

丙酮氰醇对离体红细胞膜的毒性效应^①

李大川^② 许发茂 邓丽霞 郑履康

(中山医科大学卫生学院劳动卫生教研室; 广州, 510089)

摘要 目的: 观察丙酮氰醇对离体红细胞膜的急性损害作用。方法: 将完整的红细胞和分离的红细胞膜分别与不同浓度丙酮氰醇, 温育不同时间。结果: 发现两者膜的脂质过氧化(TBARS)水平增高, 钠钾 ATP 酶的活性降低, 荧光偏振度升高(即膜流动性降低), 和对照组比较都具有显著性差别, 并存在剂量-反应关系和时间-反应关系。胆固醇(C)/磷脂(PL)的比值和对照组比较有显著性差别。相关分析表明: 膜的脂质过氧化水平(TBARS)和钠钾 ATP 酶的活性有明显的负相关, 膜的脂质过氧化水平与荧光偏振度有明显的相关, 荧光偏振度和钠钾 ATP 酶有明显的相关。荧光偏振度(P)与胆固醇/磷脂的比值没有相关。结论: 红细胞膜可能是丙酮氰醇作用的一个重要的靶器官, 膜的脂质过氧化可能是造成细胞膜结构和功能改变的一个重要原因。

主题词 氰化物类/毒性; 红细胞; 细胞膜

中图分类号 R 135.1

THE TOXIC EFFECT OF ACETONE CYANOHYDRIN TO ERYTHROCYTE *IN VITRO*

Li Dachuan Xu Famao Deng Lixia Zheng Lukang

(Department of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: In order to know the toxicity of acetone cyanohydrin to erythrocyte membrane *in vitro*. **Methods:** We isolated the ghost cells of erythrocyte and integrity erythrocyte by Pearson's method, which were cultured with different concentration of acetone cyanohydrin for different duration. **Results:** The lipid peroxidative level of the membrane was found to have obvious time-course and dose-effect relationship, the same effect was showed on the activity of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, while the lipid peroxidative level of the membrane was negatively correlated with the activity of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase. The fluorescent polarisation of membrane also had time-course and dose-response effect: as the duration and concentration of intoxication increased, the fluidity of the membrane decreased. The content of phosphatide (PL) and cholesterol (Cho) in the membrane of integrity erythrocyte had no obvious difference. The correlation analysis showed that there is no relationship between fluorescent polarisation and the ratio of C/PL, separated erythrocyte membrane was exposed to different concentration for different duration, the content of PL of the membrane decreased obviously, while the level of Cho had no obviously change, so the ratio of C/PL decreased obviously too. But fluorescent polarisation (P) had no relationship with the ratio of C/PL. **Conclusions:** The results suggest that the membrane of erythrocyte might be an important target organ of acetone cyanohydrin. The lipid peroxidation of the membrane might be an important reason for the change of structure and function of cell membrane.

Subject headings cyanides/toxicity; erythrocyte; cell membrane

人们对丙酮氰醇的急性毒性作了较为深入的研究, 认为丙酮氰醇造成的急性损害与膜脂质过氧

化失调有关^[1,2]。红细胞膜由于来源方便, 且是不含任何细胞器的较为纯净的膜, 特别是含有较高水

① 中国预防医学科学院资助课题; ② 现在广州市站前路 22 号医药大厦 6 楼中健医药公司(510160)

平的多不饱和脂肪酸,而且血红蛋白被认为是脂质过氧化的较强催化剂,适合用于膜毒性的离体研究。本次研究的目的是利用膜毒理学的方法,以脂质过氧化作为中毒的起点,进一步估计丙酮氰醇对红细胞膜的损害作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

丙酮氰醇由北京防化所生产,纯度 99.5%,批号 94.47。

1.2 红细胞的来源与膜制备

红细胞购于广州市中心血站当天的新鲜血液。将洗净的红细胞分为两部分,一部分红细胞按照 Pearson 的方法^[3]制备分离红细胞膜血影后,与丙酮氰醇在 37 °C 条件下温育,终浓度分别为 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 和 10^{-1} mol/L,温育时间为 30 min,观察其浓度效应;将已制备的红细胞膜与丙酮氰醇温育,终浓度为 10^{-2} mol/L,温育时间分别为 0、15、

30、45、60 min,观察其时间效应。将另一部分红细胞(比容为 50%)与生理盐水(内含丙酮氰醇)共同温育,其终浓度分别为 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} mol/L 温育时间 30 min,用上述方法制备红细胞膜后,再观察丙酮氰醇的浓度作用。

1.3 试验方法

红细胞膜脂质过氧化的测定按照硫代巴比妥酸法^[4],在 37 °C 条件下温育 30 min,以丙二醛作为脂质过氧化的指标;红细胞膜流动性的测定参照林克椿方法^[5];红细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 的测定,主要参考 Pearson 的方法^[3];蛋白质的测定,按贵阳医学院生化教研室等编著生物化学实验,考马斯亮兰 G-250(Coomassie brilliant blue G-250)的方法^[6]。

2 结果

2.1 丙酮氰醇对完整红细胞膜的脂质过氧化、钠钾 ATP 酶、荧光偏振度及膜的磷脂和胆固醇水平的影响见表 1。

表 1 丙酮氰醇不同浓度对完整红细胞膜的脂质过氧化水平、钠钾 ATP 酶、荧光偏振度、胆固醇和磷脂的影响

Table 1 The toxic effects of different concentration of acetone cyanohydrin to the lipid peroxidation, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, fluorescent polarisation, cholesterol and phosphatide of the complete erythrocyte membrane ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

acetone cyanohydrin ¹⁾ (mol/L)	lipid peroxidation ($\mu\text{mol/mg}$)	fluorescent polarisation (1)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (nmol/mg \cdot s)	cholesterol (mg/mg)	phosphatide (mg/mg)	Cho/PL (1)
0	0.286 ± 0.03	0.174 ± 0.010	0.199 ± 0.050	0.746 ± 0.124	0.576 ± 0.010	0.628 ± 0.470
10^{-4}	$0.315 \pm 0.031^{2)}$	$0.201 \pm 0.004^{2)}$	$0.096 \pm 0.003^{2)}$	0.819 ± 0.147	0.478 ± 0.029	0.860 ± 0.082
10^{-3}	$0.342 \pm 0.025^{2)}$	$0.207 \pm 0.004^{2)}$	$0.080 \pm 0.003^{2)}$	0.889 ± 0.183	0.533 ± 0.025	0.828 ± 0.059
10^{-2}	$0.368 \pm 0.03^{2)}$	$0.240 \pm 0.003^{2)}$	$0.056 \pm 0.003^{2)}$	0.956 ± 0.210	0.520 ± 0.027	0.915 ± 0.109

1) Incubation time; 30 min; 2) Compared with control group, $P < 0.05$

从表 1 可见当完整红细胞与不同浓度丙酮氰醇温育时,与对照组比较,脂质过氧化水平和荧光偏振度显著升高, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性与对照组比较显著降低,有统计学意义。磷脂含量有降低趋势,胆固醇含量有上升的趋势,但与对照组比较没有统计学意义。

相关分析表明,荧光偏振度与胆固醇/磷脂的比值没有明显的相关($r = 0.384$ $P = 0.064$);膜脂质过氧化水平与膜的流动性有明显的负相关($r = -0.741$ $P < 0.001$);膜脂质过氧化和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 呈明显的负相关($r = -0.727$ $P < 0.001$);

2.2 丙酮氰醇对分离红细胞膜血影的影响

2.2.1 浓度效应 表 2 显示分离红细胞膜血影暴露于不同浓度丙酮氰醇时,发现膜的脂质过氧化和荧光偏振度随着丙酮氰醇浓度增高而增高,差别有显著性($P < 0.05$)。即膜流动性随着丙酮氰醇浓度增高而降低。而钠钾 ATP 酶随着丙酮氰醇浓度增高而活性降低,有显著差别。相关分析表明,膜的脂质过氧化和钠钾 ATP 酶活性有明显的负相关关系($r = -0.6884$, $P < 0.0001$);膜的脂质过氧化和膜流动性也有明显的负相关关系($r = -0.5161$, $P = 0.01$)。提示两者有明显的双负相关关系($r =$

-0.6951, $P < 0.0001$)。膜的脂质成分胆固醇没有显著性差别;而磷脂的水平则显著降低,胆固醇/磷脂的比值则显著升高。膜流动性和胆固醇/磷脂没有相关关系($r = -0.3995$, $P = 0.053$)。

2.2.2 时间效应 表3可见分离红细胞膜血影与丙酮氰醇温育不同的时间,发现膜的脂质过氧化和荧光偏振度(P)随着丙酮氰醇染毒时间的延长而增高,且差别有显著性($P < 0.05$),即膜流动性随着丙酮氰醇染毒时间延长而降低。而钠钾ATP酶

随着丙酮氰醇温育时间延长其活性降低,差别有显著性($P < 0.05$)。相关分析表明,膜的脂质过氧化和钠钾ATP酶有明显的负相关关系($r = -0.6951$, $P < 0.0001$);膜的脂质过氧化和膜流动性没有明显的相关关系($r = 0.1545$, $P = 0.471$)。膜的胆固醇没有显著性差别;而磷脂的水平随着染毒时间延长则显著降低,胆固醇/磷脂比值在染毒30 min以后有显著升高。膜流动性和胆固醇/磷脂比值没有相关关系($r = -0.0084$; $P = 0.969$)。

表2 丙酮氰醇不同浓度对分离红细胞膜的脂质过氧化、钠钾ATP酶、荧光偏振度、胆固醇和磷脂的影响

Table 2 The toxic effects of different concentration of acetone cyanohydrin to the lipid peroxidation, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, fluorescent polarisation cholesterol and phosphatide of the separated erythrocyte membrane ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

acetone cyanohydrin ¹⁾ (mol/L)	lipid peroxidation ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	fluorescent polarisation (1)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (nmol/mg \cdot s)	cholesterol (mg/mg)	phosphatide (mg/mg)	Cho/PL (1)
0	2.255 \pm 0.126	0.237 \pm 0.009	0.176 \pm 0.003	0.317 \pm 0.018	0.468 \pm 0.023	0.677 \pm 0.021
10 ⁻⁴	3.201 \pm 0.142 ²⁾	0.274 \pm 0.012	0.149 \pm 0.001 ²⁾	0.340 \pm 0.031	0.369 \pm 0.073 ²⁾	0.921 \pm 0.045
10 ⁻³	3.372 \pm 0.093 ²⁾	0.296 \pm 0.038 ²⁾	0.137 \pm 0.003 ²⁾	0.355 \pm 0.029	0.349 \pm 0.026 ²⁾	1.017 \pm 0.023 ²⁾
10 ⁻²	4.429 \pm 0.165 ²⁾	0.289 \pm 0.014 ²⁾	0.112 \pm 0.002 ²⁾	0.375 \pm 0.041	0.344 \pm 0.026 ²⁾	1.091 \pm 0.023 ²⁾
10 ⁻¹	4.490 \pm 0.103 ²⁾	0.297 \pm 0.021 ²⁾	0.089 \pm 0.004 ²⁾	0.374 \pm 0.032	0.294 \pm 0.023 ²⁾	1.272 \pm 0.021 ²⁾

1) Incubation time; 30min; 2) Compared with control group $P < 0.05$

表3 丙酮氰醇对分离红细胞膜的脂质过氧化、钠钾ATP酶和荧光偏振度、胆固醇和磷脂影响的时间一效应关系

Table 3 The toxic effects of acetone cyanohydrin¹⁾ in different time for the lipid peroxidation, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase, fluorescent polarisation, cholesterol and phosphatide of the blood shadow of erythrocyte membrane

Time (min)	lipid peroxidation ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	fluorescent polarisation (1)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (nmol/mg \cdot s)	cholesterol (mg/mg)	phosphatide (mg/mg)	Cho/PL (1)
0	1.875 \pm 0.045	0.238 \pm 0.005	0.185 \pm 0.002	0.322 \pm 0.051	0.504 \pm 0.026	0.629 \pm 0.034
15	2.352 \pm 0.122 ²⁾	0.278 \pm 0.008 ²⁾	0.124 \pm 0.002 ²⁾	0.300 \pm 0.039	0.492 \pm 0.043 ²⁾	0.609 \pm 0.043
30	3.466 \pm 0.109 ²⁾	0.273 \pm 0.009 ²⁾	0.103 \pm 0.005 ²⁾	0.344 \pm 0.037	0.336 \pm 0.029 ²⁾	1.024 \pm 0.051 ²⁾
45	4.499 \pm 0.084 ²⁾	0.262 \pm 0.016	0.103 \pm 0.005 ²⁾	0.320 \pm 0.035	0.360 \pm 0.051 ²⁾	0.889 \pm 0.036 ²⁾
60	4.045 \pm 0.152 ²⁾	0.272 \pm 0.012 ²⁾	0.167 \pm 0.004	0.321 \pm 0.051	0.286 \pm 0.056 ²⁾	1.122 \pm 0.041 ²⁾

1) Concentration of acetone cyanohydrin; 10⁻² mol/L; 2) Compared with control group $P < 0.05$

3 讨论

丙酮氰醇对细胞结构究竟引起怎样的损害,本次研究利用膜毒理学的方法,对丙酮氰醇的作用机制作了初步的探讨。

3.1 丙酮氰醇引起红细胞膜脂质过氧化

不少人认为脂质过氧化可能是一些化学物质

引起毒性作用的起始反应,脂质过氧化可引起一系列的生物学后果,如线粒体氧化磷酸化的抑制、膜离子通透性的改变和红细胞的溶血反应等⁷⁾。

本次实验发现无论完整红细胞膜还是分离的红细胞膜,都有明显的脂质过氧化发生,并且具有时间和浓度效应关系。红细胞膜由于含有较高含量的多不饱和脂肪酸(PUFA),并且暴露在高压氧分压下,容易发生脂质过氧化。特别是完整的红细胞膜由于含有血红蛋白,而血红蛋白被认为是脂质

过氧化的较强的催化剂。因此推测完整的红细胞膜应该发生更明显的脂质过氧化,但是,本次实验的结果看,分离的红细胞膜发生脂质过氧化水平比完整的红细胞膜更高一些。这种情况可能是完整红细胞膜中含有血红蛋白,而血红蛋白缺乏起隔离作用的二硫键所致。

3.2 脂质过氧化对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性的影响

本实验发现无论完整红细胞膜还是分离的红细胞膜,钠钾ATP酶的活性都降低,且具有时间和浓度效应关系,同时与脂质过氧化有双相负相关的趋势。

钠钾ATPase是位于细胞膜上的一种糖蛋白,与ATP的分解和细胞内外钠、钾离子的转运密切相关。

脂质过氧化使膜磷脂多不饱和脂肪酸受损,多不饱和脂肪酸是维持 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性所必须,因而导致 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶活性降低, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 不对称地镶嵌在细胞膜内,而细胞膜是最易受到自由基攻击的部位之一,因为氧在非极性溶剂中的溶解度比在水中大7倍;或者经自由基丙二醛(MDA)的作用,使酶分子发生交联;由于膜流动性和完整性的改变,继发影响 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 的活性^[8]。

有报道,当红细胞膜发生脂质过氧化后,膜上ATPase活性降低^[8],我们知道丙酮氰醇能够抑制氧在呼吸链上的传递,造成细胞内的ATP数量减少,ATP数量的减少自然引起膜上的ATPase的活性降低。而脂质过氧化可能造成膜磷脂的多不饱和脂肪酸受损,而后者是维持 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性所必须的,因此可导致 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性降低。

3.3 脂质过氧化对膜流动性的影响

本次研究发现:无论完整红细胞膜还是分离的红细胞膜,荧光偏振度都升高,并且具有时间和浓度效应关系,同时与脂质过氧化有双相负相关的趋势。

尽管脂质过氧化导致膜流动性降低的机理尚不十分清楚。但是近年来大量的证据都表明:膜流动性降低,其原因可能是脂质过氧化的短链产物MDA进入水相和膜蛋白、膜脂上的 NH_2 交联形成Schiff碱^[9],致使膜流动性降低。Eichenberger等则认为^[10],MDA对细胞膜流动性并无影响,因为

将MDA加入未经氧化的微粒体制剂后,未使 r_3 增加,说明MDA未与膜脂交联,因此认为,在脂质过氧化过程中,相邻的脂质自由基发生共价结合,导致膜脂酰基链排列的连续性增加,进而降低膜流动性。

膜流动性是指磷脂分子各种运动状态总和的平均表现,膜流动性增加意味着磷脂分子的活动度增大,调解膜流动性的因素很多,其中胆固醇/磷脂(C/PL)也是一个重要的因素,实验结果明显表明:丙酮氰醇引起磷脂含量下降的同时引起膜胆固醇微弱的损害,因此胆固醇水平几乎没有变化,而磷脂含量明显的下降提示引起膜流动性显著的下降,这些变化说明脂质双层烃链非极性区荧光偏振度(P)升高。

参 考 文 献

- 1 Way J L. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1984, 24: 451
- 2 Ardel B K, Bovowitz J L, Madnh E U, *et al.* Cyanide-induced lipid peroxidation in different organs subcellular distribution. *Toxicology*, 1989, 89(2): 127
- 3 Pearson, T W. $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)^+$ - ATPase of Duchenne muscular dystrophy erythrolyte ghosts. *Life Sci*, 1978, 22(1): 127
- 4 周 浚,方允中.人血清和动物组织中脂类过氧化值变化与衰老的关系. *解放军医学杂志*, 1985, 10(6): 417
- 5 林克椿,聂松青.细胞膜的流动性. *生理科学进展*, 1985, 22(1): 83
- 6 贵阳医学院生物化学教研室. *生物化学实验*. 贵阳: 贵州人民出版社, 1987. 52 ~ 53
- 7 Ribarov Stefan R, Ludmil C, Benov L C. Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation. *Biochem Biophys Acta*, 1981, 640(3): 721
- 8 Catherine R E, Paul H. Alterations in erythrocyte membrane fluidity by phenylhydrazine induced peroxidation of lipids. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, 100: 1537
- 9 Willis E D. Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 1971, 123: 983
- 10 Eichenberger K, Bohni P, Winterhalter K H, *et al.* Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order. *FEBS Lett*, 1982, 142(1): 59

(1997-05-14 收稿 1997-12-02 修回)