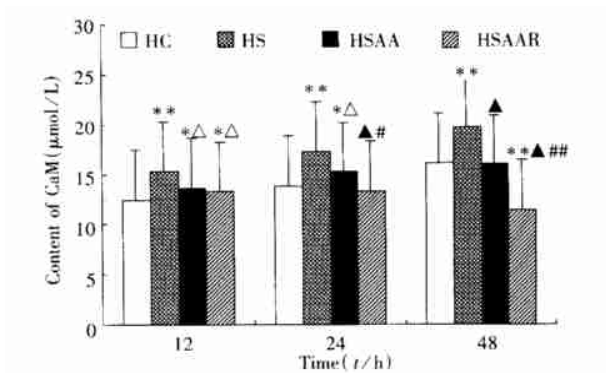
*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* Hc；▲：$P<0.01$，*vs* Hs；##：$P<0.01$，*vs* H

图 1 鼠脑组织 PLA_2 活性的变化

Fig 1 Changes of PLA_2 activity in rat brain tissue

2.3 脑组织 CaM 含量的变化

解磷复方治疗组和抗毒复方治疗组脑组织 CaM 含量在中毒治疗后 12、24 和 48 h 明显低于缺氧梭曼中毒组；且抗毒复方治疗组在中毒治疗后 24、48 h 明显低于解磷复方治疗组($P<0.05$ 或 $P<0.01$，见图 2)。



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* HC；▲：$P<0.01$，*vs* HS；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$，*vs* HSAA

图 2 鼠脑组织 CaM 含量变化

Fig 2 Changes of CaM content in rat brain tissue

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

梭曼是最重要的化学战剂之一, 进入机体迅速抑制乙酰胆碱酯酶, 导致神经递质乙酰胆碱在脑内的蓄积和中枢神经系统功能紊乱[4]。文献[5]指出, 中毒后所造成的脑供氧不足可能参与了中毒脑损伤的过程。缺氧是高原地区的重要环境因素之一, 对于初入高原者, 由于缺氧的影响容易引起以水肿为特征的脑损伤[6]。迄今尚不清楚缺氧与神经性毒剂中毒对中枢神经系统的复合效应机制。本实验结果证实, 缺氧复合梭曼中毒动物脑组织 EB 含量、CaM 含量和 PLA_2 活性均显著高于缺氧对照组动物。中毒后 12 h, 分别为对照组的 210.5%、123.1%和 185.8%, 以 EB 含量变化最为明显, 说明缺氧和中毒对脑具有复合损伤效应。

本研究表明, 缺氧复合梭曼中毒动物脑组织 EB 升高非常显著, 与文献[7]报道脑组织含水率的结果相一致, 提示缺氧与梭曼中毒导致了中枢神经系统的血脑屏障损伤, 其原因可能与 Ca^{2+} 超载有关。

CaM 已被证实是介导 Ca^{2+} 造成多种细胞病理性损害的主要介质, 对损伤性反应比 Ca^{2+} 更为敏感, 可作为脑内 Ca^{2+} 聚积的重要标志。用 PC12 细胞进行的离体实验业已证实, 缺氧和梭曼两种不同性质的损伤均可单独引起细胞内 Ca^{2+} 含量的显著增加[8,9], 本研究以整体动物研究表明, 缺氧大鼠梭曼中毒后脑组织 CaM 含量明显高于缺氧对照组。在细胞内, Ca^{2+} 与 CaM 形成 Ca^{2+}-CaM 复合物, 后者可通过激活蛋白激酶 C、A 和磷脂酶 A 等, 造成神经细胞蛋白质和磷脂代谢紊乱, 加重神经细胞继发性损害。Ca^{2+}-CaM 复合物还可通过调节肌球状蛋白轻链激酶参与脑血管平滑肌的收缩作用, 导致血脑屏障通透性增高, 可能是脑组织 EB 含量增加的原因之一。本研究还提示, 缺氧复合梭曼中毒后大鼠脑组织 PLA_2 活性明显升高, 可能是导致动物脑组织 EB 含量增加的间接原因。PLA_2 是 Ca^{2+} 依赖性酶类, 激活后以多种方式影响细胞功能, 损害突触体膜, 膜磷脂降解, 产生溶血卵磷脂和游离脂肪酸。当游离脂肪酸增加时, 严重影响中枢能量代谢、血脑屏障通透性和膜离子梯度改变, 使水进入细胞内, 导致血脑屏障结构异常和通透性增加, 诱发脑组织水肿。

本实验中对梭曼中毒动物采用了两种抗毒救治方案, 即解磷复方治疗和抗毒复方治疗。实验结果表明, 解磷复方能有效地降低梭曼和缺氧所引起的脑组织伊文思蓝含量升高, 也可明显对抗梭曼和缺氧所引起的脑组织 PLA_2 活性及 CaM 含量增加。这些结果提示, 胆碱能机制在缺氧复合梭曼中毒引起的水肿性脑损伤、磷脂代谢和钙平衡障碍中起重要作用, 而解磷复方是对抗上述脑损伤的有效措施。

由本研究结果可见, 中毒 12 ~48 h, 抗毒复方能进一步反转梭曼和缺氧两种损伤因素引起的大鼠脑组织伊文思蓝含量、CaM 含量和 PLA_2 活性的增加。在 24 h, 抗毒复方对脑组织伊文思蓝含量的作用比解磷复方强 20.6%, 对 PLA_2 的作用比解磷复方强 30.5%, 对 CaM 的作用比解磷复方强 11.4%。本结果提示, 红景天能加强解磷复方的药物疗效。

红景天是从药用植物提取的有效成分。文献[10]报道, 红景天具有抗缺氧、抗疲劳、抗毒、抗微波辐射等的作用。该药既能降低氧耗速度, 又能加大动、静脉血的氧压差, 从而增强动物对缺氧的耐力[11]。本研究中红景天的作用可能与其抗缺氧效应有关, 详细机制尚待深入研究。

参考文献:

[1] 董兆君, 赵吉清, 吴　强, 等. 模拟高原缺氧复合梭曼中毒脑损伤特点及其救治[J]. 卫生毒理学杂志, 1999, 13(3): 185－186.

[2] Saria A, Lundberg J M. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues[J]. J Neurosci Methods, 1983, 8(1): 41－49.

[3] 陈思锋, 吴中力, 丁自强, 等. 狗急性胰腺炎时磷脂酶 A_2 的变化及其在急性肺损伤中的作用[J]. 第二军医大学学报, 1989, 10(2): 105－109.

[4] 欧阳子倩, 王廷治. 防化医学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 137－139.

[5] Mcleod C G. Pathology of nerve agents: perspectives on medical management[J]. Fundam Appl Toxicol, 1985, 5(Pt 2): S10－16.

[6] 杨利孙, 章　翔, 易声禹. 脑损伤后脑循环障碍的机制及其与脑水肿的关系[J]. 中华创伤杂志, 2000, 16(1): 49－51.

[7] 董兆君, 吴　强, 赵吉清, 等. 化学中毒与急性缺氧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.

[8] 赵吉清, 吴　强, 王仕丽, 等. 缺氧复合梭曼 PC12 细胞[Ca^{2+}]、cAMP、CaM 和 Ca^{2+}/CaM-PK Ⅱ的变化[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(2): 169－171.

[9] 赵吉清, 吴　强, 李云鹏, 等. 磷脂酶 A_2 在模拟高原梭曼中毒性脑损伤中的变化[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(10): 1131－1132.

[10] 汪家春, 张　慧. 红景天复方增强红细胞免疫粘附功能的作用[J]. 海军医学杂志, 2001, 22(2): 102－105.

[11] 王晓松, 房家智, 张晓艳. 红景天甙、酮对大鼠心血管功能的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1996, 22(1): 7－9.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net