DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.001
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1131-02

论著

磷脂酶 A_2 在模拟高原梭曼中毒性脑损伤中的变化

赵吉清,吴 强,李云鹏,王仕丽,董兆君 (第三军医大学预防医学系毒理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨磷脂酶 A_2(PLA_2)在缺氧复合梭曼中毒脑损伤的作用机制。方法 应用微量滴定、放免法从动物整体水平观察了高原缺氧、梭曼中毒单一与复合致伤后12、24、48 h大鼠脑组织含水率(WCB)、伊文思蓝(EB)含量、PLA_2 的活性、环磷酸腺苷(cAMP)含量的变化。结果 高原中毒组脑组织伊文思蓝含量、PLA_2 的活性、ADP、AMP、cAMP 含量在中毒后24、48 h明显高于平原中毒组、高原对照组和正常对照组,应用钙通道阻断剂尼莫地平可明显降低 PLA_2 活性,减轻缺氧中毒后脑组织水肿。结论 磷脂酶 A_2、腺苷酸环化酶的激活可能参与高原缺氧复合梭曼中毒脑损伤。

关键词:缺氧;梭曼;磷脂酶 A_2;环磷酸腺苷
中图法分类号:R345.61;R742.8;R845.22 文献标识码:A

Changes of PLA_2 in the brain of soman intoxication combined with hypoxia

ZHAO Ji-qing, WU Qiang, LI Yun-peng, WANG Shi-li, DONG Zhao-jun (Department of Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clarify the mechnisim of PLA_2 in the brain of soman intoxication combined with hypoxia injury. Methods cAMP, PLA_2, Evans blue (EB) and water content of the brain tissue (WCB) were measured in rat after combined soman and acute hypoxia injury with microtitration and RIA. Results The level of cAMP, Evans blue and PLA_2 activity were significantly higher in soman intoxication combined hypoxia than that of simple soman intoxication group, simple hypoxic group at 24, 48 h and Control group. Additionally, nimodipine was effective in inhibiting PLA_2 activity and reducing brain edema. Conclusion Activation of PLA_2 and cAMP are involved in the damage of the brain in combined soman and hypoxia injury.

Key words: hypoxia; soman; PLA_2; cAMP

以梭曼(Soman)为代表的神经性毒剂,是不可逆性胆碱酯酶(ChE)抑制剂,因其具有毒性大,作用快,难防难治的特点,使中枢神经系统功能及代谢紊乱,可使中毒动物惊厥甚至死亡[1,2]。尤其在高原地区毒性加大。其发病机制涉及多个环节,本实验对磷脂酶 A_2(Phospholipase A_2, PLA_2)的活性在脑水肿发病机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 动物和药品

Wistar大鼠60只,雌雄不拘,体重180~220 g。随机分为平原对照组(Control,6只),平原中毒组(Ⅰ组,18只),高原对照组(Ⅱ组,18只),高原中毒组(Ⅲ组,18只),尼莫地平治疗组(Ⅳ组,6只)。

梭曼(纯度94.28%)由军事医学科学院六所提供,临用前以生理盐水配制溶液;cAMP放免试剂盒:购自上海中医学院;伊文思蓝(Evans blue, EB)、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。

1.2 方法

平原对照组直接取样;高原对照组和高原中毒组动物均预先在模拟高原4 000 m环境中停留6 h,中毒组大鼠再皮下注射梭曼后继续停留在低压舱12、24、48 h取样,同时对照组在相应时相点活杀取脑组织。尼莫地平治疗组在大鼠高原缺氧中毒后1 h用尼莫地平按每日5 mg/kg分次注入腹腔。

1.3 检测指标

1.3.1 脑组织含水率、伊文思蓝含量及脑组织 PLA_2 活性的测定 大鼠放血活杀后,取200 mg左右的脑组织精确称重后,经80 ℃,72 h烘干,求得脑组织含水率。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 Saria 等[3]的方法进行。脑组织中 PLA_2 活力测定参照陈思锋[4]法。

1.3.2 脑组织海马、小脑、皮层 cAMP 含量的测定 分别采用上海中医学院同位素室提供的^{125}I放免试剂盒测定沉淀的γ放射性测定。

1.4 统计学处理

采用SPSS10.0对各组数据行方差分析。

2 结果

2.1 脑组织含水率、伊文思蓝、PLA_2 活性的变化

高原中毒组脑组织含水率、EB含量、PLA_2 活性的变化随时间延长而递增;而伊文思蓝含量、PLA_2 活性在48 h明显高于其它时相点;各时相点均明显高于平原中毒组,高原对照组和正常对照组。尼莫地平治疗后脑组织中 PLA_2、脑组织含水率、EB含量与高原缺氧中毒组比较明显减少。多因素方差分析表明,高度因素和时间因素均对伊文思蓝含量有显著的影响,且交互作用明显,见表1。

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L015)
作者简介:赵吉清(1970-),男,山东省牟平县人,硕士,讲师,主要从事神经毒理方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752356
收稿日期:2000-11-27;修回日期:2001-05-19

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

表1 脑组织含水率、伊文思蓝含量、PLA_2 活性的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of water content, Evans blue and PLA_2 in brain tissue($\bar{x}\pm s$)

		n	Water content(%)	Evans blue(μg/g)	PLA_2(U)
Control		6	76.77±1.57	22.7±5.3	21.15±2.84
Ⅰ	12 h	6	78.96±1.57 *	56.3±7.9 **	49.87±4.94 **
	24 h	6	78.91±1.67 *	43.7±6.7 **	42.36±5.67 **
	48 h	6	78.46±1.96 *	35.1±7.4 *	33.00±5.73 **
Ⅱ	12 h	6	78.68±1.96 *	37.3±6.4 *	51.16±6.51 **
	24 h	6	79.37±1.42 *	53.1±7.3 **	71.93±(6.31 **
	48 h	6	80.37±1.39 **	75.1±13.1 **	98.33±11.65 **
Ⅲ	12 h	6	79.78±1.54 **	78.3±14.4 **△△	95.07±7.70 **
	24 h	6	80.56±1.40 **	96.3±18.2 **△△★	100.91±11.24 **△△★
	48 h	6	80.97±1.83 **△	118.9±28.3 **△△★	123.13±12.85 **△△★
Ⅳ		6	77.54±1.48 #	48.2±11.2 ##	68.36±7.08 ##

Ⅰ: Soman intoxication at sea level; Ⅱ: Simulated high altitude; Ⅲ: Soman intoxication at high altitude; Ⅳ: Nimodipine treament group; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* Ⅰ at the same time point; ★: $P<0.01$ *vs* Ⅱ at the same time point; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* Ⅲ at the 48 h

2.2 海马、小脑、皮层 cAMP 含量测定

高原中毒组海马、皮层、小脑组织 cAMP 含量随时间延长而递增，在 48 h 明显高于其它时相点；各时相点均明显高于平原中毒组、高原对照组和正常对照组($P<0.01$)。多因素方差分析表明，高度因素和时间因素均对 cAMP 含量有显著的影响，且交互作用明显，见表2。

表2 海马、小脑、皮层环腺苷酸含量的变化(μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of content of cAMP in brain tissue(μmol/L, $\bar{x}\pm s$)

	n		Time after soman intoxication(h)		
			12	24	48
Hippocampus					
Control	6	62.38±2.71			
Ⅰ	6		124.32±5.69 **	99.52±6.13 **	75.10±4.93 **
Ⅱ	6		91.18±4.54 **	119.84±4.88 **	175.54±7.01 **
Ⅲ	6		137.57±4.94 **△△★	174.10±6.91 **△△★	215.59±10.0 **△△★
Cerebellum					
Control	6	49.98±4.04			
Ⅰ	6		103.14±6.45 **	87.86±3.33 **	56.29±4.19 *
Ⅱ	6		87.63±6.39 **	113.81±3.96 **	160.37±6.97 **
Ⅲ	6		138.96±5.21 **△△★	162.24±7.39 **△△★	183.07±10.8 **△△★
Cortex					
Control	6	38.08±2.83			
Ⅰ	6		92.96±3.68 **	77.43±3.32 **	43.03±2.40 *
Ⅱ	6		72.31±6.26 **	109.00±5.53 **	138.62±5.52 **
Ⅲ	6		121.99±5.54 **△△★	149.20±5.98 **△△★	185.67±5.39 **△△★

Ⅰ: Soman intoxication at sea level; Ⅱ: Simulated high altitude; Ⅲ: Soman intoxication at high altitude; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; △△: $P<0.01$ *vs* Ⅰ at the same time point; ★: $P<0.01$ *vs* Ⅱ at the same time point

3 讨论

缺氧是引起高原条件下脑损伤的主要原因。现已证实梭曼中毒可引发脑组织缺氧性损伤[5]；同时梭曼中毒性惊厥也能直接引起和加重机体缺氧[6]。本实验主要研究模拟高原条件下缺氧复合梭曼中毒脑损伤的特点。本实验用伊文思蓝法定量经血管渗漏到组织中的白蛋白可直接映血管的通透性，结果表明高原缺氧复合梭曼中毒时，损伤程度明显高于单纯中毒和高原缺氧，且具有损伤早而重的特点。

文献[7]报道高原缺氧复合梭曼中毒由于能量代谢抑制及衰竭使神经细胞膜功能障碍，导致胞内钙浓度升高引起高原缺氧复合梭曼中毒脑损伤。细胞内游离钙升高的直接后果是激活有细胞损伤效应的 $[Ca^{2+}]i$ 依赖性磷脂酶。PLA_2 作为一种 Ca^{2+} 依赖性酶类，其激活、表达与细胞内 Ca^{2+} 调控关系密切。PLA_2 活化后水解脑细胞膜，释放出磷脂，使细胞膜完整性受损，进而降低依赖膜完整性的酶，ATP 酶为其中一种，又可通过 Ca^{2+} 积聚，活化 PLA_2，形成恶性循环[8]。本实验中无论单纯梭曼中毒和高原缺氧脑组织中 cAMP 含量、PLA_2 活性均明显高于正常组，而高原缺氧复合梭曼中毒组中上述指标呈进行性升高，且明显高于单纯梭曼中毒和高原缺氧组。表明缺氧和梭曼中毒均可使 PLA_2 活性升高，细胞能量代谢障碍，细胞内钙超载，形成脑水肿[9]，并且 cAMP 也可能参与了 PLA_2 的激活，应用钙通道阻断剂尼莫地平可明显降低 PLA_2 活性，说明尼莫地平作用于血管平滑肌及神经细胞膜上 L 型通道，拮抗细胞内钙超载，改善脑缺血、缺氧，消除了诱使 PLA_2 升高的病因，减轻缺氧中毒后脑组织水肿。另外，研究发现缺氧和梭曼中毒时，严重影响或损害 ATP 功能，引起氧自由基生成增多，自由基可直接激活 PLA_2[10]。磷脂酶 A_2 激活后以多种方式影响细胞功能，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，诱发脑组织水肿。

参考文献：

[1] 余争平，程天民. 模拟高原缺氧条件下梭曼中毒的神经毒作用[J]. 第三军医大学学报，1997，19(3)：187－190.

[2] Koelle G B. Organophosphate poisoning an overview[J]. Fund Appl Toxicol，1981，1(2)：129－134.

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

[4] 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.

[5] Petras J M. Neurology and neuropathology of soman-induced brain injury：an overview[J]. J Exp Anal Behav，1994，61(2)：319－329.

[6] Goldman H，Berman R F，Hazlett J，*et al*. Cerebrovascular responses to soman：time and dose dependent effects[J]. Neurotoxicology，1993，14(4)：469－483.

[7] 吴 强，董兆君，魏相德. 梭曼中毒复合缺氧损伤对 PC12 细胞游离钙的影响[J]. 第三军医大学学报，1997，19(4)：346－348.

[8] 陈光福. 磷脂酶 A_2 与感染性脑水肿[J]. 国外医学：神经病学·神经外科学分册，1999，26(4)：188－190.

[9] 赵吉清，吴 强，董兆君 等. 谷氨酸在模拟高原梭曼中毒性脑损伤的作用研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(6)：630－632.

[10] 赵吉清，吕宏宇，魏相德，等. 模拟高原大鼠梭曼中毒后肺中磷脂酶 A_2、ACE 及 TNFα 的变化[J]. 第三军医大学学报，1997，19(5)：448－450.

（编辑 冯崇英）

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