

- 10 Oliver IT. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. *Biochem J* 1955; 61 : 116
- 11 Hiroshi U, Shigeki I, Takashi Y, Jiro S. Correlation among lipid peroxidation, brain energy metabolism and brain oedema in cerebral ischemia. *Neuro Res* 1988; 10 : 194
- 12 Hiroaki M, Akito T, Yasuo K, *et al.* Brain eicosanoid levels in spontaneously hypertensive rats after ischemia with reperfusion: leukotriene C₄ as a possible cause of cerebral edema. *Stroke* 1988; 19 : 372
- 13 Kortaro T, Fumio G, Yasuo F, *et al.* Stable prostacyclin analogue preventing microcirculatory derangement in experimental cerebral ischemia in cats. *Ibid* 1988; 19 : 1267
- 14 Fantone JC, Kinnes DA. Prostaglandin E₁ and prostaglandin I₂ modulation of superoxide production by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Comm* 1983; 113 : 506
- 15 Simpson PJ, Mitsos SE, Ventura A, *et al.* Prostacyclin protects ischemic reperfused myo-

cardium in the dog by inhibition of neutrophil activation. *Am Heart J* 1987; 113 : 129

人参皂甙抗脂质过氧化作用及对大鼠脑再灌注损伤的保护作用

储国祥、陈修 (湖南医科大学药理教研室, 长沙 410078, 中国)

摘要 用阻断 4 血管的方法造成大鼠急性脑缺血再灌注损伤。在缺血 40 min 后再灌 1 h 时人参皂甙 Rb+Ro 100 mg/kg iv 能显著保护脑组织 CK 及 SOD 活性, 抑制脑水肿形成并减少 MDA 产生, 而且能显著促进脑内 PGI₂ 释放并抑制 TXA₂ 合成。用吲哚美辛 5 mg/kg iv 能显著阻断 Rb+Ro 对脑缺血再灌注损伤的保护作用, 这表明该保护作用是部分通过 PGI₂ 中介的。

关键词 暂时性脑缺血; 再灌注损伤; 前列腺素 X 类; 血栓素 A₂; 游离基; 过氧化脂质类; 脑水肿; 人参; 皂甙; 吲哚美辛

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Mar; 11 (2) : 123-126

维埃克斯的需氧代谢与混合功能氧化酶

傅风华、孙曼霁 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850, 中国)

Aerobic metabolism of VX and mixed function oxidases

FU Feng-Hua, SUN Man-Ji (SUN Man-Chi)
(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

ABSTRACT In our preliminary study, it has been found that VX oxidase exists in the microsome fraction of rat liver and the catalytic reaction needs the participation of molecular oxygen and coenzyme I or II. In this paper, the data showed that deoxycholate inactivated both the mixed function oxidase and VX oxidase. The specific inhibitor proadifen of the mixed function oxidase also profoundly inhibited VX oxidase activity. The complex of VX and cytochrome P-450 exhibited typical difference spectrum

of type I. Aniline competitively inhibited the inactivation of VX catalyzed by microsomes. These results indicate that VX is one of the substrates of mixed function oxidase. VX oxidase in the rat liver cells is exactly the mixed function oxidase.

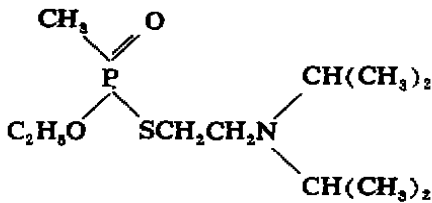
KEY WORDS mixed function oxidases; VX; aniline hydroxylase; spectrum analysis; proadifen; cholinesterase inhibitors; organophosphorus compounds

摘要 脱氧胆酸钠可使混合功能氧化酶及 VX 氧化酶活性同时丧失, 混合功能氧化酶的特异性抑制剂 proadifen 对 VX 氧化酶也有明显抑制作用, 显示两种酶促反应的密切相关性。VX 与细胞色素 P-450 结合显示典型的 I 型差示光谱, 苯胺可抑制微粒体对 VX 的酶促解毒, 均表明 VX 是混合功能氧化酶的底物。大鼠肝脏细胞中的 VX 氧化酶就是混合功能氧化酶。

关键词 混合功能氧化酶类; 维埃克斯; 苯胺羟化酶; 光谱分析; 普罗地芬; 胆碱脂酶抑制剂; 有机磷化合物

Received 1989 May 3 Accepted 1989 Sep 27

微粒体的混合功能氧化酶(mixed function oxidases, MFO)是生物体内重要的解毒酶,它由细胞色素 P-450、NADPH-细胞色素 P-450 还原酶及卵磷脂组成⁽¹⁾。肝脏中的 MFO 亦称为“肝药酶”,在药物及毒物的生物转化中起着重要作用,催化反应需要 O₂ 及辅酶 I 或辅酶 II 参与。维埃克斯(VX, S-(2-二异丙胺乙基)-甲基硫代磷酸酯, Ethyl(S-2-diisopropylaminoethyl) methylphosphonothiolate)是 V 类有机磷毒剂的典型代表,是强烈的胆碱酯酶(ChE)抑制剂。大鼠肝脏代谢 VX 的 VX 氧化酶存在于微粒体中, VX 代谢也需要 O₂ 及辅酶 I 或辅酶 II 的参与⁽²⁾, 与 MFO 极其相似。本文对 VX 氧化酶与 MFO 的关系作了研究。



Ethyl (S-2-diisopropylaminoethyl) methylphosphonothiolate (VX)

MATERIALS

二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT, SERVA 公司); proadifen(SKF-525-A, 2-(diethylamino)ethyl diphenylpropylacetate, SKF 公司); VX 由本所合成, 纯度 95-96%。其他试剂为国产 AR 级。Wistar 大鼠, ♂, 体重 217±SD 40g, 20 PR-50 型自动冷冻高速离心机及 SCP 85 H 型超速离心机(均为日立); UV-250 分光光度计(岛津)。

METHODS AND RESULTS

酶的制备 以差速离心法⁽³⁾制备亚细胞成分, 以比色法⁽⁴⁾测定蛋白质含量。S₁ 为肝匀浆经 600×g 离心 10 min 之上清液。蛋白含量为 14.2 mg/ml。S₂ 为 S₁ 在 9000×g 离心 30 min 之上清液。P₃ 为 S₂ 在 105 000×g 离心 60 min 之沉淀(微粒体)。微粒体悬液: 将 P₃

悬浮于 SPN 缓冲液(蔗糖 126 mmol/L, KH₂PO₄ 44 mmol/L, 尼克酰胺 28 mmol/L, pH 7.3)中, 蛋白含量 35.4 mg/ml。微粒体加去垢剂制品: 以 65:44.5:14.8:14.8:1.5:7.6 容量比将微粒体悬液, 甘油, 柠檬酸钾缓冲液(1 mol/L), KCl 1 mol/L, DTT 0.1 mol/L 及 10% 脱氧胆酸钠的混合液在冰浴中搅拌 20 min 而成, 蛋白含量为 15.5 mg/ml。溶液化微粒体酶: 微粒体加去垢剂制品经 105 000×g 离心 60 min 之上清液, 蛋白含量为 14.6 mg/ml。

去垢剂对微粒体中 VX 氧化酶及 MFO 活性的影响 以苯胺对位羟化酶活性作为 MFO 活性的指标。苯胺对位羟化酶的活性以比色法⁽⁵⁾测定苯胺的对位羟化产物对氨基酚为指标。苯胺对位羟化酶测定步骤如下: 取 0.1 ml 苯胺(30 mmol/L)及 0.1 ml MgCl₂(0.16 mol/L)分别加入不同的酶制品(肝匀浆上清液 0.65 ml, 微粒体悬液 0.32 ml, 微粒体加去垢剂制品 0.78 ml 或溶液化微粒体酶 0.78 ml), 再加 20 μl NADPH (10 mmol/L), 并以 SPN 缓冲液补至 1 ml。在 37℃ 振荡 20 min 后, 加 15% 三氯醋酸(TCA)0.5 ml, 离心取上清液, 测定对氨基酚的含量。肝匀浆上清液非酶对照管在加入 TCA 后再加酶制品, 其他组对照管不加 NADPH, 以 H₂O 代之。VX 氧化酶活性以酶抑制法⁽²⁾测定。

实验结果见 Tab 1, 大鼠肝匀浆上清液及微粒体悬液中 MFO 及 VX 氧化酶都有良好的活性, 而加入去垢剂后两种酶的活性均全部丧失。

VX 或苯胺与 P-450 复合物的差示光谱

以比色法⁽⁶⁾检测到微粒体悬液中存在 P-450, 其差示光谱表明微粒体悬液的部分 P-450 转变成 P-420。

取 2.9 ml 微粒体悬液分别置于参比杯及样品杯(光径 1 cm)中, 在 350-500 nm 扫描记录基线后, 分别向参比杯和样品杯中加入 0.1 ml H₂O 和 VX 2 mmol/L 或苯胺 30 mmol/L, 记录差示光谱。苯胺与 P-450 结合显示 II 型差

Tab 1. VX oxidase activity in various enzyme preparations of rat liver, $n=3$, $\bar{x}\pm SD$.

	VX oxidase $\mu\text{g VX}/$ $(\text{h}\cdot\text{mg protein})$	MFO $\text{nmol aniline}/$ $(\text{h}\cdot\text{mg protein})$
None	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Supernatant of liver		
homogenate (S_1)	0.42 ± 0.01	7.51 ± 1.09
Microsome sus- pension (P_1)	0.30 ± 0.03	3.16 ± 0.91
Microsome + detergent	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Solubilized enzyme from microsome	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Rat liver enzyme preparations, MgCl_2 16 mmol/L, VX 2 $\mu\text{mol/L}$ or aniline 3 mmol/L, SPN (sucrose 126 mmol/L, KH_2PO_4 44 mmol/L, nicotinamide 28 mmol/L) buffer, pH 7.3; NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-reduced) 0.4 mmol/L, incubated in open air with shaking at 37°C for 30 or 20 min in cases of VX oxidase of mixed function oxidases (MFO) respectively.

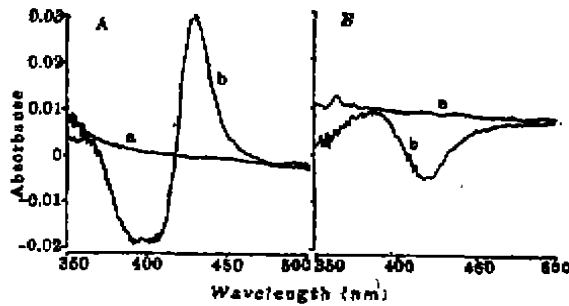


Fig 1. Difference spectra of complexes of A) aniline (1 mmol/L) and P-450, B) VX (67 $\mu\text{mol/L}$) and P-450.

a, Base line in absence of substrate (VX or aniline).

b, Difference spectra of the complexes of P-450 with VX or aniline.

示光谱(Fig 1 A), 这与已有报道⁽⁷⁾相同。而 VX 与 P-450 结合显示典型的 I 型差示光谱(Fig 1 B)。

Proadifen 对 VX 氧化酶活性的影响 取 0.2 ml S_2 加入终浓度为 1 mmol/L 的 proadifen, 在冰浴中反应 30 min, 每 5 min 振荡 1 次, 然后测定 VX 氧化酶活性。如 Tab 2 所示, 大鼠

肝脏亚细胞部分 S_2 在 37°C 30 min 内可催化 0.48 μg VX 解毒, 而加入 proadifen 可使 VX 氧化酶活性抑制约 90%。Proadifen 浓度对酶抑制法中外加 AChE 活性无影响 (proadifen 对照组 AChE 活性是正常 AChE 对照组的 98%)。

苯胺对 VX 氧化酶活性的影响 取 0.2 ml S_2 部分, 加入终浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 VX 及 3 $\mu\text{mol/L}$ 的苯胺, 37°C 振荡 30 min 后用酶抑制法测定 VX 氧化酶活性。如 Tab 2 所示, 大鼠肝脏亚细胞部分 S_2 在 37°C 30 min 内可催化 0.28 μg VX 解毒; 苯胺可使 VX 氧化酶活性抑制 82%。苯胺浓度对酶抑制法中外加 AChE 活性无影响 (苯胺对照组 AChE 活性是正常 AChE 对照组的 99%)。

Tab 2. Inhibition of VX oxidase of rat liver S_2 by proadifen and aniline. $n=3$, $\bar{x}\pm SD$.

	VX metabolized (μg)	VX oxidase activity (%)
Proadifen,		
None	0.00 ± 0.00	
S_2	0.48 ± 0.05	100
S_2 + proadifen	0.05 ± 0.09	10
Aniline,		
None	0.00 ± 0.00	
S_2	0.28 ± 0.08	100
S_2 + aniline	0.05 ± 0.08	18

Proadifen, rat liver S_2 , proadifen 1 mmol/L, inhibited in ice for 30 min, then VX 2 $\mu\text{mol/L}$, incubated at 37°C for 30 min in open air with shaking. Aniline, rat liver S_2 , aniline 3 mmol/L, VX 2 $\mu\text{mol/L}$, incubated at 37°C for 30 min in open air with shaking.

DISCUSSION

VX 氧化酶的催化反应需要 O_2 及辅酶 I 或辅酶 II 的参与⁽²⁾, 脱氧胆酸钠处理所显示的 MFO 和 VX 氧化酶的同时失活现象及 MFO 特异性抑制剂 proadifen 对 VX 氧化酶的强烈抑制现象, 提示 VX 的氧化代谢可能由 MFO 催化进行。

各种化合物与 P-450 结合可显示 3 种类型的差示光谱⁽⁷⁾, I 型, II 型及反 I 型。I 型

差示光谱 $\lambda_{max} = 385 \text{ nm}$, $\lambda_{min} = 420 \text{ nm}$. II 型差示光谱 $\lambda_{max} = 425 \sim 435 \text{ nm}$, $\lambda_{min} = 390 \sim 410 \text{ nm}$. VX 与 P-450 结合显示典型的 I 型差示光谱, 苯胺与 P-450 结合显示 II 型差示光谱. 苯胺对微粒体悬液以 VX 为底物的酶促反应产生明显的抑制作用. I 型化合物通常是 MFO 的底物, II 型化合物通常是 MFO 以 I 型化合物为底物时的竞争性抑制剂⁽⁷⁾. 综合以上结果证明 VX 是 MFO 的底物, 即肝脏中催化 VX 需氧代谢的酶是微粒体中的 MFO.

REFERENCES

- 1 Strobel HW, Lu AYH, Heidema J, Coon MJ. Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation. *J Biol Chem* 1970; 245 : 4851.
- 2 Fu FH, Sun MC. Occurrence of VX oxidase.

Chin J Pharmacol Toxicol 1989; 3 : 264

- 3 Coon MJ. Reconstruction of cytochrome P-450-containing mixed-function oxidase system of liver microsomes. *Methods Enzymol. Biomembrances Part C* 1978; 52 : 200.
- 4 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265.
- 5 Imai Y, Ito A, Sato R. Evidence for biochemically different types of vesicles in the hepatic microsomal fraction. *J Biochem* 1966; 60 : 417.
- 6 Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes, I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; 239 : 2370.
- 7 Jefcoate CR. Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. *Methods Enzymol. Biomembrances Part C* 1978; 52 : 258.

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Mar, 11 (2) : 126-130

环胍苯砒对乙酰胆碱酯酶的抑制性质

袁伯俊¹、秦伯益 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850, 中国)

Inhibitory properties of cycloguanide phenylsulfone on acetylcholinesterase

Yuan Bo-Jun, Qin Bo-Yi
(Institute of Pharmacology & Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

ABSTRACT Mouse brain homogenates, mouse RBC, immobilized enzyme of pig brain, and human RBC were chosen as source of AChE. AChE activities were determined by colorimetric and gasometric methods. Cycloguanide phenylsulfone (CGP) exerted a moderate inhibitory effect on AChE. The pl_{50} (negative logarithm of molar concentration causing 50% inhibition of AChE) towards AChE in mouse RBC and brain were

5.75 and 5.50, respectively. The binding potency to AChE was very loose. The AChE inhibition was easily reversed by washing. It showed that CGP belonged to the contra-competitive AChE inhibitor.

KEY WORDS acetylcholinesterase; cholinesterase inhibitors; cycloguanide phenylsulfone; sulfones; triazines; physostigmine; soman

摘要 环胍苯砒对真性胆碱酯酶(小鼠全脑、小鼠RBC、人RBC AChE和猪脑固相酶)有选择性抑制作用,结合疏松、抑制酶易恢复,是AChE的一种反竞争性抑制剂。

关键词 乙酰胆碱酯酶; 乙酰胆碱酯酶抑制剂; 环胍苯砒; 砒类; 三嗪; 毒扁豆碱; 索曼

Received 1988 Nov 18 Accepted 1989 Aug 29
¹ Now in Laboratory for Antimalarial Drug Research, Second Military Medical University of PLA, Shanghai 200433, China

环胍苯砒 (cycloguanide phenylsulfone, CGP) 化学名为双-对-(4,6-二氨基-2,2-二甲基-1,2-二氢均三嗪)二苯砒盐酸盐(1,1-