

醋酸棉酚对神经肌肉接头的作用

束怀德* 杨钦照 徐科 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

提要 GA 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理大鼠膈肌标本 0.5 h, 间接收缩反应即完全消失, 直接收缩因舒张不全而变小, 但神经干电位无变化. 升高 GA 浓度, 加速接头阻遏, 增至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时肌细胞膜电位亦下降. 此阻遏不为新斯的明所对抗, 但 GA 却部分对抗箭毒接头阻遏. 去神经肌肉对 ACh 敏感性不受 GA 影响. GA 使 EPP 及其量子含量逐渐变小, MEPP 频率先增加后减少, 最后停止发放. 此频率增加不受高 Mg^{++} 、低 Na^+ 或缺 Ca^{++} 的影响.

GA 引起的接头阻遏主要是突触前的, 可能是它以某种方式影响了神经末梢中线粒体对 Ca^{++} 的摄取.

关键词 醋酸棉酚; 神经肌肉接头传递; 终板电位; 小终板电位; 线粒体摄取 Ca^{++}

醋酸棉酚(gossypol acetate, GA)是一种有希望的男用节育药⁽¹⁾. 1976年我们测定了长期服用小剂量棉酚大鼠骨骼肌的静息膜电位, 未发现变化⁽²⁾. 本工作则在离体标本着重地分析了 GA 对神经肌肉接头传递的作用.

材 料 和 方 法

1. 大鼠膈神经膈肌标本 体重 180-250 g 的大鼠, 断头, 制成的膈神经膈肌标本固定在 Krebs 溶液的肌槽内, 37°C, 通 95% O_2 + 5% CO_2 . 以频率为 6 c/min 的超强方波(波宽 0.2 ms)刺激膈神经, 通过等张杠杆将膈肌收缩描记在烟鼓上.

2. 大鼠去神经膈肌标本 麻醉下开胸, 切断左侧膈神经, 术后第 13 d 取下左半侧膈肌, 检查其对乙酰胆碱(ACh)反应性.

3. 青蛙坐骨神经缝匠肌标本 固定在 Ringer 溶液的肌槽内, 25°C.

4. 细胞内记录 尖端 $< 1 \mu\text{m}$ 、内灌 3 M KCl 溶液的玻璃微电极(内阻 10-30 M Ω). 测定肌细胞静息膜电位时, 在每个标本给药前和给药后 0.5 h 各测定 20 个点(包括终板区和非终板区), 不同剂量组分别在 3 个标本进行测定, 求得给药前和后的平均值. 量子含量的测

定按文献^(3,4)进行的, 即提高溶液中 MgCl_2 含量(16 mM), 使重复刺激(1 c/s)神经引起的终板电位(EPP)振幅变小, 甚至部分脱落. 在终板区测出 90 次以上连续刺激中 EPP 的脱落次数, 再按公式计算出量子含量.

5. 膈神经动作电位 二对铂电极分别置于膈神经近中端和远中端, 前者为刺激电极, 超强方波刺激膈神经, 后者为记录电极, 引出的动作电位经放大显示于示波器.

6. 药品 GA 由上海粮油工业公司供给, 1 N NaOH 溶解, 稀释成 0.1% 溶液备用, pH 7.8. 筒箭毒碱(粉剂)为德国 Carl Roth-Karlsruhe 厂出品; 甲基硫酸新斯的明(0.5 mg/ml)为上海第七制药厂出品; 毒藜碱(八角枫碱, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)由河南中医研究所提供; 蜈蚣毒和眼镜蛇毒系本实验室采集制备.

低 Na(30 mM)溶液中含蔗糖 100 mM 以维持等渗.

结 果

1. 对神经肌肉接头的阻滞作用 刺激膈神经引起的膈肌收缩的振幅在 GA 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用下逐渐变小, 基线逐渐上升, 一般约经 0.5 h 收缩反应完全消失. 此时直接刺激膈肌的收缩反应明显变小(图 1), 但神经干电位无变化. 反复冲洗标本, 间接收缩与直接收缩均不恢复. 这些结果提示, GA 引起接头传递的阻滞. 在接头传递出现部分阻滞时, 若给膈神经施加强直刺激(100 c/s, 10 s), 则强直收缩可以维持, 无强直后易化现象(图 1).

1981年7月13日收稿 1981年10月23日修回
1980年4月在上海生理科学会上宣读

* 上海第一医学院药理教研组

中国科学院上海生理研究所林乐儒参加技术工作

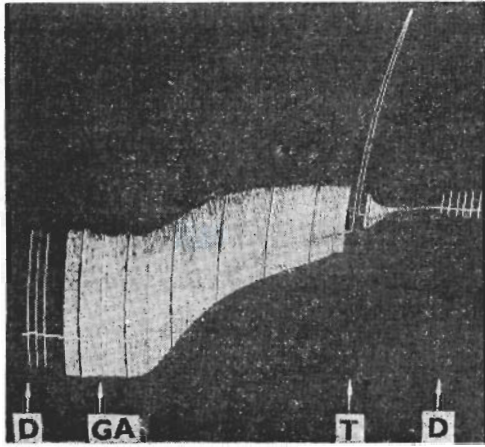


Fig 1. Blocking action of gossypol acetate on isolated rat phrenic nerve-diaphragm preparation. D=direct stimulation of muscle; GA=gossypol acetate 15 $\mu\text{g/ml}$; T=tetanic stimulation 100 c/s for 10 s.

在慢性去神经标本, GA 也可使直接刺激肌肉引起的收缩幅度变小和收缩基线的逐渐提高,但这种变化发展较慢.如图 2 所示,标本经 GA 25 $\mu\text{g/ml}$ 处理 90 min 之后,直接收缩虽已变得很小,但仍保留相当大的 ACh 反应(图 2).

GA 100 $\mu\text{g/ml}$ 引起神经肌肉完全阻滞,向溶液中加入甲基硫酸新斯的明 (1 $\mu\text{g/ml}$), 无对抗作用.但当神经肌肉传递被筒箭毒碱 (1 $\mu\text{g/ml}$) 或氯甲左箭毒碱 (3 $\mu\text{g/ml}$) 完全阻滞, GA 却可使之出现暂时的部分恢复(图 3).另一方面, GA 对蝮蛇毒 (200 $\mu\text{g/ml}$) 和眼镜蛇毒 (17 $\mu\text{g/ml}$) 引起的神经肌肉阻滞则无对抗

作用.

2. 对肌细胞静息膜电位的影响 GA 25 $\mu\text{g/ml}$ 对大鼠膈肌细胞膜电位无影响, 给药前为 $70 \pm (\text{SD}) 5 \text{ mV}$, 给药后为 $69 \pm 5 \text{ mV}$, 但 100 $\mu\text{g/ml}$ 便引起了膜电位的降低, 给药前为 $74 \pm 6 \text{ mV}$, 给药后下降为 $63 \pm 7 \text{ mV}$ ($P < 0.01$). 不仅如此, 青蛙缝匠肌细胞的膜电位在 GA 100 $\mu\text{g/ml}$ 作用下也由给药前的 $85 \pm 6 \text{ mV}$ 降低为给药后的 $72 \pm 7 \text{ mV}$ ($P < 0.01$).

3. 对 EPP 的影响 在箭毒化 (1 $\mu\text{g/ml}$) 大鼠膈神经膈肌标本记录到稳定的 EPP 之后, 向溶液中加入 GA 25 $\mu\text{g/ml}$, EPP 逐渐增大, 在有的肌细胞大到足以激发动作电位, 引起收缩. 动作电位一般发生在给药后 10 min 左右. 与此不同, 从在高 Mg^{++} (15 mM) 环境中的标本所记录的 EPP, 在 GA 25 $\mu\text{g/ml}$ 作用下, 却不增大, 而是直接变小, 直到最后记录不到.

青蛙坐骨神经缝匠肌标本经毒藜碱 3 $\mu\text{g/ml}$ 处理后, 也可由之记录到稳定的 EPP, 加入 GA 100 $\mu\text{g/ml}$, 迅即使 EPP 振幅变小, 终至反应消失.

4. 对 EPP 量子含量的影响 提高溶液中 Mg^{++} 浓度至 16 mM, 使 EPP 的量子含量 (M 值) 在 2—3 之间, 加 GA 25 $\mu\text{g/ml}$, 则量子含量迅速减少. 在部分标本在量子含量减少前, 尚见到短暂的增加.

5. 对 MEPP 的影响 不同浓度的 GA 均可使大鼠标本的 MEPP 频率显著增加, 呈爆

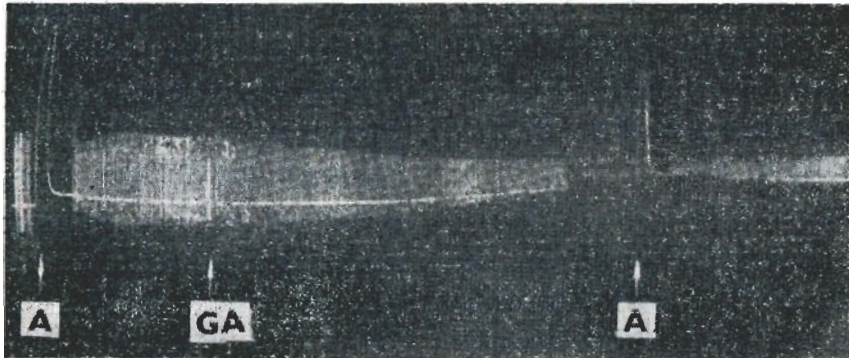


Fig 2. Effect of gossypol acetate (25 $\mu\text{g/ml}$, GA) on acetylcholine (1 $\mu\text{g/ml}$, A) sensitivity of denervated rat diaphragm preparation.

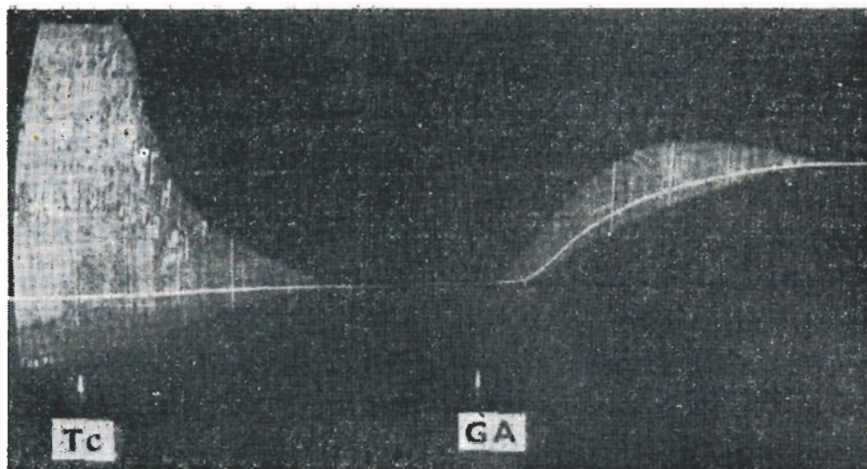


Fig 3. Partially antagonistic effect of gossypol acetate ($25 \mu\text{g/ml}$, GA) on neuromuscular blockade induced by *d*-tubocurarine ($1 \mu\text{g/ml}$, Tc).

发型发放, 有的甚至高达 200 c/s 以上. 出现发放高峰的时间间隔随 GA 浓度的增加而缩短. 如 $25 \mu\text{g/ml}$ 时, MEPP 发放的高峰出现在用药后 $40-60 \text{ min}$, 约经 2 h 后 MEPP 才逐渐消失. GA $100 \mu\text{g/ml}$ 时, 则 MEPP 发放高峰缩短到 10 min 左右出现, 约经 20 min 即发展到接近完全停止发放(图 4).

分别改变溶液中几种离子浓度, 如将大鼠标本放在低 Na^+ (30 mM)、高 Mg^{++} (15 mM) 或无 Ca^{++} 溶液中, GA 增加 MEPP 频率的效应均不受影响.

讨 论

较高浓度 ($100 \mu\text{g/ml}$ 以上) GA 可引起离体神经肌肉标本抑制现象虽已有报道⁽⁶⁾, 但由于所用剂量较大, 因而它对接头传递是否有选择作用尚不能肯定. 本工作结果表明, 即使约 $15 \mu\text{g/ml}$ 的 GA 便可在 0.5 h 左右致使神经肌肉传递完全阻滞, 因此应该认为, GA 对接头传递有一定程度的选择作用, 是一种接头阻滞剂, 并且是不可逆的.

GA 引起 MEPP 发放频率显著升高, 然

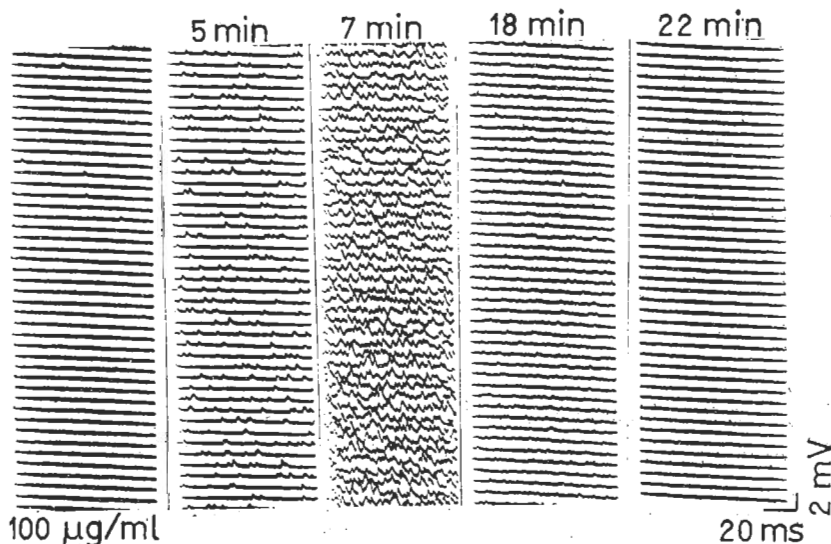


Fig 4. Effect of gossypol acetate $100 \mu\text{g/ml}$ on the MEPP frequency of rat diaphragm preparation

后逐渐降低,直至使发放完全停止.当使用较低浓度 GA 时在某些标本也观察到 EPP 的量子含量先增加后减少的变化. GA 作用过程中强直刺激引起的强直收缩的高度能够维持,无强直后易化现象等都提示 GA 对接头前的作用.另一方面,去神经肌肉标本对 ACh 的敏感性在 GA 作用下仍基本保留,GA 接头阻滞不能为新斯的明所对抗,特别是在 GA 已引起了以肌肉收缩为指标的接头传递完全阻滞之后,还可较长时间地记录到 MEPP 等又表明 GA 对接头后无明显作用.因此,我们认为 GA 对接头传递的阻滞作用主要是突触前的.

据报道,高 K 由于其强去极化效应,可引起 MEPP 发放频率的明显增加,但在缺 Ca 环境中则不能表现.增加 Mg 也能抑制高 K 或阴极电流对神经末梢自发发放的兴奋作用⁽⁶⁾.看来,GA 对神经末梢的作用与高 K 或阴极电流等的去极化作用不同,因为无论缺 Ca 或高 Mg 均不影响 GA 对突触的作用.

强心甙狄戈辛所引起的 MEPP 高频发放被认为是由于它抑制了细胞膜的 Na 泵,从而导致细胞内 Na 聚集的结果,因而在低 Na 溶液中这种作用就受到明显抑制⁽⁷⁾.相反,GA 的突触前作用也不受改变溶液中 Na 的影响.故 GA 的突触前效应也应有别于狄戈辛的 Na 泵抑制作用.

某些抑制线粒体摄取 Ca^{++} 以引起接头传递阻滞的化合物,如双香豆素(dicoumarol)能

在外液中无 Ca^{++} 的条件下引起 MEPP 发放频率明显升高⁽⁸⁾. GA 和双香豆素一样也被认为是氧化磷酸化的解偶联剂,因而它对接头传递的阻滞作用也可能是通过抑制神经末梢内线粒体的 Ca^{++} 摄取功能而实现的.此外,GA 引起的肌肉舒张不全也可以用肌细胞内 Ca^{++} 摄取功能受阻来解释.至于 GA 对突触后虽可能有某种程度的作用,但似无选择性作用.关于 GA 能部分对抗箭毒阻滞作用的机制,尚无合理解释,有待阐明.

我们在工作中也初步检查了 GA 对乙酰胆碱酯酶活力的影响,但未发现抑制或促进作用,因此在分析 GA 对接头传递的作用机制时,排除了这一因素.

参 考 文 献

- 1 男用节育药全国协作组. 中华医学杂志 1978 年 8 月; 58 (8):455
- 2 徐 科、于宗瀚. 未发表资料
- 3 Del Castillo J, Katz B. *J Physiol (Lond)* 1954 Jun; 124(3):560
- 4 Martin AR. *Physiol Rev* 1966 Jan; 46 (1):51
- 5 马如焕、余敦秋、吴熙瑞. 武汉医学院学报 1979 年 8 月; 8(3):71
- 6 Riker WF, Okamoto M. *Annu Rev Pharmacol* 1969; 9:173
- 7 Birks RI, Cohen MW. *Proc Roy Soc B* 1968 Jul; 170 (1021):401
- 8 Alnaes E, Rahamimoff R. *J Physiol (Lond)* 1975 Jun; 248(2):285

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Mar; 3(1):17-21

EFFECTS OF GOSSYPOL ACETATE ON NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

SHU Huai-de*, YANG Qin-zhao, XU Ke (HSU Ke)

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

ABSTRACT The effects of gossypol acetate on neuromuscular transmission were studied on rat phrenic nerve-diaphragm

and frog sciatic nerve-sartorius preparations. Gossypol acetate 15 $\mu\text{g/ml}$ blocked the neuromuscular transmission without

affecting the nerve conduction. The amplitude of muscle contraction elicited by direct stimulation was gradually reduced with an elevation of the baseline (tone) by gossypol acetate. The resting membrane potential was not affected by gossypol acetate 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ but was reduced to about 84% of the control level by 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Neostigmine did not antagonize the gossypol neuromuscular blockade. The sensitivity to acetylcholine of the rat chronic denervated diaphragms was not much changed by gossypol acetate. These results supported that gossypol acetate was mainly a presynaptic blocking agent.

Gossypol acetate reduced progressively the amplitude of the end-plate potential (EPP) and its quantal content in Krebs solution with high Mg concentration. But, in curarized preparations, gossypol acetate increased the amplitude of EPP even restored the contractile response in some paralyzed muscle fibers.

The frequency of miniature EPP (MEPP) was at first significantly increased and then decreased by gossypol acetate. The highest frequency of MEPP usually occurred after the neuromuscular transmission had already been completely blocked. Moreover, the changes in MEPP frequency induced by gossypol acetate were affected neither in Krebs solution with lower Na (30 mM) or higher Mg (15 mM) concentrations nor in Ca-free medium.

It is surmised that the action of gossypol acetate on the neuromuscular transmission might originate from inhibition of Ca uptake by mitochondria in presynaptic endings.

KEY WORDS gossypol acetate; neuromuscular transmission; end plate potential; miniature end-plate potential; Ca uptake by mitochondria

* Shanghai First Medical College