

息,改进其发出的命令,实现开环与闭环结合的控制。即一方面通过存贮信息,协调各肌群完成特定的运动;另一方面,又接受执行结果的信息,不断改进其输出命令。所以有人把小脑对运动的控制比拟为空间飞船上的控制计算机,它接受驾驶员(相当于大脑皮层)的命令。同时又接受各发动机和舵机的反馈信号,协调这些机构的工作,使整个飞船沿预定航线前进。不同的是飞船的计算机,目前是按预先设计好的程序工作的,而小脑“计算机”的程序可以通过学习不断改进。因此进一步搞清小脑对运动的控制,对设计计算机控制系统是很有意义的。目前已有有人以小脑为模型,设计机器人关节控制器。这种控制器的核心,是有适应能力的分布式存贮器(相当于小脑皮层)。它的特点是相似的输入有相似的对应输出,较小的存贮装置能存贮大量数据。这一设计原理已在数字计算机

上作了模拟,初步证明是可行的。

如上所述可知,目前对小脑的学习能力和对运动控制的研究,取得了较大的进展,可以期望,对小脑的研究可能成为对脑的信息处理功能研究的突破点。

主 要 参 考 资 料

[1] Eccles, J.C.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **58**, 336, 1967.
[2] Marr, D.: *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* **176**, 161, 1970.
[3] Albus, J. S.: *Math. Biosciences.* **10**, 25, 1971.
[4] 塚原伸晃: システムと制御 **16**, 434, 1972.
[5] Eccles, J. C: *J. Physiol.* **229**, 1, 1973.
[6] 伊藤正男: 電子通信学会誌, **56**, 1079, 1973.
[7] Albus, J. S.: *Trans ASME Series G.* **97**, 220, 1975.
[8] Eccles, J. S. et al: *The cerebellum as a neuronal machine* Springer, New York, 1967.

[本文于 1977 年 1 月 28 日收到]

肉毒杆菌毒素的作用机理(下)

施 玉 樑
(上海生理研究所)

作 用 特 点

剂量-反应曲线 引起机体中毒或阻遏离体神经-肌肉标本接头传递所需要的肉毒绝对量是很少的^[1],曾有人以每只豚鼠与小白鼠含有 250 万个神经细胞推算,它们分别平均每个神经细胞只要 4 或 8 个肉毒分子便可被杀死。

将稀释几个数量级的肉毒溶液注射给动物,动物存活时间仅较注射未经稀释原液的延长几分钟。肉毒作用的剂量-反应关系为双对数曲线,即将毒素剂量、反应大小分别取对数,二者关系呈一直线。将哺乳动物膈神经-膈肌标本分别暴露于含有 5×10^1 — 5×10^3 小鼠半数致死量/毫升肉毒的溶液中,观察其麻痹时间,得到了同上述在整体动物上相似的结果,麻痹

时间(分) $\approx 6.5 \times 10^2 / \sqrt[4]{LD_{50}/\text{毫升}}^{*[1]}$ 。

温度系数和低温的作用 Burgen 等(1949)曾观察到温度对肉毒的麻痹作用影响很大。大白鼠膈神经-膈肌标本在 17—18℃ 与肉毒接触 2.5 小时无麻痹征兆,而以同样量的毒素在 37℃ 时,20—40 分钟后便开始出现传递阻遏;青蛙在 16—18℃ 时存活 5—8 天,而同样毒力肉毒 30℃ 时 16 小时即使之死亡。Simpson^[2] 的进一步研究表明,在 21—37℃ 范围内,大白鼠膈神经-膈肌标本麻痹时间随温度上升作直线减少。经测定 Q_{10} 为 3.6,由此根据 Arrhenius 方程式计算得到的肉毒引起麻痹的活化能 $E_0 \approx 1.55 \times 10^4$ 卡/克分子。毒素的作用被认为有

* LD_{50} ——小白鼠半数致死量

两个过程,如上所述,肉毒麻痹作用的发展受温度影响很大,而毒素与标本的结合过程却不受温度(在 20—35℃ 范围内)影响,但明显地受溶液离子强度和 pH 影响。

低温对肉毒的麻痹作用除去上述延缓效应外,我们尚观察到降低温度对已麻痹接头的可逆性作用^[5]。大白鼠膈神经-膈肌标本在肉毒作用下完全麻痹、神经末梢动作电位和终板电位已完全消失的接头,降低温度后末梢可恢复对兴奋的传导能力,神经末梢和终板电反应重新出现,并可诱起肌肉动作电位,引起肌纤维收缩。

神经活动及两价阳离子的作用 Hughes 等(1962)曾观察到,离体哺乳动物神经-肌肉标本在肉毒作用下麻痹过程的发展与神经活动有明显关系。肉毒中毒标本在间接刺激频率为 1.25—80 次/分范围内,标本产生麻痹的时间随刺激频率升高直线缩短。从而,作者们指出。肉毒的作用与神经去极化-复极化过程有关。

Simpson 等(1967)将离体大白鼠膈神经-膈肌标本在不同浓度的 Ca^{++} 和 Mg^{++} 溶液中中毒的研究发现,神经-肌肉接头传递阻遏的潜伏期同 Ca^{++} 和 Mg^{++} 的浓度比 $\left(\frac{[\text{Ca}^{++}]}{[\text{Mg}^{++}]}\right)$ 有关,而不是同它们各自的绝对浓度有关。

进一步工作指出,肉毒对神经-肌肉接头传递的阻遏只有在溶液中有 Ca^{++} (或 Sr^{++} , 它为 Ca^{++} 的有效代替物)存在条件下才能发生^[8]。基于如下观察:在不刺激神经情况下,肉毒仍能使神经-肌肉接头发生完全传递阻遏;对置于缺 Ca^{++} (或 Sr^{++} , 不足以支持神经-肌肉接头传递)的溶液中,即使不间断刺激神经,肉毒仍缺乏作用; Mg^{++} 在足以阻遏神经-肌肉接头传递的高浓度下,拮抗肉毒的麻痹作用;钾离子(50 毫克分子)只有在 Ca^{++} 存在情况下才对肉毒的麻痹作用显示容易化效应, Simpson 等认为,肉毒作用的发生依赖于介质释放,使 Ach 释放容易化的因素(K^{+} 去极化,高渗溶液)加强,而阻止 Ach 释放的因素(高 Mg^{++} 缺 Ca^{++})减缓肉毒的作用。仅仅是 Ach 的释放,而不是神

经膜的去极化-复极化过程对肉毒引起接头传递阻遏是必需的^[7,8]。

然而,当肉毒的作用发生之后,高 Ca^{++} 环境又反过来拮抗肉毒的阻遏作用。曾观察到,在肉毒中毒 30 分钟后,溶液中高 Ca^{++} 、高 Sr^{++} 延缓接头传递阻遏的发生^[7,8]。肉毒作用下终板电位刚刚消失的接头,提高其溶液的 Ca^{++} 浓度一倍,又可使终板电位暂时恢复。 Ca^{++} 介质释放对肉毒作用的这种双相效应尚有待进一步分析。

一般认为肉毒与其在组织中的受体的结合是迅速而不可逆的^[7],在肉毒作用的潜伏期内更置标本溶液,并彻底清洗以除去多余毒素,标本照例同未更置溶液的一样麻痹。毒素与其受体的结合早在潜伏期早期业已完成。最近 Chang 和 Haung^[9] 比较了一直溶于含肉毒溶液的标本与在不同时间后清除毒素的标本的麻痹时间。他们观察到,毒素与组织的结合并非如先前报告的那样快。

肉毒同其受体的结合与麻痹的发生为两个不同的过程,介质释放被压抑时,肉毒的麻痹作用不能发生,但介质释放并不是毒素与受体结合的必须条件。结合过程即使在环境中无 Ca^{++} 时仍能进行,虽然其速度较有 Ca^{++} 时慢^[7]。

神经末梢的介质释放机制是通过 Ca^{++} 耦合的,一般相信,不只是 Ca^{++} 的存在,而 Ca^{++} 本身进入神经末梢膜对 Ach 释放的发生是必需的。由此设想肉毒作用的最初点可能是神经末梢的 Ca^{++} 运转系统, Ach 释放的阻断可能是 Ca^{++} 逆差运转被阻滞的结果。Drochman 等(1969)以 Synaptosomes 研究了肉毒对 Ca^{++} 逆差运转的效应,结果表明极,高浓度的肉毒亦不影响 Synaptosomes 对 Ca^{++} 的累积。作者们认为这个观察提供了强烈反对肉毒的作用是通过神经末梢的 Ca^{++} 运转系统的直接证据。

毒蛋白的受体

目前对于肉毒杆菌毒蛋白在体内的受体的研究才仅开始。一般由形态学和电生理^[2] 研究资料相信,肉毒蛋白的受体必定在胆碱能突触

的突触前膜或突触间基质。Simpson 设想,肉毒蛋白可能与某些突触成份相互作用,从而阻遏兴奋的传递。他由肉毒中毒恢复缓慢推测,肉毒中毒的恢复可能是被毒素结合了的基质的重新合成,按一般规律,脂类较蛋白周转率低,故可能是肉毒蛋白的受体。作者将已知神经末梢含有的各种脂类化合物分别同肉毒一起保温,一定时间后,将混合液注射于整体动物,以统计动物存活率或观察混合液对离体神经-肌肉标本的麻痹时间为指标,来比较不同脂类化合物对肉毒的去活力。并认为:只有在生理状况下(温度、pH、离子强度)能去活肉毒蛋白的方被考虑为可能的肉毒受体。突触区的脂类化合物主要有磷脂、类固醇和神经鞘类脂三大类。在所试的多种磷脂、类固醇、神经鞘类脂和脂肪酸中,唯神经节苷脂能在生理状况下(2℃—40℃,离子强度 0.05—0.4,生理 pH)迅速(少于 5 分钟)去活肉毒^[10],神经节苷脂去活毒素的能力以其分子中含有唾液酸的三唾液酸神经节苷脂(G_{T1})作用最强。提高 G_{T1} 的浓度便增强对肉毒蛋白的去活作用。整体动物存活实验表明: G_{T1} 浓度为 100 毫克/毫升时(每只小鼠以 0.1 毫升静脉注射)可完全保护一个小鼠最小致死量肉毒的作用。经 G_{T1} 去活的肉毒使离体神经-肌肉标本发生麻痹的时间较对照(125 分钟)大大延长(至 400 多分钟),这相当于将肉毒毒力降低两个数量级后的麻痹时间。最适的 G_{T1} 作用条件为 pH 6—8,温度 > 10℃,缓冲液离子强度 0.15 克分子氯化钠。分子中不含有唾液酸基团的神经节苷脂对肉毒无去活作用。以神经氨酸酶将 G_{T1} 分子中的唾液酸裂解后,它便丧失对肉毒的去活能力。神经节苷脂的作用要求保持分子的完整,用 G_{T1} 的各组分分别进行实验,均不显示对肉毒有去活作用。Simpson 由这些,并联系破伤风杆菌毒素的受体可能是神经节苷脂的研究认为,虽然肉毒与破伤风杆菌毒素被神经节苷脂的去活情况有异,但二者均为梭状芽孢杆菌所产生的毒素,因之,神经节苷脂也可能是肉毒蛋白的受体。

但是 Van Heyningen 等(1973)和 Habermann

等(1975)却未能重复出上述结果,没有观察到神经节苷脂的去活作用。后一组作者的研究还表明,脑灰质、Synaptosomes 可去活肉毒蛋白,而白质无此作用。预先以神经氨酸酶处理的 Synaptosomes 亦几乎完全丧失它对肉毒蛋白的去活作用。

毒蛋白的活力中心

肉毒是大分子量的毒蛋白, Lamanna 等测定了结晶 A 型肉毒的分子量和氨基酸成分,其分子量为 900,000—1,100,000。后来又由其分子中分离出一种特异的毒性成分和另一血凝成分,毒性成分的分子量为 150,000,毒力较原来毒素大五倍。用这种毒性成分作抗原可制备出高效价抗毒血清。Das Gupta (1966) 将 A 型肉毒蛋白分离为 α 与 β 两个组分, α 组分小但毒力很强, β 组分占蛋白总量的 80%,毒力却很弱。对 B、E 型肉毒也有类似的研究报道,目前由 A、B、E 型分子中分离出的最小毒性成份的分子量分别为 12,000, 9,000 和 10,000。

对肉毒蛋白毒力中心的研究尚不多,当前主要有两种不同的看法。

Boroff 等曾观察到 A、C、D 型毒素在紫外光下可发荧光,其毒力与所发荧光强度有关,改变毒素结构或降低其荧光的制备步骤都导致其毒力的丧失。在发荧光的氨基酸中,色氨酸最强,其荧光波长亦近于肉毒所发出的。在亚甲基蓝存在情况下,肉毒蛋白发生光氧化作用,使肉毒失活,但不改变其免疫特性。色氨酸是最易受光氧化作用的氨基酸。化学分析还表明,光氧化作用致使肉毒失活过程中,肉毒分子中的色氨酸含量亦下降。据此 Boroff 认为,色氨酸在肉毒分子的活性部分有重要作用,毒素的活性基团可能是类似色氨酸或其衍生物。

但是,已有一些显著与上述资料完全矛盾的实验报告。如 6 克分子尿酸使 A 型肉毒失活 99%,但却不影响其荧光,可消除肉毒荧光的因素则又可以对其毒力无作用;在 A 型肉毒分子中有人未发现有色氨酸存在。

一般相信,各型肉毒的抗原性、分子量虽不

同,但它们对机体的作用,阻遏神经-肌肉接头传递的机制是一样的。因之,各型肉毒蛋白的毒力中心的结构亦应相似。Gerwing 等(1966)根据这个思想分析比较了 A、B、E 型肉毒蛋白,发现它们分子中都含有半胱氨酸。特异的巯基试剂 PCMB (P-Chloromercuribenzoate), DDPM (N-[4-Dimethyl Amino-3,5-Dinitrophenyl malcimide]) 都可使三型毒素丧失毒力88—99%。而且毒力的丧失程度与其 SH-基团被封闭的多少相应。作者们分别把 A、B、E 型肉毒用胰蛋白酶分解,将其中有半胱氨酸的肽片做末端分析,结果发现N端氨基酸组成和排列顺序非常相似。这些以及其它一些资料支持肉毒分子活性部分含有半胱氨酸的观点。但也有人提出实验证据,认为 SH-基团只影响肉毒蛋白的稳定性,并不是肉毒毒力中心的主要部分。

β-银环蛇毒素与肉毒作用的比较

β-银环蛇毒素(β-bungarotoxin)是从银环蛇(*Bungarus multicinctus*)的毒液中分离出的作用于接头前阻遏兴奋传递的剧毒组分,在小白鼠其毒力竟分别相当于肉毒的1%与10%,对小鸡颈二腹肌,其毒力竟为肉毒的3—10倍^[9]。β-银环蛇毒素是一分子量为28,500的毒蛋白。它在许多方面与肉毒的作用极相似:专一地作用于突触前部分阻遏传递而不影响肌肉膜电位、突触后膜的 Ach 敏感性以及肌肉对直接刺激的反应;不阻碍 Ach 的贮存和冲动在神经的传导;麻痹发生前亦有一潜伏期;麻痹作用为重复刺激神经而加速,随温度降低而延缓;溶液中 Ca^{++} 、 Mg^{++} 浓度的改变对毒素的麻痹作用有同对肉毒作用相似的影响;当阻遏接头传递时, cpp 量子含量下降, mepp 振幅不变;在它阻遏接头传递前便取消了由新斯的明产生的神经末梢后发放;同肉毒的麻痹作用一样,也被认为有两个过程:毒素与其作用点的结合;神经末梢的毒素作用点大分子发生变化导致传递阻遏。β-银环蛇毒素是目前所知唯一与肉毒作用如此相似的物质。

Chang 等(1973)以离体哺乳动物神经-肌

肉标本研究了 β-银环蛇毒素与肉毒的相互作用,观察到它们在接头有对抗作用。两种毒素同时或当 β-银环蛇毒素预先同标本接触时,肉毒的作用可完全被取消,而当肉毒与其作用点结合后,β-银环蛇毒素便不再表现出这种有意义的对抗作用。反之,肉毒却似可阻滞 β-银环蛇毒素与其作用点的结合^[9]。

β-银环蛇毒素除去与肉毒作用具有许多重要相似之处外,尚有一些不同,这如:重复刺激肉毒部分麻痹标本的神经,肌肉表现为持续强直收缩,但与之相反,β-银环蛇毒素却表现为维金斯基氏抑制:β-银环蛇毒素作用初期使介质释放容易化,而在肉毒无此现象;β-银环蛇毒素作用下整体动物的突触小泡减少(切断神经、离体标本不然),而肉毒无此作用。

β-银环蛇毒素与肉毒作用的许多相似与一些不同,以及它们在神经-肌肉接头的拮抗作用,使我们有理由认为,深入比较它们的异同和相互作用,了解 β-银环蛇毒素的作用机制,对进一步推进肉毒作用原理的研究不是无益的。

总 结

迄今人们所知的最毒物质——肉毒对机体的作用是专一地阻遏神经冲动通过胆碱能突触的传递。我们近年的研究表明,传递阻遏的主要原因是突触前神经末梢产生和传导冲动能力的丧失,而不是乙酰胆碱释放的阻断。肉毒的作用受环境温度、两价阳离子成分影响很大。对肉毒的作用特点、毒蛋白受体、活力中心以及与肉毒有许多相似之处的 β-银环蛇毒素的研究必将推进对肉毒作用机制的认识,并为肉毒的药物防治提供理论依据。

参 考 资 料

- [1] Boroff, D. A. et al: Botulinum toxin. in "Microbiol Toxin. Vol II A. Bacterial protein toxin." pp 1—68. New York & London. 1971.
- [2] Brooks, V. B.: *J. Physiol.* **134**, 264, 1956.
- [3] 施玉梁等:科学通报,1975年,第20(2)期,第97页。
- [4] 施玉梁等:科学通报,1975年,第20(3)期,第144页。
- [5] 施玉梁等:科学通报,1975年,第20(5)期,第237页。

(下转第24页)

三个半月后,我们又做纸电泳分析。电泳液 0.05M 碳酸氢三乙胺, pH7.5。在此电泳液中,核苷与核苷酸反向泳动,结果见图 11。测核苷部分的放射性占 11.6%,核苷酸即 ^3H -dAMP 占 88.4%。产品的主要杂质是腺嘌呤核苷,这与上面的纸层析相符,在该层析体系中,核苷比核苷酸走得快,故出现小的杂质前峰。如果用下行层析,核苷将走得更快。

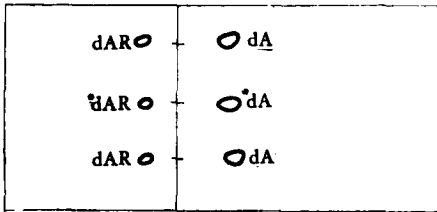


图 11 ^3H -dAMP 纸电泳分析

500 伏两小时,新华 I 号纸,
dA-dAMP, dAR-脱氧腺嘌呤核苷,
有*者为 ^3H -dAMP 与 ^3H -dAR

5. 第二次 Br-dAMP 氟化

我们加 8.9 毫克 Br-dAMP, 21.9 毫克钼催化剂, 0.8 毫升 0.1N 氢氧化钠溶液, 反应氟压 643 毫米汞柱, 其他操作同上。第二批 ^3H -dAMP 的比度为 22.7 居里/毫克分子, 放化纯度为 91%, 化学纯度为层析纯, 化学产率为 87.2%。

讨 论

dAMP 的溴化率一般均大于 60%, 有时可达 80%。制备 Br-dAMP 的关键是分离与结晶。分离的洗脱液浓度太低, 洗脱时间长, 且不能洗下溴化峰。洗脱液浓度过高又不利于二者

的分离。经过试验, 上述浓度还较理想。当然若用梯度洗脱效果可能更好些。Br-dAMP 一定要在低温干燥条件下结晶。

我们在冷冻除氟装置中加两只冷阱, 用真空泵减压浓缩同时, 不断摇动容器, 这样大大缩短除去活性氟的时间。用活性炭柱纯化产品, 整个制备过程只需两天, 效果也较好。

^3H -dAMP 的吸附现象严重, 放化分析前, 容器和层析纸需用载体处理, 以减少器皿壁与滤纸的吸附, 提高分析的精确性。

第二次氟化时, 我们减少了溶剂体积, 降低反应瓶液面, 扩大氟气与反应液的接触, 且搅拌也较均匀, 使卤氟交换更完全。所以, 得到的产品比度比第一次还高。

dAMP 本身很不稳定, 在酸性介质中易脱嘌呤或断磷酸键。我们虽在制备过程中控制各种溶液 pH3.5—3.8, 但分离时间较长, 难免产生脱嘌呤或脱磷现象。不过其量甚微, 用比层析灵敏的放化分析才得以检出。若设法缩短整个制备时间, 可望减少 dAMP 或 Br-dAMP 的分解, 得到更纯的标记产品。

此外, 产品比强度高, 也会引起放化裂解。把 ^3H -dAMP 存放在弱碱性乙醇溶液 (含 NH_4HCO_3 1%), 再降低放化浓度, 严格控制贮存温度, 可减少放化裂解。若需要, 经纸层析或电泳可除去杂质, 提高产品放化纯度。

本产品的制备过程中曾受到中国科学院上海生物化学研究所及上海第二医学院同位素室同志的大力支持, 深表感谢。

[本文于 1976 年 6 月 4 日收到]

(上接第 48 页)

- [6] 施玉梁等: 科学论文及技术总结资料汇编(1966—1974), 3: 30—32, 上海生理研究所, 1974, 10。
[7] Simpson, L. L.: *Neuropharmacol.* **10**, 673, 1971。

- [8] Simpson, L. L.: *Neuropharmacol.* **12**, 165, 1973。
[9] Chang, C. C.: et al: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **282**, 129, 1974。
[10] Simpson, L. L. et al: *Neurochem.* **18**, 1751, 1971。