

维埃克斯与索曼对烟碱样受体的直接作用

陈世铭、池木根 (军事医学科学院药理毒理研究所, 北京 100800)

提要 应用受体-配体结合试验研究神经性毒剂对 N-胆碱受体的作用。1 mol/L 浓度以下的索曼不排代 ^{125}I -cobrotoxin 及 $[^3\text{H}]$ ACh 与受体的结合, $[^3\text{H}]$ 索曼也不直接与受体结合。 $[^{35}\text{S}]$ VX 及 $[^3\text{H}]$ VX 可与 N-胆碱受体结合, 0.1-1 mol/L VX 有程度不同的排代 ^{125}I -cobrotoxin, $[^3\text{H}]$ ACh 与受体结合的作用,

1 mol/L VX 可引起受体膜微囊内 $^{22}\text{Na}^+$ 外流, 但未发现 VX 等有致受体失敏的作用。

关键词 有机磷化合物; 索曼; 维埃克斯; 烟碱受体; 眼镜蛇神经毒素

1985年4月23日收稿 1986年3月3日修回

一般认为有机磷酸酯类神经性毒剂中毒的主要原理是抑制乙酰胆碱酯酶(AChE), 对胆

碱受体产生间接作用。近年,也出现一些关于此类毒剂对受体有直接作用的报道,但尚无定论,多属间接推测,说法不一⁽¹⁻⁴⁾。本文通过生化药理学研究,探讨神经性毒剂,特别是索曼(soman)和维埃克斯(S-2-二异丙氨乙基-甲基硫赶膦酸乙酯, VX),对烟碱样胆碱受体(N-AChR)在膜水平及分子水平究竟有无直接作用。

材料与方 法

N-AChR 膜微囊的制备 丁氏双鳍电鳐(*Narcine timilei*)在我国南海捕捞,取电器官于-25℃保存。匀浆经低速离心后,取上清用蔗糖密度梯度法 90 000×离心 2 h,收集富含受体的膜微囊(receptor-rich membrane vesicle),比活性达 2 μmol cobrotoxin 结合点/g蛋白⁽⁵⁾。电镜下呈封闭性微囊,直径 0.1-0.3 μm,90%以上的结合点向外。羟胺法及凝胶电泳发现仅残存少量 AChE。用^[3H]ACh 或标记的毒剂做结合实验时,受体膜微囊先用 0.1 mmol/L 丙氟磷处理,再离心洗去丙氟磷。残余的 AChE 受到不可逆抑制,但不影响受体与^[3H]ACh 等的结合⁽³⁾。

N-AChR 蛋白的纯化 采用亲和层析法纯化,电鳐电器官在多种蛋白酶抑制剂保护下制成匀浆,经 2% Triton X-100 增溶,100 000×g 离心 1 h,取上清与 cobrotoxin-sepharose 4B 亲和层析凝胶结合,NaCl 1 mol/L 洗去杂蛋白后用氨甲酰胆碱(CCh)解吸附、透析、浓缩得纯化的受体蛋白,达到聚丙烯酰胺凝胶电泳纯,等电聚焦证明为单一成分,等电点 5.2。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳呈现四种亚单位,分子量分别为 47 k, 53 k, 61 k, 及 67 k。

¹²⁵I-cobrotoxin 的制备 用氯胺 T 法制备, Sephadex G-50 分离,比放射性为 3.33-4.44 TBq/mmol Cobrotoxin 是从湖南眼镜蛇(*Naja naja atra*)粗毒中分离出的⁽⁶⁾。

受体-配体结合试验 在电鱼生理溶液中进行,25℃下受体与毒剂先作用 20 min,加入

¹²⁵I-cobrotoxin 温育 40 min,过滤法或超速离心法把受体-配体结合物和游离配体分开,非特异性结合用加入 100 倍的非标记 cobrotoxin 测定。

超速离心法分离受体-配体复合物是在结合反应完毕,取样装入 220 μl 离心管内,150 000×离心 5 min,吸出上清液点在玻璃纤维滤片上,晾干后 LKB 1215 液闪仪计数。同时用生理溶液洗去离心管壁上残留的游离标记物,切下含有沉淀的离心管底部,放在含 Triton X-100 的闪烁液中计数。

有的样品用平衡透析法测定,将 0.2 ml 受体溶液装入透析袋内,置于 20 ml 电鱼生理溶液中,加入放射性配体,4℃轻轻震荡 16 h,取袋内、外液各 0.1 ml,作放射性计数。

^[3H]索曼比放射性 51 GBq/mmol,放化纯 99%,^[35S]VX 比放射性 3.35 GBq/mmol,放化纯 95%,^[3H]VX 比放射性 3.26 GBq/mmol,放化纯 96.7%,均为本所同位素合成组合成。^[3H]ACh 比放射性 22.05 GBq/mmol,放化纯 90%以上,中国科学院上海原子核研究所产品。索曼及 VX 由本所供给。

结 果

VX 等对 ¹²⁵I-cobrotoxin 与 N-AChR 结合的影响 Cobrotoxin 是 N-AChR 亲和力大、特异性强的配体。对 N-AChR 有作用的药物,如烟碱、氨甲酰胆碱及筒箭毒碱对 ¹²⁵I-cobrotoxin 和受体的结合有明显的抑制作用(表 1),与受体无关的化合物如甘油、芥子气等没有抑制作用。神经性毒剂索曼、沙林对 ¹²⁵I-cobrotoxin 与膜结合受体的反应影响不大,即使 1 mol/L 的浓度,也没有看到有明显的抑制作用。但 VX 有一定的排代竞争作用,0.1-1 mmol/L 的 VX 约有 18-40% 的抑制作用。用纯化的受体蛋白进行试验,结果是接近的。

VX 等对^[3H]ACh 与 N-AChR 结合的影响 ^[3H]ACh 可与膜结合受体发生特异性结合,得到结合饱和曲线, $K_D = 1.8 \mu\text{mol/L}$ 。排代竞争

Tab 1. Inhibition (%) of ^{125}I -cobrotoxin binding to N-AChR from topeo by organophosphorus compounds in comparison with cholinergic agents. (number of tests). $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$

Receptors	Drug	1 mmol/L	0.1 mmol/L	0.01 mmol/L	0.001 mmol/L
Membrane-bound	Soman	9 ± 9*	2 ± 3*	0*(3)	
	Sarin	0*(3)	0*(3)	0*(3)	
	VX	41 ± 19**	19 ± 14*	7 ± 8*	0*(4)
	Nicotine	93 ± 6**	76 ± 9**	53 ± 16**	34 ± 19**
	Carbachol	93 ± 8**	59 ± 7**	47 ± 12**	29 ± 12*
Purified	Soman	1 ± 1*	0*(3)	0*(3)	
	VX	36 ± 7**	18 ± 7**	17 ± 13*	5 ± 4*
	d-Tubocurarine	99 ± 1**	100**	95 ± 1**	9 ± 3*

试验证明, 索曼的作用不明显, 1 mmol/L 的索曼才有 4% 的抑制作用(表 2), 只有在 10 mmol/L 时才见到显著的抑制, 显然这个浓度是太高了。对于 VX 仍然可见到有较弱的抑制作用, 0.1-1 mmol/L 有 10-16% 的抑制。用提纯的受体蛋白也能得到一条 ^3H ACh 特异性结合饱和曲线, $K_D = 0.8 \mu\text{mol/L}$ 。索曼和 VX 在 1 mmol/L 浓度都没有看到有明显的作用(统计学处理, 没有显著意义)。但在 10 mmol/L 时 VX 的抑制率为 85.3%, 索曼为 63.5%。

^3H 索曼与 N-AChR 的直接结合试验

在上述排代竞争试验的基础上, 我们进一步观察 ^3H 索曼是否直接与受体结合。考虑到它们的结合物可能离解常数较大, 采用超速离心法分离, 以减少洗涤时发生离解。不同浓度的 ^3H 索曼, 25°C 下与膜结合受体作用 40 min, 离心后取上清及沉淀分别计数, 和空白对照(加 100 倍非标记索曼)比, 没有明显不同(表 3)。

Tab 2. Displacement of ^3H ACh binding to N-AChR by drugs. $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Drug	Concn (mmol/L)	dpm	Inhibition
—	—	21850 ± 1024	0
ACh	0.1	799 ± 95	100%
Cobrotoxin	0.1	1350 ± 371	97.4%
Soman	0.01	23023 ± 936*	0
	0.1	21667 ± 1117*	0
	1	21016 ± 1511*	4.0%
VX	0.01	22604 ± 1802*	0
	0.1	19860 ± 1167**	9.5%
	1	18403 ± 889**	16.4%

* $p > 0.05$, ** $p < 0.05$

在排代竞争试验中, 沉淀(P, 受体)和上清(S)的放射性计数比(P/S), 与所加入的 0-1 mmol/L 非标记索曼关系不大, 只有在 10 mmol/L 时才看到有统计学意义的差别(表 4), 说明在 1 mmol/L 以下, 沉淀中的 ^3H 索曼不是特异性结合的。

^{35}S VX, ^3H VX 与 N-AChR 的直接结合试验 ^{35}S VX 可与受体结合, 而且是可饱

Tab 3. Binding of ^3H soman to the membrane-bound receptors. (cpm). $\bar{x} \pm \text{SD}$.

^3H Soman (mmol/L)	Supernatant		Pellet	
	+ Soman	—	+ Soman	—
0.001	3416 ± 520*	3448 ± 527	409 ± 226*	374 ± 218
0.01	28802 ± 1397*	25347 ± 561	687 ± 214*	646 ± 295
0.1	211116 ± 8103*	230507 ± 23815	6608 ± 1548*	5423 ± 711
1	1759502 ± 82756*	1935456 ± 10742	53563 ± 16495*	50127 ± 21117

Compared with control * $p > 0.05$.

和的, 由 Scatchard 作图法, 得到一条下凹的曲线, 用非线性最小二乘法求得两个不同的 K_D , $K_D^1 = 269 \mu\text{mol/L}$, $B_{\text{max}}^1 = 54.62 \text{ pmol/mg}$, $K_D^2 = 90.1 \text{ nmol/L}$, $B_{\text{max}}^2 = 1.47 \text{ pmol/mg}$ 蛋白质。0.1 mmol/L 的 cobrotoxin 可抑制 48% 的 $[^{35}\text{S}]\text{VX}$ 和受体的结合率。

Tab 4. Displacement of $[^3\text{H}]\text{soman}$ bound to the membrane-bound $N\text{-AChR}$ by soman. $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Soman (mmol/L)	Pellet ($10^{-2} \times \text{cpm}$)	Supernatant ($10^{-4} \times \text{cpm}$)	P/S %
0	344 ± 36	754 ± 32	0.45
0.01	308 ± 09*	714 ± 22*	0.43
0.1	386 ± 53*	720 ± 2*	0.54
1	310 ± 67*	720 ± 21*	0.43
10	412 ± 04**	650 ± 11**	0.63

Compared with 0 mmol/L soman, * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$

用平衡透析法也发现 $[^3\text{H}]\text{VX}$ 可与受体直接结合, 如果受体预先用 cobrotoxin 处理, 则结合减少。

VX 等对 $N\text{-AChR}$ 亲和性的影响 根据文献, ACh 可使胆碱能受体失敏⁽⁷⁾。我们也观察到 CCh 预先与受体作用, 再加入 $^{125}\text{I}\text{-cobrotoxin}$, 比 CCh 和 $^{125}\text{I}\text{-cobrotoxin}$ 同时与受体作用, 对结合速率的抑制更加明显(图 1)。这

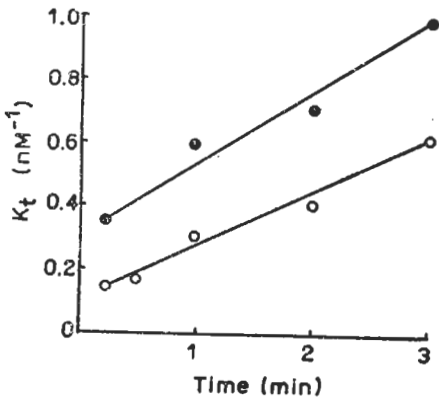


Fig 1. Binding of $^{125}\text{I}\text{-cobrotoxin}$ to the receptors in the presence of carbamoylcholine. The binding of $^{125}\text{I}\text{-cobrotoxin}$ was measured in presence of carbamoylcholine: 2 $\mu\text{mol/L}$ (●), and 2 $\mu\text{mol/L}$ pre-incubated with receptors for 15 min, prior to the addition of $^{125}\text{I}\text{-cobrotoxin}$ (○). (M = mol/L)

是一种 ACh 致受体失敏现象⁽⁸⁾。 $^{125}\text{I}\text{-cobrotoxin}$ 是 $N\text{-AChR}$ 亲和性变化的探针。此亲和性变化有一个时间过程, CCh = 2 $\mu\text{mol/L}$ 时 $t = 5 \text{ min}$, 而且是可逆的, 在去除 CCh 后 30 min, 亲和性可恢复到原有水平。对于神经性毒剂 VX 及索曼, 我们没有看到类似的致受体失敏现象。

VX 等对受体 $^{22}\text{Na}^+$ 离子流的影响 $N\text{-AChR}$ 呈桶状结构, 中央有一 2 nm 直径的离子孔道, 当受体激动时, Na^+ , K^+ 等离子流动。我们利用 $N\text{-AChR}$ 膜微囊, 把 $^{22}\text{Na}^+$ 载入囊内, 待平衡后加入 1 mmol/L CCh 或 10 $\mu\text{mol/L}$ ACh, 囊内的 $^{22}\text{Na}^+$ 很快释放出来(图 2), 0.1 mmol/L 筒箭毒碱可使这种 $^{22}\text{Na}^+$ 流出减少。VX 在 1 mmol/L 以上可使 $^{22}\text{Na}^+$ 流出增加(表 5)。

Tab 5. Effects of VX and soman on release of $^{22}\text{Na}^+$ from the membrane vesicles. The amount of entrapped $^{22}\text{Na}^+$ was determined by radioactivity on glass fiber filter discs. (cpm) * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$

Concn ($\mu\text{mol/L}$)	0	0.1	1	10	100	1000	
VX	\bar{x}	4600*	5081*	5027*	4836*	4701*	3396**
	SD	496	803	687	443	452	619
Soman	\bar{x}		5105*	4570*	4432*	4322*	3828*
	SD		74	545	674	630	572

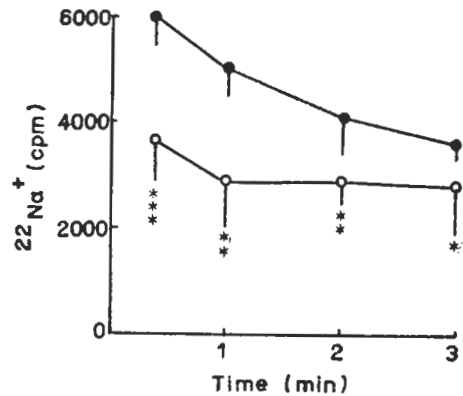


Fig 2. Carbamoylcholine-induced $^{22}\text{Na}^+$ efflux from receptor-containing membrane vesicles. The membrane vesicles pre-equilibrated with $^{22}\text{Na}^+$ were isotonicly diluted 20-fold at time zero into buffer KCl, (100 mmol/L $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, 5 mmol/L pH 7.4) containing 1 mmol/L (○) or no (●) carbamoylcholine. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

Tab 6. Inhibition of binding of radioactive compounds to N-AChR from the electric organ by drugs.

	[¹²⁵ I]cobrotoxin	[³ H]ACh	[³ H]Soman	[³⁵ S]VX	[³ H]VX
VX	+	±		++	++
Soman	-	-	-		
Nicotine	++	++		-	
Carbachol	++	++		±	
Cobrotoxin	++	++		+	+

讨 论

根据毒性和对 AChE 的抑制程度,有人提出 AChE 抑制剂可分为直接作用受体、间接作用受体和中间型。VX、索曼等归在间接作用之类⁽⁹⁾。20 年来,有一些关于这类毒剂可能直接作用于受体的证据,但多属电生理实验结果,所用毒剂浓度甚高^(2,10),另一方面,也有实验证明,丙氟磷等毒剂并不与终板上的 N-AChR 结合⁽³⁾。索曼中毒后在整体条件下胆碱能受体无敏感性变化⁽⁴⁾。我们用生化药理方法,分离出 N-AChR,排除 AChE 等的干扰,直接研究神经性毒剂与受体的相互作用。

根据文献,有机磷神经性毒剂对胆碱能受体可能的作用方式归纳为:(1)抑制 AChE,继而 ACh 蓄积,引起中毒。(2)毒剂直接作用于受体产生中毒效应。(3)ACh 过量使受体发生变构效应,导致“失敏”。(4)毒剂本身使受体“失敏”。目前以第一种最为肯定,至于毒剂与受体直接结合问题,尚有疑问。我们的主要实验结果综合在表 6。索曼在 1 mol/L 浓度以下对 N-AChR 的 cobrotoxin 及 ACh 结合部位均无直接结合的证据,10 mol/L 索曼对放射性配体有排代作用,不过浓度太高,可能意义不大。

VX 与 cobrotoxin 有相互排代作用,但 VX 排代 [³H]ACh 的能力弱,我们还观察到烟碱排代 [³⁵S]VX 的作用也很小,1 mmol/L CCh 也只能抑制 [³⁵S]VX 与 N-AChR 结合的 22%。因此,VX 的结合位置可能在 cobrotoxin 结合区上,但与 ACh 结合部位不完全一样。目前不

排除 VX 结合在其他部位,通过变构效应影响 cobrotoxin 结合的可能性。由于我们没有看到不可逆性 AChE 抑制剂索曼与受体制备特异结合的现象,所以 [³⁵S]VX 或 [³H]VX 与残余 AChE 结合而产生假象的可能不太大。

为什么 VX 与索曼等在对 N-AChR 结合上有不同呢?可能是因为 VX 属 V 类毒剂,是有机硫赶磷酸胺基酯类化合物,在生理 pH 时大多数叔胺以阳离子形式存在⁽¹¹⁾,易与受体形成复合物。也可能由于不同的立体特异性所致,有人发现,即使是胆碱能配体,与电鳗 N-AChR 的结合也不止一种结合点⁽¹²⁾。而索曼、沙林等属 G 类毒剂,不含有可形成阳离子的叔胺氮,较难与受体形成复合物。

尽管我们看到 VX 可直接结合于 N-AChR,但它与主要结合点之间形成的复合物 K_D 值为 269 $\mu\text{mol/L}$,和 VX 抑制 AChE 强度 ($pI_{50} = 8.5$) 比,还相差甚远,VX 对 AChE 的作用仍然是主要的。

致谢 承蒙周廷冲教授、孙曼霁副教授指导;汤仲明、张宝真同志帮助数据统计处理;本所同位素组提供 [³H]索曼、[³⁵S]VX 及 [³H]VX。

参 考 文 献

- 1 Van Meter WG, Karczmar AG, Fiscus RR. CNS effects of anticholinesterase in the presence of inhibited cholinesterase. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1978; 231 : 249
- 2 Bartels E, Nachmansohn D. Organophosphate inhibitors of acetylcholine-receptor and -esterase tested on the electroplax. *Arch Biochem Biophys* 1969; 133 : 1
- 3 Barnard EA, Wieckowski J, Chiu TH. Cholinergic receptor molecules and cholinesterase

- molecules at mouse skeletal muscle junctions. *Nature* 1971; 234 : 207
- 4 张 晓、秦伯益。索曼急性中毒小鼠胆碱酯酶活力和乙酰胆碱含量的关系。 *中国药理学报* 1985; 6 : 16
 - 5 陈世铭、池木根、杨 怡、许小珊。丁氏双鳍电鳐电器官乙酰胆碱受体膜微囊的分离纯化。 *军事医学科学院院刊* 1984; 5 : 571
 - 6 徐浩鹏、孙曼弄、周廷冲。中华眼镜蛇神经毒素的分离。 *军事医学科学院院刊* 1982; 4 : 447
 - 7 Raftery MA, Conti-tronconi BM, Dunn SMJ, Crawford RD, Middlemas D. The nicotinic acetylcholine receptor : its structure, multiple binding sites, and cation transport properties. *Fund Appl Toxicol* 1984; 4 (suppl 2) : S 34
 - 8 Lo MMS, Dolly JO, Barnard EA. Molecular forms of acetylcholine receptor from vertebrate muscles and torpedo electric organ. *Eur J Biochem* 1981; 116 : 155
 - 9 Aquilonius SM, Fredriksson T, Sundwall A. Studies on phosphorylated thiocholine and choline derivatives. *Toxicol Appl Pharmacol* 1964; 6 : 269
 - 10 Bullock JO, Farquharson DA, Hoskin FCG. Soman and receptor-ligand interaction in electrophorus electroplaques. *Biochem Pharmacol* 1977; 26 : 337
 - 11 Patočka J, Tulach J. Interaction of O-ethyl-S-(2-dimethylaminoethyl) methyl thiophosphate with acetylcholine esterase. *Collec Czech Chem Commun* 1969; 34 : 3191
 - 12 Eldefrawi ME, Britten AG, O'Brien RD. Action of organophosphates on binding of cholinergic ligands. *Pesticide Biochem Physiol* 1971; 1 : 101

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Sep; 7 (5) : 401-406

Direct effect of VX and soman on nicotinic receptors

CHEN Shi-ming, CHI Mu-gen

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

ABSTRACT O-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl) methylphosphonothiolate (VX) at 0.1-1mmol/L was found to block the binding of ^{125}I -cobrotoxin and ^3H ACh to nicotinic cholinergic receptors from electric organ of torpedo *Narcine timilei*. ^{35}S VX and ^3H VX were bound to the receptors and were displaced with 0.1 mmol/L cobrotoxin. Release of $^{22}\text{Na}^+$ from receptor-rich membrane vesicles was caused by 1 mmol/L VX. In contrast, 1 mmol/L soman had little or no effect on the binding of ^{125}I -cobrotoxin or

^3H ACh. ^3H soman did not show specific binding to the receptors. The phenomenon of desensitization was exhibited by preincubation of the receptors with carbamoylcholine but not VX or soman. These binding studies suggest that VX might have primarily direct effect on nicotinic receptors.

KEY WORDS organophosphorus compounds; soman; VX; nicotinic receptors; cobra neurotoxins