·专题交流·

乙醇、乙醛对红细胞膜ATP酶活性影响的体外实验研究

高小玲[1]，尹少甫[1]，张本忠[2]

（1. 兰州医学院微生物与免疫学教研室，甘肃 兰州 730000；2. 兰州医学院毒理学教研室，甘肃 兰州 73000）

摘要：采用钼酸铵定磷法测定不同剂量的乙醇、乙醛作用下红细胞膜 Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase 活性的变化，探讨乙醇、乙醛的细胞膜毒性及其机制。结果显示随着乙醇、乙醛剂量的增加，细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase 酶活性逐渐降低，呈现剂量-效应关系。当乙醇剂量为2 mmol/L时，各实验组与对照组比差异有显著性，而乙醛剂量为1 mmol/L时，各实验组与对照相比差异已呈现显著性。表明乙醇、乙醛对细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase 酶活性均有抑制作用。乙醛是乙醇在机体内的重要代谢产物，在研究乙醇的毒性作用及机制时乙醛的作用不容忽视。

关键词：乙醇；乙醛；红细胞膜；ATP酶活性

中图分类号：O623.411；O623.511 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2004)04－0233－03

Effect of alcohol and acetaldehyde on activities of ATPase in human erythrocyte membrane in vitro

GAO Xiao-ling[1], YIN Shao-fu[1], ZHANG Ben-zhong[2]

(1. *Department of Microbiology and Immunology, Lanzhou Medical College, Lanzhou* 730000, *China*; 2. *Department of Toxicology, Lanzhou Medical College, Lanzhou* 730000, *China*)

Abstract: The effects of alcohol and acetaldehyde on the activities of Na^+-K^+-ATPase, Mg^{2+}-ATPase and Ca^{2+}-ATPase in human erythrocyte membrane were investigated in vitro. The activities of these ATPase in the erythrocyte membrane treated with different concentrations of alcohol and acetaldehyde (0, 1, 2, 3 and 4 mmol/L) were determined using spectrophotometry. The results showed that the activities of those three kinds of ATPase decreased with the increase of alcohol and acetaldehyde doses in a reverse dose-effect pattern. At a dose of alcohol ≥2 mmol/L and of acetaldehyde ≥1 mmol/L, the activities of Na^+-K^+-ATPase, Mg^{2+}-ATPase and Ca^{2+}-ATPase were inhibited obviously, significantly different from those in the control group, indicating that alcohol and acetaldehyde could inhibit the activities of Na^+-K^+-ATPase, Mg^{2+}-ATPase and Ca^{2+}-ATPase in the erythrocyte membrane. Acetaldehyde is an important metabolite of alcohol in the bodies, therefore, it should not be ignored that the role of acetaldehyde in studying toxicity and mechanism of alcohol.

Key words: Alcohol; Acetaldehyde; Erythrocyte membrane; Activity of ATPase

外来化合物在机体内的生物转化以及毒性作用的发挥，均与细胞膜密切相关。现有的研究已证实细胞膜是乙醇毒性作用的靶位之一，干扰多种组织细胞膜钠泵的活性[1~4]；乙醇与细胞膜的相互作用可导致细胞膜生物物理特性发生改变，使脂质流动性升高[5]。乙醛是乙醇在体内乙醇脱氢酶（ADH）作用下产生的重要中间代谢产物，观察比较二者的毒性特征，对于阐明乙醇的毒理学特征和机制具有十分重要的意义。本研究应用生化毒理学方法观察乙醇、乙醛对细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase 活性的影响，探讨乙醇、乙醛的毒性及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

生物材料：人肝素抗凝血。仪器：721分光光度计（四川分析仪器厂），电热恒温水浴箱（山西省文水医疗器械厂），低温冷冻离心机(HSC-20R，中国图们)，沉淀离心机(上海医用分析仪器厂)。试剂：乙醇(分析纯，上海化学试剂厂)，乙醛(分析纯，天津化学试剂厂)，其余均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 红细胞膜的制备[6] 取人抗凝血红细胞，用预冷的生理盐水离心（3 000 r/min，10 min）洗涤3次，加入40倍体积的预冷缓冲溶液（10 mmol/L Tris-HCl，pH7.4），混匀，并反复冻溶，离心（12 000 r/min，10 min，4 ℃）3次，弃上清，乳白色沉淀即为红细胞膜，10 mmol/L Tris-HCl 稀释到蛋白含量为0.3 mg/ml，4 ℃条件下保存，备用。

1.2.2 蛋白质测定 考马斯亮蓝比色法。

1.2.3 染毒处理的红细胞膜制备 取2 ml红细胞膜悬液（蛋白含量0.1 mg/ml），加入乙醇、乙醛，使其终浓度为乙醇0、1、2、3、4 mmol/L，乙醛0、1、2、3、4 mmol/L，即成为染毒处理的红细胞膜，然后在37 ℃水浴中温育30 min。

1.2.4 Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase 酶活性测定[7] 用钼酸铵定磷法测定上述悬液ATP酶解反应释放的微

收稿日期：2003－11－17；修回日期：2004－01－07

作者简介：高小玲（19 －），女，硕士在读，工作单位甘肃省人民医院检验中心，研究方向

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

量无机磷，每小时酶活性单位为μmol/（mgprot·h）。在含有Na^+、K^+和Mg^{2+}的缓冲液中，加入ATP和酶制备，在37℃温育10min后，ATP被酶分解成ADP和无机磷（P）。以每毫克蛋白每小时新产生的P量为酶活性单位，即μmol/（Lp·mg·h）。所得结果为总ATP酶活性。缓冲液中加Na^+-K^+-ATPase的特异性抑制剂或无Na^+、K^+而只有Mg^{2+}时，所得结果为Mg^{2+}-ATPase活性。两者之差即为Na^+-K^+-ATPase。Ca^{2+}-ATPase同理。

1.3 统计分析

采用SPSS 8.0统计软件，通过t检验方法进行实验组与对照组之间的显著性分析。

2 结果

2.1 乙醇对红细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性的影响

由表1可见，红细胞膜与乙醇在37℃水浴中作用30min后，在1～4mmol/L剂量范围内随着乙醇剂量的增加，细胞膜3种膜酶活性逐渐降低，呈现剂量-效应关系。当剂量为2mmol/L时，各实验组与对照比较差异开始呈现显著性。提示乙醇对细胞膜Na^+-K^+-ATPase，Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性有抑制作用。

表1 乙醇对红细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性的影响（$\bar{x}\pm s$） μmol/（mgprot·h）

乙醇（mmol/L）	n	Na^+-K^+-ATPase	Mg^{2+}-ATPase	Ca^{2+}-ATPase
0	5	6.800±0.658	6.492±0.122	7.476±0.835
1	5	5.568±0.464	5.561±0.554	6.559±0.146
2	5	4.896±0.433*	4.804±0.151**	5.637±0.563*
3	5	3.888±0.528*	3.905±0.968**	4.395±0.514**
4	5	3.744±0.309**	3.023±0.252**	3.198±0.355**

与对照组比较 *$P<0.01$，**$P<0.05$；下同。

2.2 乙醛对红细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性的影响

由表2可见，红细胞膜与乙醛在37℃水浴中作用30min后，在1～4mmol/L剂量范围内随着乙醛剂量的增加细胞膜3种膜酶活性逐渐降低，呈现剂量-效应关系（$r_1=-0.942$，$P<0.01$；$r_2=-0.972$，$P<0.01$；$r_3=-0.962$，$P<0.01$）。乙醛剂量为1mmol/L时，各实验组与对照相比差异已呈现显著性。提示乙醛对细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性有抑制作用。

表2 乙醛对红细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性的影响（$\bar{x}\pm s$） μmol/（mgprot·h）

乙醛（mmol/L）	n	Na^+-K^+-ATPase活性	Mg^{2+}-ATPase活性	Ca^{2+}-ATPase活性
0	5	6.800±0.658	6.492±0.122	7.476±0.835
1	5	5.533±0.408*	5.207±0.655*	6.042±0.192*
2	5	4.340±0.034**	4.461±0.318**	5.288±0.309*
3	5	3.740±0.271**	3.679±0.302**	3.195±0.583**
4	5	1.800±0.360**	1.995±0.336**	2.377±0.313**

3 讨论

细胞膜的主要生理功能之一是进行物质转运，这种功能往往依赖于膜上某些结合蛋白。细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase都是细胞膜上主要的膜结合蛋白质，通过主动转运功能的发挥维持细胞膜内外电解质平衡，并在神经冲动的传递、信息传导中起着举足轻重的作用[8]。外来化合物导致的细胞膜酶活性异常改变，会干扰细胞膜的正常生理功能，进而造成细胞膜结构和功能的广泛损伤。这些可能是某些外来化合物毒性作用的重要机制。已有实验证明，细胞膜是乙醇毒性作用的重要靶部位之一。本研究发现乙醇及代谢中间产物乙醛，可以抑制细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性并呈现剂量-效应关系。乙醇在2～4mmol/L剂量范围内对细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性的抑制作用与对照组相比较差异有显著性；乙醛在1～4mmol/L剂量下对细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性的抑制作用与对照组相比较差异有显著性，作用比乙醇更强。细胞膜结合蛋白质正常功能的发挥有赖于适当的细胞膜脂质流动性。以往的研究曾发现乙醇与生物膜作用可以改变膜脂流动性。因此，推测细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性的抑制，可能与其提高膜脂质流动性的生物效应有关。乙醇有适宜的脂水分配系数，可以透过细胞膜，在细胞膜脂质中蓄积；也可能直接与膜结合蛋白的相互作用而改变细胞膜蛋白的结构，抑制其功能的发挥[9]。因此，乙醇对细胞膜Na^+-K^+-ATPase、Mg^{2+}-ATPase、Ca^{2+}-ATPase活性的抑制作用，可能是通过上述两种机制引起。乙醛虽然脂水分配系数较高，不利于通过膜脂质亲水区，但乙醛可以通过影响膜脂类或嵌入膜脂成分发生改变影响细胞膜脂质流动性进而导致细胞膜蛋白酶活性发生改变[10]。乙醛是乙醇在体内乙醇脱氢酶（ADH）作用下产生的重要中间代谢产物，观察比较二者的毒性特征，对于阐明乙醇的毒理学特征和机制具有十分重要的意义。因而，在研究乙醇的毒性作用及机制时乙醛的作用不容忽视。

参考文献：

[1] 张也联，符云峰，王桂兰，等. 乙醇对大鼠不同组织细胞膜钠泵活性的影响[J]. 中国药理学通报，1992，8（4）：306-308.

[2] Green RJ, Baron DN. The acute in vitro effect of ethanol. Its metablolites and other alcohols on ion flux in human leucocytes and erythrocytes [J]. Biochem Pharmacol, 1986, 35: 3457-3464.

[3] Tuma DJ, Mailliard ME, Casey CA, et al. Ethanol-induced alterations of plasma membrane assembly in the liver [J]. Biochem Biophys Acta, 1986, 856: 571-577.

[4] Polimeni PI, Otten MD, Hoeschem LE. In vivo effect of ethanol on the rat myocardium: evidence for a reversible, non-specific increase in sarcolemmal permeability [J]. J Mol Cell, 1983, 15: 113-122.

[5] 屈卫东，张本忠，吴德生，等. 乙醇和乙醛对培养大鼠胚胎卵黄囊细胞膜脂质流动性的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2000，14（1）：45-48.

[6] Okuda K, Huxtle RJ, Lenhardt ML, et al. Proteolytic digestion of red

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cell ghosts: Evidence for two ghost populations differing in susceptibility to proteolysis [J]. J Biochem, 1972, 71: 333.

[7] Reinila M, MacDonald E, Salem NJ, et al. Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatase [J]. Analytic Biochem, 1982, 124: 19-22.

[8] 孟东升, 刘志中. 酒精对神经系统发育的影响 [J]. 国外医学神经病学神经外科分册, 1996, 23 (2): 89-92.

[9] Clin JH, Goldstein DB. Drug tolerance in biomembrane: a spin label study of the effects of ethanol[J]. J Science, 1979, 196(4): 684-687.

[10] Tuma DJ, Donohue TM, Medina VA, et al. Enhancement of acetaldehyde-protein adduct formation by LL-ascorbate [J]. J Arch Biochem Biophys, 1984, 234 (2): 377-381.

联苯菊酯原药致突变性实验研究

姜 红, 徐 颖, 左派欣, 袁树华, 扬 卫超

(河北省疾病预防与控制中心, 河北 石家庄 050041)

摘要: 用昆明种小鼠经口灌胃染毒, 骨髓微核实验的剂量分别为12、6、3、0.6 mg/kg, 精子畸变实验的剂量分别为30、15、7.5、3.8 mg/kg, 分别取胸骨、副睾组织, 常规制片, 镜下观察。鼠伤寒沙门氏菌回复突变 (Ames) 实验采用平板掺入法, 剂量分别为0.1、0.5、1.5、4.5 mg/皿。小鼠骨髓微核、精子畸变实验显示: 联苯菊酯原药染毒组与阴性对照组相比, 差异无显著性 ($P>0.05$); Ames实验显示各菌株的各剂量组的回变菌落数均未超过自发回变菌落数的2倍。在本实验条件下, 未发现联苯菊酯原药的致突变性。

关键词: 农药; 联苯菊酯; 致突变性

中图分类号: R139.3; O625.13 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)04-0235-02

Experimental studies on mutagenicity of raw bifenthrin

JIANG Hong, XU Ying, ZUO Pai-xin, YUAN Shu-hua, YANG Wei-chao

(*Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang* 050041, *China*)

Abstract: Kunming mice were gavaged with raw bifenthrin at doses of 12, 6, 3 and 0.6 mg/kg for micronucleus test of bone marrow and 30, 15, 7.5 and 3.8 mg/kg for morphology of sperm, respectively. The sternum and epididymis were excised from the mice and prepared regularly for sections, and micronucleus of bone marrow and morphology of sperm were observed under microscope. Ames test for *Salmonella typhimurium* back mutation with microsome plate assay were used at doses of 0.1, 0.5, 1.5 and 4.5 mg/plate. There was no significant difference in micronucleus test of bone marrow and morphology of sperm between the mice exposed to bifenthrin and the control ones ($P<0.05$). Results of Ames test showed that number of colony with back mutation (revertants) in varied strains of *Salmonella typhimurium* at different doses did not exceed the double of the number of those with spontaneous mutation. No mutagenic effect of raw bifenthrin was found in this study.

Key words: Pesticide; Bifenthrin; Mutagenicity

联苯菊酯, 又称天王星、虫螨灵、毕芬宁, 化学名称为3-(2-氯-3, 3, 3-三氟丙烯-1-基)-2, 2-二甲基环丙烷羧酸-2-甲基-3-苯基苄基酯, 有效成分90%~96%, 属拟除虫菊酯类杀虫、杀螨剂, 具有触杀及胃毒作用, 有报道在实验剂量下对动物无致突变性[1]。为探讨其潜在的遗传危害, 保护环境及人体健康, 本实验室受农药生产厂委托, 以小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验、小鼠精子畸形实验、鼠伤寒沙门氏菌回复突变 (Ames) 实验对其进行了致突变性实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明种小鼠, 体重25~30 g, 河北试验动物中心提供。菌种TA97、TA98、TA100和TA102, 由中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所提供, 经生物学鉴定符合实验要求。联苯菊酯原药由河北省某农药厂提供, 纯度93.9%, 实验时用植物油配制。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验 健康小鼠60只, 雌雄各半, 按体重随机分为6组, 每组10只。其中实验组分为染毒12、6、3、0.6 mg/kg 4个剂量组, 相当于经口 LD_{50} 的1/5、1/10、1/20、1/100。阴性对照组用植物油等体积灌胃, 阳性对照组小鼠腹腔注射环磷酰胺 (CP) 50 mg/kg。实验小鼠每日经口染毒1次, 连续2 d, 第2次染毒后6 h处死动物, 取胸骨骨髓制片[2], Giemsa染色, 油镜下每只动物镜检1 000个嗜多染红细胞, 计算微核率。

1.2.2 小鼠精子畸形实验 健康雄性小鼠30只, 按体重随机分为6组, 每组5只。其中实验组分为染毒30、15、7.5、3.8 mg/kg 4个剂量组, 相当于经口 LD_{50} 的1/2、1/4、1/8、1/16。阴性对照组用植物油等体积灌胃, 阳性对照组小鼠腹腔注射环磷酰胺 (CP) 50 mg/kg。实验小鼠每日经口染毒1次, 连续

收稿日期: 2003-10-24; 修回日期: 2003-12-01

作者简介: 姜红 (1963-), 女, 副主任医师, 主要从事化学品毒性鉴定工作。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net