DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.005
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1227-03

论著

4-DMAP对缺氧红细胞生成高铁血红蛋白的效应特点

袁菊芳[1],叶华虎[2],李奇慧[1],曾 惠[1],董兆君[1],恽榴红[2],阮金秀[2] ([1]第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]军事医学科学院,北京 100850)

提 要:目的 探讨急性缺氧条件下4-DMAP对红细胞生成高铁血红蛋白的效应特点。方法 新鲜兔血离心洗涤后,置于特制的90% N_2+5% O_2+5% CO_2 混合气体缺氧罐内孵育,以复制急性缺氧红细胞模型。4-DMAP与缺氧红细胞作用一定时间后,采用分光光度法于波长635 nm测定高铁血红蛋白浓度。结果 急性缺氧对红细胞的血红蛋白含量无明显影响。当反应体系中4-DMAP浓度为6.49×10^{-7}、6.49×10^{-6}、6.49×10^{-5}、6.49×10^{-4}和6.49×10^{-3} mol/L时,缺氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力比常氧红细胞分别提高了22.0%、27.0%、51.44%、3.14%和5.05%。升高反应温度和延长缺氧时间均明显提高4-DMAP药理学效应。结论 缺氧增强4-DMAP对红细胞生成高铁血红蛋白的效应。

关键词:缺氧;4-DMAP;高铁血红蛋白
中图法分类号:R331.1+41;R827.172;R979.3 文献标识码:A

Effect of 4-DMAP on hypoxic erythrocytes in ferrihemoglobin formation

YUAN Ju-fang, YE Hua-hu, LI Qi-hui, ZENG Hui, Dong Zhao-jun, YUN Liu-hong, RUAN Jin-xiu (Department of Military Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To characterize the effect of 4-DMAP on hypoxic erythrocytes in ferrihemoglobin(MHb) formation. Methods The experimental erythrocytes were isolated from fresh rabbit blood and incubated in the mixed gases (90% N_2 + 5% O_2 + 5% CO_2) for the preparation of the hypoxic erythrocyte model. Ferrihemoglobin concentration (% of control) after the reaction of 4-DMAP and erythrocytes was determined by spectrophotography at the wave length of 635 nm. Results There was no difference in hemoglobin content between hypoxia groups and controls. It was demonstrated that the ability of ferrihemoglobin formation induced by 4-DMAP at the concentrations of 6.49×10^{-7}, 6.49×10^{-6}, 6.49×10^{-5}, 6.49×10^{-4} and 6.49×10^{-3} mol/L increased by about 22.0%, 27.0%, 51.44%, 3.14% and 5.05% in hypoxic erythrocytes, respectively. Both the increases in reaction temperature and the elongation of hypoxia period significantly enhanced the pharmacological effect of 4-DMAP on hypoxic erythrocytes. Conclusion Hypoxia can enhance the effect of 4-DMAP on hypoxic erythrocytes in ferrihemoglobin formation.

Key words: hypoxia; 4-DMAP; ferrihemoglobin

以氢氰酸为代表的氰化物,既是应用广泛的化工原料,又是极为重要的化学战剂,外军将其作为速杀性毒剂装备部队。此类毒剂进入机体迅速解离出氰离子(CN^-),后者与细胞色素氧化酶的三价铁(Fe^{3+})结合,抑制该酶的活性,从而阻断细胞对氧的利用,导致能量产生障碍。4-二甲氨基苯酚(4-Diaminophenol, 4-DMAP)是对氰化物中毒疗效最好的抗氰药物,在体内能将血红蛋白氧化为高铁血红蛋白,并与细胞色素氧化酶争夺氰离子,最终解除CN-对细胞色素氧化酶的抑制作用[1]。但迄今有关氰化物中毒的救治方案,以及4-DMAP形成对高铁血红蛋白的时-效、量-效参数均来源于普通常氧环境,尚未见缺氧环境下4-DMAP生成高铁血红蛋白相关报道。本实验以兔血红细胞为材料,研究缺氧对4-DMAP体外生成高铁血红蛋白的影响,为探索缺氧条件下氰化物中毒的有效救治方案提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试剂、仪器和动物:4-DMAP由本室合成,纯度97.5%;Triton X-100购自华美生物工程公司;氰化钠和氰化钾由军事医学科

基金项目:全军"九五"攻关课题(96L015)
作者简介:袁菊芳(1970-),女,四川省资中市人,硕士研究生,主要从事新药毒理学方面的研究。电话:(023)68752284
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2003-03-12;修回日期:2003-05-20

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

学院购买；其他试剂均为国产分析纯。UV-2200 型紫外分光光度计为日本岛津公司产品；缺氧罐由 5 L 干燥器改制，附设气体阀和测压表各 1 套。体质量为 1.9～2.1 kg 的日本大耳白兔由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 血样处理及急性缺氧细胞模型制备

经胸壁穿刺采集家兔心脏血，加等体积生理盐水，1 000 r/min× 10 min 离心洗涤 3 次。以 4.9 ml 氢氧化钠-磷酸盐缓冲液悬浮沉淀，制成红细胞悬液，当日使用。将红细胞悬液放置缺氧罐内，密封缺氧罐，迅速以 90% N_2＋5%O_2＋5% CO_2 混合气体反复置换 5 次以上，然后以相同气体持续交换，由气体截流阀控制罐内气压与外界相等。以常氧环境为对照组。恒温实验时，先将缺氧罐预置恒温培养箱内预温 4 h 以上。

1.3 血红蛋白 (Hb)总量测定

取血样 20 μl 于 5 ml 血红蛋白测试液(0.05 g 氢氧化钠，0.20 g 高铁氰化钾，0.14 g 磷酸氢二钾，1 ml Triton X-100，加双蒸水至 1 000 ml)，作用 5 min。测定 540 nm 的吸光度 A，计算血红蛋白总量。Hb 总量(g/L)＝A× 251× 64458/44000＝A× 367.7。

1.4 对高铁血红蛋白浓度测定

处理后的红细胞悬液加入 0.1 ml 4-DMAP 混匀培养。取 1.2 ml 血样两份，分别加入 10% Triton X-100 溶液 1.8 ml。一份于 635 nm 比色，测得吸光度 A_1。再加 5%氰化钾液一滴，2 min 后比色测得吸光度 A_2；另一份加 5%高铁氰化钾溶液一滴，反应 5 min 后，测得吸光度 A_3，再加氰化钾液一滴，反应 2 min 后测得吸光度 A_4，计算对高铁血红蛋白浓度。

计算公式：对高铁血红蛋白%＝(A_1－A_2)/(A_3－A_4)× 100%

1.5 统计学分析

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

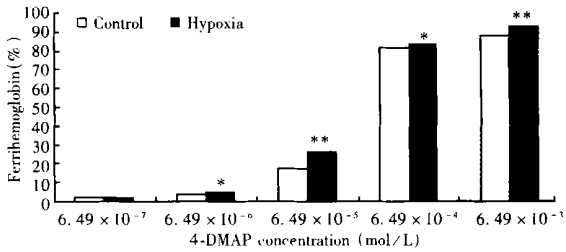
2 结果

常氧和缺氧兔红细胞 Hb 含量在(16.18～16.91) g/L 范围内波动，二者无显著差异。

2.1 4-DMAP 的量效关系

常氧条件下，随着反应体系中 4-DMAP 浓度的提高，与兔血红细胞作用所生成的高铁血红蛋白浓度逐渐增加，见图 1。当 4-DMAP 浓度为 6.49×10^{-7} mol/L 时，所生成的高铁血红蛋白仅有(1.63±0.50)%，4-DMAP 浓度为 6.49×10^{-5} mol/L 时，高铁血红蛋白为(17.69±0.49)%，当 4-DMAP 浓度为 6.49×10^{-3} mol/L 时，高铁血红蛋白为(89.50±0.69)%，呈现明显的剂量依赖趋势。

经过常压缺氧处理 6 h 的兔血细胞与 4-DMAP 反应后，生成的高铁血红蛋白浓度也随 4-DMAP 浓度的升高而升高，且存在明显的量-效依赖趋势。但在所用剂量范围内，4-DMAP 使红细胞生成高铁血红蛋白的能力明显增强。4-DMAP 浓度为 6.49×10^{-7}、6.49×10^{-6}、6.49×10^{-5}、6.49×10^{-4}和 6.49×10^{-3} mol/L 时，缺氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力比常氧红细胞分别提高了22.0%、27.0%、51.44%、3.14%和 5.05%，其快变化段在 1×10^{-7}和 1×10^{-4} mol/L 之间，提示缺氧红细胞对 1×10^{-7}～1×10^{-4} mol/L 之间的 4-DMAP 敏感性增强。临床实践中，抗氰药物的使用以产生 30%左右的对高铁血红蛋白为合适剂量。故在以后的实验中，4-DMAP 浓度均采用 6.49×10^{-5} mol/L。



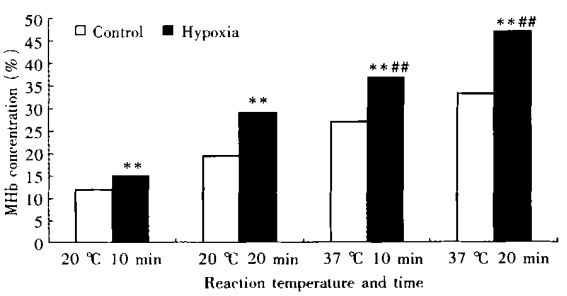
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control at the same concentration

图 1 缺氧对 4-DMAP 效应的影响(n=4)

Fig 1 Effect of hypoxia on the efficiency of 4-DMA in ferrihemoglobin(%) formation (n=4)

2.2 反应温度对4-DMAP 效应的影响

兔血细胞洗涤后，分别在 20 ℃和 37 ℃恒温条件下进行实验，缺氧处理 6 h，再与 4-DMAP 作用 10 min 或 20 min，测定对高铁血红蛋白。如图 2 所示，常氧红细胞于 20 ℃和 37 ℃条件下与 4-DMAP 作用 10 min 生成的高铁血红蛋白分别为%(12.02±0.34)%和(27.08±1.25)%($P<0.01$)，温度的升高使常氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力提高了 125.3%。而相同条件下4-DMAP 作用于缺氧红细胞所生成的高铁血红蛋白浓度分别为(15.13±0.53)%和(36.70±0.82)%($P<0.01$)，温度的升高使使缺氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力提高了 142.6%。而同为 37 ℃温度条件下，缺氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力是常氧红细胞的 135.5%。作用时间为 20 min 的结果与 10 min 相似，见图 2。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* 20 ℃ under hypoxia for same reaction time

图 2 温度对 4-DMAP 效应的影响(n=4)

Fig 2 Effect of reaction temperature on 4-DMAP efficiency in MHb formation(n=4)

2.3 反应时间对4-DMAP 效应的影响

表 1 所示为 37 ℃恒温条件下，4-DMAP 与常氧和缺氧两种红细胞作用不同时间所形成的高铁血红蛋白百份比。在 5～50 min 内，常氧红细胞生成高铁血红蛋白的浓度随 4-DMAP 作用时间的延长而增加，50～70 min 高铁血红蛋白浓度维持在平台水平。4-DMAP 与缺氧红细胞作用，所生成的高铁血红蛋白也随作用时间而变化，50 min 至 70 min 的平台水平与常氧红细胞相差不大。但缺氧红细胞 5 min 到 40 min 所生成的高铁血红蛋白水平明显高于常氧红细胞，见表 1。

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

表 1　4-DMAP 效应的时间变化 ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

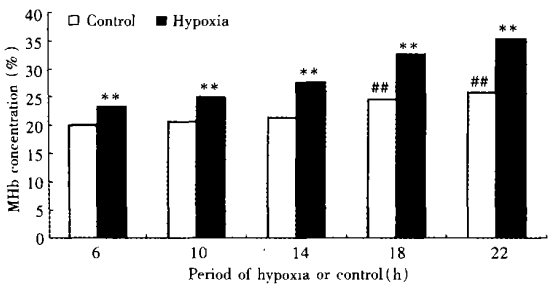
Tab 1　Temporal change of 4-DMAP efficiency ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Time (min)	Normal control	Normobaric hypoxia
0	2.10±0.21	2.11±0.13
5	5.20±0.72	7.62±0.50 *
10	27.08±1.25	36.70±0.82 **
20	33.32±0.58	47.06±1.27 **
30	55.90±1.62	64.10±1.81 **
40	67.76±1.98	70.37±0.49 *
50	74.15±1.71	76.72±1.83
60	75.79±1.40	77.90±1.34
70	79.61±0.13	79.19±2.18

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* normal control

2.4　缺氧时间对4-DMAP 效应的影响

将兔血红细胞置缺氧罐内缺氧 6~22 h, 然后加入 4-DMAP 反应 20 min, 测定高铁血红蛋白浓度变化。对照血样于常氧下放置相同时间。红细胞在常氧环境放置, 对 4-DMAP 的反应有所增加。见图 3 所示, 常氧放置 6 h, 经 4-DMAP 作用后生成的高铁血红蛋白为(19.96±1.54)%, 22 h 则为(25.95±2.32)%。缺氧使红细胞对 4-DMAP 的反应更加明显, 6、10、14、18、22 h 的药物效应分别增加了 15.92%、21.0%、29.8%、32.6%、36.45%。



**: $P<0.01$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* control at 6 h

图 3　红细胞缺氧时间对 4-DMAP 效应的影响 ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 3　Effect of hypoxia period on 4-DMAP efficiency ($n=4$　$\bar{x}\pm s$)

3　讨论

业已证实, 30%~40% 对高铁血红蛋白为抗氰化物中毒的最适浓度, 低于此浓度解毒效果欠佳, 而高于 50%则可能引起高铁血红蛋白血症[1,2]。4-DMAP 是目前广泛应用的抗氰药物之一, 但目前有关 4-DMAP 生成对高铁血红蛋白的实验参数均来自于常氧环境, 在高原地区, 空气稀薄, 氧分压低, 可能引起红细胞形态及生理指标发生改变[3,4]。但本实验显示短期急性缺氧, 血红蛋白总量和对高铁血红蛋白本底无明显变化, 与文献[5]报道结果一致。

本研究显示, 当 4-DMAP 浓度为 6.49×10^{-7}、6.49×10^{-6}、6.49×10^{-5}、6.49×10^{-4} 和 6.49×10^{-3} mol/L 时, 缺氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力比常氧红细胞分别提高了 22.0%、27.0%、51.44%、3.14% 和 5.05%。其快变化段在 1×10^{-7} 和 1×10^{-4} mol/L 之间。本结果说明, 缺氧红细胞对 1×10^{-7} 和 1×10^{-5} mol/L 之间的 4-DMAP 敏感性增强。温度是影响机体功能状态的重要因素之一。本研究显示, 当反应温度由 20 ℃升高到 37 ℃, 常氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力提高了 125.3%, 缺氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力提高了 142.6%。而同为 37 ℃温度条件下, 缺氧红细胞生成高铁血红蛋白的能力是常氧红细胞的 135.5%, 说明温度对缺氧条件下的 4-DMAP 药理学作用有重要的影响。

缺氧红细胞对 4-DMAP 敏感性的改变可能导致高铁血红蛋白峰值浓度的提高或峰值时间的提前。本实验结果证实, 红细胞缺氧 10 min 生成的高铁血红蛋白浓度已达 36.70%, 缺氧 20 min 的高铁血红蛋白接近毒害浓度。但常氧红细胞与 4-DMAP 作用 20 min 所产生的高铁血红蛋白仍在药理安全范围之内。

上述结果均说明, 缺氧使红细胞对 4-DMAP 的敏感性提高, 4-DMAP 的药理效应增强。若体内情况亦然, 则缺氧环境救治氰化物时 4-DMAP 的使用方案需要进行必要的修正。

缺氧处理后红细胞对 4-DMAP 敏感性增加的原因尚不清楚。Eyer 研究发现, 4-DMAP 静脉注射后, 迅速形成对高铁血红蛋白反应在红细胞内完成, 是由氧化型的 4-DMAP 与血红蛋白的-SH 共价结合而成。因此, 要将亚铁血红蛋白氧化为对高铁血红蛋白, 首先要求 4-DMAP 进入红细胞。而在缺氧环境下红细胞体积增大、膜组分改变、可能导致膜通透性增加[5], 以利于更多的 4-DMAP 透过质膜。此外, 陈振峰等[6]报道, 急进高原后, 人红细胞谷胱甘肽含量和谷胱甘肽过氧化物酶活性显著降低, 而超氧化物歧化酶(SOD)含量明显升高。谷胱甘肽是抗氧化剂, SOD 又是强氧化酶, 4-DMAP 的氧化活性是否受这些酶类的影响, 值得进一步研究。

参考文献:

[1] Yen D, Tsai J, Wang L M, *et al*. The clinical experience of acute cyanide poisoning[J]. Am J Emerg Med, 1995, 13(5): 524-528.

[2] Weger N P. Treatment of cyanide poisoning with 4-dimethylamino-phenl (DMAP)-experimental and clinical overview[J]. Fund Appl Toxicol, 1983, 3(2): 387-342.

[3] 李晓滨, 王索安. 高原实验家兔红细胞扫描电镜形态计量研究[J]. 青海医学院学报, 1994, 15(2): 12-17.

[4] 宋济范, 周晶萍, 叶俊雄, 等. 高原地区人群红细胞免疫粘附功能研究[J]. 高原医学杂志, 1995, 15(1): 12-14.

[5] 许栋应, 李建云, 殷斌志, 等. 亚硝酸钠作用于红细胞形成高铁血红蛋白的条件研究[J]. 环境与健康杂志, 1999, 16(5): 269-271.

[6] 陈振峰, 刘　兴, 王世鑫 等. 急性高原人群红细胞谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶的变化[J]. 环境与健康杂志, 1999, 16(3): 128-129.

(编辑　汪勤俭)

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