

维埃克斯对电鳗乙酰胆碱酯酶的作用

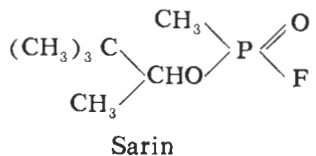
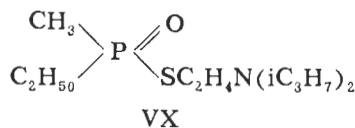
罗毅、杨松成、张其楷 (军事医学科学院药理毒理研究所, 北京 100800)

提要 应用毛细管气相色谱、气相色谱-质谱联用及放射性同位素标记等方法, 研究了 VX 与电鳗 AChE 的作用。VX 与电鳗 AChE 作用时除主要发生磷酸化而抑制酶的活力外, 还发现 VX 与电鳗 AChE 活力中心的巯基形成二硫复合物而抑制酶的活力。此外, 在生理条件下, 92% 的 VX 是以叔胺氮阳离子的形式存在, 并以静电引力与电鳗 AChE 活力中心的阴离子部位定向结合。

关键词 维埃克斯; 电鳗; 乙酰胆碱酯酶; 索曼; 对氯汞苯甲酸; 二巯基丙磺酸钠; 气相色谱法; 质量碎片质谱法; O-乙基-甲基硫赶膦酸; [³⁵硫]维埃克斯

维埃克斯(VX)是作用强而持久的有机磷胆碱酯酶抑制剂。以往人们从酶抑制动力学、酶抑制率、毒理等方面进行了研究。孙曼霁等研究了 VX 与 AChE 的作用方式, 未见有关

VX 与 AChE 作用后产物方面的报道。本文从分析 VX 与电鳗 AChE 尼龙网固相酶作用后主要产物的角度出发, 研究了 VX 对电鳗 AChE 的作用方式及影响因素



材 料

电鳗 AChE 固相酶从我国东海产丁氏双鳍

电鳐(*Torpedineform nacline Timelei*)的电器官中提取(未发表资料), 然后接到 100 目尼龙网上, 其比活性为 15.02 mmol ACh/(h·mg) 蛋白。

Varian 3700 型气相色谱仪(GC), 弹性石英毛细管柱, 内径 0.18-0.22 mm, 长 25 m, 内涂 OV-101 固定液。火焰电离检测器, 温度 270°C, 气化室温度 230°C, 柱温 80-250°C, 10°C, 载气流速 1.0 ml。

Varian MAT 44 S 型气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)。LKB 1215 Rackbeta 11 液体闪烁计数仪。

方法及结果

VX 与电鳐 AChE 固相酶作用后产物的分析 用 0.1 mol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液配成 VX 2 mmol/L 水溶液 10 ml, 加入 70 cm² 固相酶片。37°C 孵温 1 h 后用 45 ml HCCl₃ 分 3 次抽取。抽取液减压浓缩至 0.1 ml, 用 GC, GC-MS 进行分析。同时做 VX 水解, 空白尼龙网与 VX 水解, 空白酶对照实验。结果见图 1, 表 1 及表 2。

实验结果表明: 1) 同条件下尼龙网对 VX

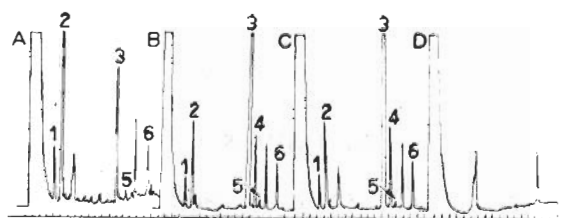


Fig 1. Gas chromatography of the enzymolytic products of VX by the action of torpedo AChE. A) Enzymolysis of VX; B) Hydrolysis of VX; C) Hydrolysis of VX and nylon net; D) Torpedo AChE. All the peak numbers are corresponding to those in Tab 1.

的水解基本上无影响。2) VX 的酶解产物与水解产物基本一致, 主要有六个峰。经 GC 及 GC-MS 分析, 证明这些峰分别是表 1 中的化合物。3) VX 酶解的主要产物有两个, 分别是 No.1 和 No.2 色谱峰。它们在量上都明显地高于同条件下水解的样品(表 2)。

索曼对 VX 与电鳐 AChE 作用的影响 用 1 mmol/L 的索曼 10 ml 于 37°C 先与 70 cm² 固相酶片作用 1 h, 然后加入终浓度为 2 mmol/L 的 VX, 再按前述方法实验。结果见表 3。

结果表明, 电鳐 AChE 先经索曼抑制后再

Tab 1. Identification of enzymolytic products of VX by torpedo AChE

Peak No.	Name	Structure	Analytical method
1	Diisopropylaminochloroethane	$\text{ClC}_2\text{H}_4(\text{iC}_3\text{H}_7)_2$	GC-MS
2	Diisopropylaminoethanethiol	$\text{HSC}_2\text{H}_4(\text{iC}_3\text{H}_7)_2$	GC-MS
3	Remained VX	$\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{POSC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{iC}_3\text{H}_7)_2$	GC-MS
4	O-deethyl VX	$\text{CH}_3(\text{OH})\text{POSC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{iC}_3\text{H}_7)_2$	Conjectural
5	<i>N,N'</i> -thiodiethylenebis(diisopropylamine)	$(\text{iC}_3\text{H}_7)_2\text{NC}_2\text{H}_4\text{SC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{iC}_3\text{H}_7)_2$	GC-MS
6	<i>N,N'</i> -dithiodiethylenebis(diisopropylamine)	$(\text{iC}_3\text{H}_7)_2\text{NC}_2\text{H}_4\text{SSC}_2\text{H}_4\text{N}(\text{iC}_3\text{H}_7)_2$	GC-MS

Tab 2. Peak height (cm) of 2 main products of VX 2 mmol/L. ($\bar{x} \pm \text{SD}$) * $p > 0.05$, ** $p < 0.01$

Condition of reaction	Diisopropylaminochloroethane	Diisopropylaminoethanethiol
Enzymolysis of VX	$14.00 \pm 0.33^{***}$	$24.50 \pm 0.30^{***}$
Hydrolysis of VX	9.50 ± 0.25	18.60 ± 0.24
Hydrolysis of VX & blank nylon net	$9.60 \pm 0.40^*$	$18.80 \pm 0.15^*$
Torpedo AChE	0	0

Tab 3. Change of peak height (cm) of 2 main products of VX 2 mmol/L by influence of soman on the action of VX on torpedo AChE ($\bar{x} \pm SD$) * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$

Condition of reaction	Diisopropylaminochloroethane	Diisopropylaminoethanethiol
Hydrolysis of VX	9.50 ± 0.25	18.60 ± 0.20
Enzymolysis of VX	14.00 ± 0.33***	24.80 ± 0.33***
Enzymolysis of VX after enzyme inhibited by soman 1 mmol/L	9.80 ± 0.15*	18.60 ± 0.31*

与 VX 作用时, VX 主要作用产物都明显地低于 VX 直接与酶作用时各产物的量, 而接近于同条件下 VX 水解各产物的量。

VX 和 O-乙基-甲基硫赶膦酸与电鳗 AChE 的作用 2 mmol/L 的 VX 或 O-乙基-甲基硫赶膦酸 10 ml, 加入 70 cm² 固相酶片在 37℃ 保温 1 h, 用 HCl 调保温液至强酸性, 用 90 ml 乙酸乙酯分 3 次抽取, 抽取液减压浓缩至干, 用 25 μl 硅烷试剂衍生化后供 GC 分析, 同时做水解对照。实验结果表明, VX 与电鳗 AChE 作用后, 溶液中所得到的 O-乙基-甲基硫赶膦酸的量较之同条件水解溶液中的明显地减少 (见表 4)。

对氯汞苯甲酸对 VX 与电鳗 AChE 作用的影响 参照索曼对 VX 与电鳗 AChE 作用的影响实验, 将索曼换成对氯汞苯甲酸。结果见表 5。当在电鳗 AChE 溶液中先加入对氯汞苯甲酸, 再与 VX 作用后, 该溶液中二异丙氨基氯乙烷和二异丙氨基乙硫醇的量较之不加对氯汞苯甲酸的 VX 酶解中的少, 而 O-乙基-甲基硫赶膦酸则增多。

Tab 4. Action of O-ethylphosphonothiolic acid (OEMPTA) 2 mmol/L and VX 2 mmol/L on torpedo AChE ($\bar{x} \pm SD$) *** $p < 0.01$

Condition of reaction	Peak height(cm)
Hydrolysis of VX	5.20 ± 0.41
Enzymolysis of VX	2.00 ± 0.30***
OEMPTA	19.70 ± 0.21
Adding torpedo AChE to OEMPTA	14.10 ± 0.13***

O-乙基-甲基硫赶膦酸对电鳗 AChE 活力的抑制 用不同浓度的 O-乙基-甲基硫赶膦酸与电鳗 AChE 溶液于 25℃ 作用 15 min 后, 用硫代乙酰胆碱比色法测定抑制率。结果见图 2。

另取 O-乙基-甲基硫赶膦酸 50 μmol/L 与电鳗 AChE 酶片室温作用 15 min 后, 用硫代乙酰胆碱比色法测定酶片抑制率。然后用 pH 6.9 磷酸缓冲液反复洗涤后, 再测定酶活力恢复率。同时做非酶水解, 正常酶水解, 依色林抑制酶等对照实验。结果见表 6。

实验表明, O-乙基-甲基硫赶膦酸能抑制电鳗 AChE 的活力, IC₅₀ 为 5.50 μmol/L。被

Tab 5. Change of peak height(cm) of main products by influence of p-chloromercuribenzoic acid(PCMBA) 1 mmol/L on the action of VX 2 mmol/L on torpedo AChE ($\bar{x} \pm SD$) * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Condition of reaction	Diisopropylaminochloroethane	Diisopropylaminoethanethiol	OEMPTA
Hydrolysis of VX	9.50 ± 0.09	19.60 ± 0.18	5.20 ± 0.41
Enzymolysis of VX	14.50 ± 0.24***	25.00 ± 0.33***	2.00 ± 0.30***
Hydrolysis of VX containing PCMBA	9.70 ± 0.09	18.18 ± 0.18	4.50 ± 0.30
Adding PCMBA to torpedo AChE before enzymolysis of VX	9.70 ± 0.24*	20.20 ± 0.33**	5.10 ± 0.41*

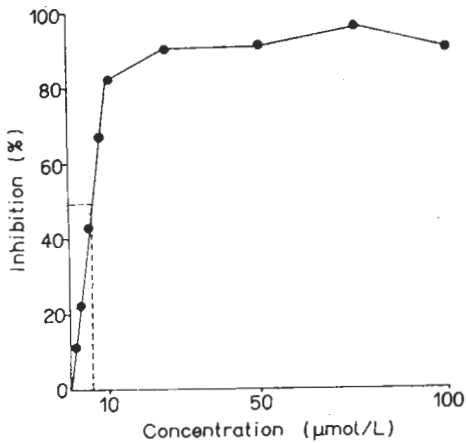


Fig 2. Inhibition of *O*-ethyl methylphosphonothioic acid on torpedo AChE

O-乙基-甲基硫赶膦酸抑制的酶片经洗涤后酶活力基本不恢复。

[³⁵S] VX 与电鳗 AChE 固相酶的作用 取用 pH 7.4 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液配成的 1.4 μmol/L 的 [³⁵S] VX 溶液 10 ml, 比放射性为 14.8 MBq。加入 5 cm² 电鳗 AChE 固相酶片, 37°C 孵温 1 h。酶片用 pH 7.4 磷酸缓冲液洗涤 10 次, 真空干燥后置 0.5% PPO 和 0.25% POPOP 甲苯混合液中计数。测后的酶片经蒸馏水洗, 二巯基丙磺酸钠 1 mmol/L 作用后,

再计数。同时做 [³⁵S] VX 1.4 μmol/L 与尼龙网, VX 1.4 μmol/L 与电鳗 AChE 固相酶的对照实验。结果见表 7。

表 7 的结果表明, 被 [³⁵S] VX 作用后的电鳗 AChE 固相酶片, 其液闪计数显著降低。同时, 参照上述方法做了二巯基丙磺酸钠对 VX 和沙林抑制酶活力的恢复实验, 其结果是 VX 和沙林对电鳗 AChE 的抑制率均在 90% 以上。经二巯基丙磺酸钠作用后, VX 抑制酶的活力恢复 20% 以上, 而沙林抑制酶的活力仅恢复约 2%。

37°C 时 VX 的 pK_a 在二氧六环水介质中用酸碱中和电位滴定法测得 37°C 时 VX 的 pK_a 值为 8.46。并由公式:

$$\text{离子化 \%} = \frac{1.00}{1.00 + \text{antilog}(\text{pH} - \text{pK}_a)} \times 100\%$$

算出 VX 在生理 pH 的环境中, 92% 的 VX 是以叔胺氮阳离子的形式存在。

硫酸铵对 VX 与电鳗 AChE 作用的影响

参照前述索曼对 VX 与电鳗 AChE 作用的影响一实验, 将索曼换成硫酸铵。结果见表 8。电鳗 AChE 光与硫酸铵作用后再与 VX 作用时, VX 的两个主要酶解产物均明显地低于同条件

Tab 6. Inhibition of *O*-ethyl methylphosphonothioic acid (OEMPTA) 50 μmol/L on torpedo AChE ($\bar{x} \pm \text{SD}$) *p>0.05, ***p<0.01

Enzyme	Absorbance		% of inhibition		Recovered activity of torpedo AChE(%)
	Before washing	After	Before washing	After	
Nonenzyme	116.5±3.3	116.5±3.3			
Enzyme	24.7±3.6	26.3±4.9			
Inhibited by physostigmine	108.1±1.9	81.7±1.8	90.9±1.9	61.3±1.8	29.6***
Inhibited by OEMPTA	72.3±2.2	71.4±2.1	51.9±2.2	49.7±2.1	2.2*

Tab 7. Change of cpm of [³⁵S] VX 14 μmol/L in AChE-[³⁵S] VX complex before and after the action of sodium 2,3-dimercaptopropylsulfonate (SDMPS) on torpedo AChE inhibited by [³⁵S] VX. ($\bar{x} \pm \text{SD}$) ***p<0.01

Samples	n	Before SDMPS	After SDMPS
[³⁵ S] VX + immobilized torpedo AChE	19	30533 ± 2225***	3929 ± 346***
[³⁵ S] VX + nylon net	19	2919 ± 291	930 ± 90
VX + torpedo AChE	15	68 ± 9	59 ± 8

Tab 8. Change of peak height (cm) of main products by influence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mmol/L on the action of VX 1 mmol/L on torpedo AChE. ($\bar{x} \pm \text{SD}$) * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$

Condition of reaction	Diisopropylaminochloroethane	Diisopropylaminoethanethiol
Hydrolysis of VX	5.70 ± 0.25	11.20 ± 0.40
Enzymolysis of VX	$10.70 \pm 0.35^{***}$	$22.50 \pm 0.33^{***}$
Hydrolysis of VX containing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$5.70 \pm 0.41^*$	$11.00 \pm 0.15^*$
Adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to torpedo AChE before enzymolysis of VX	$6.30 \pm 0.18^*$	$11.50 \pm 0.32^*$

下无硫酸铵存在时 VX 的酶解产物。

讨 论

本文结果表明, VX 与电鳗 AChE 作用时, 其作用方式有两种。一是 VX 对电鳗 AChE 的磷酰化作用。VX 与电鳗 AChE 活力中心的酯基部位磷酰化, 同时发生 P-S 键的断裂, 脱去二异丙氨基乙硫醇(图 1 中峰 2), 这一结果与孙曼霁等同位素标记法所得结果相吻合。但二异丙氨基乙硫醇在水溶液中不稳定, 很快被氧化为二异丙氨基乙二硫醚(图 1 中峰 6)。二是 VX 对电鳗 AChE 活力中心巯基的作用。VX 与电鳗 AChE 活力中心的巯基以二硫键的形式结合形成二硫复合物, 同时发生 S-C 键的断裂, 脱去环状铵离子的中间体⁽¹⁾, 该中间体在用 HCCl_3 抽取过程中或抽取液浓缩过程中, 可能与溶剂中的某些活性物质(如光气等)反应, 生成二异丙氨基氯乙烷(图 1 中峰 1)。

周廷冲教授等⁽²⁾最早提出电鳗 AChE 活力

中心有巯基存在。我们用 VX 的 S-C 键断裂含磷部份的基团 O-乙基-甲基硫赶磷酸直接与电鳗 AChE 的尼龙网固相酶作用, 发现其能抑制酶的活力, IC_{50} 为 $5.50 \mu\text{mol/L}$ 。而且, 用巯基结合剂对氯汞苯甲酸先与电鳗 AChE 作用, 再将 VX 与该作用酶反应, 发现 VX 的两个作用方式的主要离去基团的色谱峰明显地低于同条件下不加对氯汞苯甲酸的 VX 酶解。这可能是对氯汞苯甲酸首先占据了电鳗 AChE 活力中心部位, 并与巯基发生了结合, 使 VX 与该巯基发生作用的机率降低。同时, 由于对氯汞苯甲酸对酶活力中心的占据, 在一定程度上阻止了 VX 与酶活力中心酯基部位的磷酰化。 ^{35}S VX 对电鳗 AChE 的液闪计数及二巯基丙磺酸钠对 VX 抑制酶的活力恢复 20% 以上, 均表明 VX 与电鳗 AChE 活力中心巯基的结合作用。沙林的结构决定其只能与电鳗 AChE 发生磷酰化, 因此, 二巯基丙磺酸钠几乎不能使酶活力得到恢复。VX 与电鳗 AChE 的作用方式可归纳如下(图 3)。

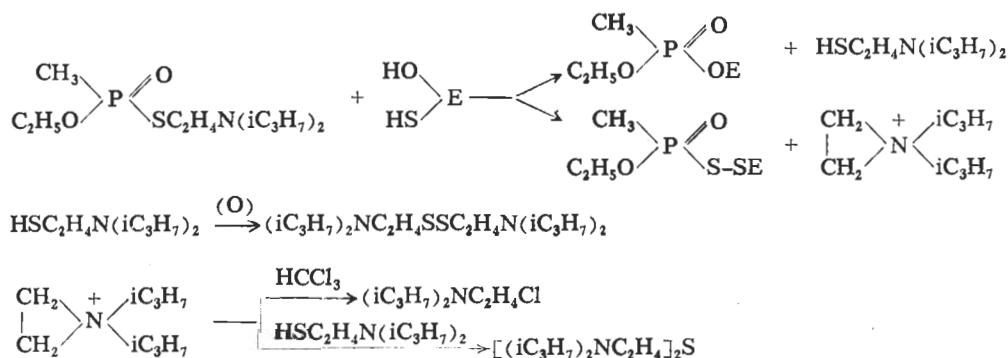


Fig 3. Two ways of the action of VX on torpedo AChE

生理条件下, 92%的 VX 是以叔胺氮阳离子的形式存在, 与其游离碱相互间是一个动态平衡。这种动态平衡存在于生物膜内外, 这种带正电荷的阳离子与酶活力中心的阴离子部位以静电引力结合。一旦酶活力中心部位被其他阳离子所占领, 就会影响 VX 与 AChE 的结合。

致谢 周廷冲教授、宋鸿鏞教授和孙曼霁副教授对本工作提出过宝贵建议。汤炳生同志曾协助进行气相色谱-

质谱联用。何云汉同志曾指导提酶。吴田虎同志供给 [^{35}S] VX。

参 考 文 献

- 1 Epstein J, Callahan JJ, Bauer VE. Kinetics and mechanisms of hydrolysis of phosphonothiolates in dilute aqueous solution. *Phosphorus* 1974; 4: 157
- 2 张兆耕、周廷冲. 对氯汞苯甲酸对电鳐乙酰胆碱酯酶活性区域的影响. 军事医学科学院院刊 1980; (3): 261

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Jan, 8 (1): 13-18

Action of VX on torpedo acetylcholinesterase

LUO Yi, YANG Song-Cheng, ZHANG Qi-Kai

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800)

ABSTRACT The action of VX (*O*-ethyl-*S*-(2-diisopropylaminoethyl) methylphosphonothiolate) on torpedo acetylcholinesterase was studied by means of capillary column GC, GC-MS and [^{35}S] VX. The immobilized torpedo AChE nylon net was used. The results showed that VX inhibited the enzyme not only by phosphorylation but also by forming dithio-complex compound with the mercapto group in the active center of the AChE. Under physiological condition,

92% VX presents as its protonated form and 8% as free base, the cationic part of VX protonated form is coulombically bound to anionic site of the enzyme selectively.

KEY WORDS VX; torpedo; acetylcholinesterase; soman; *p*-chloromercuribenzoic acid; sodium 2,3-dimercaptopropylsulfonate; gas chromatography; mass fragmentography; *O*-ethylphosphonothiolic acid; [^{35}S] VX