

## 索曼中毒时蚯蚓背肌三磷酸腺苷含量的变化\*

朱荣新 王利平 周廷冲 (军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100800)

**提要** 蚯蚓背肌中 ATP 的含量与索曼中毒剂量相关, 索曼对整体蚯蚓中毒剂量为  $1.5 \mu\text{g/ml}$  时, ATP 含量仅为正常蚯蚓背肌中 ATP 的一半。硫酸铵、氟安定、眼镜蛇毒无此作用, 新斯的明、眼镜蛇毒、腺苷可防止索曼中毒蚯蚓背肌 ATP 的降低。ACh 在索曼中毒后明显升高。

**关键词** 贫毛类环虫; 腺苷三磷酸; 胆碱能受体; 索曼; 腺苷; 眼镜蛇毒; 氟安定; 新斯的明; 荧光素酶; 荧光素

近年来, 很多学者用大鼠膈神经-膈肌, 电鳗电器官等为实验材料, 对胆碱能系统突触部位的研究表明, ATP 的含量变化与 ACh 的释放相关。ACh 是在突触前膜释放的, 而 ATP 是在突触前膜和 ACh 一起释放还是突触后膜释放, 至今有不同的看法<sup>(1-3)</sup>。本文研究了索曼中毒时, 蚯蚓背肌中 ATP 含量的变化, 并探讨这种变化和胆碱能系统(AChE 和 N-AChR)的关系。

## 材料和方法

**试剂与药物** 荧光素酶-荧光素 (luciferase-luciferin L-0633 或 FLE, Sigma Co), 三磷酸腺苷二钠盐(ATP, 上海东风生化制剂厂), 正丁醇(北京化工厂), 三羟基甲基氨基甲烷(Tris, Serva PA, 北京化学试剂商店分装), 乙二胺四乙酸二钠(EDTA, 北京化工厂), 砷酸钠(sodium arsenate, E de Haen Works), 甲基硫酸新斯的明注射液(NS, 上海第七制药厂), 毒扁豆碱(eserine, Light Co), 硫酸铵(ammonium sulfate 或 AS, 北京化工厂), 腺苷(adenosine 或 AR, Light Co), 氟安定

(flunazepam 或 FA, 上海第二制药厂), 眼镜蛇毒(cobra venom 或 CBV), 东莨菪碱(scopolamine 或 SP), 索曼(soman), 均为本院药理毒理所提供。

**ATP 提取** 挑选蚯蚓(*Eisenia foetida*)6-8条洗净, 分别浸泡在冰浴内的 3 ml 任氏液中( $\text{Na } 140; \text{K } 2.7; \text{Ca } 118; \text{Mg } 1.0; \text{Cl } 148.3 \text{ mM}$ )内含不同浓度的索曼 20 min 后, 用冰冷的任氏液冲洗, 取出背肌, 称重(约 40-60 mg), 分别加正丁醇提取液(Tris 0.1 M; 砷酸钠 0.01 M; EDTA 0.01 M; 正丁醇 6%)制成 1% 的匀浆,  $4000 \times g$   $4^\circ\text{C}$  离心 20 min, 取上清液, 冰箱保存。

**荧光素酶法测定 ATP** FLE 与 ATP 的特异性反应, 可引起发光。记录反应时的发光强

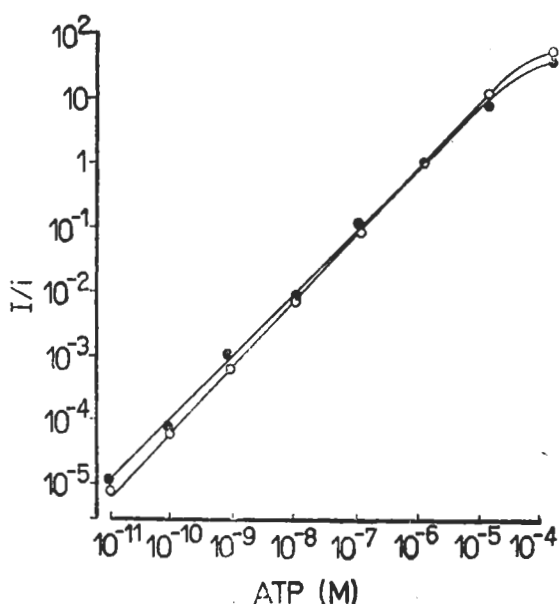


Fig 1. Standard Curve of ATP. I/i; Measuring value/light intensity of  $1 \mu\text{M}$  ATP. ●: Ringer solution system; ○: n-butanol system (Tris 0.1 M, sodium arsenate 0.01 M, EDTA 0.01 M, n-butanol 6%).

度,即可测定样本中 ATP 含量<sup>(4)</sup>。

取样本 1 ml, 加入测定管内, 用微量注射器注入 FLE(20 mg/ml)5  $\mu$ l, 在 LKB-1250 型发光仪上作发光测定, 反应时的发光强度, 可通过数码显示并打印记录, 以 X-Y 记录仪记录发光图谱。作定量分析时, 以 1  $\mu$ M 的 ATP 作标准, 求出标本的发光强度与 1  $\mu$ M 标准 ATP 光强的比值, 从预先制作的 ATP 标准曲线上查得样本中 ATP 的含量。

**ATP 标准曲线的制作** 用同一分析体系将标准 ATP 配成 1 mM 母液, 以 10 倍稀释法, 稀释成  $10^{-4}$ - $10^{-11}$  M 浓度。各取 1 ml, 加入 5  $\mu$ l FLE (20 mg/ml), 于 LKB-1250 型发光仪上测定发光强度, 用各测定值与 1  $\mu$ M ATP 标准光强的比值与 ATP 浓度双对数作图, 得到标准曲线。

对不同体系的 ATP 标准测定作回归分析表明, ATP 浓度在  $10^{-5}$ - $10^{-11}$  M 范围内, 与光强对数具有满意的线性关系, 相关系数大于 0.98, 精确度大于 80%(图 1)。

## 结 果

**蚯蚓背肌中 ATP 含量与索曼中毒剂量的关系** 用索曼 0, 0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5  $\mu$ g/ml 分别对整体蚯蚓中毒 20 min 后, 对蚯蚓背肌用 FLE 法作 ATP 含量分析, 结果分别为  $1.51 \pm 0.08$ ,  $1.18 \pm 0.13$ ,  $0.72 \pm 0.04$ ,  $0.61 \pm 0.04$ ,  $0.48 \pm 0.02$ ,  $0.38 \pm 0.05$   $\mu$ mol/g 湿组织 ( $n=3$ )。这说明蚯蚓背肌中 ATP 含量与索曼所用剂量有着明显的依赖关系, 随着索曼浓度的增加, ATP 含量逐渐降低, 索曼剂量为 1.5  $\mu$ g/ml 时, 蚯蚓背肌中 ATP 即降到正常值的一半。由此可见, 小剂量的索曼即可使蚯蚓背肌内 ATP 含量大幅度降低(图 2)。不过, 在蚯蚓浸泡液中未能测出有 ATP 的存在。对正常蚯蚓背肌提取物作高压液相分析表明, ATP 含量很高, 而 ADP, AMP 含量很低(图 3)。

**毒扁豆碱和 NS 处理整体蚯蚓后, 对蚯蚓背肌 ATP 含量的影响** 用毒扁豆碱 0, 1.1,

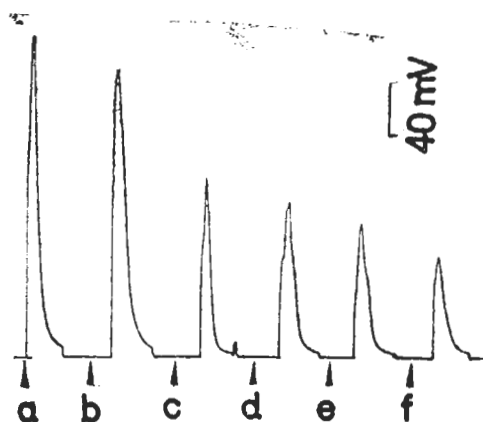


Fig 2. Assay of ATP content in earthworm dorsal muscle in 3 ml Ringer solution. a-f) soman 0, 0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5  $\mu$ g/ml, respectively. After 20 min, the dorsal muscle was taken out and ATP was extracted, then determined by luciferase-luciferin method.

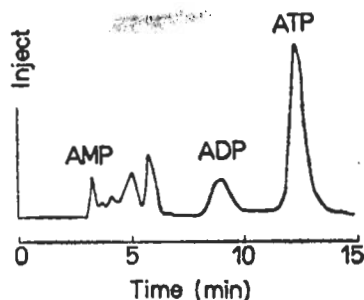


Fig 3. HPLC assay of adenine nucleotides of earthworm dorsal muscle extracted with 2.5% perchloric acid. Instrument Waters 244 type, column  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$ (4 mm  $\times$  30 cm), solvent methanol/water(30/70), each with PIC reagent A, PH 7.72, polarity 8.39, pressure 1000 psi, flow rate 1 ml/min, detector UV 254 nm, ATP retention time 12 min 18 s, ATP 146 ng/2  $\mu$ l.

3.4, 10.2, 30.7, 92.0  $\mu$ g/ml 对蚯蚓作用 20 min 后, 蚯蚓背肌中 ATP 含量分别为  $1.24 \pm 0.06$ ,  $1.91 \pm 0.22$ ,  $1.34 \pm 0.32$ ,  $1.20 \pm 0.27$ ,  $1.28 \pm 0.17$ ,  $0.95 \pm 0.26$   $\mu$ mol/g 湿组织 ( $n=3$ )。当用 NS 0, 1.8, 5.5, 16.5, 49.5, 148.5  $\mu$ g/ml 对蚯蚓作用 20 min 后, 蚯蚓背肌中 ATP 含量分别为  $1.41 \pm 0.08$ ,  $1.98 \pm 0.13$ ,  $1.11 \pm 0.03$ ,  $1.03 \pm 0.08$ ,  $1.13 \pm 0.11$ ,  $0.71 \pm 0.11$   $\mu$ mol/g 湿组织 ( $n=3$ )。以上试验表明, 低

剂量的毒扁豆碱(1.1  $\mu\text{g/ml}$ )和NS(1.8  $\mu\text{g/ml}$ )可使蚯蚓背肌中ATP含量升高40-50%。NS浓度增加,有使ATP含量逐步降低的趋势,这种作用类似于索曼,但作用远较索曼弱。当其浓度高达148.5  $\mu\text{g/ml}$ 时,ATP含量才降至正常值的一半。

**在索曼中毒时,NS对蚯蚓背肌ATP含量降低的防止** 很多工作已经证明可逆性ChE抑制剂NS在索曼中毒时对ChE有一定的保护作用<sup>(5,6)</sup>。本文为了研究蚯蚓背肌ATP的变化与ChE间的关系,对此作了观察,实验选用了-一个不引起蚯蚓背肌ATP含量变化的NS浓度(0.5  $\mu\text{g/ml}$ ),并采用三种不同的方法,观察ATP含量的变化(图4)。第一法:以NS配入含不同浓度索曼的任氏液中(NS, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ )分别用3 ml将蚯蚓浸泡20 min(图4 A); 第二法:先用NS任氏液(NS, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ )3 ml将蚯蚓浸泡20 min以后再放入含不同浓度索曼的任氏液中,(不含NS)中毒20 min(图4 B); 第三法:先用NS任氏液(NS, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ )浸泡20 min后,将蚯蚓放入含NS(0.5  $\mu\text{g/ml}$ )的索曼任氏液中中毒20 min(图4 C),以正常任氏液和NS任氏液(NS, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ )作对照。

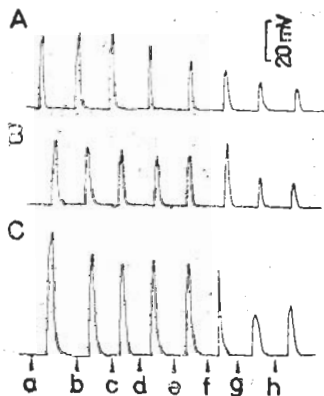


Fig 4. Effect of neostigmine (NS) on ATP content in earthworm dorsal muscle poisoned by soman. A, NS+soman 20 min; B, NS 20 min later, soman 20 min; C, NS 20 min later, NS+soman 20 min; a) Ringer solution; b-h)NS 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ; d-h) soman 0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

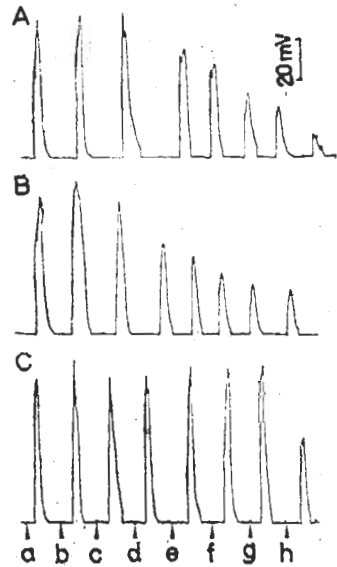


Fig 5. Effect of cobra venom (CBV) on ATP content in earthworm dorsal muscle poisoned by soman. A, CBV+soman 20 min; B, CBV 20 min later, soman 20 min; C, CBV 20 min later, CBV+soman 20 min. a) Ringer solution; b-h) CBV 25  $\mu\text{g/ml}$ ; d-h) soman 0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

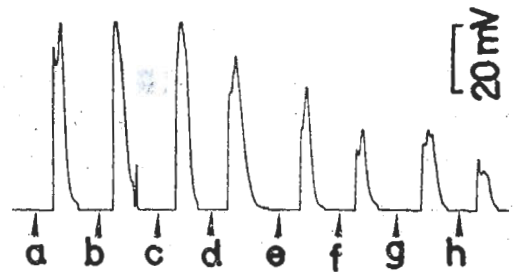


Fig 6. Effect of scopolamine (SP) on ATP content in earthworm dorsal muscle poisoned by soman. a) Ringer solution; b-h) SP 50  $\mu\text{g/ml}$ ; d-h) soman 0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. Only by method C the profile of ATP content was shown.

这三法均对背肌作ATP含量分析,结果表明,第一法与索曼单独作用时一样,第二法,第三法在索曼浓度较低时,能使蚯蚓背肌内ATP含量不致降低,而在高浓度索曼作用下,NS就失去这种防护作用。

**CBV对索曼中毒时蚯蚓背肌ATP含量的影响** CBV可以阻断神经肌肉接头处的N-胆

碱能受体。我们首先试验了不同浓度(6.25-100  $\mu\text{g/ml}$ )的CBV对蚯蚓的作用。结果表明,尽管所用CBV浓度范围很大,但ATP含量基本不受影响。用25  $\mu\text{g/ml}$ 的CBV作ACh受体阻断实验,结果见图5。第一法,第二法(图5, A, B)与索曼单独作用一致。第三法(图5, C)在索曼浓度达40.5  $\mu\text{g/ml}$ 时,蚯蚓背肌中ATP含量才有明显的降低。这说明当N-胆碱能受体被CBV阻断时,ATP的含量不致降低。

而用M-胆碱能受体阻断剂SP(50  $\mu\text{g/ml}$ )作上述实验,三种方法均不能维持蚯蚓背肌中ATP的水平,而与索曼单独作用一样。以第三法为例见图6。以上实验一方面证实了在蚯蚓背肌中存在N-胆碱能受体,同时说明ATP的释放和消耗确实和ACh的作用密切相关。

**AR对索曼中毒的蚯蚓背肌ATP水平的影响** 用1 mM的AR作上述实验(图7),观察到第二法(图7, B)索曼浓度为0.5  $\mu\text{g/ml}$ ,

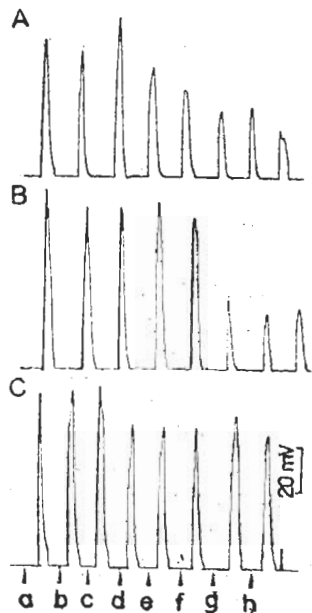


Fig 7. Effect of adenosine (AR) on ATP content in earthworm dorsal by soman. A: AR+soman 20 min, B: AR 20 min later, soman 20 min; C: AR 20 min later, AR+soman 20 min. a) Ringer solution, b-h) AR 1 mM; d-h) soman 0.5, 1.5, 4.5, 13.5, 40.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.

1.5  $\mu\text{g/ml}$ 时, AR能使蚯蚓背肌中ATP含量保持不变,索曼剂量加大,AR则失去这一作用,而第三法(图7 C)则基本能使ATP含量维持在同一水平

**AS和FA对蚯蚓的作用** 为了进一步观察索曼中毒过程中,蚯蚓背肌中索曼含量的降低是否具有一定的专一性,我们以1-5%的AS对蚯蚓作用后,测定其背肌中ATP含量。AS虽能引起蚯蚓剧烈运动,也可能消耗高能化合物,但实验结果表明并不引起蚯蚓背肌内ATP含量的明显变化。较低浓度(1-3%)的AS还有使ATP略有升高的趋势。AS(3%)与索曼同时作用于蚯蚓,与索曼单独作用时情况类似,随索曼浓度的升高,ATP含量减低。

用0.125-2 mM的FA对蚯蚓作用,不引起蚯蚓背肌ATP含量的改变,而0.5 mM的FA与索曼同作用于蚯蚓,与索曼单独作用无异。

AS是一种盐析剂,而FA的作用部位可能是在中枢兴奋敏感的突触上,有类似中枢抑制性递质甘氨酸的作用。以上实验初步说明,索曼对蚯蚓背肌可引起ATP的降低,但AS与FA无此作用,同时也不能防止索曼中毒引起的背肌ATP含量的降低。

## 讨论与结语

本文首次证实,蚯蚓背肌ATP的含量受到索曼中毒剂量的影响,并且有一定的专一性,我室任蕴芳等观察到,蚯蚓在中毒后,背肌中ACh含量随索曼的浓度逐渐增高<sup>(7)</sup>。根据本文实验,当蚯蚓背肌中ChE受到NS保护以及N-胆碱能受体受CBV阻断后,可使索曼中毒的蚯蚓背肌中ATP含量不致降低,而SP却没有这一作用。这些实验表明,在蚯蚓被索曼中毒时,ATP含量的变化是与ChE及N-胆碱能受体有关,蚯蚓背肌存在烟碱样胆碱能受体,而无毒蕈碱样作用<sup>(8)</sup>。ATP含量的变化还可能与ACh释放的作用有关。

索曼为ChE不可逆性抑制剂,使神经末梢释放的ACh在体内积聚,并作用于N-胆碱

能受体, 此后才引起体内 ATP 的释放与含量减少。浸泡液中测不到有 ATP 的升高, 因此可推测, 释放出的 ATP 可能被腺苷三磷酸酶 (ATP-ase) 很快降解成 ADP, AMP 和 AR, 它们在一定的浓度下, 可能对 ACh 的释放起到反馈抑制或调节作用。实验表明, AR (1 mM) 能维持索曼中毒的蚯蚓背肌 ATP 的水平, 这从另一个侧面推测, AR 可抑制 ACh 的释放, 从而控制 ATP 的消耗。AR 是 ACh 释放的有效抑制剂, 它通过 2'-OH 基对 ACh 释放起到抑制作用, 还可能阻断  $Ca^{++}$  的越膜而作用于胆碱能神经末梢。

ACh 与 ATP 不是由同一部位释放的。用大鼠膈肌标本研究 ACh 与 ATP/ADP 的释放, 认为 ATP 的主要来源在突触前, 而用电鳗电器官所做的实验, 则认为 ATP 的主要来源在突触后, 我们用 CBV 做的实验表明 ATP 的主

要来源在突触后。但也不排除中毒时, ATP 在蚯蚓体内代谢和转化的可能性。

我们提出, 索曼中毒引起的蚯蚓背肌 ATP 含量明显降低, 也可能是蚯蚓死亡原因之一。

**致谢** 方允中教授提供仪器使用的方便。沈倍奋赠 FLE

### 参 考 文 献

- 1 Silinsky EM. *J Physiol (Lond)* 1975; 247: 145
- 2 Israël M, Lesnats L, Meunier FM, Stinnakre J. *Proc R Soc Lond [Biol]* 1976; 193: 461
- 3 Michaelson DM. *FEBS Lett* 1978; 89: 51
- 4 Thore A. *Science Tools* 1979; 26: 30
- 5 Dirnhuber p, Green DM. *J Pharm Pharmacol* 1978; 30: 419
- 6 Berry WK, Davies DR. *Biochem Pharmacol* 1970; 19: 927
- 7 任蕴芬、金道山、周廷冲. 中国药理学报 1984; 5: 145
- 8 周建群、周廷冲. 同上 1982; 3: 84

*Acta Pharmacologica Sinica* 1985 Mar; 6 (1): 6-10

## CHANGE OF ATP CONTENT OF EARTHWORM DORSAL MUSCLE DURING SOMAN POISONING\*

ZHU Rong-xin, WANG Li-ping, ZHOU Ting-chong (T C Chou)

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

**ABSTRACT** Luciferase-luciferin method was used in the assay of ATP extracted with 6% n-butanol from the earthworm (*Eisenia foetida*) dorsal muscle. ATP content in the dorsal muscle of intact earthworm poisoned by various concentrations of soman was present a good dose-dependent fashion. When 1.5  $\mu\text{g/ml}$  soman was used, muscle ATP reduced to one-half of the normal value, whereas no ATP was found in the bathing medium. Ammonium sulfate and flunazepam, although caused muscular contraction, were nothing to do with the ATP level. Experiments with eserine, neostigmine and

cobra venom suggested that ATP efflux probably closely related to ACh release. Cobra venom (25  $\mu\text{g/ml}$ ), but not scopolamine, maintained ATP within the normal level. It indicated that N-ChR action of the earthworm dorsal muscle is involved in the above-mentioned reaction. Adenosine 1 mM suppressed ATP release through inhibition of ACh liberation which might be the mechanism for the protective effect of adenosine on the ATP content of dorsal muscle during soman poisoning.

**KEY WORDS** oligochaeta; adenosine triphosphate; cholinergic receptors; soman; adenosine; cobra venoms; azepines; neostigmine; luciferase; luciferin.

\* Projects supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences.