

· 药理实验与临床观察 ·

粉防己碱对有机磷酸酯抑制的胆碱酯酶活性的影响

熊玉卿,傅 军,刘汉清*,李艳艳

(江西医学院临床药理研究所,江西南昌 330006)

摘要:目的 研究粉防己碱(Tet)对有机磷酸酯抑制的胆碱酯酶(ChE)活性的影响。方法 采用 Ellman's 比色法测定人血 ChE 活性作为观察指标。结果 Tet 使敌百虫抑制的 ChE 活性量效曲线右移,最大抑制反应明显压低;0.4、0.8、1.6 μ g/mL Tet 的最大复活效应分别为 20.5%、38.3% 和 80.2% ($P < 0.05$);Tet 与氯磷定(PAM-Cl)活化被抑制酶的 EC_{50} 分别为 0.69 和 2.01 μ g/mL。结论 提示 Tet 是被抑制的 ChE 复活剂。

关键词: 粉防己碱;敌百虫;胆碱酯酶;重活化剂

中图分类号: R286.93

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)03-0236-03

Influence of tetrandrine on activity of cholinesterase inhibited by organophosphate

XIONG Yu-qing, FU Jun, LIU Han-qing, LI Yan-yan

(Institute of Clinical Pharmacology, Jiangxi Medical College, Nanchang Jiangxi 330006, China)

Abstract **Object** To observe the effect of tetrandrine (Tet) on the activity of cholinesterase (ChE) inhibited by organophosphate. **Methods** Activity of ChE in human blood was determined with Ellman's method and used as an index. **Results** The cumulative dose-effect curves for inhibitory effect of dipterex on ChE were shifted to right and the maximal inhibitory effect of dipterex was obviously declined by Tet. The maximal reactivating rates of inhibited ChE were 20.5%, 38.3% and 80.2% when the concentrations of Tet were 0.4, 0.8 and 1.6 μ g/mL ($P < 0.05$), respectively. The EC_{50} values of Tet and PAM-Cl for re-activation of ChE were 0.69 and 2.01 μ g/mL, respectively. **Conclusion** It was suggested that Tet is a re-activator of ChE inhibited by organophosphate.

Key words tetrandrine (Tet); dipterex; cholinesterase; reactivator

粉防己为防己科千金藤属植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的茎根,具有祛风除湿、利尿消肿、行气止痛等多种功效,粉防己碱(tetrandrine, Tet)——一种双苄异喹啉类生物碱为其有效成分之一^[1]。Tet 是一种有效的钙拮抗剂^[2],可拮抗钙调蛋白,抑制依赖钙的 Ca^{2+} -Mg²⁺-ATP 酶^[3],有着广泛的心血管效应和保护脑、血、肝细胞的作用^[4,5]。本课题组发现 Tet 可对抗有机磷中毒^[6],为研究其机制是否与被抑制的胆碱酯酶(ChE)重活化有关,我们以有机磷酸酯农药——敌百虫为抑制剂,观察了 Tet 对有机磷酸酯抑制的 ChE 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂:敌百虫:结晶固体,浙江兰溪农药厂,用生理盐水溶解配成 6% 溶液备用。Tet 原粉,浙江

金华制药厂,因不溶于水,用 0.1 mol/L 盐酸溶解成 4% 溶液。氯磷定:氯磷定注射液,上海淮海制药厂(Pyraloxime Methylchloride, PAM-Cl)。0.01 mol/L DTNB 溶液:按 Dale^[7]的方法配制, -4℃ 保存。二巯基双硝基苯甲酸(dithirbisnitrobenzoic acid, DTNB) Sigma 产品。0.05 mol/L ATCh 贮存液:按 Dale^[7]的方法配制, -4℃ 保存。碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCh) Sigma 产品。DTNB 溶液 1.0 mL 与 0.1 mol/L PBS (pH=8.0) 30 mL 混合为 R₁液,临用前配制;ATCh 贮存液 1.0 mL,临用前用无离子水稀释 10 倍为 R₂液。

1.2 酶溶液的制备:将肝素抗凝的人血经 3 000 r/min 离心 20 min,吸取血浆, -4℃ 保存,作为假性胆碱酯酶(BChE)溶液备用。下层的红细胞沉淀

* 收稿日期: 2001-06-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 39760082)

作者简介:熊玉卿(1956-),女,江西南昌人,硕士,教授,1999年同济医科大学药理学博士研究生,以药物作用机制、药动学及药物代谢为主要研究方向。 Tel: 0791-6360654 6361114 Fax: 0791-6360654

* 联系人 江西医学院生理学教研室

加 10 倍体积 4°C 预冷生理盐水充分洗涤后 $3\,000\text{ r/min}$ 离心 20 min , 弃上清液, 重复洗涤 1 次后制成 50% 混悬液, 贮于 4°C 冰箱, 2 d 内用无离子水稀释 50 倍, 制成溶血液供测定真性胆碱酯酶 (AChE) 活性用。

1.3 仪器: Analy Tech-738 型半自动生化分析仪 (上海安泰); Nichipet Digital Micropipette $1\sim 20\text{ }\mu\text{L}$ $20\sim 200\text{ }\mu\text{L}$ 微量取样器 (日本 Nichipyo); Stata 统计软件包 (美国计算机资源中心研制)。

1.4 ChE 活性测定: 采用 Ellman 等的 DTNB 比色法^[8], 生化分析仪上的主要分析参数: 波长 410 nm , 样品用量 $20\text{ }\mu\text{L}$; R_1 $500\text{ }\mu\text{L}$, R_2 $50\text{ }\mu\text{L}$, 间隔时间 60 s , 延迟时间 20 s , 读数时间 20 s , 酶活性以在 37°C 、 $\text{pH } 8.0$ 和底物终浓度为 0.5 mmol/L 时单位体积 (mL) 样品中 ChE 每分钟水解 ATCh 为一个活性单位

$$\text{ChE 活性 (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 22\,200$$

1.5 实验方法: 取 350 支试管分成 10 组, 每组 35 管, 其中溶血液 AChE 测定 7 组: 敌百虫、Tet-3、PAM-Cl-3 组。血浆 BChE 测定则各选择 Tet-3 和 PAM-Cl-3 组与敌百虫血浆组作对照试验。每一试管加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 血浆或溶血液, 以不同浓度敌百虫作用 0.5 h 后, 按表 1 步骤加药处理 (“+”为加入对应药, 每点重复 5 次)

表 1 操作步骤

敌百虫 ($\mu\text{g/mL}$)	Tet ($\mu\text{g/mL}$)			PAM-Cl ($\mu\text{g/mL}$)		
	0.4 (1组)	0.8 (2组)	1.6 (3组)	1.0 (1组)	2.0 (2组)	4.0 (3组)
0.1	+	+	+	+	+	+
0.3	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+

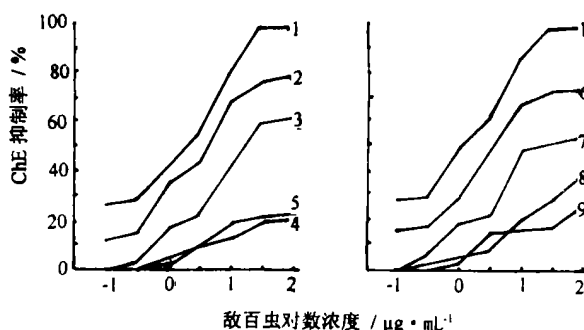
各药作用 0.5 h 后取样测定 ChE 活力, 计算均数和标准差。以敌百虫对数浓度为横坐标, ChE 抑制百分率为纵坐标, 绘制敌百虫量-效曲线。分别观察 Tet 和 PAM-Cl 对有机磷酸酯抑制 AChE 量-效曲线的影响。当敌百虫达到最大抑制效应时 (即敌百虫最大浓度), 用加入复活剂所得的 ChE 抑制百分率减去未加复活剂 ChE 的抑制百分率得出最大复活效应, 以评价各药的复活强度。

2 结果

2.1 Tet 对有机磷酸酯抑制 ChE 量-效曲线的影响: 敌百虫 ($0.1\sim 100.0\text{ }\mu\text{g/mL}$) 加入溶血液中明

显抑制 AChE 活性, 其抑制 AChE 效应与剂量呈正相关, 最大抑制率接近 100% 。经不同剂量的 Tet 作用后敌百虫抑制 AChE 量-效曲线发生右移, 最大抑制反应明显压低 (图 1-A)。 $0.4, 0.8, 1.6\text{ }\mu\text{g/mL}$ 组 Tet 的最大复活效应分别为 $20.5\%、38.3\%、80.2\%$ ($P < 0.05$)。对照药 PAM-Cl 也出现量-效曲线右移和最大抑制效应明显降低 (图 1-B)。对于血浆 BChE $1.6\text{ }\mu\text{g/mL}$ Tet 也有同样的重活化作用, 其对被抑制的 BChE 和 AChE 最大复活反应分别为 80.2% 和 78.2% , 敌百虫 ($0.1\sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$) 抑制各点复活强度 AChE 和 BChE 也十分相似 (图 1), 可见测定 BChE 能反映 AChE 的活力水平。

本实验另设盐酸溶液对照试验, 结果表明 0.1 mol/L 盐酸液对敌百虫抑制的 ChE 活力无影响



1-敌百虫 2-Tet $0.4\text{ }\mu\text{g/mL}$ 3-Tet $0.8\text{ }\mu\text{g/mL}$ 4-Tet $1.6\text{ }\mu\text{g/mL}$ (溶血液 AChE) 5-Tet $1.6\text{ }\mu\text{g/mL}$ (血浆 BChE) 6-PAM-Cl $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 7-PAM-Cl $2.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 8-PAM-Cl $4.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ (溶血液 AChE) 9-PAM-Cl $4.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ (血浆 BChE)

图 1 敌百虫抑制 ChE 量-效曲线

2.2 Tet 与 PAM-Cl 复活 ChE 效应强度的比较: Tet-3 和 PAM-Cl-3 对 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 敌百虫抑制 AChE 的复活效应百分比分别为 60.7% 和 57.9% , 两者相比差异显著 ($P < 0.05$)。运用 Scatchard 法求出 Tet 和 PAM-Cl 复活 ChE 活性的 50% 所需药物浓度 (EC_{50})。计算所得 Tet EC_{50} 为 $0.69\text{ }\mu\text{g/mL}$, 而 PAM-Cl 则为 $2.01\text{ }\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$), Tet 重活化 ChE 作用比 PAM-Cl 强 2.9 倍。

3 讨论

主要存在于人和大多数动物的神经组织和红细胞液的 ChE 称为 AChE。该酶催化神经末梢释放出的 ACh 水解, 从而保证了胆碱神经正常的生理功能。有机磷酸酯是 AChE 和 BChE 强烈的抑制剂, 它能以高亲和力形式抑制体内的 ChE, 生成磷酸化酶, 从而造成 ACh 大量堆积, 引起胆碱能神经功能紊乱。因此, AChE 活性抑制是有机磷农药和神经性毒剂中毒的重要诊断依据^[9]。研究表明, 离体或在体

有机磷酸酯中毒试验后 ChE 活力抑制效应是基本一致的^[10],因此采用离体实验方法初步研究新的解毒药物的复活作用是有意义的

Tet 对有机磷酸酯抑制的胆碱酯酶的重活化作用尚未见报道。本研究采用体外实验方法以血浆 BChE 和红细胞 AChE 为酶源,以敌百虫为抑制剂,证实 Tet 是受抑制的胆碱酯酶复活剂。它对已抑制的 ChE 活力具有强大的重活化作用,随着剂量的加大, Tet 的作用不断增强,各组间最大复活效应的显著性差异表明了这种呈正比的量效关系。对同等量抑制的 AChE 起 50% 活化效应时所需 Tet 与 PAM-Cl 的量相差近 3 倍。可见, Tet 比经典的 ChE 复能剂 PAM-Cl 重活化 AChE 作用更强, EC₅₀ 分别为 0.69 和 2.01 μ g/mL。

有机磷中毒治疗的关键在于早期、足量地使用 AChE 复活剂。现行的复活剂主要为肟类化合物。临床使用过程中,存在许多不能解决的问题。即使是阿托品与氯磷定的最佳剂量也只能使丙氟磷中毒小鼠的 LD₅₀ 提高 45%^[11]。因此,在治疗中引入新的药物和新的机制是很有必要的。Tet 作为复活剂在本实验中已表现出良好重活化 ChE 的量效关系, Tet 解毒的机制可能是在磷酸化酶完全老化前将磷酸基从中毒酶上解离使其复活,对此尚需作进一步的探讨。我们在试验中还发现, Tet 与 ChE 的结合并不十分

牢固,可用 PBS 洗脱,这似提示 Tet 形成的药物-中毒酶复合物可解离并重新起活化作用。

参考文献:

- [1] Chen K, Chen A L. The alkaloids of Han-Fang-Chi [J]. J Biol Chem, 1985, 109(2): 681-684.
- [2] Fan D C, Jiang M X. A new calcium antagonist of Chinese medicinal origin Tetrandrine [J]. J Hypertension, 1986, 4 (suppl 6): s150.
- [3] 郑广华. 细胞内信使系统——基础与临床 [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1987.
- [4] Liu Q Y, Karpinski E, Pang P K T. Tetrandrine inhibits both T and L calcium channel currents in ventricular cells [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 20: 513-519.
- [5] 东建途, 张均田, 屈志伟. 粉防己碱对体外培养大鼠皮层神经元损伤的保护作用 [J]. 药学报, 1996, 31: 161-165.
- [6] 刘汉清, 谢凤香, 梁尚栋, 等. 粉防己碱对敌百虫中毒小鼠的保护作用 [J]. 江西医学院学报, 2001, 41(1): 1-5.
- [7] Dal G, Bonham J R, Riley K W, *et al.* An improved method for the determination of acetylcholinesterase activity in rectal biopsy tissue from patients with hirschsprung's disease [J]. Clin Chim Acta, 1977, 77: 407-413.
- [8] Ellman G L, Courtney K O, Andres V J, *et al.* A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochem Pharmacol, 1961, 7(1): 88-95.
- [9] 孙东红, 赵丽红, 周宏东. 血液胆碱酯酶活力测定方法的进一步研究 [J]. 工业卫生与职业病, 1994, 20(3): 154-157.
- [10] 赵秀丽, 栾丽君, 赫梅生. 家兔敌敌畏代谢动力学与胆碱酯酶抑制毒效动力学的关系 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 11(1): 59-62.
- [11] Mintor N A, Murray V S G. A review of organophosphate poisoning [J]. Med Toxicol, 1988, 3: 350-375.

母鼠妊娠期服用豆腐果苷对仔代的神经行为效应

刘 苹, 李 健, 纳冬荃, 耿菊敏, 尚 莉*

(昆明医学院 公共卫生学院, 云南 昆明 650031)

摘 要: 目的 应用神经行为畸胎学方法评价豆腐果苷对大鼠仔代的神经行为毒性。方法 妊娠 6~15 d 大鼠采用豆腐果苷 0, 27, 270, 1 350 mg/kg[·]d 剂量连续 ig 染毒, 17 只孕鼠自然分娩。观察母鼠妊娠期和分娩后的生理、生育指标; 160 只仔鼠出生后的体重增长、早期生理发育和神经行为发育指标; 随机选择 32 只仔鼠于 10 周龄时进行自动化操作行为测试。此外, 对 10 周龄仔鼠 24 只进行脑组织的光镜观察和单胺类神经递质(去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺)的测定。整个实验采用双盲法。结果 未观察到豆腐果苷对大鼠的母体毒性; 3 个剂量组仔鼠的体重增长、早期生理发育及神经行为发育与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$); 操作行为测试中, 仔鼠学习记忆能力无性别差异, 3 个剂量组仔鼠的学习成绩与对照组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$); 与对照组相比, 各剂量组仔鼠脑组织均未观察到明显的形态学改变, 脑神经递质含量也未见异常 ($P > 0.05$)。结论 未观察到胚胎期服用豆腐果苷对大鼠仔代神经系统的早期发育、神经行为功能和脑组织学的影响。

* 收稿日期: 2001-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39840003, 39860068); 云南省自然科学基金资助项目 (96C070M)

作者简介: 刘 苹 (1954.10-), 女, 云南石屏人, 硕士, 教授。1989年毕业于同济医科大学公共卫生学院, 1992-1994年赴德国慕尼黑技术大学医学院留学, 先后前往澳大利亚、瑞典、芬兰、韩国、新加坡、泰国等国家进行学术访问。现任昆明医学院公共卫生学院代院长, 环境卫生学教研室主任, 中华预防医学会环境卫生学分会委员, 云南环境科学学会常务理事; 为国家教育部高等学校骨干教师, 昆明医学院硕士生导师, 第三军医大学副博士生导师。主要研究方向为行为毒理学和环境医学, 参与编写卫生部高等医药院校规划教材《环境卫生学》第 4 版, 主持国家自然科学基金、其它基金项目和国际合作项目多项, 以第一作者发表论文 40 余篇, 其中 2 篇被 SCI 引用 (1 篇) 和收录 (1 篇)。Tel 0871-5339214 E-mail liu@public.km.yn.cn