78.75%增至96.25%，Ⅱ级由18.75%降至3.75%，Ⅲ级由2.5%变为0，经χ^2检验，治疗前后血铅水平分级构成比有显著差异($P<0.05$)，治疗前后病例血铅总体状况及分级平均浓度经u检验，存在明显差异($P<0.05$)，血铅平均浓度治疗后较治疗前显著降低，铅中毒情况得到改善。

对治疗前后不同血铅浓度的6项免疫指标进行u检验，其中IgA、IgG、TLS、BLS差异显著($P<0.05$)，说明血铅水平降低时，免疫机能得到了相应的改善。对治疗前后各项免疫指标进行单因素多样本方差分析，其中IgA、IgG、TLS、BLS整体在不同血铅浓度时存在差异($P<0.05$)，表明铅暴露对幼儿免疫系统机能有影响。不同血铅浓度，幼儿免疫机能受损情况存在差异。

在病例整体存在差异的IgA、IgG、TLS、BLS 4项免疫指标进行级间q检验中，Ⅰ级与Ⅲ级比较，治疗前后4项数据$P<0.05$，样本均数间存在差异，而Ⅰ级与Ⅱ级，Ⅱ级与Ⅲ级比较，治疗前后4项数据无统计学意义，证实患儿血铅水平变化越大，其免疫机能受到的影响越明显。

在治疗前后血铅水平分别与对应的存在显著差异的IgA、IgG、TLS、BLS免疫指标进行相关分析，并对相关系数进行t检验，P值均<0.05，说明二者之间存在较明显的负相关，即当血铅水平增高时，4项免疫指标降低。

综上所述，当80例RRTI患儿均处于铅暴露中时，免疫机能均受到不同程度的抑制，且血铅水平越高，血铅分级平均浓度越大，免疫机能受损情况越明显。治疗后，随着血铅水平和血铅分级平均浓度的下降，患儿免疫机能得到相应的改善。表明反复呼吸道感染幼儿与铅暴露及其所致的免疫机能抑制有关，铅中毒可以影响幼儿的免疫系统机能。

关键词：幼儿；反复呼吸道感染；血铅；免疫
中图法分类号：R725.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 孙 鹏，赵 证，李 荣，等. 环境铅暴露对学龄前儿童免疫系统的影响[J]. 环境与健康杂志，2002：2.
[2] LIDSKY T I, SCHNEIDER J S. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates[J]. Brain, 2003, 126: 15-19.
[3] 刘 爽，孙俊秀，周在成. 儿童反复呼吸道感染与血清免疫球蛋白G亚类IgA缺陷[J]. 实用儿科临床杂志，2002，4(17)：328-329.

（编辑 薛国文）

经验交流

文章编号：1000-5404(2006)15-1636-02

修饰蛇神经毒素的毒性研究

魏有东，谢 鹏 （重庆医科大学附属第一医院神经内科，重庆市神经病学重点实验室，重庆 400016）

在神经系统疾病中，脑卒中后遗偏瘫、脊髓损伤、帕金森病等常有明显、持久的肌张力增高。这给患者的心理、生活、工作等方面带来种种负担及痛苦。因蛇毒具有明显神经肌肉接头的神经传导阻滞作用，理论上可将其用于治疗肌张力增高的实验研究；但因其毒性太大而难以成功。本实验通过化学修饰改变蛇神经毒素毒性，以期为临床治疗肌张力增高提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

乙酸酐购自重庆东方试剂厂。N-乙基马来酰亚胺(N-Ethylmaleimide, NEM)购自中国科学院上海生物化学研究所。MS-302多媒体化生物信号分析仪为广东药学院产品。岛津紫外分光光度计为日本导津制研所产品。浙江蝮蛇粗蛇毒购自广州鑫嘉益公司。蝮蛇神经毒素由蝮蛇蛇毒经过DEAE-Sephadex A50，Sephadex G 50 2次柱层析分离而得[1]。

1.2 乙酸酐修饰神经毒素氨基

乙酸酐(10 mol/L)按比例稀释后，取50 μl加入0.5 ml神经毒素样品中，使乙酸酐的终浓度分别为10 mmol/L。充分混匀后，将试管放入4 ℃下反应50 min。取0.5 ml二氯甲烷沿管壁缓慢加入试管底部，并用摇床低速旋摇15 min(注意液体的分层不要被破坏)。取水相按2 μl梯度加入Tris溶液(1 mol/L)，用pH试纸测定其pH值至6.0～7.0，否则重新旋摇。已用小鼠实验证明0.5 ml二氯甲烷能完全萃取50 μl乙酸酐(10 mol/L)。

1.3 NEM修饰神经毒素巯基

NEM(0.07 mol/L乙醇溶液)按比例稀释后，取50 μl加入含0.7 ml神经毒素样品中，使NEM的终浓度分别为10 mmol/L。充分混匀后，在300 nm下测定吸光度(最高达到0.400)。然后将试管放入4 ℃下反应，每5分钟测定吸光度值，直至吸光度无明显下降为止(反应30 min后吸光度最高为0.38，延长到50 min其吸光度下降少于0.3%)。取0.7 ml二氯甲烷沿管壁缓慢加入试管底部，并用摇床低速旋摇15 min。已用小鼠实验证明0.5 ml二氯甲烷能完全萃取50 μl NEM(10 mol/L)。

1.4 蟾蜍的坐骨神经-腓肠肌标本

破坏蟾蜍脑和脊髓后，蟾蜍下颌呼吸运动消失，四肢松软，无自发运动，表示脑和脊髓已破坏完全。剪除躯干上部及内脏，在腹侧脊柱两旁可见坐骨神经。剥去皮肤，分离出大腿，游离坐骨神经。用浸有任氏液的锌铜弓触及坐骨神经，可见腓肠肌收缩，表明标本机能良好。将制备的蟾蜍坐骨神经-腓肠肌标本，放于任氏液中稳定10 min。任氏液：每1 000 ml所需量

作者简介：魏有东（1973-），男，重庆市人，硕士，主治医师，主要从事脑血管疾病方面的研究。电话：(023)89012903，E-mail：wyd-wydwyd@163.com

收稿日期：2005-06-16；修回日期：2006-04-18

NaCl：6.5 g，10% KCl：1.4 ml（0.4 g），5% NaH_2PO_4：0.13 ml（0.006 5 g），$NaHCO_3$：0.2 g，$CaCl_2$（1 mol/L）：1.08 ml(0.12 g)，葡萄糖：2 g。

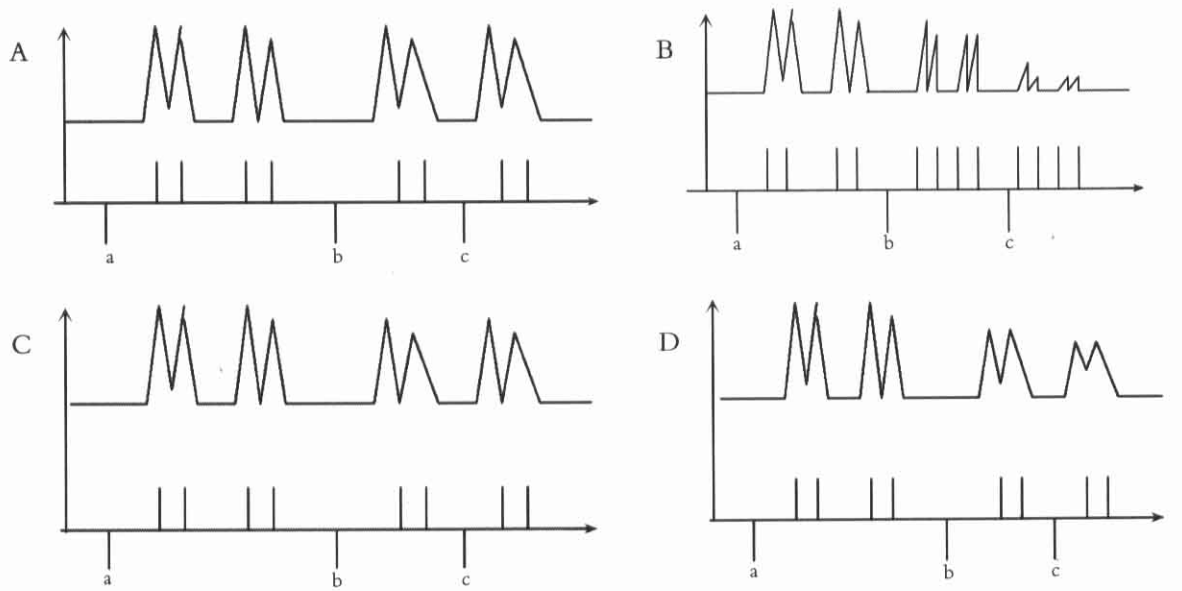
1.5　MS-302 多媒体化生物信号分析仪鉴定神经毒素

将坐骨神经－腓肠肌标本固定于平板肌槽上。调节 MS-302 多媒体化生物信号分析仪，间断给予任氏液，保证标本机能良好。用 MS-302 多媒体化生物信号分析仪记录蟾蜍腓肠肌运动的曲线，待曲线稳定后加入样品，继续观察蟾蜍腓肠肌运动的曲线[2,3]。制作 20 个坐骨神经腓肠肌标本，分 4 组：对照组 1：生理盐水 0.3 ml；对照组 2：未修饰的神经毒素 0.3 ml；实验组 1：乙酸酐修饰的神经毒素 0.3 ml；实验组 2：NEM 修饰的神经毒素 0.3 ml，分别滴注在各坐骨神经－腓肠肌接头上。通过 MS-302 多媒体化生物信号分析仪了解对照组和实验组蟾蜍腓肠肌运动的曲线变化情况。

2　结果

以刺激频率 A（以波间隔 400 ms，串长 2 记录）为横坐标；收缩幅度为纵坐标作蟾蜍腓肠肌收缩曲线，结果见图 1。用生理盐水 0.3 ml，1、1.5 h 后腓肠肌收缩曲线均正常。用未修饰的神经毒素 0.3 ml，1 h 后腓肠肌收缩曲线幅度降低约 50%，1.5 h 后腓肠肌收缩曲线幅度降低约 85%。用乙酸酐修饰的神经毒素 0.3 ml，1 h 后腓肠肌收缩曲线幅度降低约 15%，1.5 h 后腓肠肌收缩曲线幅度降低约 16%。用 NEM 修饰的神经毒素 0.3 ml，1 h 后腓肠肌收缩曲线幅度降低约 20%，1.5 h 后腓肠肌收缩曲线幅度降低约 25%。

由此可见修饰后的神经毒素的毒性有所减低。MS-302 多媒体化生物信号分析仪实验证明：蝮蛇神经毒素氨基、巯基是必需基团，而巯基相对而言更具活性。



A：生理盐水 0.3 ml 组；B：未修饰的神经毒素 0.3 ml 组；C：用乙酸酐修饰的神经毒素 0.3 ml 组；D：用 NEM 修饰的神经毒素 0.3 ml 组；a：正常；b：用样品 1 h 后；c：用样品 1.5 h 后

图 1　腓肠肌收缩曲线

3　讨论

目前在全国医科大学的生理实验中，蟾蜍的坐骨神经－腓肠肌标本实验已被广泛地应用。该实验方法操作简单、方便，并且准确性好。本实验研究采用 MS-302 多媒体化生物信号分析仪对神经毒素进行鉴定，结果较满意。

选择性的化学修饰是指在较温和的条件下，以可控制的方式使一种蛋白质同某些化学试剂起特异性的反应，以引起单个氨基酸残基或其功能基发生共价的化学改变。选择性的化学修饰的优点在于，单个修饰的实验条件远较多个修饰易于控制，实验结果也较易解释[4]。本实验初步掌握了神经毒素的氨基、巯基修饰条件，通过 MS-302 多媒体化生物信号分析仪实验证实：化学修饰蝮蛇神经毒素氨基、巯基，修饰后的神经毒素仍具有神经毒性，但毒性相对减弱。本实验可推断出氨基、巯基是神经毒素的必需基团，而巯基相对而言更具活性。

本实验通过修饰蝮蛇神经毒素的巯基，较好地改变了神经毒素的毒性。修饰后的神经毒素拟用于肌张力增高的大鼠模型，实验观察能否改善大鼠的肌张力，为将来的进一步深入研究和临床治疗肌张力增高提供了一种新思路和方法。

关键词：蝮蛇；神经毒素；实验研究；修饰
中图法分类号：R966.3　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 魏有东，谢　鹏，左　联. 蝮蛇毒神经毒素的分离[J]. 重庆医科大学学报，2004，29(3)：367－369，385.
[2] 莫书荣. 实验生理科学[M]. 北京：科学出版社，2001：61－66.
[3] 董　岩，汤云贵，蒋伍玲，等. 纯化眼镜蛇毒蛋白对乙酰胆碱受体通道的阻断作用[J]. 中国应用生理学杂志，1995，11(2)：113－116.
[4] 陶慰孙. 蛋白质分子基础[M]. 上海：高等教育出版社，1981：154－176.

（编辑　薛国文）