

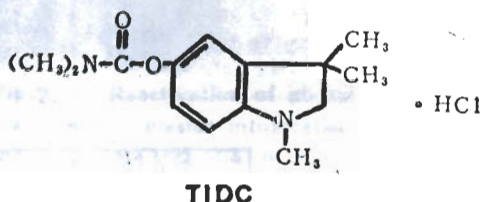
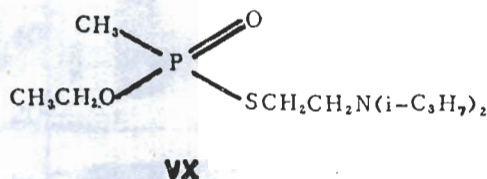
索曼、VX 和二甲氨基甲酸-5-(1,3,3-三甲基)吲哚满酯盐酸盐对小鼠血浆胆碱酯酶同工酶的作用

郝晓勇、秦伯益 (军事医学科学院药理毒理研究所, 北京 100800)

提要 小鼠血浆 ChE 经电泳分离出 8 条同工酶区带。索曼对 AChE 同工酶选择性高; VX 和 TIDC 对 BuChE 同工酶选择性高。对 AChE 抑制强度索曼 > VX > TIDC。除索曼外, VX 磷酸化和 TIDC 氨基酰化 ChE 在电泳中均有自动复活现象。索曼中毒后 ChE 的新生过程是先小分子后大分子。在抗毒实验中, TIDC 保护的血浆 ChE 与 AChE 之间有明显差别。

关键词 乙酰胆碱酯酶; 丁酰胆碱酯酶; 胆碱酯酶抑制剂; 同工酶; 电泳; 小鼠; 索曼; 二甲氨基甲酸-5-(1,3,3-三甲基)吲哚满酯盐酸盐; S-2-二异丙基氨基乙基-甲基硫代膦酸乙酯

人、大鼠等哺乳类动物组织胆碱酯酶(ChE)经电泳都可分离出 2-11 条同工酶区带⁽¹⁾。同工酶不仅在体外对 ChE 抑制剂敏感性不同,而且在有机磷化合物中毒后,组织 ChE 同工酶的反应性及恢复过程也有明显差别^(2,3)。有机磷化合物索曼和 VX 对 ChE 抑制作用很强,是化学战剂中重要的神经性毒剂。我所于六十年代合成的氨基甲酸酯类化合物催醒宁⁽⁴⁾(二甲氨基甲酸-5-(1,3,3-三甲基)吲哚满酯盐酸盐, 5-(1,3,3-trimethyl)indolinyl-N,N-dimethyl carbamate, TIDC)。在预防神经性毒剂中毒时,对 ChE 有保护作用。本文观察它们对小鼠血浆 ChE 同工酶的作用。



药 品

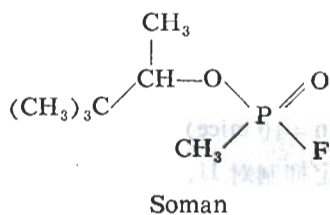
索曼、VX(S-2-二异丙基氨基乙基-甲基硫代膦酸乙酯)、TIDC、新托品(1,1-二苯基-2-(3'-托品基)乙烷盐酸盐)和碘化乙酰硫代胆碱(AcTCh)由本所提供。碘化丁酰硫代胆碱(BuTCh)购自瑞士 Fluka 公司。

方法和结果

小鼠血浆 ChE 圆盘电泳 本院饲养♂小鼠 30 只, 体重 23 ± SD 3 g, 断头处死, 取全血肝素抗凝, 室温 2800 × g 离心 10 min, 吸取血浆备用。电泳点样量每管 8 μl。

聚丙烯酰胺凝胶电泳及 ChE 活性染色方法与文献⁽⁵⁾同。分离胶浓度 7.5%, 电泳电流 3 mA/管。电泳后取出凝胶条, 在 37°C 与 3.2 mM AcTCh 反应 60 min, 经 30% 硫酸铵固定 1 d 后用岛津 CS-910 薄层扫描仪在 570 nm 处定量。

小鼠血浆 ChE 有 8 条活性染色区带(图 2. C 和 D), 称同工酶 I, II_a, II_b, II_c, III_a, III_b, III_c 和 IV。同工酶 I, II, III, 和 IV 的相对%



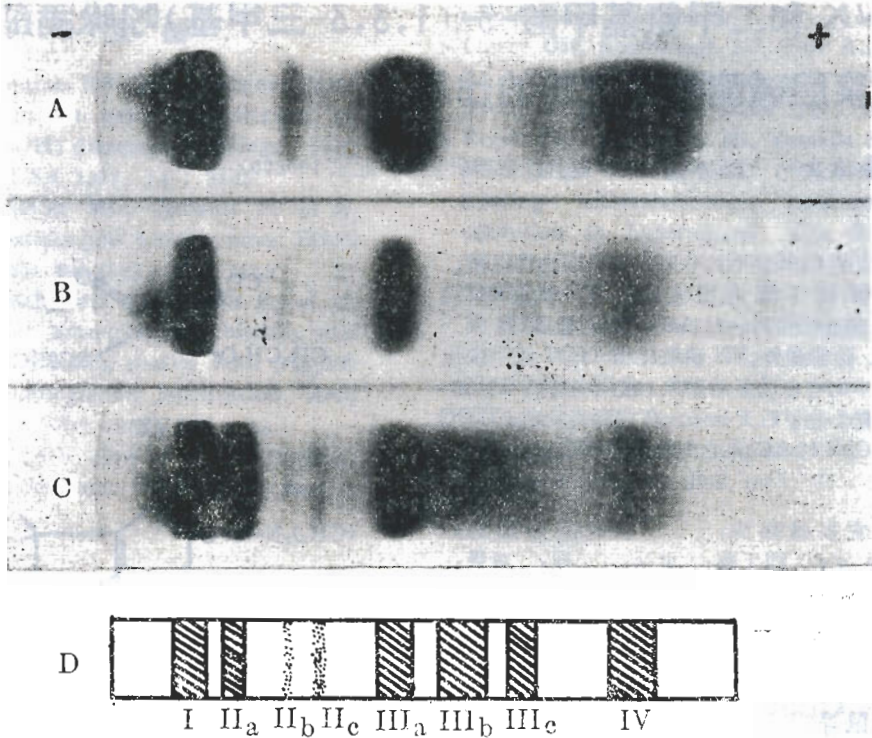


Fig 1. Distribution of AChE and BuChE isoenzymes in mouse plasma identified by staining with different substrates (3.2 mM) at 37°C. A) BuTCh 90 min; B) BuTCh 60 min; C) AcTCh 60 min; D) Schematic diagram.

含量 \pm SD 分别为 47 ± 4 , 18 ± 3 , 30 ± 4 和 5 ± 2 , $n=20$ mice.

用 3.2 mM BuTCh 代替 AcTCh 作底物染色, 同工酶 II_a, II_c 和 III_b 完全消失, 将染色时间延长 30 min 也不出现(图 2.B 和 A)。这就证明 II_a, II_c 和 III_b 是乙酰胆碱酯酶(AChE), 余为丁酰胆碱酯酶(BuChE)。小鼠血浆中 AChE 同工酶占总酶量的 $20\pm 5\%$ ($n=10$ mice)。

索曼、VX 和 TIDC 对 ChE 的选择性 在 ChE 活性染色过程中⁽⁵⁾, 于同工酶与底物反应前将胶条置所需浓度抑制剂中, 予平衡 10 min (索曼, VX) 或 30 min (TIDC), 然后加入底物, 37°C 孵温 60 min, 与正常 ChE 染色相比, 得抑制酶的残存活力。

在抑制剂 IC₅₀ (抑制 ChE 活力 50% 时的浓度) 下(表 1), II_a 对索曼敏感(完全被抑制); VX 和 TIDC 抑制的同工酶谱相似, 其中 II_a 残

Tab 1. Zymograms of mouse plasma cholinesterase inhibited by soman, VX and TIDC at IC₅₀. $n=6$ times (control $n=10$), $\bar{x}\pm$ SD.

Iso-enzymes	Content of control	Content after soman	Content after VX	Content after TIDC
I	47 ± 4	39 ± 3	35 ± 4	30 ± 4
II	18 ± 2	0	10 ± 2	10 ± 1
III	31 ± 3	10 ± 2	4 ± 2	9 ± 1
IV	4 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
Total	100	50	50	50

IC₅₀ of soman, VX and TIDC were 25 nM, 2 nM and 0.25 μ M, respectively.

存活力为 10% 左右。AChE 同工酶 II_a 和 BuChE 同工酶 III_a 的正常活力分别为 $18\pm 2\%$ 和 $21\pm 3\%$ ($n=10$ mice), 大致相当。因此, 在相同条件下测定抑制对 II_a 和 III_a 的最小抑制浓度(扫描值为 0), 可分别观察到抑制剂对 AChE 和 BuChE 的抑制强度, 而两个最小抑制浓度之比则表示抑制剂对两种 ChE 的相对抑制强

度或选择性。索曼、VX 和 TIDC 对 II_s 的最小抑制浓度分别为 0.04 μM ($n=7$)、0.2 μM ($n=7$) 和 10 μM ($n=6$)；而对 III_s 的最小抑制浓度分别为 0.08 μM 、0.06 μM 和 6 μM ；两种浓度的比值分别为 0.5、3.3 和 1.6，数值越小表示抑制剂对 AChE 选择性越高。

磷酸化(氨甲酰化)ChE 的自动复活 ♂小鼠 80 只，体重 19 ± 2 g。sc 不同剂量 VX，60 min 后断头取血(高剂量组小鼠临死前取血)，制备血浆，用 DTNB 法测定 ChE 活性⁽⁹⁾，同时取样电泳，结果见表 2。中毒酶电泳后扫描测得的残存酶活力与电泳前 DTNB 法测定值无平行关系。sc VX 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 中毒小鼠血浆残存酶活力为 7%，而电泳后上升到 50%，这显然表明电泳中 VX 磷酸化酶有自动复活(re-activation)现象。而且中毒酶活性越低，自动复活的酶就越多。同工酶的自动复活没有选择性。

中毒酶经电泳到染色约需 4 h⁽⁶⁾。图 3 表明：sc VX 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 中毒的小鼠血浆 ChE 在 37°C 孵温 4 h 后活性恢复 13%；sc VX 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的中毒酶活性恢复 15%。两者恢复幅度无明显差别 ($p>0.05$)。用 AcTCh 和 BuTCh 两种底物分别测定的 ChE 活性变化呈平行关系。将正常 ChE 电泳胶条在 VX 10 μM 中浸泡 10 min，移入无 VX 的染色基质液中，于不同

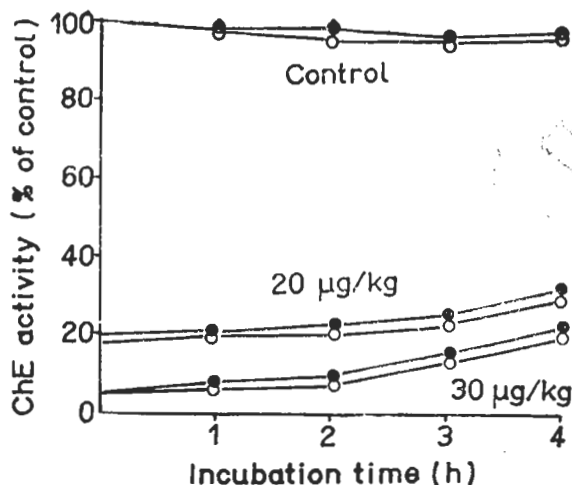


Fig 2. Reactivation of phosphoryl cholinesterase in mouse plasma intoxicated by VX (sc) while incubated at 37°C. (●)BuTCh, (○)AcTCh.

间取出与 AcTCh 反应。在第 4 h 末，同工酶总的自动复活率为 26.4% ($n=4$ times)，其中 I、II、III 和 IV 分别为 25.6%、0.6%、0.2% 和 0，I 占总量的 97%。

TIDC 3 mg/kg ip 60 min 后血浆 ChE 的抑制率为 $58 \pm 4\%$ ($n=4$ mice)，电泳后氨甲酰酶全部恢复活性(100%)。

索曼磷酸化 ChE 实验方法同上，结果见表 2。随着索曼剂量增加，中毒血浆残存 ChE 活力下降，电泳后在胶条上测得酶活力也平行

Tab 2. Activities of cholinesterase and its isoenzymes in mouse plasma after sc soman and VX. $n=6$ mice (control $n=12$), $\bar{x} \pm \text{SD}$.

	$\mu\text{g}/\text{kg}$	ChE	Isoenzymes				Total
			I	II	III	IV	
VX	0	100	45 \pm 5	20 \pm 4	32 \pm 4	4 \pm 2	100
	7.5	90 \pm 3	42 \pm 3	17 \pm 3	25 \pm 3	3 \pm 1	87 \pm 3
	10	47 \pm 6	36 \pm 2	12 \pm 2	15 \pm 1	2 \pm 1	65 \pm 2
	15	35 \pm 4	34 \pm 3	9 \pm 2	12 \pm 1	2 \pm 1	57 \pm 2
	20	30 \pm 3	30 \pm 3	9 \pm 1	10 \pm 2	2 \pm 1	51 \pm 6
	30	7 \pm 2	30 \pm 4	8 \pm 1	10 \pm 2	1 \pm 1	49 \pm 6
soman	50	66 \pm 7	38 \pm 2	4 \pm 1	23 \pm 2	2 \pm 1	67 \pm 6
	75	51 \pm 3	38 \pm 3	2 \pm 1	14 \pm 1	2 \pm 1	56 \pm 2
	100	40 \pm 2	33 \pm 1	0	4 \pm 1	0	37 \pm 1
	150	20 \pm 2	15 \pm 1	0	1 \pm 1	0	16 \pm 2
	200	11 \pm 1	13 \pm 1	0	0	0	13 \pm 1

降低。将中毒血浆在体外 37°C 温孵 4 h, 没有发现索曼抑制酶的自动复活现象。同工酶对索曼的敏感性高低为 II>IV>III>I。

sc 索曼 100 µg/kg 中毒后 1-3 h 内, 新生的同工酶 IV 便开始出现, 随着是 III(3-6 h 内)和 II(6-12 h 内)。I 在中毒 12 h 后才降至最低点并开始恢复。到中毒后 d 7, 总酶活力恢复到正常值的 90%, 同工酶的相对含量渐趋正常。见图 4。

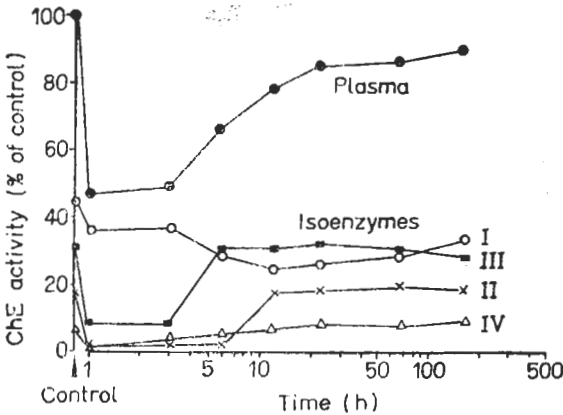


Fig 3. Recovery of ChE and its isoenzymes in mouse plasma after irreversible inhibition by sc soman 100 µg/kg.

TIDC 的抗毒作用 ♂ 小鼠 30 只, 体重 20 ± 3 g。索曼(200 µg/kg sc)中毒前 15 min ip 不同剂量 TIDC 和新托品 1 mg/kg; 中毒对照组 ip 新托品 5 mg/kg; 以求小鼠存活。中毒 60 min 后杀鼠取血, 制备血浆, DTNB 法测定血浆 ChE 活力, 取样电泳。结果见表 3。中毒对照组小鼠血浆 ChE 残存活力 8%, 均为 BuChE 同工酶 I。0.25-2 mg/kg TIDC 对同工酶 I-IV 均有保护作用。对 AChE 同工酶 II_a 的保护率约为 2-10%。在 2 mg/kg 剂量下, 小鼠在索曼中毒前就表现出胆碱能神经兴奋的症状。此时, 血浆 ChE 活力(34%)降低, 这是由于 TIDC 保护了更多 ChE(64%)所致。电泳前后 ChE 活力的差值主要与氮甲酰化 ChE 的自动复活有关。

Tab 3. Activities of cholinesterase and its isoenzymes in mouse plasma after the intoxication of soman (200 µg/kg sc) prevented by TIDC (ip). n = 6 mice (control n = 6), $\bar{x} \pm SD$.

TIDC mg/kg	ChE	Isoenzymes				Total
		I	II	III	IV	
0	9±1	8±1	0	0	0	8±1
0.25	36±2	27±2	2±1	5±1	0	34±2
0.5	43±4	30±3	4±1	7±2	0	41±3
1	45±3	34±2	7±1	8±1	1±1	50±3
2	34±4	38±4	10±3	13±1	2±1	63±7

讨 论

本文首次注意到, 小鼠血浆 ChE 经电泳可分离出单独的 AChE 区带(II_a、II_c 和 III_b)。因此, 可以在电泳凝胶上同时观察 AChE 和 BuChE 活力及其变化, 测定抑制剂对两类 ChE 的抑制强度和选择性。实验测得索曼对血浆 AChE 抑制作用最强, 其次是 VX, TIDC 作用最弱。三种抑制剂对 AChE 选择性高低是索曼 >TIDC>VX。在正常机体中或 ChE 抑制剂中毒的情况下, 胆碱能神经系统和运动功能的维持仅仅依赖于 AChE, 而目前常用方法只能测定总酶(AChE + BuChE)活力的变化。用 ChE 电泳的方法可以排除掉 BuChE 的干扰, 也就是由于抑制剂对两种 ChE 选择性造成的干扰, 直接观察抑制剂对 AChE 的作用。

磷酸化 ChE 有两条转化途径: 一是与水发生亲核水解反应去磷酸化, 恢复酶活性; 二是脱去磷酸残基上的烷氧基团, 转变成不能再复活的老化 ChE。索曼磷酸化 ChE 的半老化期极短, 只有 2.4 min, 几乎没有去酰化产物。磷酸化 ChE 半老化期长达数天时间, 相对容易去酰化。本研究发现在 37°C 温孵 4 h 后即有 15% 左右的 VX 磷酸化 ChE 自动复活, 其中绝大部分是 BuChE 同工酶 I。而残存活力相近的 VX 磷酸化 ChE 在电泳中的自动复活率高达 40%, 同工酶的自动复活没有选择性。这可能是电泳过程中某些因素加速了所有 ChE 同工酶的去酰化反应。

小鼠索曼中毒后, 血浆 ChE 新生过程表现为不同大小同工酶的逐级恢复。本研究结果与前人报告⁽⁷⁾相似。

参 考 文 献

- 1 Christoff N, Anderson PJ, Slotwiner P, Song SK. Electrophoretic and histochemical evaluation of anticholinesterase drugs. *Ann NY Acad Sci* 1966; 135 : 150
- 2 Srinivasan R, Karczyles AG, Bernsohn J. Rat brain acetylcholinesterase and its isoenzymes after intracerebral administration of DFP. *Biochem Pharmacol* 1976; 25 : 2739
- 3 Michalek H, Meneguz A, Bisso GM. Molecular forms of rat brain acetylcholinesterase in

- DFP intoxication and subsequent recovery. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1981; 3 : 303
- 4 杨宝铃、张敬娥、黄主精、杜功玉、宋斌。催醒宁和催醒安降眼压和缩瞳作用的研究。中华眼科杂志 1982; 18 : 5
 - 5 Juul P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1968; 19 : 205
 - 6 Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7 : 88
 - 7 Grubic ZJ, Klinar SB, Brzin M. Recovery of acetylcholinesterase in the diaphragm, brain and plasma of the rat after irreversible inhibition by soman: A study of cytochemical localization and molecular forms of the enzyme in the end-plate. *J Neurochem* 1981; 37 : 909

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Jul; 7 (4) : 303-307

Effects of soman, VX and 5-(1,3,3-trimethyl)indolinyl-N,N-dimethyl carbamate on cholinesterase isoenzymes in mouse plasma

HAO Xiao-yong, QIN Bo-yi

(*Inst Pharmacology & Toxicology, Academy of military Medical Sciences, Beijing 100800*)

ABSTRACT The 8 cholinesterase (ChE) isoenzymes were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) from mouse plasma. Among them, IIa, IIc and IIIb ($20 \pm 5\%$) were acetylcholinesterases (EC 3.1.17, AChE) and the rest were butyrylcholinesterases (EC 3.1.18, BuChE). The effects of soman, VX and 5-(1,3,3-trimethyl) indolinyl-N,N-dimethyl carbamate (TIDC) on the isoenzymes were observed *in vivo* and *in vitro*. Soman showed a higher selective inhibition to AChE isoenzymes than VX and TIDC which both selectively acted on the BuChE isoenzymes. During PAGE, the activity of the isoenzymes inhibited by VX (sc 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

spontaneously increased from 7% to 50% and that inhibited by TIDC (ip 3 mg/kg) from 42% to 104%, but no reactivation occurred in those inhibited by soman (sc 50-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). In a few days after sc soman 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the activities of the ChE isoenzymes recovered at different rates (I < II < III < IV).

KEY WORDS acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; cholinesterase inhibitors; isoenzymes; electrophoresis; mice; soman; 5-(1,3,3-trimethyl)indolinyl-N,N-dimethyl carbamate; ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate