

## 对硫磷与对氧磷抑制的人脑乙酰胆碱酯酶的老化及重活化

李劲彤<sup>1\*</sup>, 张雨<sup>2</sup>, 杜先林<sup>1</sup>, 孙曼霁<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 中国人民解放军三〇七医院, 北京 100850)

**摘要:**目的 了解对硫磷与对氧磷在试管内对人脑乙酰胆碱酯酶(AChE)的抑制, 磷酰化酶的老化速率及肟类药物的重活化效能有何差别。方法 微量羟胺比色法测定 AChE 活性。结果 对硫磷与对氧磷抑制人脑 AChE 50%活性的摩尔浓度的负对数值( $pI_{50}$ )分别为 4.10 及 7.51, 抑制人脑 AChE 90%活性的摩尔浓度的负对数值( $pI_{90}$ )值分别为 2.55 及 6.57。氯磷定、双复磷、双磷定和酰胺磷定 4 种重活化剂对对硫磷与对氧磷抑制的人脑 AChE 的重活化作用有较大差异, 等摩尔浓度条件下, 其对对氧磷的重活化作用普遍好于对硫磷。且双肟类重活化剂作用普遍强于单肟类重活化剂; 对硫磷与对氧磷的最佳重活化剂均为双复磷。对硫磷与对氧磷人脑 AChE 磷酰化酶的半老化时间( $t_{0.5}$ )分别为 14 及 12 h, 老化达到 99%的时间( $t_{0.99}$ )分别为 95 及 81 h。结论 对硫磷或对氧磷中毒时应尽早使用双复磷或双磷定。且在急性中毒症状控制后, 仍须连续使用重活化剂 4 d。

**关键词:**有机磷化合物; 乙酰胆碱酯酶; 肟类; 重活化; 老化

中图分类号: R994.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)02-0143-04

对硫磷(parathion)与对氧磷(paraoxon)是广泛使用的有机磷农药, 对氧磷(含 P=O 键)是对硫磷(含 P=S 键)的氧化脱硫衍生物, 以往的研究已证实, 对硫磷进入机体后在细胞色素 P450 催化下转化为对氧磷而发挥更强的抑制乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的能力<sup>[1]</sup>。国内外对对硫磷与

对氧磷的生化毒理学已有相当多的研究, 但结果多为实验动物上得到的, 外推至人存在种属差异问题。人脑富含 AChE, 并且是有机磷农药中毒后的重要靶器官。因此, 作者采用人脑 AChE 作酶原对比研究对硫磷与对氧磷在试管内对 AChE 的抑制、重活化及老化特点, 以期对其中毒后临床救治中选择重活化剂的种类与使用时机有所参考。

### 1 材料

#### 1.1 材料

人脑组织为交通事故死亡后 24 h 以内男性尸体的小脑(来自北京市法医鉴定所法医鉴定后的废弃材料)。除去血污, 以  $0.07 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)研磨成 1/4 (W/V) 匀浆, 冻存在  $-20^\circ\text{C}$  冰箱备用。

#### 1.2 试剂

对硫磷纯度 97.4%, 对氧磷纯度 94.7%, 氯解磷定(pralidoxime chloride, 2-PAM)、双磷定(trimedoxime, TMB<sub>4</sub>)、双复磷(obidoxime chloride, LüH<sub>6</sub>)和酰胺磷定(pyramidoxime, HI-6)均由毒物药物研究所提供。溴化乙酰胆碱(ACh·Br)为北京化工厂产品。

#### 1.3 仪器

Bio-Rad 550 型酶标仪, Bio-Rad 公司; 高速台式离心机, 上海华亭医疗器械厂; 高速分散器, 江苏其林医用仪器厂; 电热恒温水浴箱, 北京西城区医用仪器厂。

#### 1.4 统计学处理

实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SAS 软件包中  $2 \times 4$  析因分析方法作统计学处理。

## 2 方法和结果

### 2.1 微量羟胺比色法测定乙酰胆碱酯酶活性<sup>[2]</sup>

取不同量人脑匀浆加 PBS 至  $50 \mu\text{L}$ , 加  $0.014 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)  $50 \mu\text{L}$ 。  $37^\circ\text{C}$  水浴

收稿日期: 2001-10-10 接受日期: 2001-11-28

作者简介: 李劲彤(1971-), 男, 甘肃省兰州市人, 博士, 助理研究员, 主要从事毒物药物代谢研究。

\* 联系作者 Tel: (010)66874610, Fax: (010)68211656, E-mail: lijintong@163.net

孵温 30 min, 然后加碱性羟胺 200  $\mu\text{L}$  终止反应。再加 2 mol·L<sup>-1</sup> HCl 200  $\mu\text{L}$  及 5.33% FeCl<sub>3</sub> 溶液 300  $\mu\text{L}$  显色。离心 (10 000 × g, 30 min), 取上清液 300  $\mu\text{L}$  于 490 nm 波长处比色测定吸光度值。按下列公式计算酶活性:

AChE 活性 ( $\mu\text{mol ACh}\cdot\text{h}^{-1}$ ) = (非酶水解管吸光度 - 样品管吸光度) × 1.4 / 标准管吸光度

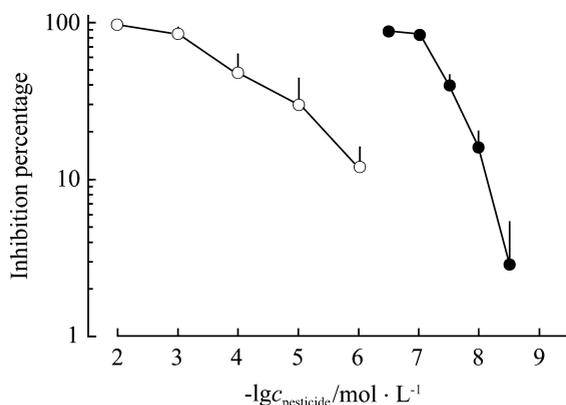
酶用量-酶活性曲线表明 1:4 (W/V) 人脑匀浆在 3~15  $\mu\text{L}$  范围内与酶活性呈直线关系为一级反应。

### 2.2 对硫磷及对氧磷对人脑乙酰胆碱酯酶活性的抑制作用

取 1:4 (W/V) 人脑匀浆 15  $\mu\text{L}$ , 加 PBS 25  $\mu\text{L}$ , 再加不同浓度对硫磷或对氧磷 10  $\mu\text{L}$  37°C 孵温 10 min 后, 加 0.014 mol·L<sup>-1</sup> ACh 50  $\mu\text{L}$ , 在 37°C 继续孵温 30 min。用微量羟胺比色法测量残余酶活性。酶抑制率按下列公式计算:

$$\text{AChE 抑制率}(\%) = \frac{\text{正常管酶活性} - \text{中毒管酶活性}}{\text{正常管酶活性}} \times 100\%$$

以不同浓度对硫磷与对氧磷浓度的负对数对人脑 AChE 抑制百分率的对数作图, 求出两个对硫磷或对氧磷抑制 AChE 的量效曲线 (图 1)。



**Fig 1. Inhibition of human brain acetylcholinesterase (AChE) activity by parathion or paraoxon.** (○) parathion, (●) paraoxon. Normal AChE activity: (0.84 ± 0.04)  $\mu\text{mol ACh}\cdot\text{h}^{-1}$  for parathion group, (0.85 ± 0.03)  $\mu\text{mol ACh}\cdot\text{h}^{-1}$  for paraoxon group.  $\bar{x} \pm s$ , n = 3.

用 Logit 法计算出对硫磷和对氧磷抑制人脑 AChE 的 pI<sub>50</sub> 值分别为 4.10 及 7.51, 二者的 pI<sub>90</sub> 值分别为 2.55 及 6.57。结果表明, 对氧磷抑制人脑 AChE 能力较对硫磷高 3~4 个数量级。

### 2.3 重活化剂对对硫磷和对氧磷抑制的人脑乙酰胆碱酯酶的重活化作用

取 1:4 (W/V) 人脑匀浆 15  $\mu\text{L}$ , 加 PBS 15  $\mu\text{L}$ , 再加 PBS 稀释的对硫磷或对氧磷溶液 10  $\mu\text{L}$  (反应终浓度: 对硫磷 3.16 mmol·L<sup>-1</sup>, 对氧磷 0.316  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 37°C 孵温 10 min, 而后分别加入 10  $\mu\text{L}$  肟类药物 2-PAM、HI-6、TMB<sub>4</sub> 及 LüH<sub>6</sub> (反应终浓度为 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>), 37°C 再孵温 30 min, 加 0.014 mol·L<sup>-1</sup> 的 ACh 50  $\mu\text{L}$ 。37°C 水浴孵温 30 min, 余步骤同 2.1, 用微量羟胺比色法测 AChE 活性。实验设有正常酶活性、中毒酶活性、正常酶加重活化剂 3 种对照管。重活化率按下列公式计算:

$$\text{重活化率}(\%) = \frac{\text{EIR} \times \text{E} \div \text{ER} - \text{ER}}{\text{E} - \text{EI}} \times 100\%$$

式中: E 为正常酶活性; EI 为中毒酶活性; EIR 为中毒酶重活化后活性; ER 为正常酶加重活化剂后活性。

4 种重活化剂对对硫磷和对氧磷抑制的人脑 AChE 的重活化作用结果见表 1。

**Tab 1. Reactivation of parathion and paraoxon-inhibited human brain acetylcholinesterase by oximes**

Reactivator / mmol·L <sup>-1</sup>		Reactivation / %	
		Parathion	Paraoxon
2-PAM	0.1	20 ± 5	63 ± 5 □□
HI-6	0.1	25 ± 7	42 ± 6 □
TMB <sub>4</sub>	0.1	36 ± 8 *	92 ± 10 △△▲▲□□
LüH <sub>6</sub>	0.1	38 ± 4 * #	96 ± 8 △△▲▲□□

Inhibition concentration: parathion, 3.16 mmol·L<sup>-1</sup>; paraoxon, 0.316 mmol·L<sup>-1</sup>, incubated at 37°C for 10 min. Normal AChE activity: (0.850 ± 0.022)  $\mu\text{mol ACh}\cdot\text{h}^{-1}$ . Intoxicated AChE activity: (0.054 ± 0.006)  $\mu\text{mol ACh}\cdot\text{h}^{-1}$  for parathion treatment, (0.074 ± 0.016)  $\mu\text{mol ACh}\cdot\text{h}^{-1}$  for paraoxon treatment.  $\bar{x} \pm s$ , n = 3. \* P < 0.05, compared with 2-PAM in parathion treatment; # P < 0.05, compared with HI-6 in parathion treatment; △△ P < 0.01, compared with 2-PAM in paraoxon treatment; ▲▲ P < 0.01, compared with HI-6 in paraoxon treatment. □ P < 0.05, □□ P < 0.01, compared with corresponding parathion treatment.

结果表明, 4 种重活化剂对对氧磷抑制的人脑 AChE 的重活化率显著高于对对硫磷的重活化率, 双肟类重活化剂的重活化效果普遍好于单肟类重活化剂。

### 2.4 老化作用

取 1:4 (W/V) 人脑匀浆 300  $\mu\text{L}$ , 加 PBS 300  $\mu\text{L}$ ,

再加 PBS 稀释的对硫磷或对氧磷溶液 200  $\mu\text{L}$  (反应终浓度: 对硫磷  $3.16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对氧磷  $0.316 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $37^\circ\text{C}$  孵温 10 min 后, 每隔一定时间间隔取出 40  $\mu\text{L}$ , 加终浓度  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  LiH<sub>6</sub> 10  $\mu\text{L}$ ,  $37^\circ\text{C}$  再孵温 30 min, 加  $0.014 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 ACh 50  $\mu\text{L}$ 。  $37^\circ\text{C}$  水浴孵温 30 min, 余步骤同 2.1, 用微量羟胺比色法测酶活性, 求出重活化率。以肟类药物重活化率的对数对时间作图, 可得磷酰化酶的老化曲线(图 2)。

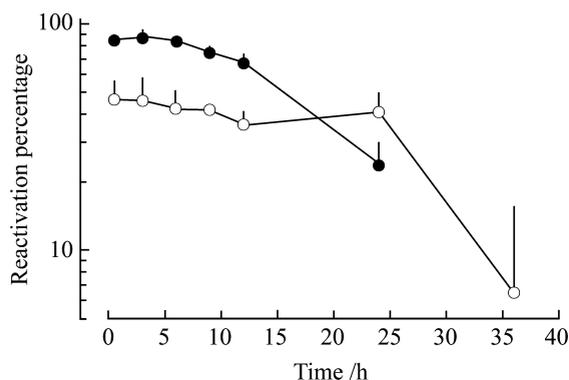


Fig 2. Time course of aging of parathion or paraoxon inhibited-human brain acetylcholinesterase. (○) parathion, (●) paraoxon.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ .

曲线的斜率即为抑制 AChE 的老化常数  $k_{\text{aging}}$ , 按公式:  $t_{0.5} = 0.693/k_{\text{aging}}$  及  $t_{0.99} = 4.605/k_{\text{aging}}$  可求出半老化时间( $t_{0.5}$ )和老化率达到 99% 所需要的时间( $t_{0.99}$ )。对硫磷与对氧磷的最佳重活化剂均为 LiH<sub>6</sub>(表 1)。采用 LiH<sub>6</sub> 为重活化剂时, 测得对硫磷与对氧磷抑制的人脑 AChE 老化反应的  $t_{0.5}$  分别为 14 及 12 h,  $t_{0.99}$  分别为 95 及 81 h, 对硫磷抑制的人脑 AChE 的老化速度比对氧磷稍慢。

### 3 讨论

有机磷农药的毒性大小主要取决于其抑制 AChE 能力的强弱, 农药分子一般有 2 个烷基和 1 个离开基团(leaving group), 离开基团通常是 1 个烷基或杂环, 它与磷原子之间连接不稳定, 易水解, 这种不稳定性决定抑制 AChE 能力的强弱, 含 P=O 有机磷农药普遍比含 P=S 的有机磷农药抑制 AChE 能力强<sup>[3]</sup>, 因为 O 比 S 吸电子效应强, 使离开基团更不稳定。本实验显示, 对氧磷较对硫磷抑制人脑

AChE 能力约强万倍, 符合这个规律。对硫磷可在体内经细胞色素 P450 催化生成对氧磷而发挥更强的抑酶作用<sup>[1]</sup>; 对氧磷虽然抑酶能力强, 但 4 种重活化剂对对氧磷磷酰化酶的重活化率(42% ~ 96%)明显高于对对硫磷磷酰化酶的重活化率(18% ~ 38%), 这是因为肟类药物是亲核试剂, 其重活化速率受磷原子上取代基的影响, O 比 S 吸电子效应强, 所以对氧磷磷酰化酶较对硫磷磷酰化酶的亲电子性高, 易被肟类药物亲核攻击, 重活化率就高。双肟类药物对对氧磷与对硫磷抑制的人脑 AChE 都有较高的重活化率, 比 2-PAM 及 HI-6 好, 这是因为双肟类药物分子中有 2 个阳离子中心, 增强了与磷酰化酶的结合能力, 重活化作用相对较好, 故临床上急救应采用双肟类重活化剂为佳。

老化是指磷酰化酶脱去烷基而不能被重活化剂重活化的一种现象, 它影响肟类药物对有机磷农药抑制的 AChE 的重活化效果, 由于发生老化, 有机磷农药(毒剂)中毒后难以救治。对硫磷和对氧磷酰化人脑 AChE 的完全老化需时约 4 d, 故中毒病人应反复使用双肟类重活化剂。当前有机磷农药中毒后使用肟类化合物的时间一般是 1 ~ 2 d<sup>[4]</sup>, 显然太短。此外, 有机磷农药进入机体后可分布到组织器官中, 形成“贮存库”, 这些组织中的有机磷农药不断释放到血中, 可使 AChE 受到再抑制<sup>[5]</sup>。以上结果提示: ①急救时应尽早使用重活化剂, 最好是双肟类重活化剂; ②当急性毒性症状得到控制后, 仍须重复使用重活化剂直至中毒症状得到彻底缓解。重复给予双肟类药物可有效地重活化再次被抑制而未出现老化的磷酰化酶, 加速患者的恢复; 此外, 肟类药物还能直接水解有机磷农药, 使之转变为无毒产物<sup>[6]</sup>, 有抗惊厥及恢复被抑制的神经肌肉传递功能等作用<sup>[7]</sup>。

### 4 参考文献:

- [1] Zhang HX, Sultatos LG. Biotransformation of the organophosphorus insecticides parathion and methyl parathion in male and female rat liver perfused *in situ* [J]. *Drug Metab Dispos*, 1991, **19**(2):473 - 477.
- [2] Li FZ, Sun MC. Microcolorimetric assay of cholinesterase activity [J]. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 1986, **10**(3):211 - 214.
- [3] Chen RY, Liu LZ. *Chemistry of Organophosphorus Pesticide* (有机磷农药化学) [M]. Shanghai: Shanghai Science

- and Techonology Press, 1995. 1 - 3.
- [4] De-Kort WL, Kiestra SH, Sangster B. The use of atropine and oximes in organophosphate intoxications: a modified approach[J]. *J Toxicol Clin Toxicol*, 1988, **26**(3 - 4): 199 - 208.
- [5] Jokanovic M, Maksimovic M. A comparison of trime-doxime, obidoxime, pralidoxime, and HI-6 in the treatment of oral organophosphorus insecticide poisoning in the rat [J]. *Arch Toxicol*, 1995, **70**(2):119 - 123.
- [6] Karalliedde L, Senanayake N. Organophosphorus insecticide poisoning[J]. *Br J Anaesth*, 1989, **63**(6):736 - 750.
- [7] van-Helden HP, de-Lange J, Busker RW, Melchers BP. Therapy of organophosphate poisoning in the rat by direct effects of oximes unrelated to ChE reactivation[J]. *Arch Toxicol*, 1991, **65**(7):586 - 593.

## Reactivation and aging of parathion- and paraoxon-inhibited human brain acetylcholinesterase *in vitro*

LI Jin-Tong<sup>1</sup>, ZHANG Yu<sup>2</sup>, DU Xian-Lin<sup>1</sup>, SUN Man-Ji<sup>1</sup>

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. 307 Hospital of PLA, Beijing 100850, China)

**Abstract:** **AIM** To explore the differences in reactivation and aging of phosphorylated human brain AChE caused by parathion or paraoxon *in vitro*. **METHODS** Micro-spectrophotometric assay was used to determine the activity of AChE. **RESULTS** The  $pI_{50}$ 's inhibition of the human brain acetylcholinesterase (AChE) by parathion and paraoxon was 4.10 and 7.51, whereas the  $pI_{90}$ 's was 2.55 and 6.57, respectively. Efficacies of reactivation of parathion or paraoxon-inhibited human brain AChE by pralidoxime chloride (2-PAM), pyramidoxime(HI-6), obidoxime chloride(LüH<sub>6</sub>) and trimedoxime(TMB<sub>4</sub>) were obviously different. On the equivalent molar basis, the potency of LüH<sub>6</sub> and TMB<sub>4</sub> was higher in reactivation of the inhibited human brain AChE than that of 2-PAM and HI-6. The four oxime reactiva-

tors were more effective in reactivation of the paraoxon-inhibited human brain AChE than its parathion counterpart. The optimal reactivator for parathion- and paraoxon-AChE was LüH<sub>6</sub>. The half aging time( $t_{0.5}$ ) of parathion- and paraoxon-AChE was 14 and 12 h, and the 99% aging time( $t_{0.99}$ ) was 95 and 81 h, respectively. **CONCLUSION** Obidoxime or trimedoxime should be used with atropine at the earliest time in the therapy of intoxication of parathion and paraoxon. Even when the acute symptoms have been well controlled, the reactivator should be consecutively used within four days.

**Key words:** organophosphorus compounds; acetylcholinesterase; oxime; reactivation; aging

(本文编辑 石 涛)