

# 眼镜蛇神经毒素低分子量水解物的镇痛研究

## The Analgesic Action of Low Molecular Catabolite from the $\alpha$ -Cobrotoxin of Chinese Cobra Venom

班建东 蓝秀万 舒雨雁 汤圣希  
Ban Jiandong Lan Xiuwan Shu Yuyan Tang Shengxi

(广西医科大学蛇毒研究所 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Snake Venom Research Institute, Guangxi Medical Univ., 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要** 眼镜蛇神经毒素 ( $\alpha$ -cobrotoxin或 NT) 经胃液水解后超滤得分子量  $< 3\ 000$  u低分子量  $\alpha$ -cobrotoxin胃液水解物 ( $\alpha$ -cobrotoxin fragment, NTF) 该低分子量产物在小鼠热板及大鼠电尾嘶叫测痛实验, 都显示出明显的镇痛作用, 并有剂量-效应关系。NTF毒性比 NT明显降低, NTF的镇痛显效时间比 NT提前, 维持时间长, 不产生耐受现象。

**关键词** 眼镜蛇 神经毒素 低分子量水解物 镇痛作用 吗啡

中图分类号 R 996.3

**Abstract** The  $\alpha$ -cobrotoxin, NT, is the neurotoxin from the venom of Chinese cobra, *Naja naja atra*. The  $\alpha$ -cobrotoxin fragment, NTF, is the catabolite by the human gastric juice in vitro and is ultrafiltrated to obtain the fragment of low molecular weight less than 3000 u. The analgesic action of NTF was tested by the hot-plate method for mice and the electric tail-stimulation method for rats. Both analgesic methods demonstrated analgesic action and had a dose-effect relationship. The analgesic start-time of NTF was quicker than the NT and the analgesic duration was longer than the NT. The toxicity of NTF was lower than that of NT by means of LD<sub>50</sub> for mice. It was no drug tolerance in successive doses daily for NTF in rat.

**Key words** Chinese cobra,  $\alpha$ -cobrotoxin, low molecular catabolite, analgesic action, morphine

眼镜蛇神经毒素 ( $\alpha$ -cobrotoxin) 具有镇痛作用, 连续小剂量给药可明显提高大、小鼠的痛阈。无成瘾性, 作用与吗啡类药物不同<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -cobrotoxin属于神经肌肉接头突触后膜神经毒素, 因其理化性质的制约, 难以通透血脑屏障, 其镇痛作用不一定是直接作用于中枢神经系统而产生。本文报告眼镜蛇神经毒素低分子量水解物的镇痛作用, 旨在寻找一种低分子量, 毒性低, 镇痛作用强的  $\alpha$ -cobrotoxin水解物, 为临床应用  $\alpha$ -cobrotoxin镇痛提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

昆明种小鼠共 252只, 平均体重 (19 $\pm$ 1)g, 雌性; Wistar大鼠共 108只, 雌性, 平均体重 (170 $\pm$ 20)g 以上动物由广西医科大学实验动物研究中心提供。人新鲜胃液由广西医科大学第一临床医学院提供

### 1.2 眼镜蛇神经毒素 ( $\alpha$ -cobrotoxin)

由广西医科大学蛇毒研究所分离、纯化, 并经小鸡颈二腹肌试验<sup>[2]</sup>证实为突触后膜神经毒素, 其分子量是 7400 u (SDS法), 等电聚焦电泳测其 PI为 8.5 小鼠 LD<sub>50</sub>是 0.102 mg/kg, 95%可信度是 0.086 mg/kg~ 0.118 mg/kg

### 1.3 方法

小鼠热板法参照药理实验方法学<sup>[2]</sup>。以小鼠舔后足潜伏期为痛阈指标, 温度 (55 $\pm$ 0.50) $^{\circ}$ C。实验前将反应迟钝或过敏蹦跳的小鼠剔除

大鼠电尾嘶叫法参照药理实验方法学<sup>[2]</sup>。实验前大鼠训练 2 d, 以适应实验环境。以 YSD-4型多用仪为刺激器, 刺激方波波宽 4 ms, 64 Hz, 串长 1 s 逐渐提高刺激电压, 直至大鼠挣扎嘶叫为止。以引发大鼠嘶叫的电压作为痛阈指标。实验前反应过敏、迟钝的大鼠剔除

转杆试验<sup>[3]</sup>。小鼠放在 5min内转速从 2 r/min 升高到 20 r/min的转动杆上先筛选能保持 5 min不掉下来的小鼠。NT给药后 3h NT胃液水解物给药

后 5h 测定从杆上掉下来的时间, 超过 5 min 者视为无影响。

#### 1.4 胃液降解 $\alpha$ -cobrotoxin 方法

用新鲜胃液 1 mL 与 1.5 mg/mL  $\alpha$ -cobrotoxin 5 mL 混匀, 用 0.5 mol HCl 调节 pH 值为 2, 于 37°C 水浴保温 4 h, 用 0.5 mol NaOH 调节 pH 值为 7 用截留分子量 3 000 的超滤膜进行超滤, 滤出液为低分子量 NT 胃液水解物, 小鼠  $LD_{50}$  是 0.376 mg/kg, 95% 可信度是 0.354 mg/kg~0.398 mg/kg

## 2 实验结果

### 2.1 低分子量 NT 胃液水解物的镇痛作用

#### 2.1.1 小鼠热板法

♀ 小鼠 144 只, 随机分成 6 组 对照组 NT 组、不同剂量 (1/8  $LD_{50}$  1/4  $LD_{50}$  1/3  $LD_{50}$  1/2  $LD_{50}$ ) NTF 组 对照组小鼠每只腹腔注射生理盐水 0.2 mL, NT 组小鼠每只注射 NT 0.025 mg/kg (1/4  $LD_{50}$ ), 不同剂量 NTF 组小鼠分别注射 NTF 0.047 mg/kg 0.094 mg/kg 0.125 mg/kg 0.188 mg/kg 实验结果表明, 腹腔注射 1/4  $LD_{50}$  NT 可使小鼠痛阈平均升高 36.6%, 腹腔注射 1/4  $LD_{50}$  NTF 可使小鼠痛阈平均升高 37.3%。以 4 个不同剂量 NTF 组 (每组  $n=24$ ) 的腹腔注射剂量为横坐标, 以引起小鼠痛阈上升的百分率为纵坐标作图 (图 1), 显示 NTF 对小鼠具有镇痛作用, 并有剂量—效应关系。

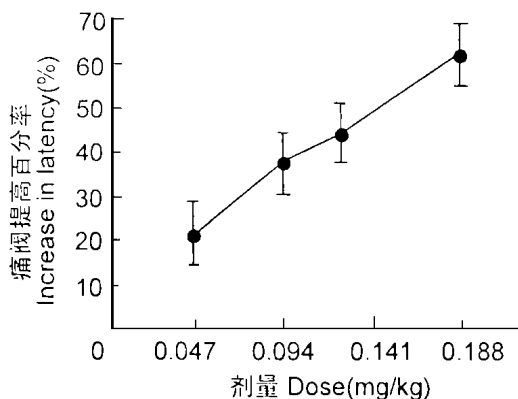


图 1 NTF 镇痛作用的量效关系 (小鼠热板法)

Fig. 1 The dose-effect relationship of the analgesic action of NTF in mice (mouse hot plate)

#### 2.1.2 大鼠电尾嘶叫法

大鼠 72 只分为对照组、NT 组 NTF 组、吗啡组。分别测定给药前、后的痛阈, 吗啡组大鼠给药后 1h 再测痛阈, NT 组大鼠给药后 3h 再测痛阈, NTF 组大鼠给药后 2h 再测痛阈。实验结果见图 2 注射 NT 后可使大鼠痛阈平均升高 49.2%, 注射 NTF 后可使大鼠痛阈平均升高 43.3%, 注射吗啡后可使大

鼠痛阈平均升高 40.6%。

### 2.2 低分子量 NT 胃液水解物的镇痛作用时间

大鼠 36 只分为对照组 NT 组及 NTF 组。剂量同上。分别测定各组大鼠在注射前及注射后 1 h 2 h 3 h 5 h 7 h 12 h 24 h 48 h 和 72 h 的痛阈。结

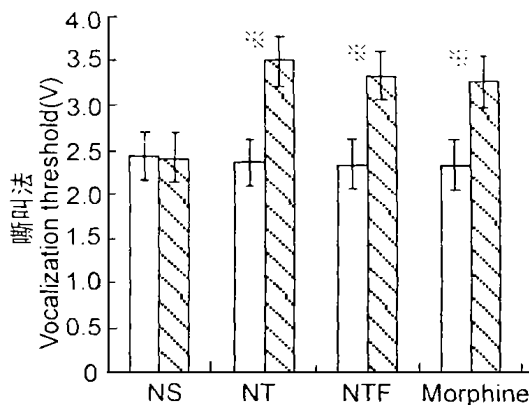


图 2 NTF 的镇痛效应 (大鼠电尾嘶叫法)

Fig. 2 The analgesic effect of NTF in the rats (vocalization test)

□ 给药前 Before injection, ▨ 给药后 After injection; Mean  $\pm$  SD (V); NS  $n=12$ , 0.4 mL/rat, ip; NT  $n=24$ , 0.025 mg/kg, ip; NTF  $n=24$ , 0.094 mg/kg, ip; Morphine  $n=12$ , 4 mg/kg, ip; \*\*  $P < 0.01$ .

果显示, 注射 NT 1h 后大鼠痛阈升高 13.9% ( $P > 0.05$ ), 2h 后大鼠痛阈升高 21.4% ( $P < 0.05$ ), 3h 后痛阈升高 34.2% ( $P < 0.01$ ), 5h 后痛阈升高 31.3% ( $P < 0.01$ ), 7h 后痛阈升高 30.5% ( $P < 0.01$ ); 注射低分子量 NTF 1h 后痛阈升高 14.1% ( $P > 0.05$ ), 2h 后痛阈升高 36.4% ( $P < 0.01$ ), 3h 后痛阈升高 34.3% ( $P < 0.01$ ), 5h 后痛阈升高 32.4% ( $P < 0.01$ ), 7h 后痛阈升高 28.6% ( $P < 0.05$ )。痛阈升高水平可保持 24 h 以上。注射后第 48 h 及 72 h, 两组大鼠痛阈仍比对照组高。结果显示, NTF 比 NT 镇痛作用起效快, 维持时间比较长, 见图 3

### 2.3 连续注射 NTF 和吗啡对小鼠痛阈耐受性的影响

小鼠 48 只分为 NS 组 ( $n=12$ )、NT 组 ( $n=12$ )、NTF 组 ( $n=12$ )、吗啡组 ( $n=12$ )。NS 组每天腹腔注射 NS 0.2 mL, NT 组每天腹腔注射 NT 0.025 mg/kg, NTF 组每天腹腔注射 NTF 0.094 mg/kg, 吗啡组每天腹腔注射吗啡 5 mg/kg。每天早上测定各组注射前的痛阈及注射后 NT 组 3h NTF 组 2h 吗啡组 1h 的痛阈。连续注射 9 d, 观察对小鼠痛阈的影响。各组基础痛阈 (注射前痛阈) 变化见图 4 (A)。NS 组及吗啡组的基础痛阈变化不大, NT 组和 NTF 组的基础痛阈与 NS 组相比, 有较明显升

高 ( $P$  值波动在 0.05 左右), 每次注射 NT NTF 及吗啡后小鼠痛阈变化见图 4 (B) 连续注射 NT 及

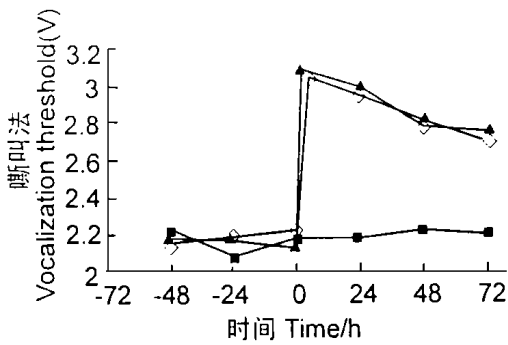


图 3 NTF 镇痛作用的持续时间 (大鼠电尾嘶叫法)

Fig. 3 Time course of the analgesic of NTF in rats (vocalization test)

—■— NS  $n = 12$ , 0.4 mL/rat, ip; —◇— NT  $n = 12$ , 0.025 mg/kg, ip; —▲— NTF  $n = 12$ , 0.094 mg/kg, ip; (—) 给药前 Before injection; (+) 给药后 After injection.

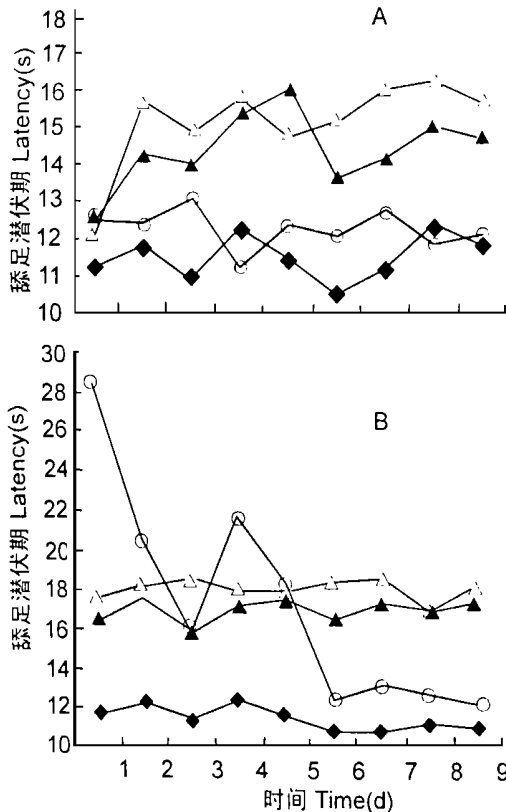


图 4 连续注射 NTF 的镇痛作用 (小鼠热板法)

Fig. 4 Analgesic effects of nine repeated doses of NTF in mice (hot plate test)

(A) 连续注射 NTF 对小鼠基础痛阈的影响 Influence of NTF on the base pain threshold; (B) 连续注射 NTF 和吗啡 9 d, 两者镇痛强度的变化 The variation of analgesic effects of NTF and morphine; —◆— NS  $n = 12$ , 0.2 mL/rat, ip; —▲— NT  $n = 12$ , 0.025 mg/kg, ip; —△— NTF  $n = 12$ , 0.094 mg/kg, ip; —○— Morphine  $n = 12$ , 5 mg/kg (1 d-3 d); 7.5 mg/kg (4 d-9 d), ip.

NTF 9 d, 镇痛作用从第 1 天至第 9 天的效应强度相似。吗啡组注射 3 次吗啡后出现耐受现象, 镇痛效应已不明显 ( $P > 0.05$ ) 第 4 天起增加吗啡剂量至 7.5 mg/kg, 又出现镇痛作用。随后几天, 吗啡的镇痛效应逐渐下降至消失。结果显示, 连续注射吗啡小鼠产生急性耐受现象; 而连续注射 NT 及 NTF 小鼠并不出现耐受, 基础痛阈反而升高

## 2.4 转杆试验

小鼠 60 只分为 5 组, 分别注射 NTF 0.047 mg/kg, 0.094 mg/kg, 0.125 mg/kg, 0.188 mg/kg, 0.282 mg/kg。结果表明, 0.047 mg/kg~0.125 mg/kg 的剂量对小鼠肌肉松弛和协调性方面无影响。在剂量为 0.188 mg/kg 组中有一只小鼠有轻微损伤 (195 s), 在剂量为 0.282 mg/kg 组中有 7 只小鼠在 5 min 内从杆上掉下来, 平均值为 (186 s), 见表 1 表 1 NT 胃液水解物对小鼠转杆试验的影响

Table 1 Effects of NTF on rota-rod performance

剂量 Dose (mg/kg)	小鼠数 No. mice	保持时间 Duration (s)
0.047	12	300
0.094	12	300
0.125	12	300
0.188	12	29 ± 9
0.282	12	186 ± 38*

截止时间 300 s. Ended up at 300 s; \* 单侧  $t$  检验,  $P < 0.05$ .  
Single  $t$ -test,  $P < 0.05$ .

## 3 讨论

30 年代人们已发现眼镜蛇毒粗毒具有镇痛作用, 并将其应用于临床治疗各种痛症, 如恶性肿瘤疼痛, 各种神经痛等, 收到较好的缓解疼痛效果。实验证实, 眼镜蛇毒中具有镇痛作用的组分是眼镜蛇神经毒素 ( $\alpha$ -cobrotoxin), 其镇痛作用起效慢, 持续时间较长, 不出现耐受性和成瘾性<sup>[1,4,5]</sup>。至今为止, 其作用机理尚未见有系统的结论性报道。眼镜蛇神经毒素是一种神经肌接头突触后膜神经毒素, 能与突触后膜的 nAChR 结合而阻滞神经冲动的传导, 此作用经小鸡颈二腹肌实验得以证实。有报道美洲恐怖响尾蛇 (*Crotalus durissus terrificus*, Cdt) 蛇毒中低分子量物质 (分子量  $< 3000$ ) 眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*) 神经毒素口服也有镇痛作用, 但其对胰蛋白酶十分敏感, 经胰蛋白酶处理后其镇痛作用消失<sup>[6,7]</sup>。本文实验模型显示  $\alpha$ -cobrotoxin 经胃液水解的低分子量产物具有镇痛效应, 并有量-效关系。与  $\alpha$ -cobrotoxin 相比较, 其镇痛作用不仅保持了  $\alpha$ -cobrotoxin 原有特

(下转第 212 页 Continue on page 212)

已有通过水源传播甲型肝炎和急性病毒性胃肠炎的报道<sup>[2]</sup>。

这次从污水中分离到的病毒,以 polio 病毒为主 (12 株脊灰病毒),均为疫苗相关株,这主要是与目前大规模普服脊灰减毒活疫苗有关。结果提示,一旦脊灰野病毒输入或疫点流行,污染在水内的病毒将能随水流传送到很远的距离,而造成很大地区环境污染。因此,用 PCR 监测水源中脊灰病毒,了解传染源途径和范围,指导环境污水的处理和易感人群疫苗接种,阻断传播,消灭脊灰,确保社会的稳定和居民健康具有十分重要作用。

此外,这次研究还表明 PCR 的应用可解决一些标本难于培养而不产生明显细胞病变的病毒;解决中和试验鉴定分离物中病毒突破现象和脊灰病毒和非脊灰肠道病毒混合感染型别的不易判断;解决常规病毒型别和型内 T 特征鉴别的操作繁琐,耗时 14 d,比常规缩短到 2 d。该法特异性强,敏感性高,快速地检出病毒,定型和型内鉴别,为临床诊断和流行病学

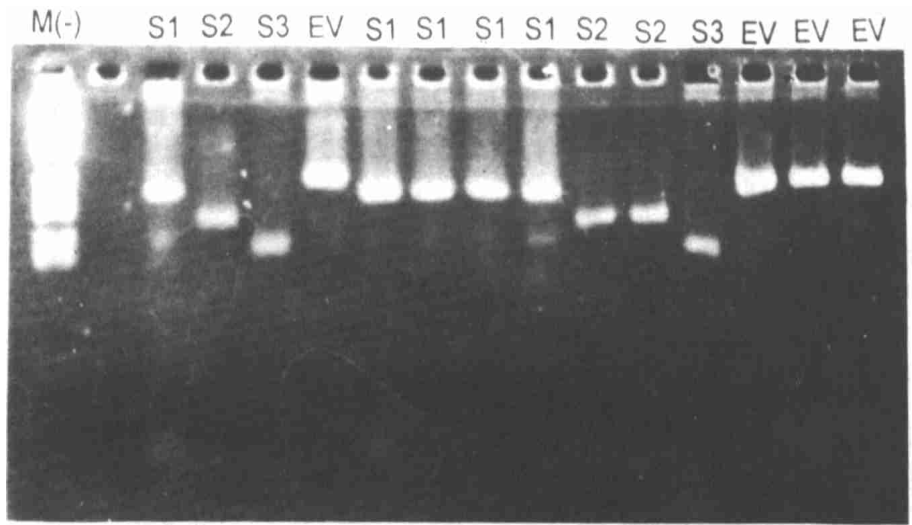


图 1 用 4 对引物扩增肠道病毒分离株的结果

Fig. 1 Amplification products of enteroviruses using 4 PCR primer pairs  
M: 分子量大小 Molecular size marker (PBR322/HadII); S<sub>1</sub>~ S<sub>3</sub>: Sabin 疫苗株 1-3 型 Type 1-3 vaccine-related poliovirus; EV: 肠道病毒 Enterovirus.

现场监测提供辅助手段。

### 参考文献

- 1 Slade J S. Viruses in water. In: GBerg. American Public Health Association. Inc. Washington D C. 1976.
- 2 Martin Goldfied et al. Virus in water. In: GBerg. American Public Health Association. Inc. Washington D C. 1976.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 207 页 Continue from page 207)  
点,而且起效较快。镇痛作用持续时间方面,α-cobrotoxin 低分子水解物镇痛作用的痛阈升高水平可持续 24 h 以上,注射后 72 h 痛阈仍比对照组高。连续注射 α-cobrotoxin 低分子水解物可维持与刚使用时相似的镇痛效果,而不产生耐受现象,也不出现竖尾、活动增加等吗啡类药物的表现。其镇痛性质可能与吗啡类药物不同。

从转杆实验可以观察到 α-cobrotoxin 低分子水解物在 0.047 mg/kg~ 0.125 mg/kg 剂量范围内,并未发现小鼠落杆现象,说明在此剂量范围内,α-cobrotoxin 低分子水解物对小鼠肌肉松弛和协调性均无影响。而在较大剂量组中出现小鼠落杆现象,可能与 α-cobrotoxin 低分子水解物与突触后膜的 nAChR 结合而阻滞神经冲动的传导有关。实验结果表明,经胃液处理 α-cobrotoxin 得到低分子量水解物,具有明显的镇痛作用,并有剂量-效应关系。NTF 毒性比 NT 明显降低,NTF 的镇痛显效时间比 NT 提前,维持时间长,无耐受现象。是否适用于临床,尚需作进一步的

临床观察研究。

### 参考文献

- 1 郝文学,陈远聪主编. 蛇毒的生化、毒理和应用. 北京: 科学出版社, 1980. 109~ 115.
- 2 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 695, 696, 786.
- 3 Wong P T H, Tan S F, Lee H S. Pharmacological profiles of 5-phenylemethylehydantoin and its methoxy substituted derivatives. Jpn J Pharmac, 1989, 49: 309~ 315.
- 4 Habemehl G G. Venomous animal and their toxins. Berlin Springer, 1981. 184~ 185.
- 5 陈汝筑,吴秀荣. 眼镜蛇神经毒素的镇痛作用. 中国药理学通报, 1988, 4 (2): 113~ 117.
- 6 Pu X C, Wong P T H, Gopalakishnakone P. A novel analgesic toxin (hannalgisin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hamah*). Toxicon, 1995, 33 (11): 1425~ 1431.
- 7 Giorgi R, Bernardi M M, Cury Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon, 1993, 31 (10): 1257~ 1265.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)