

有机磷化合物的生物膜毒性效应

袁玉坤 张 铨

(北京医科大学、公共卫生学院卫生毒理学教研室)

提 要

有机磷化合物对生物膜的毒性效应可能在其非胆碱能毒性中具有重要作用。本文概述了有机磷化合物的生物膜毒性效应的基础以及其对生物膜的生物化学性质和生物物理特性的影响。

有机磷化合物的急性毒性主要归因于对胆碱能神经突触后膜上乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的抑制,造成突触间隙乙酰胆碱 (ACh) 蓄积,后者持久地作用于乙酰胆碱受体 (AChR),而引起一系列的胆碱能神经兴奋症状。然而,有机磷化合物的所有毒性效应并非都能用胆碱能作用机制所解释。文献资料表明,有机磷化合物的某些毒性与其对 AChE 的抑制程度无平行关系^[1]。昆虫毒理学的研究结果也表明 AChE 的抑制并不是有机磷化合物引起昆虫中毒和死亡的唯一原因^[2]。鉴于目前对此尚未研究清楚,故统称为有机磷化合物的非胆碱能毒性作用。有机磷化合物对生物膜的影响可能在上述毒性中起重要作用。本文拟就近年来有关有机磷化合物生物膜毒性效应的研究作一概述。

一、有机磷化合物致生物膜毒性效应的基础

有机磷化合物种类繁多,但基本结构相同,因而具有一些类似的理化性质。首先,有机磷化合物多具有较好的脂溶性,这种特性使它们可能掺入生物膜的脂区中,影响膜的结构、功能、生物化学及生物物理性质。Antunes-Madeira^[3]研究证明,对硫磷 (parathion) 可掺入到人工膜及天然生物膜的脂区中,掺入量受膜脂的组成 (尤其是胆固醇的含量)、膜脂流动性及温度

的影响。而对硫磷的掺入可使膜热相变温度改变。在研究有机磷和有机氯化物对昆虫骨骼肌肌质网钙泵的影响时,也发现这些化合物对钙泵的影响程度与它们在己烷中和生物膜中的分配系数有一定的关系。其次,有机磷化合物具有磷酸化和烷基化两种性能^[4],当有机磷化合物与膜 AChE 络合, P-X 键断裂脱下 X 基团,即形成磷酸化酶,使 AChE 活性丧失。同时也可能使其它膜酶或膜蛋白磷酸化,而 AChE 或膜蛋白磷酸化尤其是酶老化时,可能会引起膜表面电荷的变化。不仅如此,有机磷化合物与 AChE 形成络合物后,其 R-O 键或 X 基团中所含有的 O-C 键亦可断裂而脱下烷基,脱下的烷基往往是有活性的烷化剂,特别是那些能够形成环状结构的碳离子均是烷基化能力较强的烷化剂。烷化剂可使含-SH 酶或蛋白烷基化。因此,有机磷化合物的烷化性能可能是抑制某些含-SH 酶活性的原因。此外, R-O 键断裂脱烷基也可能是 AChE 老化的原因。其三,有机磷化合物对 AChE 的抑制,导致突触间隙 ACh 蓄积,实验证明 ACh 可以增强神经组织的磷脂转换 (turnover, 主要限于磷脂酰肌醇和磷脂酸)。Lapetine 等认为 ACh 刺激磷脂酰肌醇的转换,可能与突触膜流动性变化有关。因此, Davis 推测有机磷化合物很有可能间接或直接地促进磷脂酰肌醇和/或磷脂酸

的代谢而改变突触膜的通透性,并由此影响突触联系。他们研究有机磷化合物对参与磷脂酰肌醇和磷脂酸代谢的二酰基甘油激酶(diacylglycerol kinase)及磷脂酰肌醇磷酸二酯酶(phosphatidylinositol phosphodiesterase)活性影响的结果似乎支持他们的推测^[7]。上述性质即构成了有机磷化合物的生物膜毒性效应的基础。

二、有机磷化合物的膜毒性表现

1. 有机磷化合物对膜生化性质的影响

有机磷化合物对膜生化性质影响的一个主要方面即是对膜酶的影响。除特异性地抑制 AchE 外,对多种组织的 ATPase 亦有作用^[6]。TOTP (tri-*o*-tolyl phosphate)、速灭磷对鸡脊神经索突触体 Na^+ , K^+ -ATPase 和 Mg^{2+} -ATPase, 对硫磷对大鼠膈肌肌质网 Ca^{2+} -ATPase 和 Mg^{2+} -ATPase 以及梭曼和 DFP 对大鼠脑皮质 Na^+ , K^+ -ATPase 都有抑制作用。并有时间、剂量依赖关系。且同一种 ATPase 对不同的有机磷化合物的反应不一,同一种有机磷化合物对不同的 ATPase 的抑制能力也不同。而且,有机磷化合物对 ATPase 的抑制能力与其抗胆碱酯酶活性不成平行关系。如 TOTP 不抑制 AchE 活性却可抑制 Mg^{2+} -ATPase 和 Na^+ , K^+ -ATPase 的活性。对硫磷对 Ca^{2+} -ATPase 的抑制能力较对氧磷强,但其抗胆碱酯酶活性却弱于后者许多。相反,也有报道 DFP 可使大鼠脑和肾匀浆微粒体组分 Na^+ , K^+ -ATPase 活性增加,对硫磷、谷硫磷使昆虫骨骼肌肌质网钙泵活性增加^[7]。

腺苷酸环化酶(AC)和鸟苷酸环化酶(GC)是参与环核苷酸代谢的另一类重要膜酶,它们与磷酸二酯酶(PDE)一起调节组织中环核苷酸的水平。在某些有机磷化合物中毒时,动物常常出现类似于甲基黄嘌呤类(如咖啡因)中毒的症状并伴随有血浆及脑组织中 cAMP、cGMP 和 cAMP/cGMP 比值的变化。说明有机磷化合物可能干扰了参与环核苷酸代谢的酶系统。Sëvaljevic 等发现,大鼠 VX 或

梭曼中毒时,血浆和脑组织中的 cAMP 及 cGMP 含量均明显增加。而血浆中 cAMP 水平升高与红细胞 AchE 活性抑制程度之间呈相关关系。用 HI-6 (bisquaternary monoxime) 治疗 VX 中毒大鼠,随着红细胞膜 AchE 活性的恢复,血浆 cAMP 水平相应地降至近于正常。而梭曼中毒用 HI-6 治疗,既无红细胞 AchE 活性的重活化,也无 cAMP 水平的恢复。提示调节血浆 cAMP 水平的机理和调节 AchE 活性的机理是相联系的。用利血平预处理动物,可以明显减少 VX 中毒所引起的 cAMP 水平升高,说明儿茶酚胺可能是 VX 中毒时使 cAMP 水平升高的原因之一。因此作者认为可能是有机磷化合物对 AchE 的抑制,导致 Ach 增加,Ach 诱导儿茶酚胺释放,后者再活化 AC 活性,使 cAMP 生成增加。后来他们进一步证明梭曼中毒大鼠脑突触体膜磷酸化比对照增加,AC 活性增高^[8]。Deli 等^[9]也发现 Wofotox 50 EC 在有 GPP(NH)P 或异丙肾上腺素和 GTP 共存时,可刺激鸡胚胎肌肉组织的 AC 活性,使 cAMP 水平增加。而 Coult 等认为梭曼所引起的 cAMP、cGMP 增加可能是梭曼既干扰了胆碱能系统,又干扰了 GABA 能系统,即梭曼抑制 AchE,导致 Ach 增加,刺激 cGMP 释放,后者反馈性刺激 GABA 受体,GABA 再刺激 cAMP 的释放,结果是 cAMP、cGMP 均增加。按照上述观点,凡能抑制 AchE 的有机磷化合物都应引起环核苷酸代谢的变化。实际上,双环有机磷化合物 IPTBO (4-isopropyl-2, 6, 7-trioxo-1-phosphabicyclo [2, 2, 2]octone) 并无抗胆碱酯酶活性,却可使小鼠脑组织中 cGMP 水平升高,cAMP 水平下降。有趣的是,有人发现 DFP 可降低脑、心组织中 cAMP 含量,同时可抑制 AC 活性。国内也有报道倍硫磷可使血浆中 cAMP、cGMP 含量降低,cAMP/cGMP 比值增加。这说明有机磷化合物对细胞膜环化酶的影响可能因结构而异。

此外,有机磷化合物对其它膜酶的影响可能与其毒性也有一定的关系。如对脂酶的影响

可能引起膜脂组成和含量的变化。对神经毒酯酶的抑制可能是发生迟发性神经毒的生化基础。

有机磷化合物对膜生化性质影响的另一个方面是对膜脂质的作用,包括膜脂组成变化和脂质过氧化。关于膜脂组成的变化,已有文章详述,本文不再赘述。至于有机磷化合物有无脂质过氧化作用目前报道尚少。Matkovis等^[10]曾报道敌百虫和杀螟磷可使肝脂质过氧化增强,超氧化物歧化酶活性增加,尚可使缺乏维生素A膳食动物的肝脏维生素A含量进一步降低。提示这两个化合物可能对肝脂质过氧化有影响。Islam等^[11]报道甲基内吸磷能使大鼠大脑某些区域的脂质水平下降,脂酶活性和脂质过氧化增加。相反也有阴性报道。

2. 有机磷化合物对膜通透性及离子转运的影响

Antunes-Madeira等发现在 10^{-3}mol/L 的对硫磷作用下,脂质体在尿素和赤藓醇的等渗液中可发生明显的渗透肿胀,而在不可透性的电解质如钠、钾和钙的醋酸盐等渗液中并无渗透肿胀增加,但当加入各自特异的离子载体如缬氨霉素和ionophore X-537A时,即可见渗透肿胀增加。此后他们还观察了有机磷化合物对猪红细胞及红细胞膜提取脂脂质体通透性的影响^[12],发现对硫磷、谷硫磷明显增加红细胞在高渗甘油中的始相肿胀速率。在 0.5mol/L 甘油溶液中,对硫磷等使红细胞溶血率或胞内 K^+ 外漏出量均明显增加,而脂质体内 K^+ 则完全漏出。相比之下,由红细胞膜提取脂制备的脂质体比完整红细胞对对硫磷的作用更敏感。结果表明,有机磷化合物可使脂质体膜和红细胞膜对非电解质和离子载体复合物的通透性增加,而脂质体与完整红细胞对有机磷化合物的敏感性差异则提示脂质-蛋白质的相互作用在膜通透性调节过程中具有重要作用。然而,他们在标准低渗盐水溶血试验时,却发现对硫磷等对猪红细胞膜具有保护作用。作者认为这种作用可能是由于有机磷化合物与膜蛋白结合,导致蛋白、脂质分区,从而减少了脂质与蛋白相接界面

连续性缺陷的数目,并加强了脂质-脂质间及蛋白质间的相互作用,由此增强了膜的强度,相应地使膜对渗透损伤的抵抗力增强。以往研究表明,脂膜对非电解质的通透性与膜脂流动性呈函数关系。既然有机磷化合物使膜对非电解质通透性增加而无明显的脂膜损伤,且对不透性电解质只有在特异性载体存在时才有通透性的增加,说明有机磷化合物似乎并不引起去污剂样对膜的永久性损伤。因此,Antunes-Madeira等推测有机磷化合物使膜对非电解质及离子载体复合物的通透性增加可能是由于有机磷化合物使膜脂流动性增加所致。

有机磷化合物不仅影响膜对物质的被动转运,而且对离子的主动转运也有影响。Huddart等^[13]报道较低浓度对硫磷就可明显抑制阴虱或蟑螂等昆虫骨骼肌肌质网钙泵对钙的摄取,而且可使已摄取的钙又重新释放,说明对硫磷对肌质网的整个钙富集系统有直接作用。后来,他们进一步发现在接近体内钙浓度的情况下,肌质网对钙的结合能力要比线粒体强,而线粒体摄钙受到有机磷化合物的抑制却比肌质网更敏感。同时还发现在体内条件下当肌质网无钙可释放时,有机磷化合物尚可诱导线粒体内钙的释放。因此,他们认为对硫磷所引起的肌细胞内游离钙浓度的增加以及随之发生的肌肉收缩,可能主要是由于对线粒体钙主动摄取的抑制所致。但是,Antunes-Madeira等^[7]却发现,对硫磷与谷硫磷等可明显刺激肌质网钙泵的活性,使钙摄取、ATP水解及 $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ 比率均明显增加,而且这些效应与它们对膜通透性的影响以及对哺乳动物的某些毒性基本一致。他们认为,既然有机磷化合物可改变膜脂流动性而引起膜对非电解质和离子载体复合物通透性的增加,那么有机磷化合物对肌质网膜可能也有同样的影响,推测有机磷化合物与肌质网的相互作用,可能使得肌质网膜处于一种适合于钙泵发挥活性的流动性或粘度,也可能是影响了脂质-蛋白质的相互作用,从而给酶(钙泵)提供了一个有利于其活性的适当构象,因而肌质网钙泵活性增加。作者认为由此可以解释有机

磷化合物中毒时一些生理效应的变化如肌肉麻痹。不仅如此, Gauna 等^[14]还发现对硫磷在尚未抑制狗红细胞和肾组织 AchE 活性的剂量下,即可使肾小球钠排泄量明显增加,钾排泄量明显减少,除了尿量有轻微增加以外,其它各参数(包括肾小球滤过率、肾血流、滤过物成分及血浆钠浓度)都无变化,而且所给的对硫磷剂量远远低于能够抑制 Na^+ , K^+ -ATPase 的剂量。作者认为这可能是由于低剂量对硫磷引起肾小管膜的结构变化,从而减少了钠的重吸收。这进一步说明有机磷化合物可直接影响膜的主动转运。

有机磷化合物除直接影响膜的离子转运外,在神经突触连接处,还可通过 Ach 的作用间接影响突触膜的离子转运。由于 AchE 受到抑制,突触间隙 Ach 蓄积,而引起持久的 Na^+ 、 Ca^{2+} 内流及 K^+ 外流,由此引起一系列生理效应的变化。

3. 有机磷化合物对膜生物物理性质的影响

膜脂流动性与膜的通透性有密切关系。前已提及,有机磷化合物使人工膜对非电解质及离子载体复合物通透性的增加可能就是由于膜脂流动性变化的结果。Domench 等^[15]根据膜结合酶的 H 系数(即 n 值)与膜脂流动性的关系,首次报道马拉硫磷、对硫磷在尚未抑制大鼠红细胞膜 AchE 的浓度 (10^{-7} — 10^{-9} mol/L),即可引起红细胞膜脂流动性下降及膜结合性 AchE 变构行为的改变。此后,尚有人报道 DFP 和沙林可降低电鱼肌纤维膜 (electroplax membrane) 的胆固醇与磷脂比例,提示它们也可改变膜脂流动性。

有机磷化合物亦可影响膜相变温度及诱导相分离。Antunes-Madeira 等^[16]报道对硫磷、谷硫磷与脂双层脂质体相互作用,使膜热相变温度明显向低温范围移动,表明膜脂双层无序化增加。这种作用可能与膜脂排列无序性增加伴随磷脂烃链的运动增加有关。脂双层疏水核心区无序化的增加通过 Vander Waals 引力和降低膜脂粘度而减弱了脂肪酸链间的相互作用,这样就造成脂屏障的减弱或瞬间缺失,由此

引起膜通透性的增加。这同有机磷化合物使人工膜对非电解质和离子复合物通透性增加而无膜完整性破坏的现象是一致的。作者发现有机磷化合物对短链脂的影响比对长链脂的影响更明显,认为在衡量有机磷化合物与膜脂这种相互作用的程度时,似乎脂链的长度比脂的头部组成更为重要。除相变温度的变化,对硫磷等尚可诱导 DMPC 和 DSPC 两种混合脂膜发生双相相变即相分离。混合脂膜中某些组分在较低温度范围内就发生了相变成为流动相,而其余仍保持凝胶状。对硫磷等更易于与由短链磷脂组成的流动性大的流动相作用。既然天然生物膜中有较多量的流动脂,因此作者预测有机磷化合物可能更易于与流动性高的膜脂作用而引起相分离。相分离在生物膜平面中液-固界面引入侧向异性 (lateral heterogeneity) 提供了一条途径。这些效应可能导致侧向压缩性 (lateral compressibilities) 和侧向扩张性 (lateral extensibilities) 出现,并由此影响生物膜的生理功能。作者还观察到对硫磷等能部分地消除胆固醇对热相变的影响,提示对硫磷等可干扰胆固醇-膜脂的相互作用。另一方面,膜相变又影响对硫磷掺入膜中的量^[3]。在相变温度范围内,对硫磷掺入膜中的量最大。可能相变时,凝胶相与液晶相共存,脂链高速摆动,邻近相的有序摆动可能引起有序区 and 无序区间的瞬间缺陷,从而利于外来分子掺入。此外,相变时的侧向压缩性和侧向扩张性可能也有益于对硫磷的掺入。当然,这种掺入反过来又影响膜脂热相变温度。

有机磷化合物对生物膜的电学特性也可间接地或直接地产生影响。当 AchE 受到抑制,突触间隙内 Ach 浓度增加, Ach 可直接作用突触后膜,引起快兴奋性突触后电位,也可干扰环核苷酸代谢而影响慢抑制性突触后电位及慢兴奋性突触后电位。有机磷化合物还可发挥改变递质释放的突触前效应而使微小终板电位频率改变。有机磷化合物也可直接与膜作用而影响膜表面电荷。Toia 等^[17]发现有机磷化合物使 α -糜蛋白老化后,蛋白电泳现象明显不同

于老化前,说明蛋白分子纯电荷发生了变化。这提示有机磷化合物使膜 AchE 或其它膜蛋白老化时,可能也会引起膜电荷的变化。Bradburg 和 Haddart^[13] 先后都观察到对硫磷等可明显使甲虫类肌纤维膜电位去极化。本室研究表明,久效磷等可增加红细胞膜表面唾液酸测定量,也提示有机磷化合物可能影响红细胞表面电荷。

有机磷化合物的膜毒性除以上三方面的表现外,它们对膜受体的影响也是近年来人们所重视的一个重要问题。已有研究发现,某些有机磷化合物急性中毒和慢性中毒对膜受体的影响是不同的^[18-20]。乙拌磷(disulfoton)亚急性染毒两周,可明显减少动物脑和腺体组织中的胆碱能M受体和脑组织中N受体的数目,但受体与其特异性配体的亲和力并无改变。同样,对氧磷(paraoxon)和DFP等亚急性染毒也可使大鼠脑组织中M受体和N受体数目明显减少而无受体亲和力的变化。但一次性急性染毒却无上述效应。此外,有机磷化合物还可作用于突触前受体而影响神经递质的释放。这些结果可以解释动物对某些有机磷化合物产生耐受性的现象。

综上所述,有机磷化合物可以从多方面直接和/或间接地影响生物膜的结构、功能和生物物理性质。然而,这方面的研究还只是起步不久,研究还不完善,但值得注意的是,有关有机磷化合物的生物膜毒效应与迟发性神经毒的关系、有机磷化合物生物膜毒效应的构效关系、有机磷化合物对膜受体的直接作用与其毒性的关系、有机化合物的生物膜毒效应在非胆碱能毒

性中的地位以及如何利用生物膜指标来评价高效低毒的有机磷农药和其毒性的防治等等方面的研究在今后的研究中将可能占有重要地位。

参 考 文 献

- [1] Marquis, J. K.: *TIPS*, 1985, 6, 59.
- [2] 童建:《农药》,1988,27,48。
- [3] Antunes-Madeira, M. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 778(1), 49.
- [4] 江藤守総著(杨先石等译):《有机磷农药的有机化学与生物化学》,化学工业出版社,北京,1981,66—196页。
- [5] Davis, D. B. et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1983, 20, 92.
- [6] Binder, N. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 1976, 25, 835.
- [7] Antunes-Madeira, M. C. et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1982, 17, 185.
- [8] Sevaljevic, L. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 1984, 33, 3714.
- [9] Dell, E. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 1986, 35, 1603.
- [10] Matkovis, B. et al.: *General Pharmacol.*, 1980, 11, 353.
- [11] Islam, F. et al.: *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1983, 53, 121.
- [12] Antunes-Madeira, M. C. et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1981, 15, 79.
- [13] Huddart, H. et al.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 1977, 58c, 91.
- [14] Gauna, H. F. et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1982, 18, 271.
- [15] Domench, C. E. et al.: *FEBS Lett.*, 1977, 74, 243.
- [16] Antunes-Madeira, M. C. et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1980, 14, 161.
- [17] Toia, R. F. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 1979, 28, 3307.
- [18] Costa, L. G. et al.: *Chem-Biol. Interact.*, 1984, 48, 261.
- [19] Thomsen, R. H. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1986, 237(3), 689.
- [20] Lim, D. K. et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1987, 90, 465.

[本文于1987年12月28日收到]

(上接第161页)

参 考 文 献

- [1] 李泳棠等:《生物化学与生物物理学报》1988,20,504
- [2] Durlach, J.: *Lésion diabétiques et apport magnésique Le magnésium en pratique clinique*, J.B.

- Baillere, (ed.), E. M. I. Paris, 1985.
- [3] Dodge, J. T. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, 100, 119.
- [4] Kriauciunas K. M. et al.: *Diabetes*, 1987,36,164

[本文于1987年12月28日收到]