

口服三邻甲苯基磷酸酯对成年母鸡卵壳腺 ATP 酶及血清 β -葡萄糖醛酸酶活性的影响*

伍一军 冷欣夫

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

摘 要 本研究测定了成年母鸡口服 TOCP(750mg/kg)引起的迟发性神经毒性、卵壳腺钙 ATP 酶及钙镁 ATP 酶的活性。在为期 10 天的试验中,染毒鸡在给药后的第 8~10 天出现迟发性神经毒性症状:表现为轻度步态失调,而对照鸡则自始至终未见有此类症状表现。染毒后 7~10 天取样,试验鸡的卵壳腺钙 ATP 酶及钙镁 ATP 酶活性与对照相比无明显变化($P>0.05$),血清 β -葡萄糖醛酸酶活性两组间亦无明显差异($P>0.05$),以上结果表明,虽然 TOCP 可诱导成年母鸡产生迟发性神经毒性,并影响其产蛋性能,导致产包括软壳蛋在内的异常蛋,但其发生机理可能与卵壳腺的钙 ATP 酶活性无直接关联,至少在接触药物 7~10 天范围尚监测不到药物对卵壳腺钙 ATP 酶及钙镁 ATP 酶活性的影响。此外,在上述取样时间点,亦未见有血清 β -葡萄糖醛酸酶活性的改变,提示 OPIDP 的发生机制不涉及 β -葡萄糖醛酸酶。

关键词 三邻甲苯基磷酸酯 迟发性神经毒性 母鸡 卵壳腺 ATP 酶 β -葡萄糖醛酸酶

有机磷化合物(Organophosphorus Compounds, OPs)是一类用途广泛的工业品,主要用作农药、增塑剂、阻燃剂、油料添加剂、润滑剂等^[1-2]。已知 OPs 可以引起人和其它敏感动物产生由于乙酰胆碱酯酶活性受到抑制而发生的急性中毒,严重者可导致死亡。而且,许多 OPs 还能引发一种所谓“迟发性毒性”,即:有机磷化合物引起的迟发性多发性神经病(Organophosphate-induced Delayed Polyneuropathy, OPIDP),其特征是:在接触 OPs 7~14 天(或更长)后出现毒性症状,主要是周围神经受损,显微镜检查见轴突变性、降解或脱落;临床表现为感觉异常,腓肠肌疼痛、由下肢逐渐向上肢发展的衰弱无力,常见有步态失调、行走困难,严重时出现瘫痪症状^[3-4]。OPIDP 的首次大规模暴发发生在 20 年代的美国,原因是患者服用了被三邻甲苯基磷酸酯(Tri-*o*-Cresyl Phosphate, TOCP)污染的饮料^[5],我国也报道数起 TOCP 引起迟发性神经毒性的病例^[6-7]。现在,TOCP 已成为研究 OPIDP 的经典诱导剂,而成年鸡由于其与人有相似的敏感性及其它一些特征而常被用作 OPIDP 的动物模型^[4]。在以往研究中发现,试验鸡接触 OPs 后出

现产蛋异常,例如:产小蛋、软壳蛋等,提示 OPs 可能影响生殖机能,尤其是成卵过程^[8]。已知禽类卵成熟主要涉及到卵壳腺的正常功能,其中卵壳腺钙 ATP 酶活性是一个非常重要的因素。故本研究通过用有机磷药物染毒成年母鸡,测定其卵壳腺钙 ATP 酶与钙镁 ATP 酶的活性,了解 TOCP 在诱导迟发性神经毒性的同时,是否对禽类卵壳腺 ATP 酶活性产生影响。

此外,OPIDP 发生机理至今尚不清楚,就 OPs 作用于机体的靶标而言,除胆碱酯酶(ChE)、假定的神经毒性酯酶(NTE)^[9]外,还涉及到 β -葡萄糖醛酸酶^[10]。本文也附带测定 TOCP 对血清 β -葡萄糖醛酸酶活性的影响。以明确 β -葡萄糖醛酸酶是否也参与 OPIDP 发生机制。

1 材料与方 法

1.1 化学试剂 TOCP、毒扁豆碱购自英国 BDH 公司;硫酸阿脱品是杭州民生药厂的产

* 国家自然科学基金资助课题(神经毒剂诱导迟发性神经毒性机理的研究 39570153);

第一作者简介:伍一军,男,34 岁,副研究员,博士;

收稿日期:1997-10-22,修回日期:1998-04-05

品;乌苯苷购自德国 Merck 公司;4-甲基伞形酮-β-D 葡萄糖苷酸 (4-Methylumbelliferone-β-D-Glucuronide, 4-MUBG)、4-甲基伞形酮 (4-Methylumbelliferone, 4-MUB)、牛血清白蛋白 (BSA)、Tris、EGTA 均为美国 Sigma 公司的产品。其余试剂均为国产(分析纯级)。

1.2 试验动物及其处理 成年来航母鸡 (*Gallus gallus*) (12 月龄, 1.2~1.4kg) 购自中国农业大学实验鸡场, 购回后单独饲养。至少适应环境一周后才开始试验。自由采食和饮水 (日粮为北京西北旺饲料厂的标准蛋鸡饲料)。整个试验期间, 鸡舍温度控制在 20℃ 左右, 每天光照 12 小时。

试验鸡分成 2 组: 对照组和试验组, 所有试验鸡在给药之前 15 分钟均给予硫酸阿脱品 (10mg/kg, 皮下注射) 和硫酸毒扁豆碱 (0.1mg/kg, 皮下注射) 以防止急性胆碱能中毒。试验组给予 TOCP (装入空胶囊中, 剂量为 750mg/kg, 口服); 对照组则口服等量空胶囊。给药后 48 小时内密切监视被试鸡的急性中毒情况, 此后每天检查被试鸡的变化及运动功能直到第 12 天实验结束, 在给药后 7~10 天处死被试鸡, 取其脏器及血液作生化分析。

1.3 组织制备 鸡被断头处死后, 取其血液于试管中, 自然放置, 室温下析血清。同时, 取出卵壳腺 (Shell Gland, SG), 并将其置于冰冷的含 0.30mol/L 蔗糖和 1mmol/L EDTA 的缓冲液 (10mmol/L Tris-盐酸, pH7.40) 中, 用剪刀剪开, 翻出内粘膜, 用缓冲液漂洗干净。再用载玻片将粘膜小心地刮下, 加入约 7 倍体积的缓冲液, 在玻璃匀浆器中匀浆。将制备好的 SG 匀浆作差异离心处理提取微粒体, 具体方法参照 Castaldo 和 Maurice 的方法^[11]进行。最后得到的沉淀为卵壳腺的微粒体部分; 用缓冲液作适当稀释即为待测定的酶液。

1.4 蛋白质含量测定 采用 Bradford 的方法^[12], 以考马斯亮兰 G-250 作为染色剂, 以 BSA 作为定量标准。

1.5 卵壳腺钙 ATP 酶活性的测定 卵壳腺钙 ATP 酶可以分解底物 ATP 产生磷, 借此来定

量测定其活性。将经上述步骤制备的酶液用缓冲液稀释成含蛋白质 4~10mg/ml 的浓度。取此酶液 10μl 加入到 80μl 的反应体系中 (含 10mmol/L Tris-盐酸缓冲液, 5mmol/L CaCl₂, 0.5mmol/L EGTA); 另一组反应体系除了还含有 0.5mmol/L 乌苯苷外, 其余成分完全相同。39℃ 保温 10 分钟后, 向各反应体系中加入底物 ATP 10μl 以启动反应, 5 分钟后加入 50μl 5% 三氯乙酸 (TCA) 溶液停止反应。释放的无机磷用 Muszbed 等的方法^[13]进行比色测定, 后两组的差值代表卵壳腺钙 ATP 酶的活性。对照组在加入酶液后立即加入 TCA, 然后再加底物。所得卵壳腺钙 ATP 酶活性减去此组值即为卵壳腺钙 ATP 酶活性的真实值。钙镁 ATP 酶活性测定方法相同, 只是反应体系中还另含有 5mmol/L MgCl₂。

1.6 β-葡萄糖醛酸酶活性的测定 参照 Kead-tisuke 和 Nakatsugawa 的方法^[14]进行。取血清 100μl 加入反应体系中 (含 0.05mol/L 乙酸钠-0.04mol/L 盐酸缓冲液, pH4.10; 0.25mmol/L 4-MUBG), 反应体系的终体积为 0.4ml。39℃ 保温 10 分钟后, 加入 4-MUBG 启动反应, 30 分钟后加入终止缓冲液 (0.20mol/L 甘氨酸-0.15mol/L NaOH, pH10:10) 停止反应。用 Hitachi 850 型荧光分光光度计测定荧光强度 (激发波长 360nm, 发射波长 450nm)。将所得数据换算成相应的 β-葡萄糖醛酸酶活性。

1.7 数据统计 对试验组和对照组的血清 β-葡萄糖醛酸酶与卵壳腺钙 ATP 酶活性数据进行比较; 采用双尾 t 检验, 以 P < 0.05 视为有显著意义。

2. 结果

2.1 试验鸡迟发性神经毒性的症状 所有被试鸡均未出现急性有机磷中毒症状。在给药 8~10 天, TOCP 处理组开始有神经功能异常的表现, 但症状轻微, 主要为轻度步态失调, 腿部运动减少, 行走减慢, 个别鸡站立困难。对照组所有鸡在试验期间均未出现任何异常症状。

2.2 TOCP 对试验鸡的卵壳腺钙 ATP 酶活性及

血清 β -葡萄糖醛酸酶活性的影响 与对照组相比,口服 TOCP(750mg/kg)后,试验鸡卵壳腺钙

ATP 酶、钙镁 ATP 酶活性及血清 β -葡萄糖醛酸酶活性均未发生明显改变($P>0.05$)(见表 1)。

表 1 口服 TOCP(750mg/kg)对成年母鸡卵壳腺钙 ATP 酶、钙镁 ATP 酶及血清 β -葡萄糖醛酸酶活性的影响

项目 处理后时间	钙 ATP 酶*			钙镁 ATP 酶*	β -葡萄糖醛酸酶**
	7 天	10 天	平均	10 天	7 天
对照组	22.41 ± 2.83	30.87 ± 4.76	26.64 ± 4.23	39.05 ± 4.79	9.56 ± 3.66
TOCP 组	24.96 ± 4.72	29.32 ± 4.39	27.14 ± 3.08	38.67 ± 1.01	9.44 ± 3.22

* 钙 ATP 酶及钙镁 ATP 酶的活性单位: $\text{Pi}(\mu\text{moles/hr/mg 蛋白质})$;

** β -葡萄糖醛酸酶活性单位: $4\text{-MUB}(\times 10^{-5}/30\text{min/mg 蛋白质})$

3 讨论

TOCP 诱导成年来航母鸡产生迟发性神经毒性,并可致母鸡产异常蛋(小蛋、软壳蛋),作者怀疑后者的原因是由于 TOCP 抑制母鸡卵壳腺钙 ATP 酶活性所致,但从本试验研究的结果看来,情形可能并非如此。在给予 TOCP(750mg/kg,口服)7 天和 10 天采样分析,母鸡卵壳腺钙 ATP 酶及钙镁 ATP 酶活性与对照组相比均无显著差异。然而,TOCP 究竟是如何影响母鸡成卵过程的呢?是通过影响体内生殖激素的水平还是通过别的途径来降低母鸡产蛋性能的呢?有必要设计进一步的试验来解开这个谜。

此外,通过分析血清 β -葡萄糖醛酸酶活性发现,在口服 TOCP(750mg/kg)后的第 7 天,染毒鸡与对照鸡的血清 β -葡萄糖醛酸酶活性没有明显差别,此结果初步提示,在 OPIDP 的发生机理中,可能不涉及 β -葡萄糖醛酸酶活性的改变。

致谢 实验动物的处理得到陈志强高级实验师的协助,谨致谢意。

参 考 文 献

- Davis, C. S., R. J. Richardson. Organophosphorus compounds In "Experimental and Clinical Neurotoxicology" (P. S. Spencer, and H. H. Schaumburg, Eds.), Baltimore, Williams and Wilkins, 1980, 527~544
- Schaumburg, H. H., P. S. Spencer. Human toxic neuropathy due to the industrial agents. In: "Peripheral Neuropathy" (P. J. Dyck, P. K. Thomas, E. H. Lambert, and R. Bunge,

Eds.), Saunders, Philadelphia, 1984, 2:2115

- Cavanagh, J. B. Peripheral neuropathy caused by chemical agents. *Crit. Rev. Toxicol.*, 1973, 2:365~417
- Abou-Donia, M. B. Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1981, 21: 511~548
- Smith, H. I., E. Elvove, W. H. Frazier. The pharmacological action of certain phenol esters, with special references to the etiology of so-called ginger paralysis. *Public Health Rep.*, 1930, 45:2509~2524
- 鲁锡荣,张寿林,张哲民,杨 师.三邻甲苯磷酸酯暴发中毒的临床症状:卫生研究,1992,21(5):268~271
- 张基美.三邻甲苯磷酸酯亚急性中毒 74 例临床观察.中国药理学与毒理学杂志,1997,11(2):153
- 陈志强,伍一军,谢遵逸.有机磷酸酯类化合物对蛋鸡生产性能的影响.动物学集刊,1995,12:71~74
- Johnson, M. K. Organophosphorus and other inhibitors of brain "neurotoxic esterase" and the development of delayed neurotoxicity in hens. *Biochem. J.*, 1970, 120:523~531
- Leng, X. F., T. Nakatsugawa. Paraoxon-induced release of β -glucuronidase from rat hepatocytes in vitro. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1984, 21:207~212
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72:248~254.
- Muszbeke, L., T. Szabo, L. Fesus. A highly sensitive method for the measurement of ATPase activity. *Anal. Biochem.*, 1977, 77:286~288
- Keaditsuke, S., T. Nakatsugawa. Significance of phosphorylation in organophosphate-mediated β -glucuronidase release from the rat liver. *Pestic Biochem Physiol.*, 1980, 13:213~218
- Castaldo, D. J., D. V. Maurice. Shell gland adenosine triphosphatase in hens producing strong and weak egg shells. *Brit. Poultry. Sci.*, 1990, 31:225~229