

金环蛇类心脏毒素对不同可兴奋组织作用的比较

徐耀忠* 徐 科 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

提要 从金环蛇毒中分离纯化的毒素A和B⁽¹⁾的生理作用是一致的, 但毒素B比毒素A的生物效应较强一些。在蛙缝匠肌标本, 毒素B首先使间接刺激引起的收缩消失, 但在大鼠膈神经膈肌标本, 它的作用则使间接收缩和直接收缩平行下降, 同时消失。两种毒素均明显降低蛙缝匠肌、心室肌的膜电位, 但心肌对毒素的抵抗力更强些。

关键词 金环蛇; 蛇毒; 肌肉挛缩; 神经肌肉阻滞剂; 静息电位

在眼镜蛇的毒液中有一类毒性较弱、含量较高(约占粗毒蛋白总量的35-50%)的碱性多肽, 被统称为心脏毒素^(2,3)。从台湾省产金环蛇毒中分离出两种毒素(VIA, VIB)和眼镜蛇心脏毒素有类似的作用, 命名为类心脏毒素⁽⁴⁾。但它们都不是只作用于心脏或心肌, 而是对多种细胞有毒性作用。其作用机制还不清楚, 在已有资料中, 也存在着相当多的矛盾^(5,6)。本工作利用哺乳和两栖动物标本, 观察了广东产金环蛇类心脏毒素对可兴奋组织的作用, 特别着重地比较了它们对骨骼肌和心肌的作用, 以期了解心脏毒素的作用机制和提高金环蛇咬伤临床治疗效果提供实验依据。

材 料 和 方 法

用小鸡颈二腹肌、蛙坐骨神经缝匠肌、大鼠膈神经膈肌、大鼠心室乳头肌、蛙心室肌以及蛙的心脏灌流标本。小鸡或大鼠标本浸于Krebs液的肌槽中, 通95%O₂+5%CO₂, 37°C。蛙标本置Ringer液中(室温20°C)。用晶体管刺激器产生的超强方波刺激神经或肌肉(无特殊指明者均为3c/min), 收缩由记录杠杆或通过机械-电换能器描记在烟鼓或在台式自动平衡记录仪上。膜电位用充以KCl 3M玻璃微电

极记录, 电极阻抗为6-20 MΩ。

金环蛇类心脏毒素A和B由广东省产金环蛇毒分离纯化获得⁽¹⁾。

结 果

引起小鸡颈二腹肌产生接头传递阻遏和挛缩是心脏毒素的功能特征之一⁽³⁾。因此首先在小鸡颈二腹肌标本上观察了类心脏毒素的作用。结果表明, 以毒素A或B处理标本时, 由刺激神经所引起的间接收缩的振幅便逐渐减小, 与此同时收缩基线逐渐升高(即出现了挛缩), 直至收缩完全停止(图1), 但此时直接收缩尚存。用正常溶液反复冲洗和浸泡6次约0.5h, 不能使标本对间接刺激的收缩反应恢复。

毒素B(20 μg/ml)阻遏小鸡颈二腹肌神经肌肉传递所需时间65±(SD)18 min (n=5)。而毒素A在浓度比毒素B高一倍时, 在4例中, 有2例平均麻痹时间为158 min, 另2例则在180 min后尚未完全麻痹。这说明毒素B作用比毒素A快。在致挛缩作用方面, 也是毒素B稍强一些。

高钙溶液可拮抗毒素A和B的致挛缩作用。在高钙Krebs液中(Ca⁺⁺浓度10-13 mM), 毒素A或B的致挛缩现象均不再出现, 但毒素B阻遏神经肌肉传递所需的时间也随之明显缩短。在高钙Krebs液中, 毒素B(20 μg/ml)阻遏神经肌肉传递时间为32±6 min (n=3), 而在正常Krebs液中为65±18 min (n=5)。两者差异显著(p<0.05)。

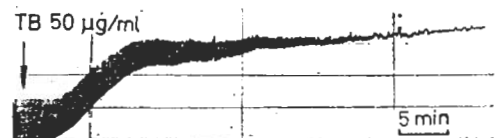


Fig 1. Effect of toxin B (TB) from venom of *Bungarus fasciatus* on chick biventer cervicis muscle preparation

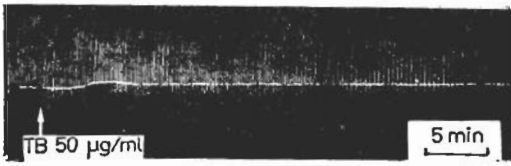


Fig 2. Effect of toxin B (TB) on frog nerve muscle preparation. The indirect and direct stimuli were applied alternately

对蛙和大鼠神经肌肉传递阻遏作用的比较

将间接刺激和直接刺激交替施于神经肌肉, 刺激频率均为 3 c/min. 在蛙坐骨神经缝匠肌标本, 毒素 B 的作用使间接刺激所引起的收缩振幅显著地逐渐变小, 但基线并不升高. 间接刺激引起的收缩完全消失之后, 直接刺激引起的收缩的振幅只稍见减小. 毒素 B (50 µg/ml) 使接头阻遏时间为 40 ± 11 min ($n=3$), 但直接刺激引起的收缩在加毒后 3 h 尚存留约 1/10. 在间接收缩完全消失之后用正常溶液反复冲洗, 既不能恢复间接刺激引起的收缩, 也无减缓直接刺激引起的收缩变小的趋势. 新斯的明 1 µg/ml 不能对抗毒素 B 的接头阻遏作用.

在大鼠膈神经膈肌标本, 毒素 A 和 B 的作用都是使间接和直接收缩振幅平行地逐渐变小, 直到完全消失, 其间未观察到肌肉挛缩(图 3). 实验表明大鼠膈肌较蛙缝匠肌对这两种毒素更敏感. 毒素 A 或 B 的浓度都为 30 µg/ml

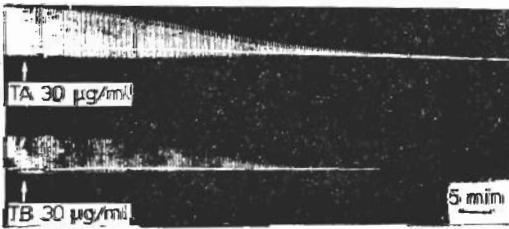


Fig 3. Effects of toxin A (TA) and toxin B (TB) on rat's phrenic nerve-diaphragm preparations. The indirect and direct stimuli were applied alternately



Fig 4. Effects of toxin A (TA) on rat's papillary muscles

时, 使间接和直接刺激引起的收缩完全消失所需时间, 前者为 61 ± 23 min ($n=6$), 后者为 41 ± 7 min ($n=6$). 毒素 A 的作用明显弱于毒素 B 的作用.

对大鼠骨骼肌和心肌收缩作用的比较

前已指出, 由直接刺激引起的大鼠膈肌收缩反应在毒素 A 和 B (各 30 µg/ml) 的作用下, 分别在 60 min 和 40 min 左右便完全消失. 但在大鼠心室乳头肌标本直接刺激引起的收缩幅度 (在正常生理溶液中 3 h 无显著变化), 在毒素 A 或 B 浓度都为 40 µg/ml 经 3 h 之后分别减小为原来的 $13 \pm 12\%$ ($n=3$) 和 $16 \pm 12\%$ ($n=3$). 由此来看, 在大鼠标本, 与骨骼肌相比, 心肌似对这两种毒素的抵抗力更强些(图 4).

对蛙骨骼肌和心室肌纤维膜电位作用的比较

引起膜电位下降是心脏毒素的另一特征. 在蛙缝匠肌标本 (在生理溶液中 4 h 膜电位无显著变化), 两种毒素都明显地降低肌纤维的静息膜电位, 毒素 B 的作用更强些 (见表 1, 其中 n 代表插入微电极的肌纤维数). 在开始加毒后一段时间, 膜电位下降很快, 尔后则下降变缓, 并且表层肌纤维首先受到毒物的作用, 当表层肌纤维的膜电位已经降得很低时, 深层肌纤维的膜电位变化还不很大, 因此我们尽可能地只测表层肌纤维的膜电位. 如果毒素浓度较高在作用了更长时间后, 表层肌纤维会逐渐变得混浊, 甚至出现断裂.

高钙溶液能有效地阻止类心脏毒素引起的肌细胞膜电位下降. 表 1 显示, 当将溶液中 Ca^{++} 浓度提高到 10 mM 时, 经毒素 A 作用

Tab 1. Effects of toxin A and toxin B from venom of *Bungarus fasciatus* on membrane potential of frog's sartorius muscle fibres. $\bar{x} \pm SD$ (mV)

	Ca^{++}	n	0 min	60 min	240 min
Toxin A	2 mM	60	89 ± 3	$72 \pm 15^{**}$	$47 \pm 23^{***}$
	10 mM	40	97 ± 3	$95 \pm 4^*$	$91 \pm 10^*$
Toxin B	2 mM	80	86 ± 5	$50 \pm 13^{***}$	$24 \pm 12^{***}$
	10 mM	100	95 ± 4	$87 \pm 10^*$	$72 \pm 14^{**}$

n: number of muscle fibres. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Tab 2. Effects of toxin A and toxin B on resting potential (mV) of frog ventricular muscles. $\bar{x} \pm SD$

	0 min	30 min	90 min
Toxin A	84 ± 6	78 ± 9*	72 ± 6**
200 µg/ml	(n = 60)	(n = 60)	(n = 60)
Toxin B	86 ± 7	76 ± 8**	67 ± 10***
200 µg/ml	(n = 60)	(n = 60)	(n = 55)

n: number of muscle fibres. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

4 h, 毒素 B 作用 1 h 后, 膜电位变化不显著 ($p > 0.05$), 毒素 B 作用 4 h 后膜电位虽然显著下降 ($p < 0.05$), 但下降程度较在正常溶液中的小。

两种毒素虽都明显降低蛙心室肌细胞 (在生理溶液中 120 min 膜电位无显著变化) 的膜电位, 但与在缝匠肌标本相比, 尽管将毒素的浓度提高了一个数量级, 其膜电位的下降程度还是要小些 (见表 2, 其中 n 代表肌纤维数)。故在蛙标本以膜电位的变化为指标所获得的结果, 也是心肌比骨骼肌对类心脏毒素的抵抗更强些。

前面以收缩振幅和膜电位为指标, 关于毒素对心肌和骨骼肌作用的结果均表明, 心肌比骨骼肌对类心脏毒素的抵抗力反而更强一些。在离体蛙心上, 用毒素 B 200 µg/ml 灌流时, 心室自动收缩的振幅逐渐变小, 加毒 1 h 开始出现间歇性房室传导阻断, 约在 2 h 后房室传导完全阻断, 心室停止跳动, 但心房仍维持自律性收缩。

讨 论

毒素 A 和 B 在分子量及氨基酸组成方面分别与 VIA 和 VIB 相近⁽¹⁾。从本文实验结果看, 这两组由不同产地的金环蛇提取的毒素的生理作用虽在致挛缩、减弱心肌收缩、使灌流蛙心产生 A-V 阻断等方面基本相似外, 尚有一些明显不同。例如: 在小鸡标本, 高钙溶液显著延长 VIB 产生的 N-M 阻遏⁽⁴⁾, 却加速毒素 B 的阻遏; 在大鼠膈神经膈肌标本, VIB 首先引起

N-M 阻遏, 而毒素 B 则使 N-M 阻遏和肌肉对直接刺激的反应同时消失。故 VIB 和毒素 B 可能不是同一物质。生活于不同生态环境的毒蛇, 虽系同种, 但产生的毒素存在某些差异是不足为奇的。

毒素 A 和 B 对大鼠的和蛙的骨骼肌神经肌肉接头的作用机制是否相同, 尚不能肯定。毒素对后者的阻遏作用应是封闭乙酰胆碱受体的结果, 但对前者的阻遏作用, 由收缩描记的实验结果看来, 还不能做这样的推论。

毒素 A 和 B 虽传统地被称为心脏毒素和类心脏毒素, 但都对多种细胞有作用。但关于它们作用的比较研究资料甚少⁽⁷⁾。本工作结果表明, 无论在哺乳动物或两栖动物, 心肌对类心脏毒素的抵抗都比骨骼肌更强些。如以作用较强的毒素 B 为例, 则可见即使把浓度增加 20 倍, 蛙心室肌细胞膜电位的下降程度还要比蛙缝匠肌的为轻。在大鼠膈肌标本用毒素 B 30 µg/ml 便可在 40 min 完全抑制由直接刺激引起的收缩, 但在大鼠心室乳头肌标本, 即使用 40 µg/ml, 经过 3 h, 直接刺激肌肉引起的收缩还残留 15%。联系到毒素 A 和 B 以及文献⁽⁴⁾报道的 VIA 和 VIB 都对神经肌肉传递有明显的阻遏作用, 我们认为, 把金环蛇类心脏毒素称之为类神经毒素可能更合适些。

参 考 文 献

- 1 吉永华、薛涛云、徐耀忠、江明侍、徐科. 两栖爬行动物学报 1983; 2:69
- 2 Sarkar NK. *J Indian Chem Soc* 1947; 24:227
- 3 Chang CC. The action of snake venoms on nerve and muscle. In: Lee CY, Ed. *Handbook of experimental pharmacology*; vol 52. Springer-Verlag, 1979:347
- 4 Lin SY, Huang MC, Lee CY. *Toxicon* 1975; 13: 189
- 5 陈式穆、吴兴陆、孙以安、张孝慈、陈远聪. 生物化学与生物物理学报 1981; 13:535
- 6 Dufourcq J, Faucon JF, Bernard E, Pezolet M. *Toxicon* 1982; 20:165
- 7 Earl JE, Excell BJ. *Comp Biochem Physiol [A]* 1972; 41:597

COMPARISON OF ACTIONS OF CARDIOTOXIN-LIKE PRINCIPLES FROM VENOM OF *BUNGARUS FASCIATUS* ON EXCITABLE TISSUES

XU Yao-zhong, XU Ke (K Hsu)

(Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT Toxin A (TA) and toxin B (TB) were isolated from venom of *Bungarus fasciatus* in Guangdong Province. TB was more potent than TA. TB decreased the direct muscle twitch only mildly after abolishing completely the indirect muscle twitch on frog nerve-muscle preparations. It simultaneously abolished the direct and indirect muscle twitches in rat nerve-muscle preparations. TA and TB markedly decreased the membrane potentials of sartorius and myocardium in frogs. The change-rate of membrane potential in frog sartorius muscle

was faster than that in myocardium. In view of the facts that the cardiac muscles were more resistant to "cardiotoxins" than skeletal muscles and that the toxins selectively blocked neuromuscular transmission in most cases, the name of "neurotoxin-like" principle would be more suitable than that of "cardiotoxin-like" principle.

KEY WORDS *Bungarus fasciatus*; snake venoms; muscle contracture; neuromuscular blocking agents; resting potential