

猪鬃插入法研究索曼在组织中扩散的特性

刘志平、余寿忠、许小珊 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 应用染毒猪鬃插入法, 采用 ChE 组化技术研究了索曼在机体组织中扩散的特性, 确立了组织血流及 CE 在限制 ChE 抑制中的重要作用, 提出了索曼中毒大鼠组织中产生以小血管为中心的区域性 ChE 抑制的原因是: 1) 索曼分子有极强的穿透力; 2) 机体中小血管较之毛细血管的血流速度为快; 3) 血液中含有结合、分解索曼的酶类。

关键词 索曼; 扩散; 胆碱酯酶; 组织化学; 血流速度; 羧酸酯水解酶; 苯巴比妥; 磷酸三甲苯酯

索曼(soman)是强烈的不可逆性胆碱酯酶(ChE)抑制剂, 它的毒性作用是由于抑制 ChE, 导致突触部位乙酰胆碱堆积, 引起一系列中毒表现。影响索曼抑制 ChE 及其毒性的因素很多, 其中包括通过水解酶对毒剂解毒⁽¹⁾; 羧酸酯水解酶(CE)和其它蛋白质对索曼分子的结合⁽²⁾; 组织 ChE 浓度⁽³⁾和血流⁽⁴⁾。过去我们在 ChE 组化观察中, 曾见到 1 个 LD₅₀ 剂量索曼中毒的鼠类脑组织中, 往往查见以小血管为中心的区域性 ChE 抑制图像^(5,6)。为了阐明索曼分子在组织中扩散的特性, 以及形成区域性抑制的原因而建立本实验模型。

材料与方 法

选用普通制毛刷的黑色猪鬃, 直径为 $40 \pm SD 5 \mu m$, 洗净晾干后剪成约 5 mm 的小段备用。每批实验前将猪鬃浸泡于新鲜配制的 0.1% 索曼水溶液中, 1 h 后取出置滤纸上晾干, 立即垂直插入被观察的脑和肝组织中。

♀性大鼠, 体重 $230 \pm SD 30 g$, ip 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 暴露颈部颅骨, 相当于大脑颞叶处钻孔, 以便将染毒猪鬃插入深达底节部。剖腹将染毒猪鬃插入肝组织中。大鼠分为 2 组, 一组为活体, 另一组为死体(即插入猪鬃前将动物阻断呼吸杀死), 比较染毒猪鬃

中所含索曼分子向周围组织扩散的范围大小。

另一批大鼠分为 3 组: 1) 猪鬃插入前不作任何处理, 为索曼中毒对照组; 2) 猪鬃插入前每天 ip 苯巴比妥钠(PB)生理盐水溶液 100 mg/kg, 为 PB 处理组, 共 5 次, 末次给药 24 h 后作猪鬃插入; 3) 实验前 24 h sc 磷酸三甲苯酯(TOCP)花生油溶液 80 mg/kg, 为 TOCP 处理组。3 组大鼠以后的处理均同前一批实验。

不论活体或死体大鼠在猪鬃插入 30 min 后切取以猪鬃为中心的组织块, 经 10% 含钙福尔马林水溶液 4℃ 固定 1 d, 30% 蔗糖水溶液中保存。组织块作以猪鬃为中心的垂直冰冻切片(40 μm), 进行改良的硫胆碱法 ChE 组化染色^(7,8), 切片用甘油明胶封固。光镜下用显微测微器测量猪鬃扩散出的索曼分子抑制周围组织 ChE 的抑制半径, 比较不同实验条件下 ChE 被抑制的范围。

结 果

比较大鼠活体与死体索曼分子在脑及肝组织中的扩散情况, 见到不论是肝或脑, 索曼在活体组织中较之在死体组织中难以扩散(图 1, 表 1)。

通过 3 组实验结果, 比较不同实验条件下肝与脑中索曼分子扩散范围的差异, 不论活组

Tab 1. Extents of soman diffusion in brain and liver of live rats vs dead rats. Number of rats in parentheses. $\bar{x} \pm SD$. *** $p < 0.01$ vs live rats, †† $p < 0.01$ vs brain.

	Radius of soman diffusion (mm)	
	Live rat	Dead rat
Brain	0.75 ± 0.14 (30)	2.09 ± 0.24 *** (12)
Liver	0.19 ± 0.06 †† (54)	0.43 ± 0.14 ***††† (23)

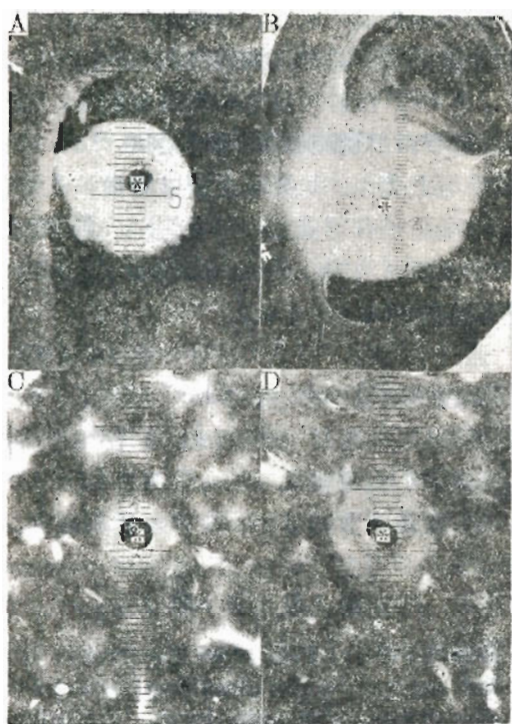


Fig 1. Diffusion of soman contained in pig bristle (*) under various conditions (scale 0.1 mm with micrometer). A) Brain of live rat; B) Brain of dead rat; C) Liver of live rat; D) Liver of dead rat.

织或死组织，索曼中毒对照组和苯巴比妥钠处理组索曼分子在肝组织的扩散远远小于其在脑中的扩散，而 TOCP 处理组这种差别缩小甚至消失(表 2)。

在活体中，索曼分子从猪鬃向周围组织扩散过程中遇到小血管，容易沿着该血管扩散；死体中则不见此现象。

活体大鼠的脑标本，往往查见在猪鬃周围 ChE 抑制区域外，存在着个别以小血管为中心的 ChE 抑制小区(图 2)，非常类似索曼全身中毒大鼠脑中以小血管为中心的 ChE 区域性抑制图像⁽⁵⁾，说明索曼分子在机体向四周组织穿过程中容易沿着小血管扩散。

讨 论

活体组织较死体组织为什么表现出如此显著的限制索曼分子扩散的作用？推想其主要原

Tab 2. Extents of soman diffusions around pig bristles soaked with soman in brain and liver of rats pretreated with ip phenobarbital 100 mg/kg qd×5 or sc tritolyl phosphate 80 mg/kg. Number of rats in parentheses. $\bar{x} \pm SD$. * $p > 0.05$; *** $p < 0.01$ vs brain.

	Radius of soman diffusion (mm)		
	No pre-treatment	Pheno-barbital	Tritolyl phosphate
Live rat			
Brain	0.75 ± 0.14 (30)	0.84 ± 0.27 (10)	1.01 ± 0.19 (7)
Liver	$0.19 \pm 0.06^{***}$ (54)	$0.18 \pm 0.08^{***}$ (16)	$0.86 \pm 0.33^*$ (12)
Dead rat			
Brain	2.09 ± 0.24 (12)	2.54 ± 0.30 (5)	2.36 ± 0.32 (6)
Liver	$0.43 \pm 0.14^{***}$ (23)	$0.30 \pm 0.07^{***}$ (10)	$1.38 \pm 0.35^{***}$ (9)

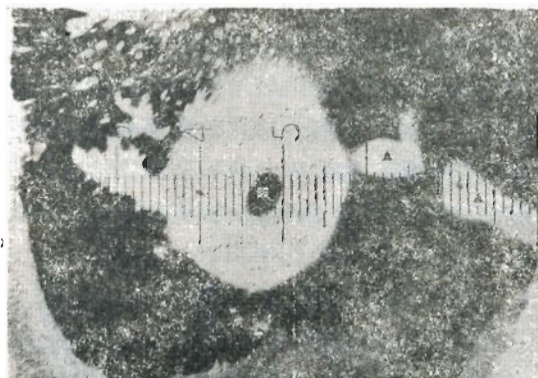


Fig 2. Regional ChE inhibition around small vessels (▲) often seen in brain of the live rats in addition to inhibition around pig bristle (*) (scale 0.1 mm with micrometer).

因是活体中有血液流动。当高浓度索曼在活体组织中散布时，由于毛细血管含有大量流动的血液，稀释了穿透入血液中的索曼分子，限制了其对组织 ChE 的抑制。组织的血流状态是影响有机磷毒剂抑制 ChE 的重要因素^(3,4)，对索曼中毒的局部来说，血流起到了限制索曼扩散的作用。反之，对携带索曼向全身组织扩散来说，血流必然起到较远距离的扩散作用。

索曼分子不仅可以抑制 ChE, 而且还能结合并抑制其它含丝氨酸的酶类, 如 CE. CE 通过与索曼结合, 降低游离索曼的浓度而起到 ChE 的保护作用. 肝组织 CE 活性为脑组织的 32 倍⁽⁴⁾, 当染毒猪鬃插入富含 CE 的肝组织时, 肝内 ChE 活性就不象脑内那样容易被抑制. TOCP 是强烈的 CE 抑制剂, 它对肝脏丰富的 CE 有很强的抑制作用. 脑 CE 含量少, 即使被 TOCP 全部抑制, 其绝对量也远远低于肝中被 TOCP 所抑制的 CE. 这样, 两种组织中未被抑制的 CE 含量接近, 因而 ChE 抑制区面积接近甚至差别消失. 苯巴比妥钠可诱导产生 CE, 但其诱导作用不如 TOCP 的抑制作用强. 本实验中未见明显的诱导作用, 和中毒对照组相比, 组织 ChE 抑制区域未见明显缩小. 但肝和脑组织相比, 前者 ChE 抑制范围比后者小得多, 这和中毒对照组结果一样(表 2). CE 对影响索曼抑制 ChE 有重要作用, 这在整体实验中已有不少报道⁽⁹⁻¹¹⁾. 由于小血管的血液流速相对地较毛细血管快⁽¹²⁾, 容易将未及结合、分解及稀释的索曼分子带出原来扩散的范围, 加之索曼有极强的穿透力, 小血管血液中索曼分子仍能一面流动, 一面向血

管外组织中扩散, 所以, 在原来扩散区外形成了以小血管为中心的区域性抑制图像(图 2, 3). 将 DFP 注射入大鼠一侧脑组织后, 对侧脑组织中可以观察到 ChE 抑制区域⁽¹³⁾, 我们的结果与之类似. 如果小血管中索曼浓度很高时, 索曼分子有可能穿出该血管壁, 再穿入邻近的小血管血流中, 继续一面流动, 一面向血管外组织中扩散(图 3 ▲).

通过本实验, 可认为索曼中毒大鼠脑组织中产生以小血管为中心的 ChE 区域性抑制的原因有 3: 1) 索曼分子有极强的穿透力; 2) 机体中小血管较之毛细血管的血液速度为快; 3) 血液中含有结合、分解索曼的酶类.

参 考 文 献

- 1 Hoskin FCG, Kirkish MA, Steinmann KE. Two enzymes for the detoxification of organophosphorous compounds—sources, similarities, and significance. *Fundam Appl Toxicol* 1984; 4 (Suppl) : S 165
- 2 Sterri SH, Berge G, Fonnum F. Esterase activities and soman toxicity in developing rat. *Acta Pharmacol Toxicol* 1985; 57 : 136
- 3 Bajgar J. Inhibition of acetylcholinesterase in different parts of the rat brain by isopropyl methylphosphonofluoridate; *in vitro* and *in vivo* experiments. *Biochem Pharmacol* 1972 21 : 687
- 4 Maxwell DM, Lenz DE, Groff WA, Karminskis A, Froehlich HL. The effects of blood flow and detoxification on *in vivo* cholinesterase inhibition by soman in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 88 : 66
- 5 许小珊. 索曼对中枢胆碱酯酶抑制的组织化学改变. *中国药理学报* 1983; 4 : 10
- 6 许小珊, 余寿忠, 张振声, 杨瑞彪. 用组织化学和图像分析间接说明索曼中毒的羧基酯酶作用. 同上 1986; 7 : 97
- 7 Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 1964; 12 : 219
- 8 Tsuji S, Larabi Y. A modification of thiocholineferrocyanide method of Karnovsky and Roots for localization of acetylcholinesterase activity without interference by Koelle's copper thiocholine iodide precipitate. *Histochem* 1983; 78 : 317

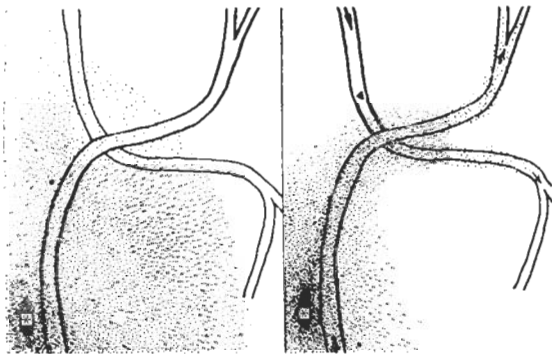


Fig 3. High concentration of soman molecules around the source (*). Approaching small vessels the soman molecules diffusing homogeneously in tissues of the dead (left), while in tissues of the live (right) they diffusing along small vessels or even penetrating into small vessels nearby(▲) and continuing to diffuse. Arrow representing the flowing blood.

- 9 Clement JG. Role of aliesterase in organophosphate poisoning. *Fundam Appl Toxicol* 1984; 4 (suppl) : S 96
- 10 Boskovic B. The influence of 2-/o-cresyl/-4H-1 : 3 : 2 - benzodioxaphosphorin-2-oxide (CBDP) on organophosphate poisoning and its therapy. *Arch Toxicol* 1979; 42 : 207
- 11 Clement JG. Importance of aliesterase as a detoxification mechanism for soman (pinacolyl methylphosphonofluoridate) in mice. *Biochem Pharmacol* 1984; 33 : 3807
- 12 湖南医学院. 生理学. 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 1978: 124-7
- 13 Butcher LL, Bilezikjian L. Acetylcholinesterase-containing neurons in the neostriatum and substantia nigra revealed after punctate intracerebral injection of di-isopropylfluorophosphate. *Eur J Pharmacol* 1975; 34 : 115

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Nov; 9 (6) : 526-529

Characteristics of soman diffusion in tissues studied by sticking of pig bristles

LIU Zhi-Ping, YU Shou-Zhong, XU Xiao-Shan

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

ABSTRACT A new experimental model was established by sticking pig bristles soaked with soman into tissues. Soman diffusion in tissues was determined by a histochemical technique. The importance of blood flow and carboxylic ester hydrolases in limiting the inhibition of cholinesterase was corroborated. Three possible mechanisms of regional ChE inhibition around small vessels in the tissues of soman poisoned rats may be involved: 1) So-

man molecules possess a very strong penetrative capability; 2) Blood flow velocity in the small vessels is greater than that in the capillaries; 3) Blood contains enzymes which neutralize soman.

KEY WORDS soman; diffusion; cholinesterase; histocytochemistry; blood flow velocity; carboxylic ester hydrolases; phenobarbital; tritoyl phosphate