DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.05.003

大鼠实验性急性氰化物中毒时脑组织的病理变化及其发生机制的研究

朱 立 陈意生 （病理学教研室）

提 要 本文结合血液、脑组织CN^-浓度测定和脑组织细胞色素氧化酶活性定量分析，对大鼠急性NaCN中毒（4.5mg/kg i.p.）后24h内脑组织的病理变化进行了动态观察，结果表明，大鼠腹腔注射低于致死剂量的NaCN（80%LD）造成急性中毒后，脑组织可出现明显的病理变化，以细胞色素氧化酶低活性分布区为重。其基本病理变化为：（1）神经细胞、神经胶质细胞变性、坏死；（2）各种细胞突起成份变性、肿胀、溶解；（3）有髓神经纤维髓鞘破坏。这些病理变化的产生和发展，表现为一动态过程，大致可分为3个时期：（1）代谢紊乱期；(2)损伤反应期；（3）恢复期。本文认为，动物急性中毒反应的发生，是NaCN注射后脑组织细胞色素氧化酶活性受到强烈抑制的直接结果；随后出现的震颤、不稳、共济失调等则可能与继发的脑组织结构损伤有关。本文还对氰化物中毒后脑组织病理变化产生的机制进行了讨论。

关键词 急性氰化物中毒；细胞色素氧化酶素

中枢神经系统是氰化物损伤最敏感的靶器官之一，对低于致死量的氰化物急性中毒时脑组织的病理变化及其发生机制的研究，迄今国内外尚无专题报道。本文通过对血液、脑组织CN^-浓度、脑组织细胞色素氧化酶活性测定以及脑的组织学和超微结构变化的动态观察，以期了解低于致死剂量的氰化物急性中毒时脑组织的病理变化，特别是超微结构变化及其演变规律，探讨中枢神经系统病变与血液、脑组织毒物浓度和代谢障碍的关系，为进一步提高对氰化物中毒的防治水平和深入进行氰化物中毒的法医毒理学研究积累资料。

1 材料与方法

选用Wistar健康雄性大鼠165只，体重200g～300g，随机分为中毒组和对照组。中毒组动物给予NaCN（4.5mg/kg）腹腔注射，于注射后2、5、10、15、30min和1、2、6、12、24h活体取材，分别用于下列观察指标：（1）血液、脑组织CN^-浓度测定：荧光分光光度法[1]，每时相点6只动物；（2）脑组织细胞色素氧化酶活性测定：DAB法染色，显微分光光度法定量[2]，每时相点6只动物；（3）脑组织病理组织学和超微结构观察：每时相点3只动物，分别作H·E染色、髓鞘染色（Luxol固兰法）和Bielscohwsky氏神经纤维染色，供病理组织学检查；于大脑皮质、胼胝体、小脑皮质和髓质取材，常规电镜制样，作超微结构观察，对照组：15只动物，于腹腔注射等量生理盐水后30min取材，分别作为中毒组上述各项观察指标的总体对照。实验数据用t检验和单因素方差分析进行统计学处理。

2 实验结果

2.1 动物的急性中毒反应

中毒组动物注射NaCN后，立刻出现急性中毒症状。最初表现为兴奋、不安和挣扎逃脱状，继之很快丧失运动能力。NaCN注射后2min，动物呼吸极度困难，剧烈抽搐，进入昏迷状态。随之，体位反射及痛觉反应消失。动物于NaCN注射后35min～60min逐渐清醒，但精神萎糜，嗜睡少动，身体震颤不稳，此状态持续至中毒后24h。

2.2 血液、脑组织毒物浓度变化

大鼠腹腔注射NaCN造成急性中毒后，血液CN^-浓度升高极为迅速，NaCN注射后2min即达0.50±0.037 μmol/ml，10min时达浓度峰值。此后，血液CN^-浓度不断下降，至NaCN注射后2h开始接近正

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

常水平（图1）。对照组血液CN^-浓度微量；中毒组各时相点血液CN^-浓度显著高于对照组（$P<0.01$）。脑组织CN^-浓度变化同血液CN^-浓度变化曲线相一致（图1），但明显低于相应各时相点的血液CN^-浓度水平（$P<0.01$）。NaCN注射后6 h～24h各点及对照组脑组织CN^-浓度未能测出。

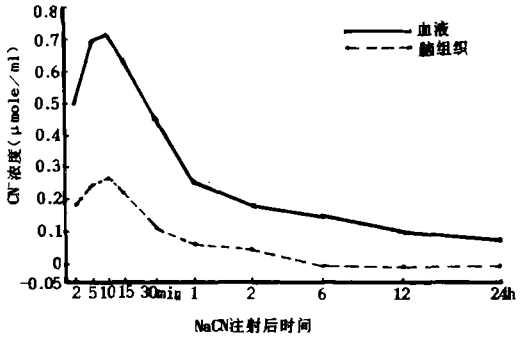


图1 NaCN腹腔注射后血液、脑组织CN^-浓度的变化

2.3 脑组织细胞色素氧化酶活性测定

以对照组作参照，NaCN注射后2min，酶活性抑制16%～22%，10min～15min出现抑制峰值，酶活性抑制达36%～74%，此后，酶活性迅速恢复。其中胼胝体、小脑髓质酶活性抑制重（达73%～74%），恢复快（中毒后1 h恢复正常）大脑皮质和小脑皮质（分子层）酶活性抑制相对较轻（41%～44%），恢复较慢（中毒后6 h恢复正常）。NaCN注射后24h，各部位酶活性显增高趋势（图2，3）。

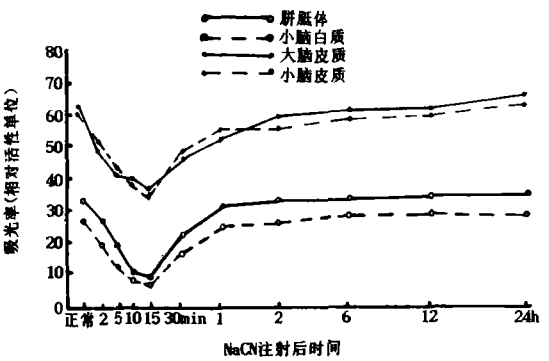


图2 NaCN腹腔注射后脑组织细胞色素氧化酶活性变化

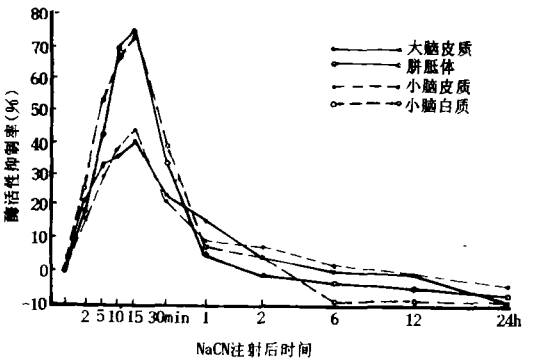


图3 NaCN腹腔注射后脑组织细胞色素氧化酶活性抑制曲线

2.4 脑的病理组织学及超微结构变化

2.4.1 中毒组

光镜观察所见：NaCN注射后2min～60min各时相点，脑内各部位未见异常。中毒后2 h，脑组织出现水肿性改变，部分大脑皮质区神经细胞及神经胶质细胞、海马神经细胞和小脑蒲肯野氏细胞显变性坏死，邻近可见明显的空腔或间隙，以海马和小脑蒲肯野氏细胞层处为甚（图4）；蒲肯野氏细胞周围部分神经纤维崩解呈节段状；胼胝体区神经纤维疏松、水肿，走向紊乱，形成波纹状外观（图5）。上述病理变化持续至中毒后12h，之后各部位水肿逐渐减轻，脑组织结构趋于正常。各时相点均未发现脑组织白质区脱髓鞘病变。

电镜观察所见：

2.4.1.1 大脑皮质：NaCN注射后2min～5min，大脑皮质区未见明显病变。10min～15min时，少数神经细胞出现高尔基体扁平囊轻度扩张，粗面内质网脱颗粒，线粒体出现程度不一的肿胀和空化。30min至1 h，除见上述各种病变进一步加重外，部分神经细胞、胶质细胞核膜曲折内陷，核周间隙明显扩张，出现明显的胞浆内水肿。部分细胞突起成份肿胀、空化伴有轻度溶解性改变（图6）。有髓神经纤维髓鞘板层肿胀、均质化，并见有小泡形成或局限性溶解。NaCN注射后2 h，部份区域显高度水肿和溶解性改变，受累神经细胞核内染色质减少、核仁边集，胞浆高度水肿伴部分胞质溶解；细胞突起成份及神经纤维高度肿胀或溶解消失。有髓神经纤维髓鞘板层广泛均质化和溶解。此后，细胞及细胞突起成份的水肿及溶解性改变逐渐减轻。NaCN注射后24h，除残存病变外，神经细胞及其突起结构趋于正常，可见少数少突胶质细胞伸

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

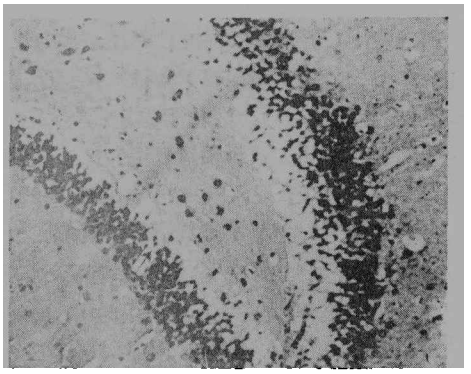


图4 NaCN注射后2h，部分海马神经细胞胞核固缩，胞浆明显空化（↑），其邻近结构出现明显的空腔和间隙。H.E染色×200

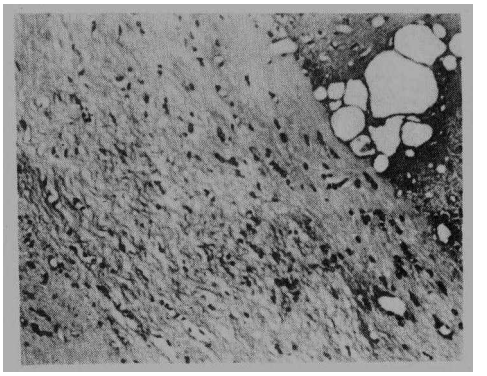


图5 NaCN注射后2h，胼胝体区神经纤维疏松、水肿，走向紊乱，形成波纹状外观。H.E染色 ×100

出“伪足”，包裹变性的髓鞘断片（图7）。

2.4.1.2 胼胝体：NaCN注射后2min～5min，少突胶质细胞核周间隙、内质网及高尔基体扁平囊轻度扩张，线粒体肿胀，可见灶性胞质内溶解区。有髓神经纤维髓鞘板层结构紊乱、均质化，轴浆内部分线粒体肿胀，有少量髓样结构形成。30min时，上述细胞及髓鞘病变加重，少突胶质细胞核周间隙、内质网、高

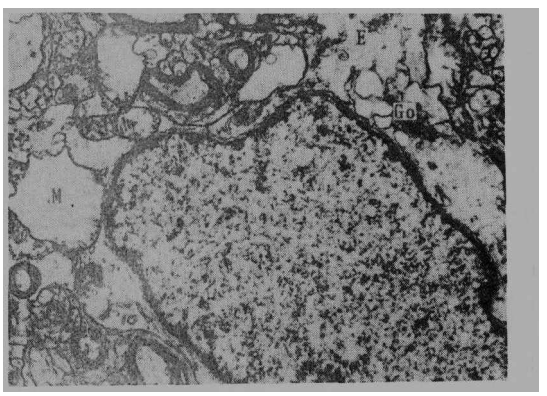


图6 NaCN注射后30min，示星形胶质细胞胞浆水肿（E），电子密度降低，高尔基体扁平囊（Ga）扩张，线粒体（M）显著肿胀、空化。×8 000

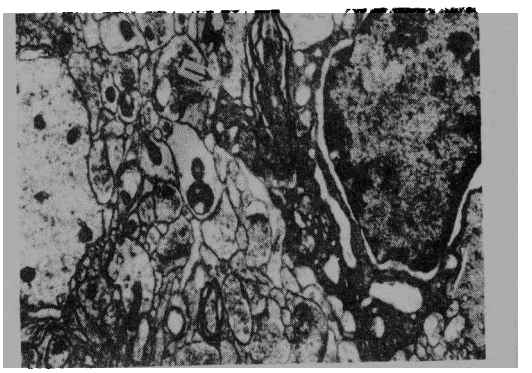


图7 NaCN注射后24h，大脑皮质中一少突胶质细胞伸出“伪足”包裹变性的髓鞘断片（↑）。 ×8 000

尔基体扁平囊均明显扩张，线粒体肿胀、空化。有髓神经纤维髓鞘结构溶解、破裂，形成髓鞘内髓样结构、髓鞘内小泡、“蟹足样”结构等多种病理性改变（图8，9）。NaCN注射后1h～6h，电镜下以细胞水肿和髓鞘溶解为主要病变，致使有髓神经纤维极为紊乱，表现为神经纤维间分枝、融合、相嵌或断裂呈节段状，部分神经纤维失去髓鞘、轴浆裸露，组织内出现大量膜性碎片及髓鞘样结构（图10）、并见有水肿液蓄积。此后，上述病变逐渐减轻。NaCN注射后24h，组织水肿消退，偶见变性的髓鞘碎片被包裹消除。

2.4.1.3 小脑皮质和小脑髓质：NaCN注射后，小脑皮质区细胞及神经纤维的病变及其演变过程与大脑皮质中所见者基本一致；小脑髓质区病变较胼胝体为重，同样经历了相似的发展过程（图11）。

2.4.2对照组：

对照组光镜与电镜观察，除电镜下脑组织白质髓鞘成份显轻度变性外，未见异常改变。

3 讨 论

氰化物属速杀性毒剂，大剂量中毒时因致死迅速，脑组织常无明显的病理变化。鉴于平

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



图 8　NaCN注射后30min胼胝体、髓鞘结构破坏，形成髓鞘小泡（↑）。　×15 000

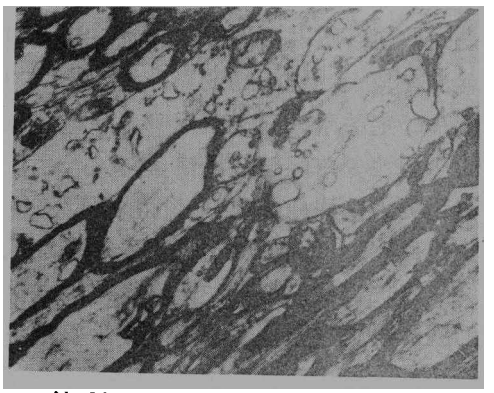


图 9　NaCN注射后1h胼胝体，部分无髓神经纤维明显水肿，出现溶解性改变和小泡状结构。×10 000



图10　CNNa注射后 2 h胼胝体，部分神经纤维髓鞘脱失（↑），轴浆（A）溶解。×8 000



图11　NaCN注射后30min小脑皮质，小脑小球内线粒体广泛肿胀，空化。有髓神经纤维髓鞘板层均质化，出现髓鞘内髓样结构及髓鞘内小泡（↑）。　×10 000

战时对氰化物中毒有价值的救治目标较多是遭受低于致死剂量袭击的伤员，研究该剂量下急性氰化物中毒时脑组织的病理变化，显然具有一定的理论和实践意义。本文采用 4.5mg/kg NaCN（80%LD）腹腔注射造成急性NaCN中毒模型，观察到大鼠在低于致死剂量的氰化物急性中毒时脑组织可出现明显的病理变化。主要表现为：（1）神经细胞、胶质细胞变性、坏死；（2）各种细胞突起成份变性、肿胀和溶解；（3）有髓神经纤维髓鞘破坏。其中，以髓鞘病变尤为显著。上述脑组织病变的产生，表现为一动态发展过程，大致可分作 3 个时期：（1）代谢紊乱期，见于NaCN注射后2min～15min，以代谢改变为主，组织结构损伤较轻；（2）损伤反应期，见于NaCN注射后30min至12h，此期组织结构损伤显著，代谢紊乱逐渐恢复；（3）恢复期，见于NaCN注射后24h，除残存的遗留病变外，脑水肿消退，各种结构趋于恢复。

细胞色素氧化酶在脑组织表现为高活性和低活性两种不同的分布区[2]。本实验研究表明，NaCN中毒后脑组织病变以后者为重。产生这种差异的基本原因，可能是生理情况下两种区域细胞色素氧化酶的绝对含量不同。大、小脑皮质酶含量丰富，中毒后即使有部分酶活

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

性受到抑制，所占比例较小；而脐脓体、小脑髓质等酶的低活性分布区，酶活性一旦受到抑制就占有较大比例，导致局部组织代谢的严重损伤。其次，和两种酶活性分布区的血液供给程度有一定关系。据文献报道，脑组织白质区毛细血管密度仅为大脑皮质的1/5左右[4]，即酶的高活性分布区较低活性分布区可能有着更为丰富的血液供应。这样，一方面血液CN^-浓度变化更为直接地影响着该区域酶活性抑制率的变化，另一方面血氧又对所辖区域组织具有保护作用[5][6]，因而酶活性恢复较酶的低活性分布区为慢且病变较轻。其三，酶的低活性分布区受到“双重损害”，即除氰化物直接造成轴突、髓鞘的缺氧性损伤外，大、小脑皮质神经细胞、胶质细胞也显明显病变，以致失去对前者的支持营养作用，加重了前者的损伤。

NaCN注射后24h，脑组织各部位细胞色素氧化酶活性有增高趋势。类似结果，以往已有文献报导，被解释为受损组织恢复正常状态的促进反应[7]。细胞色素氧化酶活性增高，可使组织呼吸增强、代谢活跃，有利于受损组织的恢复过程，因而可能是NaCN中毒后中枢神经系统损伤进入恢复期的标志之一。

氰化物中毒后中枢神经系统损伤的机制。以往，已有一些文献对此进行过讨论，但尚无统一意见[8]。由本实验结果可以看出，脑组织病变于代谢紊乱期和损伤反应期两次同血液、脑组织CN^-浓度、脑组织细胞色素氧化酶活性变化、以及动物的急性中毒反应形成明显差别，即严重的脑组织形态学改变出现于血液、脑组织CN^-浓度和脑组织细胞色素氧化酶活性趋于恢复的阶段，而非血液、脑组织CN^-浓度升高和脑组织细胞色素氧化酶活性受到强烈抑制之时，这一方面提示NaCN注射后，动物急性中毒反应的出现是血液、脑组织CN^-浓度迅速升高、脑组织细胞色素氧化酶活性受到强烈抑制的直接结果；而随后出现的震颤、不稳、共济失调等则可能与脑组织结构损伤有关[3]，另一方面也提示，NaCN本身对脑组织的形态结构可能并无直接的损伤作用；中枢神经系统病理变化产生的根本原因还是细胞色素氧化酶抑制所引起的组织缺氧性损害，继之，受到损害的组织发生溃变而出现明显的结构变化。此外，缺氧造成的细胞内和细胞外水肿，会使组织和细胞代谢受到一定影响，因而加重了病变的发展。至于氰化物中毒后，中枢神经系统易于遭受损伤的机制，可能与CN^-在脑组织中选择性的积聚[8]、脑组织细胞色素氧化酶及CN^-解毒酶类含量相对低下[9][10]、以及脑组织对缺氧极为敏感等多种因素有关。

参考文献

1. Morgan RL, et al. Fluorometric determination of cyanide in biological fluids with pyridoxal. J Analy Toxicol 1980;4:78
2. Zhi Li, et al. Histochemical Study and Microspestrophotometer Analysis of Regional Distribution of Cytochrome Oxidase in Normal Rat Brain J of Medical Colleges of PLA 1989; 4(4):354
3. Uitti RJ, et al. Cyanide-induced Parkinsonism: a clinico-pathologic report. Neurol 1985; 35:921
4. Hicks SP. Brain metabolism in vivo: 1 The distributiom of lesions caused by cyanide poisoning, insulin hypoglycemia, asphyxia in nitrogen and fluoroacetate poisoning in rats. Arch Pathol 1950; 49:111
5. Isom GE, et al. Effect of oxygen on the antagonism of cyanide intoxication——cytochrome oxidase, in vivo. Toxicol Appl Pharmacol 1982;65:250
6. Levine S, et al. Experimental encephalopathy: gradients of susceptibility in the corpus

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

callosum. J Neuropathol Exper Neurol 1967;26:214
7. Van Houten WH, et al. Histochemical studies of experimental demyelination produced with cyanide. Exp Neurol 1961;4:402
8. 朱立，等。氰化物脑病。国外医学：军事医学分册 1988;4:207
9. 朱逢春，主译。新酶组织化学北京。人民卫生出版社， 1983:112
10. Sorbo BH. On the properties of rhodanese, partial purification, inhibitors and intracellular distribution. Acta Chem Scand 1951;5:724

(收稿：1990.01.13；1990.07.04)

Experimental Study on Pathological Changes and Their Mechanism in Rat Brain Tissue with Acute Cyanide Poisoning

Zhu Li and Cheng Yisheng (Department of Pathology, Third Military Medical College)

Observations on the developement of pathological changes of rat brain, together with dynamic detection of CN^- concentrations in blood and brain tissue and quantitive analysis of brain cytochrome oxidase activity, are carried out within 24 h after acute cyanide intoxication (4.5mg/kg i.p.). The results indicate that in the cyanide poisoning with the dose under lethality (80%LD), the pathological changes in rat brain appear, especially in cytochrome oxidase poorly-contained areas, including: 1) degeneration and necrosis of neurons and gliocytes; 2) degeneration, swelling and lysis of different cell projection components; 3) the myelinoclasis of myelinated nerve fibers. Those changes undergo a dynamic course divided into three phases: 1) the phase of metabolic disturbance; 2) of response to injury; and 3) of restoration. The authors consider that the acute poisoning displayed by the animal after NACN injection is directly caused by the intense inhibation of brain cytochrome oxidase; the secondary lesions of brain structure may be responsible for the manifestations such as trembling, unstable, and ataxia etc. occur later. The mechanisms of the brain pathological changes after cyanide intoxication are also disscussed.

Key words: acute cyanide poisoning; cytochrome oxidase

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