

体外小鼠、豚鼠、犬及人血液对梭曼的解毒作用

应翔宇*, 刘艳芹, 钟玉绪, 阮金秀
(北京毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:目的 研究不同种属动物及人血液对梭曼的解毒能力与血液中几种梭曼解毒酶活性的关系。方法 测定血液中梭曼残留浓度及解毒酶活性。结果 小鼠、豚鼠、犬、人血浆对梭曼的解毒能力要明显高于其自身红细胞的解毒能力,血浆对梭曼的解毒能力依小鼠、豚鼠、犬、人的顺序由高到低依次排列。啮齿类动物血液中羧酸酯酶(CaE)活性位点数目多且与梭曼结合快,因此在梭曼解毒中可发挥重要作用。犬、人血液中乙酰胆碱酯酶(AChE)在梭曼解毒中占据了重要的解毒地位,犬、人血液中CaE基本没有参与梭曼解毒。结论 血液解毒能力的种属差异与种属间解毒酶结合位点数量的多少及梭曼与酶的结合速率密切相关。

关键词:梭曼; 羧酸酯酶; 胆碱酯酶; 血液; 解毒; 毒物

中图分类号:R827.1

文献标识码:A

文章编号:1000-3002(2002)00-0056-04

梭曼(soman)发挥毒性作用必须经过血液循环运送到脑及膈肌等重要靶器官。血液,作为梭曼的首过屏障器官,在梭曼靶前解毒(指梭曼在进入机体之后且在到达靶器官之前机体对梭曼解毒能力的大小)中发挥着重要的解毒作用。由于机体解毒机理相当复杂,人们很难在体内单独评价血液对梭曼的解毒能力,但体外牵涉的解毒因素相对较少,再加上靶前解毒时间仅有几秒,最多十几秒,因此可以假设梭曼iv瞬间,其仅在血管系统内分布,那么,如在

体外将毒剂-酶反应系统的温度及血容量比例尽可能维持与体内一致,则大致可以认为血液在体外对梭曼的解毒情况与体内血液对梭曼的瞬间解毒作用大体相近。作者通过测定血中梭曼残留浓度及解毒酶活性,探索了体外血液对梭曼解毒能力种属差异与血液中主要解毒酶如羧酸酯酶(carboxylesterase, CaE)、丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BuChE)、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)之间的内在关系。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

碘化硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCh)、碘化硫代丁酰胆碱(butyrylthiocholine iodide, BTCh)均购自Sigma公司;5,5'-二巯基-2-硝基苯甲酸(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)为Fluka公司产品;对硝基戊酸苯酯(*p*-nitrophenyl valerate, NPV,纯度99%),梭曼[P(±)-soman, P(+):P(-)为1:1,纯度97%]均由北京毒物药物研究所提供。其余均为分析纯试剂。Model 550酶标仪是美国BIO-RAD公司产品。

1.2 实验动物

昆明种小鼠,♀,18~22g;英国种豚鼠,♀,300~350g;家养犬,♂,10~15kg;均由军事医学科学院实验动物中心提供。实验动物于实验前12h禁食,自由饮水。人健康新鲜血液由本院307医院血库提供。

1.3 血浆、红细胞中梭曼浓度的测定

参照应翔宇^[1]的游离梭曼测定方法。具体如下:将盛有血浆、红细胞的离心管预先置于37℃水浴中温育3min,使血浆、红细胞的温度接近于37℃,然后加入梭曼,再继续温育10s后,立即取出加入高氯酸沉淀蛋白,而后置于冰浴中。

1.4 血液中梭曼浓度的换算

小鼠、豚鼠、犬、人全血容量分别为77.8、75.3、

收稿日期:2001-02-23 接受日期:2001-05-31

作者简介:应翔宇(1970-),男,吉林省长春市人,助理研究员,博士,主要从事神经药理及毒理学研究;阮金秀(1936-),男,福建省仙游县人,研究员,博士生导师,主要从事药理学研究。

*联系作者 Tel:(010)66931647, Fax:(010)68211656, E-mail:Yingxy@mailcity.com

94.1、80 mL·kg⁻¹[2,3]。小鼠、豚鼠、犬 iv 梭曼的 LD₅₀ 值分别为 42、21、10 μg·kg⁻¹[4,5], 人血液中梭曼浓度是以犬 LD₅₀ 值计算的, 在此特作说明。小鼠、豚鼠、犬、人 iv 1 LD₅₀ 梭曼后, 如假定梭曼在 iv 瞬间仅在血管系统中分布, 且在血浆及红细胞中的分配系数相等, 此时各种属血液中的梭曼浓度则分别为 539.8、278.9、106.3 及 125 μg·L⁻¹ 血液。

1.5 血液中羧酸酯酶 (CaE)、丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 及乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定

参照 Chambers 等^[6]、董立春^[7] 的酶活性测定方法。

1.6 酶结合位点的评估

酶结合位点的计算公式: 酶结合位点 = 酶活性 (μmol 底物·min⁻¹·mL⁻¹ 血浆)·血浆或红细胞体积 (mL)/酶变率。酶变率: 底物水解量·min⁻¹·活性位点⁻¹。CaE、BuChE 和 AChE 的酶变率分别为 91 920^[8]、171 000^[9] 和 278 000^[10]。

1.7 统计学处理

用“SAS”统计软件中 *t* 检验处理数据。

2 结果

2.1 体外小鼠、豚鼠、犬及人血浆及红细胞对梭曼解毒能力

当小鼠、豚鼠、犬、人血液中梭曼浓度分别为 161.9、83.7、31.9 和 37.5 μg·L⁻¹ 血液时, 37°C 孵育 10 s, 小鼠、豚鼠、犬、人血浆对梭曼的解毒率分别为 (99.7 ± 0.21)、(87.4 ± 2.4)、(54.3 ± 1.5) 及 (90.4 ± 2.8)%, 红细胞的解毒率分别为 (20.7 ± 3.6)、(36.7 ± 3.9)、(51.4 ± 1.8) 及 (79.3 ± 0.5)% (图 1)。

从表 1 可知, 血浆对梭曼的解毒能力存在种属

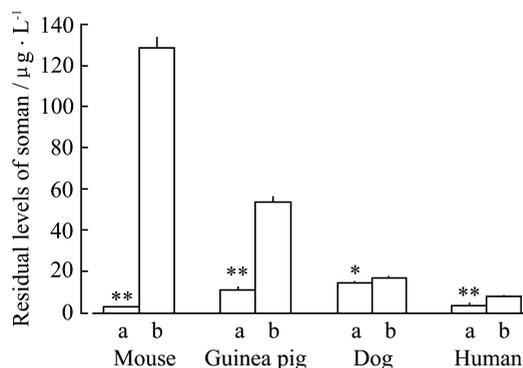


Fig 1. *In vitro* residual levels of soman in plasma (a) and red blood cells (b) of mouse, guinea pig, dog and human after preincubation for 10 s at 37°C. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with residual levels of soman in one's own red blood cells.

差异, 解毒力依小鼠、豚鼠、人、犬的顺序由高到低依次排列。

2.2 小鼠、豚鼠、犬及人血液中主要解毒酶活性及结合位点数

表 2 结果表明, 血液中 CaE、BuChE、AChE 活性均存在种属差异。啮齿类动物血浆中 CaE 活性较高, 人血液中 BuChE、AChE 活性较高。小鼠、豚鼠、犬血浆中酶结合位点数分别是红细胞位点数 35、8.4 及 4.7 倍; 人血浆及红细胞中解毒酶, 在结合位点的分配比例上较为特殊, 表现为二者的位点数基本相等。小鼠、豚鼠血浆中 CaE 活性位点数分别为 BuChE 位点数的 2.4 及 2.6 倍; 犬、人血浆中 BuChE 活性中心数量相对较高, 分别是 CaE 位点数的 16 及 28 倍。

2.3 梭曼与 CaE 剂量-效应抑制关系

当小鼠、豚鼠血浆中梭曼浓度分别超过 4.3、

Tab 1. Degradation of various initial levels of soman in mouse, guinea pig, dog and human plasma at 37°C for 10 s

Species	Residual levels of soman/μg·L ⁻¹ plasma			
Mouse	0.47 ± 0.10(162)	1.0 ± 0.4(324)	3.7 ± 1.2(810)	9.5 ± 1.4(1619)
Guinea pig	1.3 ± 0.4(41.8)	2.3 ± 0.4(84)	9.3 ± 2.4(209)	153 ± 24(418)
Dog	6.9 ± 1.9(15.9)	14.6 ± 0.6(32)	25.7 ± 0.9(80)	55.7 ± 3.8(159)
Human	1.8 ± 0.5(18.7)	3.58 ± 1.05(38)	20.4 ± 2.5(94)	43.2 ± 5.3(188)

Data in bracket refers to initial concentration of soman. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

Tab 2. Enzyme activities and estimated esteratic sites in blood of mouse, guinea pig, dog and human

Species	Activity of soman detoxifying enzymes/ $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ plasma or red blood cells		
	CaE	BuChE	AChE
Mouse	$5.0 \pm 0.4(54.6 \pm 4.7)$	$3.9 \pm 0.3(23.0 \pm 1.8)$	$0.62 \pm 0.12(2.2 \pm 0.4)$
Guinea pig	$3.09 \pm 0.20(33.6 \pm 2.2)$	$2.2 \pm 0.5(13.0 \pm 3.1)$	$1.55 \pm 0.12(5.6 \pm 0.4)$
Dog	$0.09 \pm 0.01(0.98 \pm 0.12)$	$2.6 \pm 0.4(15.2 \pm 2.4)$	$0.96 \pm 0.22(3.4 \pm 0.8)$
Human	$0.10 \pm 0.01(1.10 \pm 0.12)$	$5.2 \pm 1.5(30.4 \pm 9.0)$	$8.7 \pm 0.5(31.4 \pm 1.7)$

Data in bracket refers to estimated esteratic sites available for detoxification of soman by irreversible binding($\text{pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ plasma or red blood cells). $\bar{x} \pm s, n = 6$.

$0.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 37°C 温育 10 s, 梭曼对 CaE 的抑制率分别为(93.3 ± 0.4)%和(93.0 ± 2.3)%, 而后趋于恒定。犬、人血浆中 CaE 基本不与梭曼结合, 当梭曼血浆浓度超过 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CaE 的抑制率也仅为 10%左右(图 2)。

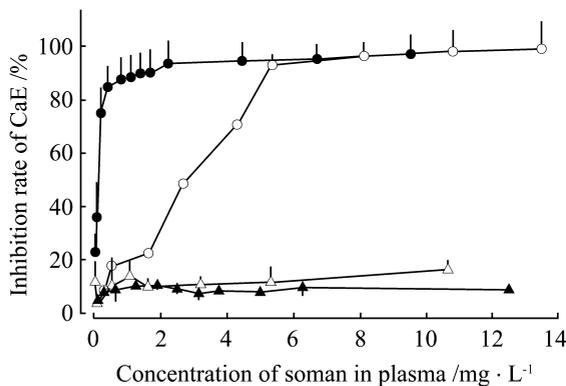


Fig 2. The inhibition curves of carboxylesterase by various initial concentrations of soman in plasma of mouse(\circ), guinea pig(\bullet), dog(\triangle) and human(\blacktriangle). $\bar{x} \pm s, n = 3 - 6$.

2.4 梭曼对 BuChE、AChE 的抑制作用

小鼠、豚鼠、犬及人血浆中梭曼浓度分别为 $809.7, 418.4, 159.4$ 及 $187.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 血浆时, 37°C 温育 10 s, 梭曼对血浆中 BuChE 的抑制趋于完全, 抑制率均可高达 90%以上。相比之下, 当小鼠、豚鼠、犬及人红细胞中梭曼浓度分别为 $161.9, 83.7, 31.9$ 及 $37.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 37°C 温育 10 s, AChE 的抑制率分别为(78.6 ± 7.7)%, (80.0 ± 2.6)%, (81.6 ± 1.8)%及(92.0 ± 1.1)%。

3 讨论

小鼠、豚鼠、犬血浆对梭曼的解毒能力明显高于其自身红细胞的解毒能力, 这与其血浆中酶结合位点较多相一致; 人血浆与红细胞中的酶结合位点数量虽然较为接近, 但血浆对梭曼的解毒能力仍显著高于红细胞的解毒能力, 提示可能与血浆中其他非特异性蛋白结合有关。

血浆中 CaE 含量存在种属差异。本实验则在此基础上进一步发现, 不同种属 CaE 在与梭曼结合时, 表现出明显不同的作用特点, 直接验证了 CaE 的多样性^[12]。啮齿类血浆中 CaE 活性高, 且与梭曼结合能力强, 因此在梭曼解毒中可发挥重要作用; 犬、人血浆中 CaE 活性低且与梭曼结合能力弱, 故基本没有参与梭曼解毒。

啮齿类血液中胆碱酯酶虽然活性较低, 但与梭曼结合较快, 因此也起到了一定的解毒作用; 犬、人血液中胆碱酯酶则发挥了至关重要的解毒作用。结果进一步提示, 血液解毒能力种属差异与种属间解毒酶位点数的高低及梭曼与酶的结合速率密切相关。

4 参考文献:

- [1] Ying XY, Ruan JX. Electric eel acetylcholinesterase-based microassay for measuring initial soman in plasma[J]. *J Sanit Toxicol*(卫生毒理学杂志), 2000, 14(4): 253 - 255.
- [2] Shi XY. *Experimental Methods for Medical Animals*(医学动物实验方法)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1983. 407 - 408.
- [3] Shanghai First Medical College. *Human Anatomy and Physiology*(人体解剖生理学)[M]. Beijing: People's

- Medical Publishing House, 1979. 119 – 132.
- [4] Benschop HP, Bijleveld EC, De Jong LP, Van der Wiel HJ, Van Helden HP. Toxicokinetics of the four stereoisomers of the nerve agent soman in atropinized rats – influence of a soman simulator[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987, **90**(3):490 – 500.
- [5] Due AH, Trap HC, Van Der Wiel HJ, Benschop HP. Effect of pretreatment with CBDP on the toxicokinetics of soman stereoisomers in rats and guinea pigs[J]. *Arch Toxicol*, 1993, **67**(10):706 – 711.
- [6] Chambers H, Brown B, Chambers JE. Noncatalytic detoxication of six organophosphorus compounds by rat liver homogenates[J]. *Pesticide Biochem Physiol*, 1990, **36**(3):308 – 315.
- [7] Dong LC. A method for microassay of the activity with DTNB[J]. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 1987, **11**(6):480 – 483.
- [8] Wood ANP, Lafuente RF, Cowan DA. Purification and partial characterization of a novel thermophilic carboxylesterase with high mesophilic specific activity[J]. *Enzyme Micro Technol*, 1995, **17**(9):816 – 825.
- [9] Main AR, Tarkan E, Aull JL, Soucie WG. Purification of horse serum cholinesterase by preparative polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *J Biol Chem*, 1972, **247**(2):566 – 571.
- [10] Cohen JA, Oosterbaan RA, Warringa MGPJ. The turnover number of aliesterase pseudo- and true-cholinesterase and the combination of these enzymes with diisopropylfluorophosphate[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1955, **18**(2):228 – 235.
- [11] Benschop HP, Konings CA, Van Genderen J, De Jong LP. Isolation, anticholinesterase properties, and acute toxicity in mice of the four stereoisomers of the nerve agent soman[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984, **72**(1):61 – 74.
- [12] Sterri SH, Fonnum F. Carboxylesterases in guinea-pig plasma and liver. Tissue specific reactivation by diacetylmonoxime after soman inhibition *in vitro* [J]. *Biochem Pharmacol*, 1987, **36**(22):3937 – 3942.

***In vitro* degradation of soman in blood of mouse, guinea pig, dog and human**

YING Xiang-Yu, LIU Yan-Qin, ZHONG Yu-Xu, RUAN Jin-Xiu

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract: **AIM** To study the relationship between the capability of soman detoxification of blood and the detoxifying enzyme activities in blood of different species. **METHODS** By measuring residual levels of soman and activities of detoxifying enzymes. **RESULTS** The degradation of soman by plasma was more powerful than that by its own red blood cells, the rank order of soman degradation in plasma was mouse > guinea pig > human > dog. The plasma carboxylesterase in rodents played a very significant role in inactivating soman due largely to its comparatively activity and large number of binding site. While, the plasma carboxylesterase in dog and human did

not play an important role, as did in rodents. In contrast, the cholinesterase in blood of dog and human served as the major elimination pathways of soman. **CONCLUSION** The differences in the amount of esteratic site available for soman detoxification and the binding rate between soman and detoxifying enzymes might be responsible for the species variation of detoxification capability in blood.

Key words: soman; carboxylesterase; cholinesterase; blood; metabolic detoxification, poisons

(本文编辑 乔虹)