DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.04.009

军事医学

无基质高铁血红蛋白的制备及抗氰效果初步观察

欧阳子倩 朱俊信 余争平（卫防系 毒理学教研室）

提 要 应用犬血或猪血制备了无基质高铁血红蛋白溶液。制备原理是根据血红蛋白氧化为高铁血红蛋白、在高渗磷酸缓冲液中结晶，经反复洗涤、离心、透析，除去所有细胞膜成分和脂质成分，方法稳定，重复性好。制取的SFMS其Na^+、K^+、Cl^-等离子浓度及pH值与正常血浆所含量相同，400～700nm的吸收曲线符合MHb的特性。

静注SFMS抗氰效果肯定，应用相当于动物体内总Hb7%的SFMS，测得大鼠的防护指数为2.25。SFMS与现用的抗氰药比较，前者能与CN^-直接结合并迅速排出体外；SFMS为外源性高铁血红蛋白，不损害正常红细胞带氧功能。

SFMS大鼠静注LD_{50}为1889±1370mg/kg，应用相当于大鼠体内总Hb的10%SFMS，心电未见异常改变；应用相当于Hb总量4%的SFMS对家兔血液离子浓度和血气均无明显影响。

关键词 氰化物类—毒性；中毒—药物疗法；高铁血红蛋白—治疗作用；高铁血红蛋白—药效学

氰中毒的抗毒治疗药物较多，但国内外现行抗氰治疗仍离不开亚硝酸类的高铁血红蛋白形成剂(MFS)，即或新近有了毒副作用较小的4-DMAP，但它仍然是-MFS。此类药物在氰化物中毒治疗中均需使体内30%左右的血红蛋白(Hb)转变为失去带氧功能的高铁血红蛋白(MHb)。在氰中毒化学复合伤以及火灾时发生的氢氰酸、一氧化碳混合中毒伤员，MFS的使用很可能使病情恶化。如急性失血复合致死量NaCN中毒，$NaNO_2$可迅速导致心血管功能衰竭，不宜使用[1]。因此需要寻找不影响带氧功能的新的药物。

Ten Eyck等人用人血制备无基质高铁血红蛋白溶液(SFMS)作为抗氰剂用于大白鼠NaCN静注中毒的治疗，发现有明显疗效。作者认为SFMS作为抗氰药使用具有能与氰直接迅速结合并很快排出体外以及不损害体内的带氧功能[2][3][4]等优点。

材料和方法

1. *动物及药品* 大白鼠雌雄不拘，昆明种，体重110～150g，本校繁殖。氰化钠，AR，比利时产品。

2. SFMS制备 用肝素抗凝之犬或猪全血，按De Venuto等方法[5]加以改进制取无基质血红蛋白溶液后加定量高铁氰化钾使之转变为SFMS，然后对生理盐水透析除去多余的高铁氰化钾，确保无残存氧化活性。Hb含量测定用Crosby法进行[6]，MHb浓度测定用Evelyn and Malloy法[7]。

MHb及CNMHb吸收光谱用日产岛津UV365型可见紫外分光光度计于400～700nm扫描。

溶液的离子浓度(K^+，Na^+，Cl^-)用英制6400型火焰光度计测定。

3. *残存氧化活性测定* 取新鲜抗凝血、离心除去血浆，红细胞用生理盐水洗二次，等分为二，分别置于含相同体积的生理盐水和自制的SFMS中，37℃保温10min后离心，分离红细胞，用生理盐水洗涤2次并悬浮于生理盐水中，于630nm测定MHb含量，结果无氧化活性。

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

4. 抗氰效果观察 按简化机率单位法作NaCN及SFMS静注LD_{50}测定，并依照简化机率单位法公式计算LD_{50}及其95%可信限。

SFMS的抗氰效果用防护指数（PR）表达，即PR=LD_{50}（处理）/LD_{50}（中毒）。SFMS剂量按大鼠体内总血红蛋白（以15g/dl，血容量为68ml/kg计）的7%尾静脉注射，1min注完，注后30s内经同一静脉注射0.1%NaCN生理盐水溶液，观察一周存活率。

结　果

1. 无基质高铁血红蛋白主要成分分析 利用犬和/或猪新鲜血液，经溶血、氧化、离心、结晶、洗涤、透析等反复操作，除去所有细胞膜成分及脂质成分，制备的SFMS的化学组成与国外用人血制备的SFMS基本一致，典型的SFMS分析结果如下：

表1　三次制备的SFMS组成成分分析结果

	SFMS		
	Ⅰ[a]	Ⅱ[b]	Ⅲ[b]
MHb(g/dl)	12.6	9.1	16.4
Na^+(mmol/L)	130	142	139
K^+(mmol/L)	2.7	4.1	3.9
Cl^-(mmol/L)	96	103	98
pH	—	7.38	7.43

a：犬血，b：猪血

400～700nm的吸收曲线完全符合MHb及CNMHb的特性（图1）。

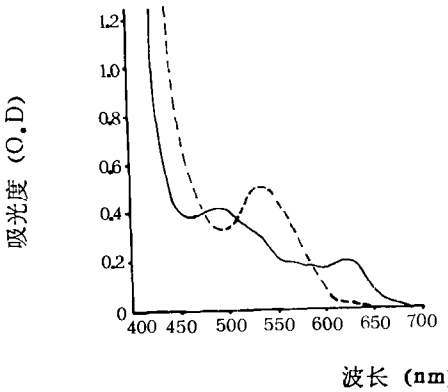


图1　SFMS吸收曲线

MHb浓度12.6g/dl，水1:200稀释，溶液加NaCN使MHb转变为CNMHb

SFMS（——）；CNMHb（……）

2. 抗氰效果 经三次重复实验（犬SFMS 2次，猪SFMS 1次）所得结果一致，防护指数均为2.25。以下是一次实验结果（见表2和表3）。

表2　NaCN大白鼠静注LD_{50}测定结果

NaCN剂量 (mg/kg)	死亡率	LD_{50}±95%可信限 (mg/kg)
Ⅰ. 1.904	1/6	2.234±0.30
Ⅱ. 2.618	5/6	

表3　SFMS[c]处理大鼠静注NaCN LD_{50}测定结果

NaCN剂量 (mg/kg)	死亡率	LD_{50}±95%可信限 (mg/kg)
Ⅲ. 4.76	1/6	5.023±0.51
Ⅳ. 5.95	5/6	

c：SFMS剂量为大鼠体内总血红蛋白的7%

$$防护指数(PR)=\frac{LD_{50}(处理)}{LD_{50}(中毒)}=\frac{5.023}{2.234}=2.25$$

3. SFMS毒性 SFMS大白鼠尾静脉注射LD_{50}测定结果为1889±1370mg/kg。按照毒性分级标准，大白鼠一次经口LD_{50}500～5000mg/kg者属低毒类，可知SFMS毒性较低。

按大鼠体内血红蛋白总量的10%静注SFMS，未见心电异常。

家兔耳缘静注SFMS，剂量为家兔体内总Hb的4%，注入后1～160min，定时取血进行血液离子浓度和血气分析，各指标值：K^+、Na^+、Cl^-、pH、PCO_2、PO_2、ABE、SBE、SAT、O_2CT均在正常范围。

讨　论

按照De Venuto法加以改进制备SFHS，然后用高铁氰化钾使之转变为SFMS；或于溶血后直接加高铁氰化钾，以下步骤按原法程序进行，所得SFMS的离子成分及吸收光谱是一致的。经多次重复制备实验，方法稳定，重复性好。本实验目的是制备SFMS，因此不需首先制备SFHS，故将原法加以改进，于溶血后即加高铁氰化钾，然后离心、透析、结晶、洗涤制得的SFMS可更好地保证无残存氧化活性。另用CCl_4代替甲苯，

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

操作较方便。应该指出的是：应用SFHS作为血液代用品必须除去任何颗粒、细胞膜成分和脂质，以防止凝血及对肾功能的不良影响。对于SFMS，当然也应如此。

SFMS作为抗氰剂从理论上讲，优点是不影响体内Hb的带氧功能，并能直接迅速与氰结合排出体外[2]，因而是一种起效快、毒副作用小的抗氰药。本实验也证明SFMS具有明显的抗氰能力，且给药后血氧分压及氧饱合度等均无明显改变，提示对体内Hb携氧功能无影响。Ten Eyck应用相当于动物体内总Hb的1.5%的SFMS剂量即有明显的抗氰效果[2]。应用11.5%μmol/kg，可对抗4×LD_{50}的氰化钠中毒[3]。本文没有就SFMS做出对抗几个致死量的实验设计，但初步工作已能证明SFMS的抗氰作用是肯定的。

60年代以来塑料及合成纤维广泛应用于家庭，因火灾引起人员死亡较之过去有明显增加[8]。死亡率增加的主要原因是现代建筑及家具使用塑料制品增加所致。火灾烟气成分中有HCN、CO等有害气体，死亡率的增加与HCN及CO复合作用有关[9]。HCN和CO两者都是血液毒，有相加作用[10]，能严重影响细胞带氧和利用氧的能力。又因HCN中毒常用药物是MFS，它的使用又可使部分红细胞失去带氧功能。因此在HCN和CO复合中毒情况下，应用不影响体内血红蛋白携氧能力的SFMS，应有其独特的优点。

参考文献

1. 余争平、欧阳子倩。DMAP、$NaNO_2$对急性失血复合氰化物中毒狗血流动力学的影响。第三军医大学学报 1987；9(3)：283
2. Ten Eyck RP, et al. Stroma-free methemoglobin Solution as an antidote for cyanide poisoning: A preliminary study. Clin Toxicol 1983; 21(3):343～358
3. Ten Eyck RP, et al. Stroma-free methemoglobin solution: An effective antidote for acute cyanide poisoning. Amer J Emergency Med 1985; 3(6): 519～523
4. Ten Eyck RP, et al. Comparison of nitrite treatment and stroma-free methemoglolln solution as antidotes for cyanide poisoning in a rat model. Clin Toxicol 1985; 23(7and8): 477～487
5. De Venuto F, et al. Characteristics of stroma-free hemoglobin prepared by crystalization. J Lab Clin Med 1977; 89(3) 509～516
6. Crosby WH, et al. Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. Armed Forces Med J 1954; 5:693～703
7. Evelyn KA and Malloy HT. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and salfhemoglobin in a single sample of blood. J BC 1938; 126:655～662
8. Symington IS. Cyanide exposure in fires. Lancet 1978; 2:91～92
9. Simmons RF and Metcalfe E. Toxic combustion products. Chemistry in Britian 1987; 230～234
10. Levin BC, et al. Effects of exposure to single or multiple combinations of the predominant toxic gases and low oxygen atmospheres produced in fires. Fundamental and Applied Toxicology 1987; 9: 236～250

（收稿日期：1987年5月12日；修回日期：1988年5月20日）

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

Preparation of Stroma-free Methemoglobin Solution (SFMS) and the Effect of SFMS in the Treatment of Cyanide Poisoning: A Preliminary Study

Ou-Yang Ziqian, et al

(Department of Toxicology, Third Military Medical College)

Stroma-free methemoglobin solutions were prepared from dog and pig red blood cells. The procedure is based on oxidizing the ferrous iron in hemoglobin solution to the ferric state. Then all the cell membrane components (i.e.stroma) were removed through crystallization of the hemoglobin molecule in high ionic phosphate buffer, dialysis and repeated washing of crystals prior to solubilization. This method is feasible and reproducible. The methemoglobin solution obtained had similar potassium, sodium, chloride ion concentration and pH value as normol serum. Spectral maxima and minima were characteristic for methemoglobin.

SFMS proved to be an effective antidote for cyanide intoxication. Its protection ratio was calculated to be 2.25 while the rats were treated with SFMS equal to 7 % of their total body hemoglobin. The potential advantages of SFMS over current antidotes include its immediate action with cyanide and doesn't compromise any of the patient's oxygen carrying capacity. In preliminary work, SFMS was given at levels of 4～10% total hemoglobin with little adverse effects.

Key words: Cyanides/toxicity; Poisoning/drug therapy; Methemoglobin/therapeutic use; Methemoglobin/pharmacodynamics

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