

索曼急性中毒小鼠胆碱酯酶活力和乙酰胆碱含量的关系

张 晓 秦伯益 (军事医学科学院药理毒理研究所, 北京 100800)

提要 小鼠索曼 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sc 后, 中毒症状和脑 ACh 含量的恢复过程一致; 重复 4-5 次 sc 后, 羟胺比色法测定脑 ChE 活力一度为零, 但仍可见 ACh 含量恢复。用放射化学法测定这种样品 ChE 活力分别为正常的 1.2 和 2.5%。此样品经 37 $^{\circ}\text{C}$, 20 min 温育可以水解掉按 49 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 重复添加的 [^3H]ACh。索曼中毒后 1-2 h 可见 ChE 活力回升, “贮存酶”回升幅度高于“功能酶”。

关键词 索曼; 胆碱能受体; 乙酰胆碱; 胆碱酯酶; 脑

动物在索曼中毒的急性期过后, 其症状的恢复与脑胆碱酯酶(ChE)受抑程度间呈不平行现象, 即症状逐渐消失至正常时, 酶活力很少恢复, 这种现象曾被推测是受体脱敏感所致, 但无直接证据⁽¹⁻³⁾。我们曾证实小鼠索曼急性中毒后胆碱能受体敏感性无变化⁽⁴⁾。本文从胆碱能化学传递中的其它因素出发, 探讨了造成

上述不平行现象的原因。并比较了索曼中毒后“功能酶”和“贮存酶”的恢复程度。

材 料 和 方 法

体重 21 \pm (SD)3 g 小白鼠。♀♂兼用。ChE 活力测定用羟胺比色法⁽⁵⁾及放射化学法⁽⁶⁾乙酰胆碱(ACh)含量测定用放射免疫法⁽⁷⁾。中毒后症状评分参照 Jovic⁽¹⁾的方法。

亚细胞成份制备 杀鼠 6-7 只取脑合并, 用 0.32 M 蔗糖制成 1:10 的匀浆, 900 \times g 离心 10 min, 沉淀 p_1 弃去, 上清 s_1 经 11,000 \times g 离心 20 min, 得上清 s_2 和沉淀 p_2 。 s_2 经 100,000 \times g 离心 20 min, 取沉淀 p_3 备用。 p_2 经蔗糖不连续梯度 50,000 \times g 离心 2 h, 取 1.0 M 和 1.2 M 之间的部份用 0.15 M 蔗糖稀释后, 100,000 \times g 离心 30 min, 上清弃去, 得沉淀 p_4 备用。离心均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行。

蛋白质含量测定用 Folin-酚法⁽⁸⁾。

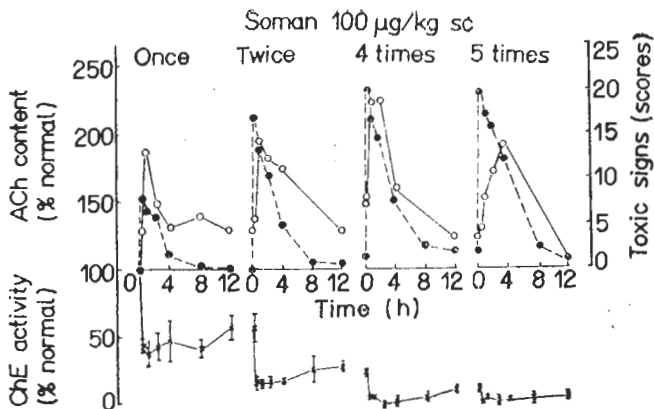


Fig 1. Toxic signs (●, n=6) of the mice intoxicated repeatedly with soman 100 µg/kg sc in relation to ChE activity (×, n=4) and ACh content(○, n=6) in brains.

结 果

索曼中毒后症状、脑 ACh 含量和 ChE 活力的相互关系 索曼 100 µg/kg sc 单次和 q 12 h 连续 2, 4, 5 次中毒后约 10 min 就可见肌颤、呼吸困难、惊厥等症状, 逐渐加重。约 30 min 后, 症状开始逐渐消失。在中毒后 8-12 h, 症状完全消失。从每次中毒出现的症状看, 随中毒次数的增加, 症状也逐渐加重。在上述中毒条件下脑 ChE 也很快被抑制。第 1, 2, 4, 5 次中毒后 ChE 活力最低水平分别为 40, 7, 0 和 0%。在中毒后 1-2 h 开始稍有恢复, 到中毒后 12 h 分别恢复到 58, 26, 2 和 5%。每次中毒后脑内 ACh 含量均表现增高, 在中毒后 2 h 左右达最高水平, 以后开始回降。8-12 h 恢复正常(图 1)。

索曼中毒后 ChE 活力的变化 以上实验结果中, 索曼 100 µg/kg sc 重复 4 次和 5 次中毒后虽然用羟胺比色法测不到 ChE 活力, 但用放射化学法测定这种样品仍有一定的酶活力。分别为 0.33 和 0.16 nmol [³H]ACh/mg 蛋白/min。相当于正常的 2.5 和 1.2%。向这种样品的反应体系中按 49 µmol/ml 分次添加冰干的 [³H]ACh, 使添加后反应体系中底物的初始浓度为 5×10^{-5} M, 每次添加后都经 37°C 20 min 温育, 加入的 [³H]ACh 几乎被完全水解(图

2)。

索曼中毒后, 微粒体和突触体 ChE 活力的恢复 按方法中亚细胞成份制备程序制得的 P₃ 和 P₄ 部份以及全脑匀浆的 ChE 活力分别为 189 ± 34 , 93 ± 9 和 82 ± 16 nmol [³H]ACh/mg 蛋白/min。同时经电镜鉴定(图 3), 证实 P₃ 是微粒体, P₄ 是突触体。索曼 100 µg/kg sc, q 12 h × 5 次中毒后 1 h, 微粒体, 突触体和全脑匀浆的 ChE 活力分别为正常的 4.7, 5.1 和

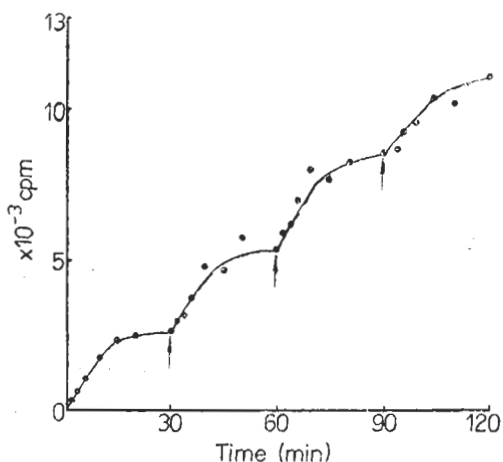


Fig 2. The ChE activity of the brain homogenates of mice after soman given 100 µg/kg sc for 5 times can be detected by radiometric method. It is shown that the [³H]ACh 49 µmol/ml added (↑) into the reactive system every 30 min. is almost completely hydrolyzed by the homogenate. Using modified Hestrin method, however, no ChE activity was detected in the same enzyme source.

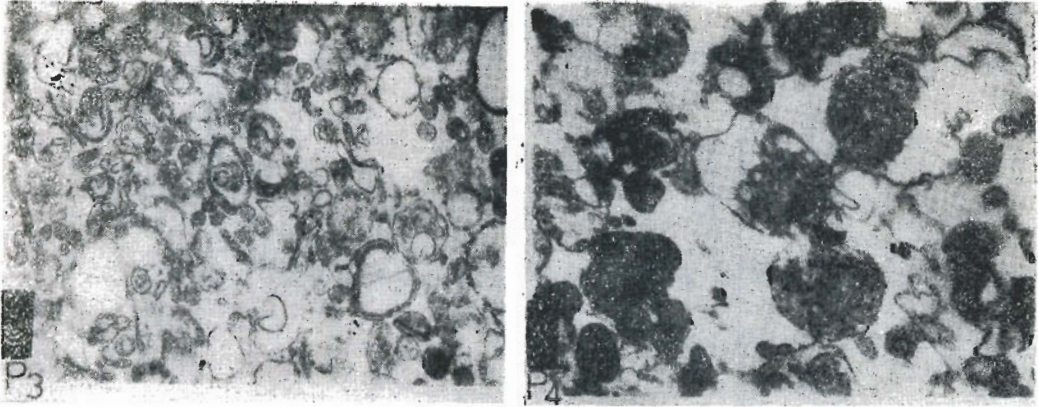


Fig 3. Electron micrographs of brain. Fraction p_3 consisted almost entirely of microsomes and p_4 synaptosomes. $\times 36,000$

Tab 1. ChE activity (nmol [^3H]ACh/mg protein/min) in different fractions of brain of mice intoxicated by soman

Tissue	0 h	1 h	12 h
Synaptosome	108 (70.8-123.6)	4.7 [†] (4.5-5.0)	7.7 (2.5-12.9)
Microsome	217 (201.0-227.9)	10.5 [†] (8.6-12.4)	22.4 (16.4-28.3)
Whole homogenate	101 (87.6-108.6)	2.8 [†] (2.2-3.4)	11.2 ^{††} (10.0-12.8)

[†] n = 2; ^{††} n = 3; the rest n = 4.

2.8%。中毒后 12 h, 三者的 ChE 活力分别为正常的 10.4, 6.9 和 11.1%(表 1)。微粒体 ChE 活力的恢复程度高于突触体。

讨 论

在我们以往的工作中曾通过一系列实验证实, 小鼠索曼急性中毒后整体条件下胆碱能受体敏感性无变化⁽⁴⁾。虽然一些文献报道过离体标本或整体器官局部受胆碱酯酶抑制剂作用后, 有胆碱能受体脱敏现象, 但这种中毒方式与整体中毒有很大差别, 所得结果较难代表整体中毒情况。本实验的结果证实, 索曼急性中毒的小鼠脑内 ACh 含量恢复与症状恢复的动态过程趋于一致。ACh 含量升高, 症状加重; ACh 含量下降, 症状减轻。因此可以认为 ACh 含量的恢复是症状恢复的主要原因, 而不必要用胆碱能受体脱敏解释。

索曼重复中毒后, 用羟胺比色法测定 ChE 活力一度为零, 但仍可见 ACh 含量恢复。因此应该考虑这种酶可能并不是没有活力, 只是羟胺法的灵敏度不够, 测不出。我们用放射化学法测到这种酶仍有 1.2 和 2.5% 的活力。可以设想, 如果这点残存酶活力在体内可以水解蓄积的 ACh, 那么它应具有连续水解 ACh 的能力。实验证实, 它确实可以水解掉按 49 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 重复添加到反应体系中 [^3H]ACh。实验中测得正常脑 ACh 含量为 $10.2 \pm 2.2 \text{ pmol ACh}/\text{mg}$ 组织。索曼 100 $\mu\text{g}/\text{kg sc}$ 中毒后, 脑内 ACh 含量升高幅度最高不超过 25 $\text{pmol ACh}/\text{mg}$ 组织。另外根据一些文献报道的材料计算, 大鼠、小鼠等动物脑组织 ACh 的释放量约为 0.008-0.07 $\text{nmol ACh}/\text{mg}$ 湿组织/ min ⁽⁹⁻¹¹⁾。这些都说明索曼中毒后残存酶活力可以起到消除蓄积 ACh 的作用。

索曼中毒后 ChE 活力的回升主要是由于酶的新生。微粒体上的 ChE 即贮存酶的恢复程度高于突触体 ChE 即功能酶恢复程度符合酶的新生过程。这个结果与以前关于 DFP 的报道⁽¹²⁾结果一致。

致谢 军事医学科学院基础医学研究所鲍忠祈研究员, 凌世淦助理研究员指导 ACh 含量放射免疫测定方法和 ChE 活力的放射化学测定方法, 并赠送 ACh 抗血清和 [^3H]ACh。陈德蕙研究员作亚细胞成份的电镜鉴定。

参 考 文 献

- 1 Jovic RC. *Eur J Pharmacol* 1974; 25 : 159
- 2 李文彬. 军事医学科学院院刊 1980; (1) : 85
- 3 甘思德、王家惠. 同上 1981; (3) : 345
- 4 张 晓、秦伯益. 同上 1983; (6) : 655
- 5 Leuzinger W. Acetylcholinesterase (*Electrophrus electricus*). In: Tabor H, Tabor CW, eds. *Methods in enzymology*; vol 17 B. NY : Academic Press, 1971 : 782-83
- 6 凌世淦、王光远、李 玲、鲍忠祈. 军事医学科学院院刊 1984; (30) : 221
- 7 鲍忠祈、凌世淦、王光远、李 玲. 中国药理学报 1982; 3 : 166
- 8 潘家秀、徐俊杰、任梅轩. 蛋白质, 多肽及氨基酸的显色反应. 见: 潘家秀、任梅轩、徐俊杰、戚正武, 编. 蛋白质化学研究技术. 第1版. 北京: 科学出版社, 1973 : 28-99
- 9 Mitchell JF. *J Physiol (Lond)* 1963; 165 : 98
- 10 Bartholini G, Stakler H, Ciria MG, Lloyd KG. *Neuropharmacology* 1976; 15 : 515
- 11 Bhatnagar SP, MacIntosh FC. *Can J Physiol Pharmacol* 1967; 45 : 249
- 12 Filbert MG, Flersher JH, Lochner MA. *Biochim Biophys Acta* 1972; 284 : 164

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Mar; 6 (1) : 16-19

RELATIONSHIP BETWEEN CHOLINESTERASE ACTIVITY AND ACETYLCHOLINE OF THE BRAINS OF MICE ACUTELY INTOXICATED WITH SOMAN

ZHANG Xiao, QIN Bo-yi

(*Inst Pharmacology & Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100800*)

ABSTRACT In mice following soman 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sc intoxication the dynamic courses of recovery of the toxic signs and the ACh content of brain tissue showed a parallelism. After soman q 12 h sc for 4 and 5 times with above dose, the ChE activity of mouse brain was once equal to 0% of normal as measured by hydroxylamine spectrophotometry, whereas it was found to be respectively 2.5 and 1.2% of normal mea-

asured by radiochemistry assay. Having incubated at 37°C for 20 min, the residual ChE almost completely hydrolyzed the [^3H]ACh which was added at 49 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. More recovery of the enzyme was found in the reserve ChE than that in the functional ChE.

KEY WORDS soman; cholinergic receptors; acetylcholine; cholinesterases; brain