维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)05-0666-03

蝮蛇神经毒素氨基的实验研究

魏有东,谢 鹏

(重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过化学修饰蛇神经毒素氨基,了解修饰氨基后蛇神经毒素的活性。方法:制备大鼠脊髓损伤后肌张力增高模型。从浙江蝮蛇毒中分离出神经毒素,用乙酸酐修饰神经毒素的氨基,通过生理记录仪鉴定,并探讨修饰后神经毒素对大鼠模型的影响。结果:腹腔注射修饰氨基的神经毒素,可见大鼠的肌张力增高有降低,并且大鼠生存时间较对照组中大鼠模型明显延长。结论:蝮蛇神经毒素的氨基是必需基团。

【关键词】神经毒素;氨基;实验研究

【中国图书分类法分类号】R33 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-02-05

The experiment research of amino in neurotoxin from agkistrodon

WEI Youdong, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To modify amino in the neurotoxin, learn about modified neurotoxin's activity. *Methods*: We made rat models that were suffered from spinal injury and had marked muscular hypertonia. We separated neurotoxin from agkistrodon in ZheJiang, modified amino in the neurotoxin by using acetic anhydride, then applied the modified neurotoxin to rats in order to know about its effects, and used the physiological recorder to authenticate its effects. *Results*: The modified neurotoxin was applied to the rats by injecting to the abdominal cavity. These rats 'muscular hypertonia was improved, and their survival time was much longer. *Conclusion*: Amino in the neurotoxin is an important radical.

【Key words】Neurotoxin; Amino; The experimental research

1 材料和方法

1.1 材料

昆明种大鼠 30 只,体质量为 110~120g,雌雄各半,购自重庆医科大学实验动物中心;大鼠随机分 3 组,每组 10 只;对照 2 组,即生理盐水和未修饰的神经毒素组;实验 1 组,即乙酸酐修饰组。乙酸酐购自重庆东方试剂厂;MS-302 多媒体化生物信号分析仪为广东药学院产品。浙江蝮蛇粗蛇毒购自广州鑫嘉益公司;浙江蝮蛇神经毒素由蝮蛇蛇毒经过 DEAE-Sephadex A50, Sephadex G-50 两次柱层析分离而得[1]。

1.2 乙酸酐修饰神经毒素氨基

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

1.3 制备大鼠脊髓半横断的模型

将大鼠经腹腔注射 20g/L 异戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉后,腹位固定于手术台上,剪除胸腰段背部毛发,于 T5~T13 中线切开皮肤,钝性分离浅筋膜,剪开棘突两侧筋膜及肌肉,于 T8~T9 进行椎板切除术。暴露脊髓,用温热生理盐水冲洗伤口。将一尖端圆钝的细钢丝钩型探针,沿硬脊膜外有椎管的一侧导致另一侧,轻轻提起脊髓,运用刀片往返运动切断半侧脊髓。脊髓半横断后,探针可由脊髓断端取出。用冰冻的生理盐水反复冲洗伤口止血。手术完成后,用细丝线缝合深层肌肉,逐层缝合伤口。术后每天观察大鼠,了解大鼠情况。

1.4 蟾蜍的坐骨神经-腓肠肌标本试验

参照文献的方法制备标本,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

作者介绍:魏有东(1973-),男,主治医师,硕士,主要研究方向:脑血管疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

蟾蜍腓肠肌运动的曲线[2,3]。

1.5 方法

A.对照组中，取生理盐水和未修饰的神经毒素各 0.3ml 分别腹腔注射大鼠脊髓半横断的模型各 10 只。实验组中，取乙酸酐修饰的神经毒素 0.3ml 腹腔注射大鼠脊髓半横断的模型 10 只。记录对照组和实验组大鼠肌张力变化，了解大鼠生存时间情况。B.取生理盐水，未修饰的神经毒素和乙酸酐修饰的神经毒素各 0.3ml，分别滴注在蟾蜍坐骨神经－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。

通过 A，B 两种方法了解修饰后神经毒素的毒性变化情况，推断氨基是否是必需基团。

2 结 果

2.1 脊髓半横断大鼠模型

术后 10～14h，脊髓半横断的大鼠进食物尚可，可见大鼠一后肢软弱无力，但可通过双前肢、另一后肢行走。术后 30～38h，脊髓半横断的大鼠的一后肢由软弱无力变为肌张力增高，不能屈曲，进食物尚可；肌张力增高的后肢可支撑身体向前爬行。术后 45～52h，脊髓半横断的大鼠的一后肢仍为肌张力增高，肌张力增高的后肢可支撑身体向前爬行，但后肢不能屈曲。用手可感受其后肢肌张力增高，以后其肌张力增高持续存在。因此可成功制造出大鼠肌张力增高模型。

2.2 乙酸酐修饰后的神经毒素用于脊髓半横断大鼠模型的评价。见表 1。

由此可见，乙酸酐修饰后的神经毒素用于肌张力增高的大鼠，可见到肌张力增高改善，并且大鼠存活时间相对延长。表明对蛇神经毒素进行化学修饰有明显减毒作用。临床大鼠试验可证明蝮蛇神经毒素氨基是必需基团。

2.3 MS－302 多媒体化生物信号分析仪鉴定毒素实验

以上波型以波间隔为 400ms，串长为 2(A)记录。三组腓肠肌收缩曲线结果表明：在同样时间内，生理盐水组腓肠肌收缩曲线无明显变化；神经毒素组腓肠肌收缩曲线明显减低；乙酸酐修饰组腓肠肌收缩曲线有所减低。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是必需基团。

表 1 实验组和对照组中大鼠模型的表现

腹腔注射后时间	对照组		实验组
	生理盐水	未修饰神经毒素	乙酸酐修饰神经毒素
20～30min	未见明显异常	大鼠烦躁不安，步态不稳	未见明显异常
31～50min	未见明显异常	大鼠活动明显减少	大鼠活动无明显减少，步态较不稳
51～100min	未见明显异常	大鼠四肢无力，以瘫痪侧后肢为主，可见肌肉明显松弛，不能行走。毛耸立，并且头不停地抖动。	大鼠站立较不稳，前肢较后肢有力，瘫痪侧后肢可见肌肉较松弛，可以略屈曲。伸屈后肢可感觉肌张力有下降。
101～140min	未见明显异常	10 只大鼠死亡	同前
141～179min	未见明显异常		大鼠四肢均无明显无力，瘫痪侧后肢可屈曲行走，可进食。以后反复用手伸屈后肢，可感觉肌张力有不同程度的下降。
3～6h	未见明显异常		同前
1.0～2.0d	未见明显异常		2 只大鼠不进食，死亡
2.0～2.5d	进食差		余下 8 只大鼠几乎无活动，不进食，死亡。
3.0～4.0d	活动减少，进食差		
4.0～5.0d	10 只大鼠死亡		

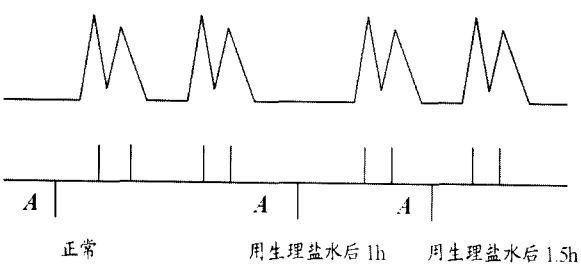


图 1 正常腓肠肌收缩曲线（生理盐水组）

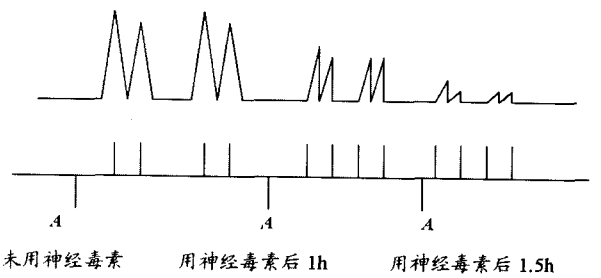


图 2 异常腓肠肌收缩曲线（神经毒素组）

维普资讯 http://www.cqvip.com

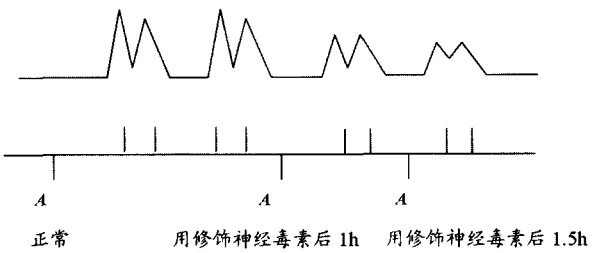


图 3 异常腓肠肌收缩曲线(乙酸酐修饰组)

3 讨 论

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,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]。蛋白质的功能基团所处的环境强烈地影响着它的物理和化学性质。蛋白质分子的表面特点也影响化学试剂的接近[5]。化学修饰技术的应用与生物学功能密切相关,侧链基团的改变有可能导致生物学活性的改变,这类基团称为必需基团。必需基团的改变将导致蛋白质生物学活性的下降或丧失。而某些基团的破坏,对蛋白质生物学功能没有影响,这类基团称为非必需基团[6]。

氨基的修饰可分为三种:(1)将原来带正电的氨基修饰成带负电荷的基团;(2)将氨基修饰成不带电荷的基团;(3)保留原来的正电荷。目前有关氨基的修饰多以 Siamensis toxin 为材料,该毒素有 6 个氨基。氨甲酰化可产生单氨甲酰化到六氨甲酰化的 6 种衍生物。彻底的氨甲酰化以后,改变了毒素的净电荷,从原来的中性条件下带 4 个正电荷变成带 2 个负电荷,毒性只有原来的 3%。Siamensis toxin 的毒性随着被甲酰化的程度的增加而降低,能引起呼吸困难的病理现象也一样[7]。

本实验已通过临床大鼠实验和 MS-302 多媒体化生物信号分析仪实验两方面证实:化学修饰蝮蛇神经毒素氨基,在不明显影响大鼠生存率的情况下,仍可改善大鼠的肌张力增高;修饰后的神经毒素仍具有神经毒性,但毒性减弱。本实验可推断出氨基是神经毒素的必需基团。通过了解神经毒素氨基性质,为以后神经毒素用于临床治疗提供帮助。

参 考 文 献

[1] 魏有东,谢 鹏.蝮蛇毒神经毒素的分离[J].重庆医科大学学报,2004;29(3):106-109.

[2] 莫书荣.实验生理科学[M].第 1 版,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].第 1 版,北京:高等教育出版社,1981;154-176.

[5] A.N.Glazer. Proteins[M]. the first edition, America: Academic Press, 1976;2-88.

[6] 周海梦,王洪睿.蛋白质化学修饰[M].第 2 版,北京:清华大学出版社,1998;1-3.

[7] 覃公平.中国毒蛇学[M].第 2 版,广西:科学技术出版社,1998;372-384.