

大鼠急性经口暴露毒死蜱的毒物代谢动力学和毒物效应动力学研究

吴 惠, 乙楠楠, 刘 沛, 李亭亭, 何贤松, 赵敏娴, 姚欣雅, 王灿楠*

(东南大学公共卫生学院环境医学工程教育部重点实验室, 东南大学公共卫生学院营养与食品卫生系, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:测定一次性经口暴露毒死蜱(chlorpyrifos, CPF)的毒物代谢动力学和毒效学指标,研究 CPF 的毒代动力学和毒效学特征。方法:雌性 SD 大鼠按体重随机分为 4 个剂量组和 1 个阴性对照组,每组 15 只。剂量组分为:12.5、25.0、50.0、100.0 mg/kg,一次性灌胃染毒。染毒后 1、3、6、12 和 24 h 5 个时间点分别在每个剂量组随机选择 3 只大鼠,乙醚麻醉,股动脉取血,颈椎脱臼处死,分离大脑皮质,用高效液相色谱法测定这 5 个时间点的血清中 CPF 和 3,5,6-三氯-2-吡啶(3,5,6-trichloropyridinol, TCP)的浓度,用胆碱酯酶试剂盒测定血清和大脑皮质中乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活性。结果:血清 CPF 和 TCP 的浓度随时间变化,先上升后下降,前者峰值浓度出现在染毒后 3 h,后者为 6 h 左右;血清和皮质的 AChE 活性随时间变化,先下降后上升,血清 AChE 活性在染毒后 3~6 h 抑制程度最大,皮质 AChE 在染毒后 6~12 h 抑制程度最大。血清 CPF 浓度、TCP 浓度与 AChE 活性均成线性负相关,血清 CPF 浓度与 TCP 浓度呈线性正相关。结论:获得了毒死蜱经口暴露的多项毒代动力学和毒效学数据,阐明了毒代动力学和毒效学特征,为毒死蜱生理毒物代谢动力学和毒物效应动力学模型的建立和完善提供了科学依据。

[关键词] 毒死蜱;毒物代谢动力学;毒物效应动力学

[中图分类号] R114

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-592-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140511

Toxicokinetics and toxicodynamics of chlorpyrifos in rats with single oral gavage exposure to chlorpyrifos

Wu Hui, Yi Nannan, Liu Pei, Li Tingting, He Xiansong, Zhao Minxian, Yao Xinya, Wang Cannan*

(The Key Laboratory of Medical Engineering Environment, Nutrition and Food Hygiene Department, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To measure the index of toxicokinetics and toxicodynamics of chlorpyrifos in Sprague-Dawley rats after single oral-dose exposure to chlorpyrifos (CPF), and study the characteristic of toxicokinetics and toxicodynamics of CPF. **Methods:** The adult female SD rats were randomly divided into 5 groups (including 1 control group and 4 treated groups) according to the weight. Each group has fifteen rats. The dose of chlorpyrifos is respectively 12.5 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg. Blood samples were collected through arteria cruralis after single dose gastric gavage exposure at 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h, then rats were killed and cortexes were collected. The concentrations of CPF and TCP (3,5,6-trichloropyridinol) at every five time point in plasma were determined by HPLC (high performance liquid chromatography), and acetylcholinesterase (AChE) activity was estimated by the Pureauto CHE. **Results:** The peak concentration of CPF and TCP first peak were observed at 3 h and 6 h, respectively, then declined. The maximum inhibition of plasma AChE was observed between 3 to 6 h. Maximum inhibition of cortex AChE occurred between 6 to 12 h. Both the plasm concentration of CPF and TCP were linear negatively correlated with the plasm AChE activity. The plasm concentration of CPF and TCP showed a linear positive correlation. **Conclusion:** Through this study, we obtain several indexes of toxicokinetics and toxicodynamics of CPF, and represent the characteristics. These results will provide useful information to the physiologically based toxicokinetics and toxicodynamics (PBTK/TD) model.

[Key words] chlorpyrifos; toxicokinetics; toxicodynamics

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05):592-596]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81273080);教育部博士点基金资助(2010009211052)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wcnseu@126.com

毒死蜱 (chlorpyrifos, CPF) 作为一种有机磷农药,是世界范围内最广泛应用的 5 种杀虫剂之一,占据杀虫剂销售额的第 2 位。2007 年,全球毒死蜱农药生产量达到 12 万吨,国内需求为 1.5 万吨^[1]。目前,毒死蜱已经成为国内大力推广的农药品种。污染物监测结果显示,农产品中有机磷农药残留情况相当严重。毒死蜱一旦进入机体后就会在细胞色素酶 P450 的作用下代谢成活性中间产物,即氧化后的毒死蜱^[2],后者能与机体内的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 等多种胆碱酯酶结合,引起胆碱酯酶抑制反应,造成胆碱能受体功能紊乱,使有胆碱受体的器官功能发生障碍。氧化后的毒死蜱经对氧磷酶 (paraoxonase 1, PON-1) 等水解酶的作用,降解生成解毒后的代谢产物,即磷酸二乙酯 (diethylphosphate, DEP) 和 3,5,6-三氯-2-吡啶 (3,5,6-trichloropyridinol, TCP)^[3],其中 TCP 是毒死蜱的特殊代谢产物^[4]。同样,氧化后的毒死蜱在与胆碱酯酶作用时也可形成 DEP 和 TCP^[5]。毒死蜱本身也可以被细胞色素酶 P450 直接代谢生成 DEP 和 TCP^[2]。近年来,食品安全问题频发,食品中的各种污染物、农药或者添加剂等化学物质通过多种机制对人体造成多种毒害作用。食品化学物暴露形成的健康风险随之受到了越来越多的重视。食品风险评估方法有多种,包括危害指数法、相对效能因子法、概率风险评估法以及生理毒物代谢动力学和毒物效应动力学 (PBTK/TD) 模型法。应用 PBTK 模型能够预测毒物原型或其活性代谢产物在靶组织中的剂量,被视为定量风险评估的理想方法,是目前风险评估方法研究的热点^[6]。本次研究的目的是对大鼠一次性经口暴露毒死蜱后机体内药物代谢动力学和药物效应动力学特征进行研究描述,以期为下一步的 PBTK 模型建立和完善工作提供科学数据,最终为风险评估建立新的更有效的评估方法。

1 材料和方法

1.1 材料

选用中国人民解放军南京军区医学动物实验中心提供的雌性成年清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 75 只,体质量 250~300 g [合格证号 SCXK (军)2007-0004]。东南大学实验动物中心 SPF 级动物房中饲养,温度为 (22 ± 3) °C,相对湿度为 50%~60%,通风良好,昼夜周期为 12 h/12 h,自由摄食和饮水,食用标准颗粒饲料。

市售毒死蜱 (美国陶氏益农公司,浓度为 480

g/L)。CPF 标准品 (99%, aladdin), TCP 标准品 (>99%, Sigma 公司, 美国)。甲苯、冰乙酸、醋酸钠、无水硫酸钠、甲醇。AChE 活性测定试剂盒、考马斯亮兰蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。岛津高效液相色谱仪 LC-20AD、岛津二极管阵列检测器、TGL-16C 离心机、氮吹仪。756 型紫外可见分光光度计, S10 手提式高速分散器, 80-2 离心沉淀器和 L-550 台式低速离心机。

1.2 方法

1.2.1 染毒方式及剂量分组

大鼠适应性喂养 7 d 后,按体重随机分为 5 组 (4 个实验组和 1 个对照组),每组平均 15 只。根据体重确定灌胃量,灌胃量按每 100 g 体重 1 ml;一次性灌胃染毒。4 个实验组的染毒剂量分别为 12.5、25.0、50.0、100.0 mg/kg。对照组给予等体积的纯净水。

1.2.2 实验方法

75 只大鼠一次性灌胃染毒,在染毒后 1、3、6、12 和 24 h 5 个时间点分别在每个剂量组随机选择 3 只大鼠,乙醚麻醉,股动脉取血,颈椎脱臼处死,分离大脑皮质,生物样品经处理后于 -80 °C 冷冻保存。

血清中 CPF 及 TCP 检测:使用高效液相色谱法检测。取 500 μl 血浆加入 300 μl HAc 溶液 (10%),加入 1 ml 甲苯,涡旋混匀 2 min 后离心取出上清液,剩余溶液再分别用 1 ml 甲苯萃取两次,合并上清液,并加入过量无水硫酸钠涡旋 2 min,取出上清液,将上清液通过 0.22 μm 滤膜,收集滤液,滤液在 50 °C 水浴中氮吹至干,用 0.1 ml 甲苯复溶后进样检测。色谱条件为,色谱柱:Kromasil 100-5C₁₈ (250 mm × 4.6 mm);检测波长:TCP:298 nm, CPF:290 nm;柱温:30 °C;流动相:A 相:醋酸溶液 (pH=3), B 相:甲醇。胆碱酯酶测定:按照 AChE 活性测定试剂盒操作说明,测定血清和脑组织中 AChE 的活性。

1.3 统计学方法

所有实验数据用 Excel 建立数据库,做带误差线的时量曲线图进行结果分析。血清 CPF 以及 TCP 浓度与 AChE 活性的相关性分析用 SPSS 统计软件分析。

2 结果

2.1 毒死蜱毒物代谢动力学结果分析

大鼠一次性经口暴露毒死蜱后,血清中 CPF 及 TCP 的浓度随时间变化情况见图 1 和图 2。由图 1 可知,一次性经口染毒毒死蜱后,血清中 CPF 的浓度随着时间推移,逐渐上升,在染毒后 3 h 达到峰

值,随着开始降低,在染毒后 3~12 h 浓度下降较多,染毒后 12~24 h 浓度下降缓慢。25 mg/kg 剂量组,在染毒后 24 h,血清中 CPF 浓度较染毒后 12 h 稍有增高。不同染毒剂量大鼠血清中 CPF 浓度随时间变化的曲线相似,且剂量越大血清浓度越高。

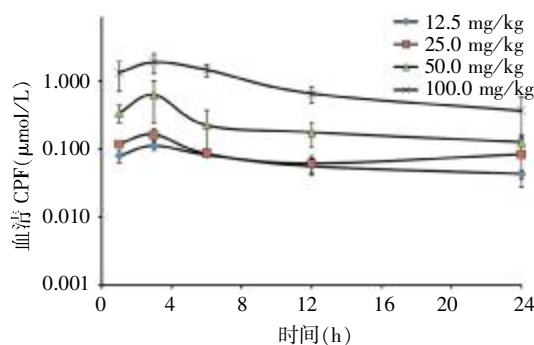


图1 血清毒死蜱(CPF)浓度时程变化曲线

Figure 1 Time course curve for plasm CPF concentration

由图2可知,一次性经口染毒毒死蜱后,血清中TCP的浓度随着时间推移,逐渐上升,在染毒后6h达到峰值,随着开始降低,在染毒后24h,浓度下降至最低。不同染毒剂量,大鼠血清中TCP浓度随时间变化速度及趋势一致,且剂量越大,血清浓度越高。

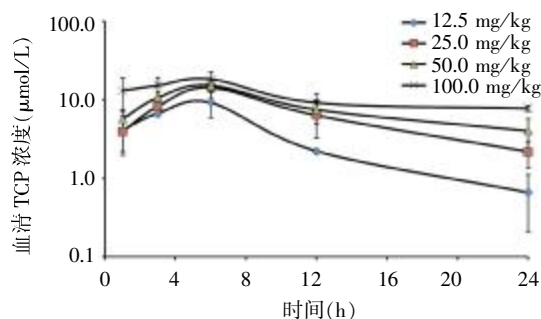


图2 血清毒死蜱(TCP)浓度时程变化曲线

Figure 2 Time course curve for plasm TCP concentration

2.2 毒死蜱毒物效应动力学结果分析

大鼠一次性经口暴露毒死蜱后,血清和脑组织中AChE活性随时间变化的情况见图3和图4。用对照组大鼠AChE活性百分比的形式来表示各实验组不同时间点不同组织AChE活性变化情况。由图3可知,在低、中剂量组染毒后1h已经出现AChE活性下降,随着时间的推移,血清AChE活性逐渐下降,在染毒后6h活性值达到最低,而最高剂量组,即100 mg/kg剂量组,在染毒后3h血清AChE活性抑制程度最大。随后,AChE活性开始缓慢上升,尤其在染毒后12~24h AChE活性上升幅度较大。不同剂量组大鼠血清中AChE活性随时间变化曲线相似,且与剂量相关。

图4显示,在低剂量组,即12.5 mg/kg剂量组,大鼠皮质AChE活性在染毒后1h和24h高于对照组,其余3个剂量组染毒后皮质的AChE活性均低于对照组;12.5 mg/kg和25.0 mg/kg剂量组在染毒后12h,皮质AChE活性降低到最低值,12h后AChE活性开始上升;50 mg/kg和100 mg/kg剂量组在染毒后6h,皮质AChE活性降低到最低值,6h后AChE活性开始上升。

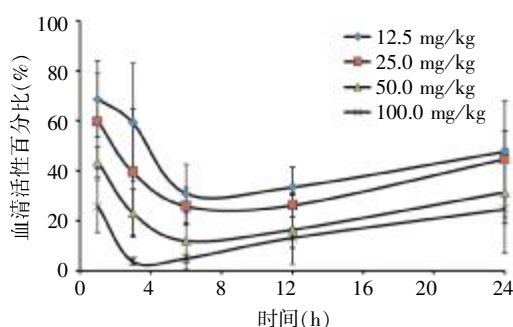


图3 血清AChE活性时程变化曲线

Figure 3 Time course curve for plasm AChE activity

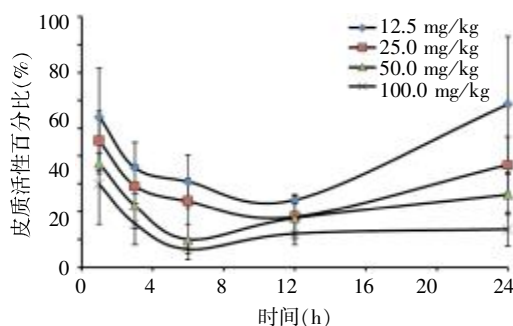


图4 皮质AChE活性时程变化曲线

Figure 4 Time course curve for cortex AChE activity

2.3 CPF、TCP浓度与AChE活性相关性分析

表1是每个时间点15只大鼠血清CPF浓度、TCP浓度与血清AChE活性相关性分析以及血清CPF浓度与TCP浓度相关性分析的结果。由结果可知,血清CPF浓度与AChE活性之间呈线性负相关关系,且具有统计学意义(24h时间点除外)。血清TCP浓度与AChE活性之间呈线性负相关关系,且具有统计学意义。血清CPF浓度与TCP浓度之间呈线性正相关关系,且具有统计学意义。

3 讨论

毒死蜱是一种常见的有机磷农药,机体内与有机磷农药代谢密切相关的胆碱酯酶有AChE、丁酰胆碱酯酶和羧酸酯酶等,其中AChE又称真性胆碱酯酶,主要作用于乙酰胆碱。AChE主要分布于神经

表 1 各指标间的相关性分析结果
Table 1 Correlation analysis of each index

相关性分析指数	时间				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
CPF 和 AChE					
<i>r</i> 值	-0.78	-0.68	-0.63	-0.68	-0.58
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.05
TCP 和 AChE					
<i>r</i> 值	-0.77	-0.58	-0.74	-0.86	-0.72
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
CPF 和 TCP					
<i>r</i> 值	0.92	0.90	0.6	0.69	0.84
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

肌肉组织,红细胞及血小板中,是所有有机磷农药共同的靶点,活性部位丝氨酸残基与有机磷结合后,活性被抑制,其活性抑制是有机磷农药中毒的主要机制,也是评价有机磷农药中毒程度的一个重要生物标志物^[6]。毒死蜱进入机体后要先经氧化酶的代谢活化作用生成活性中间产物,即毒死蜱氧化物,才能作用于靶组织中的 AChE,发挥毒作用,造成胆碱能受体功能紊乱,使有胆碱受体的器官功能发生障碍。毒死蜱经过一系列的代谢反应后,最终生成终级代谢产物 DEP 和 TCP,经尿液排出体外。因此,本研究主要检测指标包括:血液 CPF、TCP 浓度以及血清 AChE 活性、大脑皮质 AChE 活性,这些指标能够反映毒死蜱毒物代谢动力学和毒效学的特征。

本次毒代动力学研究结果显示,血清中 CPF 及 TCP 的时程曲线趋势为先上升至峰值后逐渐下降。其中毒死蜱灌胃,暴露毒死蜱后 1 h,便能在血液中检测到 CPF,经过一段时间的代谢反应后,3 h 血清 CPF 浓度达到峰值,随后在 6、12 和 24 h 时浓度逐渐下降。这个结果与 Timchalk 等^[7]的研究结果一致。Poet 等^[8]研究者关于毒死蜱和地亚农联合暴露的研究结果还显示,毒死蜱一次性经口暴露,血清 CPF 药物代谢动力学也是在 3 h 出现峰值。本研究结果中血清 TCP 浓度变化情况显示(图 2),在染毒后 1 h 血清 TCP 浓度开始上升,经过 6 h 后浓度达到峰值,随后逐渐下降。TCP 作为 CPF 的终极代谢产物,出现峰值浓度的时间要晚于 CPF 峰值浓度出现的时间。血清 TCP 浓度变化结果与上述两项研究结果也保持一致。除了急性经口暴露实验外,还有研究者研究了其他暴露途径下毒死蜱的药代动力学特征,结果发现经皮暴露毒死蜱的情况下,血液中 CPF 和 TCP 达到浓度峰值的时间均推迟^[9]。这表明毒死蜱经口暴露进入机体后,更容易快速吸收,在肠道和

肝脏代谢后,分布至全身。

本次毒死蜱的毒效学研究结果显示,胆碱酯酶活性的时程曲线为先下降至最低值后逐渐上升,在 Foxenberg 等^[10]关于人暴露毒死蜱和对硫磷的研究中,胆碱酯酶活性时量曲线也呈现这个趋势。本研究血清 AChE 活性在暴露后 1 h 即观察到抑制反应,AChE 活性降到最低值后逐渐上升,低剂量组和中剂量组中血清 AChE 活性在暴露后 6 h 左右降到最低,分别是对照组活性的 30.95%、25.84% 和 11.99%。而当暴露剂量继续升高,血清 AChE 活性抑制反应加重,100 mg/kg 剂量组在暴露后 3 h AChE 活性降低到 3.83%。上述实验结果与 Timchalk 的研究结果一致^[7],这可能是由于剂量增大,机体内参与 CPF 代谢反应的酶饱和,CPF 迅速与靶组织酶结合发生抑制反应有关。另一个毒效应学指标为大脑皮质 AChE 活性,图 4 结果显示在低剂量组,即 12.5 mg/kg 剂量组,皮质 AChE 活性在暴露后 1 h 和 24 h 高于对照组,这可能与毒物兴奋效应有关^[11]。低剂量组(12.5 mg/kg 和 25.0 mg/kg)皮质 AChE 活性抑制最大出现在第 12 h,分别是对照组活性的 48.48% 和 36.36%。而高剂量组(50 mg/kg 和 100 mg/kg)皮质 AChE 活性抑制最大出现在第 6 h,分别是对照组活性的 20.20% 和 13.13%。这种现象可能与血清 AChE 活性抑制反应在高剂量组提前出现相似。同时,本研究发现血清 AChE 活性抑制反应早于皮质 AChE 抑制反应,因此血清胆碱酯酶活性可以作为一个早期生物标识。

血清 CPF、TCP 浓度与血清 AChE 活性相关性为线性负相关,即随着血清 CPF 或 TCP 浓度的增大,血清 AChE 活性下降,抑制程度增大。此外,血清 CPF 浓度与血清 TCP 浓度相关性为线性正相关,血清 CPF 浓度增大,TCP 浓度也随着增大。

总之,本研究测定了急性经口暴露毒死蜱情况下多项毒死蜱药物代谢动力学和药效学指标,描述了毒死蜱药代动力学和药效学的特征,这些数据为 PBPK/PD 模型的建立和完善提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 刘占山,黄安辉,肖明山. 毒死蜱的研究应用现状及产业发展前景[J]. 世界农药,2009,31(1):59-61
- [2] Ma T,Chambers JE. Kinetic parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpyrifos by rat liver microsomes [J]. Food Chem Toxicol,1994,32(8):763-767
- [3] Pond AL,Chambers HW,Coyne CP,et al. Purification of

two rat hepatic proteins with A-esterase activity toward chlorpyrifos-oxon and paraoxon [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 286(3): 1404-1411

[4] 周志荣,林少彬. 血、尿中有机磷农药及其代谢产物检测方法的研究进展[J]. *国外医学卫生学*, 2007, 34(3): 153-157

[5] Chanda SM, Mortensen SR, Moser VC, et al. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats; an *in vitro* and *in vitro* comparison[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1997, 38(2): 148-157

[6] Refstrup TK, Larsen JC, Mever O, et al. Risk assessment of mixture of pesticides. Current approaches and future strategies [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2010, 56(2): 174-192

[7] Timchalk C, Nolan RJ, Mendrala AL, et al. A Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 66(1): 34-53

[8] Poet TS, Timchalk C. Development of a physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model to determine dosimetry and cholinesterase inhibition for a binary mixture of chlorpyrifos and diazinon in the rat[J]. *Neuro Toxicol*, 2008, 29(1): 428-443

[9] Smith JN, Campbell JA, Busby-Hjerpe AL, et al. Comparative chlorpyrifos pharmacokinetics via multiple routes of exposure and vehicles of administration in the adult rat [J]. *Toxicology*, 2009, 261(1): 47-58

[10] Foxenberg RJ, Ellison CA, Knaank JB, et al. Cytochrome P450-specific human PBPK/PD models for the organophosphorus pesticides: Chlorpyrifos and parathion [J]. *Toxicology*, 2011, 285(1): 57-66

[11] 周志俊. 基础毒理学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 2008: 9

[收稿日期] 2013-11-19

《南京医科大学学报(自然科学版)》荣获首届 江苏省新闻出版政府奖

由中共江苏省委宣传部、江苏省新闻出版(版权)局、江苏省财政厅、江苏省人力资源和社会保障厅共同主办的首届江苏省新闻出版政府奖评选表彰结果公布,经评审委员会评审和评选工作领导小组审定,并经过严格的指标评定,《南京医科大学学报(自然科学版)》荣获江苏省新闻出版政府奖报刊提名奖。该奖项中报刊奖期刊类 20 种,报刊提名奖期刊类 14 种。江苏省共有 441 种期刊出版,此次仅有 34 种期刊获此殊荣。