

# 索曼、沙林和维埃克斯对 $[^3\text{H}]$ 二苯羟乙酸奎宁酯与大鼠大脑皮层匀浆特异性结合的影响

赵德禄 王忠孝 裴淑秋 刘传绩 (军事医学科学院药理毒理研究所, 北京100800)

**提要** 索曼、沙林和 VX 对  $[^3\text{H}]$ QNB 与大鼠大脑皮层匀浆特异性结合的影响, 随着剂量的逐渐增加而有规律地减少。与对照相比, 最大减少 20% 左右。药物在  $\mu\text{M}$  浓度时, 这种影响即伴随乙酰胆碱酯酶的抑制而产生。初步提供了索曼、沙林和 VX 对中枢 M-胆碱能受体有直接作用的体外依据。

**关键词** 索曼; 沙林; 维埃克斯;  $[^3\text{H}]$ 二苯羟乙酸奎宁酯; 毒蕈碱样受体

索曼、沙林和维埃克斯(S-(2-二异丙氨乙基)甲基硫赶麟酸乙酯; VX)均系有机磷酸酯类化合物。它们除抑制乙酰胆碱酯酶(AChE)外, 还可能对中枢 M-样胆碱能受体(M-AChR)有直接作用。我们(1962-63)曾在兔脑海马 AChE 完全抑制下, 反复给予索曼 3—4 次, 每次都能引起海马脑电癫痫波, 并且都能被抗胆碱能药所消除。推测索曼对中枢 M-AChR 有直接作用。以后国外也有同样推测<sup>(1-3)</sup>。二苯羟乙酸奎宁酯(3-quinuclidinyl benzilate, QNB)对中枢 M-AChR 有高度特异、迅速而可逆的结合<sup>(4, 5)</sup>。所得复合物又难解离<sup>(6)</sup>。近年已广泛用于研究和鉴定 M-AChR 的工具药。本实验观

察药物对 $[^3\text{H}]$ QNB 与大鼠大脑皮层匀浆结合的影响, 以探讨索曼、沙林和 VX 对中枢 M-AChR 的直接作用。

## 材 料 和 方 法

本院繁殖的 Wistar  $\delta$  大鼠, 体重 180-220 g 参照文献<sup>(5)</sup>稍加改动, 测定 $[^3\text{H}]$ QNB 与大鼠大脑皮层匀浆的结合。大鼠断头后立即取出皮层。室温下按脑重加 10 倍体积冰冷蔗糖溶液(0.32 M), 用玻璃匀浆器制成匀浆(10% w/v)。再以 2700  $\times$  g 离心 10 min, 取其上层液 0.5 ml 先与被观察的药物(0.2 ml)在 15 $^\circ\text{C}$  水浴上孵温 20 min, 然后再与 5 nM  $[^3\text{H}]$ QNB 0.2 ml 于 35 $^\circ\text{C}$  孵温 30 min。总容量 2 ml, 不足部分用 0.05 M, pH 7.4 的 Na-K 磷酸缓冲液补足。用国产 49 型玻璃纤维滤纸迅速在水泵上抽滤, 并用 6 ml 磷酸缓冲液洗去游离。 $[^3\text{H}]$ QNB. 取下滤纸自然干燥, 用国产 FJ-353 型双道液体闪烁计数器计数。每份样品有 3 只复管, 取平均值。用在匀浆中加 5  $\mu\text{M}$  非标记 QNB 先孵温, 再加 5 nM  $[^3\text{H}]$ QNB 再孵温的方法测定非特异性结合部份<sup>(6, 7, 8)</sup>。 $[^3\text{H}]$ QNB 为 2.4 Ci/mmol, 由本所标记。AChE 活力用羟胺比色法测定。

结 果

$[^3\text{H}]\text{QNB}$  特异性结合和非特异性结合

在匀浆量和其它条件固定的情况下, 观察不同剂量  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  对特异性结合和非特异性结合的影响。图 1 表明, 非特异性结合和总结合与  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  量分别呈直线相关( $r = 0.98$ ) 和曲线相关( $r = 0.90$ )。均呈不饱和结合曲线。总结合计数减去非特异性结合计数所得特异性结合曲线则是饱和的。当  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  为  $5 \text{ nM}$  时, 结合计数尚在  $1200 \text{ cpm}$  左右, 并接近饱和浓度, 特异性结合与非特异性结合比值为  $12-15$ , 所以  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  采用  $5 \text{ nM}$ 。此时非特异性结合部分可以忽略, 而不影响实验结果的分析。结合计数抑制%计算公式: (对照组结合  $\text{cpm}$ -样品组结合  $\text{cpm}$ )/对照组结合  $\text{cpm} \times \%$ 。

**索曼对  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  与皮层匀浆特异性结合及对 AChE 活力的影响** 图 2 表明, 随着索曼浓度的增加, 结合% 呈有规律地减少。同时, AChE 活力很快被抑制为接近于零。当索曼浓度为  $10 \text{ pM}$  时, 计数较对照组下降  $9.5\%$ , AChE 活力被抑制  $17.6\%$ 。索曼浓度增加, 结合计数下降% 也增加, AChE 活力随着急剧下降。索曼为  $10 \text{ nM}$  时, 计数下降最多, 为  $20.3\%$ 。AChE 活力被抑制  $92.2\%$ 。而当索曼浓度再增加时, AChE 活力已趋近于零, 然而结合计数下降% 反而有所减少。索曼为  $0.1 \text{ mM}$

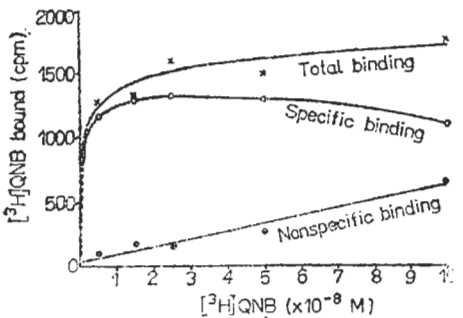


Fig 1. Specific and nonspecific bindings of  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  to rat brain homogenates as a function of the concentration of  $[^3\text{H}]\text{QNB}$ .  $[^3\text{H}]\text{QNB}$   $5 \text{ nM}$  gave a high ratio of specific to nonspecific binding( $12-15$ )

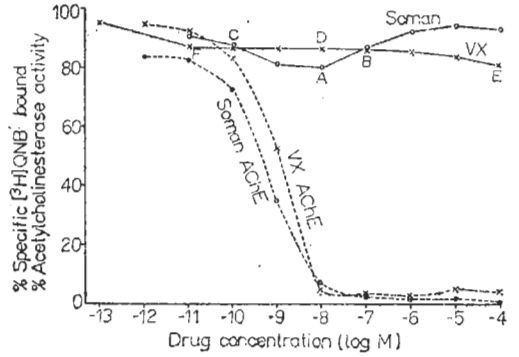


Fig 2. Effects of soman or VX on specific  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  bound and acetylcholinesterase activity in rat cerebral cortex homogenates. A~B ( $p < 0.05$ ), A~C( $p < 0.01$ ), A~D( $p < 0.05$ ),  $n_A = n_B = 10$ ,  $n_C = n_D = 5$ . E~F( $p < 0.05$ ),  $n = 5$

时, 结合计数仅下降  $7.6\%$ 。

**VX 对  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  与皮层匀浆特异性结合及对 AChE 活力的影响** 图 2 还表明, 随着 VX 浓度逐渐增加, 其结合% 也呈有规律地减少。同时 AChE 活力很快被抑制。当 VX 为  $0.1 \text{ pM}$  时, 结合计数下降  $5\%$ 。(将  $0.1 \text{ pM}$  的 VX 煮沸  $10 \text{ min}$  使 VX 分解, 则不能降低结合计数%)。VX 为  $10 \text{ pM}$  时, 结合计数下降  $13.4\%$ , AChE 被抑制  $8\%$ 。VX 浓度逐渐增加到  $0.1 \text{ mM}$  时, 结合计数下降  $19.5\%$ , 而 AChE 活力在 VX 为  $10 \text{ nM}$  时, 就已接近于零。

**沙林对  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  与皮层匀浆特异性结合及对 AChE 活力的影响** 随着沙林浓度的逐渐

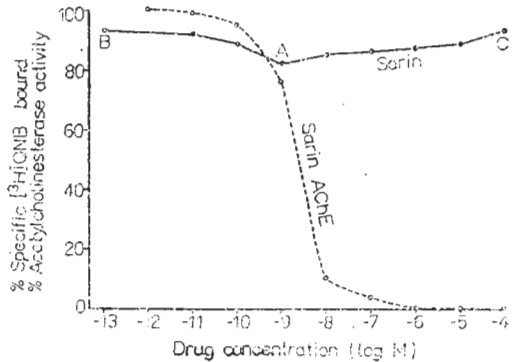


Fig 3. Effects of sarin on specific  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  bound and acetylcholinesterase activity in rat cerebral cortex homogenates. A~B ( $p < 0.01$ ), A~C ( $p < 0.01$ ),  $n = 5$

增加, 其结合计数%也呈有规律地减少。匀浆 AChE 活力很快被完全抑制(图 3)。当沙林浓度为 0.1 pM 时, 结合计数下降 6.2%。沙林为 10 pM 时, 结合计数下降 8.2%, AChE 活力被抑制 1.1%。沙林为 1.0 nM 时, 结合计数下降 17.7%, AChE 活力被抑制 23.8%。沙林为 10 nM 以上时, AChE 完全被抑制, 但是结合计数下降%反而逐渐减少。沙林为 0.1 mM 时, 结合计数仅下降 6.9%。

## 讨 论

QNB 对 M-AChR 的特异性结合, 可以被对 M-AChR 有亲和能力的药物(激动剂或拮抗剂)所抑制。而对烟碱样胆碱能受体(N-AChR)有亲和力或对 M-AChR 无亲和力的药物则很少或不能抑制其结合<sup>(5,9,10)</sup>。因此, 如果用某药能将 M-AChR 结合的 QNB 置换下来, 就可以代表该药对 M-AChR 有结合。据此, 初步认为, 就定性而言, 随着索曼、沙林和 VX 浓度的改变, 使 [<sup>3</sup>H]QNB 与皮层匀浆的特异性结合呈有规律性地减少, 提供了它们对中 枢 M-AChR 有直接作用的体外依据。就所用药物浓度的变化范围和对 [<sup>3</sup>H]QNB 结合的抑制程度而言, 药物对 [<sup>3</sup>H]QNB 结合的干扰还不算大。尤其是 VX 需要较高浓度才显示出对 [<sup>3</sup>H]QNB 结合有明显干扰。这些可能是由于药物对 AChE 亲和力大于对 M-AChR 的亲和力有关。

这种有规律性的结合减少是否是由于样品管中 AChE 被索曼、沙林或 VX 所抑制, 从而匀浆中的 ACh 被保获并作用在 M-AChR 上的结果? 在我们试验条件下, 从制匀浆一直到开始竞争, 间隔大约 45 min, 其间没采取任何保护 ACh 的措施。所以大部分 ACh 将被匀浆中 AChE 所水解。模拟本实验条件, 对正常大鼠皮层匀浆进行了三次 ACh 生物测定(蛙腹直肌

法, 敏感度为  $8.8 \times 10^{-10} \text{M}$ ) 结果均测不出 ACh。因此认为, 本实验结果与 ACh 影响无关。

索曼、沙林和 VX 对 M-AChR 的结合, 在 pM 浓度时就可以产生, 而此时 AChE 开始被抑制, 说明它们对 M-AChR 的结合和对 AChE 的抑制, 大体上是同时进行的。

索曼和沙林剂量增大到一定程度后, 对结合计数的影响反而减少。这点与 VX 显然有区别。推测索曼和沙林对 M-AChR 的作用机理可能与 VX 有所不同。

初步认为, 索曼、沙林和 VX 对中 枢 M-AChR 都有直接作用。这种作用在很低的药物浓度就与对 AChE 的抑制相伴随而产生。索曼和沙林对 M-AChR 的作用机理可能与 VX 不同。

致谢 贾永和及孟庆林同志给予很多具体帮助

## 参 考 文 献

- 1 Van Meter WG, Karczmar AG, Fiscus RR. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1978 Feb; 231 (2): 249
- 2 Aquilonius SM, Fredriksson T, Sundwall A. *Toxicol Appl Pharmacol* 1964 May; 6(3): 269
- 3 Adams GR, Yamamura HI. *Eur J Pharmacol* 1976 Jul; 38(1): 101
- 4 Snyder SH, Chang KJ. *Fed Proc* 1975 Sep; 34(10): 1915
- 5 Yamamura HI, Snyder SH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974 May; 71(5): 1725
- 6 Westek GJ, Yamamura HI. *Mol Pharmacol* 1978 Sep; 14(5): 768
- 7 Baxter JD, Funder JW. *N Engl J Med* 1979 Nov 22; 301(21): 1149
- 8 徐 珩、金文桥、夏兴林、池志强. 中国药理学报 1980 年 12 月; 1(2): 76
- 9 Yamamura HI, Snyder SH. *Mol Pharmacol* 1974 Sep; 10(5): 861
- 10 Birdsall NJM, Hulme EC. *J Neurochem* 1976 Jul; 27(1): 7

## EFFECTS OF SOMAN, SARIN AND VX ON SPECIFIC BINDING OF [<sup>3</sup>H]QNB IN RAT CEREBRAL CORTEX HOMOGENATES

ZHAO De-lu, WANG Zhong-xiao, PEI Shu-qiu, LIU Chuan-hui

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

**ABSTRACT** The interaction of organophosphorus anticholinesterases soman, sarin and VX with the muscarinic acetylcholinergic receptor (M-AChR) in CNS was studied by measuring the specific binding of [<sup>3</sup>H]QNB to the homogenates of rat cerebral cortex.

The specific [<sup>3</sup>H]QNB bound was saturable with increasing concentrations. The non-specific binding, in the presence of 5 μM unlabeled QNB and 5 nM [<sup>3</sup>H]QNB, was not saturable and increased linearly with increasing [<sup>3</sup>H]QNB. Under our assay condition, the ratio of specific binding/nonspecific binding was 12-15.

The specific binding of [<sup>3</sup>H]QNB decreased regularly as the concentrations of soman, sarin

and VX increased gradually. The decrease was initiated under low concentration of soman, sarin and VX, which only slightly inhibited the AChE activity. A maximal reduction of about 20% of specific binding of [<sup>3</sup>H]QNB was observed as compared to controls.

These data afforded tentatively a direct evidence for the action of soman, sarin and VX on M-AChR in rat cerebral cortex *in vitro*. Their dual actions on AChE and M-AChR would be useful for explaining the mechanism of action of organophosphates on CNS.

**KEY WORDS** soman; sarin; VX; [<sup>3</sup>H]QNB; muscarinic receptors