

甲胺磷诱发母鸡迟发性神经毒性模型

杨琳^{①②} 刘杰^① 李薇^① 伍一军^{①*}

(^①中国科学院动物研究所分子毒理学实验室 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080 ;

^②中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 :以成年鸡为实验动物,对甲胺磷原药诱发鸡的迟发性神经毒性进行了研究。检测了甲胺磷对鸡脑神经靶标酯酶(NTE)的体外抑制情况以及急性中毒后期鸡神经组织 NTE 活性变化。毒性试验发现,甲胺磷对京白母鸡(*Gallus domesticus*)的毒性主要表现为急性中毒,未见有明显的迟发性神经毒性症状。结果表明,本实验未能通过经口及经皮两种染毒途径在母鸡上建立甲胺磷诱发的迟发性神经毒性模型。

关键词 :甲胺磷 ;迟发性神经毒性 ;母鸡 ;模型

中图分类号 :R-332 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2005)04-12-05

Delayed Neurotoxicity is not Induced by Methamidophos in Adult Hen

YANG Lin^{①②} LIU Jie^① LI Wei^① WU Yi-Jun^①

(^①Laboratory of Molecular Toxicology, State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080 ;

^②Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract :An attempt to establish a methamidophos-induced delayed neurotoxicity model in Beijing White Laying Hens was performed. Neuropathy target esterase(NTE) inhibition was evaluated. It was showed that surviving hens exposed to methamidophos did not develop organophosphate-induced delayed neurotoxicity. The results indicate that delayed neurotoxicity is not induced by methamidophos administered orally and subcutaneously in adult hens.

Key words :Methamidophos ;Delayed neurotoxicity ;Hen ;Model

甲胺磷为硫代硫酸酯类有机化合物,是一类最常见的有机磷农药,在农业生产上被大量使用。甲胺磷易溶于水、甲醇、乙醇等溶剂,对光、热、氧均较稳定,遇碱易分解。关于甲胺磷对人和动物健康的影响已有报道,一些动物实验和流行病学研究均表明,甲胺磷除了可抑制胆碱酯酶活性,还可引起迟发性神经毒性^[1],其特征为衰弱无力、运动障碍、神经受损,严重者麻痹瘫痪,发病时一般有 7~14 d 的潜伏期,称为有机磷化合物诱导的迟发性神经毒性(organophosphate-induced delayed neurotoxicity, OPIDN)^[2]。尽管 OPIDN 的发病机制目前仍不清楚,但神经靶标酯酶(neuropathy target esterase, NTE)被抑制

和随后发生的老化被认为是 OPIDN 发生的前提条件^[3]。

母鸡是研究 OPIDN 的敏感动物,研究发现能使人产生迟发性神经毒性的有机磷一般都能使成年母鸡产生相似的迟发性神经毒性,而且鸡和人在发病时间、组织病理学及症状表现上非常相似。另外母鸡作为实验动物,容易获得,

基金项目 教育部留学回国人员科研启动基金(No. A1702037), 国家自然科学基金(No. 30470228) ;

* 通讯作者, E-mail : wuyj@ioz.ac.cn ;

第一作者介绍 杨琳,女,硕士研究生,研究方向:神经毒理学, E-mail : yanglin@ioz.ac.cn.

收稿日期 2004-12-02, 修回日期 2005-04-29

且易于处理,所以成年母鸡一直是 OPIDN 机理研究中最常用的动物模型^[2]。根据美国环境保护署(EPA)制定的筛选有机磷农药毒性的标准实验方法^[4],我们观察了不同给药途径和不同剂量甲胺磷诱发母鸡 OPIDN 的情况,毒性症状的轻重程度按照 Johnson 和 Barnes(1970)^[5]及 Hollingshaus 等(1981)^[6]的划分标准,希望能够找到在成年母鸡上诱导迟发性神经毒性的合适的染毒方法,为探讨 OPIDN 发生机制提供有用的实验模型。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 74% 纯度甲胺磷原液由山东高密农药厂出品。硫酸阿托品为杭州民生药厂产品,硫酸毒扁豆碱购自英国 BDH 公司,戊酸苯酯(phenyl valerate)和氟丙胺磷(mipafos)由本室自行合成,前者的沸点为 70~72℃(0.2 mmHg),后者的熔点为 60~62℃。

试验用鸡购自北京市海淀大北养鸡场,为产卵京白母鸡(*Gallus domestics*),鸡龄约 8 个月,鸡购回后单笼饲养,喂以蛋鸡饲料,适应性喂养一周后进行实验。

1.2 实验方法 试验鸡共 12 只,编号并随机分为两个大组,一为对照组(共 3 只),一为试验组(共 9 只),后者又根据被试农药剂量分为相应的小组(分别为 25、50、100 mg/kg 体重 3 组,每小组 3 只)。参考对鸡半致死量(LD₅₀ 25 mg/kg)将甲胺磷称取一定重量放置在医用空心胶囊内,胶囊直接投入鸡口,喂适量清水使其吞入。对照组喂等量空胶囊。所有试验鸡在给药前 15 min 均给予硫酸阿托品(10 mg/kg 体重,皮下注射)和硫酸毒扁豆碱(0.1 mg/kg 体重,皮下注射),以防止急性胆碱能中毒。

染毒后每天上下午各观察一次至第 21 d,记录中毒症状、中毒时间、发病及持续时间;观察动物有无行为异常,并定期使动物作强制性活动以观察有无运动异常,迟发性神经毒性判定采用 0~4 级计分^[5,6],并定期称量被试鸡体重。如一次染毒后未观察到神经毒性反应,则于给药后 21 d 重复染毒一次,继续观察 21 d。

实验期间喂以蛋鸡饲料,任其自由进食及饮水,室温控制在 25℃ 左右,每天光照 12 h。

1.3 NTE 活性测定 参照 Kayyal(1991)的方法并略加改进^[7]。将鸡断头处死,取神经组织,加入 TE 缓冲液(50 mmol/L Tris-0.2 mmol/L EDTA, pH 8.0)电动玻璃匀浆器匀浆,以后的操作沿用本室曾经报道的方法^[8],蛋白质测定按 Bradford 的方法进行,以 BSA 作为定量标准。

1.4 不同浓度甲胺磷对鸡脑 NTE 活性的体外抑制 设置成对试管,每管加入 30 μl 用 TE 缓冲液配制的不同浓度的甲胺磷(终浓度为 0~75.00 mmol/L)对照组则加入等量 TE。然后加入鸡脑匀浆样品,37℃ 保温 10 min,以后的操作与 NTE 活性的标准测定方法完全相同(参见 1.3)。

2 结 果

2.1 甲胺磷对鸡脑 NTE 活性的体外抑制 在固定孵育温度 37℃,抑制时间为 20 min 条件下,药物浓度在 0~50.00 mmol/L 范围所测定的甲胺磷对鸡脑匀浆中的 NTE 活性抑制情况见图 1,其抑制的百分率与甲胺磷浓度(mmol)的对数呈现正相关。

由图 1 可见,随着测试药物浓度的增加,甲胺磷在体外明显抑制鸡脑匀浆组织中的 NTE 活性,至浓度 5 mmol/L 时,甲胺磷对 NTE 的抑制已经达到 65%。从图 1 所示的数据中可以读出甲胺磷抑制 NTE 活性的半数抑制浓度 I₅₀ 为 5.7 mmol/L。

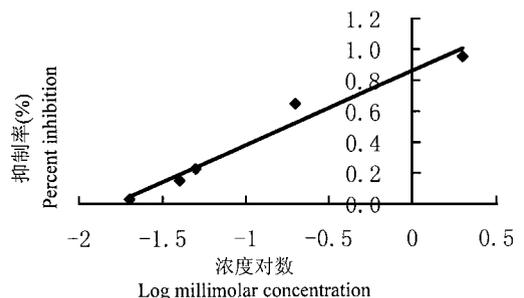


图 1 不同浓度的甲胺磷在体外对鸡脑 NTE 活性的抑制

Fig. 1 Inhibition of NTE activity in the cerebrum of hens by different concentrations of methamidophos

2.2 甲胺磷急性中毒 4 组试验鸡给予不同剂量的甲胺磷(表 1)。给药后,除对照组外,各组试验鸡均出现不同程度的急性中毒症状,主要表现为:双腿软弱无力,蹲卧或趴于笼底,呼吸急促,食欲丧失,流涎,素嚷内积液,严重时死亡。急性毒性症状一般持续 4~10 d。对照组未出现上述症状。所有给予甲胺磷的被试鸡在给药期间体重都有不同程度的下降,且中剂量组和高剂量组体重下降更明显(数据未给出)。这些结果提示,甲胺磷的药物毒性作用使试验鸡食欲降低导致采食量减少,引起体重下降。较高的剂量组表现出的毒性症状比低剂量组的明显,同时导致的采食抑制也更严重。

表 1 甲胺磷对京白母鸡的急性毒性

Table 1 Acute toxicity of methamidophos on Beijing White Laying Hens

给药剂量 Dose (mg/kg)	动物数(只) No. of hens used	死亡数 No. of deaths (只)	死亡率 Death rate (%)
0	3	0	0
25	3	0	0
50	3	2	66.7
100	3	2	66.7

2.3 迟发性神经毒性 按表 1 中所示剂量给药后在连续 21 d 的实验期间未观察到试验鸡有迟发性神经毒性症状出现,有 4 只死于急性中毒。后又重复染毒,将鸡分为 2 组,一组剂量为 30 mg/kg,给药一次,另一组剂量同上,重复给药 5 d,每天给药后鸡蹲卧不动,但第 2 d 能站立取食,第 3、4 d 后即恢复正常行走和进食,重复给药组有 1 只在最后一次结束给药后第 2 d 死亡(表 2)。所有试验鸡直至实验结束均未观察到迟发性神经毒性症状(计分为 0 级),仅见有急性中毒反应。

经过两次给药分别持续 21 d 观察,仍未见试验鸡有迟发性神经毒性症状出现,随后,又将给药剂量加大到 100 mg/kg 体重,试验用鸡共 5 只,因急性毒性死亡 4 只,剩余一只 4 d 后恢复正常,直到 21 d 实验结束仍未发现有迟发性神经毒性症状。

表 2 甲胺磷对京白母鸡的迟发性神经毒性作用
Table 2 Delayed neurotoxicity of methamidophos on Beijing White Laying Hens

组别 Groups	给药剂量 Dose (mg/kg)	试验鸡 No. of hens tested (只)	死亡鸡 No. of deaths (只)	出现 OPIDN 的 鸡(只) No. of the hens with developed OPIDN
对照组 Control	0	3	0	0
一次给药组 Single dose	30	3	0	0
重复给药组 Repeated dose	30	3	1	0

2.4 神经组织 NTE 活性测定 在第 3 次给药结束后第 21 d 取急性中毒后期存活的试验鸡和对照鸡的神经组织(包括中枢和外周神经)测定 NTE 活性,结果如表 3 所示。与对照组相比,试验鸡的脊髓、大脑和小脑 NTE 酶活性有所下降,坐骨神经 NTE 活性略微上升,但均无显著差异。

表 3 试验母鸡不同神经组织中的 NTE 活性比较(纳摩尔酚/分/毫克蛋白)

Table 3 Comparison of NTE activity in homogenates of hen cerebrum, cerebellum, spinal cord, and sciatic nerve (nmol phenol/min/mg protein)

	对照(Mean ± SD) Control	甲胺磷(Mean ± SD) Methamidophos
坐骨神经 Sciatic nerve	2.96 ± 0.06	3.18 ± 0.74
脊髓 Spinal cord	5.12 ± 0.22	5.06 ± 0.07
大脑 Cerebrum	23.84 ± 0.22	22.40 ± 0.13
小脑 Cerebellum	28.59 ± 0.42	24.43 ± 0.90

3 讨论

按我国农药毒性分级标准,甲胺磷属高毒杀虫剂。对母鸡的急性经口中毒 LD₅₀ 为 25 mg/kg。其急性中毒的发病机理为甲胺磷使体内胆碱酯酶磷酸化,丧失水解乙酰胆碱的能力,导致乙酰胆碱在胆碱能神经突触中蓄积,产生中毒症状。急性中毒恢复后,部分患者可出现

OPIDN。

以往的研究表明,甲胺磷以大于 8 倍 LD_{50} 剂量染毒且无保护剂时才可导致 OPIDN^[5]。本研究参照 Johnson 实验方法 给予口服大剂量甲胺磷,母鸡因急性毒性及消化道损伤和严重的采食抑制,导致高死亡率;中小剂量组只是出现急性中毒症状,胆碱能症状消除后能恢复站立及进食,但未出现 OPIDN,因此口服甲胺磷未能在京白母鸡上有效地诱发迟发性神经毒性症状。另外,参照赵秀兰等^[9]的实验方法,连续 5 d,每天经皮下给予 30 mg/kg 剂量的甲胺磷,发现在染毒结束后给药部位的皮肤呈现坏死。所有试验鸡在染毒时均给予保护剂以减少急性中毒,但染毒的试验鸡还是在 7 d 之内死亡。

参考以前用经典的迟发性神经毒性有机磷化合物三邻甲苯基磷酸酯(TOCP)对迟发性神经毒性的诱导实验,被试鸡口服 TOCP(750 mg/kg 体重)后,通常在第 9~10 d 开始出现迟发性毒性症状,症状分级为给药后 0~8 d 为 0 级(无症状);9~13 d 为 1 级(轻度异常步态);14~16 d 为 2 级(步态严重失调);17~20 d 为 3 级(常蹲卧,站立则常跌倒);21 d 及以后达 4 级(完全不能站立,瘫痪)。将甲胺磷和 TOCP 的中毒症状相比较,可以认为通过口服和皮下给予两种染毒途径在京白母鸡上建立迟发性神经毒性模型甚为困难。

实验最后,检测了试验鸡的外周和中枢神经组织在急性中毒恢复后期 NTE 活性的变化情况,结果显示,随着时间延续 NTE 活性逐渐恢复,经口给药结束 21 d 后,NTE 在鸡脊髓、大脑和小脑中的活性分别恢复到对照组的 99%、94%和 85%(参见表 3),其中脑 NTE 活性在给药组和对照组的差异与以前我们用 TOCP 在成年鸡上所做的实验结果一致^[8]。

在诱发迟发性神经毒性方面,甲胺磷作为一种单氨基磷酸酯,其表现可能与氟丙胺磷等二氨基磷酸酯不同^[10]。例如:虽已证实甲胺磷可使人产生迟发性神经毒性,但成年母鸡在给予两倍 LD_{50} 剂量的甲胺磷且无保护剂条件下,NTE 的抑制率只有 50%,难以达到 OPIDN 发生

的必要条件——70%的 NTE 抑制率^[11],并且无迟发性神经毒性症状^[12]。本研究体外抑制实验显示,鸡脑 NTE 活性可被甲胺磷高度抑制(图 1),由于体内 NTE 活性在给药早期未能直接测定,虽然本实验最高给药剂量达到 4 倍 LD_{50} ,但尚不能断定在给予甲胺磷后鸡脑中的 NTE 活性抑制超过 70%。因而,给予甲胺磷后鸡脑 NTE 活性抑制问题值得进一步研究。从甲胺磷对 NTE 抑制及其在人和实验动物上的毒性差异可以看出,甲胺磷诱发迟发性神经毒性可能有其独特的分子机理,另外,包括立体化学结构和纯度在内的一些因素也会影响甲胺磷的毒性^[13,14],这使得甲胺磷的神经毒性机制可能要比其他有机磷农药复杂。

参 考 文 献

- [1] Sun D H, Zhou H D, Xue S Z. Epidemiologic survey on organophosphate-induced delayed polyneuropathy (OPIDP) among patients recovered from Methamidophos poisoning. *Med Law*, 1998, **89** :S123 ~ 128.
- [2] Abou-Donia M B. Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1981, **21** :511 ~ 548.
- [3] Johnson M K. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. *Rev Biochem Toxicol*, 1982, **4** :141 ~ 212.
- [4] US Environmental Protection Agency. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision F. Hazard Evaluation: Human and Domestic Animals. Addendum 10: Neurotoxicity, series 81, 82, 83. Springfield, VA: National Technical Information Service, 1991, 1 ~ 60.
- [5] Johnson M K. Organophosphorus and other inhibitors of brain "neurotic esterase" and the development of delayed neurotoxicity in hens. *Biochem J*, 1970, **120** :523 ~ 531.
- [6] Hollingshaus J G, Nishioka T, March R B, et al. Effect of impurities on the delayed neurotoxicity of O-(4-bromo-2,5-dichlorophenyl) O-ethyl phenylphosphonothioate administered orally to hens. *J Agric Food Chem*, 1981, **29**(3) :593 ~ 600.
- [7] Kayyali U S, Moore T B, Randall J C, et al. Neurotoxic esterase (NTE) assay: optimized conditions based on detergent-induced shifts in the phenol/4-aminoantipyrine chromophore spectrum. *J Analyt Toxicol*, 1991, **15** :86 ~ 89.
- [8] 伍一军,冷欣夫.有机磷酸酯诱导迟发性神经毒性及其

- 对神经毒性酯酶(NTE)活性影响的动态研究. 环境科学学报, 1995, 15(4): 461 ~ 465.
- [9] 赵秀兰, 韩晓英, 于丽华等. 甲胺磷诱发母鸡迟发性神经毒性模型研究. 山东大学学报(医学版), 2004, 42(4): 398 ~ 400.
- [10] Johnson M K, Vilanova E, Read D J. Anomalous biochemical responses in tests of the delayed neuropathic potential of methamidophos (O, S-dimethyl phosphorothioamidate), its resolved isomers and of some higher O-alkyl homologues. *Arch Toxicol*, 1991, 65(8): 618 ~ 624.
- [11] Johnson M K. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. *Rev Biochem Toxicol*, 1982, 4: 141 ~ 212.
- [12] Senanayake N, Johnson M K. Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphate insecticide. *N Engl J Med*, 1982, 306(3): 155 ~ 157.
- [13] Bertolazzi M, Caroldi S, Moretto A, et al. Interaction of methamidophos with hen and human acetylcholinesterase and neuropathy target esterase. *Arch Toxicol*, 1991, 65(7): 580 ~ 585.
- [14] Kellner T, Sanborn J, Wilson B. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of impurities and chirality on methamidophos-induced neuropathy target esterase aging. *Toxicol Sci* 2000, 54(2): 408 ~ 415.