DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.04.013

军事医学

硫代硫酸钠在大鼠及其离体灌流肝脏的抗氰作用

朱东亚 指导者：欧阳子倩

（卫防系 防化医学教研室）

提 要 $Na_2S_2O_3$ 对 NaCN 在大鼠及其离体灌流肝脏代谢成硫氰酸盐的作用的动力学分析表明：NaCN可与内源性供硫体反应代谢成硫氰酸盐，但速度缓慢；$Na_2S_2O_3$ 显著加快了NaCN转变成硫氰酸盐的初速度。在循环灌流的大鼠离体肝脏，$Na_2S_2O_3$ 的作用有一定的量效关系，$Na_2S_2O_3$/NaCN（摩尔比）3∶1时 NaCN 代谢成硫氰酸盐的初速度提高了近40倍（几乎达最大效应），但 $Na_2S_2O_3$ 对NaCN转变成硫氰酸盐的总量影响较小。结果证实 $Na_2S_2O_3$ 可以通过血液外途径发挥重要作用。本文还讨论了 $Na_2S_2O_3$ 的作用机制。

关键词 氰化物；硫代硫酸钠；大鼠离体肝脏灌流

硫代硫酸钠（$Na_2S_2O_3$）是一有效抗氰药物。新近有人提出 Sulfane 硫（连接在另一个硫原子上的离子化硫）代谢池的概念，认为血浆白蛋白——Sulfane 硫复合体在 CN^- 解毒中起主要作用[1]；药物动力学研究发现 $Na_2S_2O_3$ 促使 CN^- 转变成硫氰酸盐发生在中央室，表观分布容积约等于血液容积[2]；似乎血液是 $Na_2S_2O_3$ 发挥抗氰作用的主要场所。为进一步观察 $Na_2S_2O_3$ 的抗氰作用，探讨除血液外有无其它重要作用途径，作者制备了离体灌流的大鼠肝脏，用动力学方法分析了 $Na_2S_2O_3$ 对NaCN（氰化钠）在大鼠及其离体灌流肝脏转变成硫氰酸盐的作用，并讨论了 $Na_2S_2O_3$ 的作用机制。

材料和方法

动物 雄性Wistar大鼠（购自四川省中药研究所）84只，体重150～180g，随机分组，实验前禁食24小时，给饮水。

主要试剂 NaCN（分析纯）上海石油化工厂地区化工厂产品。$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$（分析纯）为上海人民化工厂产品。KSCN（分析纯）为成都化学试剂厂产品。

实验方法

1．整体动物实验 给大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠生理盐水溶液（50mg/kg）麻醉。自分离暴露的左髂外静脉取血约0.5ml（自身对照），而后从分离暴露的左颈内静脉按如下方法快速注药：A、B组给0.05M NaCN水溶液（0.04ml/100g）后立即分别给0.8M $Na_2S_2O_3$ 水溶液和生理盐水（0.05ml/100g）；C和D组只分别给等体积的0.8M $Na_2S_2O_3$ 水溶液和生理盐水。注药毕3、15、30、50分钟按如上方法取血。血液样本的处理和血浆硫氰酸盐浓度的分析与 Pettigrew[3] 的方法同。所有样本平行管测定取均值。

2．离体肝脏灌流实验

（1）灌流方法：将Miller[4]的灌流装置作适当改动。所用灌流液为 Krebs-Henseleit 碳酸氢盐缓冲液，葡萄糖5mM，pH 7.4，用已湿化的容积比95∶5的 O_2-CO_2 混合气氧合，温度37.5℃。灌流技术同Millter[4]，灌流速度为26～28ml/min。在循环灌流实验灌流液量为90ml。

（2）循环灌流：取自身对照样本后按如下方法自给药处快速注药：A、B、C、D及E组给3.70mM NaCN灌流液溶液0.8ml后，立即分别给74.00mM、11.10mM、3.70mM、1.85mM $Na_2S_2O_3$ 灌流液溶液及生理盐水0.8ml；F和G组只分别给74.00mM $Na_2S_2O_3$ 灌流液溶液及生理盐水0.8ml。

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

注药毕2、5、10、20、30分钟各取灌流液样本一个。

（3）非循环灌流：取自身对照样本后继续循环灌流10分钟，换上0.075mM NaCN灌流液溶液进行非循环灌流并记时为0。A组于5分钟自给药处输入18.70mM $Na_2S_2O_3$灌流液溶液（2.4ml/min），至12分钟停输；B及C组于5分钟分别快速注入37.40mM $Na_2S_2O_3$灌流液溶液及生理盐水0.8ml。各组分别于不同的时相点取样。

（4）硫氰酸盐浓度分析：灌流液氰化物和硫氰酸盐的分离装置与周恒铎[5]同。取分离后的样本分析硫氰酸盐，方法同血浆硫氰酸盐浓度的测定。所有样本平行管测定取均值。

结　果

1. 整体动物实验　图1表示各组动物

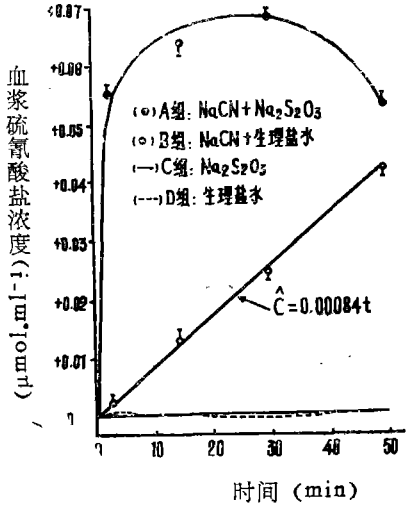


图1　$Na_2S_2O_3$对NaCN在大鼠代谢成硫氰酸盐的影响
各值代表6只大鼠的平均值±标准误

给药后血浆硫氰酸盐浓度的改变。C及D组没有变化，而A和B组明显增加。各相应时间点比较，A组明显高于B组（$P<0.01$）。B组随时间升高呈线性关系，用回归方程（$\hat{C}=0.00084t$，$\hat{C}$表示硫氰酸盐浓度的估计值，t表示时间）拟合直线，回归系数意义非常显著（$P<0.01$）。A组开始迅速升高，而后缓慢升高，50分钟点明显下降。

2. 离体肝脏灌流实验

（1）循环灌流：各组给药后灌流液硫氰酸盐浓度的经时过程如图2所示。F、G组未测出硫氰酸盐。A、B、C、D组各相应时间点明显高于E组（$P<0.01$）。A、B组各相应时间点比较均无明显差别（$P>0.05$）。

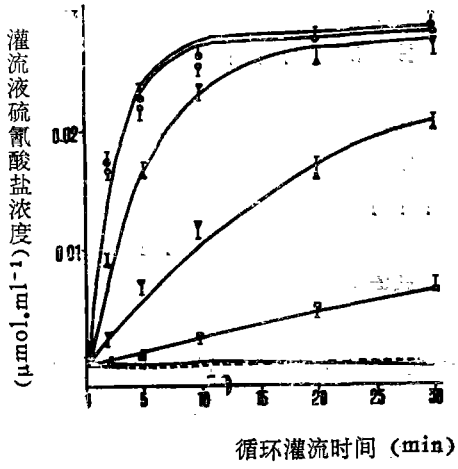


图2　灌流液硫氰酸盐浓度的经时过程

(•)A组：3.7mM NaCN+74mM $Na_2S_2O_3$；
(○)B组：3.7mM NaCN+11.1mM $Na_2S_2O_3$；
(△)C组：3.7mM NaCN+3.7mM $Na_2S_2O_3$；
(▲)D组：3.7mM NaCN+1.85mM $Na_2S_2O_3$；
(□)E组：3.7mM NaCN+生理盐水；
(—)F组：74mM $Na_2S_2O_3$；
(…)G组：生理盐水；
各药均给0.8ml。各值代表6只大鼠的平均值±标准误

能够转变成硫氰酸盐的CN^-按一级动力学消除，并用单室模型描述CN^-在离体肝脏的分布，则：

$$-\frac{d(Cm-C)}{dt}=Km\,(Cm-C)\quad(1)$$

解得　$C=Cm\,(1-e^{-Kmt})$　　(2)

式中C为瞬时硫氰酸盐浓度，Cm表示能够转变成硫氰酸盐的CN^-初始浓度，Km表示CN^-转变成硫氰酸盐的速率常数，t表示时间。根据方程(2)用非线性最小二乘法在Pied piper计算机上拟合A、B、C、D及E组的曲线，相关系数分别为0.993、0.990、

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

0.997、0.995、0.992，方程(2)用于A、B、C、D、E组的参数见表1。将此参数值代入方程(1)求得A、B、C、D、E组NaCN转变成硫氰酸盐的初速度分别为

表1 药物动力学参数

参数	组别				
	A	B	C	D	E
Km(min^{-1})	0.350	0.350	0.180	0.050	0.009
Cm($\mu mol.m^{-1}$)	0.0283	0.0280	0.0276	0.0263	0.0263

0.0099、0.0098、0.0050、0.00137、0.00024 $\mu mol.\ ml^{-1}.\ min^{-1}$。由Cm值与NaCN初浓度的比值计算，A、B、C、D、E组最多能分别使86%、85%、84%、80%、80%的CN^-转变成硫氰酸盐。$Na_2S_2O_3$+NaCN的A、B、C、D组比NaCN+生理盐水的E组CN^-转变成硫氰酸盐的初速度分别提高40.3、39.8、19.8、4.7倍，将此提高的倍数作为$Na_2S_2O_3$的效应强度，对$Na_2S_2O_3$/NaCN（摩尔比）的对数作图，量效关系曲线见图3。当$Na_2S_2O_3$/NaCN大于3时，$Na_2S_2O_3$的效应几乎不再增加。

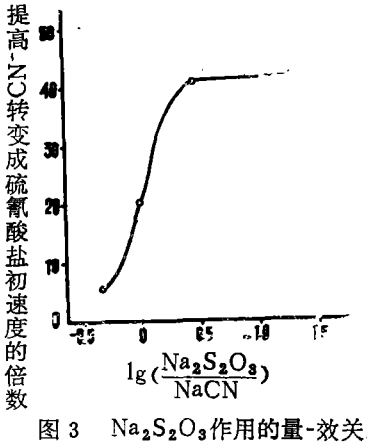


图3 $Na_2S_2O_3$作用的量-效关系

(2)非循环灌流：图4表示各组灌流液硫氰酸盐浓度的经时过程。A和B组给$Na_2S_2O_3$后硫氰酸盐浓度迅速升高，但A组高于B组（P<0.01）。A组在$Na_2S_2O_3$恒速输入期间及C组硫氰酸盐浓度稳定在一个水平，后者除10分钟点与B组无明显差异（P>0.05）外，其余各时间点均低于A、B组（P<0.01）。A、B组停用$Na_2S_2O_3$ 1分钟后硫氰酸盐浓度呈一级动力学消除，用单室模型描述，则：

$$C = C_0 e^{-kt} \qquad (3)$$

式中C_0、C、k分别表示停用$Na_2S_2O_3$ 1分钟

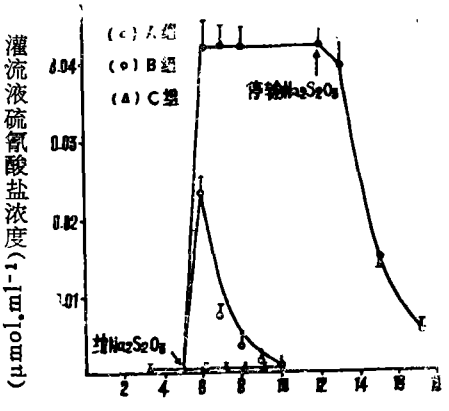


图4 灌流液硫氰酸盐浓度的经时过程

各值代表6只大鼠的平均值±标准误

时、时间t的硫氰酸盐浓度、消除速率常数。根据方程(3)用最小二乘法在Pied piper型电子计算上拟合A、B组停用$Na_2S_2O_3$后硫氰盐酸浓度的经时消除曲线，相关系数分别为1.00和0.99，K值分别为0.5544和0.7452，半衰期分别为1.25和0.93分钟。

讨 论

本实验在大鼠及其离体灌流肝脏，NaCN+生理盐水能代谢生成硫氰酸盐，而单给生理盐水并不能生成硫氰酸盐（图1、2、4），表明NaCN能与内源性供硫体反应生成

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

硫氰酸盐。

在整体动物（图1），手术和$Na_2S_2O_3$不能促使大鼠产生硫氰酸盐，但NaCN+$Na_2S_2O_3$组氰转变成硫氰酸盐的速率明显高于NaCN+生理盐水组，表明$Na_2S_2O_3$明显加快了CN^-转变成硫氰酸盐的速率。

在循环灌流实验（图2），用最小二乘法拟合浓度——时间曲线，相关系数>0.99，说明药动学模型能够描述硫氰酸盐浓度的经时过程。$Na_2S_2O_3$大大加快了CN^-代谢成硫氰酸盐的初速度且有一定的量效关系。当$Na_2S_2O_3$/NaCN（摩尔比）3∶1时CN^-转变成硫氰酸盐的初速度提高了近40倍（几乎达最大效应，图3），略高于Sylvester[2]在狗按20∶1预防用$Na_2S_2O_3$的结果。Sanders[6]用组织匀浆发现$Na_2S_2O_3$/NaCN 3∶1（摩尔比）是硫氰酸酶（Rhodanese，E、C、2.8，1.1）催化反应的最适底物浓度；Schulz[7]将硝普钠和$Na_2S_2O_3$混合给狗输入，硫酸盐和硫氰酸盐的产量为3∶1（摩尔比），这与本实验的巧合可能反应了$Na_2S_2O_3$在机体或组织的代谢特性。但是$Na_2S_2O_3$对CN^-代谢成硫氰酸盐的总量影响较小（表1），有人报导$Na_2S_2O_3$对氰化钾中毒小鼠尿排泄硫氰酸盐总量影响较小[8]支持此结果。

在非循环灌流肝脏（图4），$Na_2S_2O_3$的作用似乎是立即发生的，给$Na_2S_2O_3$ 1分钟硫氰酸盐浓度已达高峰；在$Na_2S_2O_3$和NaCN同时恒速输入期间，硫氰酸盐的生成速度几乎保持不变；停用$Na_2S_2O_3$后硫氰酸盐浓度迅速下降，半衰期仅1分钟左右，表明硫的供应是CN^-转变成硫氰酸盐的限制因素。

许多动物及人的血液内有Rhodanese活性存在且$S_2O_3^{-2}$可以透过红细胞膜进入红细胞[9]，血浆白蛋白在氰解毒中的作用受到足够的重视[1]，在整体动物血液应是$Na_2S_2O_3$发挥抗氰作用的理想场所。然而用无蛋白的灌流液进行肝脏离体灌流排除了血液的作用，$Na_2S_2O_3$能显著加快CN^-代谢成硫氰酸盐的初速度（图2、4），说明它可以通过血液外途径发挥重要作用。

在离体灌流的肝脏，$Na_2S_2O_3$显著加快CN^-转变成硫氰酸盐的初速度，但灌流液本身不能促使$Na_2S_2O_3$与NaCN反应生成硫氰酸盐；硫代硫酸盐分布在细胞外液，进入细胞的速度极为缓慢[10]；催化CN^-与硫代硫酸盐反应生成硫氰酸盐的Rhodanese围绕血管分布[11]且有很高的转换数[12]，因此紧邻血液的细胞外组织可能是$Na_2S_2O_3$通过血液外途径发挥作用的主要场所。但值得强调的是在有CN^-存在的条件下细胞膜的通透性会发生改变，据报道$S_2O_3^{-2}$可由线粒体膜二羧基阴离子载体运入线粒体内[13]，所以$Na_2S_2O_3$进入细胞内发挥抗氰作用也有可能。

因此，$Na_2S_2O_3$的抗氰机制似乎是由于在血液及紧邻血液的细胞外组织促使CN^-迅速转变成硫氰酸盐，因而限制了进入细胞发挥毒性作用的CN^-量。

参考文献

1. Way JL: Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. Ann Rev Toxicol 1984; 24:451～481
2. Sylvester DM, et al: Effect of thiosulfate on cyanide pharmacokinetics in dogs. Toxicol Appl Pharmacol 1983;69:265～271
3. Pettigrew AR, et al: Simplified colorimetric determination of thiocyanate in biological fluid, and its application to investigation of the toxic amblyopias. Clin Chem 1972;18:996～1000
4. Miller LL: Technique of isolated rat liver perfusion, in isolated liver perfusion and its application (Bartosek I, Guaitani A, Miller LL, ed) pp. 11～15, Raven press, New York, 1973

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

5. 周恒铎：职业中毒检验。人民卫生出版社，1976；311～322
6. Saunders JP: Properties of the transsulferase responsible for conversion of cyanide to thiocyanate. Amer J Physiol 1950;163:404～409
7. Schulz V. Clinical pharmacokinetics of nitroprusside, cyanide, thiosulphate and thiocyanate. Clin Pharmacokinetics 1984; 9:239～251
8. Frankenberg L, et al: Original investigation: Effect of cyanide, antidotes on the metabolic conversion of cyanide to thiocyanate, Arch Toxicol 1975;33:81～89
9. Kowalski HH, et al: Distribution of the thiosulfate ion with respect to normal human serum and red blood cells and its application to extracellular fluid determination. J Clin Invest 1952;31:370～374
10. Marlin D Mckinley, Floyence R Mckinley, Evelgnl Mcgown: Report, 1982, LAIR-127; Order No. AD-A121877, 25pp.
11. Sylvester DM, et al: Histochemistry of a sulfurtransferase. Pharmacologist 1981;23:115.
12. Sörbo BH: Crystalline rhodanese I: Purification and physicochemical examination. Acta Chem Scand 1953; 7 : 1129～1136
13. Crompton M, et al: The transport of thiofulfate in rat liver mitochondria. FEBS Lett 1974;46:247～250

The Antidotal Effect of Sodium Thiosulfate on Cyanide in Rats and in Isolated Perfused Rat Liver

Zhu Dongya, Tutor: Ouyang Ziqian

(Department of Antichemical Medicine, Third Military Medical College)

The dynamical analysis of the effect of sodium thiosulfate on the biotransformation of cyanide to thiocyanate in rats and in isolated perfused rat liver showed that the rate of "spontaneous" biotransformation of cyanide was rather slow, but the administration of sodium thiosulfate would dramatically accelerate the initial rate of conversion of cyanide into thiocyanate. In the recirculating perfused rat liver, a certain dose-response relationship of the thiosulfate against cyanide was demonstrated. The rate of conversion of cyanide to thiocyanate increased almost 40 times after the administration of sodium thiosulfate (the maximun of effectiveness being nearly reached) , when the molar ratio between thiosulfate and cyanide was 3:1. However thiosulfate could hardly increase the total amount of cyanide converted. It was suggested that the contribution of thiosulfate as an important antidote against cyanide poisoming be through an extravascular route. In addition, the mechanism of the action of thiosulfate was discussed.

Key words: Cyanide; Sodium thiosulfate; Isolated rat liver perfusion

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