DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.008
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0631-04

论著

缺氧条件下梭曼中毒对大鼠脑M受体的影响

吴 强,林 海,董兆君 (第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨高原缺氧条件下梭曼中毒大鼠脑组织乙酰胆碱酯酶(AChE)活性和毒蕈碱样乙酰胆碱(M)受体变化规律。方法 以DTNB法和受体放射性配基结合法检测大鼠皮层、海马及纹状体AChE活性和M受体密度及亲和力。结果 缺氧使大鼠脑组织AChE活性不同程度升高,缺氧24 h海马和纹状体M受体密度分别增加10.4%和25.3%,M受体的亲和力分别增加55.6%和30.3%。单纯梭曼中毒和缺氧复合梭曼中毒均显著抑制脑组织AChE活性,但缺氧条件下梭曼对大鼠海马和纹状体的AChE抑制程度减弱。缺氧和缺氧复合梭曼中毒脑损伤以纹状体最明显。结论 高原缺氧和梭曼中毒均明显干扰大鼠脑组织胆碱能神经系统功能。

关键词:高原;梭曼中毒;缺氧;M受体
中图法分类号:R392.11;R971.9 文献标识码:A

Effects of soman intoxication under hypoxia on cerebral M receptors of rats

WU Qiang, LIN Hai, DONG Zhao-jun (Department of Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of soman intoxication under high altitude hypoxia on muscarinic acetylcholine receptors (M receptors) and the mechanism of the increase of toxicity in the nervous tissue in high altitude. Methods The activity of acetylcholine esterase (AChE) and the density and affinity of M receptors in the cerebral cortex, hippocampus and striatum were measured with DTNB method and receptor radioligand binding method. Results Hypoxia increased the activity of AChE in different degrees. After 24 hours of hypoxia, the density of M receptors was increased by 10.4% and 25.3% in the hippocampus and striatum respectively and the affinity of M receptors was increased by 55.6% and 30.3%. Both simple soman intoxication and combined soman intoxication and hypoxia inhibited significantly the activity of AChE in brain tissues. But under hypoxia, the inhibition of soman on AChE in the hippocampus and striatum was attenuated. The damages resulting from hypoxia or combined hypoxia and soman intoxication were most severe in the striatum. Conclusion High altitude soman intoxication and hypoxia both significantly interfere in the functions of the cholinergic nervous system in the brain.

Key words: high altitude; soman intoxication; hypoxia; muscarinic acetylcholine recepter; rat

有机磷毒剂——梭曼(Soman),是一种强有力的胆碱酯酶(Cholinesterase, ChE)抑制剂。梭曼中毒具有毒性大,作用快,难防难治的特点,因而是外军竞相装备的化学战剂[1]。在高原条件下梭曼的毒性较平原明显增强,显然,高原缺氧加重了梭曼的毒性效应。脑对于神经性毒剂及高原缺氧均十分敏感,神经系统,尤其是中枢胆碱能系统是神经性毒剂的重要效应器官[2],高原条件下神经性毒剂毒性升高与胆碱能系统有十分重要的关系。本研究利用DTNB显色法和放射性配基结合法,系统分析了缺氧条件下梭曼中毒大鼠皮层、海马及纹状体乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinease, AChE)和M受体(Muscarinic acetylcholine receptor)的变化,旨在探讨M受体在高原缺氧脑损伤中的作用及高原条件下神经

基金项目:全军"九五"攻关项目(96L063)
作者简介:吴 强(1970—),男,四川省成都市人,硕士研究生,助教,主要从事高原神经毒毒理作用的方面的研究。电话:(023)68752356
收稿日期:1999-10-11;修回日期:2000-04-17

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

性毒剂毒性升高的机制，为缺氧相关疾病和高原神经中毒的预防及救治提供更充实的理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar大鼠60只，体重(250±30)g，雌雄不拘，由本校动物所提供。随机分为对照组(6只)、平原中毒组(Ⅰ组，18只)、高原缺氧组(Ⅱ组，18只)和高原缺氧中毒组(Ⅲ组，18只)，设置中毒后8、24、72 h 3个时相点，每时相点6只动物。

1.2 药品

梭曼，纯度94.6%，军事医学科学院提供；[^{3}H]-QNB为Amersham产品，总放射性51 Ci/mmol；硫化乙酰胆碱(Acetylcholine sulfide，S-ACh)、DTNB(5，5 thiobis-2-nitrobenzoic acid)购自Fluka；十二烷基硫酸钠(Sodium lauryl sulphare，SDS)购自BM。

1.3 仪器

紫外可见光分光光度计(日本岛津)，γ-射线液体闪烁计数仪(荷兰)，小动物低压舱本室自制。

1.4 动物模型

平原(以重庆地区作为近似平原，海拔300 m)各组动物皮下注射72 μg/kg的梭曼(对照组以生理盐水代替)，分别于中毒后8、24、72 h断头处死取样，高原中毒组预先于低压舱(相当于高原4 000 m)停留6 h后注射相同剂量的梭曼，继续减压8、24、72 h后处死取样。

1.5 检测指标和方法

1.5.1 脑组织AChE活性的测定 参照文献[3]进行反应介质为0.025 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)，反应体系含1 nmol/L的S-ACh，以3%的SDS终止反应，0.2%的DTNB 1 ml显色，412 nm波长比色。

1.5.2 脑组织M受体的[^{3}H]-QNB结合分析[4] 分离的脑区以0.32 mol/L蔗糖溶液匀浆，1 000×g离心10 min，取上清用于膜受体分析；反应介质为0.05 mol/L，pH 7.4磷酸盐缓冲液，非特异管中加入1 μmol/L的阿托品。受体分析结果作饱和曲线和Scatchard图，以B_{max}表示受体密度、解离常数Kd表示亲和力(Kd值与亲和力成反比)。

1.5.3 Lowry法测定组织蛋白含量，以牛血清白蛋白作标准。

1.6 统计学分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用双因素方差分析判断各组数据差别的显著性。

2 结果

2.1 缺氧条件下梭曼中毒大鼠脑组织AChE的变化

实验结果显示，单纯梭曼中毒大鼠各脑区的AChE都受到了不同程度的抑制，以纹状体最甚，海马其次，皮层最轻。中毒后24 h，皮层酶活性已基本恢复，海马和纹状体酶的抑制约50%，72 h时，皮层和海马AChE活性完全恢复，而纹状体酶的抑制仍维持在50%；缺氧条件下4 000 m大鼠脑组织AChE活性则出现了不同程度得的升高，且在高原停留时间越长，升高越明显，以纹状体最为明显，海马次之；缺氧条件下梭曼中毒各脑区AChE都受到不同程度的抑制，但与平原中毒组相比，AChE活性有升高趋势，且存在时效关系，见表1。

表1 缺氧条件下梭曼中毒对大鼠脑AChE活性的影响(λ_B/μmol·min^{-1}·mg^{-1}，$\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab 1 Effects of soman intoxication or/and simulate high altitude on AChE activity in rat brain (λ_B/μmol·min^{-1}·mg^{-1}，$\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Group	Control	Time after intoxication (h)		
		8	24	72
Cortex	1.078±0.084			
Ⅰ		0.742±0.082 *	0.954±0.088	1.032±0.068
Ⅱ		1.072±0.11	0.998±0.066	1.166±0.078
Ⅲ		0.79±0.038 *	0.834±0.094 *	1.172±0.098
Hippocampus	1.452±0.138			
Ⅰ		0.686±0.074 **	0.732±0.056 **	0.93±0.074 *
Ⅱ		1.296±0.082 *	1.298±0.132	2.07±0.164 **
Ⅲ		0.682±0.056 **	0.908±0.072 *#	1.732±0.112 *#
Striatum	3.478±0.212			
Ⅰ		2.352±0.102 *	1.978±0.13 **	2.05±0.164 **
Ⅱ		3.702±0.116	4.064±0.238 *	4.162±0.134 *
Ⅲ		2.362±0.146 *	3.234±0.174 ##	3.51±0.148 ##

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* group Ⅰ

2.2 缺氧条件下梭曼中毒脑组织M受体密度的变化

M受体检测结果显示，单纯梭曼中毒对皮层和海马M受体B_{max}影响不大，仅在24 h出现降低($P<0.05$)，而纹状体在8、24、72 h的变化都非常显著，且在72 h降到最低($P<0.01$)；高原缺氧大鼠皮层和海马B_{max}才出现明显变化，而纹状体在24 h就有明显降低；缺氧条件下梭曼中毒B_{max}较正常有不同程度的下降，在后期皮层和纹状体与单纯中毒相比，呈上升趋势，以纹状体变化最为显著，见表2。

2.3 缺氧条件下梭曼中毒脑组织M受体亲和力的变化

单纯梭曼中毒在早期即Kd出现升高，后升高幅度逐渐下降，至72 h已基本恢复到正常水平；高原缺氧对大鼠海马和纹状体M受体的Kd影响非常显著，分别由正常对照的0.133、0.109 nmol/L降低至72 h的0.046、0.056 nmol/L；高原缺氧条件下梭曼中毒大脑皮层Kd明显升高，但随时间增加而有下降趋势，海马和纹状体Kd与单纯中毒组相比，呈明显下降趋势，且具显著统计学意义。

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

表 2　缺氧条件下梭曼中毒大鼠脑 M 受体密度的变化(fmol/mg, $\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Tab 2　Changes of M receptor density after soman intoxication and simulate high altitude (fmol/mg, $\bar{x}\pm s$, $n=4$)

	Control	Time after intoxication(h)		
		8	24	72
Cortex	1 728±203			
Ⅰ		1 678±182	1 582±128	1 715±193
Ⅱ		1 750±56.5	1 828±157 *	1 861±172 *
Ⅲ		1 896±138 *#	1 741±134 #	1 784±112
Hippocampus	1 338±107			
Ⅰ		1 288±128	1 100±53.7 *	1 470±202
Ⅱ		1 353±161	1 477±72.9	1 594±219
Ⅲ		1 388±168	1 074±126 *	1 317±70.4
Striatum	2 141±93.2			
Ⅰ		1 991±136	1 524±69.8 **	1 508±150 **
Ⅱ		1 997±224	2 683±133 **	2 365±105 *
Ⅲ		2 046±150	2 109±106 ##	2 202±124 ##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$; ##: $P<0.01$ *vs* group Ⅰ

3　讨论

缺氧性脑损伤是近年来神经科学领域的重要研究课题[5]。低氧是高原环境的显著特征, 快速进入高原的人群容易发生缺氧性脑损伤[6]。梭曼是难防难治的军用毒剂之一, 主要中毒机制是抑制胆碱酯酶, 进而扰乱胆碱能神经系统功能, 故脑组织是其主要靶器官[7]。因此, 脑是对缺氧和梭曼中毒都很敏感的器官, 高原缺氧和梭曼中毒两因素作用下中枢胆碱能系统的变化如何, 国内外未见报道。既往研究证实, 高原缺氧条件下梭曼的毒性明显加强, 原因尚不清楚, 胆碱能机制可能在其中起重要作用[8]。本实验对比研究高原缺氧复合梭曼中毒大鼠各脑区 AChE、M 受体的变化。结果发现, 无论单纯梭曼中毒或高原缺氧复合梭曼中毒, 其共同特点是显著抑制各脑区 AChE 活性, 并有降低 M 受体密度和其亲和力的作用趋势。各脑区的敏感性依次为纹状体>海马>皮层。这种区域的敏感性差异可能与脑组织中胆碱能纤维分布有关。

单纯缺氧对各脑区 AChE 活性的作用不完全相同, 纹状体 AChE 活性升高 16.8%(24 h)和 19.6%(72 h), 海马 AChE 活性升高 42.6%(72 h), 对皮层 AChE 活性影响不大。目前对缺氧导致脑组织 AChE 活性升高的原因尚不明了, 可能与机体的应激反应有关。由于 AChE 是梭曼的主要生化靶位, 高原缺氧既然使得脑组织 AChE 活性升高, 复合梭曼中毒时各脑区的 AChE 的抑制程度应小于单纯梭曼中毒。进一步研究证实, 高原缺氧 24 h 梭曼对大鼠海马和纹状体的 AChE 抑制程度分别降低 20.0%和 22.8%。这些结果提示, 缺氧条件下脑组织胆碱酯酶对梭曼的敏感性有所下降。但由于梭曼毒性强大, 酶敏感性的降低不一定能有效改善梭曼的毒性效应。本实验发现, 缺氧 24 h 海马和纹状体 M 受体密度分别增加 10.4%和 25.3%; 而上述各脑区 M 受体的亲和力在缺氧 24~72 h 呈持续上调, 24 h 分别上调 55.6%和 30.3%; 72 h 分别上调 65%和 49%。受体密度和亲和力与神经递质的内在活性(Intrinsic activity)及其生物效应有直接关系。因此, 高原缺氧条件下 M 受体密度及其亲和力的增加, 将导致中枢胆碱能效应的增强, 胆碱能危象发生的可能性也增加。但是由于脑功能的复杂性, 缺氧导致 M 受体特性的改变是否为缺氧条件下梭曼毒性变化的直接原因尚待深入研究证实。

高原缺氧条件下梭曼中毒脑损伤的机制是复杂的, 有研究认为高原神经毒毒性的升高可能源于非胆碱能系统的过度激活, 包括能量代谢障碍、自由基损伤、钙超载及对组织细胞的直接损害等[9]。但是, 高原缺氧条件下梭曼对胆碱酯酶的明显抑制和 M 受体数量及质量的显著变化, 均提示胆碱能神经功能紊乱在高原神经毒中毒脑损伤机制中占主导地位。可能是胆碱能系统与非胆碱能系统共同介导了高原神经性毒剂的毒性效应。针对以上两种致伤机制联合用药, 对于提高神经性毒剂中毒的防治水平有重要指导意义。

参考文献:

[1] 刘　勇, 余争平, 欧阳子倩, 等. 模拟 4 000 米高原梭曼中毒犬的血流动力学变化[J]. 第三军医大学学报, 1993, 15(3): 228-231.

[2] McDonough J H, Mcleod C G, Nipwoda M T. Direct microinjection of soman and VX into the amygdala prouduces repetitive limbic convulsions and neuropathology[J]. Brain Res, 1987, 435(2): 123-132.

[3] Fosbraey P, Wetherell J R, French M C. Neurotransmitter changes in guinea-pig brain region following soman intoxication[J]. J Neurochem, 1990, 54(1): 72-79.

[4] Lyeth B G, Jiang J Y, Delahunty T M, *et al*. Muscarinic receptor binding in rat brain following traumatic brain injury[J]. Brain Res, 1994, 640(1-2): 240-245.

[5] Saijoh K, Fujiwara H, Tanaka C. Influence of hypoxia on release and uptake of neurotransmitters in guinea pig striatal slices:

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

dopamine and acetylcholine[J]. Jpn J Pharmacol, 1985, 39(4): 529—539.

[6] Chleide E, Ishikawa K. Hypoxia-induced decrease of brain acetylcholine release detected by microdialysis[J]. Neuroreport, 1990, 1(3-4): 197—199.

[7] Burn J D, Leighton F A. Further studies of brain cholinesterase: cholinergic receptor ratios in the diagnosis of acute lethal poisoning of birds by anticholinesterase pesticides[J]. J Wildl Dis, 1996, 32(2): 216—224.

[8] 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.

[9] 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救治[J]. 卫生毒理学杂志, 1999, 13(3): 185—186.

(编辑 冷怀明)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)07-0634-01

同种胚胎脊髓移植治疗成年大鼠脊髓损伤

Treatment of spinal cord injury by fetal cord allograft in adult rats

彭亦良, 吴梅英, 崔大勇 (第三军医大学附属西南医院骨科, 重庆 400038)

脊髓损伤所造成的截瘫, 至今仍缺乏有效的治疗方法。本实验采用同种胚胎脊髓移植治疗成年大鼠脊髓损伤, 通过观察植入的胚胎脊髓在宿主脊髓内的分化发育过程及对损伤脊髓再生修复的促进作用, 为进一步探索脊髓损伤后再生修复的机制和胚胎脊髓移植的临床应用提供可能有用的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

Wistar 大鼠 96 只, 体重(200±20)g, 雌雄不拘。随机分为两组: ①胚胎脊髓移植组: 72 只; ②单纯脊髓损伤组: 24 只。

1.2 截瘫模型制备

采用大鼠胸腰段(T_{11}-L_1)脊髓左侧半横切损伤模型。

1.3 胚胎脊髓移植

选用妊娠 14 d 的胎鼠作为移植供体, 损伤组不作移植。

1.4 组织标本制作

以术后 15、30、60 d 作为制作标本及观察的时相点。

1.5 观察指标

1.5.1 HE 染色、尼氏染色和嗜银染色。

1.5.2 免疫细胞化学染色 采用 S-P 法进行 SP、SOM、GFAP、NF-200 4 种抗体的免疫细胞化学染色。

1.5.3 图像分析 运用图像分析软件, 对阳性染色的神经元数目、面积、平均灰度值进行测量和分析。

1.5.4 统计学处理 实验数据作方差分析。

2 结果

2.1 一般组织病理学改变

HE 染色显示, 移植组织存活率为 72.26%。移植组术后 30 d 时, 87.19%的移植物与受体脊髓融合在一起; 术后 60 d 时融合更紧密; 而损伤组术后左半侧脊髓均形成一个大的空腔。尼氏染色显示移植组术后 30 d 时, 移植物中神经元体积增大, 神经元内尼氏体增多, 神经元排列较规整; 术后 60 d 时移植物中神经元大小、形态与脊髓后角神经元基本相似; 而损伤组在术后 15 d 时, 损伤区周围神经元内尼氏体大多消失, 60 d 时仍无明显恢复。镀银染色显示移植组术后 15 d, 63.96%的移植组织内可见纤细的神经纤维, 与受体脊髓间有少量的纤维连接。30 d 时 74.08%的移植物与受体纤维连接增多, 60 d 时移植物与受体脊髓交界面可见明显的纤维联系; 而损伤组则至术后 60 d 时脊髓内神经纤维在空腔处仍不连续。

2.2 免疫细胞化学改变

移植组术后 15 d, 69.48%的移植物内即可见较明显的 SP 和 SOM 阳性染色细胞, 呈斑片状或网状分布; GFAP 和 NF 染色不明显。术后 30 d 时, 87.25%的移植物内 SP 和 SOM 染色呈强阳性, 阳性染色的细胞呈类圆形或多角形, 可见较多棕黄色颗粒分布于胞浆内, 并可见长短不一的突起向周围延伸。GFAP 染色阳性的细胞和纤维稀疏, 主要见于移植物与宿主脊髓融合不紧密处。NF 染色阳性的神经纤维在纵切面上呈纵形排列, 分布密集; 在横截面上呈点状散在分布, 并可见少量 NF 阳性神经元。术后 60 d 时, 以上 4 种染色与 30 d 时基本相似, 仅阳性染色略浅。单纯损伤组在各时相点中 GFAP 阳性染色最明显, 呈带状或网状分布于脊髓空腔周围。

作者简介: 彭亦良(1964-), 男, 重庆市人, 硕士, 主治医师, 主要从事脊髓损伤方面的研究, 发表论文 5 篇。电话: (023) 68754019

收稿日期: 1999-08-15; 修回日期: 1999-12-28

(下转 638 页)

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