

克百威 甲基对硫磷对湘云鲫脑 AchE 活性的影响

林亲铁¹, 杨仁斌², 李适宇¹

(1. 中山大学环境科学研究所, 广东 广州 510275; 2. 湖南农业大学农业环境研究所, 湖南 长沙 410128)

摘要:采用体内染毒的方法,研究了克百威、甲基对硫磷及两者混合物对湘云鲫脑乙酰胆碱酯酶(AchE)活性的影响,对其作用机制和以 AchE 活性作为生物学标记物来监测环境中农药的可行性进行了初步的探讨。结果表明,克百威和甲基对硫磷之间产生协同作用,而且这种作用随时间的延长表现得更加显著,AchE 活性可以作为生物学标记物。

关键词:湘云鲫; 克百威; 甲基对硫磷; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号:X503. 225 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 – 0267(2002)05 – 0439 – 04

Effects of Carbofuran and Methyl – Parathion on AchE Activity in Brain of Xingyunji – Fish

LIN Qin-tie¹, YANG Ren-bin², Li Shi-yu¹

(1. Institute of Environmental Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China; 2. Institute of Agro – Environmental Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: This paper reports the effects of carbofuran and methylparathion on AchE Activity in Brain of Xingyunji – Fish. It also investigates their mechanisms and the possibility of AchE as a biomarker to monitor pesticide residues in environment. The results showed that interaction between the two pesticides exhibited to be synergistic, and became stronger with time, suggesting that the activity of AchE may be used as a biomarker.

Keywords: Xiangyunji – fish; carbofuran; methylparathion; AchE

湘云鲫是湖南师范大学刘筠院士等利用现代基因工程手段培养出来的一个具有广阔市场前景的鱼类新品种。有机磷农药和氨基甲酸酯农药都是乙酰胆碱酯酶(AchE)的强抑制剂。关于这些农药对鱼脑 AchE 活性的影响以及利用 AchE 的活性作为生化指标来监测水质变化等,国内外都有报道^[1-4],但是对于它们之间联合毒性效应的研究还很少。本文采用体内染毒定时检测 AchE 活性的方法,分别研究了克百威、甲基对硫磷及其混合物的毒性效应,对采用 AchE 的活性作为生物学标记物(biomarker)来监测环境中的有机磷或氨基甲酸酯类农药及采用生物化学实验来评价污染物的毒性进行了探讨。

1 试验材料与方法

1. 1 试验材料与试剂

1. 1. 1 试验材料

试验用鱼为购自于湖南师范大学生物系的湘云

鲫,体长 7. 5—10 cm,鱼样于试验前先在室外生态池驯化 10 d,再在实验室暂养 4—6 d,每天换水一次。试验养鱼用水为曝气脱氯的自来水。

1. 1. 2 试剂

2 mol · L⁻¹ 的盐酸羟胺溶液(低温保存); 3. 5 mol · L⁻¹ 的氢氧化钠; 碱性羟胺溶液(使用前 20 min 内用等体积的盐酸羟胺与氢氧化钠溶液混合而成); 0. 37 mol · L⁻¹ 的三氯化铁溶液(三氯化铁 10 g 溶于 100 mL0. 1 mol · L⁻¹ 的盐酸中,贮于棕色瓶内); 1: 2 盐酸; 磷酸缓冲溶液(pH = 7. 2, 0. 01 mol · L⁻¹),取 2. 72 g 的磷酸二氢钾和 16. 72 g 的磷酸氢二钠用蒸馏水定容至 1 000 mL(贮于塑料瓶中)。

氯化乙酰胆碱标准贮备液:称取 73 mg 氯化乙酰胆碱溶于 10 mL 醋酸钠溶液(pH = 4. 5,0. 01 mol · L⁻¹)中,贮于 0 ℃—4 ℃冰箱内(不超过两个星期)。

氯化乙酰胆碱标准使用液:临用前取贮备液 2 mL 用醋酸钠溶液定容至 20 mL(4 μmol · L⁻¹)。

克百威纯品(99. 98%)由美国 FMC 公司提供,配成 10⁴ mg · L⁻¹ 的溶液备用; 甲基对硫磷原药(94. 65%)由湖南农药厂提供,配成 5 × 10⁴ mg · L⁻¹ 的

溶液备用。

1. 1. 3 试验仪器

722 光栅分光光度计、AEU-210 皿氏电子分析天平。

1. 2 染毒方法

试验在 16 L 圆形聚乙烯塑料水桶中进行, 每桶盛 10 L 试验溶液, 试验分两部分进行。

1. 2. 1 试验水中不同浓度农药同一时间对湘云鲫脑 AchE 活性的影响

根据被测物 LC₅₀ 和预备试验结果, 设 1 个清水对照, 9 个处理。各处理农药及浓度 (均为安全浓度) 分别为: 克百威——处理 1: 0. 20 mg · L⁻¹; 处理 2: 0. 25 mg · L⁻¹; 处理 3: 0. 30 mg · L⁻¹。甲基对硫磷——处理 1: 1. 5 mg · L⁻¹; 处理 2: 2. 0 mg · L⁻¹; 处理 3: 2. 5 mg · L⁻¹。克百威 + 甲基对硫磷——处理 1: 0. 20 mg · L⁻¹ + 1. 5 mg · L⁻¹; 处理 2: 0. 25 mg · L⁻¹ + 2. 0 mg · L⁻¹; 处理 3: 0. 30 mg · L⁻¹ + 2. 5 mg · L⁻¹。采用静态试验法, 试验期间不曝气, 不投放饵料, 每个处理放鱼 3 尾, 重复两次, 于 96 h 取样测定其 AchE 活性。

1. 2. 2 试验水中同一浓度农药不同时间对湘云鲫脑 AchE 活性的影响

设 1 个清水对照, 3 个处理, 各处理农药及浓度分别为: 处理 1 为 0. 25 mg · L⁻¹ 克百威; 处理 2 为 2. 0 mg · L⁻¹ 甲基对硫磷; 处理 3 为 0. 25 mg · L⁻¹ 克百威 + 2. 0 mg · L⁻¹ 甲基对硫磷。每个处理放鱼 12 尾, 重复两次。采用静态试验法, 分别于试验 24、48、72、96 h 取鱼样 3 尾, 测定其 AchE 活性。

1. 3 湘云鲫脑 AchE 活性测定

1. 3. 1 标准曲线的绘制

分别取氯化乙酰胆碱标准使用液 0. 1, 0. 4, 0. 6, 0. 8, 1. 0 mL 于试管中, 用磷酸缓冲液加到 2 mL, 摇匀, 各加碱性羟胺 4 mL, 振摇 3 min, 然后加 1: 2 盐酸溶液 2 mL, 振摇 2 min, 最后加 0. 37 mol · L⁻¹ 的三氯化铁溶液 2 mL。10 min 后在 525 nm 下以试剂空白调零点, 进行比色测定, 绘制标准曲线 (空白先加 1: 2 盐酸摇匀, 后加碱性羟胺)。

1. 3. 2 湘云鲫脑 AchE 活性测定

用剪刀在湘云鲫脑背面剪三刀, 剥去头顶骨, 用镊子取出脑组织, 称取 0. 4 g, 加入 1 mL 磷酸缓冲液在冰水浴中 (1 ℃—4 ℃) 进行匀浆, 再用磷酸缓冲液稀释至 20 mL, 使每毫升含脑组织 2 mg。

吸取 1 mL 标准应用液于试管中, 加入脑组织匀浆液 1 mL, 放入 37 ℃ 恒温水浴中 20 min, 取出后立即

加入碱性羟胺溶液 4 mL, 充分搅拌, 立即用快速滤纸过滤, 加入 2 mL 1: 2 盐酸和 2 mL 三氯化铁溶液, 充分振摇后, 立即用快速滤纸过滤, 将滤液放入 1 cm 比色皿在 525 nm 波长下以试剂空白调零点测定其吸光度。

1. 4 湘云鲫脑 AchE 活性计算方法

酶活性为每毫克脑组织每小时水解氯化乙酰胆碱的微克分子数, 其计算公式为:

酶活性 = (M - m) × 3 / 2 (μmol · mg⁻¹ · h⁻¹)
式中: M 为标准应用液中乙酰胆碱的微克分子数; m 为水解后残留的乙酰胆碱的微克分子数; 3 为作用时间 20 min 除 60 min 所得数, 2 为加入的脑组织的毫克数, 数据均由 3 次试验的平均值和标准差表示。

2 试验结果与分析

2. 1 不同浓度农药同一时间对湘云鲫脑 AchE 活性影响

不同浓度农药同一时间对湘云鲫脑 AchE 活性影响的试验结果如表 1。

表 1 不同浓度农药同一时间处理湘云鲫的 AchE 活性
Table 1 AchE changes in Xiangyunji - fish treated with identical time at different dosages of pesticide concentrations used

项目	处理浓度		AchE 活性	抑制率
	/mg · L ⁻¹		/μmol · mg ⁻¹ · h ⁻¹	/%
克百威	CK		2. 94 ± 0. 02	
	处理 1	0. 20	2. 50 ± 0. 12	14. 8
	处理 2	0. 25	2. 38 ± 0. 18	19. 0
甲基对硫磷	处理 3	0. 30	2. 27 ± 0. 36	22. 7
	处理 1	1. 5	1. 98 ± 0. 21	32. 5
	处理 2	2. 0	1. 77 ± 0. 11	39. 7
克 + 甲	处理 3	2. 5	1. 66 ± 0. 09	43. 6
	处理 1	0. 20 + 1. 5	1. 79 ± 0. 15	39. 2
	处理 2	0. 25 + 2. 0	1. 60 ± 0. 12	45. 6
	处理 3	0. 30 + 2. 5	1. 46 ± 0. 27	50. 2

注: 表内数据为 3 次试验测定平均值 ± 标准差。

由表 1 可以看出, 同一时间内, 同种农药对 AchE 的抑制率随着浓度的升高而增加。同为 1/3—1/6 LC₅₀ (96 h) 浓度处理 96 h 后, 克百威对 AchE 的抑制率明显低于甲基对硫磷, 两种农药混合使用后, 它们对 AchE 的抑制率高于两种农药单独作用对 AchE 的抑制率, 协同作用效果显著。

2. 2 同一浓度农药不同时间对湘云鲫脑 AchE 活性影响

同一浓度农药不同时间对湘云鲫脑 AchE 活性影响的试验结果如表 2。

表 2 同一浓度农药不同时间对 AchE 活性影响

Table 2 AchE changes in Xiangyunji – fish treated at identical dosage with different times								
处理	24 h		48 h		72 h		96 h	
	AchE 活性	抑制率	AchE 活性	抑制率	AchE 活性	抑制率	AchE 活性	抑制率
CK	2. 82 ± 0. 18		2. 84 ± 0. 15		2. 85 ± 0. 09		2. 91 ± 0. 12	
处理 1	1. 95 ± 0. 12	30. 9	2. 17 ± 0. 15	23. 6	2. 26 ± 0. 27	20. 5	2. 34 ± 0. 07	19. 4
处理 2	1. 98 ± 0. 09	29. 7	1. 80 ± 0. 21	36. 5	1. 76 ± 0. 18	38. 2	1. 75 ± 0. 22	39. 4
处理 3	1. 87 ± 0. 15	33. 6	1. 73 ± 0. 06	39. 2	1. 61 ± 0. 13	43. 6	1. 58 ± 0. 25	45. 4

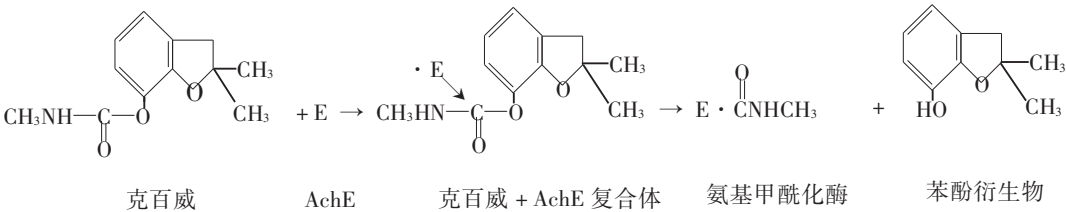
注:表内数据为 3 次试验测定平均值 ± 标准差,酶活性单位为 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。

由表 2 可以看出克百威对 AchE 的抑制率在 24 h 处即达到最高 (30. 9%), 随着时间的延长, 对 AchE 的抑制率下降; 甲基对硫磷对 AchE 的抑制率随着时间的延长而增加, 在试验结束时 (96 h) 达到最高值 (39. 4%)。克百威和甲基对硫磷混合使用后对 AchE 的抑制率比两种农药单独使用对 AchE 的抑制率都要高, 但两种农药在处理 24 h 后, 对 AchE 的抑制率与克百威对 AchE 的抑制率比较接近, 两种农药的协同作用不显著。随着时间的延长混合物对 AchE 的抑

制率显著高于克百威的抑制率, 两种农药的协同作用显著。

3 讨论

3. 1 克百威与湘云鲫脑 AchE 活性抑制的关系
克百威属于神经毒剂, 它本身及主要代谢产物 3 – 羟基克百威都是有力的胆碱酯酶抑制剂。它对胆碱酯酶的抑制是乙酰胆碱酯酶活性中心酯解部位上丝氨酸的羟基被甲酰化了的结果, 其反应式为:

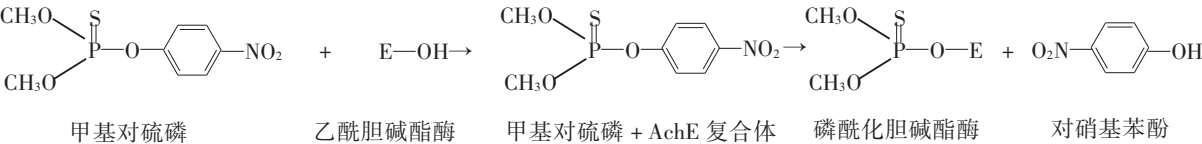


由于 AchE 氨基甲酰化后, AchE 失活, 导致突触部位大量积累乙酰胆碱, 突触后膜的乙酰胆碱受体不断地被激活, 突触后神经纤维长时期处于兴奋状态, 同时突触部位的正常神经冲动传导受阻塞, 中毒后的生物最初出现高度兴奋、痉挛、最后死亡。

外源性化学物质进入生物体内之后, 在初始时, 是一个富集占主动的过程, 分解量小于富集量, 生物体内的克百威浓度逐步增加, 所以 AchE 活性的抑制是逐渐加大的。随着克百威富集到某一最高浓度后, 分解量开始大于富集量, 分解作用开始占优势, AchE 活性出现一个逐渐恢复的过程。在不同浓度农药同一时间对 AchE 活性影响试验中, 由于浓度增加, 促使 AchE 氨基甲酰化加快, 游离的 AchE 减少, 导致其活性下降。在同一浓度不同时间农药对 AchE 活性影响

试验中, AchE 活性在 24 h 内即达到最低值, 随后逐渐恢复。美国 R. G. 库尔报道^[5], 氨基甲酸酯类农药进入生物体之后, 会很快通过水解、氧化 (依靠 O₂ 及 NADPH)、结合作用等代谢过程, 使之转变为可溶性成分, 从而易于排泄出去。Oonnithan, E. S 等人^[6]通过应用大鼠肝脏混合功能氧化酶系统与一系列氨基甲酸酯杀虫剂相互作用指出, N – 甲基羟化作用是氨基甲酸酯杀虫剂在生物体内的一种重要代谢过程, 从而使生物体内该农药浓度很快降低。

3. 2 甲基对硫磷与湘云鲫脑 AchE 活性抑制的关系
甲基对硫磷的中毒机理是由于静电吸引等因素, 使之和酶结合成为酶 – 抑制剂复合体, 然后脱去甲基对硫磷的一部分而生成磷酰化胆碱酯酶, 其过程为:



磷酸化胆碱酯酶已丧失催化乙酰胆碱水解的能力,使神经末梢蓄积乙酰胆碱,乙酰胆碱又使受体过度兴奋而出现中毒症状。

甲基对硫磷在初始阶段以富集为主,分解量小于富集量,AchE 的抑制率也逐渐增大,随后由于磷酸化胆碱酯酶自动可逆恢复率小,且甲基对硫磷是以磷酸基与 AchE 相结合使酶磷酸化,甲基对硫磷的水解有利于增加其毒性,因而 AchE 活性抑制率在 24 h 到 96 h 逐渐增大。

3.3 克百威与甲基对硫磷混合物和湘云鲫脑 AchE 活性抑制的关系

两种农药的混合物比单独作用对 AchE 活性的抑制率都要高,但在 24 h 到 48 h 增加幅度不很显著,到 96 h 增加幅度达到最大。产生上述现象的原因可能是因为,在初始阶段,两种农药竞争同一靶标部位的 AchE,由于克百威与 AchE 结合速度大于甲基对硫磷,因此在 24 h 前产生的毒性以克百威为主。随着时间的延长,氨酰化酶很容易水解而恢复活性,但由于甲基对硫磷的存在,恢复活性的 AchE 又马上与之结合,而且经过一段时间后,甲基对硫磷部分水解,水解后的磷酸基更易与 AchE 结合,结果使游离的 AchE

减少,AchE 活性受到更大抑制。

3.4 AchE 活性作为生物学标记物的可行性

实验结果表明,随着农药浓度的增加,AchE 活性抑制率也增加,二者表现出同步性,AchE 活性能反映污染物的影响。而且,当鱼脑 AchE 活性受到明显抑制时,鱼在形体和行为上仍表现正常,因而 AchE 活性具有预警性,完全适合作为监测这两种农药的生物学标记物。

参考文献:

- [1] 徐镜波,何春光,孙刚. 单甲脒农药对湘云鲫脑乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 环境化学,1998,17(1): 55 - 59.
- [2] 李少南,樊德方. 几种淡水湘云鲫脑乙酰胆碱酯酶的动力学特征[J]. 中国环境科学,1997,17(2): 163 - 165.
- [3] Wallace K B. Reaction and aging of phosphorylated brain acetylcholinesterase from fish and rodents[J]. *Toxicology and Pharmacology*, 1988, 12: 307 - 314.
- [4] Hoy T. Inhibition of acetylcholinesterase in rainbow trout following dichlofos treatment at different water oxygen levels[J]. *Aquaculture*, 1991, 95: 33 - 40.
- [5] R J 库尔, H W 多鲁夫. 氨基甲酸酯杀虫剂的化学、生物化学及毒理学[M]. 北京:化学工业出版社,1984.
- [6] Oonnithan E E. Metabolites of methyl and dimethylcarbamate insecticide chemicals as formed by rat liver microsomes[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1966, 1: 59.

欢迎订阅 2003 年《农业环境与发展》

《农业环境与发展》是由中国农业生态环境保护协会、农业部环境保护科研监测所和全国农业环境保护科技信息网联合主办的国家级综合指导类科技期刊。该刊积极宣传我国农业生态环境保护有关政策,及时报道生态农业建设与无公害农产品生产的发展,在农业生态环境保护工作中发挥宣传指导作用。该刊主要刊登我国农业生态环境保护的方针政策、管理经验,监测与评价方法,生态农业建设理论与实践以及无公害农产品生产技术,农业环境信息、动态等。同时,《农业环境与发展》在重要版面上宣传各地农业环境保护成就并承办各类相关广告业务。

《农业环境与发展》为双月刊,48 页,大 16 开,逢双月 25 日出版,刊号 ISSN 1005 - 4944, CN12 - 1233/S,全国发行,各地邮电局(所)均可订阅,邮发代号 6 - 40,每本定价 6.00 元,全年 36.00 元。有漏订者可直接与编辑部联系订阅。本刊现有 1999—2000 年度合订本,定价 60.00 元/册(含邮资),2001 年合订本每册 50 元(含邮资)需订购者请直接从邮局汇款至编辑部订阅(务请在汇款单上注明订户详细地址及需订内容)。

编辑部地址:天津市南开区复康路 31 号 邮政编码:300191 电话:022 - 23674336

传真:022 - 23367139 E-mail: caed@public.tpt.tj.cn

欢迎订阅《农业环境科学学报》(原《农业环境保护》)

《农业环境科学学报》(原《农业环境保护》)是由农业部主管、中国农业生态环境保护协会主办的全国性学术期刊。是中国科学引文数据库核心期刊,列于被引频次最高的中国科技期刊 500 名之内并入编《中国学术期刊(光盘版)》。本刊主要刊登农业生态环境保护领域的科研新成果、新理论,防治污染、保护生态的新技术和新方法。包括研究报告与简报、专论与综述、实用技术与国内外动态信息等。读者对象为从事农、林、牧、乡镇企业、环保、卫生、城建等工作的科技人员、院校师生。

《农业环境科学学报》为双月刊,大 16 开,128 页,每本定价 12.00 元,全年定价 72.00 元。国内外公开发行,全国各地邮局征订,邮发代号 6 - 64。如读者在当地邮局漏订,可通过邮局汇款至本刊编辑部补订。此外,编辑部存有 2000 年以前的各卷合订本(1999 年以前每本 50 元,2000 年每本 80 元),欢迎选购。编辑部地址:300191 天津市南开区复康路 31 号 电话:(022) 23674336 传真:(022)23367139 电子信箱: caep@public.tpt.tj.cn