

兔“有机磷酸酯类中毒及解救”实验中乙酰胆碱酯酶活力测定技术的改进

王秋静¹, 宋祥福², 李天舒¹

(1. 吉林大学基础医学院, 长春 130021; 2. 吉林大学公共卫生学院, 长春 130021)

[摘要] 目的 改进“有机磷酸酯类中毒及解救”实验技术方法, 探索出一种能替代传统检测乙酰胆碱酯酶(AChE)活力的方法; 寻找到替换原实验设计中应用的临床严控处方药品。方法 在硫代乙酰胆碱-联硫代双硝基苯甲酸法的基础上, 对部分实验技术方法和条件进行改进, 建立改进后AChE活力测定方法。结果 改进后的AChE活力测定结果与传统一致; 找到了具有同样解救作用效果的替代药。结论 改进后的检测方法准确可靠, 操作时间短, 安全; 替代药品能使与临床密切相关的药理学经典实验得以延续。

[关键词] 有机磷中毒及解救; 实验技术方法改进; 乙酰胆碱酯酶活力; 兔

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2020)06-0528-03

药理学实验“有机磷酸酯类中毒与解救”作为传统的经典实验在医学实验教学中有着重要意义, 是医学生必做的实验项目。学生在实验中可以观察到机体从正常生理状态到有机磷酸酯类农药中毒的病理变化, 以及药物对中毒解救治疗效果的整个过程。临床上乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)活力测定是对急性有机磷中毒患者进行早期诊断、判断疗效和预后的重要指标, 对治疗具有指导意义^[1]。所以, AChE活力测定实验是临床专业医学生需要重点掌握的内容。

传统的AChE活力测定是采用羟胺三氯化铁法, 涉及氢氧化钠、盐酸和三氯化铁(加浓盐酸配制)等危险化学试剂, 且碱性羟胺溶液需现用现配, 水浴时间长, 测定AChE时效率较低, 容易产生沉淀等缺陷。因此, 寻求一种检测准

确, 操作时间短, 既能保障实验室生物安全, 又有利于实验教学长期应用的AChE活力测定方法相当重要。此外, 原“有机磷酸酯类中毒及解救”实验中使用的医用药品硫酸阿托品和碘解磷定现在属于临床严控处方剂, 较难购得, 故急需找到适合实验教学内容的替代药品。

1 材料与方法

1.1 实验动物与药品

新西兰兔16只, 雌雄不限, 3~4月龄, 体重2.3~2.5 kg, 由吉林大学基础医学院实验动物中心提供[SCXK(吉)2016-0004], 饲养于屏障设施[SYXK(吉)2017-0003]。实验动物饲养和处理严格遵循动物福利3R原则和吉林大学基础医学院伦理委员会相关条例要求。硫酸阿托品注射液购自山西省芮城科龙兽药有限公司(批号: 20170512); 碘解磷定注射液购自哈尔滨市宏达动物药品厂(农业部兽药GMP验收通过企业)(批号: 20161109); 敌百虫购自湖北沙隆达股份有限公司(批号: 20170413)。

1.2 AChE测定实验技术方法改进

依据测定全血AChE活性的分光光度测定方

[收稿日期] 2020-06-04

[基金项目] 吉林大学实验技术项目(2019SYJS-B75)

[作者简介] 王秋静(1963—), 女, 高级工程师, 研究方向: 机能学。E-mail: wqj@jlu.edu.cn

[通信作者] 李天舒(1971—), 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 机能学。E-mail: lits@jlu.edu.cn

法（硫代乙酰胆碱-联硫代双硝基苯甲酸法，WS/T67-1996）^[2]，原理是AChE水解硫代乙酰胆碱（ASCh）生成硫代胆碱和乙酸，硫代胆碱与硫基显色剂（DTNB）反应形成黄色化合物（TNB），在波长412 nm处比色定量。通过水解产物胆碱的测定量反映AChE的活力。

本研究在参照硫代乙酰胆碱-联硫代双硝基苯甲酸法的基础上，对部分实验技术方法和条件进行改良：由于抑制剂柳酸毒扁胆碱为严格管制药品，本研究采用原实验室库存的水杨酸毒扁胆碱代替，以降低实验成本；ASCh生物试剂目前在市场上难以购买到，故用碘化硫代乙酰胆碱代替且加样前37℃水浴；由于有机磷中毒后血管收缩，通过耳缘静脉采取末梢血非常困难，且极易造成溶血，而动脉血不易凝固，故通过颈总动脉插管取血可迅速获得足量符合测定要求的全血。此外，AChE抑制法通常使用比色管分光光度法测定，这在一定程度上制约了其进行多次重复，也不利于实现高通量操作，而且需要消耗大量的试剂药品^[3]。而微孔板法则具有可高通量操作、易于多次重复、所需试样体积小等特点^[4]。因此，本研究用微孔板法代替比色管分光光度法测定样本吸光度值。经过多次预实验确定最佳操作流程，其优点包括水浴时间短、操作安全、实验成本低、灵敏度及时效率高。改进后和传统AChE活力测定方法的操作流程分别见表1和表2。

表1 改进后AChE活力测定方法操作流程
Table 1 Operation flow of improved AChE activity determination method

加样步骤	(mL)			
	样品管	样品对照管	空白管	标准管
磷酸缓冲液	3	3	3	3
待测样本	0.01	0.01	—	—
蒸馏水	—	—	0.01	—
标准品应用液	—	—	—	0.01
抑制剂	—	0.06	—	—
DTNB显色剂	1	1	1	1
碘化ASCh应用液	1	1	1	1
37℃水浴6 min				
抑制剂	0.06	—	0.06	0.06
离心取上清液，在412 nm波长下比色，测定吸光度值				

表2 传统AChE活力测定方法操作流程
Table 2 Operation process of traditional AChE activity determination method

加样步骤	(mL)		
	空白管	标准管	样品管
磷酸缓冲液	1	1	0.85
待测样本	—	—	0.15
37℃水浴5 min			
Ach	—	1	1
蒸馏水	1	—	—
37℃水浴40 min，每隔10 min摇动一次			
碱性羟胺	4	4	4
盐酸	2	2	2
三氯化铁	2	2	2
反应液滤纸过滤，15 min内在530 nm波长下比色，测定吸光度值			

1.3 寻找替换原实验中应用的临床严控处方药品

本研究以兽用针剂硫酸阿托品和碘解磷定代替医用处方药，并通过预实验摸索出两种药品的给药剂量分别为：0.05%阿托品2 mL/kg；2.5%碘解磷定4 mL/kg。结果显示实验效果良好，可达到实验预期目的，匹配教学需要，使经典实验得以延续，保障该实验教学项目长期顺利进行。

1.4 改进后和传统方法测定AChE活力

将16只家兔随机分成2组，分别为改进后组和传统组，每组8只，测定AChE活力。称质量，观察并记录各组家兔的活动情况：呼吸、瞳孔大小、唾液分泌、大小便、肌张力及有无肌震颤等。之后进行气管插管和颈总动脉插管术，连接呼吸、血压换能器和心电导线，记录中毒前后及给予解救药后血压、呼吸、心电、心率等指标变化，同时进行颈总动脉插管以备取血。设定家兔在给药前、中毒症状明显时、给予阿托品待症状明显缓解后，以及给予解磷定解救后0、10、20和30 min共7个取血时间点测定AChE活力。

取正常血后，按体质量经家兔耳缘静脉注射10%敌百虫1 mL/kg。按前述指标观察并记录中毒症状。待中毒症状明显时取血，取血结束后立即静脉注射0.05%硫酸阿托品2 mL/kg，记录中毒症状有何改变并取血，而后静脉注射2.5%碘解磷定4 mL/kg，并在给予解磷定解救后0 min、10 min、20 min、30 min取血，同时观察、比较给予阿托品和解磷定后，家兔呼吸、瞳孔大

小、唾液分泌等中毒症状。

1.5 统计分析

采用 SPSS 16.0 软件进行分析，实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

用改进后和传统方法测定 AChE 活力，结果

发现给药后每个时间点的 AChE 活力测定值与时间均呈正相关关系；改进后方法在给药后每个时间点的 AChE 活力测定值均比传统方法高 ($P < 0.05$) (表 3)。结果说明，改进后的测定结果与传统一致，改进后方法比传统方法测定 AChE 活力的灵敏度和时效率高，而且准确性及可靠性略佳，主要体现在中毒时最低检测活力上。

表 3 兔给药前、中毒及给予解救药后 AChE 活力
Table 3 AChE activity of rabbits before administration, poisoning and after administration of rescue drugs
($\bar{x} \pm s$, U/mL)

组别	n	给药前	中毒期间	给阿托品后	给解磷定后			
					0 min	10 min	20 min	30 min
传统	8	8.25 ± 1.05	0.45 ± 0.05	0.55 ± 0.04	3.95 ± 0.35	5.05 ± 0.46	5.52 ± 0.50	4.65 ± 0.43
改进后	8	7.55 ± 0.85	1.74 ± 0.13*	2.25 ± 0.25*	6.55 ± 0.55*	6.91 ± 0.52*	6.78 ± 0.61*	5.89 ± 0.49*

注：与传统方法比较，* $P < 0.05$ 。

3 讨论

有机磷酸酯类为持久性抗 AChE 剂，进入机体后，能与 AChE 结合，并使后者失去水解乙酰胆碱的能力，导致乙酰胆碱在体内大量堆积，进而激动 M 和 N 受体并作用于中枢神经系统，产生 M、N 样及中枢神经系统症状。抗胆碱药阿托品能解除有机磷中毒的 M 样症状，而解磷定可复活 AChE 水解乙酰胆碱的能力，对 M、N 样症状均有效。

本研究通过改进“有机磷酸酯类中毒与解救”实验技术方法，摸索出一种检测准确、用时短（提高课堂利用率）、操作安全、灵敏度和时效率高，且教学成本合理的 AChE 活性测定方法；寻找到能替换原实验方法中应用的临床严控处方药品，使与临床密切相关的药理学经典实验得以顺利延续；同时开发和应用先进仪器，创建实验模块，在原有简单定性实验中补充了对临床中毒诊断常用的心电、血压和呼吸流量等定量指标检测^[5]，进一步完善了实验内容。这有利于医学生应用先进仪器，客观、准确、综合地了解“有机磷酸酯类中毒及解救”实验的发病机制和解救药物的药效机制，并在教学实验中结合

临床检查项目和用药情况，充分利用基础实验课的作用，培养学生临床应用能力^[6]。

参考文献:

[1] 于名杰. 有机磷中毒患者血胆碱酯酶活性的变化规律及临床意义[J]. 中国实用医药, 2010, 5(20):15-16.

[2] 中华人民共和国卫生部. 全血胆碱酯酶活性的分光光度测定方法 羟胺三氯化铁法: WS/T 66—1996[S]. 1997.

[3] 葛会林, 刘树深, 陈浮, 等. 测定化学物对荧光素酶抑制毒性的微板发光法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(10):2766-2770.

[4] 陶珊珊, 葛会林, 袁宏球, 等. 测定化学物对乙酰胆碱酯酶抑制毒性的微板吸光法研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(1):201-209.

[5] 赵红梅, 隋建峰, 张晓燕, 等. 机能综合实验“有机磷农药中毒与解救”的改进[J]. 四川生理科学杂志, 2009, 31(1):44-45.

[6] 侯征, 薛小燕, 卢林杉, 等. 药理学实验教学模式的优化有助于提升医学生创新能[J]. 医学教育研究与实践, 2019, 27(6):1035-1038.

[7] 李文强, 杨河欣, 杨卫泽. 早期血气分析对急性有机磷农药中毒患者预后的预测[J]. 中国急救医学, 2008, 28(10): 883-885.

[8] 王丽萍, 吴松, 孙丹, 等. 血气分析仪器在急诊分析检验中的应用价值分析[J]. 中国医疗器械信息, 2017, 23(15): 127-128.