

## 金环蛇蛇毒突触后神经毒对神经肌肉接头的作用

孙以安 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031) 陈式穆 (暨南大学生物系, 广州 510152)

吴兴陆 (中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

**提要** 从金环蛇(*Bungarus fasciatus*)蛇毒中分离出的 XIV 峰毒素组分对大鼠膈肌及去神经的比目鱼肌膜电位没有影响, 能迅速减低 epp 和 mepp 振幅, 减低去神经肌肉对 ACh 的等长挛缩张力及 ACh 电位, 直至消失。也能阻断氨甲酰胆碱的去极化作用, 但对 KCl 的去极化作用没有什么影响; 高浓度的筒箭毒碱对该毒素组分效应有部分对抗作用。结果表明此组分系作用于突触后膜的 ACh 受体, 阻断神经肌肉接头传递。

**关键词** 金环蛇毒素; 突触后神经毒; 终板电位; 小终板电位; 乙酰胆碱电位

从银环蛇蛇毒中分离提纯的神经毒素, 有作用于突触前部分, 也有作用于突触后膜, 它们为神经生理学的研究提供了甚为重要的工具<sup>(1)</sup>。印度环蛇蛇毒中有一种作用机制较为特殊的作用于突触后膜的神经毒素<sup>(2)</sup>。在环蛇属中研究得较少的是金环蛇神经毒素。我们曾报

道<sup>(3)</sup>金环蛇(*Bungarus fasciatus*)蛇毒经羧甲基-葡聚糖凝胶 C-50 柱层析分离出 16 个主要组分, 并对其中毒素组分进行了毒性效应的生理学鉴定。本文报道第 XIV 峰对神经肌肉接头的作用的观察。

### 材料与 方法

**蛇毒来源** 详见(3)。金环蛇粗毒经羧甲基-葡聚糖凝胶过滤后得到的第 XIV<sub>2</sub> 峰, 用于本文的部分实验。XIV<sub>2</sub> 峰进一步经 BioRex 70 柱层析及 G-25 凝胶过滤所得 XIV<sub>2D</sub> 峰为一聚丙烯酰胺电泳纯的蛋白, 分子量为 7900,

---

1981年10月26日收稿 1982年1月5日修回  
暨南大学生物系张孝慈同志参加部分工作

无磷脂酶A活性。本工作后一阶段使用此纯品XIV<sub>2D</sub>。由于XIV<sub>2</sub>及XIV<sub>2D</sub>的实验结果无区别，故文中不再加以区别，统称为XIV毒素组分(简称毒素)。

**实验材料** 实验用体重180-210g成年大鼠正常膈神经-膈肌或去神经后5d的比目鱼肌标本。去神经手术或取标本时，大鼠iv戊巴比妥钠40mg/kg麻醉。比目鱼肌去神经手术系将动物麻醉后，在消毒条件下，从近股骨头转子处把坐骨神经剪断。

### 去神经比目鱼肌的等长挛缩张力的测定

去神经手术后5d，处死大鼠，取出比目鱼肌标本，放于32±1℃浴槽中，槽内灌以生理盐水，通以95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>。给药时先把槽内溶液放完，再迅速灌入预先配好并保持在同一温度的ACh(10μg/ml)生理盐水。肌肉的等长挛缩张力经自制换能器<sup>(4)</sup>输至前置放大器，最后由L<sub>23</sub>-304型函数记录仪描记记录。

**电生理测定** 用常规微电极方法，细胞内记录肌纤维的膜电位，终板电位(epp)和小终板电位(mepp)。电极以Tasaki纤维灌注法灌以3M KCl阻抗20-50MΩ。生物电位经微电极放大器(FW-2型)放大10倍输入示波器，照相记录。测量膜电位时，把微电极放大器的输出引至P<sub>2-8</sub>型数字电压表直接读出。微量离子电泳方法测量去神经肌纤维膜对ACh的敏感性时，电泳电极灌以2.5MACh，阻抗50-80MΩ。制泳电流(braking current)随电极不同具体调节为5-10nA。记录电活动时标本槽溶液温度为28-30℃。

记录epp时，先用0.8-2μg/ml浓度的筒箭毒碱生理盐水阻断神经肌肉接头传递。寻找合适终板(一般能记录到3-5mV的epp)进行

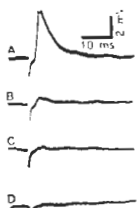


Fig 1. Effect of fraction XIV on epp of rat diaphragm (in the presence of tubocurarine 1 μg/ml). A) control, B-D) after application of toxin for 10, 15 and 27 min, respectively

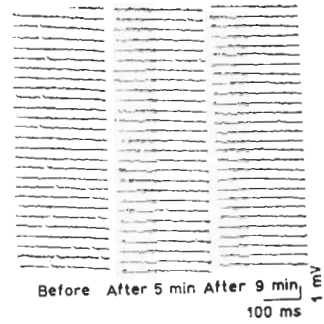


Fig 2. Effect of fraction XIV on mepp of rat diaphragm

观察。

为了防止给予氨甲酰胆碱或KCl时，肌纤维大幅度去极化引起的收缩可能损害电极，中断记录。标本用10μg/ml的dantrolene sodium处理30min并把标本适当拉长。

## 结 果

**对肌纤维膜电位的影响** 毒素1-5μg/ml对正常大鼠膈肌纤维的膜电位无影响。正常膈肌给毒素前膜电位为77±(SD)6mV(n=60)。给毒素后30min为74±5mV(n=59)，1h后平均为76±4mV(n=54)，2h后为75±4mV(n=41)。以上各组数据差异皆不显著。

毒素1-5μg/ml对去神经5d的大鼠比目鱼肌的膜电位也无影响。给毒素前肌纤维膜电位值为57±4mV(n=50)，给毒素后30min至1h膜电位值为55±3mV(n=34)，差异不显著。

**对epp及mepp的影响** 正常大鼠膈神经膈肌标本用筒箭毒碱(0.8-2μg/ml)阻断神经肌肉接头传递。找到合适的终板，记出3-5mV大小的终板电位后加入毒素使槽中的最终浓度为2-5μg/ml。结果见图1。给毒素后epp逐



Fig 3. Effect of fraction XIV on contraction of denervated rat soleus induced by ACh 10 μg/ml

渐减小, 一般经 20 至 45 min 消失。

毒素 2-5  $\mu\text{g/ml}$  也使正常标本的自发 mepp 振幅迅速下降。给予毒素前大鼠膈肌标本 mepp 平均振幅为 0.74 mV, 频率约 1-3 c/s。给予毒素后 10 至 20 min, 表层纤维的 mepp 消失。在毒素作用过程中, 未见有 mepp 发放频率增加(图 2)。

**对去神经肌纤维 ACh 敏感性的影响** 切断支配比目鱼肌的神经以后 5 d, 神经末梢已溃变。这时除了原来的运动终板区仍保持了对 ACh 的高度敏感外, 整条肌纤维表面都分布了 ACh 受体, 因而到处都对 ACh 敏感。这样的标本可以排除突触前的因素, 同时把突触后膜放大, 使研究突触后膜对 ACh 的敏感性更方便。我们用浴槽给药及离子电泳给药方法测定了毒素对肌纤维膜的 ACh 敏感性的影响。在浴槽给药条件下, 去神经 5 d 的比目鱼肌对 10  $\mu\text{g/ml}$  浓度的 ACh 所产生的等长挛缩张力。在给毒素后逐渐减小, 经 30 min 反应消失(图 3)。但这时肌肉对直接刺激仍能产生反应。用离子电泳给药法所记录的 ACh 电位, 给毒素后迅速减小, 一般经过 30-45 min 电反应消失(图 4)。给毒素后 27 min 电泳注射的 ACh 量虽增大 25-50 倍, 但仍不能引起反应。

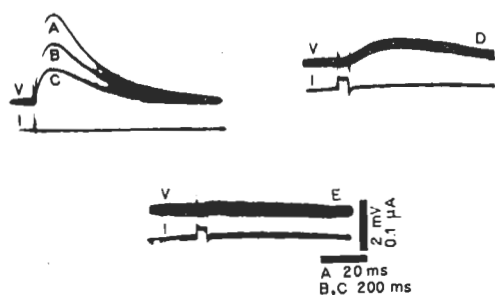


Fig 4. Effect of fraction XIV on the potential induced by iontophoretic application of ACh (denervated rat soleus). A) control; B) after 5 min; C) after 10 min; D) after 15 min; E) after 27 min. V = voltage, I = current

**对氨甲酰胆碱和 KCl 引起的去极化反应的影响** 在观察毒素对 ACh 受体的其他激动

剂及 KCl 的去极化效应的影响时, 为了防止大幅度去极化可能引起强烈的收缩, 以致使电极及肌膜受损, 中断记录。用去偶合剂 dantrolene sodium 1  $\mu\text{g/ml}$  浸泡 30-40 min, 以消除肌肉的兴奋收缩偶联, 并将肌肉适当拉长。浴槽中给予 20 mM 的氨甲酰胆碱, 引起的去极化电位为  $18 \pm 3$  mV ( $n=6$ ), 冲洗 15 min 后给予毒素 (2-5  $\mu\text{g/ml}$ , 经 30 min 后加入同样浓度的氨甲酰胆碱, 几乎不再引起去极化反应 ( $0.8 \pm 1$  mV,  $n=6$ )。在毒素继续存在下, 加入 0.2 M 的 KCl 仍能引起强烈的去极化反应 ( $15 \pm 1$ ,  $n=6$ )。

**筒箭毒碱对毒素效应的部分对抗作用** 文献报道<sup>(5)</sup>高浓度筒箭毒碱对  $\alpha$ -银环蛇毒素与 ACh 受体的结合有部分竞争作用, 我们用去神经 5 d 的大鼠比目鱼肌标本, 以浴槽给药方法对高浓度筒箭毒碱溶液是否对该毒物组分有部分对抗作用进行了检验。实验先记录一侧比目鱼肌标本对 10  $\mu\text{g/ml}$  浓度的 ACh 所产生的等长挛缩反应张力, 再向槽中加入高浓度的筒箭毒碱 (1 mg/ml), 30 min 至 1 h 后加入毒素 (2-5  $\mu\text{g/ml}$ ), 经 20 min 后冲洗, 重新测定标本对 ACh 的反应张力。用对侧的已去神经 5 d 比目鱼肌, 在不加筒箭毒碱情况下经同样程序记录给毒前后肌肉对 ACh 的反应张力作对比。去神经 5 d 的比目鱼肌对浓度 10  $\mu\text{g/ml}$  的 ACh 产生的等长挛缩张力为  $6.1 \pm 0.8$  g ( $n=6$ ), 在筒箭毒碱存在下, 给予毒素 20 min 后对同样浓度的 ACh 所产生的张力为  $2.2 \pm 0.9$  ( $n=5$ ), 而没有筒箭毒碱只给予毒素 20 min 后, 平均挛缩张力为  $0.15 \pm 0.1$  ( $n=6$ ), 表明筒箭毒碱 1 mg/ml 对毒物效应应有部分对抗作用。

## 讨 论

所得结果表明金环蛇毒 XIV 峰毒素组分对肌纤维的膜电位没有影响, 它能迅速使 epp 和 mepp 减小, 终至消失; 能迅速减低去神经后肌纤维对 ACh 的敏感性, 这些提示了它对突触后膜的作用。

毒物组分 XIV 峰对其他的 ACh 受体的激动剂也同样有阻断作用, 但对 KCl 的去极化效应影响不大; 高浓度筒箭毒碱对毒物的效应有部分对抗作用, 提示这个毒素组分主要是通过 ACh 受体结合产生效应。看来此方法分离所得的金环蛇毒 XIV 峰组分的毒素属于  $\alpha$ -银环蛇毒素一类。

Lo 等<sup>(6)</sup>报道了从金环蛇毒中分离纯化得到两种神经毒素, 其中一个属 I 型神经毒素, 另一个为 II 型神经毒素, 但未涉及有关功能的研究。因此无法与我们的结果进行比较。有关金环蛇毒 XIV 峰毒素的其他生理生化特性,

氨基酸组成等正在进一步研究中。

### 参 考 文 献

- 1 Chang CC. The action of snake venoms on nerve and muscle. In: Lee CY, ed. *Handbook of experimental pharmacology*, vol 52. 1st ed. Berlin: Springer, 1979:309—31
- 2 Bon C. *Bull Inst Pasteur Lille* 1976; 74:41
- 3 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, 待发表
- 4 朱德行、倪紫美. 生理学报 1979 年 4 月; 31 (2):203
- 5 Miledi R. *Nature* 1971 Oct 29; 233 (5322):599
- 6 Lo TB, Lu HS. *Toxicon* 1979; 17 (Suppl 1): 106

*Acta Pharmacologica Sinica* 1982 Jun; 3 (2): 90—93

## EFFECT OF POSTSYNAPTIC NEUROTOXIN XIV FROM *BUNGARUS FASCIATUS* VENOM ON NEUROMUSCULAR JUNCTION

SUN Yi-an (Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

CHEN Shi-qiu (Department of Biology, Ji-nan University, Guangzhou 510152)

WU Shin-lu (Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

**ABSTRACT** The venom of *Bungarus fasciatus* was fractionated on a CM-Sephadex C-50 column into 16 main fractions. The physiological roles of fraction XIV were: The resting membrane potentials of rat diaphragms and soleus muscle were not altered; the amplitude of end plate potentials and miniature end plate potentials were reduced; the isometric contrature tension and the ACh potentials of denervated muscle to ACh were reduced and then disappeared.

The membrane potential depolariza-

tion of denervated soleus fibres by the agonists, such as carbachol, were also blocked by the toxin. Tubocurarine 1 mg/ml possessed a partial antagonistic activity towards the blockade induced by the toxin. It is concluded that the fraction XIV produces a neuromuscular block by acting on ACh receptors

**KEY WORDS** *Bungarus fasciatus*; post-synaptic neurotoxin; end plate potential; miniature end plate potential; acetylcholine potential