

乌拉坦影响红细胞能量代谢导致溶血反应的机制研究

杨黎黎, 吉 勇, 俞志成, 李树清

(昆明医科大学基础医学院实验教学中心, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨乌拉坦静脉注射, 对红细胞的能量代谢的影响. **方法** 20 只家兔使用 25% 乌拉坦经耳缘静脉麻醉, 给药 30 min 后经颈外静脉采血. 每只家兔血样使用肝素抗凝后, 分为 3 组, 分别加入葡萄糖 (GS)、三磷酸腺苷 (ATP) 和氯化钠 (NaCl) 以观察溶血率是否可以被降低. **结果** 实验后血样, 葡萄糖 (GS) 组和三磷酸腺苷 (ATP) 组, 与 NaCl 对照组相比, GS 组溶血率明显下降 ($P < 0.05$); ATP 组溶血率明显下降 ($P < 0.01$). 并且与 GS 对照组相比, ATP 组溶血率也明显下降 ($P < 0.01$). **结论** 乌拉坦静脉注射后, 红细胞破坏溶解现象可以被葡萄糖 (GS) 和三磷酸腺苷 (ATP) 纠正, 并且加入 ATP 可使溶血率的下降更为明显. 乌拉坦可能是影响了红细胞糖酵解过程中的某个环节及 ATP 的利用, 造成红细胞能量供应不足, 凋亡溶解.

[关键词] 乌拉坦; 溶血; 糖酵解

[中图分类号] R365 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 06 - 0021 - 04

The Effect of Urethane on Red Blood Cell Energy Metabolism and Hemolytic Reaction

YANG Li - li, JI Yong, YU Zhi - cheng, LI Shu - qing

(Center of Functional Experiment, School of Basic Medicine Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of urethane on the energy metabolism of red blood cell. **Method** 20 rabbits were anesthetized by urethane intravenous injection. We got blood samples through external jugular vein after 30 min, and divided blood samples which after anesthesia into control group, GS group, and ATP group, then observed whether the hemolytic rate can be reduced. **Results** Compared with control group, the hemolytic rate in GS group was decreased ($P < 0.05$). ATP group's hemolytic rate was remarkably decreased ($P < 0.01$). And compared with GS group, the hemolytic rate of ATP group was also decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** After anesthesia, the hemolytic rate is alleviated when we put glucose (GS) and adenosine triphosphate (ATP) into blood sample. And ATP is better than GS. Urethane probably affects the energy metabolism of red blood cells. It makes the glycolysis decreased.

[Key words] Urethane; Hemolysis; Glycolysis

乌拉坦 (Urethane) 又名氨基甲酸乙酯, 分子式 $\text{NH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$, 为无色的结晶体或白色粉末, 易燃, 无臭, 目前的主要用途是作为一种经典的动物麻醉剂^[1]. 早年, 乌拉坦被发现于西方酒类酿造发酵的过程中, 作为一种食品生产过程中的产物, 后经过提取, 广泛使用于化工业和制造业. 人们可以在杀虫剂、纺织品、化妆品中广泛接触到乌

拉坦. 上世纪 50 ~ 60 年代, 人们发现长期饮用酿造酒类的人群, 罹患肺腺瘤和肺腺癌的比例较不饮酒者高出许多倍, 这时对乌拉坦的化学性质及其作用的研究才开始受到重视. 目前, 国外关于乌拉坦的研究主要集中于其致癌作用的研究^[2], 并且可以使用乌拉坦制造肺腺瘤和肺腺癌的实验模型^[3]. 1997 年, 国内有学者提出, 在实验过程中反

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30971171)

[作者简介] 杨黎黎 (1981~), 女, 云南昆明市人, 硕士研究生, 助理实验师, 主要从事机能实验教学和科研工作.

[通讯作者] 李树清. E-mail: shuqing591@hotmail.com

复观察到乌拉坦麻醉动物的血清呈红色^[4], 继而采用不同品系大鼠和家兔, 经过不同给药途径来验证乌拉坦可能导致溶血, 结果发现乌拉坦静脉注射可导致溶血, 而腹腔注射为阴性^[5]. 仅观察到此现象之后, 没有人再进行深入的、关于乌拉坦如何导致溶血的机制的研究. 乌拉坦廉价而且麻醉效果稳定, 成为学生实验当中最为常用的实验药物, 过去普遍认为其对动物的呼吸循环无明显影响, 被广泛用于家兔、大鼠等小动物的急性实验. 新近研究发现乌拉坦对细胞膜、心血管活动、血液流变学、血糖以及癌基因均有明显影响^[6], 本研究旨在探讨乌拉坦导致溶血的部分可能机制.

1 材料与方法

1.1 实验对象

20 只家兔雌雄不拘, 体重 (2 200 ± 300) g. 避光、安静、清洁的环境饲养.

1.2 实验器材

TGL-16C 台式离心机、隔水式电热恒温培育箱、37 °C 恒温水浴箱、电子分析天平 METTLER TOLEDO AB204-S、一次性负压真空采血管、急性动物实验手术器械、紫外分光光度计 unico7200、25% 乌拉坦 (氨基甲酸乙酯)、分析纯 ATP、10%

$$\text{测定管溶血率} = \frac{\text{测定管吸光度值} \times (1 - \text{血细胞比容})}{\text{溶血对照管吸光度值} \times 4} \times 100\%$$

所有样本 1 号管血样为葡萄糖组, 2 号管为 ATP 组, 3 号管为生理盐水对照组. 红细胞在 37 °C 孵育 48 h, 在乌拉坦的作用下, 红细胞持续破坏, 加入 ATP 和葡萄糖后, 检测溶血率是否下降, 溶血现象是否被纠正, 探讨乌拉坦致溶血的作用机制是否是影响了红细胞的糖酵解和 ATP 的供应和利用.

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 统计软件包进行统计学分析, *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

20 例实验结果见表 1. 静脉注射乌拉坦后, 血样中加入 ATP 和葡萄糖, 溶血现象可以部分纠正 (见表 1, 图 1). 静脉注射乌拉坦 30 min 后血样, 与 NaCl 对照组相比, GS 组溶血率明显下降, 二者差异有统计学意义, ($P < 0.05$); 与 NaCl 对照组相比, ATP 组溶血率明显下降, 二者差异有

葡萄糖溶液、0.9% NaCl 溶液、氰化高铁血红蛋白稀释液.

1.3 实验方法

1.3.1 手术操作 按 1 g/kg 抽取浓度为 25% 的乌拉坦, 从耳缘静脉注射进行麻醉, 30 min 后将家兔仰卧固定于兔台, 剪除颈部兔毛, 以 75% 酒精消毒后, 自环状软骨开始做 6 cm 正中切口, 钝性分离皮下组织, 游离一侧颈外静脉, 使用真空采血管采血 4 mL.

1.3.2 实验步骤^[7] 取 4 只试管, 编号, 分别加入 1 mL 血样. 1 号管加入 10% 葡萄糖 (glucose, GS) 溶液 50 μL, 2 号管加入三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 液 50 μL, 3 号管加入 0.9% 氯化钠溶液 (NaCl) 50 μL, 1、2、3 号管混匀 37 °C 水浴 48 h, 4 号管放入 4 °C 冰箱 48 h. 将 4 号管血样取出, 取全血 0.1 mL 入试管, 加入氰化高铁血红蛋白稀释液 9.9 mL, 作为溶血对照管. 将 1、2、3、4 号管混匀, 测定各管血细胞比容. 后将 1、2、3、4 管血样离心, 各取 0.2 mL 分别放入 4 个试管, 各加入氰化高铁血红蛋白稀释液 4.8 mL, 混匀, 1、2、3 号管为待测管, 4 号作为空白调零. 用紫外分光光度计在 540 nm 处测定各管吸光度值. 根据公式:

统计学意义 ($P < 0.01$); 与 GS 对照组相比, ATP 组溶血率明显下降, 二者差异有统计学意义 ($P < 0.01$).

表 1 葡萄糖、三磷酸腺苷对乌拉坦致溶血作用的纠正 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The changes of hemolysis rate after given GS, ATP and NS ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	溶血率 ($\bar{x} \pm s$)
生理盐水对照组	20	14.17 ± 9.02
10%葡萄糖组 (GS)	20	9.97 ± 6.74*
ATP 组	20	7.20 ± 5.48**

与生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

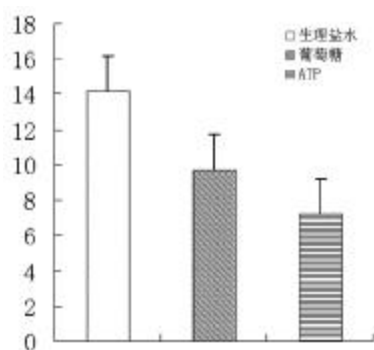


图1 溶血率变化

Fig. 1 The changes of hemolysis rate

3 讨论

3.1 葡萄糖可以缓解乌拉坦注射后导致的溶血现象

本实验中, 实验后血样加入 10%GS 以后, 与生理盐水对照组相比, 溶血率降低为 $(9.97 \pm 6.74) \%$, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 说明葡萄糖可以减低乌拉坦对红细胞的破坏作用.

红细胞含有许多较为复杂而能起代谢作用的物质, 如蛋白质和游离氨基酸、各类酶系统和辅酶、维生素、糖、电解质微量元素等, 其中最重要的是糖代谢^[8]. 红细胞内葡萄糖代谢基本上与其他组织细胞内的代谢过程相类似. 但由于成熟红细胞没有三羧酸循环, 故其仅能从葡萄糖酵解 (Glycolysis) 的途径获得能量. 血浆内葡萄糖是与细胞膜的载体结合而进入细胞内的. 血液循环内的红细胞每摄取 25 g 葡萄糖, 其中有 90% ~ 95% 经过糖酵解产生能量. 葡萄糖在酵解过程中 1 mol 葡萄糖可生成 2 mol 的磷酸丙糖, 每 1 mol 磷酸丙糖转变为丙酮酸时, 又可以生成 2 mol ATP. 因而 1 mol 葡萄糖总共生成 4 mol ATP. 而葡萄糖转变为 1, 6-二磷酸果糖时要消耗 2 mol ATP, 因此葡萄糖酵解最后可产生 2 mol ATP, 供给红细胞作为能量使用. 实验后血样加入 GS 以后, 溶血率下降, 说明增加了葡萄糖的供给, 糖酵解的原料增多, 使得红细胞的供能增多, 在一定程度上减慢了红细胞膜破坏的速度.

3.2 ATP 可以缓解乌拉坦注射后导致的溶血现象

本实验中, 实验后血样加入 ATP 后, 与生理盐水对照组相比, 溶血率降低, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.01$). 说明 ATP 也可以减低乌拉坦对红细胞的破坏作用.

红细胞如果要有效的发挥其结合、运输和传递氧气的功能, 必须要有能量来源. 这些能量主

要来源于糖酵解途径所产生的 ATP^[9]. ATP 在红细胞内的功能有以下几个: 首先 ATP 可用于血红蛋白二价铁的维持. 其次, ATP 在维持细胞膜“钠泵”的正常功能中有重要作用. 已知 Na-K-Mg 依赖性 ATP 酶在细胞膜的阳离子交流中起重要作用. ATP 酶催化 ATP 分解, 随着磷酸化和脱磷酸化而与 K 或 Na 结合或脱落, 以保持红细胞内的离子平衡, 即红细胞在高钠, 低血钾水平下维持红细胞内高钾、低钠状态, 维持这种差别除与细胞膜上某种特殊蛋白质有很大关系, 还需要消耗能量, 约消耗 ATP 生产总量的 30%. Na⁺ 泵对维持红细胞的正常形态极为重要, 当 ATP 供给不足时 Na⁺ 内流将大于 K⁺ 外流, 致使红细胞内渗透压升高, 最终导致破裂. 另外, ATP 供能维持红细胞 Ca⁺ 内环境的恒定, Ca²⁺ 泵 (Ca²⁺-ATP 酶) 通过 ATP 供能将细胞内过量的 Ca²⁺ 转运出细胞, 以维持红细胞内 Ca²⁺ 和血浆 Ca²⁺ 之间的悬殊的浓度差. 否则, 红细胞过量的 Ca²⁺ 会沉积在细胞膜上使红细胞散失柔韧而变僵硬, 成为棘状细胞, 这种细胞变型运动困难, 长期滞留于酸性环境中, 会导致细胞破裂溶血. 还有, ATP 用于红细胞膜上脂质的更新, 正常红细胞 ATP 含量为 1.85×10^{-3} mol/L, 当 ATP 降低至 1×10^{-4} mol/L 时, 可导致溶血磷脂浓度升高并聚集在膜内, 随之红细胞形态发生异常状态, 生成棘状细胞和球形细胞, 通透性也增大, 导致细胞破裂^[10]. 最后 ATP 协助保持酶蛋白、血红蛋白和膜上巯基的活性还原状态, 维持红细胞的双凹形态和变形性. 实验中 ATP 组的溶血率比生理盐水组的明显下降, 说明加入 ATP 后, 直接供给维持红细胞正常形态和功能的能量在红细胞自身糖酵解不足的情况下, 仍有充足的 ATP 供给, 红细胞的破裂速度减慢.

综上所述, 静脉注射乌拉坦后, 乌拉坦可能作用于红细胞的糖酵解过程中的某个物质, 某个环节或某种酶, 影响了 ATP 的生成, 导致红细胞能量供应不足, 发生破裂溶血; 也可能是作用于红细胞对 ATP 利用环节, 导致红细胞破裂溶血. 并且, 实验中 GS 组和 ATP 组的比较中发现, ATP 组的溶血率也明显低于 GS 组, 二者差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明乌拉坦影响糖酵解的过程的可能性更大, 但是具体作用位点还有待进一步研究.

[参考文献]

[1] 戴体俊主编. 麻醉药理学[M]. 第2版. 北京:人民卫

- 生出版社,2005:6-7.
- [2] HERZOG C R, DEVEREUX T R, PITTMAN B, et al. Carcinogenic induction directs the selection of allelic losses in mouse lung tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (22): 6 424 - 6 429.
- [3] GARBOW J R, WANG M, WANG Y, et al. Quantitative monitoring of adenocarcinoma development in rodent by magnetic resonance imaging [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1 363 - 1 367.
- [4] 于小玲, 刘凤, 王宝娃, 等. 乌拉坦静脉注射所致的溶血现象及其对血液流变性的影响[J]. *微循环学杂志*, 1997, 7(3): 22 - 23.
- [5] 齐晓娟, 彭如心, 杨秀珍, 等. 维生素C和地塞米松增加兔红细胞渗透抵抗性[J]. *中国微循环*, 1999, 3(3): 142 - 143.
- [6] 杨黎黎. 乌拉坦麻醉动物的病理生理学作用[J]. *微循环学杂志*, 2011, 21(1): 59 - 61.
- [7] 叶应妩主编. 全国临床检验操作规程[M]. 第3版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 10.
- [8] LEONART M S, NASCIMENTO A J, NONOYAMA K, et al. Enzymes And membrane proteins of ADSOL-preserved blood cells [J]. *Sao Paulo Med J*, 2000, 118(2): 41 - 45.
- [9] ASLAN R, SEKEROGU M R, TARAKOGLU M, et al. Investigation of malondialdehyde formation and antioxidant enzyme activity in stored blood [J]. *Haematologia*, 1997, 28(4): 233 - 237.
- [10] KNIGHT J A, SEARLES V A, CLAYTON F C. The effect of desferri Oxamine on stored erythrocytes: lipid peroxidation, deformability, and morphology [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 1996, 26(4): 283 - 290.
- (2012-02-22 收稿)

(上接第 20 页)

- [5] FRIEDMAN S L. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies [J]. *N Engl J Med*, 1993, 323: 1 828 - 1 835.
- [6] FRIEDMAN S L. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver [J]. *Semin Liver Dis*, 1990, 10: 20 - 29.
- [7] FRIEDMAN S L, ROLL F J. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan [J]. *Anal Biochem*, 1987, 161: 207 - 218.
- [8] BLOMHOFF R, BERG T. Isolation and cultivation of rat liver stellate cells [J]. *Meth Enzymol*, 1990, 190: 58 - 71.
- [9] GEERTS A, NIKI T, HELLEMANS K, et al. Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting [J]. *Hepatology*, 1998, 27: 590 - 559.
- (2012-03-08 收稿)