DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.035

氰化钠对大鼠不同脑区细胞色素氧化酶活性的影响

魏相德 王家凤 (第三军医大学卫防系毒理教研室) 630038

氰化物抑制细胞色素氧化酶活性,使组织不能利用氧,已为 Keillin 等人证实。氰化物对脑组织的细胞色素氧化酶同样具有抑制作用,影响脑组织糖代谢和能量供应[1]。脑组织对氰化物的敏感性,在一定程度上还与氰化物代谢有关[2]。急性氰化物中毒的临床表现有一个发展过程。本研究目的在于了解其中毒过程与脑组织细胞色素氧化酶活性抑制以及氰化物浓度的关系。为氰化物中毒的临床特点提供理论依据。

1 材料与方法

药物:氰化钠纯度为 96%以上,白色结晶颗粒,上海石油化工总厂产品;细胞色素 C VI 型,Sigma Chemical Company,USA 产品;吡哆醛盐酸盐纯度为 99%,上海试剂厂分装进口产品。其余一般试剂采用 AR 级试剂。

动物:Wistar 系大鼠 40 只雌雄各半,体重在 225~400g 之间,实验前 12h 禁食不禁水。实验时,动物随机分 3 组。正常对照组:仅静脉注射 0.9%NaCl 溶液;中毒 A、B 两组:分别静脉注射 0.1% NaCN3mg/kg 和 5mg/kg。注射后(含注射时间)在各确定时间,以颈部环、枢椎间断头,将头立即置于冰浴条件下,取出脑组织,弃血污。先摘取小脑部分,在脑干中脑脚,桥脑上缘切断,中脑以上部分为大脑区;桥脑以下为桥-延脑区,以上 3 个区分别称重,置入试管内按 10%(W/V)比例加入预冷的重蒸水,在冷浴条件下,制成匀浆备用。

试验:(1)氰化物含量测定:NaCN 标准液,准确称取 AR NaCN 并用双蒸水配制为 1mg/1ml 溶液,置于冰箱中备用。临用时吸取标准液 0.1ml 加水至 20ml 混匀,即标准稀释液(5μg/ml)。取微量扩散盒于中央池加入 0.1 mol/L NaOH 2ml 作吸收液;外池一侧加入 NaCN 标准稀释液 1ml,对侧加 50%H_2SO_4 1ml。立即加盖密封,振荡扩散 3h。揭盖,吸取中央池 NaOH 吸收液 1ml 于试管中,加入 0.2 mol/L NaH_2PO_4(pH7.5) 3.5ml 和 6×10^{-3}mol/L 吡哆醛盐酸盐溶液 0.5ml 混匀,在 50℃水浴中加热 60min。最后加入 0.2mol/L Na_2CO_3 1.0ml 中止反应。在日立 MPF-4 型萤光分光光度计,激发波 365nm。发射波 432nm 进行测定[3]。

吸取 1%脑匀浆混悬液 1ml,置于微量扩散盒外池一侧,其余操作和测定方法如上。与 NaCN 稀释标准测定比值,求得每克组织含氰化物毫克数。

(2)细胞色素氧化酶活力测定[4]:取 0.18mmol/L 细胞色素 C 0.5ml 于试管中,加入 0.03mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4) 2.4ml 和几粒 $Na_2S_2O_4$ 摇匀,在岛津 UV-365 型紫外分光光度计,狭缝 0.05,光径 10mm.波长 550nm 测得 OD 值,然后加 0.2%脑组织液 0.1ml,立即开始计时,随后每间隔 30 s,测定一次 OD 值,持续测定 5min。最后加饱和高铁氰化钾溶液一滴。使之完全氧化并纪录结果。以最小二乘法计算经原点线求其斜率 k 值。即为细胞色素 C 氧化速率常数,代表细胞色素氧化酶活力。χ^2-检验比较各组间显著性。

2 结果

2.1 脑组织氰化物浓度

大鼠静注氰化钠分别为 3mg/kg(1.26 LD_{50})和 5mg/kg(2.1 LD_{50}),5min 各脑区氰化物浓度差别不显著。

以 NaCN 3mg/kg 中毒 5min 后,大脑、小脑和桥-延脑区含 CN^- 浓度分别为 15.86μg/g 组织,12.73μg/g 组织和 16.07μg/g 组织;15minN 后,各区 CN^- 浓度迅速下降至中毒 5min 时的 44%、57%和 52%;30min CN^- 浓度进一步急剧减少,60min 仍有 CN^- 残留(如图 1)。

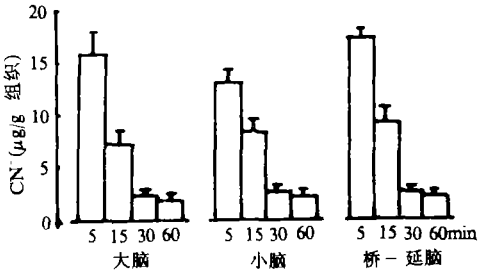


图 1 各脑区 CN^- 浓度的变化

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

2.2 细胞色素氧化酶活力变化

大鼠 NaCN3mg/kg 和 5mg/kg 分别中毒，5min 各脑区细胞色素 C 的氧化速率常数为 k(如表 1)，中毒组较正常组明显降低($P<0.01$)；B 组较 A 组更低($P<0.01$)，同时 A、B 两组大脑和桥-延脑的 k 值显著低于小脑 k 值($P<0.01$)。

表 1 NaCN 中毒 5min 大鼠脑组织细胞色素 C 氧化速率常数 k(min^{-1})($n=6$)

组织	正常组	NaCN i.v	
		A 组(3mg/kg)	B 组(5mg/kg)
大脑	0.140±0.01	0.09±0.013**	0.048±0.06**
小脑	0.130±0.01	0.128±0.03(4)	0.061±0.006**
桥-延脑	0.115±0.006	0.07±0.002**	0.049±0.008**(5)

**各中毒组与相应正常组的显著性测定 $P<0.01$

2.3 大鼠 NaCN3mg/kg 中毒，在不同时相各脑区细胞色素氧化酶活力变化

以 NaCN3mg/kg 中毒，大脑和小脑在 15min 下降至最低值分别为 0.067±0.006(6) 和 0.086±0.007(5)(如图 2)，尔后缓慢回升。桥-延脑在 5min 下降至最低点 0.07±0.002(5)，15min，呈现暂时的回升至 0.091±0.002(5)，随后又下降并维持在低水平。

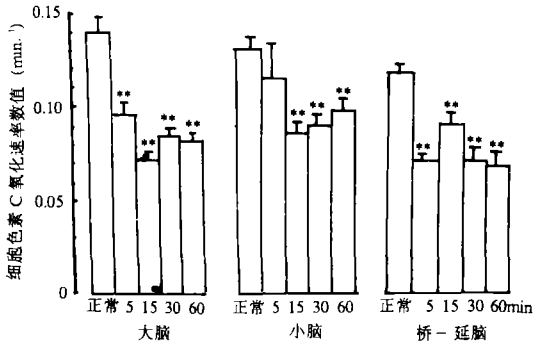


图 2 NaCN 中毒后各脑区细胞色素 C 氧化速率常数的改变

3 讨论

氰化物在体内主要抑制细胞内线粒体呼吸链的细胞色素氧化酶活力。Ison(5) 证明给予小鼠 KCN5min 内，脑组织细胞色素氧化酶活力抑制达最大值。此酶活力可通过对还原型细胞色素 C 的氧化能力得到体现。其反应速率与常数 k 呈正比关系，k 值大小表示细胞色素氧化酶活力。脑的重量仅占体重的 2%，但其耗氧量占整体耗氧量的 20～25%(6)，说明脑组织的代谢十分旺盛，对缺氧显得十分敏感(7)。氰化物中毒使组织不能利用氧，引起中枢缺氧体征显露突出。中毒脑组织 CN^- 浓度显然较高(如图 1)，3 个脑区均超过整机体平均每克组织平均理论值的 3～5 倍，以致脑组织对氰化物解毒机能失调(8)。尽管如此，CN^- 在脑组织中消除较快，特别是中毒后 30min 前迅速降低，此后维持在较低的水平，60min 仍有残存。

机体 NaCN 中毒 5min 后(如表 1)，中枢各脑区细胞色素氧化酶活力呈现严重抑制($P<0.01$)，抑制程度与毒剂量有关。NaCN3mg/kg 中毒 5min 后，大鼠各脑区，特别是大脑和桥-延脑区 k 值下降，酶活力分别为正常的 64.3% 和 60.9%。本文结果与 Mimori 等人(9) 实验结果基本一致。同时发现，中毒 15min 后，各脑区 CN^- 浓度已下降 50% 以下，除桥-延脑区酶呈暂时回升外，大、小脑区酶活力仍处于严重抑制，提示大、小脑处于抑制时，桥-延脑区有一个暂时兴奋；当前者酶活力开始恢复时，后者却处于抑制状态。似乎桥-延脑区酶活力恢复较困难，直接影响动物存活。

就 NaCN 中毒剂量而言，结果表明，大脑对 CN^- 较其它脑区敏感，酶活力的抑制随中毒剂量增加而加重。桥-延脑区酶活力也易受抑制，能量代谢障碍，以致功能抑制，此与氰化物中毒观察到的临床表现基本一致。由上述可见，临床上观察救治氰化物中毒病人恢复需要有一个过程，至少在 1h 内没有脱离危险。需要密切观察呼吸功能，并及时采取急救措施为抢救氰化物中毒的一项重要环节。

关键词 大鼠；氰化钠；细胞色素氧化酶类

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

参考文献

1. Albaum HG, Tepperman J, Bodansky O. The vivo in inactivation by cyanide of brain cytochrome oxidase and its effect on glycolysis and on the high energy phosphorus compounds in brain. J Biol Chem 1946;164:45～51
2. Piantadosi CA, Sylvia AL, Jobsis FF. Cyanide-induced cytochrome a,a_3 oxidation-reduction responses in rat brain in vivo. J Clin Invest 1983;72:1224
3. Morgan RL, Way JL. Fluorometic determination of cyanide in biologicol fliuds with pyridoxal. J Analytical Toxicol 1980;4:78～81
4. Schubert J, Brill W. Antagonism of experimental cyanide toxicity in relation to the in vivo activity of cytochrome oxidase. J Pharmacol Exp Therap 1968;162:352～359
5. Ison GE, Burrows GE, Way JL. Effect of oxygen on the antagonism of cyanide intoxication-cytochrome oxidase, in vivo. Toxicol Appl Pharmacol 1982;65(2):250～256
6. Smith EL, Hill RL, Lehman IR, et al. Principles of biochemistry: mammalian biochemistry. Seventh ed, metabolism of the brain 1983:266
7. 陈伯銮。急性脑衰竭的复苏。中国急救医学 1986;6(1):21～27
8. Piantadosi CA, Sylvia AL. Cerebral cytochrome a, a_3 inhibition by cyanide metabolizing enzymes in bloodless rats. Toxicology 1984;33(1):67～79
9. Mimori Y, Nakamura S, Kameyama M. Regional and subcellular: distribution of cyanide metabolizing enzymes in the central nervous system. J Neurochem 1984;43:540～545

(收稿:1991-10-04;修回:1992-01-20)

脓毒败血症大鼠肺脏细胞线粒体损伤及其发生机制的研究

蒋建新 汪江淮 陈惠孙 田昆仑 刁有芳 王 涛 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

本文在大鼠盲肠结扎穿孔(Cecal ligation and puncture,CLP)脓毒败血症后,观察了肺线粒体呼吸功能、膜流动性和线粒体内丙二醛含量的变化,旨在阐明线粒体损伤在脓毒败血症时肺功能衰竭方面的重要性以及线粒体的受损机制.

1 材料和方法

Wistar 大白鼠 32 只,体重 201±39g,雌雄兼有,随机分为对照组(n =8)、CLP 12h(n =8)、16h(n =8)和 20h(n =8)组。大鼠 CLP 感染性休克模型按 Wichterman 等人[1]方法复制,肺线粒体分离按 Reisis[2]等人方法改良.计算呼吸控制率(respiratory control ratio,RCR)和磷/氧比值(P/O)值。线粒体膜流动性测定按范崇竹等人[3]方法改良。计算荧光偏振度(P)、各向异性(γ)和微粘度($\bar{\eta}$)。线粒体内丙二醛测定按 TBA 荧光法[4],单位以 nmol/mg 线粒体蛋白表示。数据按单因素差分析统计组间显著差异性,并检验其相关性。结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

CLP 16 h,动物血压较对照值下降 72%($P<0.01$),至 CLP20h,血压下降更甚。表 1 所示,CLP 12h,P/O 值较对照值下降 18%($P<0.05$),RCR 无明显减少($P>0.05$).CLP 16h,P/O 值、RCR 分别较对照值下降 28%($P<0.01$)和 2%($P<0.01$),至 CLP 20h,两值下降更甚。CLP 12 h,p、γ、$\bar{\eta}$ 可分别较对照值升高 5.2%、5.8%和 16%($P<0.01$)。CLP16、20h,各值升高更多(表 2)。相关分析表明,$\bar{\eta}$ 与 P/O 值呈显著负相关($r=-0.75$,$P<0.001$)。CLP12h,MDA 较对照值升高 28%($P<0.01$),至 CLP16、20h,MDA 升高更甚(附图)。相关分析还表明,MDA 与 P/O 呈显著负相关 ($r=0.72$,$P<0.001$) 与 $\bar{\eta}$ 呈显著正相关($r=0.83$,($P<0.001$)。

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