

· 药理与临床 ·

甲基莲心碱对有机磷酸酯抑制的小鼠脑胆碱酯酶的重活化作用

李新华¹, 张 红², 徐文炜², 熊玉卿^{2*}

(1. 江西医学院 卫生科, 江西 南昌 330006; 2. 江西医学院临床药理研究所, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 研究甲基莲心碱 (Nef) 对有机磷酸酯中毒小鼠脑胆碱酯酶 (ChE) 的重活化效应。方法 采用微量二巯基双硝基苯甲酸 (DTNB) 法测定敌敌畏 (DDVP) 体内、体外抑制小鼠脑 ChE 活力, 观察 0.001 ~ 0.03 mg/L DDVP 在体外对小鼠脑 ChE 活力的抑制作用, 比较 Nef 和氯磷定体内、体外给药对 DDVP 中毒小鼠脑 ChE 的重活化效应。结果 不同浓度的 DDVP 显著地抑制试管内小鼠脑 ChE 活力, 呈现明确的量效关系, IC_{50} 为 0.003 mg/L。Nef (2.4, 4.8 mg/L) 与氯磷定 (5, 12.5 mg/L) 对 0.02 mg/L DDVP 体外抑制的小鼠脑 ChE 重活化效应随着浓度增高而加大。对 sc DDVP (10 mg/kg) 的小鼠分别 ip Nef 或氯磷定, 其脑 ChE 活率分别为 (41.6 ± 10.9) %、(56.5 ± 12.4) % (Nef 15, 30 mg/kg) 和 (24.1 ± 17.4) %、(28.4 ± 11.9) % (氯磷定 25, 50 mg/kg), 两者相比差异显著 ($P < 0.01$)。结论 Nef 比氯磷定有更为显著的重活化 ChE 的作用, 这与 Nef 能进入中枢复活脑中毒酶有关。

关键词: 甲基莲心碱; 有机磷酸酯; 胆碱酯酶; 酶重活化剂

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)06-0651-03

Reactivation of neferine on mice brain cholinesterase inhibited by organophosphate

LI Xin-hua¹, ZHANG Hong², XU Wen-wei², XIONG Yu-qing²

(1. Department of Health; 2. Institute of Clinical Pharmacology, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Object** To study the reactivation of neferine (Nef) and pralidoxime chloride (2-PAM · Cl) on mice brain cholinesterase (ChE) inhibited by organophosphate. **Methods** Micro-DTNB method was used to determine the ChE activity of mice brain inhibited by DDVP *in vitro* and *in vivo*, then the inhibitory effect of DDVP (0.001—0.03 mg/L) on mice brain ChE *in vitro* was observed. The reactivative effect of Nef and 2-PAM · Cl on brain ChE of poisoned mice with DDVP *in vivo* and *in vitro* was compared. **Results** *In vitro*, the inhibitory effect of DDVP at different concentrations on mice brain ChE showed a concentration-effect relationship. The IC_{50} was 0.003 mg/L. The reactivative effect of Nef (2.4, 4.8 mg/L) and 2-PAM · Cl (5, 12.5 mg/L) on brain ChE inhibited by DDVP (0.02 mg/L) enhanced with increasing their concentrations. *In vivo*, after 30 min of treated with DDVP (10 mg/L, sc), the mice were given (ip) with Nef (15, 30 mg/kg) or 2-PAM · Cl (25, 50 mg/kg), respectively. The ChE activity rate in these two treated groups were (41.6 ± 10.9) %, (56.5 ± 12.4) % and (24.1 ± 14.3) %, (28.4 ± 11.9) %, respectively. The difference between poisoned group (sc DDVP) and Nef treated group was significant ($P < 0.01$), whereas that between poisoned group and 2-PAM · Cl treated group was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion** The results suggest that Nef have a more remarkable reactivative effect on inhibited brain ChE *in vitro* and *in vivo* than 2-PAM · Cl. This may be contributed to that Nef can penetrate the blood-brain barrier.

Key words: neferine (Nef); organophosphate; cholinesterase (ChE); enzyme reactivators

寻找重活化有机磷酸酯中毒的胆碱酯酶 (ChE) 的药物的工作是很有效率的。早在 20 世纪 50 年代就发现了含胍基的化合物能确切有效地重活化中毒酶。几十年来, 临床上常用的重活化药仍为季胺吡啶醛胍类化合物^[1], 它们均不易穿透血脑屏

障。对脑 ChE 无明显重活化作用^[2], 使中枢 ChE 严重抑制的患者难以救治。甲基莲心碱 (neferine, Nef) 是中药莲心子的有效成分, 属双苄基异喹啉类生物碱, 研究发现 Nef 具有较强的重活化有机磷抑制的 ChE 的作用^[3]。本实验采用微量二巯基双硝基

* 收稿日期: 2003-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30060092)

作者简介: 李新华 (1957—), 男, 江西省人, 医学学士, 副教授, 副主任医师, 主要研究方向为呼吸内科疾病的预防治疗与中枢药物作用及其机制。Tel: (0791) 6361537 Fax: (0791) 6360654 E-mail: LiXH@public.nc.jx.cn

苯甲酸 (DTNB) 法, 分别于体外、体内用敌敌畏 (DDVP) 抑制小鼠脑 ChE 活性, 比较 Nef 和氯磷定 (2-PAM·Cl) 对 DDVP 抑制的小鼠脑 ChE 的复活作用, 探求 Nef 对脑内中毒 ChE 的确切效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 昆明种健康小鼠, 雌雄兼用, 体重 (20.0±2.0) g, 由江西医学院实验动物中心提供。

1.2 仪器: 96 孔酶标板 (丹麦 NUNC), 550 型酶标仪 (美国 Bio-Rad Laboratories), 高速冷冻离心机 (美国 Beckman)。

1.3 试剂与药品: DDVP (浙江兰溪农药厂, 批号: 960306, 取 1.5 mL 加 2.0 mL 聚山梨醇酯 80 搅匀, 蒸馏水配成 10% 母液); Nef (含量: 92.6%, 同济医科大学药理教研室提供, 0.1 mol/L 盐酸溶解为 3% 溶液); 毒扁豆碱 (美国 Fluka, 用 0.1 mol/L 盐酸溶解); 氯磷定 (上海淮海制药厂, 批号: 9990115); 以上母液均用生理盐水稀释。DTNB (0.01 mol/L 溶液)、碘化硫代乙酰胆碱 (ATCh, 0.05 mol/L 溶液), 均为 Sigma 公司产品。

1.4 脑 ChE 制备: 小鼠断头, 去头骨、脑膜和小脑。取大脑并称质量, 以 10% 蔗糖液 (1:9) 混合匀浆。3 000 r/min 冷冻离心 10 min, 取上清液冷藏备用。

1.5 ChE 活性测定: 微量 DTNB 法参照文献^[4] 进行, 在 96 孔酶标板内加入 0.067 mol/L 磷酸缓冲液和 0.05 mol/L ATCh 各 30 μL, 加入脑 ChE 备用液 30 μL, 37 °C 温箱中孵温 30 min, 加 1 mol/L 盐酸 10 μL 终止反应, 加 0.01 mol/L DTNB 200 μL 显色, 于 405 nm 波长测吸光度 (A) 值。

1.6 体外实验: 取 0.001, 0.002, 0.003, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03 mg/L DDVP 分别作用于小鼠脑 ChE, 每份设双管, 重复测定 2 次。另取小鼠脑组织直接测定 ChE 活力为正常酶活力。所得实验数据作量效曲线图, 得出 DDVP 对脑 ChE 的 IC₅₀ 及脑 ChE 抑制率 80% 以上的 DDVP 浓度。

在试管内加入脑 ChE 抑制率 80% 以上浓度的 DDVP, 作用于小鼠脑组织 10 min 后, 再分别加入不同浓度的 Nef (2.4, 4.8 mg/L) 或氯磷定 (5, 12.5 mg/L), 重活化 30 min, 测定 ChE 活力, 并设生理盐水 (NS) 对照组 (以生理盐水代替 DDVP) 及 DDVP 对照组 (以生理盐水代替 Nef 或氯磷定)。

1.7 体内实验: 将小鼠随机分 6 组, 每组 8 只。其中 4 组小鼠 sc DDVP (1.0 mg/kg) 中毒后, 分别 ip Nef (15, 30 mg/kg) 或氯磷定 (25, 50 mg/kg), 30 min 后处死, 取脑制备脑 ChE, 测定酶活力。另一组

sc DDVP 后 ip 等容的 NS 作为模型对照, 余下一组 sc 和 ip 等容的 NS 作正常对照。

ChE 活率 = 实验组酶活力 / 正常酶活力 × 100%

ChE 抑制率 = (正常酶活力 - 实验组酶活力) / 正常酶活力 × 100%

1.8 数据处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 DDVP 体外对小鼠脑组织 ChE 的抑制作用: 0.001~0.03 mg/L 的 DDVP 在试管内作用于小鼠脑组织 ChE, 可显著抑制脑 ChE 活性, 且呈量效关系, 见图 1。以 DDVP 浓度对数与 ChE 抑制百分率作直线回归, 得出 DDVP 对 ChE 的 IC₅₀ 为 0.003 mg/L。由图 1 可得出 DDVP 抑制小鼠脑组织 ChE 80% 以上的浓度为 0.02 mg/L。

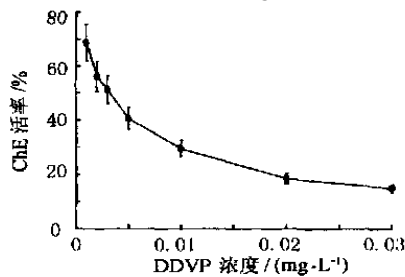
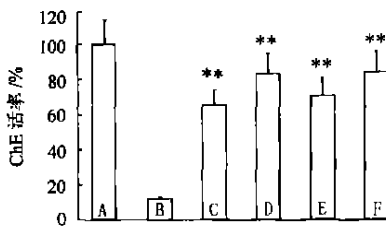


图 1 DDVP 体外抑制小鼠脑 ChE 作用的量效曲线
Fig. 1 Curve of concentration-effect on mice brain ChE inhibited by DDVP in vitro

2.2 Nef 体外对 DDVP 抑制的脑 ChE 活性的影响: 由图 2 可见 2.4, 4.8 mg/L Nef 对 0.02 mg/L DDVP 抑制的脑 ChE 有明显的重活化作用。Nef 与氯磷定在复活效应相当时, Nef 浓度比氯磷定低。

2.3 Nef 体内对 DDVP 抑制的小鼠脑 ChE 的作



A-生理盐水 B-DDVP C, D-Nef (2.4, 4.8 mg/L)
E, F-氯磷定 (5, 12.5 mg/L)
A-NS B-DDVP C, D-Nef (2.4, 4.8 mg/L)
E, F-2-PAM·Cl (5, 12.5 mg/L)
与 DDVP 组比较: ** P < 0.01
** P < 0.01 vs DDVP group

图 2 Nef 体外对 DDVP 抑制的小鼠脑 ChE 的重活化效应
Fig. 2 Reactivation of Nef on mice brain ChE activity inhibited by DDVP in vitro

用: 结果见表 1。小鼠 sc DDVP 后脑 ChE 活力均显著被抑制, 但 Nef 能重活化被 DDVP 抑制的中毒小鼠脑 ChE, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)。而氯磷定对 DDVP 中毒的小鼠脑 ChE 未呈现复活效应, 即使加大其用量仍未出现激活现象, 与模型组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 但与 Nef 低剂量组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 Nef 体内对 DDVP 抑制的小鼠脑 ChE 的重活化作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Reactivation of Nef on mice brain ChE activity inhibited by DDVP *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	ChE 活性/%
正常	-	100.0 ± 8.0
模型	-	25.7 ± 4.6**
Nef	15	41.6 ± 10.9**
	30	56.5 ± 12.4**
氯磷定	25	24.1 ± 14.7***
	50	28.4 ± 11.9***

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $P < 0.01$;

与 Nef (15 mg/kg) 组比较: *** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group; $P < 0.01$ vs model group;

*** $P < 0.01$ vs Nef (15 mg/kg) group

2.4 体外、体内实验结果比较: 由图 2 和表 1 结果可见, Nef 与氯磷定体外均明显重活化脑 ChE, 两者之间差异不显著 ($P > 0.05$), 而在体内 Nef 与氯磷定重活化脑 ChE 的作用却存在显著差异 ($P < 0.01$), Nef 具有明显重活化作用。

3 讨论

呼吸衰竭导致窒息是有机磷酸酯中毒致死的第一要素^[5]。有机磷酸酯中毒时, 脑内 ChE 被严重控制, 中枢的乙酰胆碱 (ACh) 积聚, 激动呼吸中枢的背侧呼吸细胞群 (DRG) 和腹侧呼吸细胞群 VRG 的 M 受体, M 受体过度激动引起两细胞群节律性传出冲动紊乱甚至停止, 膈肌和肋间外肌就停止节律性收缩, 无法实现有效的吸气动作, 出现窒息和呼吸衰竭^[6]。能进入中枢的 ChE 重活化药可纠正脑 ChE 抑制所造成的呼吸衰竭, 使被有机磷抑制的脑内 ChE 恢复其水解 ACh 的活力, 清除呼吸、循环中枢突触间隙中蓄积的 ACh^[7]。而临床上有确切疗效的肟类重活化药均为季胺或双季胺吡啶脒胍基化合物, 季胺盐结构特性决定它们难以通过血脑屏障, 不进入中枢中进入脑内甚少, 故对呼吸和循环中枢的磷酸化 ChE 没有重活化作用^[8]。本实验表明, ip Nef

对 DDVP 中毒小鼠脑 ChE 有重活化效应, 且随着剂量的增加, 对脑磷酸化 ChE 重活化作用明显增强。而 ip 50 mg/kg 氯磷定解救中毒小鼠时, 其脑 ChE 活率仅为 28.4%, 与模型组相比差异不显著 ($P > 0.05$), 与其体外重活化作用差异显著。这种差异性的存在可能是由于氯磷定分子结构中具有季胺基团, 不易穿过血脑屏障而进入中枢所致。Nef 在解救有机磷中毒过程中显现出比经典的氯磷定更强的重活化 ChE 作用, 其原因可能与 Nef 能进入中枢重活化脑内 ChE, 迅速清除或改善呼吸和循环中枢内积聚的 ACh、恢复中枢正常的生理功能密切相关。

重活化药作用于磷酸化酶使之脱磷酸基的作用符合质量作用定律, 有效的重活化基团愈多, 则单位时间内可重活化更多的中毒酶分子, 复活作用就愈强^[9]。本研究结果表明 DDVP 对小鼠脑 ChE 的抑制作用是随着剂量的增大而显著加强的, Nef 与氯磷定在体外对 DDVP 抑制 80% 以上的脑中中毒酶呈现显著地重活化作用。两者等效应时, Nef 剂量约为氯磷定的 1/2, 可见 Nef 重活化脑中中毒酶的作用比氯磷定强, 与前期研究结果也相吻合^[3], 依据质量作用定律, 这提示 Nef 结构上可能具有比氯磷定更多的效应基团, 值得进一步研究。

References:

- [1] Clement J G, Shiloff J D, Gennings C. Efficacy of a combination of acetylcholinesterase reactivators, HI-6 and obidoxime, against tabun an soman poisoning of mice [J]. *Arch Toxicol*, 1987, 61(1): 70-75.
- [2] Shih T M. Comparison of several oximes on reactivation of soman-inhibited blood, brain, and tissue cholinesterase activity in rats [J]. *Arch Toxicol*, 1993, 67(2): 637-646.
- [3] Xiong Y Q, Zeng F D. Effect of neferine on toxicodynamics of dichlorvos for inhibiting rabbit cholinesterase [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2003, 24(4): 332-336.
- [4] Dong L C. Micro-DTNB method was used to determine the ChE activity [J]. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 1987, 11: 480-483.
- [5] Foutz A S, Boudinot E, Denavit S M. Central respiratory depression induced by acetylcholinesterase inhibition: involvement of anaesthesia [J]. *Eur J Pharmacol*, 1987, 142(2): 207-213.
- [6] Yamashita M, Tanaka J, Ando Y. Human mortality in organophosphate poisonings [J]. *Vet Hum Toxicol*, 1997, 39(2): 84-85.
- [7] Sterling G H, Doukas P H, Sheldon R J, et al. *In vivo* protection against soman toxicity by known inhibitors of acetylcholine synthesis *in vitro* [J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(3): 379-384.
- [8] Rosenstock L, Keifer M, Daniell W E, et al. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication [J]. *Lancet*, 1991, 338(8761): 223-227.
- [9] Brestkin A P, Zhukovskii I G, Moralev S N, et al. The mechanism of anticholinesterase action of acetylene organophosphorus inhibitors [J]. *Bioorg Khim*, 1992, 18(8): 1067-1072.

更正: 本刊 2004 年第 5 期第 529 页刊“HPLC 法测定复方五味子软胶囊中五味子甲素的含量”一文的作者单位应为“深圳市宝安区人民医院”, 特此更正。