

蚯蚓背肌上可能存在“索曼受体”的证据

周廷冲 周建群 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100800)

提要 Soman, GABA 和谷氨酸在离体蚯蚓(*Eisenia foetida*)背肌上的效应经 40℃、10% (NH₄)₂SO₄ 或 1% Triton X-100 膜处理后都可被消除, 但 ACh 反应仍存在, 蚯蚓背肌 ChE 活性比处理前高得多。在未经膜处理, 但 ACh 效应、GABA 效应或谷氨酸效应被阻断的标本上, soman 仍引起肌缩反应。我们认为 soman 的肌缩效应是 soman 与 ChE 或 ACh 受体、GABA 受体及谷氨酸受体以外的另一膜蛋白质相互作用的结果, 并提出蚯蚓背肌可能存在“soman 受体”的假说。

关键词 索曼; 蚯蚓背肌; 胆碱酯酶; 胆碱能受体; γ -氨基丁酸受体; 谷氨酸受体; 索曼受体

起初, 我们研究蚯蚓背肌标本的目的是为了建立一个简易的筛选 γ -氨基丁酸(GABA)受体激动剂和拮抗剂的方法⁽¹⁾。之后, 我们又研究了 soman 对这种标本的影响, 认为它较适合于 soman 的研究⁽²⁾。为克服背肌本身自发活动的干扰, 曾将背肌放在 40℃ 的修正任氏液中孵育 60 min, 偶然发现这样处理的标本对 GABA、谷氨酸(Glu)以及 soman 的反应完全消失, 唯独保留了乙酰胆碱(ACh)反应。一般认为 soman 是通过胆碱能机制起作用的, 如与胆碱酯酶(ChE)和胆碱能受体(ChR)有关。而这种现象表明 soman 在标本上的反应与 ACh 的反应是分别独立存在的, 因而引起了我们的极大兴趣。我们进一步追踪这个线索, 在方法学上逐渐形成了两方面的工作。一方面是把生化上常用的从膜碎片中抽提蛋白质的方法及温度处理法应用于离体标本, 这是前人未曾试过的离体标本实验方法。另一方面是用对抗剂阻断给定递质反应的方法来排除 soman 对 ACh 受体、GABA 受体和 Glu 受体的作用。根据所收集的事实, 我们将在本文提出蚯蚓背肌上可能存在“soman 受体”的假说。

材料和方法

一、蚯蚓背肌标本生物膜的处理

1. 温度处理 将蚯蚓背肌⁽¹⁾浸入 40℃ 的修正任氏液(用 0.01 M NaHCO₃ 溶液稀释任氏液至 65%, pH 7.4)内孵育 50 min 即可应用。

2. 盐析处理 将蚯蚓背肌浸入含 10% (NH₄)₂SO₄ 的修正任氏液中, 在 20℃ 孵育 60 min, 洗涤后应用。

3. 去垢剂处理 将蚯蚓背肌浸入含 1% Triton X-100 的修正任氏液中, 在 20℃ 孵育 30 min, 洗涤后应用。

经以上方法处理的标本在 0—5℃ 可保存数天, 甚至更长时间而不失活性。

二、受体阻断实验

1. ChR 阻断实验 银环蛇(*Bungarus multicinctus*)毒(BGV)干粉购自湖南食品调拨转运站, 内含 α -银环蛇毒素。分两组实验: 一组用含蛇毒 0.1 mg/ml 的修正任氏液冲灌标本时观察 ACh, GABA, Glu 和 soman 对蚯蚓背肌的影响。另一组是在停止冲灌时用含蛇毒 0.2 mg/ml 的修正任氏液置换浴池中的修正任氏液, 使背肌浸在蛇毒 0.2 mg/ml 液中(15℃)20 min 后, 开始冲灌修正任氏液。在洗去蛇毒液后观察 ACh, GABA, Glu 和 soman 对背肌的影响。冲灌药液前为对照。递质和药物(soman 等)的来源和规格见前文⁽¹⁾。

2. GABA 受体阻断实验 所用 4-异丙双环磷酸酯(IPTBO)和印防已毒素(picROTOXIN, 英国 B.D.H. 公司产品)均用修正任氏液分别配成 10⁻⁴ M, 在 15℃ 冲灌标本, 每次实验在冲灌药液前为对照。

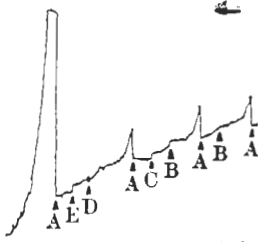


图 1. Responses of 40°C-modified earthworm preparation to A) ACh 10^{-4} M; B) GABA 10^{-4} M; C) Glu 10^{-3} M; D) soman 1 $\mu\text{g/ml}$; E) soman 10 $\mu\text{g/ml}$.

3. Glu 受体阻断实验 将盐酸阿扑吗啡以修正任氏液配成 10^{-4} M 冲灌背肌标本, 待 Glu 10^{-2} M 反应消失后立即更换正常冲灌液, 观察递质反应的恢复过程。当 ACh 10^{-4} M 反应基本恢复而 Glu 10^{-2} M 反应还未恢复时, 就可进行 soman 等化合物的实验。冲灌阿扑吗啡溶液前的实验为对照。

结果与讨论

一、蚯蚓背肌生物膜处理实验 本实验将生化上从膜碎片中提取蛋白质及温度处理的常规方法用于离体标本的处理。一般认为常规匀浆步骤就可引起化学修饰, 尤其是受体蛋白质, 即使在从膜上提取之前也易发生化学改变⁽³⁾。就作者所知, 迄今无人试验过把从膜碎片中提取蛋白质的方法应用到离体标本上来研究受体功能的变化。我们在实验中发现, 对蚯蚓背肌分别用 40°C, 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% Triton X-100 处理后, 背肌对 GABA、Glu 和 soman 的反应完全消失, 但仍然保留了对 ACh 的反应性(图 1, 2, 3)。

以上 3 种膜处理在本实验的条件下均能得到相同结果。这表明 GABA, Glu 和 soman 所结合的蛋白质可以被这些方法除去或纯化。

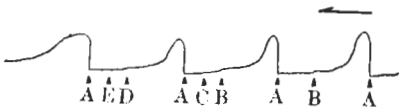


图 2. Responses of 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -treated earthworm preparation to A) ACh 10^{-4} M; B) GABA 10^{-4} M; C) Glu 10^{-3} M; D) soman 1 $\mu\text{g/ml}$; E) soman 10 $\mu\text{g/ml}$.



图 3. Responses of 1% Triton X-100-modified earthworm preparation to A) ACh 10^{-4} M; B) GABA 10^{-4} M; C) Glu 10^{-3} M; D) soman 1 $\mu\text{g/ml}$; E) soman 10 $\mu\text{g/ml}$.

因此, 这些蛋白质或受体须是肌肉膜的周围蛋白质, 而存留的 ACh 反应则说明 ACh 受体可能是背肌膜内埋藏较深的蛋白质, 因而不易受影响。

虽然 soman 在经过以上 3 种膜处理的蚯蚓背肌上的兴奋性反应都已消失, 但在用了 soman 之后的标本再试 ACh 时, 背肌对 ACh 的收缩反应明显强于用 soman 前或更为持久。这表明 soman 仍可抑制背肌膜上未被以上处理除去或钝化的 ChE, 从而加强了 ACh 的反应。将经 3 种膜处理后的肌肉块的 ChE 活力与正常肌块的 ChE 活力用比色法⁽⁴⁾进行比较, 发现经处理的肌块 ChE 活力都比正常肌块 ChE 活性有极为明显的提高(图 4)。这也说明 ChE 可能深嵌在背肌膜内, 经上述处理后暴露得更多, 因此活性有明显提高。

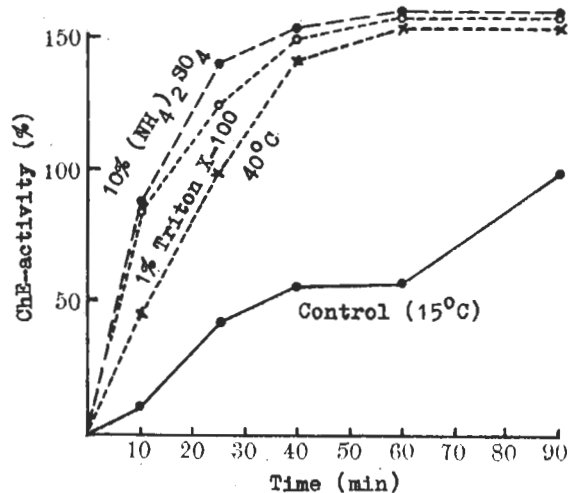


图 4. ChE activities of the modified earthworm muscles.

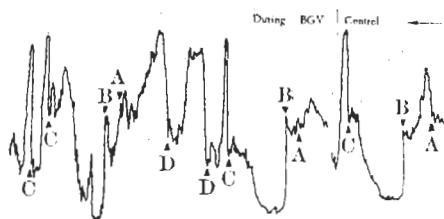


图 5. Responses of earthworm muscle during superfusion of bungarovenom (BGV)-containing solution. A) ACh 5×10^{-4} M; B) GABA 10^{-4} M; C) Glu 10^{-3} M; D) soman $1 \mu\text{g/ml}$.

蚯蚓背肌经上述处理后, soman 的肌收缩效应消失, 而 ACh 反应和 ChE 活性仍旧存在, 表明在蚯蚓背肌膜上存在着一种能与 soman 起反应的蛋白质。这种蛋白质不妨称为“soman 受体”。这种受体是热不稳定的并且是易于从背肌膜上脱离或失活的周围蛋白质。它不是 ACh 受体, 也不是 ChE。

二、蚯蚓背肌标本的受体阻断实验

1. ACh 受体阻断实验 用含 BGV 生理液冲灌背肌的实验证明: 当 ACh 反应被取消时, Glu, GABA 和 soman 的反应却仍存在(图 5)。为了排除 BGV 中 ChE 可能因水解注入的 ACh 对实验造成的干扰。又单纯将背肌与含 BGV 的修正任氏液短暂接触, 然后彻底冲净毒液, 以正常生理液冲灌。在冲灌液不含 BGV 的情况下, 标本对 ACh 仍不起反应, 对其它神经递质和 soman 的反应也同上实验(图 6), 这就排除了蛇毒中 ChE 对实验的干扰。这两组实验都显示了在 ACh 受体已被阻断的情况下 soman 仍能引起肌收缩反应。这进一步说明引起 soman 的肌收缩效应的部位独立于 ACh 受体之外。

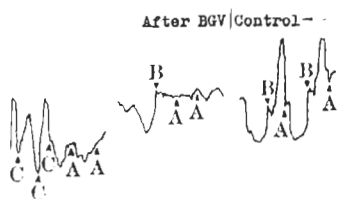


图 6. Responses of earthworm muscle preparation (N-cholinergic receptor blocked by bungarovenom) to A) ACh 10^{-4} M; B) GABA 10^{-4} M; C) soman $1 \mu\text{g/ml}$.

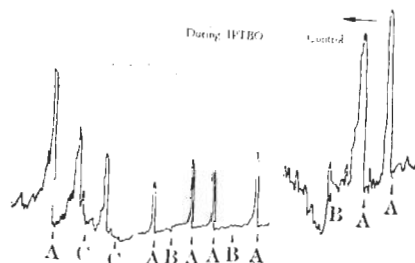


图 7. IPTBO superfusion of earthworm preparation. A) ACh 10^{-4} M; B) GABA 10^{-4} M; C) soman $1 \mu\text{g/ml}$.

2. GABA 效应的阻断实验 虽然 GABA 引起的反应是肌松弛, soman 引起的反应是肌收缩, 但从 3 种膜处理实验的结果来看, 它们的受体很可能都属于背肌膜上的周围蛋白质。soman 是否也有可能作用在 GABA 受体上? 本文进行了 GABA 受体对抗剂 IPTBO 和印防己毒素的冲灌实验。结果见图 7 和图 8。GABA 效应消失而 ACh, Glu 和 soman 效应仍然存在, 说明 soman 的这种肌收缩效应是 soman 与 GABA 受体以外部位作用的结果。

3. Glu 效应的阻断实验 在上面一系列实验中, soman 肌收缩效应的出现或消失与 Glu 肌收缩效应的出现或消失完全一致。因此, soman 作用在 Glu 受体上的可能性也是很大的。用阿朴吗啡 10^{-4} M 冲灌背肌的实验表明, 当改换正常冲灌液后, 在 Glu 效应不出现的情况下, soman 仍可引起肌收缩反应(图 9), 这就表明 soman 的作用点与 Glu 是有区别的。

三、我们的假说 从大量有关 soman 中毒机理研究的文献来看, 研究方面主要集中在

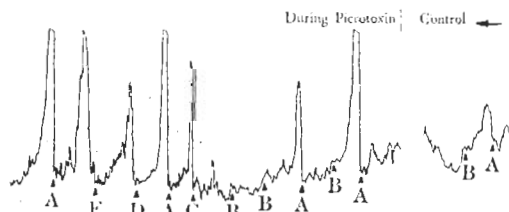


图 8. Picrotoxin superfusion of earthworm preparation. A) ACh 10^{-4} M; B) GABA 10^{-4} M; C) Glu 10^{-3} M; D) soman $1 \mu\text{g/ml}$; E) soman $0.5 \mu\text{g/ml}$.

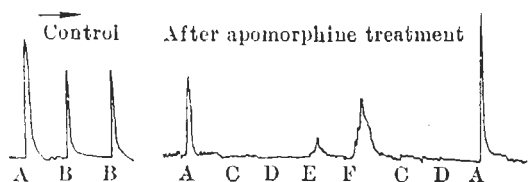


图 9. Apomorphine superfusion of earthworm preparation. A) ACh 10^{-5} M; B) Glu 10^{-4} M; C) Glu 10^{-3} M; D) Glu 10^{-2} M; E) soman 1 $\mu\text{g/ml}$; F) soman 10 $\mu\text{g/ml}$.

胆碱能系统。一致公认的是 soman 以高亲和力与 ChE 结合, 使 ChE 失活, 并且在和 ChE 磷酸化后很快由于酶的自身催化作用脱去烷

基, 产生不易被肟类药重活化的“老化酶”⁽⁶⁾。ChE 失活致使体内 ACh 积聚, ACh 作用在 ChR 上, 出现胆碱能系统症状。Adams 和 Bullock 等各自根据药理或生化实验结果认为 soman 作用在 ChR 上, 可能由于 soman “老化”或其它未知原因引起不可逆结果^(6,7)。至于除 ChE 和 ChR 外, soman 是否还有其它作用部位或受体, 文献中未曾报道。

根据本文中 soman 的肌收缩效应独立于胆碱能系统、GABA 系统和 Glu 系统之外这一事实, 我们提出一个假说: 蚯蚓背肌可能存在一种“soman 受体”, 并以图 10 示意。

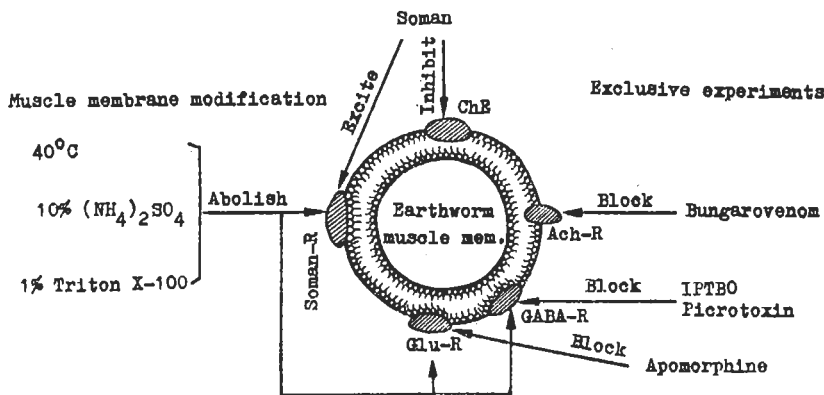


图 10. A hypothetical scheme of the action of soman on earthworm dorsal muscle preparation.

致谢 天津饲料研究所赠蚯蚓, 王崇铨同志赠 IPTBO, 解放军总医院绘图室白杰同志协助绘图

参 考 文 献

- 1 周廷冲、周建群. 中国药理学报 1981年9月; 2(3):145
- 2 周建群、周廷冲. 同上 1981年12月; 2(4):221
- 3 Chang HW, Bock E. *Biochemistry* 1979 Jan; 18

(1):172

- 4 Hestrin S. *J Biol Chem* 1949 Aug; 180 (1):249
- 5 Fleisher JH, Harris LW. *Biochem Pharmacol* 1965 May; 14(5):641
- 6 Adams GK III, Yamamura HI, O'Leary JF. *Eur J Pharmacol* 1976 Jul; 38(1):101
- 7 Bullock JO, Farquharson DA, Hoskin FCG. *Biochem Pharmacol* 1977 Feb 15; 26(4):337

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Dec; 2 (4) : 217--221

EVIDENCES FOR POSSIBLE EXISTENCE OF A “SOMAN RECEPTOR” IN EARTHWORM DORSAL MUSCLE

ZHOU Ting-chong (T C Chou), ZHOU Jian-qun

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)

ABSTRACT GABA, glutamic acid or soman binding sites could be inactiva-

ted or removed from the earthworm muscle cell membranes by means of incubation

ting at 40°C for 50 min, treating with 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60 min) or 1% Triton X-100 (30 min), without affecting the function of ACh binding sites. ChE activity of the modified muscle pieces was much more active than that of the normal ones. It indicated that AChE also remained intact on the membrane during the above mentioned treatments. Therefore, muscular contractions induced by ACh were evidently enhanced so long as the enzyme was inhibited after the addition of soman.

Soman binding effects could be well distinguished on the superfused muscle

preparations from the effects of ACh, GABA and Glu by using bungarovenom or picrotoxin and isopropyl bicyclophosphate or apomorphine as antagonists against these 3 putative neurotransmitter receptors respectively.

Based on the above results, the possible existence of a "soman receptor" in the earthworm muscle was proposed.

KEY WORDS soman; earthworm dorsal muscle; cholinesterase; cholinergic receptor; GABA receptor; glutamic acid receptor; soman receptor