

肉毒杆菌毒素的作用机理(上)

施 玉 樑

(上海生理研究所)

前 言

肉毒杆菌毒素(Botulinum toxin,以下简称肉毒)是梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)在厌氧环境生长过程中产生的毒素,其化学本质为一大分子量的蛋白质。依其抗原性,现已分离出七种(A、B、C_α、C_β、D、E、F、G)不同的免疫类型,引起人类中毒的主要是A、B、E型。肉毒中毒虽非常见多发病,但死亡率很高,且常暴发形式发生。有关肉毒中毒的临床及实验研究已有不少专著与综述^[1]。

肉毒是迄今为止人们所知道的最毒物质,A型肉毒结晶(为平均长短径85微米与5微米的杆状)一微克即可杀死体重20克的小白鼠20万只^[1],Van Heyningen(1950)推算对一个成人的致死量只有万万分之七克!曾有报道,基于肉毒的这种剧毒性,某些帝国主义国家早在第二次世界大战前已把它列为致死性化学战剂,并做好了用于战争的准备。

自1897年从比利时的一次引起食物中毒暴发的火腿中分离出肉毒杆菌以来,对肉毒中毒的临床和病理进行了广泛的研究。肉毒中毒的绝大多数都是由食物经口引起的。中毒病人出现的各种症状与体征都可以用躯体神经纤维及副交感神经纤维的麻痹来解释。呼吸麻痹是死亡的直接原因。对肉毒中毒的实验研究进一步补充了临床的资料。Mихайлова(1972)观察到猫和兔延脑呼吸中枢的各种类型神经原的电活动在肉毒中毒过程中和呼吸麻痹后不受影响,Davies等(1953)将肉毒直接注射在兔延脑呼吸中枢,动物存活时间反比静脉注射毒素的长,说明阻遏是周边性的。有人研究了肉毒对自主神经系统的作用,结果表明肉毒的阻遏作

用只发生在胆碱能神经纤维。虽然有人报道过肉毒改变脊髓运动神经原的电活动,并认为神经-肌肉接头传递的阻遏只是这种变化的结果,但人们普遍接受肉毒的主要作用是选择性地阻遏周边神经胆碱能纤维的兴奋传递。

除去它的剧毒性之外,肉毒专一地在突触前阻遏冲动经过胆碱能突触特别是神经-肌肉接头的传递,是它为生理学和药理学广泛注意的主要原因。骨骼肌在去神经后发生的各种大家熟悉的变化,如萎缩、纤维性颤动和乙酰胆碱敏感性升高,在肉毒中毒后亦都出现。

本文将简短叙述主要在细胞和分子水平上的有关肉毒对神经-肌肉接头阻遏作用方面的研究,而不拟涉及肉毒对各系统的作用及临床诸方面。

作 用 方 式

神经和肌肉对肉毒作用不敏感 早期的研究已知肉毒对神经的作用不大。在肉毒作用下肌肉对间接刺激麻痹后,神经传导仍正常。Guyton和MacDonald(1947)将肉毒分别注射于豚鼠左侧腓肠肌及右侧坐骨神经的骨盆出口处,刺激坐骨神经上端,当左侧肌肉完全不反应后,右侧收缩正常;对一侧肢体肌肉局部注射肉毒,同时以特异的抗肉毒血清给动物以全身保护,待此肢体完全麻痹后,其坐骨神经的动作电位幅度与正常对照侧无显著差异。Bürgen等(1949)将离体大白鼠膈神经-膈肌标本的神经浸于小室,肌肉浸于大室,加肉毒500单位于小室,神经传导不变,80分钟后刺激神经不出现肌肉收缩异常,但若将200单位肉毒加入大室,标本在30分钟后开始出现麻痹。

肌肉对肉毒的作用亦相对不敏感。在肉毒

使间接刺激引起的肌肉收缩麻痹后,肌肉对直接刺激的反应仍不受影响。直接刺激豚鼠的以肉毒抗毒血清行全身保护而局部注射肉毒造成的对间接刺激不反应的腓肠肌,刺激阈值和收缩幅度的改变与未中毒的去神经的肌肉的变化相同,提示这只是去神经的结果。通过神经给正常神经-肌肉标本施以重复刺激,刺激后出现强直后加强,这种现象在肉毒中毒的标本上仍然出现,而且肉毒中毒后收缩综合曲线(前后给予两个刺激,改变二者的时间间隔,观察肌肉收缩张力变化的曲线)与正常标本的相同。这些结果也说明肉毒对肌肉本身的影响不大,因为强直后加强与综合现象都主要是肌肉的特性。

这些研究表明,肉毒的阻遏作用不发生在神经或肌肉,而是发生在神经-肌肉接头。

肉毒不降低突触后膜对乙酰胆碱(Ach)的敏感性 现代生理学的研究认为,一个由中枢传来的神经冲动要引起肌肉收缩,需经如下几个过程:

神经冲动→Ach→终板电位(epp)
→肌肉动作电位→肌肉收缩。

由前面的叙述可知肉毒产生的阻遏发生在神经-肌肉接头,即是说,它或者以某种方式作用于突触前影响神经冲动达到神经末梢、阻遏Ach的释放;或者作用于突触后阻遏释放出的Ach弥散通过突触裂、使Ach与主要定位于突触后膜的Ach受体不能发生反应。由于箭毒也是阻遏神经-肌肉接头传递的药物,并且早已广为生理工作者研究,所以在研究肉毒对接头的作用时,自然将它的作用与箭毒相比较。生理学的研究表明,箭毒对兴奋通过接头传递的阻遏作用主要发生在突触后,箭毒与Ach竞争受体,使突触后膜对Ach不敏感,结果神经末梢释放的Ach不再能使突触后膜产生如常的去极化,从而阻遏兴奋传递。

Ambache(1949)利用兔的在体眼瞳孔扩约肌和上直肌、猫的胫前肌进行了分析。发现与箭毒不同,在肉毒中毒后它们仍对注射Ach反应。对豚鼠离体胫前肌^[2]以及大白鼠膈肌进行的观察也得到了相同的结果。利用微量电泳注

射将Ach直接施于终板,记录突触后膜的反应的研究也表明,肉毒中毒传递阻遏后突触后膜对Ach敏感度不降低。

生理情况下,运动神经末梢释放的Ach通过突触裂达到突触后膜,与定位在那里的胆碱受体相结合,改变膜的通透性,产生去极化电位epp。之后,主要定位于突触后膜的胆碱脂酶即刻将Ach分解。所以,抗胆碱脂酶类药物对箭毒中毒接头有明显的改善。而肉毒中毒的标本,抗胆碱脂酶类药物如依色林、新斯的明等均无效,去箭毒样作物药物如氯化钾、TEPP、肾上腺素亦均无改善作用。

直接用生物化学方法测定肉毒作用下神经组织的胆碱脂酶活力亦未发现较对照有明显不同。魏乃森等(1963)还观察到夹毁神经可加速肉毒中毒肌肉的自然恢复。这些研究都说明,肉毒对神经-肌肉接头传递的阻遏作用不同于箭毒,主要作用不在突触后。

肉毒中毒标本间接重复刺激时Ach逸出量的减少 在抗胆碱脂酶类药物存在情况下,间接重复刺激正常或肉毒中毒的神经-肌肉标本,可以测出神经末梢在刺激时逸到溶液中的Ach量。利用大白鼠离体膈神经-膈肌标本做的这种测定表明,肉毒中毒后的标本,施加频率50次/秒的重复刺激20分钟,Ach的逸出量降低到对照的1/6—1/10以下;但合成Ach的酶——胆碱乙酰化酶,即使在更高浓度肉毒作用下,其活力亦不受影响。胚芽乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)有同哺乳动物一样的通过胆碱乙酰化合成Ach的能力,Stevenson和Girvin(1958)的研究表明,肉毒在极高浓度下亦不影响这种细菌的活动和它对Ach的合成与贮存。这些结果也说明,肉毒作用下神经-肌肉标本Ach逸出量的减少并非由于Ach的合成受阻致使Ach耗尽的结果。

本世纪五十年代初用电生理学方法在神经-肌肉接头记录到的小终板电位(mepp)被认为与epp一样,也是神经末梢释放的Ach作用于突触后膜产生的去极化电位。所不同的是,mepp代表在没有神经冲动情况下Ach的随机

量子释放,较 epp 含有 Ach 的量子少,幅度亦小。Brooks^[2]利用豚鼠离体前锯肌标本,以终板区电活动为指标对肉毒的作用进行了分析。作者以一对金属电极刺激标本的神经,用玻璃微电极记录肉毒作用下突触后电反应的变化。随着肉毒作用的发展观察到,间接刺激不再能诱起肌肉动作电位而仅能记到幅度逐渐降低的 epp。在 epp 下降过程中,mepp 的发放频率亦逐渐降低,作者认为二者有线性关系。同时 Brooks 对三个接头做了连续观察,发现在接头传递阻遏前后十分钟左右,代表 Ach 随机量子释放的 mepp 亦行消失。若对 mepp 刚刚消失的接头通过神经施以重复刺激,可使 mepp 重新出现并达到正常发放频率,此时亦可见到传递阻遏的暂时解除。Thesleff (1960)利用猫的 *Tennissimus* 肌亦观察到高剂量肉毒完全取消 epp 与 mepp。低剂量肉毒处理的肌肉的 mepp 发放频率大大降低(为正常的1%),刺激这种标本的神经或者无效,或者只出现一个振幅很小的 epp。作者还观察到,整体动物肉毒中毒 1—2 周后的肌肉表现对 Ach 的超敏感化作用,对 Ach 的敏感区可以从终板区扩大到整个肌纤维膜,对不同纤维的测定说明, Ach 敏感区的长度随其 mepp 发放频率在肉毒作用下的降低而增大。

这些以及其它一些生理研究使人们普遍接受肉毒的作用是阻止 Ach 从运动神经末梢释放的看法。

Zacks 等 (1962) 利用免疫电子显微术对肉毒分子在接头的分布进行了观察。作者们发现, 缺蛋白标记的 B 型肉毒分子在接头处相当规则地排列在突触裂的基底膜内,由此认为,肉毒在基底膜与 Ach 相结合,从而使 Ach 不可能被释放出来。近年来以荧光和同位素 ¹²⁵I 标记肉毒进行的研究所获得的结果也被认为是与上述观点一致的。

肉毒作用下神经末梢电活动的消失 我们曾利用电生理学方法对大白鼠膈神经-膈肌标本在肉毒作用下的电活动进行了研究。观察到经 A 型肉毒处理后的标本甚至在接头传递完全

阻遏(对间接重复刺激无反应)后达七小时之久, epp 早已消失, 而 mepp 的发放频率虽降低(70% 的频率 1—20 次/分), 但却始终不消失^[3]。上述结果我们是在 1970 年得到的, 后来看到 Spitzer (1972) 报道了类似结果。我们尚观察了肉毒作用下 epp 消失前后不同理化因素对于 mepp 发放频率的影响, 结果是当氯化钾(加 30 毫克分子)和重复刺激(100—300 次/秒)不再能改变麻痹标本 mepp 的发放频率时, 高渗溶液(加 7% 蔗糖)、盐酸胍(2.5×10^{-3} 克/毫升, 等渗)都仍能使经肉毒处理完全麻痹接头的 mepp 发放频率大大增加, 达到或超过正常发放水平, 但却不能使已经消失了的 epp 恢复。肉毒虽降低然而并未完全取消 Ach 的随机量子释放, 但刺激神经却不再能引起 Ach 的同步释放; 去极化因素已丧失作用而高渗溶液的作用尚存, 由此使我们开始怀疑对肉毒阻遏作用的传统解释, 而设想可能是在肉毒作用下神经末梢膜的通透性发生了某种变化, 以至去极化因素和神经纤维传来的冲动此时不再使末梢发生如常的去极化。进一步的工作证实了肉毒影响神经末梢的兴奋性。

按 Katz 和 Miledi (1965) 所介绍的方法, 用细胞外微电极记录在肉毒作用过程中神经末梢和终板区电活动的变化(主要在青蛙坐骨神经-缝匠肌标本上进行), 我们发现, 肉毒可使运动神经末梢动作电位的振幅逐渐下降, 直至完全消失^[4]。随着神经末梢动作电位下降, epp 振幅亦逐渐降低, 并最后由于神经冲动在末梢的传导阻遏而消失。在这种变化过程中, epp 振幅(亦即 Ach 的释放量)的对数值随神经末梢动作电位振幅的降低作直线下降, 这同给被河豚毒素(阻止兴奋在神经和肌肉膜的发生, 但不影响突触传递)麻痹的突触施加不同强度的短脉冲于突触前, 记录突触后反应的大小所得到的强度-反应曲线相似。在神经末梢动作电位降低的同时, 主要代表 Ach 释放过程的突触延搁(从神经末梢动作电位负波波峰至终板电位开始之间的时间间隔)在肉毒作用下却没有变化^[4]。这反映肉毒中毒时, Ach 从膜内冲出的速度、由

突触前至突触后膜的弥散速度以及它与突触后膜反应的速度没有变化。对经肉毒作用传递已完全阻遏, epp 和神经末梢动作电位已完全消失的接头, 重复刺激神经又可使神经末梢暂时恢复对冲动的传导能力, epp 亦同时出现^[4]; 降低被肉毒阻遏接头的温度亦能恢复神经末梢对兴奋的传导并使已消失的 epp 恢复^[5]。这些观察说明, 肉毒的阻遏作用可能首先是影响了神经末梢膜的兴奋性, 而不是阻断 Ach 的释放(即兴奋-释放耦合机制)。

Harris 和 Miledi (1971) 在人工培养经 D 型肉毒处理 2—6 天麻痹的青蛙坐骨神经-缝匠肌标本上只记录到神经末梢动作电位, 未记到 epp, 而且间接重复刺激尚能使 mepp 发放频率升高。他们未能得到与我们相似的结果, 除去所用毒素类型和实验条件不同外, 联系我们过去的观察, 随着神经末梢动作电位振幅的下降, epp 脱落越来越多(最后有 30—50 次刺激方出现一次 epp 的), 但还不是 epp 的最后消失^[4]; 而且当神经末梢动作电位振幅尚未显著下降时, 重复刺激神经也是可以增加 mepp 发放频率的。在上述 Harris 等的工作中就描述了记到神经末梢动作电位而间接重复刺激却未能提高 mepp 发放频率的例子, 作者们并认为“神经冲动是否沿整个末梢传导, 或者它的振幅是否已受到肉毒的影响, 尚待研究”。这也许正相当于我们观察到的 epp 严重脱落, 重复刺激已不再增加 mepp 发放频率的阶段。

1954 年 Brooks 根据他得到的, 在肉毒作用下离体神经-肌肉标本对间接重复刺激的 Ach 逸出量显著降低后, 通过标本溶液重复刺激神经, Ach 逸出量却仍与未中毒对照标本的相当, 从而提出肉毒阻断兴奋在神经部分传导的可能性。但这个设想不久即由于他自己的进一步工作^[2]而被舍弃。最近魏和王^[6]重复和验证了这个结果, 并以外科去神经的标本做对照以排除肌肉本身逸出 Ach 的可能性。结果表明, 肉毒阻遏兴奋传递后, Ach 的同步释放仍能被动员起来, 说明兴奋-释放耦合机制尚未受到明显的破坏。

另外的研究结果, 如肉毒在它尚未阻遏接头传递功能时已使由新斯的明产生的神经末梢后发放消失; 若标本预先以肉毒处理, 在它对接刺激的收缩反应幅度尚未降低时已丧失了对新斯的明产生后发放的能力^[7], 都从另一侧面反映肉毒在它致使神经末梢动作电位振幅明显变化的更早阶段就已经影响了神经末梢的兴奋性。一般认为, 后发放的产生与神经无髓鞘末梢部分轴突的负后电位增大有关, 一种药物对神经末梢兴奋性的改变与该种药物增大和延长负后电位在时程上相当。负后电位受神经膜对钾离子通透性影响。肉毒取消后发放; 氯化钾加速肉毒的麻痹作用^[8], 以及它对完全被肉毒麻痹接头的 mepp 发放频率无影响^[3], 使我们推想, 肉毒对末梢兴奋性的影响可能是它以某种方式改变了膜对钾离子通透性的结果。

我们利用微电极通极化电流以改变神经末梢膜的极化状态, 还观察到, 经肉毒部分麻痹的接头, 改变末梢极化状态增加 mepp 发放频率, 而对完全被肉毒麻痹的接头, 末梢去极化不再能引起介质释放增加, 但超极化却使 mepp 的发放频率升高, 振幅增大^[9], Boroff 和 del Castillo 等 (1974) 也得到了相似的观察, 但作者们对此很觉意外, 而按我们上述设想, 这完全是意中的事。Boroff 等还观察到, 接头被肉毒完全麻痹前总是可以得到同正常一样或较之稍大的突触容易化效应, 由此他们也认为, 神经末梢去极化与介质释放之间的耦合机制相对说来不受肉毒的作用。

参 考 资 料

- [1] Boroff, D. A., et al: Botulinum toxin. in "Microbiol Toxin. Vol. IIA, Bacterial protein toxin." pp. 1—68, New York and London, 1971.
- [2] Brooks, V. B.: J. Physiol., **134**, 264, 1956.
- [3] 施玉樑等: 科学通报, 1975 年, 第 20 (2) 期, 第 97 页.
- [4] 施玉樑等: 科学通报, 1975 年, 第 20 (3) 期, 第 144 页.
- [5] 施玉樑等: 科学通报, 1975 年, 第 20 (5) 期, 第 237 页.
- [6] 魏乃森等: 未发表资料。(待续)