

- 6 Fang WG, Xu JC, Wang JL. Histological and immunohistochemical studies of gastric carcinoma before and after transplantation into nude mice. *J Beijing Med Univ* 1988; 20 : 89
- 7 Zhang SY, Shu YH, Zhang JL, et al. Effects of 8 antitumor-drugs against the growth of human lung adenocarcinoma (LAX-83) transplanted under the kidney capsule of nude mice. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 450
- 8 樊代明, 张学庸, 陈希陶, 等. 抗胃印戒细胞癌株 KATOIII 单克隆抗体 MGb₁ 和 MGb₂ 的建立及其免疫组化初步鉴定. *中华消化杂志* 1988; 8 : 285
- 9 Manabe Y, Tsubota T, Haruta Y. Production of a monoclonal antibody-mitomycin C conjugate, utilizing dextran T-40 and its biological activity. *Biochem Pharmacol* 1985; 34 : 289
- 10 Li S, Zhang XY, Chen XT, Zhang SY, Chen LJ, Zhang JL. Selective cytotoxicity against human tumor cells by an anti-gastric cancer monoclonal antibody-mitomycin C conjugate. *Acta Pharmacol Sin* 1990; 11 : 367
- 11 Gallego J, Price MR, Baldwin RW. Preparation of four daunomycin-monoconal antibody 791T / 36 conjugates with anti-tumour activity. *Int J Cancer* 1984; 33 : 737

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Nov; 11 (6) : 560-563

五种高铁血红蛋白形成剂对红细胞膜的通透性

叶玲¹, 黄如衡 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850, 中国)

Permeability of 5 methemoglobin formers through red cell membrane

YE Ling¹, HUANG Ru-Heng
(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

ABSTRACT By measuring the methemoglobin formation, the permeabilities of some cyanide antidotes passing through mouse erythrocyte membrane were studied. $K_3Fe(CN)_6$ (0.1 mol/L) did not permeate the red cell and no methemoglobin formed. To the red cell suspension, adding PAPP 0.07 mmol/L, an useful cyanide antidote, no methemoglobin was found. On the contrary, PHAPP, the metabolite of PAPP, transported into the cell readily and reacted with hemoglobin to form methemoglobin quickly. DMAP and $NaNO_2$ passed through the red cell membrane easily. With comparable amount of methemoglobin formation, the concentration of $NaNO_2$ was about 200 times as much as that of DMAP. A comparison of the anticyanide potency of DMAP and $NaNO_2$, the permeability rate

constant, the half time and activation energy were measured as: 0.217 and 0.0506 / min; 3.2 and 13.7 min; 17.1 and 50.2 kJ / mol, respectively. Owing to its ready permeability and formation of methemoglobin, DMAP is a better antidote than $NaNO_2$ against cyanide poisoning.

KEY WORDS erythrocytes; cell membrane permeability; cyanides; antidotes; aminophenols; propiophenones; sodium nitrite; ferricyanides; methemoglobin

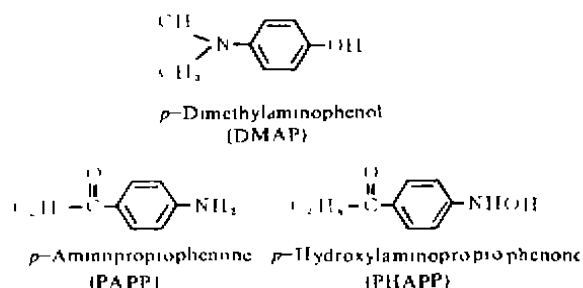
提要 本文利用测高铁血红蛋白(MetHb)来研究红细胞膜对5种MetHb形成剂的通透性。对氨基苯丙酮(PAPP), $K_3Fe(CN)_6$ 不能通透RBC膜,而对羟胺苯丙酮极易进入RBC生成MetHb。37℃下对二甲氨基苯酚(DMAP)0.5 mmol/L和 $NaNO_2$ 30 mmol/L的通透速率常数, $T_{1/2}$ 和活化能分别为: 0.217, 0.0506 min⁻¹; 3.2, 13.7 min; 17.1, 50.2 kJ/mol。DMAP是比 $NaNO_2$ 优越的抗氰药物。

关键词 红细胞; 细胞膜通透性; 氰化物; 解毒剂; 氨基苯酚; 苯丙酮; 亚硝酸钠; 高铁氰化钾; 高铁血红蛋白

氰化物极易与细胞色素氧化酶作用生成氰-酶复合物,使酶中毒,也极易与高铁血红蛋白(MetHb)结合成MetHb-CN。体内有大量血红蛋白(Hb),当部分Hb转变为MetHb时

Received 1989 Dec 21 Accepted 1990 Jun 29
¹ Now in Institute of Gerontology and Geriatrics of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

就可与氧-酶复合物竞争而防治氰化物中毒^(1,2)。本文报道 MetHb 形成剂 $K_3Fe(CN)_6$, $NaNO_2$, 对二甲氨基苯酚(DMAP), 对氨基苯丙酮(PAPP)及其代谢产物对羟胺苯丙酮(PHAPP)等穿透红细胞膜的速度及生成 MetHb 量, 作为评价它们抗氰化物中毒效果的指标之一。



MATERIALS AND METHODS

DMAP, PAPP, PHAPP 均由本所合成室合成。亚硝酸钠(北京红星化工厂), 高铁氰化钾(北京化工厂), 以上试剂均用生理盐水配成 0.1 mol/L, -15℃ 保存, 1wk 内应用。

UV - 可见分光光度计, 日本岛津 UV - 250。

昆明种小鼠♂, 20 ± SD 3 g, 本院动物场繁殖供应, 取正常小鼠, 摘眼球采血, 肝素抗凝。

压积实验 将新鲜鼠血加入压积管中至 10 cm 处, 经 3000 × g 离心 30 min, 记录血球界面刻度, 不同批小鼠血球压积为 47 ± 0.7%, (n = 12)。

红细胞膜通透性实验 取压积 47 ± 0.7% 的全血 0.05 ml, 加 0.35 ml pH 7.4 的等渗磷酸盐缓冲液制成血球悬液, 加 0.1 ml DMAP 0.5 mmol/L 或 $NaNO_2$ 30 mmol/L 作用一定时间后, 立即 3000 × g 离心 2 min, 弃去上清液, 血球沉淀用生理盐水洗涤两次, 沉淀血球用含 1% Triton X-100

的蒸馏水 2.9 ml 溶血, 3000 × g 离心 5 min, 测上清液中高铁血红蛋白, 按下式^(3,4)计算 MetHb 含量。

$$\text{MetHb} (\%) = \frac{\{A_{628} - rA_{588.7}\}}{[A_{588.7}(R-r)]} \times 100 \quad [1]$$

式中 $A_{588.7}$ 与 A_{628} 为 588.7 和 628 nm 处的吸光度, R, r 均为常数, 分别为 0.98, 0.02。同时以 0.1 ml 生理盐水代替 MetHb 形成剂为空白管, 平行操作。

反应速度测定 在红细胞悬液中分别加入 0.1 ml DMAP 0.5 mmol/L 和 $NaNO_2$ 30 mmol/L, 在 37℃, 20℃, 10℃, 0℃ 下作用 1, 3, 5, 10, 15, 20 min 后, 迅速直接以 3000 × g 离心 2 min, 再同上处理测 MetHb, 各样品管测定结果均减去空白。

RESULTS

五种高铁血红蛋白形成剂穿透红细胞膜的能力 $K_3Fe(CN)_6$, $NaNO_2$, DMAP, PAPP, PHAPP 分别与血球悬液混合, 经作用后测 MetHb 含量, 计算结果如 Tab 1。

Tab 1. Permeability of RBC membrane to 5 methemoglobin formers. Drugs were incubated with RBC at 20℃ for 10 min. n = 4, $\bar{x} \pm SD$.

Drug	mmol/L	MetHb (%)
$K_3Fe(CN)_6$	100	0
$NaNO_2$	10	0.8 ± 0.6
Dimethylaminophenol	5	67.2 ± 1.3
<i>p</i> -Aminopropiophenone	0.07	0
<i>p</i> -Hydroxylaminopropiophenone	0.07	71.6 ± 2.2

Tab 1 显示 5 种 MetHb 形成剂对红细胞膜通透性有差异, $K_3Fe(CN)_6$ 虽然用 0.1 mol/L 仍无 MetHb 形成, 提示其不能穿过红细胞膜与细胞内的 Hb 作用生成 MetHb, 故无抗氰能力, PAPP 是一个优良的抗氰药, 但在体外实验时也无 MetHb 生成⁽⁵⁾, 而其代谢产物 PHAPP 却有很强的 MetHb 形成能力⁽⁶⁾, 提示 PAPP 是通过在体内代谢转化为

PHAPP 后起抗氰作用的。DMAP 和 NaNO_2 均能穿过红细胞膜进入血球内再与 Hb 作用产生 MetHb 发挥抗氰效用。

DMAP 和 NaNO_2 穿透 RBC 膜产生 MetHb 的浓度依赖性与速度等特点

1 浓度依赖性 将不同浓度的 DMAP 和 NaNO_2 分别加入血球悬液中，室温作用后测 MetHb 生成量，如 Tab 2。

Tab 2. Effects of *p*-dimethylaminophenol and NaNO_2 on MetHb formation. $n=4, \bar{x} \pm \text{SD}$.

DMAP (mmol/L)	MetHb (%)	NaNO_2 (mmol/L)	MetHb (%)	NaNO_2 DMAP
0.01	0.16 ± 0.04	10	0.82 ± 0.63	1000
0.10	4.13 ± 0.87	20	4.64 ± 0.49	200
0.25	7.99 ± 1.19	30	7.32 ± 1.04	120
0.50	17.03 ± 2.23	40	18.39 ± 1.29	80
1.00	24.94 ± 1.22	50	19.01 ± 2.84	50
5.00	67.24 ± 1.27	100	75.93 ± 4.95	20

按加权概率单位分析法求得 DMAP 的半数有效浓度 EC_{50} 为 2.62 mmol/L，其 95% 置信限为 0.59 - 11.72 mmol/L。 NaNO_2 的 EC_{50} 为 72.41 mmol/L，95% 置信限为 42.24 - 124.14 mmol/L。 NaNO_2 的 EC_{50} 是 DMAP 的 27.64 倍。另外，药物浓度与 MetHb% 的关系符合 Hill 公式：

$$\text{DMAP: } \ln[\text{MetHb\%} / (100 - \text{MetHb\%})] = 1.13 \ln C - 0.944 \quad [2]$$

$$\text{NaNO}_2: \ln[\text{MetHb\%} / (100 - \text{MetHb\%})] = 2.47 \ln C - 10.64 \quad [3]$$

式中 C 为药物浓度 mmol/L。用上两式分别计算形成 50% MetHb 时的浓度为 2.31 和 73.98 mmol/L，这与加权法求得的 EC_{50} 基本相符。从浓度依赖性分析，DMAP 的抗氰效果明显比 NaNO_2 优越。

2 速度比较 不同温度下 DMAP 0.5 mmol/L 和 NaNO_2 30 mmol/L 与血球悬液作用不同时间后测得的 lnMetHb % 与时间关系见 Fig 1。

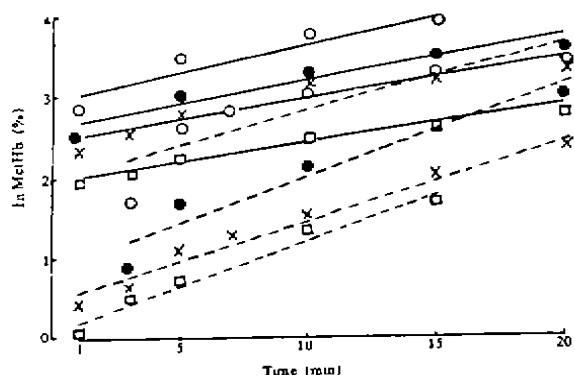


Fig 1. Formation rate of lnMetHb (%) of 4-dimethylaminophenol 0.5 mmol/L and NaNO_2 30 mmol/L reacting with RBC at different temperature. DMAP(—); NaNO_2 (- - -). 37°C (O); 20°C (●); 10°C (×); 0°C (□). $n=3$

MetHb 的生成速度符合一级动力学公式：

$$\ln\{[(\text{MetHb \%})_{\infty} / ((\text{MetHb \%})_{\infty} - (\text{MetHb \%})_t)]\} = kt \quad [4]$$

式中 $(\text{MetHb \%})_{\infty}$ 、 $(\text{MetHb \%})_t$ 分别为平衡时和 t 时的 MetHb %， k 为一级动力学速率常数， t 为时间 min。速率常数计算结果如 Tab 3。

Tab 3. Permeable rate constant of DMAP (0.5 mmol/L) and NaNO_2 (30 mmol/L) passing through RBC membrane under different temperature.

T(°C)	$k(\text{min}^{-1})^*$		$\frac{k_{\text{DMAP}}}{k_{\text{NaNO}_2}}$
	DMAP	NaNO_2	
0	0.0902	0.0033	27.3
10	0.1189	0.0056	27.2
20	0.1557	0.0111	14.0
37	0.2172	0.0506	4.3

* Calculated by: $\ln\{[(\text{MetHb \%})_{\infty} / ((\text{MetHb \%})_{\infty} - (\text{MetHb \%})_t)]\} = kt$

从上表可见 DMAP 穿透红细胞膜的速度比 NaNO_2 快，温度高穿透快，温度对 DMAP 穿透速率常数呈线性相关，为：

而温度对 NaNO_2 的穿透速率常数呈指数相关, 为:

$$k = 0.0029 e^{0.0746T} \quad [6]$$

式中 T 为温度($^{\circ}\text{C}$). 温度低时 MetHb % 升高慢, 20°C 后升高快.

两速率常数 k 的比值随温度升高而下降. 37°C 时, DMAP 的穿透速率比 NaNO_2 大 3.3 倍, 加上浓度相差 60 倍的因素, 总的速度相差约 200 倍.

$$T_1 \text{ 按公式: } T_1 = 0.693 / k \quad [7]$$

计算 T_1 在 37°C 时 DMAP 和 NaNO_2 分别为 3.2 与 13.7 min. NaNO_2 的 T_1 要比 DMAP 长 3.28 倍.

3 活化能比较 根据热力学性质, 正常分子所处能阶是按正态分布的, 但分子只有具备比平均能量高的活化能才能发生反应. 药物分子运动时, 若细胞膜能障高, 只有能量超过该能障的分子, 才能穿透膜进入细胞内. 若细胞膜能障低, 通过的分子就多. 因此了解通透红细胞膜的能障, 有助于阐明药物穿透速率及穿透量差异的原因.

活化能计算按 Arrhenius 公式:

$$\ln(k_{T_1} / k_{T_2}) = (-E_a / R)(1 / T_1 - 1 / T_2) \quad [8]$$

式中 k_{T_1} , k_{T_2} 为在相应温度 T_1 , T_2 下测得的速率常数. E_a 为活化能, 相当于膜对该药的能障. R 为气体常数 8.314 J/mol . T_1 , T_2 为绝对温度. 将 4 个温度下测得的速率常数 k 与 T 代入 6 次, 计算得平均活化能分别为 17.1 ± 1.3 与 $50.2 \pm 12.3 \text{ kJ/mol}$, $n = 6$. NaNO_2 通过红细胞膜的能障明显高于 DMAP, 达 2.9 倍, 提供了 NaNO_2 穿透红细胞膜难的热力学根据.

DISCUSSION

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 是一个经典的高铁血红蛋白

形成剂, 在测 MetHb 法中用作使血红蛋白完全氧化为 MetHb 的试剂. 在本实验中发现 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 加入红细胞悬液中不能产生 MetHb, 提示其不能进入红细胞内, 其原因可能由于 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 是无机配位复盐, 不溶于脂质层中, 且 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 离子大, 带有 3 个负电荷, 与红细胞膜上唾液酸所带的负电荷相斥而被阻于细胞外. 与其相比 NO_2^- 只有 1 个电荷且分子小, 在电解质平衡作用下较易进入细胞内与 Hb 作用产生 MetHb.

PAPP 加入红细胞悬液中也不能产生 MetHb, 只有其代谢产物 PHAPP 才极易穿过红细胞膜产生 MetHb. 故 PAPP 不能作氰化物中毒急救用. 但其起效慢且持久, 可用作预防药. 而 DMAP 脂溶性较大, 活化能低, 极易进入红细胞并很快与 Hb 作用生成 MetHb. 即使当氰化物中毒症状出现时再给 DMAP 尚可使动物存活. 因此 DMAP 是较理想的抗氰化物中毒的药物.

REFERENCES

- 1 Weger N. Treatment of cyanide poisoning with 4-dimethylaminophenol (DMAP) - experimental and clinical overview. *Fundam Appl Toxicol* 1983; 3 : 387
- 2 Bright JE, Marrs TC. A comparison of the methemoglobin-inducing activity of moderate oral doses of 4-dimethylaminophenol and *p*-aminopropiophenone. *Toxicol Lett* 1982; 13 : 81
- 3 Ye L, Huang RH. Study on permeability of 4-Dimethylaminophenol through mice erythrocyte. *Prog Biochem Biophys* 1987; 5 : 47
- 4 Liu LT, Huang RH. A simple method of determination of methemoglobin. *Bull Acta Military Med Sci* 1986; 10 : 229
- 5 Liu LT, Huang RH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of *p*-aminopropiophenone in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 178
- 6 Liu LT, Huang RH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of *p*-hydroxylamino-propio-phenone. *Ibid* 1988; 9 : 380