

· 基础研究 ·

高压氧对急性一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠学习记忆能力及脑组织髓鞘碱性蛋白的影响

李砚屏 刘青乐 郑成刚 衣洪杰 赵黎明 杭晓华

【摘要】目的 观察高压氧(HBO)对急性一氧化碳中毒(COP)迟发性脑病大鼠学习记忆及脑组织髓鞘碱性蛋白(MBP)表达的影响。方法 选取雄性 SD 大鼠 45 只,经 Morris 水迷宫筛选后,分为正常对照组(NC 组)11 只、急性一氧化碳中毒组(COP 组)17 只和急性一氧化碳中毒高压氧治疗组(HBO 组)17 只。COP 组和 HBO 组采用分次腹腔注射 CO 气体法建立大鼠急性 COP 迟发性脑病模型,NC 组采用相同方法腹腔注射等量空气。造模成功后,HBO 组大鼠进行 HBO 治疗,NC 组及 COP 组均给予常压饲养。与造模成功后第 1 天至造模成功后第 21 天对 3 组大鼠进行水迷宫测试,观察其学习记忆能力的变化情况,并于造模成功后第 21 天检测 3 组大鼠脑组织中 MBP 的表达情况。结果 造模后 21 d 内,COP 组迟发性脑病发病 9 只(64.3%),HBO 组发病 4 只(26.7%),2 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。HBO 组大鼠平均逃避潜伏期为(6.20 ± 1.98)s,与 COP 组的(10.61 ± 4.82)s 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。造模成功后第 21 天,COP 组和 HBO 组大鼠脑组织 MBP 的表达均低于 NC 组($P < 0.05$);COP 组大鼠脑组织 MBP 的表达低于 HBO 组($P < 0.05$)。3 组大鼠脑组织灰度值比较,NC 组显著优于 COP 组和 HBO 组($P < 0.05$),而 HBO 组亦显著优于 COP 组($P < 0.05$)。结论 HBO 治疗能改善急性 COP 迟发性脑病大鼠学习记忆能力,减轻脑组织髓鞘损伤。

【关键词】 高压氧; 急性一氧化碳中毒; 迟发性脑病; 髓鞘碱性蛋白

Effects of hyperbaric oxygen on learning and memory ability and myelin basic proteins in brain tissue after carbon monoxide poisoning Li Yanping, Liu Qingle, Zheng Chenggang, Yi Hongjie, Zhao Liming, Hang Xiaohua. Department of HBO Treatment, The First Affiliated Hospital of The Second Military Medical University, Shanghai Hospital, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Liu Qingle, Email: qlliuv@126.com

【Abstract】Objective To observe the effects of hyperbaric oxygen (HBO) on learning and memory ability and on the level of myelin basic protein (MBP) in the brain tissue of rats with delayed neurological sequelae (DNS) after acute carbon monoxide poisoning (COP). Methods Forty-eight male SD rats had their cognitive performance assessed with the Morris water maze. After basic training with the Morris water maze and screening, the rats were randomly divided into a normal control (NC) group ($n = 11$), a COP group ($n = 17$) and an HBO group ($n = 17$). Pure CO gas was injected intraperitoneally to establish acute COP in the latter two groups. The NC group received a similar injection of air. The HBO group was given HBO therapy. The rats in each group were tested for changes in their learning and memory abilities using the Morris water maze. On the 21st day after the treatment, paraffin tissue sections of the rats' brains were subjected to immunohistochemical (IHC) examination and Western blotting (WB) was used to detect any expression of MBP in the brain tissue. Results After 21 days, morbidity among the COP group was 64.3%, while it was 26.7% in the HBO group, a significant difference. The average maze escape latency in the COP group was significantly longer than in the HBO group. IHC staining and Western blotting showed that MBP in the hippocampal tissue of the COP group was significantly lower than that in the HBO group. In gray scale comparisons of the rats' brain tissue, that from the NC group was significantly better than that from the COP and HBO groups, but that from the HBO group was significantly better than that from the COP group. Conclusion HBO can effectively reduce DNS after acute COP, mitigate the severity of DNS, reduce demyelination of brain tissue and thus play an important role in protecting brain cells.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Carbon monoxide poisoning; Myelin basic protein; Memory; Learning

一氧化碳中毒(carbon monoxide poisoning, COP)

迟发性脑病是指部分 COP 患者经过或未经过治疗,其中毒症状缓解或消失 2~60 d 后,出现神经、精神病学方面的异常表现,如学习和记忆能力下降、痴呆等^[1]。临床上,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)对急性 COP

的治疗作用已众所周知,但其对急性 COP 迟发性脑病是否有预防和治疗作用,目前尚无确凿证据。为了给临床提供 HBO 对急性 COP 迟发性脑病预防及治疗作用基础研究方面的证据,本课题组在前期研究的基础上,建立改良的急性 COP 动物模型(大鼠),在同一时间,同等条件下对 3 组不同造模或治疗方式大鼠进行行为学检测,评价急性 COP 大鼠学习记忆的变化,判断是否有迟发性脑病的发生及严重程度;同时取大鼠脑组织检测髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP),评价脑组织脱髓鞘病变的严重程度,旨在探讨 HBO 在预防和治疗急性 COP 迟发性脑病中的作用。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物:雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只,体重(400 ± 20) g,购于第二军医大学实验动物中心。

2. 实验试剂及仪器:纯品 CO 气体(99.99%)和罐装纯氧气体(压力为 14.0 MPa)均购于上海申威灌装气体有限公司;兔源抗鼠 MBP 多克隆抗体均购于美国 Abcam 公司;Morris 水迷宫及图像采集分析系统(上海产, DigBehv-MR 型),水池直径为 160 cm,高度为 50 cm,站台面积为 12 cm $\times$ 30 cm,可升降;实验动物高压氧舱(上海产, DW C450-1150 型)。

二、实验方法

(一)模型制作和分组

将 48 只 SD 大鼠进行 6 d 水迷宫基础训练并筛选,第 6 天时超过 120 s 仍未找到平台的大鼠记为不合格,予以淘汰(共淘汰 3 只)。将合格的 45 只大鼠分为 3 组,其中正常对照组(NC 组)11 只,急性一氧化碳中毒组(COP 组)17 只,急性一氧化碳中毒高压氧治疗组(HBO 组)17 只。采用分次腹腔注射纯品 CO 气体的方法建立大鼠急性 COP 模型^[2]。COP 组和 HBO 组大鼠腹腔注射纯品 CO 气体,首剂量为 120 ml/kg 体重,每隔 4 h 追加 1 次,追加剂量为 60 ml/kg 体重,共追加 4 次(首次注射 4 h 内, COP 组大鼠死亡 3 只, HBO 组大鼠死亡 2 只)。NC 组在同等条件下,给予等量空气腹腔注射。每 10~15 min 观察 1 次 COP 组和 HBO 组大鼠神志行为变化,采用改良双波长血碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, COHB)定量法^[3]动态监测大鼠 COHB 浓度。于染毒前和首次注射后 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h 以及每次追加注射后 2 h,取大鼠尾静脉血进行检测。用抗凝管取大鼠尾静脉血 0.1 ml 加 0.4 ml/L 的氨溶液 20 ml,混匀,加 20 mg 低亚硫酸钠混匀,5 min 内用酶标仪测定 535 nm 及 578 nm 波长下的吸光度,按公式计算 COHB 的含量, COHB 含量 >

50%,且出现典型 CO 中毒表现,认为造模成功。

$$\text{COHB}(\%) = (2.44 \times A_{535} / A_{578} - 2.68) \times 100\%$$

(二)HBO 治疗

将 HBO 组动物于完成最后 1 次注射后第 1 天置于实验动物高压氧舱内,以纯氧洗舱,用测氧仪测得舱内氧浓度 >95% 后,匀速加压,达目标压力 0.2 MPa (2.0 ATA)后,稳压 60 min,保证在稳压过程中舱内氧浓度始终保持在 95%~99%。HBO 治疗均于每天下午进行,每日 1 次,连续治疗 20 次。NC 组及 COP 组仅给予常规饲养。

(三)Morris 水迷宫检测

1. Morris 水迷宫测试:造模成功后第 1 天至造模成功后第 21 天对 3 组实验大鼠进行 Morris 水迷宫测试,隔天 1 次,均于上午进行。水深超过平台 2 cm,水温室温等条件均与基础训练时相同,将每只大鼠依次从 4 个象限的中点面壁式入水,应用图像采集及分析系统记录保存大鼠寻找并爬上平台所需时间(逃避潜伏期),取四个象限的平均值作为当日成绩。

2. 迟发性脑病的判定:正常大鼠随时间推移其逃避潜伏期时间应呈逐渐递减趋势^[4]。本实验判定迟发性脑病发生的条件为:①染毒后逃避潜伏期(即造模后 21 d 内)时间出现复升;②至少出现连续 2 次的逃避潜伏期时间延长。

(四)组织形态观察及 MBP 的检测

1. 免疫组织化学染色观察组织形态:于造模后第 21 天,完成 Morris 水迷宫测试后,采用 10% 水合氯醛溶液(0.5 ml/100 g 体重)腹腔注射麻醉大鼠。开胸暴露心脏,插管,由左心室经主动脉快速灌注生理盐水 200 ml,直至双肺及双眼变白。换为滴注 10% 中性甲醛 200 ml,断头取脑,10% 中性甲醛固定 24 h。

常规制作石蜡组织切片,脱蜡水化,采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶免疫组织化学方法(streptavidin-biotin complex, SABC)观察组织 MBP 的表达情况。在低倍镜($\times 200$)视野下扫视整个切片,呈棕黄色或棕褐色纤维状结构即为 MBP 阳性表达。

2. 免疫蛋白印迹检测:于造模后第 21 天,完成 Morris 水迷宫测试后,大鼠处死后断头取脑。生理盐水冲洗,将组织放入液氮中预冷后,迅速取出并研磨成粉末状,组织裂解、13 000 rpm 条件下离心 12 min,取上清采用双喹啉-4-羧酸二钠盐(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白质浓度,蛋白样品经 10% 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)恒压电泳后,在 200 mA 恒流下进行转膜,将膜用封闭液(5% 脱脂奶粉)浸泡,摇床 2 h,然后依次加入一抗(兔源抗鼠 MBP 多克隆抗体)4℃ 过夜结合;二抗(辣根过氧化物酶标

记的羊抗兔的免疫球蛋白 G) 室温结合 1 h, 增强化学发光法显色。显影图像用 ImageJ 图像分析软件处理并分析, 以目的蛋白 (MBP)/内参 (β -actin) 的相对值代表各样本 MBP 表达量。

三、统计学分析

采用 SPSS 17.0 版软件进行统计处理, 数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 计量资料比较使用 t 检验, 计数资料比较使用 χ^2 检验, 计数资料样本量小于 40, 使用 Fisher's 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、3 组大鼠造模后表现

COP 组及 HBO 组大鼠于首次腹腔注射纯品 CO 气体后 5 ~ 15 min 出现烦躁不安、撞笼、蹦窜; 15 min 后陆续出现少动, 皮毛乍起, 呼吸急促; 30 min 后大鼠四肢瘫软, 张力降低或消失, 部分大鼠出现抽搐。首次注射 4 h 内, COP 组大鼠死亡 3 只, HBO 组大鼠死亡 2 只, 存活大鼠均未主动进食水。个别死亡大鼠尸检发现, 内脏重度充血伴散在出血点, 脑组织充血水肿严重, 可见出血。随后每追加注射后大鼠均出现活动减少, 嗜睡, 对外界刺激反应减弱。2 组大鼠在 4 次追加注射过程中均未出现死亡。NC 组大鼠腹腔注射等量空气未出现异常表现。

二、3 组大鼠尾静脉血 COHB 的含量

COP 组及 HBO 组大鼠尾静脉血 COHB 含量均 $> 50\%$, 此水平持续维持 16 h; NC 组大鼠腹腔注射等量空气后尾静脉血 COHB 浓度始终 $< 5\%$ 。

三、COP 组及 HBO 组大鼠迟发性脑病发病情况及大鼠逃避潜伏期比较

急性一氧化碳中毒大鼠发病潜伏期 (造模后 21 d 内) 内, COP 组迟发性脑病发病 9 只 (64.3%), HBO 组发病 4 只 (26.7%), 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HBO 组大鼠平均逃避潜伏期为 (6.20 ± 1.98) s, 与 COP 组的 (10.61 ± 4.82) s 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

四、MBP 的检测

(一) 组织形态观察

NC 组大鼠海马组织 MBP 阳性纤维表达致密, 成

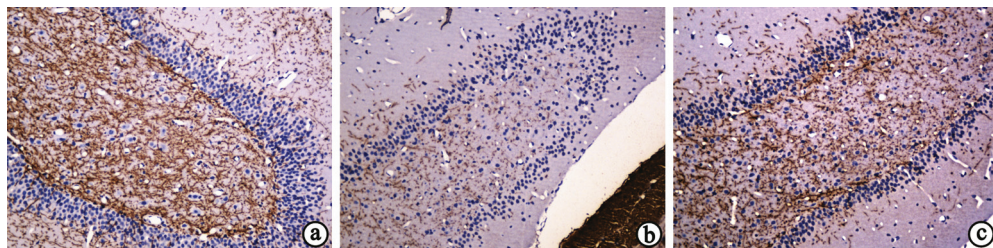
条索样, 细胞饱满, 形态正常; COP 组大鼠海马组织 MBP 阳性纤维表达稀疏, 细胞可见变性坏死, 固缩; HBO 组大鼠海马组织 MBP 阳性细胞表达稍稀疏, 细胞形态接近正常, 可见少量细胞变性坏死。见图 1。

(二) 免疫蛋白印迹检测

造模成功后第 21 天, COP 组和 HBO 组大鼠脑组织 MBP 的表达均低于 NC 组 ($P < 0.05$); COP 组大鼠脑组织 MBP 的表达低于 HBO 组 ($P < 0.05$) (图 2)。大鼠脑组织灰度值越低表示其脱髓鞘损伤越严重, COP 组为 (0.402 ± 0.047) , HBO 组为 (0.562 ± 0.169) , 2 组大鼠均有脱髓鞘损伤病变, 与 NC 组 (0.641 ± 0.118) 比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 HBO 组病变程度轻于 COP 组 ($P < 0.05$)。

讨 论

常温常压下 CO 是无色、无味的气体, 日常生活中的 CO 中毒, 主要是经由呼吸道吸入引起。本课题采用分次腹腔注射纯品 CO 气体的染毒方式建立急性 COP 模型, 其特点是: 虽然染毒途径与临床所见急性 CO 中毒的侵入途径不同, 但中毒机制一致; 在实验中, 首次腹腔注射后, 大鼠血液中 COHB 含量可于 30 min 内迅速升至 70% 以上, 达重度中毒水平, 随后的追加注射, 使大鼠体内 COHB 浓度始终保持 50% 以上水平, 造成大鼠长时间重度 COP 的条件, 与临床上急性 COP 后迟发性脑病的易发因素 (即长时间处于中毒环境中) 相符^[5]。有研究通过监测 COHB 证实, 大鼠血液中 CO 含量与 CO 注射量, 呈良好直线正相关, 这一特点有利于控制中毒剂量^[6]。动态监测发现, COHB 含量 $> 50\%$ 持续 16 h, 可认定为重度 COP, 但此时仅可认为使迟发性脑病发生的可能性有所增高, 不能确定该模型一定发生了迟发性脑病。临床上急性 COP 迟发性脑病患者很大一部分都表现为再度出现的学习记忆能力的减退甚至痴呆等表现^[7]。因此, 在大鼠急性 COP 迟发性脑病发病潜伏期^[8] (2 ~ 21 d) 通过对其学习记忆及认知能力的检测, 可认定是否发生迟发性脑病。Morris 水迷宫实验是判断大鼠学习记忆能力的重要指标, 急性 COP 模型建立后应用水迷宫实验持续跟踪大鼠的行为变化^[9], 是发现迟发性脑病的重要手段。



注: a 为 NC 组, b 为 COP 组, c 为 HBO 组

图 1 造模成功后第 21 天 3 组大鼠 MBP 的表达 (SABC 法染色, $\times 200$)

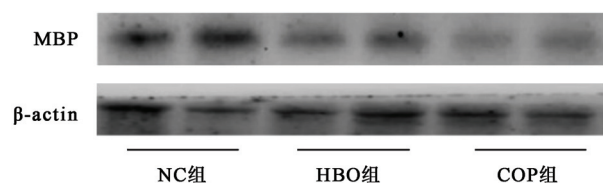


图2 3组大鼠脑组织免疫蛋白印迹检测结果比较

从本研究 Morris 水迷宫检测结果分析:①2 组大鼠染毒后均有迟发性脑病发生,说明长时间较高浓度 CO 的接触可造成神经组织不可逆的严重损伤,此现象也证实,患者长时间暴露在 CO 中毒环境是发生迟发性脑病的高危因素。由此也可说明为何部分急性 COP 患者在早期接受正规的 HBO 治疗过程中仍会发生迟发性脑病。而尽早地脱离中毒环境是避免迟发性脑病发生的重要条件。②造模成功后 21 d 内,COP 组迟发性脑病发病 9 只(64.3%),HBO 组发病 4 只(26.7%),组间差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 HBO 治疗可降低急性 COP 迟发性脑病的发病率。有研究指出,在 COP 急性期发生脑组织缺血缺氧的损伤后,经过一些病理生理改变,一段时间后才出现严重的迟发性损伤^[10],这一表现与临床上急性 COP 迟发性脑病患者出现的“假愈期”相符。由于迟发性神经损伤的存在,提示对急性 COP 患者进行 HBO 治疗过程中,不能以患者急性期症状消失作为停止治疗的指标。

脑白质广泛的脱髓鞘改变是迟发性脑病主要的特征性病变^[11],可造成血管内皮细胞损伤,继而引起血小板聚集,形成微血栓,最终导致脑白质弥漫性缺血缺氧而发生脱髓鞘改变,这一病变过程所需时间恰好与临床上急性 COP 迟发性脑病“假愈期”基本一致^[10]。单纯的 COP 急性期缺血缺氧所造成的神经损伤及脱髓鞘病变,与迟发性脑病出现的病理改变的严重程度并不完全一致,尤其是在大量外源性 CO 已排出体外,体内 COHB 也已恢复正常水平后,脱髓鞘病变仍持续加重^[12-13]。因此,考虑有其他损伤因素参与了迟发性脑病病变的发展。MBP 是神经系统髓鞘的重要组成部分,同时也是髓鞘中抗原活性最强的蛋白,其可能作为一种抗原性物质参与了迟发性脑病的自身免疫损伤过程。MBP 作为抗原使 T 淋巴细胞致敏,致敏 T 淋巴细胞进一步攻击破坏神经纤维髓鞘,通过抗体依赖细胞介导的细胞毒作用造成神经髓鞘的脱失。Watanabe 等^[14]的实验研究进一步对 MBP 降解部位进行研究,发现 MBP 降解以齿状回和海马 CA3 区为主。研究结果显示,COP 组和 HBO 组的脑组织 MBP 含量较 NC 组均有不同程度的减少($P < 0.05$),说明 COP 组和 HBO 组脱髓鞘发生改变,证实了以往对迟发性脑病脱髓鞘病变的研究,同时量化了脱髓鞘病变的严重程度,而 HBO

组脱髓鞘的程度轻于 COP 组($P < 0.05$),提示 HBO 可以有效地减轻迟发性脑病的发病程度。探讨其可能的作用机制有:一方面 HBO 可以在 COP 急性期提高脑组织供氧量,减少缺氧引起的直接损伤;另一方面,HBO 可调节自身免疫机制,减轻迟发性脑病由于自身免疫攻击造成的继发性损伤。

综上所述,HBO 能有效地减轻迟发性脑病损伤病变程度,从侧面说明迟发性脑病的发病机制可能与自身免疫反应有关,HBO 可能通过抑制免疫炎症反应,预防迟发性脑病的发生或减轻其损伤程度。

参 考 文 献

- [1] Pepe G, Castelli M, Nazerian P, et al. Delayed neuropsychological sequelae after carbon monoxide poisoning: predictive risk factors in the Emergency Department. A retrospective study[J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2011, 19(3):14-16.
- [2] Liu Y, Fechter LD. MK-801 protect against carbon monoxide-induced hearing loss[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1995, 132(2): 196-202.
- [3] 冯仁丰. 实用医学检验学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1996: 72.
- [4] Frick KM, Baxter MG, Markowska AL, et al. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. Neurobiol Aging, 1995, 16(2):149-160.
- [5] 全明范. 急性一氧化碳中毒致迟发性脑病的临床相关因素的分析[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(11):1816-1817.
- [6] 付守芝, 刘勇, 杨建业, 等. 腹腔注射法建立一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠模型[J]. 中国急救医学, 2007, 27(11):996-998.
- [7] Prockop LD, Chichkova RI. Carbon monoxide intoxication: an updated review[J]. J Neurol Sci, 2007, 262(1-2): 122-130.
- [8] Nabeshima T, Katoh A, Ishimaru H, et al. Carbon monoxide-induced delayed amnesia, delayed neuronal death and change in acetylcholine concentration in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 256(1): 378-383.
- [9] 胡镜清, 温泽淮, 赖世隆. Morris 水迷宫检测的记忆属性和方法学初探[J]. 广州中医药大学报, 2004, 17(2): 117-119.
- [10] Kegeles LS, Humaran TJ, Mann JJ. In vivo neurochemistry of the brain in schizophrenia as revealed by magnetic resonance spectroscopy[J]. Biol Psychiatry, 1998, 44(6):382-398.
- [11] Handa PK, Tai DY. Carbon monoxide poisoning: a five year review at Tan Tock Seng Hospital, Singapore[J]. Ann Acad Med Singapore, 2005, 34(10):611-614.
- [12] Ishimaru H, Nabeshima T, Katoh A, et al. Effects of successive carbon monoxide exposures on delayed neuronal death in mice under the maintenance of normal body temperature[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 179(2):836.
- [13] Gorman D, Lin HY, Williams C. Early evidence of a regulated response to hypoxaemia in sheep that preserves the brain cortex[J]. Neurosci Lett, 2006, 394(3):174-178.
- [14] Watanabe S, Matsuo H, Kobayashi Y, et al. Transient degradation of myelin basic protein in the rat hippocampus following acute carbon monoxide poisoning[J]. Neurosci Res, 2010, 68(3): 232-240.

(修回日期:2013-12-07)

(本文编辑:阮仕衡)