

氰化物的毒理学

曹阳 常亚男[†] 光洁 郭威 姚远

北京大学化学与分子工程学院

[†] 北京大学医学部

北京 100871, 中国

关键词： 氰化物 毒理学 细胞色素氧化酶 细胞钙稳态

摘要： 氰化物其实是含氰基一类化学物质的总称。最常见的是氢氰酸、氰化钠和氰化钾。氰化物对人和动物是一种剧毒药物，可由呼吸道和消化道等途径摄入体内。当过量吞入或吸入高浓度氰化物时，中毒者随即倒地，意识丧失，瞳孔放大，迅速死亡。本文简要地介绍了氰化物中毒的临床反应和急救方法，并着重探讨氰化物中毒的机理。

1 氰化物中毒的临床反应和救治

1.1 氰化物进入体内的方式：

氰化物中毒主要是通过呼吸道，其次在高浓度下也能通过皮肤吸收。生活性氰化物中毒以口服为主（如误食含氰果仁儿，比如生桃仁儿等），口腔粘膜和消化道对其可充分吸收。

1.2 氰化物的中毒分类

- 1、按中毒时间: 氰化物所致的急性中毒分为轻、中、重三级。
- 2、轻度中毒表现为眼及上呼吸道刺激症状，有苦杏仁味，口唇及咽部麻木，继而可出现恶心、呕吐、震颤等；
- 3、中度中毒表现为叹息样呼吸，皮肤、粘膜常呈鲜红色，其他症状加重；
- 4、重度中毒表现为意识丧失，出现强直性和阵发性抽搐，直至角弓反张，血压下降，尿、便失禁，常伴发脑水肿和呼吸衰竭。
- 5、氢氰酸对人体的慢性影响表现为神经衰弱综合症，如头晕、头痛、乏力、胸部压迫感、肌肉疼痛、腹痛等，并可有眼和上呼吸道刺激症状。皮肤长期接触后，可引起皮疹，表现为斑疹、丘疹，极痒。

1.3 临床表现及机制

1.3.1 呼吸系统：

早期：呼吸加快，呼吸作用深而快-----

- 1、机体因为缺氧，血液中 $pCO_2 > pO_2$, CO_2 作用于外周化学感受器（颈动脉体和主动脉体）和中枢感受器，使其兴奋，呼吸中枢兴奋，化学感受器从而呼吸肌收缩加强，呼吸作用加强。
- 2、机体缺氧，组织细胞的有氧氧化作用受限，无氧代谢加强，乳酸生成增加，氢离子浓度增加，而氢离子可以通过血脑屏障，直接作用于中枢系统，刺激其兴奋，呼吸作用加强。

晚期：呼吸衰竭-----

- 1、长期严重的组织细胞内氧化磷酸化过程受损，生物氧化过程障碍， CO_2 对呼吸的抑制大于兴奋作用，呼吸减弱。

- 2、因为长期缺氧，呼吸肌细胞 ATP 产生减少，运动能力下降。
- 3、氰化物可损伤肺泡膜上皮细胞。释放中性粒细胞趋化因子，中性粒细胞聚集，释放氧自由基、蛋白酶、炎症介质，损伤肺组织，呼吸衰竭。

1.3.2 中枢神经:

起主导作用。当吸入氰化气体或吞服大量高浓度致死剂量的氰化钾(钠)时，数分钟内可引起猝死。氰化物中毒时，患者突然发生尖叫声，随即倒地，意识丧失抽搐一阵，先呼吸停止而死亡。有的出现咽喉紧缩感，头痛、头晕、恶心、呕吐，继而意识丧失、抽搐、角弓反张。

烦躁不安-----

- 1、缺氧引起，二氧化碳刺激交感—肾上腺系统，使中枢神经系统兴奋。
- 2、CO₂ 浓度上升，脑内 PH 下降，GABA 增多，中枢抑制。

头晕、虚弱、头痛-----

因脑水肿引起。Po₂ 下降，CO₂ 上升，刺激脑血管扩张，血管内皮细胞损伤通透性加强，引起脑充血和脑水肿，导致颅内压升高。

痉挛-----

氰化物中毒导致肌浆网释放大量钙离子，进入细胞，Ca⁺浓度明显增高，肌收缩力加强。

失去知觉-----

- 1、皮层中枢功能受到影响。小剂量氢氰酸即可引起皮层抑制，条件反射消失。腈类化合物的分子本身具有直接对中枢神经系统的抑制作用。
- 2、酸中毒时细胞膜磷脂酶活性增强，融媒体膜通透性增高，破裂，损伤脑细胞。

1.3.3 循环系统:

早期：心跳过快-----

缺氧引起机体代偿性增加血供应量，以维持氧需量。

氰离子对主动脉体和颈动脉体化学感受器的反射性作用。

对心脏心肌表面受体的直接兴奋作用。

后期：低血压、心跳过慢-----

氰化物对外周血管的直接扩张作用，是心脏后负荷降低，血压降低。且因为长期缺氧，心肌细胞 ATP 产生减少，运动能力下降，心跳减慢。

患者皮肤粘膜和血液呈现鲜红色-----

氰离子与氧化型细胞色素氧化酶的 Fe 结合，阻止了氧化酶中三价铁的还原，抑制该酶活性，氧气不能从中脱离出来，动静脉血氧差由正常的 4~5 % 降至 1.0~1.5 %，因氧合血红蛋白呈鲜红色，所以氰化物中毒时的皮肤、粘膜呈樱桃红色。

1.3.4 消化系统:

恶心与呕吐-----

- 1、主要是由于胃肠道平滑肌细胞，因钙离子内流增加，肌纤维运动加强，痉挛。
- 2、缺氧使得机体内 pco₂ 升高，刺激交感神经，消化液分泌减少，胃肠蠕动减慢，导致食物在胃肠道内停滞，消化不良，致使食欲不振，厌食，恶心

1.4 氰化物中毒的临床反应和急救方法

立即将患者移至空气新鲜处, 吸氧 (作用不大, 不能解除根本原因)。呼吸停止者应进行人工呼吸 (但避免用口对口人工呼吸法), 心跳停止者, 应即时作胸外心脏挤压。有条件者立即将亚硝酸戊酯 2 支包在手帕中压碎, 置患者口鼻前吸入, 可反复应用 2~3 次。在医院中还可使用亚硝酸钠、硫代硫酸钠或美兰等进行抢救。近来认为依地酸二钴 (CO₂EDTA)、组氨酸钴等有机钴盐类是治疗氰化物中毒的较为有效的解毒药。临床上常用的抢救方法是用硫代硫酸钠 (解除氰化物对细胞色素氧化酶的作用) 溶液进行静脉注射, 同时使那些尚有意识的病人吸入亚硝酸异戊酯进行血管扩张来克服缺氧。

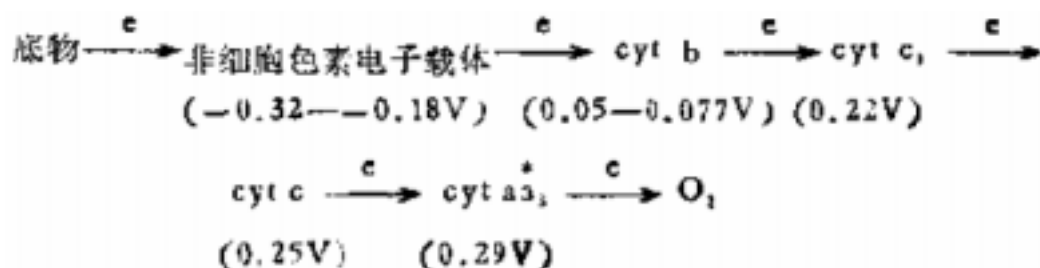
2 氰化物的中毒机理

氰化物的毒性在于它可以和几种重要酶的催化位点上的金属阳离子结合形成复合物, 抑制酶功能。急性氰化物中毒多表现为全身性中毒, 但中枢神经系统是氰化物毒理作用的主要靶器官之一, CN⁻ 进入脑组织后, 迅速抑制细胞色素氧化酶, 使细胞生物氧化过程受阻, 导致中枢神经系统生化代谢、病理形态和生理机能改变, 从而引起一系列中枢神经中毒症状。机理极为复杂。[1] 本文重点讨论中枢神经系统生化代谢变化中的两个主要方面: (1) 细胞色素氧化酶活性抑制; (2) 钙稳态的破坏。

2.1 抑制细胞呼吸链

2.1.1 细胞色素氧化酶活性抑制:

细胞色素 (cytochrome 简写 cyt) 是一类以血红素为辅基的蛋白质。它的特征功能是通过结构中的铁价态的可逆变化而进行电子传递。在细胞的呼吸过程中发生着营养物质 (如葡萄糖) 的氧化, 生物体利用后者氧化为 CO₂ 和 H₂O 时释放的能量, 用于 ATP 的合成 (即氧化磷酸化作用), 在此氧化过程中, 细胞色素起着电子载体的作用, 电子传递的途径及电势如下图所示:



细胞色素根据结合到血红素辅基卟啉环上的取代物的不同, 可分成 ABC 三大类。与本文相关的主要是血红素 A (Heme a) 的结构, 以下给出血红素 A 和 C 的结构

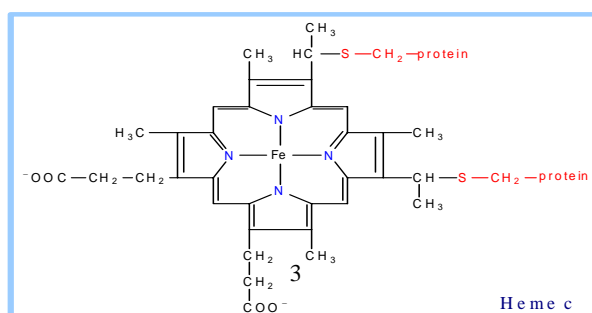
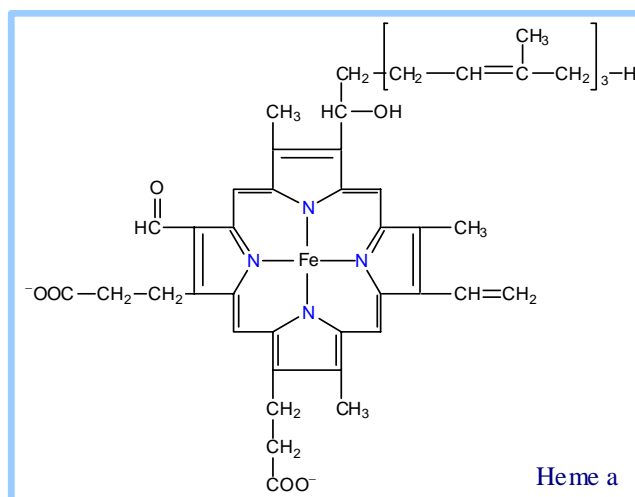


Fig 1

Fig 2



2.1.2 细胞色素 c 氧化酶

细胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase, CcO₂) 是在真核细胞线粒体内膜和需氧菌细胞膜电子传递链中位于细胞色素 c 与电子的最后受体氧气分子 (或其他氧化性分子) 之间的电子载体。[2] 超过 90% 的被动吸入的氧气由线粒体膜内的 CcO₂ 还原利用。[7] CcO₂ 催化细胞色素 c 与氧气的反应[6]：



形成水说需要的质子来源于线粒体或细菌内膜的内侧，而细胞色素 c 位于内膜外侧。同时，CcO₂ 在传递电子的同时把四个质子有膜内侧泵向外侧。这两项作用使内膜两侧产生质子浓度梯度，产生电化学能，生物一次推动 ATP 的合成，而 ATP 是许多生理反应、活动的直接能源。故而 CcO₂ 在生物体代谢过程中至关重要。[6] 细胞色素 c 氧化酶是含血红素/铜的终端氧化酶 [3, 4, 5] 大家族的成员之一。这个家族的成员的特征是，在最保守的亚基 (Sub₁) 中有与两个 heme 基团和一个 Cu 离子 (CuB) 配位的组氨酸 (His) 存在。在细菌酶中 heme 基团可以是 heme A、B、O[5]，而在线粒体 CcO₂ 中仅发现存在 heme A。[6] 由于细胞色素氧化酶含血红素 A，是 A 类细胞色素。故最早命名为细胞色素 a (cyt a)，当用 CO 处理 cyt a，它的氧化还原吸收光谱的吸收峰分成两个组分，于是发现了 cyt a₃，于是，对酶分子中能与 CO 及 CN⁻ 结合的血红素辅基通常称作 cyt a₃ 部位，而对小配体无反应的部位称为 cyt a 部位。考虑到 cyt a 和 cyt a₃ 从未成功分离，(有人提出，细胞色素氧化酶是一种脂蛋白复合体) 因此当时细胞色素氧化酶用符号 cyt aa₃ 表示。[2] 至今许多文献中仍沿用 cyt a₃ 来指与 CO，CN⁻ 及 O₂ 的催化反应位点，但细胞色素 c 氧化酶大多用 CcO₂，而少用 cyt aa₃。CcO₂ 催化机理的研究的重大突破来自于对其晶体结构的测定。1995 年测定了 2.8Å 分辨率的牛心线粒体 CcO₂ (BCcO₂) [8, 9]。1998 年，Yoshikawa 等对 PCcO₂ 晶体结构进行了 2.3Å 分辨率的测定[10]。PCcO₂ 由三个核心亚基 Sub₁、Sub₂ 和一个功能未知的非保守亚基 Sub₃ 组成[11]。

Sub₁ 是 CcO₂ 中最大和最保守的亚基，它含有 12 个跨膜螺旋，这些螺旋以近似三重轴对称方式排列在膜中，从内侧垂直于膜表面观察，12 个螺旋依次按反时针方向排列形成 3 个半圆拱形结构，形成 A、B、C 三个孔洞 (见图 3)。[6] 立体图见图 4。

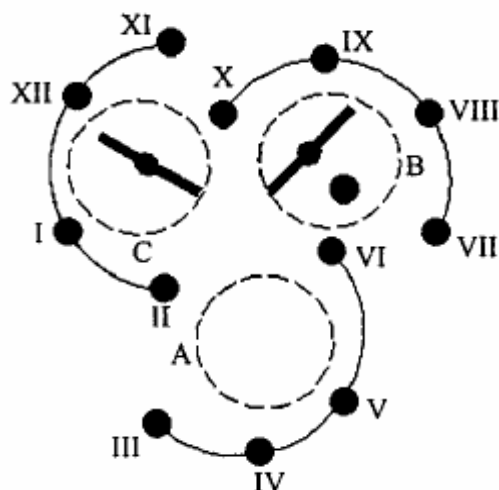


Fig 3

—●— heme ● helices

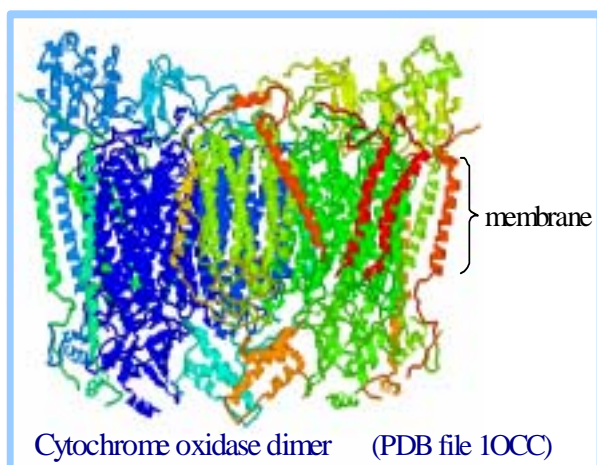


Fig. 4.

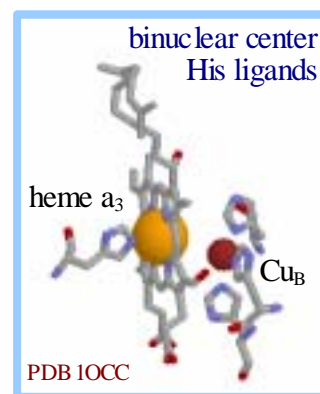


Fig. 5.

其中共有 5 个金属中心，氧化还原催化位点为 heme a、heme a₃ 和 Cu_B，非催化位点为 Mg 和 Ca。其中 heme a 中 Fe (低自旋) 轴向配体为两个 His (分别来源于螺旋 2 和 10) 的残基的咪唑(imidazole)。heme a₃ 中 Fe (高自旋) 轴向配体为一个 His (螺旋 10) 的 imidazole，另一个轴向配位点空。Cu_B 与三个 imidazole 的 N 原子配位，呈近似三角形构型 (见图 5)。Heme a 位于孔 C 中，heme a₃ 在孔 B 中。两个 heme 平面都垂直于膜表面且各自的 2 个丙酸根基团都伸向胞质侧。两个 heme 平面几乎是垂直的，在 PCc0 中平面夹角为 108°。这使得两个 heme 间距离很近。PCc0 中两个 heme 的边-边距离仅 4.7 Å，Fe-Fe 距离仅为 13.2 Å。Heme a₃ 和 Cu_B 一起 (有些文献指这个双中心反应催化位点为 cyt a₃)，形成 O₂ 还原催化部位的双核中心。Cu_B 与 heme a₃ 间距离约 5 Å 左右。[6] Cu_B 与 heme a₃ 都没有 EPR 信号，解释是产生了强烈的反铁磁性耦合作用[3, 12]。而产生的原因曾经有多种假设，有人认为存在桥联配体[13]，有人认为存在一非 His 残基可以在两金属中心间移动而充当活动配体[14]。后来由 2.3 Å 高分辨率的氧化钛 BCc0 的结构看出，在 heme a₃ 的 Fe³⁺ 和 Cu_B²⁺ 之间有过氧离子桥联[10]。一些键长数据如下：Cu_B-O 2.16 Å，Fe (a₃)-O 2.52 Å，O-O 1.62 Å (比过氧化氢中的 O-O 键稍长)。另有氧化还原滴定结果也支持桥联过氧化物的存在[15]。而在还原态 Cc0 中无桥联配体存在，Fe (a₃) 与 Cu_B 间距离比氧化态中稍长。

在 2.3Å 分辨率的 BCcO 的 X-ray 结构和 2.7Å 分辨率 PCcO 机构中发现一 Tyr (酪氨酸) 残基的酚基的一个邻位碳原子和与 CuB 配位的一个咪唑基上的氮原子间存在共价键[10,16]。氨基酸序列分析也证实这一发现[17]。而又发现 Tyr 残基的取代会一起 heme a₃-CuB 中心结构的破坏,表明这个残基对 CuB 位点的稳定性起重要作用[18]。可能反应机理是氧气分子还原过程中这个共价键均裂而得到自由基,参与 O₂ 中间体的电子传递和质子化作用[10,16]。

2.1.3 电子传递

电子在 CcO 中的传递途径还未完全清楚,根据已有研究成果,可能途径分如下几步:

A) cyt c -- CuA

快速动力学研究证明,CuA 结构域是接受来自 cyt c 电子的初始受体[19],CuA 结构域和 cyt c 间的电子传递速率很快,约 70000 /s[20],Cyt c 与 CcO 问复合物的形成是它们问反应的限速步骤[21]。

B) CuA — heme a

从 CuA 到 heme a 的电子传递是高速的,约为 20000 /s.Iwata 等[22]提出在 CuA 和 heme a 问存在着一个可能的电子传递途径,它是由 14 个共价键和 2 个氢键组成的。

C) heme a — heme a₃

如前所述,heme a 和 heme a₃ 这两个血红素平面几乎是相互垂直的,Fe-Fe 间的距离是 13.5Å,而血红素边缘却相互接近达到 4.5Å。因此,在 heme a 到 heme a₃ 的电子传递中,边一边间电子传递是可能的,用 Fe 配体 Sub I-His413 (heme a)和 Sub I-His411 (heme a₃)和多肽主链进行电子传递也是一条途径。另一种可能的途径[9,22]包括保守的 Sub I-Phe412 侧链,这个残基与两个血红素间的距离几乎相等。从 heme a 到 heme a₃-CuB 的电子传递速率与酶的氧化还原状态、nH 值和测量方法有关,其范围在 3—10⁵/s 范围内[19,21,23,24]。

整个过程见图 6

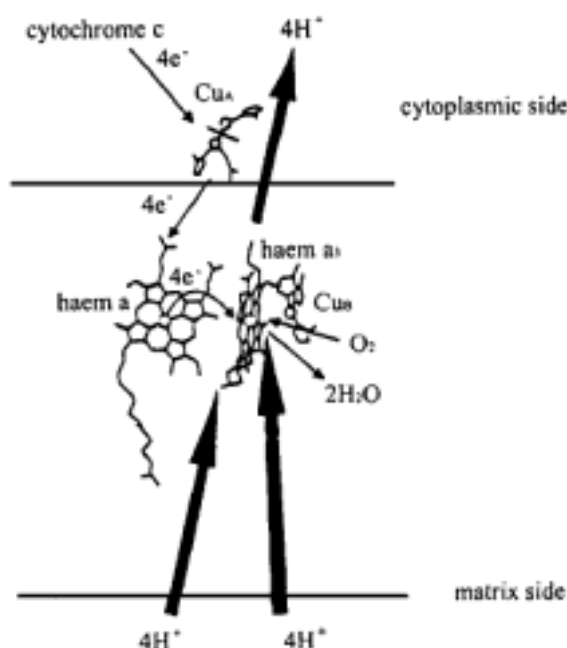


Fig. 6.

2.1.4 氰离子的作用

表 38.27 细胞色素氧化酶的性质与各组分氧化态的关系

酶的形式	EPR 信号 $g \approx 2$	830nm 吸收带	605nm 吸收带	各组分中金属的氧化态		
				a 部位	Cu(α)	a ₃ 部位
氧化型	有	有	无	Fe(III)	Cu(II)	Fe(III)
$\downarrow \text{CN}^-$ CN ⁻ 加合物	有	有	无	Fe(III)	Cu(II)	Fe(III) - CN
$\downarrow [\text{H}]$ 半还原 CN ⁻ 加合物	无	无	无	Fe(II)	Cu(I)	Fe(III) - CN

早期对 CcO 的研究科学家发现 heme a₃-CuB 这个双原子活性位点除了与已知的咪唑配体配位外还存在其他配体,并推测可能是两个配体或一个桥式配体[47]。为解释这一问题而假设了 Fe-X-Cu 模型,并以 X = O²⁻, OH⁻, and RCO₂⁻ 等单原子配体和 CN、CO、NO 等情况进行实验[48-52],而发现 CN 与该位点是不可逆结合,而确定的是 CcO 与 CN 作用而导致失活的反应位点是双原子 heme a₃-CuB 位点。而 CN⁻以怎样的方式和这个双原子位点结合则是讨论的关键。通过将不同氧化还原态的 CcO 与 CN⁻结合的产物中 C-N 的光谱学数据与自由状态时的数据及人工合成的类似反应位点化和物 ([Cu(Npy₃)(CN)](ClO₄), [Cu₂(Npy₃)₂(CN)](ClO₄), [Cu₂(MeNpy₂)₂(CN)](ClO₄), [(py)(OEP)Fe-CN-Cu(Npy₃)](ClO₄)₂·5Et₂O, [(OEP)Fe-NC-Cu(MeNpy₂)](ClO₄)·MeCN ([10](ClO₄)·MeCN), [(OEP-CH₂CN)Fe-NC-Cu(Npy₃)](ClO₄), [(OEP-CH₂CN)Fe-NC-Cu(Npy₃)](ClO₄) 中 C-N 的数据对比,及 X 射线晶体结构的测定[25, 46]得如下结论:

CcO 呈氧化态时, CN⁻以桥联配体连接 heme a₃ 和 CuB, 形成 Fe—C 键和 Cu—N 键。Fe—C—N 几乎呈直线, 而 C—N—Cu 角度约 157°。而还原态时, Cu—N 键被破坏。[25]见图 7:

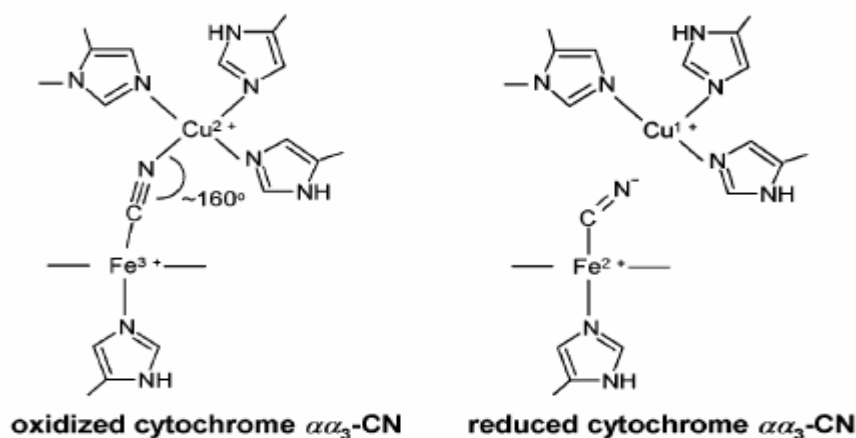


Fig. 7

2.2 破坏细胞钙稳态

氰化物中毒最基本的升华效应是抑制细胞色素氧化酶 aa3 (线粒体电子传递链的终端酶), ATP 生成中断。急性的临床表现有心律失常、呼吸抑制、心衰、脑电图改变、癫痫发作、震颤以及其他中枢性有关效应。某些病例会发展成类似帕金森病症状的中毒后遗症。慢性中毒包括热共济失调神经病、Leber 视神经萎缩性侧索硬化。[26]由此可见,脑无疑是氰化物中毒的主要靶器官。中枢神经系统对氰化物高度敏感,这是因其对能量的导读依赖、氰化物解毒酶的活性低、脂质含量高、易受自由基损伤等因素所致。近年来,对于氰化物中毒机理的研究已逐渐深入到氧化代谢抑制之后的细胞结局性损伤。氰化物的神经性损伤与钙稳态的失调之间的关系是目前研究较为活跃的一个领域。

2.2.1 神经细胞内游离 Ca^{2+} 的平衡

神经细胞内 Ca^{2+} 作为第二信使克接到多种神经生化反应。如释放神经递质、激活酶促反应、传递末内外信息都有赖于 Ca^{2+} 的参与。对于静息神经元,胞外 Ca^{2+} 浓度达 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$, 胞内 Ca^{2+} 的浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 跨质膜 Ca^{2+} 梯度为 1×10^4 。维持神经细胞内外这种 Ca^{2+} 浓度梯度,除了细胞膜的隔离外,还依靠以下机制[27]:

(1) 细胞器的封存:神经细胞内线粒体、滑面内质网、突触小泡等都能摄取 Ca^{2+} ,突触小泡内的 Ca^{2+} 含量可高达 18 mmol/L [28];

(2) Na^{+} - Ca^{2+} 交换:交换方式是三个 Na^{+} 换取一个 Ca^{2+} ,正常情况下, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶维持胞内外 Na^{+} 梯度为 1:10, Ca^{2+} 正是依赖这一化学梯度移向胞外;

(3) 胞浆蛋白对 Ca^{2+} 的缓冲作用,如钙调素 (CaM) 等。以上机理对 Ca^{2+} 调节有一定限度,如果超过这一极限,导致 Ca^{2+} 超载,可触发一系列有害反应。

2.2.2 钙离子通道:胞外钙内流的途径

神经元质膜上的 Ca^{2+} 通道可分为典雅依赖性通道 (VDC) 和受体操纵性通道 (ROC) 两种[29,30]。

(1) VDC:当质膜去极化时,VDC 开启, Ca^{2+} 依电势梯度内流。这类钙通道的选择性较差,其他一些二价阳离子如 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} 也能通过,而 Cd^{2+} 、 Mg^{2+} 等则能阻断 VDC。根据调控方式、药理特性,可将 VDC 分为 L、T、N 三型:L 型(持续型)的特点是高电导、慢灭活,需要强的去极化才能开启,开启后能产生持续 Ca^{2+} 内流;T 型(过渡型)的特性是低电导、快灭活,弱的去极化即能开启,产生快速瞬时的 Ca^{2+} 内流;N 型(神经型)只存在于某些神经元上,其开启需强极化。三型通道在不同组织中分布不同,其中只有 L 型才能被传统的钙通道阻滞剂阻断。

(2) ROC:神经递质与质膜上特定受体结合后,启动 ROC 开放,使胞外 Ca^{2+} 进入胞内。近年来提出的谷氨酸 (Glu) 过兴奋毒性学说中,N-甲基-D-门冬氨酸 (NMDA) 受体的作用备受关注。Glu 是脑内含量最高的兴奋型氨基酸,有三型受体,按功能分为 NMDA 受体和非 NMDA 受体,后者包括 Quisqualate(简称 Q)和 Kainate(简称 K)受体。虽然三型受体都与 Glu 有较高的亲和力,但是 NMDA 受体对 Ca^{2+} 有较高的通透性,神经细胞 Ca^{2+} 增加主要由 NMDA 受体介导。[31]

2.2.3 氰化物中毒与钙稳态失调的关系

如前所述,急性氰化钾中毒因阻断线粒体氧化磷酸化,可直接或间接引起中枢神经

系统组织性缺氧, 缺氧使膜通透性改变, 造成钙内流, 使胞液钙浓度增加

Johnson[26]的实验

小鼠皮下注射 KCN 10mg/kg.5min 后小鼠全脑总钙量显著下降, 15min 后明显上升, 持续 3 小时。全脑总钙升高与震颤发作相一致。如果预先注射钙通道阻滞剂硫氮卓酮(diltiazam)则可阻断或延缓震颤发生、发作时间和峰值, 认为钙在细胞内的蓄积与细胞内依赖钙调节途径的能量终止有关。

Johnson[32]用Quin2 / AM 作Ca²⁺荧光指示剂测定PC12细胞胞液Ca²⁺浓度, 分别加入 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} mol / L的KCN 后孵育, 胞液Ca²⁺浓度逐渐上升, 30min后达最高峰。孵育后15min, 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} mol / L KCN剂量组, 胞液Ca²⁺各增加3倍和6倍。先用K⁺去极化的细胞与单独用氰化钾或氯化钾(KCl)的细胞相比, 细胞内Ca²⁺升高更快。预先加入硫氮卓酮可阻断KCN 和K⁺引起的胞液Ca²⁺蓄积。

这表明氰化物引起的胞液 Ca²⁺超载源于细胞外室。从以上可看出, Ca²⁺对介导氰化物毒性起着十分关键的作用。

2.2.4 氰化物引起 Ca²⁺稳态失调的机制

自 Olney [33]提出过兴奋毒性(excitotoxicity)以来, 内源性 Glu 的神经毒性研究进展

很快。由此形成了中枢神经系统中毒机理钙流学说: 突触后膜 Glu 受体过激活-Na⁺、Ca²⁺内流假说。各种原因引起的 Glu 过度释放、异常外漏、受体敏感性降低可能使 Glu 由正常的神经递质变为神经毒素。在去除葡萄糖、排除 O₂ 或应用氧化磷酸化抑制剂引起小脑颗粒细胞能量生成下降后, Glu 可表现出神经毒作用。Patel [34]在原代海马组织培养中加入 NMDA 受体拮抗剂 2-氨基-5-磷酸(APV)可明显抑制氰化钠(NaCN, 2mmol / L)引起的细胞内 Ca²⁺升高。

氰化物导内源性 Glu 释放, 可能由两方面因素引起:

一是氰化物引起的组织缺氧造成神经细胞去极化, 使突触前膜释放 Glu; 二是缺氧造成神经细胞能量代谢障碍, 使依赖 ATP 的突触前膜对 Glu 的重吸收过程抑制。应用大脑内微透析方法, Benveniste[35]等测出大鼠缺血海马组织细胞外 Glu 升高了 8 倍。由此可见, 氰化物中毒后, 引起膜去极化和能量匮乏, 使突触间隙 Glu 浓度增加, 激活相应受体, 引起胞外 Ca²⁺内流。Choi [36]总结了 Glu 引起 Ca²⁺内流的 4 种可能途径: (1)Glu 激活 NMDA 亚型的 Glu 受体, 直接引起 Ca²⁺沿浓度梯度跨膜内流; 同时 Glu 激活 Q 和 K 亚型的 Glu 受体, 引起 Ca²⁺内流和膜去极化, 启动如下三条途径。(2)打开神经细胞膜上电压依赖性 Ca²⁺通道, 包括 L、N、T 三种亚型, 造成 Ca²⁺内流。N 型通道主要引起神经元末端部位 Ca²⁺内流, 对神经元之间损伤的传递有重要意义; (3)Na⁺ / Ca²⁺交换反向进行, Ca²⁺由胞外进入胞内。(4)急性损伤后神经元胞体引起 Ca²⁺外漏。

最近, Sun[37]用斑片钳压技术揭示 NaCN 可增加 NMDA 受体通道的开放频率而不影响单通道传导和平均通道开放时间, 认为 NaCN 可直接与 NMDA 受体作用。另有研究表明, 氰化物通过 Ca²⁺-依赖激活蛋白激酶 C(PKC)使 NMDA 甲基化后增加其活性, 同时降低 Mg²⁺阻滞[38]。

Rajdev[39]等 将大鼠前脑单个神经元分别暴露于(1)Glu、(2)NMDA、(3)Kainate、(4)高 K⁺。发现 4 种激动剂均能升高细胞内 Ca²⁺水平, 加入 KCN(5mmol / L)后, 胞内 Ca²⁺明显升高。但只有(1)、(2)两组具有神经毒性(光镜下见细胞突消失、细胞膨胀、碎裂)进一步研究表明(1)、(2)两组细胞内 Ca²⁺浓度升高持续时间长, 恢复到 10%峰值历时久。因此不能仅凭细胞内 Ca²⁺浓度升高来判断某物质的神经毒性, 总钙负荷、细胞内 Ca²⁺来源、部位、细胞缓冲 Ca²⁺的能力及第二信使的激活才是决定因素。用荧光指示剂 Fura-2 对枪乌鱼巨

大突触进行研究,发现活动区(指突触前质膜的某些特定部位,胞浆附近的突囊泡及有局部循环功能的囊泡质膜)的 Ca^{2+} 内流比非活动区至少高 10 倍,可能因为这些区域的 NMDA 受体密度及活性更高所致。

Glu 通过激活 NMDA 亚型 Glu 受体,引起细胞外钙内流,可能是氰化物中毒引起钙稳态失调的主要途径,但不能排除其它 Ca^{2+} 内流途径的存在,如胞内钙库动员。总之,氰化物引起钙稳态失调的机理有待于进一步阐明。

2.2.5 钙稳态失调对中枢神经系统的不利影响

氰化物引起的神经元 Ca^{2+} 过载可激活一些关键的质膜和胞浆的神经生化过程而致神经细胞损伤。

(1) **氧化应激**: 是氰化物神经毒性的主要表现。神经细胞内游离 Ca^{2+} 上升,可激活磷脂酶 A 和磷脂酶 c,膜磷脂大量降解,胞液游离脂肪酸如花生四烯酸成倍上升,经细胞内环氧化酶作用,产生前列腺素、白三烯等生物活性物质与 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{NO}\cdot$ 等活性氧类(ROS),引起生物膜脂质过氧化[40]。另外,氰化物可直接抑制超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等关键酶,加速脂质过氧化。

(2) **神经递质释放**: Persson[41]发现氰化物中毒可大量消耗大鼠脑内 一氨基丁酸(GABA),致死剂量的氰化物大量降低大鼠纹状体多巴胺(DA)。在 PC 细胞模型,氰化物引起多巴胺钙依赖性释放和消耗,并伴有多巴胺脱羧酶抑制。Kanthasamy[42]的研究认为纹状体神经元 DA 释放受突触前膜 NMDA 受体的控制。因此推测 NMDA 受体激活引起 Ca^{2+} 内流抑制了多巴胺脱羧酶。

(3) **癫痫**: 癫痫是急性氰化物中毒的特征性临床表现。预先给予 一酮戊二酸可阻止 KCN 诱导的小鼠脑内 GABA 下降,但不能阻断惊厥发作[43]。这表明急性氰化物中毒引起惊厥并非 GABA 下降所致。而预先给予褪黑素(20 mg / kg)可显著降低 KCN 诱导的小鼠癫痫发病率及脑脂质过氧化[44]。Yamamoto[45]做进一步研究,发现钙调蛋白抑制剂可拮抗氰化物诱导的癫痫,脑室注射一氧化氮(NO)则引起剧烈的强直性癫痫。于是提出氰化物致癫痫的假说: Ca^{2+} 内流,与钙调蛋白结合,激活 NO 合成酶,生成大量的 NO 扩散入邻近神经细胞,NO 结合于鸟苷酸环化酶活性中心 Fe^{2+} ,酶活性增加,cGMP 生成增多,cGMP 作为第二信使可发挥多种生物作用。作为一种特殊的神经递质,越来越多的文献支持 NO 是氰化物诱发癫痫的媒介这一观点,但具体过程有待进一步阐明。

氰化物中枢毒作用与钙稳态失调之间的关系密切。限于细胞内 Ca^{2+} 浓度测定的水平,目前的研究主要集中在体外实验和 PC12 细胞模拟,进一步探讨氰化物中毒的作用机理,完善 CNS 中毒的钙流学说,对提高氰化物中毒防治水平和临床治疗缺氧缺血性神经疾病都有重要意义。

参考文献:

- [1]《国外医学军事医学分册》,1992 年第 9 卷第 2 期,《氰化物的中枢毒理作用》,刘勇,魏相德;
- [2]《MITOCHONDRIA: STRUCTURE, FUNCTION AND ASSEMBLY》,P. A. Whittaker, S. M. Danks, LONGMAN Inc., New York 1978;
- [3] Ferguson-Miller S., Babcock G. T. chem. Rev., 1996, 96, 2889;
- [4] Michel H., Behr J., Harrenga A. et al Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.,

- 1998, 27, 329 ;
- [5] Calhoun M.W., Thomas J.W., Gennis R.G. Trends Biochem. Sci. 1994, 19, 325 ;
- [6] 李连之, 黄仲贤, 《无机化学学报》, vol. 17, No. 6, Nov., 2001, 761-774 ;
- [7] Slater, E. C., Van Gelder, B. F., and Minnaert, K. (1965) in Oxidases and Related Redox Systems (King, T. E., Mason, H. S., and Morrison, M., eds) Vol. II, pp. 667-706, John Wiley & Sons, New York ;
- [8] Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E. et al. Science, 1995, 269, 1069;
- [9] Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E. et al. Science, 1996, 272, 1136 ;
- [10] Yoshikawa S., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R. et al. Science, 1998, 280, 1723.
- [11] Witt H., Ludwig B. J. Biol. Chem., 1997, 272, 5514.
- [12] Van Gelder B.F., Beinert H. Biochem. Biophys. Acta, 1969, 189, 1.
- [13] Palmer G., Babcock G.T., Vickery L.E. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 2206.
- [14] WH Woodruff, O Einarsdottir, RB Dyer, KA Bagley, G Palmer, SJ Atherton, RA Goldbeck, TD Dawes, and DS Kliger, Biophysics Vol. 88, pp. 2588-2592, March 1991;
- [15] Mochizuki M., Aoyama H., Shinzawa-Itoh K. et al. J. Biol. Chem., 1999, 274, 33403.
- [16] Ostermeier C., Harrenga A., Ermler U. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 10547.
- [17] Buse G., Soulmane T., Dewor M. et al. Prot. Sci. 1999, 8, 985.
- [18] Thomas J.W., Calhoun M.W., Lemieux L.J. et al. Biochemistry, 1994, 33, 13013.
- [19] Hill B.C. J. Biol. Chem., 1991, 266, 2219.
- [20] Hill B.C. J. Biol. Chem., 1994, 269, 2419.
- [21] Antal T.M., Palmer G. J. Biol. Chem., 1982, 257, 6194.
- [22] Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B. et al. Nature, 1995, 376, 660.
- [23] Greenwood C., Gibson Q.H., J. Biol. Chem., 1967, 242, 1782.
- [24] Oliveberg M., Malmstrom B.G. Biochemistry, 1991, 30, 7053.
- [25] Eftychia Pinakoulaki, Magdalini Vamvouka, and Constantinos Varotsis, J. Phys. Chem. B 2003, 107, 9865-9868.
- [26] Johnson JD. Toxicol Appl Pharmacol, 1986, 84, 464-469
- [27] Kanthasamy AG. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 126, 156-163
- [28] 吕京. 国外医学卫生分册, 1991, 6, 328-331 ;
- [29] Geenerg DA. Ann Neurol, 1987, 21, 317-320
- [30] 陈松海, 生理科学进展, 1993, 24 (1), 10-13
- [31] Murphy SN. J. Neurosci, 1987, 7, 4145-4158
- [32] Johnson JD. Toxicol Appl Pharmacol, 1987, 88, 217-224
- [33] Olney JW. Adv Neurol, 1986, 44, 857-877
- [34] Patel MN. Toxicol Appl Pharmacol, 1992, 115, 124-129
- [35] Benven H. J. Neurochem, 1984, 43, 1369-1375
- [36] Choi DW. TINS, 1988, 11(10), 465-469
- [37] Sun PW. J Pharmacol Exp Ther. 1997, 280(3), 1341-1348
- [38] Gunasekar PG. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 227(1), 150-155
- [39] Rajdev S. Neurosci, 1994, 62(3), 667-679
- [40] Ardel t BK. Toxicology, 1994, 89, 127-137
- [41] Persson SA. Fundam Appl Toxicol, 1985, 5, 150-159
- [42] Kanthasamy AG. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 126, 156-163

- [43] Yamamoto HA. *Toxicology*, 1990, 61, 221-228
- [44] Yamamoto HA. *Neurosci Lett*, 1996, 207(2), 89-92
- [45] Yamamoto HA. *Toxicology*, 1995, 95, 19-26
- [46] **Booyong S. Lim and R. H. Holm**, *Inorg. Chem.*, **37** (19), 4898 -4908, 1998.
- [47] (a) Malmstrom, B. G. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1247. (b) Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *Nature* **1992**, *356*, 301. [[ChemPort](#)][[Medline](#)] (c) Garcia-Horsman, J. A.; Barquera, B.; Rumley, J.; Ma, J.; Gennis, R. B. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 5587. (d) Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2889
- [48] Lee, S. C.; Holm, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5833, 11789.
- [49] Scott, M. J.; Zhang, H. H.; Lee, S. C.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Holm, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 568
- [50] Scott, M. J.; Goddard, C. A.; Holm, R. H. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2558
- [51] Oxo- and hydroxo-bridged systems have also been prepared by Karlin and co-workers: Fox, S.; Nanthakumar, A.; Wikstrom, M.; Karlin, K. D.; Blackburn, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 24
- [52] Kauffmann, K. E.; Goddard, C. A.; Zang, Y.; Holm, R. H.; Munck, E. *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 985