

急性甲醇中毒大鼠模型及其眼部改变的研究

余洁婷¹, 张少冲¹, 程建新², 冷云霞¹

(1. 中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060; 2. 广州市第十二人民医院眼科, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨急性甲醇中毒大鼠模型的制作方法及其眼部改变, 为研究中毒后视功能损害及救治方法奠定基础。【方法】SD 大鼠 32 只, 随机分为 A(低剂量甲醇组)、B(高剂量甲醇组)、C(生理盐水对照组)、D(空气对照组)4 组, 每组 8 只。A、B 组吸入 N_2O/O_2 混合气及不同剂量甲醇灌胃, C 组吸入 N_2O/O_2 混合气及生理盐水灌胃, D 组置于正常空气中并按 B 组剂量给予甲醇灌胃, 观察各组大鼠一般情况、体质量及眼部改变、静脉血甲醇浓度、视网膜电图和视网膜组织学改变。【结果】染毒大鼠反应迟钝、运动失调, 视盘充血水肿、视网膜点状出血, A 组大鼠体质量为 (187 ± 12) g, B 组为 (176 ± 13) g, 较 C、D 对照组显著减轻 ($P < 0.05$); A 组视网膜电图 a、b 波振幅分别为 (87 ± 13) μV 、 (187 ± 38) μV , B 组 a、b 波振幅分别为 (53 ± 9) μV 、 (132 ± 39) μV , 与对照组相比明显下降 ($P < 0.05$); 视网膜在光镜下表现为各层细胞水肿、排列紊乱及空泡化; 电镜下细胞凋亡, 线粒体肿胀、嵴断裂; B 组动物上述改变尤其明显。【结论】吸入 N_2O/O_2 混合气及甲醇灌胃可建立急性甲醇中毒的大鼠模型, 出现典型的视网膜结构和功能改变。

关键词: 甲醇; 急性中毒; 大鼠模型; 灌胃

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0636-05

Rat Model of Acute Methanol Poisoning with Ocular Changes

SHE Jie-ting¹, ZHANG Shao-chong¹, CHENG Jian-xin², LENG Yun-xia¹

(1. State Key Laboratory of Ophthalmology // Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510060, China; 2. Department of Ophthalmology, The Twelfth People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To develop a rat model manifesting acute methanol poisoning and study the ocular changes so as to lay foundations for further investigation of visual impairment. 【Methods】Thirty-two SD rats were randomly divided into group A (low methanol dosage group, $n=8$), B (high methanol dosage group, $n=8$), C (saline control group, $n=8$) and D (air control group, $n=8$). Group A and B were exposed to a mixture of N_2O/O_2 and given different dosage of methanol by gavage. Group C was exposed to N_2O/O_2 and given the same volume of saline as group B. Group D was exposed to normal air and given the same dosage of methanol as group B. General condition, ocular changes, methanol concentration in venous blood, electroretinogram and retinal histopathologic changes were analyzed. 【Results】Methanol-intoxicated rats were characteristic by slow reaction, incoordination, optic disc hyperemia and edema and retinal haemorrhage. Body mass loss was significant in group A and B when compared with group C and D ($P < 0.05$), which was (187 ± 12) g in A and (176 ± 13) g in B, respectively. A-wave and b-wave of electroretinogram were markedly reduced in group A and B ($P < 0.05$), which was (87 ± 13) μV and (187 ± 38) μV in group A, and (53 ± 9) μV and (132 ± 39) μV in group B, respectively. Retinal edema, derangement of cells and vacuoles were obvious under light microscope. Changes under electromicroscope were characteristic by cell apoptosis, mitochondria swollen, and cristae disruption. These changes were more obvious in group B. 【Conclusion】Acute methanol poisoning in rats could be successfully duplicated by exposure to a mixture of N_2O/O_2 methanol administration by gavage, with typical retinal structural and functional changes.

Key words: methanol; acute poisoning; rat model; gavage

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):636-640]

收稿日期: 2007-04-18

基金项目: 广东省自然科学基金(05001768)

作者简介: 余洁婷(1980-), 女, 广东中山人, 硕士; 张少冲, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: zhaochong@sohu.com

甲醇(methanol, CH_3OH)是一种无色、有毒的挥发性液体,可经呼吸道、胃肠道和皮肤吸收入入人体而中毒。近年因饮用假酒致急性甲醇中毒的事件时有发生,随着甲醇在人们生产、生活中应用日益广泛,其意外中毒的可能性不断增加。中毒后幸存者常遗留不同程度的视觉损害,而目前甲醇致视功能损害的机理尚未明确,国内仅见临床病例报道^[1],缺乏相关的实验研究。国外研究采用的大鼠种属在我国并不普及,在建模方法、染毒剂量、评价指标等方面缺乏系统性及可比性^[2]。本研究采用SD大鼠,设立不同剂量甲醇灌胃组,借鉴人类急性甲醇中毒的诊断标准制订该模型的评价指标,探讨其眼部结构和功能改变,较系统地建立了急性甲醇中毒的大鼠模型,为今后进一步研究视功能损害机理及救治方法打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

分析纯甲醇(广州化学试剂厂),以生理盐水稀释成质量浓度为30%的甲醇溶液;40 L压缩 N_2O_2 混合气体(11,广州气体厂);4%多聚甲醛、苏木素、伊红(中山眼科中心病理室提供);2.5%戊二醛、1%四氧化锇(中山大学医学院电镜室提供);枸橼酸钠抗凝管、生理盐水;NEUROPAK电生理检测仪(日本光电公司),Stemi 2000-C显微镜(德国ZEISS),H-600透射电镜(日本HITACHI)。

1.2 实验动物分组及模型建立

健康SPF级雄性SD大鼠32只(广东省医学实验动物中心提供,合格证号:粤监证字2005A010),体质量200~220 g,用随机数排序法分为4组,每组8只。A组:低剂量甲醇组;B组:高剂量甲醇组;C组:生理盐水对照组;D组:空气对照组。从灌胃前4 h起至实验结束,A、B、C组大鼠均置于一密闭有机玻璃箱中,以2 L/min的速度通入 N_2O_2 混合气体,D组大鼠置于正常空气中。开始通气时间定为0 h,分别在第4,24,48 h给各组大鼠灌胃,A组:首次甲醇灌胃剂量为2 g/kg,其后每次1 g/kg;B组:首次剂量4 g/kg,其后每次2 g/kg;C组:与B组等体积的生理盐水代替甲醇灌胃;D组:按B组剂量给予甲醇灌胃。第60小时停止通气,作各项指标检测。

1.3 模型的评价指标及方法

1.3.1 全身及眼部的中毒表现 观察甲醇灌胃后大鼠的反应、活动、意识状态、体质量变化;裂隙灯观察眼前节改变;直接眼底镜观察眼底等的改变。

1.3.2 视网膜电图检测 于第60小时取出大鼠暗适应4 h,复方托品酰胺散瞳,氯胺酮50 mg/kg、氯丙嗪25 mg/kg混合腹腔注射,丁卡因表麻,Neuropack电生理仪检测视网膜电图(electroretinogram, ERG),记录 I_{16} 单次白光刺激下a波、b波潜伏期及振幅。所有操作均在有微弱红光照明的暗室内进行,未检查眼用不透光黑布遮盖避光,角膜电极、参考电极和地电极分别置于角膜表面、舌下和尾部。

1.3.3 静脉血甲醇浓度的检测 ERG检查结束后,从右心房抽取静脉血2 mL注入枸橼酸钠抗凝管中充分振荡,采用顶空气相色谱法检测血中甲醇浓度。

1.3.4 视网膜组织学检查 断颈法处死大鼠,迅速摘除双眼球,解剖显微镜下分离视网膜,固定于4%多聚甲醛中48 h,按常规制成石蜡切片,HE染色,光镜下观察。

1.3.5 视网膜超微结构检查 按上述方法分离出1 mm×5 mm大小视网膜组织,PBS漂洗,固定于2.5%戊二醛4 h,冰箱过夜,次日1%四氧化锇后固定2 h,丙酮系列脱水,Epon812定向包埋制成超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,透射电镜下观察。

1.4 统计学分析

实验数据以均数±标准差表示,采用SAS 8.0统计软件的one-way ANOVA及SNK-q检验对各组间差异进行分析,以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 中毒表现

A组大鼠毛色差,活动减少,消瘦;B组1只大鼠于第2次灌胃后5 h死亡,其余动物毛色灰暗,反应呆滞,明显消瘦,运动失调,结膜及鼻孔出血。裂隙灯下各组动物角膜、前房、虹膜、晶状体未见特殊改变;直接眼底镜下A组动物出现视网膜血管轻度迂曲及点状出血,B组动物视盘边界不清,表面充血,视网膜灰白混浊,有点、片状出血,血管迂曲变细。C、D组动物毛色光滑,反应如常,眼底无异常改变。实验结束时,C、D组体质量无显著性

差异;与对照组比较,A、B组体质量下降,差异有统计学意义($F=30.84, P<0.0001$,表1)。

表1 灌胃前后各组大鼠的体质量变化

Table 1 Changes of body mass in rats before and after gavage

Group	$(\bar{x} \pm s, g)$	
	Before gavage	After gavage
A	209 \pm 12	187 \pm 12 ¹⁾
B	212 \pm 9	176 \pm 13 ¹⁾
C	209 \pm 1	223 \pm 7
D	208 \pm 0	220 \pm 3

SNK-q test, 1) Compared with group C and D, $P<0.05$

2.2 视网膜电图

A组、B组中分别有1只和2只大鼠ERG波形熄灭,其余数据见表2。A、B组大鼠的a波及b波振幅较对照组明显下降($P<0.0001$),B组b波潜伏期较其它组别延长($P<0.05$),a波潜伏期无明显改变($P>0.05$)。C、D组ERG各成分之间差异无统计学意义($P>0.05$)。ERG波形改变见图1。

表2 各组大鼠ERG的a、b波潜伏期及振幅

Table 2 Comparison of the latency and amplitude of a-wave and b-wave in ERG between methanol-intoxicated and control group

Group	a-wave		b-wave	
	Latency(ms)	Amplitude(μ V)	Latency(ms)	Amplitude(μ V)
A	18.2 \pm 2.0	87 \pm 13 ¹⁾	43.2 \pm 3.7	187 \pm 38 ¹⁾
B	18.0 \pm 1.5	53 \pm 19 ¹⁾²⁾	54.5 \pm 13.1 ³⁾	132 \pm 39 ¹⁾
C	17.7 \pm 1.6	122 \pm 24	42.0 \pm 4.8	391 \pm 108
D	17.0 \pm 1.6	121 \pm 26	42.2 \pm 3.7	343 \pm 110
F	0.695	13.88	4.72	13.32
P	0.564	< 0.001	0.01	< 0.001

SNK-q test, 1) Compared with group C and D, $P<0.05$; 2)

Compared with group A, $P<0.05$; 3) Compared with other groups, $P<0.05$

2.3 静脉血甲醇浓度

标准曲线 $C=6.8989+0.008254A$ (A为峰面积)。相关系数 $r=0.9938$ 。A组静脉血甲醇浓度为(43.8 \pm 16.5) mmol/L, B组为(219.0 \pm 41.0) mmol/L,均显著高于C组(3.4 \pm 2.4) mmol/L和D组(14.4 \pm 6.2) mmol/L ($F=161.42, P<0.0001$);其中B组比A组增高更为明显($P<0.05$)。C、D组比较, $P>0.05$ 。

2.4 视网膜病理改变

2.4.1 光镜改变 A组视网膜内、外颗粒层排列

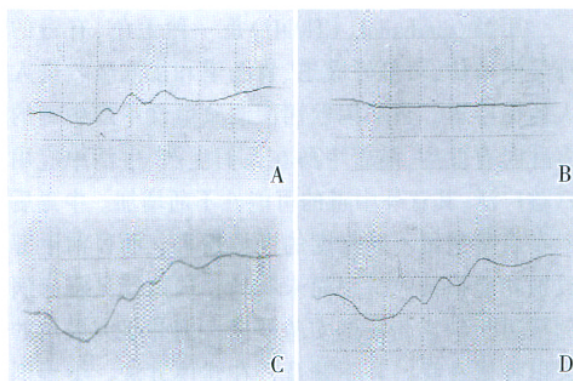


图1 中毒组与对照组大鼠的视网膜电图

Fig.1 Electroretinogram of methanol-intoxicated and control group

A: Markedly reduction of a-wave and b-wave in group A and B; B: Extinction of ERG in one and two rats of group A and B respectively; C and D: Normal ERG in control groups (group C and D)

紊乱,细胞间隙扩大,神经节细胞层轻度水肿(图2A);B组视网膜各层水肿,光感受器外节出现空泡,外颗粒层、内颗粒层排列明显紊乱,细胞间隙扩大,神经节细胞层疏松、水肿,空泡明显(图2B);C组、D组视网膜形态正常,结构清楚,各层细胞排列整齐、紧密(图2C、D)。

2.4.2 电镜改变 B组内、外颗粒层细胞凋亡普遍,细胞核固缩,细胞器结构不清(图3A);光感受器膜盘排列紊乱、肿胀并出现空泡(图3B);内、外节及内、外丛状层线粒体广泛肿胀,部分线粒体嵴断裂、空泡化甚至嵴消失(图3C)。A组改变较B组轻,有细胞凋亡现象但不常见。C、D组大鼠视网膜超微结构正常,细胞排列紧密,染色质疏松、清晰,膜盘排列整齐,线粒体形态正常(图3D、E、F)。

3 讨论

3.1 急性甲醇中毒的临床诊断标准及模型评价指标

人类急性甲醇中毒主要表现为神经系统和眼部的损害,临床诊断标准依据甲醇摄入史、血液甲醇浓度超标、神经系统及眼部损害的症状和体征如头痛、意识障碍、视物模糊、视野损害、视网膜电图和视觉诱发电位异常等^[1,3]。本研究采用灌胃的方式模拟甲醇经口染毒的过程,并借鉴了人类急性甲醇中毒的诊断标准制订模型的评价指标,包括一般表现、静脉血甲醇浓度、ERG及视网膜病理改变,从功能学和形态学两方面评价甲醇中毒对眼部的影响,结果显示上述指标与人类中毒后的改

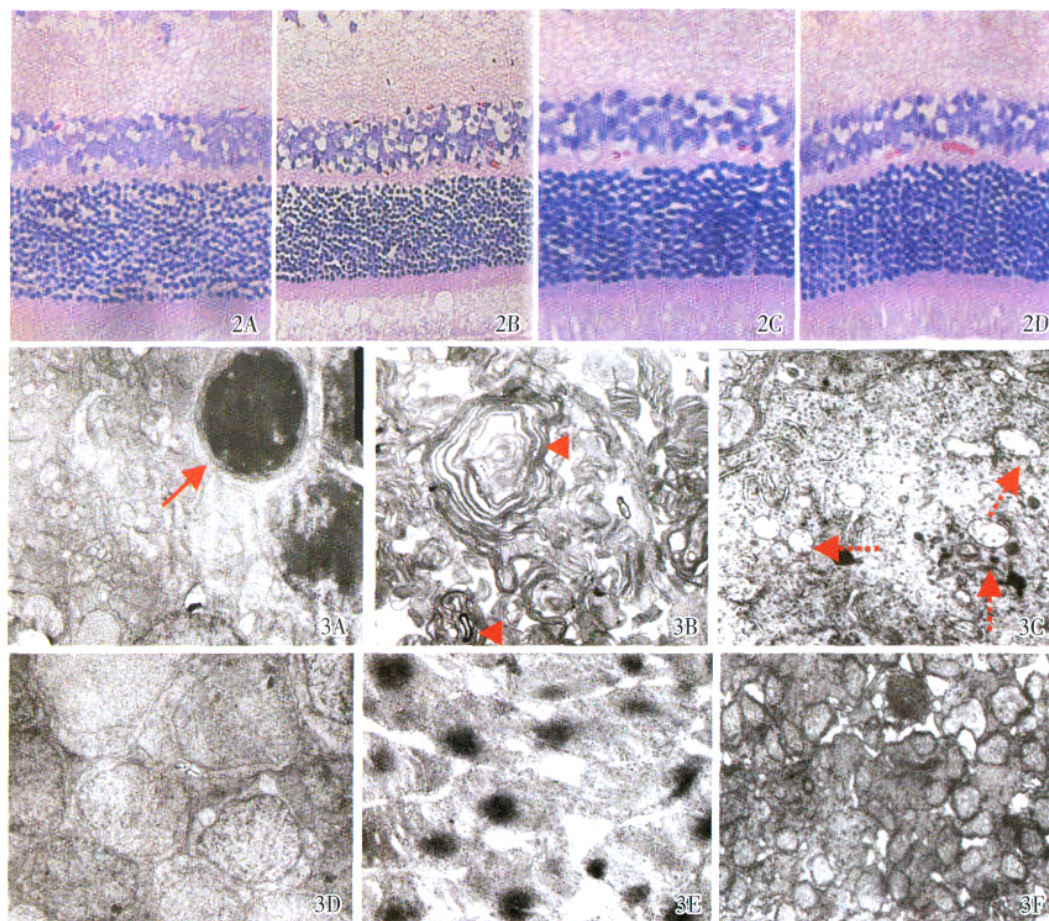


图2 光镜下中毒组与对照视网膜各层结构

图3 电镜下中毒组与对照视网膜超微结构

Fig.2 Retinal histology of methanol-intoxicated and control group under light microscope

2A: group A manifested derangement of the inner and outer nuclear layer and enlarged spacing between the cells; 2B: group B displayed obvious retinal edema with prominent vacuoles at the outer segment of photoreceptors; visible disarrangement of the inner and outer nuclear layer with dilated cell space; large vacuoles and edema of the ganglion cell layers; 2C and 2D: Normal retinal morphous of group C and D, respectively; HE, $\times 200$

Fig.3 Retinal ultrastructure of methanol-intoxicated and control group under electronmicroscope

3A: Widespread apoptosis of retinal cells with evident nuclear pyknosis in group B (red long arrow, $\times 8\ 000$); 3B: Derangement and dilated photoreceptor discs were seen in group A and B (red arrowhead, $\times 6\ 000$); 3C: Mitochondria of group A and B were generally swollen with disrupted cristae; some were difficult to identified (red dash line arrow, $\times 10\ 000$); D to F showed the normal retinal ultrastructure in group C and D; 3D: round and tightly aligned cells ($\times 4\ 000$); 3E: well-arranged photoreceptor discs ($\times 17\ 000$); 3F: regular oval-shaped mitochondria ($\times 1\ 500$)

变非常接近,表明吸入 N_2O/O_2 混合气及甲醇灌胃可复制出典型的急性甲醇中毒大鼠模型。

3.2 模型建立的关键点

啮齿类动物由于体内四氢叶酸水平比灵长类高,能辅助10-甲酰四氢叶酸脱氢酶(10-FDH)降解甲醇毒性代谢产物,不容易产生甲醇中毒^[4]。 N_2O/O_2 混合气能抑制大鼠体内四氢叶酸盐合成^[5],使10-FDH丧失解毒能力,是本模型制作的关键之一。通入 N_2O/O_2 混合气4h后开始灌胃是为了完全抑制10-FDH的活性,再采用首次剂量加倍、重复两次灌胃,使甲醇浓度达到一个相对恒定的状

态,保证了建模成功。生理盐水对照组(C组)无异常表现,表明 N_2O/O_2 混合气对大鼠的正常生理状态无影响。为评价不同剂量甲醇对大鼠的影响,本实验将动物分为低、高剂量甲醇灌胃组比较,发现高剂量组(B组)中毒表现更为突出;低剂量组(A组)各种改变较轻,这种建模方法能较全面地模拟人类不同程度的中毒表现。

3.3 急性甲醇中毒的眼部损害及其可能机制

甲醇对眼部损害主要体现在眼底的异常改变。ERG是反映视网膜功能的一项、敏感检查,a波代表了光感受器的电位变化,b波反映视网膜内颗

