

敌敌畏对大鼠脑组织 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体活性的影响

戴旭锋, 顾锡安, 孙运光, 郑光, 郑捷, 周志俊*

(复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

摘要: 目的 研究敌敌畏 (DDVP) 染毒后大鼠脑组织中 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸 (NMDA) 受体的变化规律, 探讨其在有机磷农药中毒中的作用。方法 55 只雄性 SD 大鼠分为 11 组, 每组 5 只, 一组为生理盐水 (NS) 组, 高剂量组 (25 mg/kg) 和低剂量组 (15 mg/kg) 各 5 组, 染毒组分别以敌敌畏腹腔注射, 染毒后 4 h、8 h、16 h、24 h、48 h 处死, 测定大鼠全血和脑组织的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性以及脑组织中 NMDA 受体的活性。结果 DDVP 染毒后大鼠全血和脑组织的 AChE 活性显著下降, 且脑组织 AChE 活性下降更多, 抑制率大于 80%, 恢复更迟缓。脑组织中 NMDA 受体的最大结合容量 (B_{max}) 在 4 h 便明显下降, 于 24 h 达到最低, 然后逐渐升高, 受体的平衡解离常数 (K_d) 在 4 h 时明显上升, 于 24 h 达到最高, 然后逐渐下降。结论 DDVP 染毒对大鼠脑组织 AChE 活性抑制严重, 说明中枢神经系统对 DDVP 的毒作用敏感。同时 DDVP 染毒对大鼠脑组织中 NMDA 受体产生下降调节, 表现为受体数量减少、亲和力降低。推测这是机体的一种自身调节机制, 可减少过度刺激并保护中枢神经系统。

关键词: 敌敌畏; 急性中毒; *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号: Q955; R139.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)05-0270-04

Effect of DDVP on activity of *N*-methyl-*D*-aspartate receptor in brain of rat

DAI Xu-feng, GU Xi-an, SUN Yun-guang, ZHENG Guang, ZHENG Jie, ZHOU Zhi-jun*

(School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To study the effect of DDVP on the activity of NMDA receptor in brains of male rats thereby to understand its role played in the pathogenesis of organophosphates poisoning. **Method** Fifty-five male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 11 groups. Control group was administrated with normal saline by intraperitoneal injection only instead of dichlorvos. The exposed rats were divided into high-dose group and low-dose group each had five sub-groups; rats of high-group were given 25 mg/kg dichlorvos ip, rats of low-dose group were given 15 mg/kg dichlorvos ip. Then, to measure the values of AChE and the binding capacity of NMDA receptor at the 4 h, 8 h, 16 h, 24 h and 48 h after injection, respectively. The binding capacity of NMDA receptor was measured with [3 H] MK-801 and B_{max} and K_d were determined by Scatchard analysis. **Result** The AChE activities in whole blood and brain of dichlorvos-exposed rats were obviously inhibited; especially the latter, which decreased by 80% or more and recovered slowly, too. The B_{max} of NMDA receptor in brain began to decrease at 4 h after injection of dichlorvos and reached its lowest level at 24 h after injection. While the K_d was significantly risen at 4 h after dichlorvos injection and reached its peak by the time of 24 h after dichlorvos injection. **Conclusion** It was showed that the inhibition of brain AChE activity was more severe than that of whole blood after dichlorvos injection, suggesting that the central nervous system was more sensitive to the acute toxicity of dichlorvos. In addition, dichlorvos might evoke down-regulation of [3 H] MK-801 binding to NMDA receptor in rat brain which were expressed as significant decrease in quantity and affinity of NMDA receptors, supposing that it may be a self-regulation mechanism for protecting central nervous system from dichlorvos intoxication.

Key words: Dichlorvos or DDVP; Acute poisoning; NMDA-receptor; Acetylcholinesterase (AChE)

近年来, 有机磷中毒机制和防治研究已有了很大进展。通常认为有机磷毒物的毒作用机制主要是抑制胆碱酯酶活性致乙酰胆碱过度蓄积, 从而产生一系列外周及中枢神经系统的功能紊乱。1997 年 Shih 等^[1]在研究梭曼 (Soman) 中毒引发抽搐、惊厥的大鼠大

脑神经递质变化时发现, 脑组织中乙酰胆碱于梭曼染毒后 3 min 开始升高, 在大鼠开始发生抽搐、惊厥时已显著升高; 随后脑中肾上腺素 (NE) 开始下降, 多巴胺 (DA) 及其代谢产物开始上升; 随着抽搐、惊厥的持续发作, 脑中谷氨酸和天门冬氨酸等兴奋性氨基酸开始上升, 同时也伴随有 γ -氨基丁酸等抑制性氨基酸的上升。这提示我们有机磷农药中毒后除了抑制胆碱酯酶活性致乙酰胆碱过度蓄积外, 在大脑还

收稿日期: 2003-05-06; 修回日期: 2003-06-30

作者简介: 戴旭锋 (1976-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 有机磷中毒的解毒治疗。

*通讯作者 (correspondence) (E-mail: zizhou@shmu.edu.cn)

因乙酰胆碱过度蓄积引发脑中多种神经递质连锁反应,并最终对脑神经细胞产生毒作用。

N-甲基-*D*-天门冬氨酸(NMDA)受体是目前研究比较广泛的受体。本实验拟通过选取一种有机磷农药——敌敌畏,观察染毒大鼠脑组织中NMDA受体活性的不同时间变化,进一步探讨NMDA受体在有机磷农药中毒中所起的作用,并期望从中寻找新的治疗途径。

1 材料与方法

1.1 试剂

敌敌畏(DDVP)纯度为95%,由上海允发化工有限公司惠赠。硫代乙酰胆碱(ASCh)、二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)和毒扁豆碱均购自Fluka公司。 $[^3\text{H}]$ MK-801(NEN公司,比活度1 069.3 GBq/mmol),非标记的MK-801购自Sigma公司。红光49型玻璃纤维滤膜购自上海红光造纸厂。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试剂配制

Assay缓冲液^[2](118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L MgSO_4 , 5 mmol/L NaHCO_3 , 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 2.5 mmol/L CaCl_2 , 11 mmol/L 葡萄糖, 20 mmol/L HEPES, pH 7.4, 用去离子双蒸水配制)。 $[^3\text{H}]$ MK-801用assay缓冲液稀释,非标记的MK-801用含0.32 mol/L蔗糖的Tris-HCl缓冲液稀释到0.1 nmol/L。闪烁液^[3](含质量分数分别为0.4% PPO和0.01% POPOP溶于二甲苯中)。

1.3 仪器

722型紫外分光光度计、玻璃匀浆器、Beckman CS-15R型高速低温离心机、ZT-II型多头细胞样品收集器、Beckman LS6501型液闪计数仪。

1.4 实验动物及分组

雄性Sprague-Dawley大鼠,体重(220±20)g,由复旦大学实验动物中心提供。实验前饲养5d以适应实验室环境,温度(21±1)℃,湿度(50±10)%,大鼠可自由饮水和进食。55只大鼠分为11组,每组5只,一组为生理盐水(NS)组,高剂量组(25 mg/kg)和低剂量组(15 mg/kg)各5组,染毒组分别在DDVP腹腔注射染毒后4h、8h、16h、24h、48h处死,测定大鼠全血和脑组织的AChE活性以及脑组织中NMDA受体的活性。

1.5 全血及脑组织胆碱酯酶活性测定

采用硫代乙酰胆碱-二硫代双硝基苯甲酸(ASCh-DTNB)分光光度法,在波长412 nm处比色测定。大

鼠外周血胆碱酯酶测定采尾静脉血20 μl ,每份样品均设对照管,向对照管中加入1滴抑制剂(毒扁豆碱溶液,1 mg/ml),将两管置于37℃水浴30 min后,向测定管中加入1滴抑制剂,混匀以终止反应,以此条件下每毫升血样水解1 μmol 巯基为单位。

大鼠脑组织胆碱酯酶活性测定,脑组织称重后按10:1(V:W)加入0.32 mol/L蔗糖缓冲液中匀浆,取30 μl 测定胆碱酯酶活性,每份样品均设对照管,方法同前,37℃水浴20 min,以此条件下每毫克蛋白水解1 μmol 巯基为单位。

1.6 脑突触质膜制备

大鼠颈椎脱臼处死,快速取脑,新鲜脑组织立即投入液氮速冻后于-76℃下低温保存。用时将脑组织称重后按10:1(V:W)加入冰冷的0.32 mol/L蔗糖缓冲液中冰浴匀浆,所有制备操作均在4℃下进行。匀浆液以1 000 g离心15 min,取上清液再以13 000 g离心25 min,弃上清将沉淀悬浮于assay缓冲液中,23℃水浴30 min,再将此悬浮液以4℃13 000 g离心20 min,最后将沉淀悬浮于assay缓冲液中,用微量Lowry's法^[4]进行膜蛋白定量,调整到1 mg/ml。

1.7 放射性配基受体结合分析法

反应系统采用双管,每管加入10 μl 不同浓度的 $[^3\text{H}]$ MK-801(终浓度为0.5~24 nmol/L),加入定量的膜蛋白150 μl (含膜蛋白0.15 mg),此为总结合管;平行的非特异结合管再加入100 μl 非标记的MK-801,用assay缓冲液补充到总反应体积为300 μl 。23℃水浴60 min,每管用冰冷的assay缓冲液终止反应。立即用多头细胞样品收集器经双层滤膜抽滤,用10 ml冰冷assay缓冲液快速洗膜2次。滤膜在80℃烘箱中烘烤2 h后放入计数瓶中,加5 ml闪烁液和2 ml无水乙醇,摇匀后过夜。用液闪计数仪测其放射性(cpm计数)。将测得的数据采用上海第二医科大学实验核医学教研室开发的RBA软件进行分析,经Scatchard作图,求得NMDA受体的最大结合容量 B_{max} 和平衡解离常数 K_d 。Scatchard作图以 RT 为横坐标, B/F 为纵坐标,分别由以下公式计算: $RT(\text{pmol/mg protein}) = [\text{总结合}(\text{cpm}) - \text{非特异结合}(\text{cpm})] / [\text{测量效率}(\%) \times \text{比活度}(\text{dpm/pmole}) \times \text{标本蛋白量}(\text{mg})]$; $B/F = [\text{总结合}(\text{cpm}) - \text{非特异结合}(\text{cpm})] / [\text{标记总结合}(\text{cpm}) - \text{总结合}(\text{cpm})]$ 。

1.8 数据统计

采用SPSS10.0统计软件进行分析,所有数值都以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内不同时点的比

较采用单因素方差分析 (ANOVA), 实验组与生理盐水组比较用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 大鼠敌敌畏急性中毒症状

本次实验所选用的敌敌畏染毒剂量 (25 mg/kg 和 15 mg/kg) 均低于其致死剂量, 2 个剂量组中毒大鼠均出现典型的中毒症状, 但未死亡。敌敌畏染毒后 16 min 左右, 出现肢端震颤、瞳孔缩小、流涎、流泪、呼吸道分泌物增加, 早期呼吸急促深大, 后期呼吸渐缓渐浅, 30 min 后呼吸困难、惊厥、烦躁不安, 个别出现鸣叫, 躯干及四肢剧烈颤抖, 四肢苍白, 眼

球明显突出, 口吐白色泡沫, 大小便失禁, 行走困难, 并出现举尾现象。中毒症状持续 30~40 min, 于中毒后 1 h 逐渐缓解。

2.2 大鼠全血和脑组织的 AChE 活性变化

敌敌畏腹腔染毒对大鼠全血 AChE 活性的影响, NS 组 AChE 活性为 (47.082 ± 4.031) μmol 巯基/ml, 染毒高、低剂量组各时点 AChE 活性均非常显著低于 NS 组 ($P < 0.01$)。全血 AChE 活性在染毒后 8 h 左右下降到最低, 抑制率大于 60%。高剂量组与低剂量组比较, 相应时点的 AChE 活性均有统计学差异, 高剂量组染毒大鼠全血 AChE 受敌敌畏的抑制更强。

表 1 敌敌畏染毒后大鼠全血及脑组织 AChE 活性变化

组别	全血 (μmol 巯基/ml)					脑组织 (μmol 巯基/mg pro)				
	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h
高剂量组	12.101 ± 1.409 ^{△△}	9.748 ± 1.437 ^{△△}	13.334 ± 2.395 ^{△△}	18.816 ± 2.103 ^{△△}	25.011 ± 2.855 ^{△△}	0.731 ± 0.055	0.631 ± 0.040	1.212 ± 0.045	1.305 ± 0.094	1.454 ± 0.108
低剂量组	16.890 ± 1.299	13.969 ± 1.530	18.235 ± 1.668	23.585 ± 4.515	30.055 ± 1.992	0.757 ± 0.058	1.097 ± 0.099 ^{△△}	1.431 ± 0.132	1.511 ± 0.207	1.633 ± 0.114

△△高剂量组与低剂量组在相应时点比较, $P < 0.01$, 下表同。

敌敌畏腹腔染毒对大鼠脑组织 AChE 活性的影响, NS 组 AChE 活性为 (5.451 ± 0.299) μmol 巯基/mg pro, 染毒高、低剂量组各时点脑组织 AChE 活性均低于 NS 组, 差异有非常显著性 ($P < 0.01$)。且脑组织 AChE 活性也是在染毒后约 8 h 下降到最低, 抑制率大于 80%, AChE 活性持续呈抑制状态, 直到 48 h 仍没有明显改善。高剂量组与低剂量组比较, 相应时点的 AChE 活性只在 8 h 有统计学差异 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.3 大鼠脑组织中 NMDA 受体的活性变化

敌敌畏染毒大鼠脑组织 NMDA 受体 B_{max} 值呈先下降后上升变化, 即 NMDA 受体密度先减少后增多, 于 24 h 左右达最低; NMDA 受体 Kd 值呈先上升后下降变化, 即 NMDA 受体亲和力先降低后增强, 于 24 h 左右降到最低。高剂量组和低剂量组之间相同时点的 B_{max} 值和 Kd 值变化差异均无显著性。相应时点受体的 B_{max} 值和 Kd 值均无统计学差异。见表 2。

表 2 敌敌畏染毒后不同时间脑组织 NMDA 受体 B_{max} 及 Kd 值

组别	NMDA 受体 B_{max} 值 (pmol/mg pro)					NMDA 受体 Kd 值 (nmol/L)				
	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h
高剂量组	0.517 ± 0.053 *	0.478 ± 0.050 **	0.456 ± 0.057 **	0.426 ± 0.072 **	0.515 ± 0.094 *	49.401 ± 3.438 **	58.774 ± 5.156 **	75.548 ± 7.869 **	77.568 ± 6.152 **	63.432 ± 4.134 **
低剂量组	0.528 ± 0.058 *	0.499 ± 0.043 **	0.476 ± 0.063 **	0.410 ± 0.036 **	0.550 ± 0.080	47.353 ± 4.786 **	55.910 ± 5.985 **	66.917 ± 5.340 **	71.008 ± 7.135 **	60.905 ± 6.375 **

注: NS 组 B_{max} 值为 (0.615 ± 0.043) pmol/mg pro, Kd 值为 (37.368 ± 4.167) nmol/L。* 与 NS 组比 $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 大鼠在有机磷中毒后全血和脑组织中 AChE 活性均受到明显抑制, 并呈现出剂量依赖性, 敌敌畏染毒剂量越大对 AChE 活性的抑制越强, 而且与全血 AChE 活性相比, 对脑组织 AChE 活性的抑制更强, 抑制率大于 80%。这表明 DDVP 染毒对大鼠脑组织 AChE 活性抑制严重, 说明中枢神经系统对 DDVP 的毒作用敏感, 从脑组织 AChE 活性的抑制程度更能反映出敌敌畏中毒的严重程度。

低, 是因为敌敌畏在吸收入血后, 对全血和脑组织中 AChE 产生抑制的同时, 还有大量的敌敌畏被转移到组织中, 经过一定的时间后组织中的敌敌畏又重新释放入血, 从而导致 AChE 活性的持续降低^[5]。

3.2 兴奋性氨基酸 (excitatory amino acid) 是中枢神经系统内一类重要的神经递质, 许多神经变性疾病和中枢神经系统损伤与过量谷氨酸或其类似物的兴奋毒性 (excitotoxic) 作用有关^[6,7]。NMDA 受体是兴奋性氨基酸受体的主要亚型之一, 在兴奋毒性作用机制中起着非常重要的作用。NMDA 受体在脑内分布十分广

全血和脑组织中 AChE 活性被抑制后仍持续降

泛, 参与学习、记忆等多种生理过程, 但在病理状态下, 由于兴奋性氨基酸的骤升及代谢障碍而引起的多种物质的过量释放, 可引起 NMDA 受体过度激活, 进而引起继发性脑损伤。大量实验结果表明, NMDA 受体拮抗剂对脑损伤后继发性脑损害具有确切的保护作用, NMDA 受体拮抗剂还可降低脑损伤后血脑屏障的通透性, 从而对血管源性脑水肿也有治疗作用^[8]。

3.3 敌敌畏染毒大鼠脑组织 NMDA 受体活性的变化特征首先表现为受体密度减少和亲和力下降, 这可能与脑组织中兴奋性氨基酸的大量释放有关。大量兴奋性氨基酸的释放与 NMDA 受体结合后引起 NMDA 受体数量显著减少, 即表现为下降调节, 是机体的一种自身调节机制, 可保护中枢减少过度刺激。另一方面激活后的 NMDA 受体对与其相偶联的 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 的通透性增加, 引起神经细胞内 Ca^{2+} 超载和 Na^{+} 蓄积, 神经细胞内高渗导致细胞毒性, 继发性脑损害又启动了神经细胞凋亡^[9], 抑制了 NMDA 受体合成, 加速了受体分解, 此外受体的过度兴奋会造成其寿命缩短而使受体数目减少^[10]。以上原因都导致神经细胞膜上的 NMDA 受体减少, 亲和力下降。在 Johnson PS 等^[11]的研究中发现, 敌敌畏等有机磷农药能够明显抑制 [^3H] 3-(2-羧基哌嗪-4-基)-丙基-1-膦酸 ([^3H] CPP) 对大鼠脑突触膜上 NMDA 受体的结合, 提示有机磷毒物可能通过直接与 NMDA 受体复合物的相互作用而对神经细胞产生毒作用。

用 NMDA 受体拮抗剂来治疗有机磷中毒是近几年才发展起来的新型治疗方法, 从本次实验中我们看到 DDVP 染毒对大鼠脑组织中 NMDA 受体产生下调作用, 表现为受体数量减少、亲和力下降。这一现象为我们选择 NMDA 受体拮抗剂作为 DDVP 中毒的辅助治

疗药物提供了实验依据, 根据 DDVP 染毒后 NMDA 受体的变化规律可以进一步指导 NMDA 受体拮抗剂的使用方法。目前我们课题小组正在进一步研究一种非竞争性的 NMDA 受体拮抗剂——美金刚对敌敌畏染毒大鼠脑组织 NMDA 受体的保护作用, 以及美金刚与阿托品和解磷定联用治疗的疗效观察。

参考文献:

- [1] Shih TM, McDonough JH. Neurochemical mechanisms in Somar-induced seizures [J]. J Appl Toxicol, 1997, 17 (4): 255-264.
- [2] Erik HF, Wong JA, Kemp TR, et al. The anticonvulsant MK-801 is a potent *N*-methyl-*D*-aspartate antagonist [J]. Proc Natl Acad Sci, 1986, 83: 7104-7108.
- [3] 徐乐焱 王世真, 左萍萍, 等. 大鼠脑局灶缺血再灌注后 NMDA 受体的改变 [J]. 中华核医学杂志, 2000, 20 (6): 259-262.
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275.
- [5] 郭定宗 杨世锦, 程大池, 等. 敌敌畏急性中毒对小鼠血清胆碱酯酶活性的影响 [J]. 中国兽医学报, 2000, 20 (6): 619-620.
- [6] Miller IP, Lyeth BG, Jenkins LW, et al. Excitatory amino acid receptor subtype binding following traumatic brain injury [J]. Brain Research, 1990, 526 (1): 103-107.
- [7] Choi DW, Monyer H, Giffard RG, et al. Acute brain injury, NMDA receptors, and hydrogen ions: observations in cortical cell cultures [J]. Adv Exp Med Biol, 1990, 268: 501-504.
- [8] Bullock R. Introducing NMDA antagonists into clinical practice: why head injury trials? [J]. Br J Clin Pharmacol, 1992, 34 (5): 396-401.
- [9] Takei N, Endo Y. Ca^{2+} ionophore-induced apoptosis on cultured embryonic rat cortical neurons [J]. Brain Res, 1994, 652: 65.
- [10] 罗成义, 王清华, 徐如祥. 大鼠大脑损伤后皮质 NMDA 受体活性变化与脑水肿的关系 [J]. 中华创伤杂志, 1998, 14 (4): 203-205.
- [11] Johnson PS, Michaelis EK. Characterization of organophosphate interactions at *N*-methyl-*D*-aspartate receptors in brain synaptic membranes [J]. Mol Pharmacol, 1992, 41: 750-756.

(上接第 269 页)

参考文献:

- [1] Demnati R, Fraser R, Plaa G, et al. Histological effects of acute exposure to chlorine gas on Sprague-Dawley rats lungs [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1995, 14: 15-19.
- [2] Jiang XZ, Buckley LA, Morgan KT, et al. Pathology of responses to the RD50 concentration of chlorine gas in the nasal passage of rats and mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1983, 71 (2): 225-226.
- [3] Menouar A, Anglade D, Baussand A, et al. Chlorine gas induced acute lung injury in isolated rabbit lung [J]. Eur Respir J, 1997, 10 (5): 1100-1107.
- [4] Cunningham NE, Hunibal N, Bala RJ, et al. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines [J]. Crit Care

Med, 1997, 25 (6): 958-964.

- [5] Parlapiano C, Paoletti V, Campana E, et al. CGRP and ET-1 plasma levels in normals subjects [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 1999, 3 (3): 139-141.
- [6] Celik G, Karabiyikoglu G. Local and peripheral plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respiration, 1998, 65 (4): 289-294.
- [7] Los K, Lee S, Ramos RA, et al. Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 stimulates the adhesion activity of leukocyte integrin CR3 on human neutrophils [J]. J Exp Med, 1991, 173: 1493-1500.
- [8] Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectin [J]. Science, 1989, 243: 1160-1165.