

石杉碱甲对小鼠和狗血浆胆碱酯酶同工酶的作用

郝晓勇¹、宫泽辉、秦伯益 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

提要 经圆盘凝胶电泳分离后的小鼠和狗血浆 ChE 分别显示出 8 条和 4 条同工酶区带。石杉碱甲(福定碱)对血浆中的 AChE 同工酶均有高度的选择性抑制, 而氨基甲酸酯类化合物 TIDC 对 AChE 的抑制强度与对 BuChE 的抑制基本相当。两药对狗血浆 ChE 抑制后的自动恢复速度无显著差别。TIDC 抑制的 BuChE 活性恢复极慢, 证明石杉碱甲是 AChE 抑制剂, TIDC 对 BuChE 的结合远比 AChE 牢固。

关键词 石杉碱甲; 同工酶; 乙酰胆碱酯酶; 丁酰胆碱酯酶; 聚丙烯酰胺电泳; *N, N*-二甲氨基甲酸-5-(1, 3, 3-三甲基)吲哚满酯

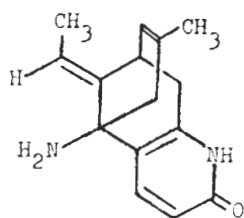
石杉碱甲(huperzine A)是从石松杉科(Huperziaceae)植物华南马尾杉 *Phlegmariurus fordii* (Baker) Ching 中提取的生物碱⁽¹⁾。对胆碱酯酶(ChE)具有较强的抑制作用, 且对真性胆碱酯酶(AChE)有高度的选择性抑制, 抑制动力学类型属竞争与非竞争性混合型抑制⁽²⁾。文献(3)报道的从蛇足石杉(千层塔) *Huperzia serrata* (Thunb) 中提取的生物碱石杉碱甲, 与华南马尾杉中提取的生物碱福定碱, 无论在化学结构上, 还是生物效应上都完全一致, 因此统一命名为石杉碱甲。

本实验室曾用圆盘凝胶电泳分离小鼠血浆

1986年11月24日收稿 1988年1月19日接受

¹ 现址: 湖南医学院药理教研室, 长沙 410008

中的 AChE 和 BuChE 同工酶, 评价索曼、维埃克斯(VX, s-2-二异丙基氨基乙基-甲基 硫赶磷酸乙酯)和 TIDC 等抑制剂的作用⁽⁴⁾。本文以 TIDC 为对照, 观察石杉碱甲对小鼠和狗血浆 ChE 同工酶的抑制作用。



Huperzine A

药品和试剂

石杉碱甲(5-氨基-11-乙叉基-5, 6, 9, 10-四氢-7-甲基-5, 9-甲撑芳辛并吡啶酮, huperzine A)、N, N-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) indolinyln-N, N-dimethyl carbamate, TIDC)、碘化乙酰硫代胆碱(AcTCh)均由本所提供。碘化丁酰硫代胆碱(BuTCh)购自瑞典 Fluka 公司。丙烯酸酰胺和 N, N-亚甲基双丙烯酸酰胺按文献⁽⁵⁾法重结晶。四甲基乙二胺、硫代乙二酰胺均购自北京化工厂。三羟甲基氨基甲烷购自成都化学试剂厂。

方法和结果

血浆 ChE 凝胶电泳 本院饲养昆明种小鼠 50 只, ♀♂兼用, 体重 $21 \pm SD$ 3 g。取样、电泳及计算方法见前文⁽⁴⁾。血浆 ChE 电泳后有 8 条染色区带, II_a, II_b 和 III_b 为 AChE 同工酶, 余为 BuChE 同工酶⁽⁴⁾。

成年杂种狗♂, 5 只, 体重 18.4 ± 2.3 kg, 后肢外侧小隐静脉取血, 肝素抗凝, 室温(20℃)2800×g 离心 15 min, 取血浆。电泳点样量每管 8 μl。用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血浆 ChE 同工酶⁽⁶⁾, 分离胶浓度 7.5%。灌胶高度 7.5-8.0 cm, 电泳电流 3 mA/管, 置 4℃ 电泳 2.5-3.0 h。取出胶条放入含 AcTCh 3.2

mmol/L 溶液中, 在 37℃ 反应 60 min, 换用硫酸铵 3 mol/L 溶液 4℃ 放置 24 h, 用二硫代乙二酰胺饱和溶液在室温(20℃)下染色 90-120 min, 使白色沉积物全部变成深绿色后, 再用 7.5% 冰乙酸固定, 最后在岛津 CS-910 双波长薄层扫描仪 570 nm 定量测定。

狗血浆 ChE 经电泳展开后, 用 AcTCh 作底物染色显示出 4 条同工酶区带(图 1), 其中 I, II, III 区带上的酶活力相对%分别为 49 ± 6 , 47 ± 6 , 3.7 ± 1.2 (n=6)。如用 BuTCh 代替 AcTCh 染色, 胶条上的第 2 条区带(同工酶 II)仅有微弱的着色, 其它各带都与 AcTCh 染色完全相同(图 1)。因而判断狗血浆 ChE 同工酶 II 主要含有 AChE, 同工酶 I 和 III 主要含 BuChE。

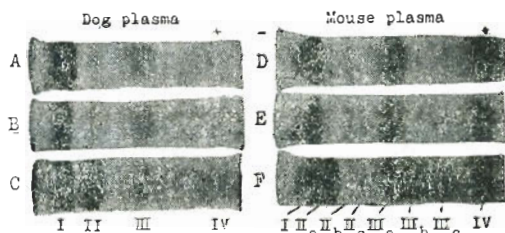


Fig 1. Inhibitory characteristics of huperzine A on ChE isoenzymes in dog and mouse plasma. Stained A), D) by BuTCh; B) by AcTCh after huperzine A 10 μmol/L for 15 min; E) by AcTCh after huperzine A 9 μmol/L for 15 min; C), F) by AcTCh

石杉碱甲对小鼠血浆 ChE 同工酶的抑制作用 小鼠 ip 石杉碱甲 4 mg/kg(约 $7 \times LD_{50}$) 1 h 后断头取血用二硫基双硝基苯甲酸(DTNB)法⁽⁷⁾测得血浆 ChE 活力抑制 $19 \pm 5\%$ (n=3 个样本, 每个样本是 3 只小鼠的血浆混合品, 下同)。石杉碱甲 10 μmol/L 对小鼠正常血浆 ChE 活力的抑制率为 $23 \pm 3\%$ (n=6)。增加石杉碱甲的剂量($10 \times LD_{50}$)或浓度(100 μmol/L), 抑制率不再增加。同样方法测得对照药 TIDC 对小鼠血浆 ChE 的抑制有良好的量效关系。体外抑酶的 pI₅₀(抑制酶活力 50% 所需要的药物浓度的负对数)值为 7.4。这个结果证

明, 石杉碱甲确与 TIDC 不同, 对主要含有 BuChE 的小鼠血浆酶活力抑制作用很弱。

将小鼠血浆 ChE 用电泳展开, 观察石杉碱甲对同工酶的抑制特点。结果表明, 仅有同工酶 II_a 和 III_b 活力随石杉碱甲浓度增加而降低(表 1)。而且, 在石杉碱甲对小鼠血浆 ChE 抑制达最大时, 只有 AChE 同工酶 II_a、II_b 和 III_b 受到完全抑制, 其余 BuChE 同工酶的分布与正常染色几乎完全相同(图 1)。TIDC 对所有的 ChE 同工酶活力的抑制强度基本相当。石杉碱甲对小鼠血浆中 AChE 有极高的选择性抑制, 对 BuChE 几乎没有抑制。其选择比(完全抑制 AChE 同工酶 II_a 的浓度/完全抑制 BuChE 同工酶 III_a 的浓度)至少 < 0.016, 远小于有机磷酸酯类化合物中的索曼(0.5)、VX (3.3) 和氨基甲酸酯类化合物 TIDC(1.6)⁽⁴⁾。因此, 对小鼠血浆 AChE 的选择性是: 石杉碱甲 > 索曼 > TIDC > VX。

石杉碱甲对狗血浆 ChE 同工酶的抑制作用 正常狗血浆经电泳展开后, 分别放入含不同浓度的石杉碱甲或 TIDC 溶液中反应 15 min, 再用 AcTCh 染色。结果显示, 石杉碱甲 0.1 μmol/L 对同工酶 II 就有明显的抑制, 随着浓度增加, 抑制作用不断增强。但对同工酶 I 和 III 的抑制很弱(表 1) 当石杉碱甲浓度增

加至 10 μmol/L 时, 被抑制的狗血浆 ChE 同工酶谱与 BuTCh 染色的同工酶谱几乎完全相同(图 1)。这结果与石杉碱甲对小鼠血浆 ChE 同工酶的抑制相一致。再加大浓度至 100 μmol/L, 同工酶 I 和 III 也出现部分抑制, 抑制率达 50% 左右。这一现象与小鼠上的结果略有差别。TIDC 10 μmol/L 能抑制所有区带上的同工酶活力。

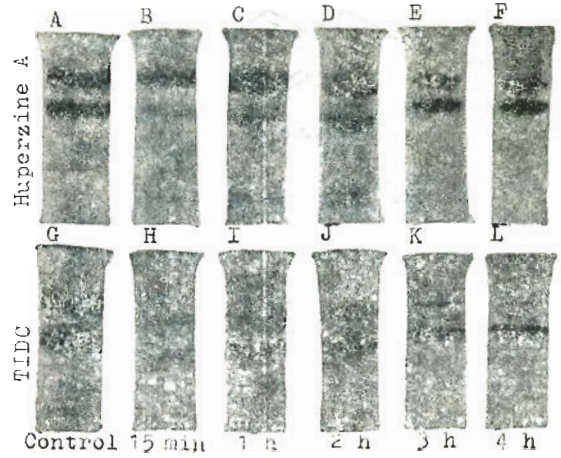


Fig 2. Recovery rate of ChE isoenzymes inhibited by huperzine A 10 μmol/L and TIDC 10 μmol/L in dogplasma. B), H) Drugs were incubated with isoenzymes at 37°C for 15 min, respectively. TIDC:5-(1,3,3-trimethyl) indoliny-1-N,N-dimethyl carbamate

Tab 1. Inhibitory effects of huperzine A on cholinesterase isoenzymes in mouse and dog plasma. Activity of isoenzymes was expressed in the area under the peak. I-IV: cholinesterase isoenzyme bands in polyacrylamide gel electrophoresis. $\bar{x} \pm SD$, * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. $n = 5$ dogs, $n = 4$ expts (Plasma from 3 mice for each expt)

Huperzine A		Activity of isoenzymes (%)				
(μmol/L)		I	II	III	V	Total
Mouse plasma	0	48.5 ± 3.7	16.6 ± 1.6	30.1 ± 2.9	4.9 ± 1.1	
	0.1	49.1 ± 2.7*	8.8 ± 0.9***	27.6 ± 2.5*	4.2 ± 0.8*	89.7 ± 4.1***
	1.0	48.3 ± 3.9*	4.5 ± 1.7***	24.5 ± 3.1*	4.0 ± 1.2*	81.3 ± 3.2***
	10.0	49.6 ± 3.6*	0***	23.4 ± 2.7**	4.4 ± 0.7*	77.4 ± 2.7***
	100.0	49.0 ± 4.3*	0***	23.7 ± 3.1**	4.1 ± 1.1*	76.8 ± 3.4***
Dog plasma	0	49.4 ± 6.4	46.9 ± 5.6	3.7 ± 1.2		
	0.1	51.4 ± 9.1*	36.7 ± 6.1**	5.1 ± 3.1*		91.7 ± 4.9**
	1.0	47.3 ± 5.7*	11.0 ± 2.5***	5.2 ± 2.8*		62.5 ± 3.5***
	10.0	42.6 ± 2.7*	0***	1.9 ± 0.2**		44.9 ± 2.8***
	100.0	29.5 ± 8.9***	0***	1.1 ± 0.1***		29.7 ± 8.5***

比较被两药抑制的狗血浆 ChE 的恢复速度, 将石杉碱甲或 TIDC (10 $\mu\text{mol/L}$) 抑制后的电泳胶条浸泡于无底物染色液中, 每隔 1 h 更换一次溶液, 随着时间的延长, 被抑制的同工酶活力逐渐恢复。石杉碱甲抑制的酶活力恢复结果表明, 受抑制轻微的同工酶 I 和 III 在浸泡 1 h 后活力即完全恢复。受抑制严重的同工酶 II 恢复较慢, 浸泡 4 h 后才恢复 79%, 结果见图 2 A-F。由此可见, 石杉碱甲对 AChE 同工酶的亲和力高, 离解速度慢。TIDC 对 AChE 和 BuChE 两种酶的抑制强度基本相同, 但在受抑酶的恢复速度上 BuChE 明显慢于 AChE (图 2 G-L)。说明 TIDC 与 BuChE 的结合比 AChE 牢固。这与小鼠试验中测得 TIDC 对 II₁ 和 III₁ (AChE 和 BuChE) 的最小抑制浓度比为 1.6, 即对 BuChE 的选择性抑制略强于 AChE 的结果⁽⁴⁾一致。

用扫描定量法测得石杉碱甲和 TIDC 对 AChE 同工酶抑制后 1, 2, 3 和 4 h 的恢复速率(%). 石杉碱甲依次为 53 \pm 22, 59 \pm 10, 68 \pm 5 和 79 \pm 21; TIDC 为 58 \pm 14, 54 \pm 14, 65 \pm 29 和 65 \pm 12。两者相比 $p>0.05$, 没有显著性差别。证明在体外, 两药对 AChE 的抑制时间基本相同。

讨 论

本文用动物血浆 ChE 同工酶测定方法观察药物对 AChE 和 BuChE 的选择性抑制, 有以下两个优点: 首先是保证了实验条件的一致性。血浆 ChE 经电泳展开后, 能清楚地将 AChE 和 BuChE 分成不同区带, 在同一个电泳胶条上能一次性观察药物对两种 ChE 同工酶的抑制作用, 完全排除了实验条件的波动和操作误差, 能更精确地比较药物的选择性作用。其二, 血浆制备简便。电泳分离效果比动物脑和肌肉组织匀浆清晰。实验选用氨基甲酸酯类化合物 TIDC 作对照药, 是因为该药对小鼠血 ChE 的抑制率比石杉碱甲强数千倍⁽²⁾, 而生物效应却比石杉碱甲弱得多。例如, 使小

鼠产生肌颤的 ED₅₀ 值, 石杉碱甲是 0.25 mg/kg, TIDC 是 3.0 mg/kg。产生这一现象的原因, 正如本文所证明的, 石杉碱甲对 AChE 有高度选择性抑制, TIDC 没有选择性或对 BuChE 的选择性抑制略强。药物对 AChE 的选择性作用越强, 疗效就越高, 副作用就越少, 实用价值也就更大。

石杉碱甲对小鼠血浆 BuChE 几乎没有抑制作用, 而对狗血浆 BuChE 具有较弱的抑制, 100 $\mu\text{mol/L}$ 抑制酶活力约 50%, 表明石杉碱甲对不同动物血浆中 BuChE 的抑制强度不同。本所李春德等在大鼠、兔、猫和人的实验中也发现石杉碱甲对血浆 BuChE 的抑制强度有明显的种族差异。

本实验结果, 石杉碱甲和 TIDC 体外抑制 AChE 的恢复速度基本相同, 但在体内, 石杉碱甲的抑酶时间远比 TIDC 长得多。小鼠 ip 石杉碱甲 1.0 mg/kg, 10 h 后脑 ChE 抑制率仍为 20% (相当最大抑制率的 2/3)。TIDC ip 2.0 mg/kg, 6 h 后酶活动即完全恢复正常⁽²⁾。造成这种体内外差别的主要原因是体内外实验条件相差甚远。体外恢复实验实际上是不断清除游离药物后, 仅观察药物与 ChE 复合体的离解速度。体内影响因素复杂, 药物作用时间的长短与它在体内代谢过程密切相关。

参 考 文 献

- 徐择邻、储宾孟、栾新慧、吴文铸、蔡定国。福定碱 (Fordine) 的结构测定。解放军医学杂志 1985; 10: 263
- 官泽辉、秦伯益。福定碱对胆碱酯酶的抑制特点。军事医学科学院院刊 1986; 10: 451
- 王月娥、岳冬贤、唐希灿。石杉碱甲的抗胆碱酯酶作用。中国药理学报 1986; 7: 110
- 郝晓勇、秦伯益。索曼、VX 和二甲基甲酸-5-(1, 3, 3-三甲基) 吡啶满酯盐酸盐对小鼠血浆胆碱酯酶同工酶的作用。同上 1986; 7: 303
- 谭国华。聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离蛋白质。见: 张龙翔、张庭芳、李令媛, 主编。生化实验方法和技术。第 1 版。北京: 人民教育出版社, 1983: 94-111
- Juul P. Humam plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1968; 19: 205

7 Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric

determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7 : 88

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Jul; 9 (4) : 312-316

Effects of huperzine A on cholinesterase isoenzymes in plasma of mice and dogs

HAO Xiao-Yong, GONG Ze-Hui, QIN Bo-Yi

(*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

ABSTRACT Using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), 8 and 4 cholinesterase (ChE) isoenzymes were separated from plasma of mouse and dog respectively. Huperzine A showed a higher selective inhibition of acetylcholinesterase (AChE) isoemzymes; but had little or no inhibition of butyryl cholinesterase (BuChE). TIDC exhibited strong inhibition of AChE and BuChE isoenzymes either. Recovery rate of AChE isoenzymes inhibited by huperzine A and TIDC in dog plasma is quite the same, but the recoveries of BuChE isoenzymes inhibited by TIDC were very slow, as the recovery

rate of AChE inhibited by huperzine A and TIDC in 4 h were 79 and 65%, while that of BuChE were 100 and 0%, respectively. Huperzine A is very potent AChE inhibitor. TIDC has no strict selectivity to AChE and BuChE, but it combines more tightly to BuChE than to AChE.

KEY WORDS huperzine A; isoenzymes; acetylcholinesterase; butyrylcholinesterase; polyacrylamide gel electrophoresis; 5-(1, 3, 3-trimethyl)indolinyln-N, N-dimethyl carbamate (TIDC)