

蝮蛇神经毒素对神经肌肉传递的突触前作用

杨钦照 徐科 (中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

提要 ATX 使大鼠膈神经膈肌标本对间接刺激的收缩反应完全消失后, 神经干复合动作电位、末梢动作电位、肌细胞膜电位和肌肉对直接刺激的收缩振幅均无明显变化. 小鸡颈二腹肌标本的接头传递被 ATX 阻遏后, 肌肉对 ACh 敏感性不受影响. ATX 是选择地抑制 ACh 从神经末梢的释放. 在 ATX 处理膈肌标本, 重复刺激引起的强直收缩不能维持, 有强直后易化现象. 一串刺激引起的 epp 振幅均相似, mepp 发放先增加后减少, 直至停止. 这些变化特征和 β -bungarotoxin 引起的相似.

关键词 蝮蛇神经毒素; 突触前阻滞剂; 末梢动作电位; 小终板电位

我国江浙一带产蝮蛇的毒液中既含血液循环毒, 又含神经毒, 后者是该蛇咬伤的主要致死因素⁽¹⁾. 蝮蛇神经毒既含突触前毒素, 又含突触后毒素⁽²⁾. 前者已被分离纯化^(3,4). 它是分子量为 13,600, 由 7 个双硫桥交联起来的 121 个氨基酸残基构成的单肽链, 被命名为蝮蛇神经毒素 (agkistrodotoxin, 简称 ATX)^(5,6). 本工作报道 ATX 对神经肌肉接头传递的毒理作用的进一步资料.

材料与方 法

由江浙一带产蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 采集的毒液, 低温真空干燥制成干粉即粗毒 (小鼠 ip MLD 为 1.1 mg/kg). 按文献⁽³⁾方法, 先用 DEAE-celullose 柱层析将神经毒组分分离出来, 再反复用 Sephadex G 50 柱层析分离出 ATX 并加以纯化, 得到经聚丙烯酰胺圆盘电泳鉴定为单一区带的纯 ATX 或尚附有 2—3 条着色极浅区带的较纯 ATX. 两者的小鼠 ip MLD 分别为 55 和 110 μ g/kg. 工作中多用后者.

大鼠膈神经膈肌标本、小鸡颈二腹肌标本以及终板电位 (epp)、小终板电位 (mepp) 和肌细胞膜电位的记录方法均见文献⁽²⁾. 神经末

梢动作电位 (TAP) 按文献⁽⁷⁾方法进行, 即将微电极放在神经末梢上进行动作电位的细胞外记录, 信号经 TQ-19 型医用电子计算机叠加 100 次.

结 果

接头传递阻遏 在 ATX (200 μ g/ml) 作用下, 膈肌标本对 6/min 间接刺激的收缩反应逐渐变小, 一般在 2 h 内消失, 此时肌肉对直接刺激的收缩反应和由神经引导的复合动作电位均无变化, 表明接头传递发生了阻遏. 若增加间接刺激频率, 则阻遏时间随之缩短. 在间接反应变小过程中给神经干以 50/s 的重复刺激时, 强直收缩高度不能维持, 即产生 Wenden-sky inhibition, 其后随之出现强直后易化现象. 需要提到, 在蝮蛇粗毒作用下, 强直收缩高度能够维持, 无强直后易化或抑制现象. 这可能因为粗毒中除 ATX 外, 尚有其它毒素的缘故.

肌细胞的 ACh 敏感性 在小鸡颈二腹肌标本, ATX (60 μ g/ml) 作用 1 h 即足以引起神经肌肉传递完全阻遏, 可见它比大鼠膈肌标本对 ATX 更为敏感. 接头阻遏后肌肉对乙酰

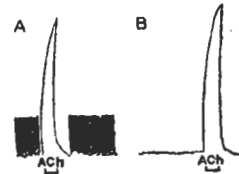


Fig 1. Effect of ATX 60 μ g/ml on ACh (10 μ g/ml) sensitivity of chick biventer cervicis muscle. A) control B) after transmission failure by ATX

1982年2月6日收稿 1982年4月10日修回
部分内容在1978年10月全国第十五届生理科学会(青岛)宣读

Table 1. Effect of ATX (40 $\mu\text{g/ml}$) on membrane potential of rat diaphragm (mV) $\bar{x} \pm \text{SD}$

Time (min)	Membrane potential
Control (n = 30)	68.5 \pm 2.1
10-15 (n = 10)	69.5 \pm 3.2
50-55 (n = 9)	70.1 \pm 4.4
120-125 (n = 11)	67.1 \pm 3.9

胆碱(ACh)的敏感性仍正常。

肌细胞膜电位 在经 ATX 处理而发生接头阻遏的膈肌标本, 无论将微电极插入肌细胞的终板区或非终板区, 均未见到膜电位改变(表 1), 尚需指出, 若 ATX 作用时间较长, 如 3 h 以上, 则位于表层的肌细胞的膜电位开始下降, 在解剖镜下还可见到肌细胞混浊等结构变化, 有关问题将在另文报道。

神经末梢电位(TAP) 前述资料表明, ATX 引起的接头阻遏局限在接头前部位。为了进一步阐明这种阻遏是来自神经末梢的传导, 还是 ACh 从末梢的释放, 观察了 ATX 对 TAP 和 epp 的影响。结果如图 2 所示, 即使在高浓度的 ATX 作用下, 当间接刺激不再能引起肌肉收缩之后, 在一段时间内可记录到 TAP 和 epp 并存(图 2 A), 随后 epp 消失, 但 TAP 保持不变(图 2 B)。

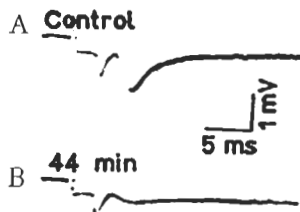


Fig 2. Effect of ATX 260 $\mu\text{g/ml}$ on TAP and epp of rat diaphragm preparation (each trace is on average of 100 times)

mepp 频率和一连 epp 振幅 在 ATX 作用下 mepp 的发放首先暂时增加(达对照的 3~5 倍), 然后逐渐减少, 最后完全停止。如图 3 所示, ATX 作用 51 min 时, mepp 频率增加约 5 倍。此外, 在有的接头同时尚可见到 mepp 的爆发式发放,

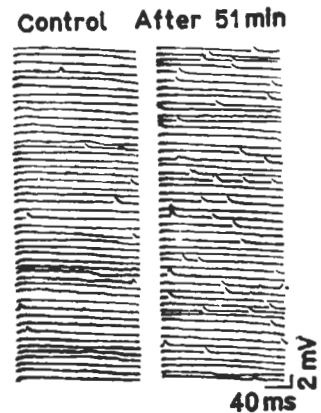


Fig 3. Effect of ATX 40 $\mu\text{g/ml}$ on mepp frequency of rat diaphragm preparation

在右旋筒箭毒碱(*d*-tc)麻痹膈肌标本, 由一串刺激引起的 epp 的振幅是递减的。此时若向溶液中再加 ATX, 并待 epp 振幅降至较低时, 则递减的振幅变成大小相似的(图 4)。在本组实验中也注意到, ATX 对肌肉标本的作用是由表及里的, 因为当从某些表在的接头已记录不到 epp 时, 深部的接头甚至可能尚未完全阻遏。

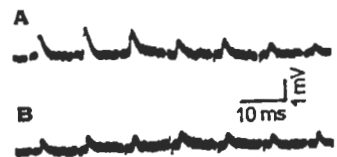


Fig 4. Effects of ATX 120 $\mu\text{g/ml}$ on amplitude of epp train of *d*-tubocurarine (1 $\mu\text{g/ml}$) paralysed rat diaphragm. A) early stage; B) late stage of ATX action

讨 论

前文关于 ATX 中毒晚期小鼠膈肌上的神经末梢内的突触小泡明显减少和线粒体变性的资料⁽⁸⁾和本文结果都一致表明, ATX 是选择地作用于突触前的毒素。从各种蛇毒分离的少数几种突触前毒素中, β -银环蛇毒素(β -bungarotoxin, 简称 β -BTX)的资料较为系统⁽⁹⁾。在 β -BTX 作用下, 强直收缩高度不能维持, 随之出现强直后易化, mepp 频率先有暂短的增加, 然后逐步降低, 最后完全停止发放。增加刺激频率加速 β -BTX 引起的接头阻遏。由一串刺激引

起的 epp 的振幅均相似, 无递增或递减现象。这些变化都和本文报道的 ATX 的资料相似。另一方面, ATX 和 β -BTX 对接头的作用也有一些差异, 如后者有明显的去神经效应, 前者的作用则主要表现在神经末梢内突触小泡减少和线粒体变性⁽⁸⁾。可以认为, ATX 也是研究突触传递, 特别是递质从神经末梢释放机制的有用工具物。

参 考 文 献

- 1 上海生理研究所第一研究室蛇毒组. 生物化学与生物物理学报 1976 年 12 月; 8(4):351
- 2 杨钦照、徐科. 同上 1977 年 12 月; 9(4):357
- 3 上海生理研究所第一研究室蛇毒组. 同上 1976 年

- 12 月; 8(4):357
- 4 Hsu K, Zhang JK, Jiang MS, Chen YC, Wu XF. A new presynaptic neurotoxin from the pit viper *Agkistrodon halys* Pallas. In: Shen ZW, ed. *Nucleic acids and proteins*. The proceedings of Symposium on nucleic acids and proteins. Beijing: Science Press, 1980, 100—3.
- 5 张景康、江明特、吴健永、徐科、陈远聪、武祥福. 生物化学与生物物理学报 1981 年 7 月; 13(3):237
- 6 陈远聪、武祥福、张景康、江明特、徐科. 同上 1981 年 6 月; 13(2):205
- 7 Katz B, Miledi R. *Proc R Soc Lond (Biol)* 1965 Feb; 161(985):453
- 8 徐科. 实验生物学报 1982 年 6 月; 15(2): 185
- 9 Chang CC, Huang MC. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1974 Apr; 282 (2): 129

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Dec; 3 (4) : 221—223

PRESYNAPTIC ACTION OF AGKISTRODOTOXIN ON NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

YANG Qin-zhao, XU Ke (K Hsu)

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

ABSTRACT On rat phrenic nerve-diaphragm preparations agkistrodotoxin (ATX) selectively blocked the ACh release from the nerve endings without effect on the compound action potential of the nerve trunk, the terminal action potential, the contractile response of muscle to direct stimulation and the membrane potential of the muscle fibres. When the transmission was blocked by ATX, the ACh sensitivity of the chick biventer cervicis muscles remained unchanged.

The unsustained tetanus with post-

tetanic potentiation was observed on the ATX-treated preparations. The frequency of the mepp was increased at first and then decreased by ATX. In the late stage of the ATX action the successive epp's at 100 Hz maintained the amplitude as the first one in the train. The characteristics of all these changes caused by ATX were similar to those by β -bungarotoxin.

KEYWORDS agkistrodotoxin; presynaptic blocking agent; terminal action potential; mepp