

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.01.011

SD大鼠急性乙二醇中毒的法医病理学研究

朱士胜¹, 黄伟², 赵鹏¹, 朱英¹, 王徐¹, 刘剑波¹, 刘明博¹,
李永国¹, 刘云志¹, 唐任宽¹, 李红卫³, 李剑波¹

(1. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆市公安局交通管理局, 重庆 400060;
3. 重庆市公安局刑警总队技术处, 重庆 400021)

【摘要】目的:探讨急性乙二醇(ethylene glycol, EG)中毒的病理学变化, 为急性 EG 中毒的法医病理学鉴定提供客观诊断依据。**方法:**将 30 只 SD 大鼠随机分为空白对照组和急性 EG 中毒组, 急性 EG 中毒组用 12 ml/kg 的 EG 行灌胃处理。取各组动物的肾脏、肝脏和肾脏等组织标本, 行 HE 染色。并用透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察各组动物的肾脏和肝脏。**结果:**急性 EG 中毒组的各组织样本均有不同程度的损害, 以肾脏损害最为严重, 并可见淡蓝色草酸钙结晶。TEM 下可见急性 EG 中毒组的肾小管上皮细胞和肝脏细胞的细胞质及管腔内有圆形、椭圆形高密度电子颗粒(草酸钙结晶)沉积。**结论:**各组织器官草酸钙结晶沉积和以肾脏损害为主的靶组织器官病理变化或可作为急性 EG 中毒的法医学鉴定的病理诊断依据。

【关键词】乙二醇; 急性中毒; 斯泼累格·多雷大鼠; 透射电子显微镜; 法医病理学

【中图分类号】D919

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-02-08

Forensic pathology findings of SD rats with acute ethylene glycol poisoning

Zhu Shisheng¹, Huang Wei², Zhao Peng¹, Zhu Ying¹, Wang Xu¹, Liu Jianbo¹, Liu Mingbo¹,
Li Yongguo¹, Liu Yunzhi¹, Tang Renkuan¹, Li Hongwei³, Li Jianbo¹

(1. Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University; 2. Traffic Administration Bureau, Public Security Bureau of Chongqing;
3. Department of Technology, Interpol Corps, Public Security Bureau of Chongqing)

【Abstract】Objective: To explore the pathological changes of acute ethylene glycol(EG) poisoning and to provide the objective diagnosis index for its forensic identification. **Methods:** Totally 30 SD rats were randomly divided into control group and acute EG poisoning group. Animals in acute EG poisoning group were poisoned with EG (12 ml/kg) in a manner of gastric perfusion. Tissue samples of heart, liver, and kidneys in each group were obtained and HE staining was conducted. Besides, transmission electron microscopy(TEM) was also used to observe the tissue samples from kidney and liver of each group. **Results:** In acute EG poisoning group, all tissue samples showed different degrees of pathological damage, especially in kidney, in which the light-blue calcium oxalate crystals were found. Under TEM, circular or oval-shaped high density electronic particles depositions(calcium oxalate crystals) were observed in renal tubular epithelial cells as well as in liver cells. **Conclusions:** Calcium oxalate crystals deposite in various organs and pathological damages mainly locate in kidney which may provide the objective diagnosis index for forensic identification of acute EG poisoning.

【Key words】ethylene glycol; acute poisoning; Sprague Dawley rats; transmission electron microscopy; forensic pathology

乙二醇(ethylene glycol, EG)是一种无色、无臭、有甜味的水溶性液体, 广泛应用于合成纤维、塑料、化妆品、太阳能热导体, 也用作溶剂、配制发动机的防冻剂。1930 年美国学者首次报道了 EG 中毒死亡的病例^[1-2]。随着化工产业和汽车制造业的不断快

速发展, EG 的应用愈加广泛, 加之很容易被人们获得, 故时有误服、自杀或他人投放 EG 而引起急性中毒致死的案例发生和报道^[3-10]。急性 EG 中毒后, 因其临床表现无特异性且多无详细案情资料, 中毒者在医院救治期间医师根本无从下手, 而贻误最佳治疗时间, 死亡诊断几乎都是死因不明或归于心脏病发作、急性肾功能衰竭和中枢神经系统严重抑制。因此, 研究急性 EG 中毒的组织病理变化, 将对急性 EG

作者简介: 朱士胜, Email: zss1003@hotmail.com,

研究方向: 法医学。

通信作者: 李剑波, Email: ljb2032008@163.com。

中毒致死的法医病理学鉴定具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年 SD 大白鼠 30 只,雌雄不限,体质量 180~220 g。随机分为 2 组:急性 EG 中毒组 20 只;空白对照组 10 只。实验动物由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 药品及主要试剂 EG、乙醇和甲醛(购自重庆川东化工有限公司)均为分析纯,戊二醛(购自江苏永华精细化学品有限公司),四氧化钨(购自南京东锐铂业有限公司),醋酸双氧铀(购自西安鼎天化工有限公司),枸橼酸铅(购自营口天元实业精细化工有限公司)。

1.1.3 主要仪器 OLYMPUS-BX51 型显微镜(日本奥林巴有限公司),H-7500 TEM(日立公司),BMJ-III 型石蜡包埋机(美国 TEICA 公司),Leica RM2135 型石蜡切片机(德国 Reichert-Jung 公司),Reichert-Jung 超薄切片机(德国 Reichert-Jung 公司)。

1.2 方法

1.2.1 急性 EG 中毒模型的建立 对急性 EG 中毒组的 20 只 SD 大鼠按 12 ml/kg EG 行胃灌注。EG 行胃灌注后有 8 只死亡(胃灌注后第 2 天、第 3 天分别死亡 5 只、3 只),其余在胃灌注后第 4 天处死。空白对照组 10 只不做任何处理。

1.2.2 观察记录 在清洁状态下进行 SD 大鼠的喂养,每天定时观察记录所有动物行为学是否有改变直至取材前。

1.2.3 取材固定及切片 急性 EG 中毒组中中毒死亡的即刻解剖取材;其余于胃灌注 EG 后第 4 天处死解剖取材。提取所有实验动物的心脏、1/2 肝脏、脾脏、肺脏、1/2 肾脏和胃肠道用 10% 福尔马林固定液固定过夜,流水漂洗已固定的组织块 30 min,脱水、透明、浸蜡,BMJ-III 型石蜡包埋机包埋,Leica RM2135 型石蜡切片机连续切片。所有实验动物余下 1/2 肾脏和 1/2 肝脏经 4% 戊二醛及 1% 四氧化钨(均用 PBS 配制, pH 7.4)作预固定和后固定各 2 h,酒精及丙酮逐级脱水,环氧树脂 618 包埋,Reichert-Jung 超薄切片机作 0.5 μ m 超薄切片,1% 甲苯胺蓝-天青 II 染色后制备超薄切片。

1.2.4 HE 染色观察 常规 HE 染色后,OLYMPUS-BX51 型显微镜观察。

1.2.5 H-7500TEM 观察 超薄切片经醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色,H-7500TEM 观察。

2 结果

2.1 行为学观察

正常对照组:SD 大鼠均生活良好,未见异常及反常现象。急性中毒组:灌注 EG 2 h 后,动物行为学出现明显改变,如:精神萎靡、嗜睡、行动缓慢、少动和少食等;有 5 只 SD 大鼠于

胃灌注后第 2 天死亡,3 只 SD 大鼠于胃灌注后第 3 天死亡。

2.2 HE 染色观察结果

2.2.1 心脏 心肌细胞部分水变性,部分坏死,中毒致死的 SD 大鼠心肌细胞坏死更明显,伴炎细胞浸润;间质有不同程度疏松水肿,部分毛细血管扩张充血,血管内皮细胞脱落,平滑肌细胞变性坏死,可见渗出的浆液、纤维素和红细胞。

2.2.2 肺脏 存在不同程度的肺气肿和肺水肿;个别肺泡腔内可见单核细胞及泡沫细胞;肺泡壁有散在炎细胞浸润;肺泡壁肺泡毛细血管充血,部分血管腔内可见血栓,血管内皮细胞及管壁平滑肌细胞变性坏死。中毒致死的 SD 大鼠还可见细小支气管黏膜上皮坏死脱落,管腔内可见红细胞,管腔内及周围肺泡腔内可见以中性粒细胞为主的大量炎细胞浸润。

2.2.3 肝脏 部分肝细胞水变性及脂肪变性,点灶状坏死、出血伴炎细胞浸润;血窦扩张淤血,部分血窦内可见淡蓝色草酸钙结晶,部分血窦内可见微血栓;枯否氏细胞轻度增生,中央静脉及部分血管内皮细胞极性化,中央静脉及血管周围可见炎细胞。中毒致死的病变相对较重,可见部分肝细胞索解离,个别血窦内可见渗出的浆液、纤维素、炎细胞;Disse 间隙扩张,汇管区血管内皮细胞及平滑肌细胞变性坏死,部分管腔内可见血栓形成,胆管上皮细胞空泡变,被膜外出血。具体见图 1。

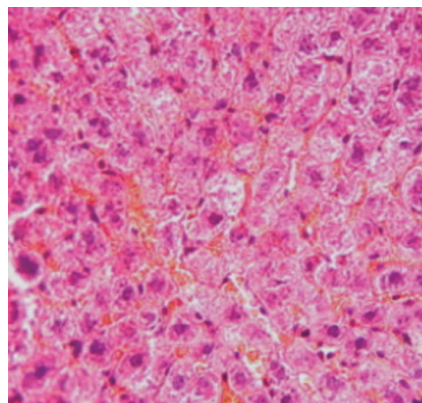
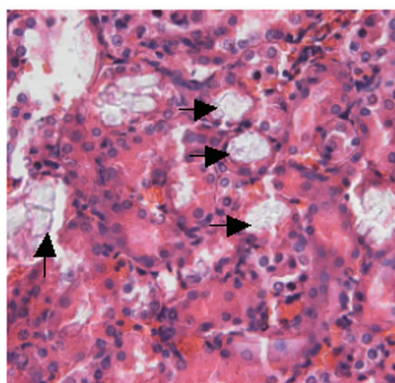


图 1 肝细胞变性、坏死 (HE,400 $\times$)

Fig.1 Denaturation and necrosis of hepatic cell (HE,400 $\times$)

2.2.4 肾脏 肾小球毛细血管扩张淤血,可见中性粒细胞,基底膜肿胀,有局灶性成纤维细胞增生;肾小管上皮细胞水肿,点灶状坏死伴出血,部分管腔内可见淡蓝色草酸钙结晶(图 2);间质血管扩张淤血,内皮细胞及平滑肌细胞变性,血管壁外侧可见炎细胞浸润。中毒致死的 SD 大鼠还可见肾包膜出血、伴少许炎细胞浸润;肾盂黏膜上皮细胞变性坏死。

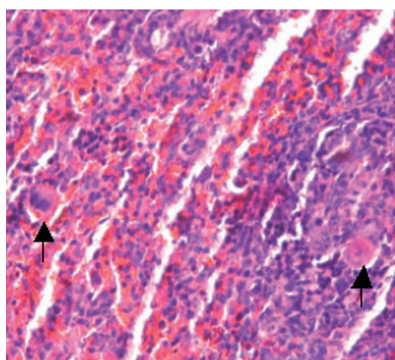
2.2.5 脾脏 淋巴滤泡周围及其内可见伊红色渗出物,淋巴滤泡内可见核空泡变、坏死伴有炎细胞浸润;血窦扩张淤血,血窦内可见多核巨核细胞和中性粒细胞(图 3);中央动脉内皮细胞及平滑肌细胞变性、纤维素样坏死伴有炎细胞浸润。



肾小管内可见淡蓝色草酸钙结晶 (→)

图 2 肾细胞变性、坏死 (HE, 400 ×)

Fig.2 Denaturation and necrosis of renal cell (HE, 400 ×)



脾淤血、出血、可见多核巨细胞 (→)

图 3 脾细胞变性、坏死 (HE, 200 ×)

Fig.3 Denaturation and necrosis of spleen cell (HE, 200 ×)

2.3 H-7500TEM 观察结果

2.3.1 肝脏 肝细胞细胞核异染色质边集,部分肝细胞染色质溶解,核仁解离;滑面内质网广泛轻度扩张;部分线粒体轻度内室肿胀;间质毛细血管内皮细胞核异染色质边集;肝脏内可见少量糖原和高密度电子颗粒沉积(图 4)。

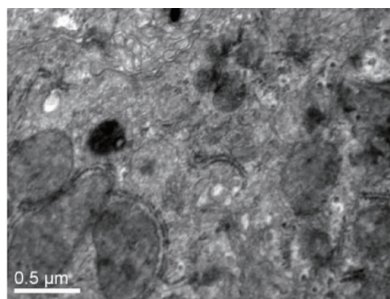


图 4 糖原和高密度电子颗粒沉积 (30 000 ×)

Fig.4 Deposition of glycogen and high density electron granules (30 000 ×)

2.3.2 肾脏 近端小管细胞质内较多的呈圆形、椭圆形高电子密度颗粒;近端小管基底膜节段性增厚;微绒毛肿胀,管腔内有高密度电子的物质沉积(图 5)。肾小球毛细血管血-尿屏障基底膜呈节段性增厚,主细胞突起,部分融合。

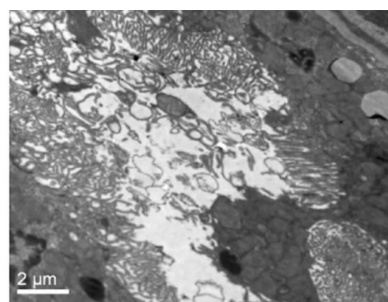


图 5 近端小管有高密度电子颗粒沉积 (6 000 ×)

Fig.5 Deposition of high density electron granules in renal proximal tubule (6 000 ×)

3 讨论

EG 又名甘醇、1,2-亚乙基二醇等。分子式: $C_2H_6O_2$, 结构简式: $HO-CH_2CH_2-OH$, 分子量: 62.068, 沸点: $197.4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 冰点: $-11.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 能与水、丙酮互溶, 但在醚类中溶解度较小。EG 是合成涤纶纤维的主要原料, 也常用作防冻剂、清洁剂、炸药、油漆、塑料、化妆品、药物等多种化工生产的溶剂和中间体。

EG 属低毒类, 可通过呼吸道及消化道迅速吸收, 并很快在肝脏和肾脏代谢转化, 体内无明显蓄积, 其半衰期为 3 h ^[11-12], 摄入后 24 h 组织和尿中便检测不出^[13], 其在体内的生物转化及一系列代谢产物的生成是其毒性作用的基础。急性 EG 中毒主要损伤肾脏、神经系统、肺脏和心脏等^[14-20]。EG 在肝脏代谢的第 1 步反应是其代谢的关键步骤, 该反应是在乙醇脱氢酶作用下转化生成乙醇醛。由于乙醇脱氢酶还可催化乙醇、甲醇等的氧化反应, 故当有大量类似酶底物存在时, 可通过酶竞争性抑制作用而阻断 EG 的代谢, 这也是临床用乙醇或甲吡唑治疗 EG 中毒的理论依据^[21]。乙醇醛进一步在乙醛氧化酶和乙醛脱氢酶的作用下生成乙醇酸, 继而经乙醇酸氧化酶或乳酸脱氢酶催化后转化成乙醛酸, 经乙醛酸氧化酶催化再分解为草酸、甲酸和甘氨酸。EG 生物转化产生的 4 个主要代谢产物乙醇醛、乙醇酸、乙醛酸和草酸毒性都比 EG 毒性大。乙醇醛作为醛类之一, 其代谢产物可抑制氧化磷酸化反应、细胞呼吸、葡萄糖代谢、蛋白质合成、DNA 复制、核糖体 RNA 的合成等, 通过细胞毒作用直接损伤集体组织。乙醇酸是 EG 代谢过程中产生的重要的导致代谢性酸中毒的有机酸之一; 乙醛酸的代谢因对三羧酸循环有抑制作用, 从而导致体内乳酸生成增多; 且 EG

代谢过程中产生大量的还原性尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸,间接导致体内乳酸堆积;结果会导致严重的代谢性酸中毒^[14-15]。草酸可与钙结合形成草酸钙结晶,沉积于以肾脏^[16-17]为主的各组织器官,直接或间接造成组织器官的损伤和功能障碍。

本研究主要发现急性 EG 中毒后 SD 大鼠心脏、肝脏、肾脏实质细胞变性坏死、组织疏松水肿、血管扩张充血、出血等;肺气肿症明显,伴有不同程度的肺水肿;脾脏内可见多核巨细胞形成;器官组织中血管病变明显:血管内皮细胞肿胀脱落、细胞核拉长、深染,血管平滑肌变性、纤维素性坏死、伴炎细胞浸润,部分管腔内可见血栓形成。肾小管腔内可见淡蓝色结晶管型(草酸钙结晶),肝脏内也可见淡蓝色结晶体(草酸钙结晶)。超微结构示肝脏内、肾小管管腔和近端小管上皮细胞胞质中可见高密度电子颗粒(草酸钙结晶)存在。可见急性 EG 中毒后,各靶组织器官均有不同程度的病理损伤,其中以肾脏病理损害最为明显,这与国外个案研究报道一致^[22-23]。

综上所述,以肾脏为主的各组织器官草酸钙结晶沉积和以肾脏损伤为主的病理变化或将可以作为急性 EG 中毒法医病理学鉴定的主要参考依据。

在法医实践检案过程中,如发现有以急性肾功能衰竭、心肺功能障碍和中枢神经系统严重抑制等临床表现,同时尸体解剖发现以肾脏为主的各组织器官草酸钙结晶沉积和严重的肾脏病理变化,应高度警惕 EG 中毒的可能,需结合法医毒物分析进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Friedman EA, Greenberg JB, Merrill JP, et al. Consequences of ethylene glycol poisoning, report of four cases and review of the literature[J]. Am J Med, 1962, 32(6): 891-902.
- [2] Levy RI. Renal failure secondary to ethylene glycol intoxication[J]. JAMA, 1960, 173(11): 1210-1213.
- [3] Jaffery JB, Aggarwal A, Ades PA, et al. A long sweet sleep with sour consequences[J]. Lancet, 2001, 358(9289): 1236.
- [4] Tobé TJ, Braam GB, Meulenbelt J, et al. Ethylene glycol poisoning mimicking Snow White[J]. Lancet, 2002, 359(9304): 444-445.
- [5] Leth PM, Gregersen M. Ethylene glycol poisoning[J]. Forensic Sci Int, 2005, 155(2-3): 179-184.
- [6] Armstrong EJ, Engelhart DA, Jenkins AJ, et al. Homicidal ethylene glycol intoxication: a report of a case[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2006, 27(2): 151-155.
- [7] McStay CM, Gordon PE. Images in clinical medicine. Urine fluorescence in ethylene glycol poisoning[J]. N Engl J Med, 2007, 356(6): 611.
- [8] Garg U, Frazee C 3rd, Johnson L, et al. A fatal case involving extremely high levels of ethylene glycol without elevation of its metabolites or crystalluria[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2009, 30(3): 273-275.
- [9] Brent J. Fomepizole for ethylene glycol and methanol poisoning[J]. N Engl J Med, 2009, 360(21): 2216-2223.
- [10] Porter WH. Ethylene glycol poisoning: quintessential clinical toxicology; analytical conundrum[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(3-4): 365-377.
- [11] Parry MF, Wallach R. Ethylene glycol poisoning[J]. Am J Med, 1974, 57(1): 143-150.
- [12] Linnanvuo-Laitinen M, Huttunen K. Ethylene glycol intoxication[J]. J Toxicol Clin Toxicol, 1986, 24(2): 167-174.
- [13] Brown CG, Trumbull D, Klein-Schwartz W, et al. Ethylene glycol poisoning[J]. Ann Emerg Med, 1983, 12(8): 501-506.
- [14] Gabow PA, Clay K, Sullivan JB, et al. Organic acids in ethylene glycol intoxication[J]. Ann Intern Med, 1986, 105(1): 16-20.
- [15] Patocka J, Hon Z. Ethylene glycol, hazardous substance in the household[J]. Acta Medica (Hradec Kralove), 2010, 53(1): 19-23.
- [16] Cruzan G, Corley RA, Hard GC, et al. Subclinical toxicity of ethylene glycol in Wistar and F-344 rats related to metabolism and clearance of metabolites[J]. Toxicol Sci, 2004, 81(2): 502-511.
- [17] McMartin KE, Wallace KB. Calcium oxalate monohydrate, a metabolite of ethylene glycol, is toxic for rat renal mitochondrial function[J]. Toxicol Sci, 2005, 84(1): 195-200.
- [18] Froberg K, Dorion RP, McMartin KE. The role of calcium oxalate crystal deposition in cerebral vessels during ethylene glycol poisoning[J]. Clin Toxicol (Phila), 2006, 44(3): 315-318.
- [19] Lovrić M, Granić P, Cubrilo-Turek M, et al. Ethylene glycol poisoning[J]. Forensic Sci Int, 2007, 170(2-3): 213-215.
- [20] Rosano TG, Swift TA, Kranick CJ, et al. Ethylene glycol and glycolic acid in postmortem blood from fatal poisonings[J]. J Anal Toxicol, 2009, 33(8): 508-513.
- [21] Stokes JB, Aueron F. Prevention of organ damage in massive ethylene glycol ingestion[J]. JAMA, 1980, 243(20): 2065-2066.
- [22] Pomara C, Fiore C, D'Errico S, et al. Calcium oxalate crystals in acute ethylene glycol poisoning: a confocal laser scanning microscope study in a fatal case[J]. Clin Toxicol (Phila), 2008, 46(4): 322-324.
- [23] Jialal I, Devaraj S. Laboratory diagnosis of ethylene glycol poisoning: The cup is half full?[J]. Am J Clin Pathol, 2011, 136(2): 165-166.

(责任编辑:冉明会)