

- 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 MGb<sub>1</sub> 和 MGb<sub>2</sub> 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-monooclonal 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<sup>1</sup>, 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 Ling<sup>1</sup>, 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

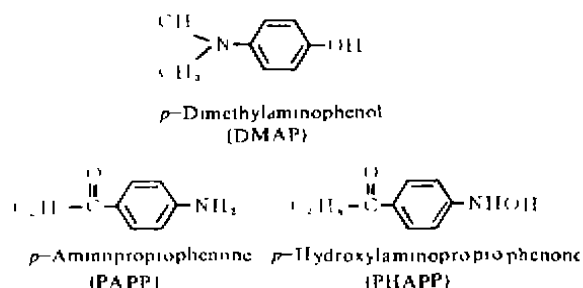
**提要** 本文利用测高铁血红蛋白(MetHb)来研究红细胞膜对5种MetHb形成剂的通透性。对氨基苯丙酮(PAPP),  $K_3Fe(CN)_6$ 不能通透RBC膜,而对羟胺苯丙酮极易进入RBC生成MetHb。37℃下对二甲氨基苯酚(DMAP)0.5 mmol/L和 $NaNO_2$  30 mmol/L的通透速率常数,  $T_{1/2}$ 和活化能分别为: 0.217, 0.0506 min<sup>-1</sup>; 3.2, 13.7 min; 17.1, 50.2 kJ/mol。DMAP是比 $NaNO_2$ 优越的抗氰药物。

**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  
<sup>1</sup> Now in Institute of Gerontology and Geriatrics of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

就可与氰-酶复合物竞争而防治氰化物中毒<sup>(1,2)</sup>。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<sup>(3,4)</sup>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<sup>(5)</sup>, 而其代谢产物 PHAPP 却有很强的 MetHb 形成能力<sup>(6)</sup>, 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> on MetHb formation. *n*=4,  $\bar{x} \pm SD$ .**

DMAP (mmol/L)	MetHb (%)	NaNO <sub>2</sub> (mmol/L)	MetHb (%)	NaNO <sub>2</sub> 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

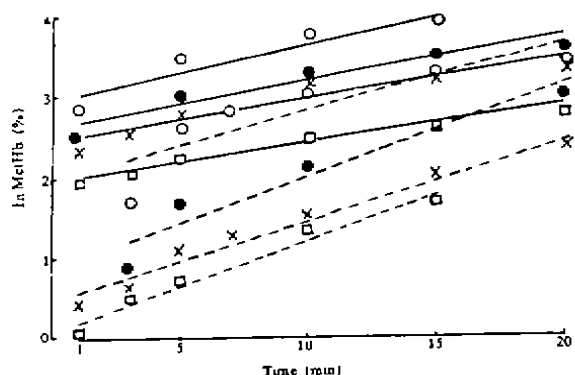
按加权概率单位分析法求得 DMAP 的半数有效浓度 EC<sub>50</sub> 为 2.62 mmol/L，其 95% 置信限为 0.59 - 11.72 mmol/L。NaNO<sub>2</sub> 的 EC<sub>50</sub> 为 72.41 mmol/L，95% 置信限为 42.24 - 124.14 mmol/L。NaNO<sub>2</sub> 的 EC<sub>50</sub> 是 DMAP 的 27.64 倍。另外，药物浓度与 MetHb% 的关系符合 Hill 公式：

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

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

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<sub>50</sub> 基本相符。从浓度依赖性分析，DMAP 的抗氰效果明显比 NaNO<sub>2</sub> 优越。

**2 速度比较** 不同温度下 DMAP 0.5 mmol/L 和 NaNO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 30 mmol/L reacting with RBC at different temperature. DMAP(——); NaNO<sub>2</sub>(- - - -). 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 (MetHb %)<sub>∞</sub>、(MetHb %)<sub>t</sub> 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<sub>2</sub> (30 mmol/L) passing through RBC membrane under different temperature.**

T(°C)	<i>k</i> (min <sup>-1</sup> )*		$\frac{k_{\text{DMAP}}}{k_{\text{NaNO}_2}}$
	DMAP	NaNO <sub>2</sub>	
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<sub>2</sub> 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  $\text{NaNO}_2$  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,  $20^{\circ}\text{C}$  后升高快.

两速率常数  $k$  的比值随温度升高而下降.  $37^{\circ}\text{C}$  时, DMAP 的穿透速率比  $\text{NaNO}_2$  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  $37^{\circ}\text{C}$  时 DMAP 和  $\text{NaNO}_2$  分别为 3.2 与 13.7 min.  $\text{NaNO}_2$  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  $8.314 \text{ J/mol}$ .  $T_1$ ,  $T_2$  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  $17.1 \pm 1.3$  与  $50.2 \pm 12.3 \text{ kJ/mol}$ ,  $n = 6$ .  $\text{NaNO}_2$  通过红细胞膜的能障明显高于 DMAP, 达 2.9 倍, 提供了  $\text{NaNO}_2$  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  $\text{NO}_2^-$  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