

敌敌畏对大鼠膈肌的直接毒性作用

张英鸽^{1*}, 王建华², 刘艳芹¹, 郑丽丽³

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 北京军医学院, 北京 100071;
3. 河北医科大学第二附属医院心内科, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 观察敌敌畏是否对膈肌具有直接抑制作用。方法 用自制双功能电极刺激膈神经或直接刺激离体大鼠膈肌, 引起膈肌收缩, 观察农药敌敌畏对膈肌的直接抑制作用。用箭毒阻断神经肌肉接头后, 刺激膈神经不再引起膈肌收缩, 直接刺激膈肌引起的收缩与神经肌肉接头无关, 对这种收缩的影响为对膈肌的直接作用。结果 10 V 直接刺激膈肌出现类似于强直收缩的波形。敌敌畏浓度大于 1.45 mmol·L⁻¹ 时可使该收缩显著抑制, 4.34 mmol·L⁻¹ 时抑制 80%, 5.79 mmol·L⁻¹ 完全抑制, 氯磷定不能减轻之。浓度大于 3.62 mmol·L⁻¹ 的敌敌畏对单收缩也有明显抑制。结论 敌敌畏对膈肌具有与神经肌肉接头阻断无关的直接抑制作用。

关键词: 有机磷化合物; 敌敌畏; 膈; 神经肌肉接头

中图分类号: R996

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)01-0065-05

呼吸肌麻痹是有机磷酸酯类农药中毒引起死亡的重要原因之一^[1]。一般认为有机磷酸酯对膈肌的抑制作用主要是由于乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)在突触间隙的过多积聚, 使 N 受体受到过度刺激而过度兴奋, 继而失敏而使神经肌肉接头的突触传递被阻断^[2], 但近来认识到在中间综合征中, 肌肉收缩机能的抑制可能是突触后的^[1]。对于有机磷酸酯类中毒的药物治疗, 主要是抗胆碱药阻断 ACh 对 M 受体的兴奋作用和用胆碱酯酶重活化剂解除抑制剂对乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的抑制^[3]。在研究有机磷毒剂对膈神经-膈肌标本的收

缩功能时, 作者曾注意到, 在毒剂浓度相当大时, 重活化剂不能有效地对抗有机磷酸酯类对膈肌的抑制作用。在临床上, 尽管采用正确的治疗原则, 有的重度有机磷中毒患者仍然不能避免死亡。虽然有关报道中都把这些死亡归结于各种各样的原因, 但颇多牵强。有机磷中毒患者的有些症状, 如中间综合征等^[1, 4]用胆碱能神经系统的阻断来解释也不能令人满意。中间综合征发生于胆碱能危象之后和延迟性多发性外周神经损伤之前, 其基本特征是肢体近端肌肉及颈曲肌的无力, 通常伴有颅神经的麻痹, 在严重的情况下累及呼吸肌^[1, 4]。对于中间综合征肌无力发生的原因, 虽然其发现者 Senanayake 等认为可能是突触后的, 但在此后近 20 年的研究中, 并未找到直接的证据。由此作者提出了这样的问题: 有机磷毒剂对膈肌是否有直接的抑制作用? 重活化剂对这种抑制作用是否有对抗作用? 本研究对最常用的有机磷杀虫剂之一敌敌畏(dichlorvos)对膈肌的神经肌肉接头后抑制作用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

筒箭毒碱(tubocurarine), Cari Roth Karlsruhe 产品; 80% 敌敌畏标准乳液, 河北新丰农药化工股份有限公司; 氯磷定(pralidoxime)由本研究所合成; 苯为北京益利精细化学品有限公司产品, 批号 970226。其他试剂均为市售分析纯。膈肌-膈神经双功能刺激电极为自行设计, 由军事医学科学院仪器厂制备: 四根铜导线自一个有机玻璃四棱柱的一端穿入。两根在距另一端 1.5 cm 处穿出并与两个白金制成的圆环相连, 作为刺激神经的电极; 另两根自另一端的底部穿出并弯曲成钩, 既作悬挂膈肌之用, 又作直接刺激膈肌的电极(图 1)。

1.2 膈肌-膈神经标本制备

取 Wistar 大鼠(体重 180 ~ 220 g, 本院动物中心

收稿日期: 2001-09-06 接受日期: 2002-04-23

作者简介: 张英鸽(1958 -), 男, 河南郑县人, 副研究员, 医学博士, 主要从事药理学与毒理学研究。

* 联系作者 Tel: (010)66931623, Fax: (010)68211656,
E-mail: zhangyg@nic.bmi.ac.cn

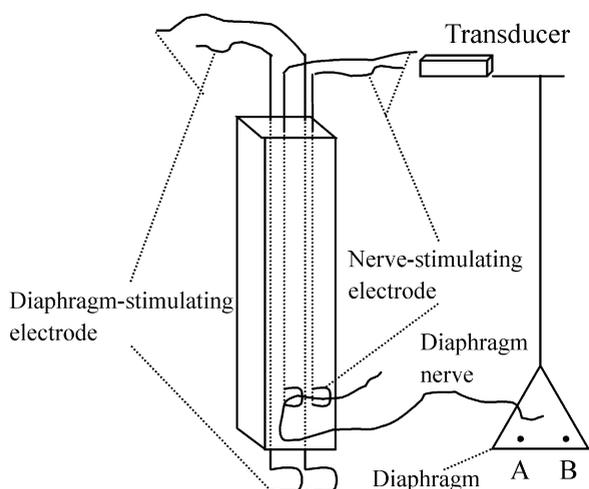


Fig 1. Schematic illustration of the double-function electrode to stimulate diaphragm nerve and diaphragm muscle at the same time. The fan-shape diaphragm was hung onto the hook of the diaphragm-stimulating electrode through sites A and B. Diaphragm nerve was passed through the two circles of the nerve-stimulating electrode. The stimulating of the diaphragm muscle and diaphragm nerve may be carried out simultaneously or alternatively.

提供)左前 1/4 膈肌-膈神经标本,中心腱处用 1 号丝线结扎,切下,迅速置台氏液中。以扇形膈肌的边缘处(图 1 中的 A、B 两点)固定于电极下端的肌肉刺激电极钩上,膈神经自刺激神经电极圆环中穿过,然后将其置入含有 50 mL 台氏液的麦氏浴槽中,中心腱通过一丝线悬挂于换能器上。台氏液中通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体。

1.3 刺激膈神经

膈肌在 36℃ 台氏液中稳定 20 min 后,首先使刺激器的输出电极与刺激神经电极相连,刺激膈神经引起膈肌收缩,刺激条件如下,单收缩:波宽 0.05 ms, 3.3 Hz; 强直收缩:连续刺激,延时 0 ms, 波宽 0.05 ms, 50 Hz, 串长 100, 以高出引起最大收缩 2 V 的电压为刺激电压。

1.4 直接刺激膈肌

将刺激器的输出电极与刺激膈肌的电极相连,直接刺激肌肉以引起膈肌收缩。刺激条件与刺激神经相同。因为引起肌肉最大收缩的刺激一般都接近 10 V, 而刺激器的最大电压就是 10 V, 因此刺激电压一律采用 10 V。用此电压能保持膈肌的稳定收缩 5 h 以上,可满足实验需要。

1.5 神经肌肉接头的阻断

在直接刺激膈肌时,不可避免地会刺激到膈肌

中的神经末梢而影响对直接刺激肌肉引起的收缩的观察,因此需要将神经肌肉接头阻断。实验中首先刺激膈神经,引起膈肌最佳收缩后,在浴槽中加入筒箭毒碱(终浓度为 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),使刺激膈神经引起的收缩完全消失。此时直接刺激膈肌引起的收缩即是完全由刺激膈肌引起的(图 2)。

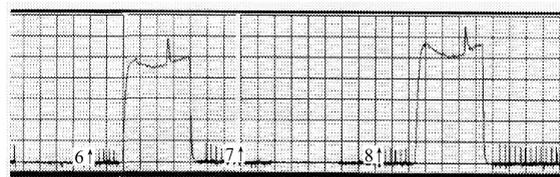


Fig 2. The contraction produced by stimulating diaphragm nerve (symbol 7), which had been completely inhibited to the zero line, and that by directly stimulating the diaphragm of rats (symbols 6 and 8) after the neuromuscular junction has been blocked by tubocurarine. Conditions of the stimulation for tetanic contraction: voltage = 10 V; string length = 100; wave width = 0.05 ms, 50 Hz. Conditions for simple contraction: voltage = 10 V; wave width = 0.05 ms, 3.3 Hz.

1.6 膈肌收缩的记录

膈肌收缩用 MS-302 生理记录仪(广东药学院研制)记录。收缩力以克表示,强直收缩以收缩力和收缩曲线下面积(AUC,即收缩力与持续时间的乘积)表示,单位为克·秒。

1.7 数据处理及统计学方法

未加敌敌畏前刺激膈肌引起的收缩的均数为 100%,每次测定值均与其进行比较以确定其离均差。差异显著性采用 *F* 和 *t* 检验判定。

2 结果

2.1 敌敌畏对直接刺激膈肌收缩的抑制作用

由表 1 结果可见,敌敌畏作用 30 min, 浓度高于 $1.45 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对类似强直收缩的抑制作用明显并有浓度依赖性, $4.34 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制可达 80%。敌敌畏也抑制单收缩。在 $0.724 \sim 2.96 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,虽然有抑制倾向,但不具有统计学显著性。在浓度大于 $3.62 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,其抑制作用具有统计学意义。在 $5.79 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可完全抑制直接刺激膈肌引起的这两种收缩。

2.2 敌敌畏抑制直接刺激膈肌收缩的时间过程

由图 3 结果可见,在浴槽中加入敌敌畏后类似

Tab 1. Inhibitory effects of dichlorvos on the contraction of direct-stimulated rat diaphragm measured at 30 min after the addition of dichlorvos

Dichlorvos /mmol·L ⁻¹	t/min	Tetanus-like contraction				Single twitch/g			
		Strongest force		AUC		Pre-tetanus-like		Post-tetanus-like	
		/g	/%	/g·s	/%	/g	/%	/g	/%
0	0	11 ± 2	100 ± 20	33 ± 7	100 ± 18	4.5 ± 0.5	100 ± 19	4.8 ± 0.6	100 ± 15
	30	11 ± 1	98 ± 14	34 ± 4	104 ± 18	4.7 ± 0.4	104 ± 14	4.6 ± 0.7	97 ± 19
0.724	0	10 ± 2	100 ± 14	29 ± 3	100 ± 22	4.0 ± 0.4	100 ± 13	4.2 ± 0.8	100 ± 17
	30	8 ± 1	83 ± 10	24 ± 3	84 ± 8	3.8 ± 0.3	95 ± 8	3.8 ± 0.2	90 ± 6
1.45	0	9 ± 2	100 ± 21	33 ± 6	100 ± 24	4.3 ± 0.4	100 ± 11	4.7 ± 0.7	100 ± 16
	30	5 ± 1*	56 ± 12*	18 ± 3*	53 ± 9*	3.7 ± 0.5	86 ± 12	3.9 ± 0.3	83 ± 10
2.17	0	10 ± 1	100 ± 12	32 ± 6	100 ± 18	4.6 ± 0.5	100 ± 20	4.7 ± 0.6	100 ± 15
	30	5 ± 1*	47 ± 12*	14 ± 2*	45 ± 6**	3.8 ± 0.4	83 ± 22	4.0 ± 0.5	86 ± 11
2.96	0	12 ± 2	100 ± 13	32 ± 5	100 ± 19	4.5 ± 0.9	100 ± 21	4.7 ± 0.5	100 ± 18
	30	6 ± 1*	53 ± 12*	9 ± 2*	28 ± 6**	3.3 ± 0.9	73 ± 25	3.4 ± 1.7	73 ± 30
3.62	0	10 ± 3	100 ± 25	35 ± 7	100 ± 19	4.4 ± 0.8	100 ± 17	4.5 ± 0.9	100 ± 20
	30	3 ± 1**	29 ± 10**	8 ± 3**	22 ± 7**	3.0 ± 0.7*	69 ± 13*	2.5 ± 0.4*	55 ± 10*
4.34	0	11 ± 1	100 ± 10	33 ± 3	100 ± 11	4.2 ± 0.6	100 ± 14	4.4 ± 0.6	100 ± 13
	30	3 ± 1**	31 ± 8**	6 ± 2**	18 ± 6**	2.9 ± 0.6*	70 ± 13*	2.4 ± 0.6*	54 ± 11*
5.06	0	12 ± 1	100 ± 14	34 ± 5	100 ± 10	4.6 ± 0.4	100 ± 15	4.7 ± 0.3	100 ± 17
	30	1 ± 1**	8 ± 2**	3 ± 1**	9 ± 2**	1 ± 1**	26 ± 6**	0.9 ± 0.2**	19 ± 5**
5.79	0	13 ± 2	100 ± 21	33 ± 6	100 ± 18	4.6 ± 0.9	100 ± 20	4.7 ± 0.8	100 ± 16
	30	0**	0**	0**	0**	0**	0**	0**	0**

t: time after addition of dichlorvos. $\bar{x} \pm s$, $n = 4 - 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with before the addition of dichlorvos(0 min).

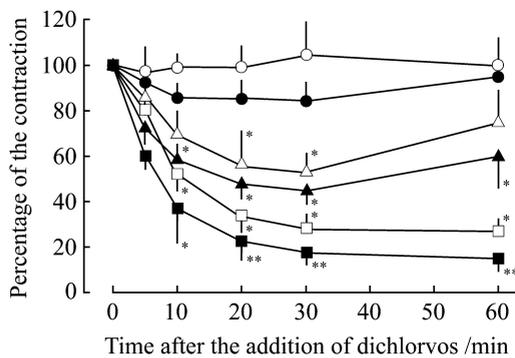


Fig 3. Time course of the dichlorvos inhibition on the tetanic contraction of the diaphragm. (○) control; (●, △, ▲, □, ■) dichlorvos 0.724, 1.45, 2.92, 3.62, 4.34 mmol·L⁻¹, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 4 - 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control.

强直收缩立即被抑制。10 min 后即已很明显,具有统计学显著性,30 min 后达最大值。在较低浓度,60 min 稍有恢复,浓度大于 2.96 mmol·L⁻¹, 60 min 内

一直稳定在最大抑制水平。对单收缩抑制作用的时间过程与对强直收缩的抑制相似。

2.3 苯对直接刺激膈肌收缩的影响

由于实验中所用敌敌畏为 80% 的苯溶液,故单独将苯作用于箭毒阻断神经肌肉接头后的大鼠离体膈肌,观察苯对膈肌是否产生抑制作用。结果表明,1.68 mmol·L⁻¹苯(与 2.17 mmol·L⁻¹敌敌畏浓度相应的苯浓度)可使类似强直收缩和单收缩幅度均增加,表 2 示类似强直收缩 AUC 的变化。5.05 mmol·L⁻¹苯(大于 5.79 mmol·L⁻¹敌敌畏相应的苯浓度)的主要作用是使膈肌基础张力增加,且对单收缩无明显影响(图 4)。

2.4 氯磷定对敌敌畏抑制直接刺激大鼠离体膈肌收缩功能的影响

5.79 mmol·L⁻¹敌敌畏使类似强直收缩完全抑制, AUC 为 0 g·s。在完全抑制后,加入 5.8 ~ 10 mmol·L⁻¹氯磷定作用 10 ~ 40 min, AUC 仍为 0 g·s,表明氯磷定对这种抑制没有明显影响。

Tab 2. Inhibitory effects of benzene on the tetanic contraction of direct-stimulated rat diaphragm

Benzene /mmol·L ⁻¹	t/min	Tetanus-like contraction	
		AUC/g·s	%
1.68	0	35 ± 7	100 ± 20
	10	50 ± 10*	143 ± 30*
	30	53 ± 9*	151 ± 26*
	60	57 ± 5*	164 ± 12*
5.05	0	33 ± 6	100 ± 22
	10	27 ± 5	82 ± 17
	30	26 ± 4	67 ± 14
	60	24 ± 6	72 ± 6

t: time after addition of benzene. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with the contractions before the addition of benzene(0 min).

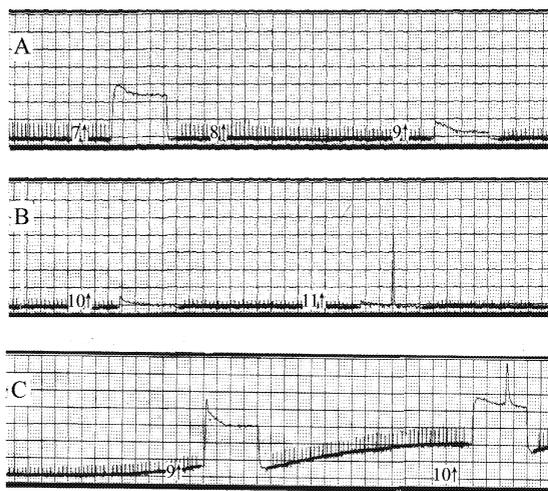


Fig 4. Comparison of the influences of dichlorvos and benzene on the contractions of the rat diaphragm. A: contraction before (7) and immediately after (8, 9) the addition of dichlorvos 5.79 mmol·L⁻¹; B: 30 min after the addition of dichlorvos 5.79 mmol·L⁻¹. The tetanic-like contraction had been almost completely inhibited (10) and simple contraction had also been completely inhibited several minutes later but there was no elevation of the base line; C: contraction at 30 min after the addition of benzene 5.05 mmol·L⁻¹. Its inhibition on the contraction was not significant but there was an obvious elevation of the base line.

3 讨论

一般认为,有机磷农药中毒引起的呼吸肌麻痹是呼吸中枢抑制或大量蓄积的乙酰胆碱对 N 受体过度激动造成受体脱敏所致^[5,6]。但这些研究都是通过刺激膈神经引起膈肌收缩。本研究则建立了既可刺激膈神经,又可刺激膈肌,并能将两者明确分开的电极和实验方法。结果显示,除了文献^[5,6]所述

对神经肌肉接头的阻断作用外,敌敌畏对直接刺激大鼠离体膈肌的类似强直收缩和单收缩也产生抑制作用,并且具有浓度依赖性。这种抑制作用对类似强直收缩影响尤为明显。由于加入敌敌畏前已用筒箭毒碱阻断神经肌肉接头,且收缩是由直接刺激膈肌所引起,所以这一作用与突触传递及胆碱酯酶的抑制无关,而是对膈肌直接作用的结果,可视为 Senanayake 等^[1]关于中间综合征中肌无力突触后可能机制的一个直接证据。

加入浓度为 1.68 mmol·L⁻¹的溶剂苯时,直接刺激膈肌的类似强直收缩和单收缩均增强。此浓度与敌敌畏浓度为 2.17 mmol·L⁻¹时的苯浓度相当,在这样浓度下的敌敌畏对类似强直收缩的抑制已大于 50%。而苯在较大浓度(5.05 mmol·L⁻¹)时,虽可以使收缩 AUC 略有减小,但不具有统计学意义,主要是使膈肌收缩的基线抬高,意味基础张力的增加。此浓度已高于实验所用敌敌畏最高浓度时的苯含量(敌敌畏浓度为 5.79 mmol·L⁻¹,溶液中苯的浓度为 4.1 mmol·L⁻¹)。因此敌敌畏溶液对直接刺激膈肌的抑制是敌敌畏本身对膈肌的作用。

实验中,用等摩尔浓度氯磷定作用于敌敌畏中毒的膈肌,对 5.79 mmol·L⁻¹敌敌畏引起的类似强直收缩抑制无对抗作用。由于该浓度与临床用药剂量相比已相当高,因此可以认为氯磷定对敌敌畏的直接抑制膈肌作用无明显对抗效应,因此考虑氯磷定对有机磷中毒所致膈肌麻痹的治疗作用可能在于神经肌肉接头而不是接头后,其详细机制有待于进一步探讨。

“中间综合征”的症状常常发生于胆碱能危象被控制后。在预实验中,作者曾比较了敌敌畏对膈肌的直接抑制与对神经肌肉接头的阻断作用之间在时间和浓度上的差异,结果表明对神经-肌肉接头的作用一般在 3~5 min 内即十分明显,10 min 内即可完全抑制(未发表资料),而直接作用要在加药后 10 min 后才明显,30 min 后才达最大,迟于对神经肌肉接头的抑制作用,达到最大抑制的时间也较对神经肌肉接头的阻断时间要长得多,且不能被 AChE 重活化剂氯磷定^[7]所对抗。本研究结果表明,敌敌畏直接抑制膈肌所需的浓度也较抑制神经-肌肉接头所需浓度要大得多。这些特点也与中间综合征累及呼吸肌多发生在较重的情况下及胆碱能危象控制之后的现象一致,因此提示有机磷农药对膈肌的直接抑制作用是中间综合征导致呼吸衰竭的可能因素之一。

本实验中所用敌敌畏浓度较大。按体重为 60

kg, 体液含量为 63% 计, 则人体体液总量约为 36 L。本实验中所用的最低浓度为 $0.724 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相当于一个 60 kg 的人吸收约 6 g 或 6 mL 的敌敌畏。所用的最高浓度 $5.79 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 相当于吸收约 48 g 或 48 mL 的敌敌畏, 也即相当于 80% 的敌敌畏溶液 60 mL。有报道大剂量敌敌畏中毒剂量为 60 ~ 200 mL^[8]。按本实验所用浓度折算出的对膈肌直接毒性作用所需的中毒量与临床大剂量中毒剂量接近。因此本实验结果具有一定的临床意义: 它提示其直接抑制作用可能是有机磷中毒引起呼吸肌麻痹因素之一, 因此在抢救大剂量有机磷中毒, 特别是出现中间综合征时, 除了用药物对抗胆碱能神经系统的毒性作用外, 还应当考虑有机磷对膈肌的直接作用。

4 参考文献:

- [1] Senanayake N, Karalliedde L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides: an intermediate syndrome [J]. *N Engl J Med*, 1987, **316**(13):761-763.
- [2] Ballantyne B, Marrs TC. *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates* [M], Oxford: Butterworth-Heinemann Inc., 1992.
- [3] Bardin PG, Van Eeden SF, Moolman JA, Foden AP, Joubert JR. Organophosphate and carbamate poisoning [J]. *Arch Intern Med*, 1994, **154**(13):1433-1441.
- [4] De Bleeker J, Van Den Neucker K, Colardyn F. Intermediate syndrome in organophosphorus poisoning: a prospective study [J]. *Crit Care Med*, 1993, **21**(11):1706-1711.
- [5] Chang CC, Hong SJ, Ko JL. Mechanisms of the inhibition by neostigmine of tetanic contraction in the mouse diaphragm [J]. *Br J Pharmacol*, 1986, **87**(4):757-762.
- [6] Zou F, Liu CG. The presynaptic and postsynaptic effect of soman in isolated non-uniform stretched muscle preparation (INSMP) of rat diaphragm [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1988, **2**(2):113-121.
- [7] Hu BR. Antidotes [A]. In: Yang ZC, Jiang MX, ed. *Medical Pharmacology* (医用药理学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997. 1148-1161.
- [8] Lu FL, Li SL, Yang HX, Ma P, Yan YQ and Ma YG. The exploration of rapid atropinization in the emergency treatment of severe dichlorvos intoxication [J]. *Clin Focus* (临床荟萃), 1993, **5**(1):90-91.

Direct toxicity of dichlorvos on isolated rat diaphragm

ZHANG Ying-Ge¹, WANG Jian-Hua², LIU Yan-Qin¹, ZHENG Li-Li³

- (1. *Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*;
2. *Beijing Military Medical College, Beijing 100071, China*; 3. *Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China*)

Abstract: **AIM** To observe if dichlorvos having the direct toxicity on the diaphragm. **METHODS** Isolated rat diaphragm was directly stimulated with a home-made double-functional electrode after the neuromuscular synaptic transmission was blocked with tubercurarine. The contraction of the rat diaphragm caused in this way had no relation to the neuromuscular synaptic transmission. The direct action of dichlorvos could be observed by its influences on such kind of contraction. **RESULTS** After the neuromuscular synaptic transmission was completely blocked with tubercurarine, stimulating phrenic nerve was not able to induce the contraction of diaphragm, while directly stimulating diaphragm could still result in its contraction.

Dichlorvos at the concentration of $0.724 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ began to inhibit the directly-stimulated tetanic-like contraction of the rat diaphragm. At the concentration of $4.34 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, such contraction was inhibited by 80%. At the concentration of $5.79 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, both the tetanic-like and simple contractions were completely inhibited by dichlorvos, pralidoxime could not reduce the inhibition. **CONCLUSION** Dichlorvos has direct inhibition effect on the diaphragm, which is unrelated to the block of the neuromuscular transmission and the inhibition of acetylcholinesterases.

Key words: organophosphorus compounds; dichlorvos; diaphragm; neuromuscular junction

(本文编辑 董立春)