

中国沿海常见棘毒鱼类的毒性研究 ——日本鬼鲉棘毒液对螫伤大鼠局部组织 结构及代谢的影响*

刘晓萍 张克凌 于业军

(青岛大学医学院 青岛 266021)

提要 于1996—1997年春、秋渔汛季节,在山东青岛、日照沿海采集日本鬼鲉,分离毒腺,提取毒腺粗提液,对大鼠后肢进行肌肉注射,采用组织学、组织化学、放射免疫学方法观察和检测局部皮肤和肌肉的组织结构改变、注射局部肌细胞内的琥珀酸脱氢酶(SDH)及神经肌肉连接处的乙酰胆碱酯酶(AchE)活性变化以及神经肽——P物质和生长抑素含量的改变。结果表明,毒腺粗提液局部注射可造成大鼠肢体麻痹;局部皮肤和肌肉组织明显肿胀,肌细胞有损伤,其内SDH活性显著降低,肌细胞及其间质水肿、血管扩张、伴有出血现象;神经肌肉连接处AchE活性显著增强;局部肌肉组织中P物质含量显著升高,而生长抑素含量显著降低。提示毒棘螫伤造成的剧烈疼痛和肿胀可能与P物质有关,造成肢体麻痹可能与肌细胞损伤及神经肌肉接头处乙酰胆碱分解过程增强有关。

关键词 日本鬼鲉 乙酰胆碱酯酶 P物质 生长抑素

学科分类号 R966.3

毒鲉科鱼类是棘毒鱼中毒性较强的一类,广泛分布于中国沿海。最常见的种类是日本鬼鲉(*Inimicus japonicus*),其毒腺位于背鳍上,被其螫伤可造成局部剧烈疼痛、肿胀、并且迅速向周围扩展,出现肢体麻痹。严重者可出现恶心、呕吐、淋巴结炎、胸闷、心慌等全身症状,且未见有效的治疗方法。目前国外研究主要涉及毒鲉(*Synanceja horrida*) (Yuen *et al*, 1995)、玫瑰毒鲉(*Synanceja verrucosa*) (Garnier *et al*, 1997)等,均属于研究者本国沿海常见的、而且毒性较强的类型。目前国内外尚未见有关日本鬼鲉毒性的专门研究报道。本研究在流行病学调查的基础上,进一步研究毒腺粗提物对螫伤大鼠局部结构及代谢的影响、及对神经肌肉连接处(运动终板)乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AchE)活性、及其P物质(Substance P, SP)和生长抑素(Somatostatin, SS)含量的影响,以期研究螫伤机理,为螫伤的有效治疗提供实验依据。同时为中国海洋生物学、职业病学、急救医学的研究提供资料。

1 材料和方法

1.1 毒腺粗提物的制备

日本鬼鲉(*Inimicus japonicus*)为于1996—1997年春、秋渔汛季节在青岛、日照沿海采

* 国家自然科学基金资助项目,39270645号;山东省教育委员会资助项目,J91K01号。刘晓萍,女,出生于1957年3月,硕士,副教授, Fax:0086-0532-3801449

收稿日期:1998-06-25,收修改稿日期:1999-05-22

集的活鱼,迅速取下背鳍至4℃平皿中,去掉皮肤及毒腺周围的结缔组织,剥离毒腺至研磨器中匀浆,加入少量双蒸水冲洗后,将匀浆液离心(7 000r/min,4℃,30min)取上清液冷冻抽干。置于-30℃保存一周,使用前用生理盐水溶解,使其浓度为100mg/ml。

1.2 实验动物处理

将40只健康的雄性Wistar大鼠随机分为对照组和毒液注射组。(1)对照组(Control group,C组)大鼠右后肢肌肉注射生理盐水0.3ml;(2)毒液注射组(Venom group,V组)大鼠右后肢肌肉注射毒腺粗提液0.3ml(粗提物30mg)。20min后,每组一半大鼠断头取血及局部组织,用于放射免疫测定SP和SS含量;另一半大鼠用于组织学、组织化学观察。

1.3 SP和SS含量测定

1.3.1 血样的采集处理 取抗凝血,置于含300μg杆菌肽的预冷试管中。经离心、丙酮和石油醚处理后,冷冻抽干。-20℃冰箱保存待测。

1.3.2 组织标本的采集处理 迅速取下组织,立即置于沸生理盐水中灭活蛋白酶,称重,取1ml 0.1mol/L HCl匀浆。加0.4ml PELH和0.6ml综合液,离心(4 500r/min,4℃)30min,取上清液待测。

1.3.3 放射免疫分析 由北京海科生物检测中心协助测定。

1.4 组织学、组织化学研究

在腹腔注射戊巴比妥钠麻醉下,对实验大鼠进行心脏灌流固定,固定液为新配制的含4%多聚甲醛和0.5%戊二醛的磷酸缓冲液(pH=7.2)。20min后,取出毒液注射区域的皮肤及肌肉组织,部分置上述固定液中室温固定4h,然后常规梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片6μm,HE染色,用于组织学观察。另一部分肌肉取出后置OCT包埋,液氮冷冻,行恒冷箱冰冻切片30μm。分别进行组织化学染色,显示AchE和琥珀酸脱氢酶(Succinate Dehydrogenase,SDH)活性。并用VIDAS-21型图像分析仪测定。

2 结果与讨论

剧烈的疼痛和显著肿胀是日本鬼鲉螫伤造成的明显特征。本研究发现,在毒液注射后数分钟内,局部组织迅速肿胀,与对照组相比可见注射组大鼠的局部皮肤显著增厚(图1a、b);肌肉组织明显肿胀,可见肌细胞呈不同程度水肿,有的肌细胞膜被破坏;肌细胞之间的结缔组织水肿,间隙变大,其内的毛细血管明显扩张,伴有出血现象(图1c、d)。提示日本鬼鲉毒腺组织内含有高效率的致毒物质。流行病学调查结果显示,在受到螫伤后,如果将患部迅速侵入可忍受的热水中,其疼痛可以减轻。根据这一特点和作者观察的局部组织在短时间内破坏明显的特点,推测致毒物质很可能为酶类或毒蛋白。

本实验通过放射免疫学方法还检测到注射部位的肌肉组织内SP含量显著升高,而SS

表1 毒液对局部损伤组织SDH、AchE活性及其SP、SS含量的影响

Tab.1 Effects of venom on the activities of AchE and SDH, and contents of SP and SS in the wound tissues

项目	对照组	注射组
SDH(OD值)	0.33±0.11	0.92±0.31 ¹⁾
AchE(OD值)	0.76±0.16	1.30±0.45 ¹⁾
SP(pg/ml)	0.79±0.25	1.23±0.32 ²⁾
SS(pg/ml)	0.24±0.08	0.28±0.10

注:1)表示P<0.01;2)表示P<0.05,n=10

含量并无显著改变(表1)。SP在伤害性感受的初级感觉神经元中是重要神经递质,可以与神经激肽-1(neurokinin-1)受体结合。Hopkins等(1996)的研究显示神经激肽受体拮抗剂可以抑制回肠平滑肌对 *Synanceja trachynis* 毒液的反应。从而推测 *S. trachynis* 毒液可

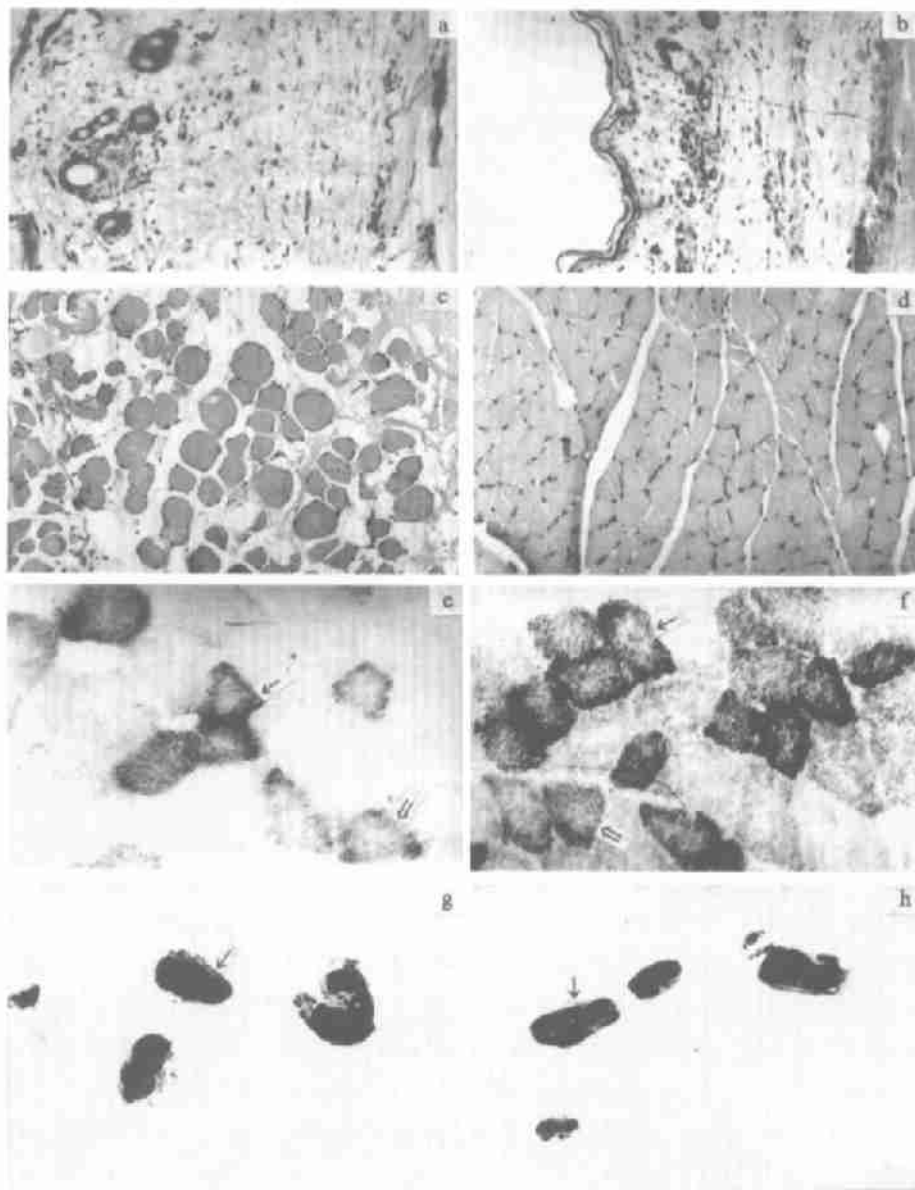


图1 日本鬼触棘毒液对大鼠局部组织的影响

Fig.1 The effects of crude venom extraction of *Inimicus japonicus* on the structure in the rat local tissues

a. 注射组皮肤明显增厚, $\times 400$, 下同; b. 对照组皮肤厚度; c. 注射组肌肉组织结构, 可见肌细胞及其间质水肿, 并有出血(\uparrow); d. 对照组局部肌肉组织结构; e. 注射组肌肉SDH活性显著减弱, 其中红肌(\uparrow)和中间肌(\downarrow)SDH活性降低更明显; f. 对照组肌肉SDH活性, 红肌(\uparrow)和中间肌(\downarrow)SDH活性较强; g. 注射组神经肌肉连接处(\uparrow)AchE活性显著增强; h. 对照组神经肌肉连接处(\uparrow)AchE的活性

能通过促使释放内源性的 SP, 而作用于神经激肽受体。本实验结果也提示日本鬼鲉螯伤可能促使局部组织释放 SP, 而造成剧烈的疼痛。SP 还可以促使肥大细胞释放组织胺、白三烯; 而这些炎性介质又反过来促进神经末梢释放 SP, 进一步增强毛细血管的通透性(张万会等, 1992)。因此, 推测 SP 在疼痛和肿胀的产生和加重过程中起重要作用。而 SS 可能未参与此过程。但是毒腺组织内是否含有 SP, 尚待进一步研究。

SDH 是线粒体的标志酶, 与细胞的能量代谢有关, 其活性的强弱代表了线粒体功能的强弱或线粒体损伤。本实验结果显示, 毒液不仅造成注射局部肌细胞及其间质迅速而显著地水肿; 而且也可造成局部肌肉组织细胞内 SDH 活性显著性降低, 尤其对功能活跃的红肌纤维抑制作用更明显(图 1e, f)。而在神经-肌肉连接处(运动终板)的 AchE 活性显著增强(图 1g, h), 经图像分析发现, 其单位面积光密度值有显著差异(表 1), 说明毒液抑制了局部肌细胞的能量代谢, 并且造成肌细胞内线粒体损伤。有研究表明来自毒鲉的毒腺粗提物可刺激分离的肌肉标本释放内源性的乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach), 低浓度时毒液作用于突触前膜造成神经末梢中 Ach 的释放和耗竭; 高浓度时毒液既可作用于突触前膜, 又可作用于突触后, 造成肌细胞去极化及其镜下可见性肌肉和神经损伤(Colasante *et al.*, 1996)。本实验结果与之相似, 可见日本鬼鲉螯伤大鼠局部肌肉组织中也伴有乙酰胆碱的代谢改变。因此提示日本鬼鲉螯伤后造成的肢体麻痹不仅与肌细胞本身结构损伤及其能量代谢降低有关; 而且与突触后膜上 AchE 活性增强、加速乙酰胆碱分解有关; 同时也可能与肌组织中的神经纤维被破坏有关。

参 考 文 献

- 张万会, 朱运龙, 1992. P 物质的免疫调节效应. 生理科学进展, 23(2): 116
- Colasante C, Meunier F A, Kreger A S *et al.*, 1996. Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. *Eur J Neurosci*, 8(10): 2 149
- Garnier P, Ducancel F, Ogawa T *et al.*, 1997. Complete amino-acid sequence of the beta subunit of VTX from venom of the stonefish (*Synanceja verrucosa*) as identified from CD/VA cloning experiments. *Biochim Biophys Acta*, 1 331(1): 1
- Hopkins B J, Hodgson W C, Sutherland S K, 1996. Evidence for adrenergic and tachykinin activity in venom of the stonefish (*Synanceja trachynis*). *Toxicon*, 34(5): 541
- Yuen R, Cai B, Khoo H E, 1995. Production and characterization of monoclonal antibodies against stonustoxin from *Synanceja horrida*. *Toxicon*, 33(12): 1 557

**TOXICITY RESEARCH OF SPINE POISONING FISH FREQUENTLY
FOUND IN CHINA COASTAL WATERS
—EFFECTS OF INJECTION WITH CRUDE VENOM EXTRACTION OF
STONEFISH (*INIMICUS JAPONICUS*) ON THE STRUCTURE AND
METABOLISM IN THE RAT WOUND TISSUES**

LIU Xiao-ping, ZHANG Ke-ling, YU Ye-jun

(*Medical College of Qingdao University, Qingdao, 266021*)

Abstract In order to study the mechanism of venomous effects of *Inimicus japonicus*, in this paper, we used Histologic, Histochemical techniques and Immunoradioassay (RIA) to study the venomous effects on the structure and the metabolisms of Acetylcholinesterase (AChE) and Succinate Dehydrogenase (SDH), and on the contents of Substance P (SP) and Somatostatin (SS) in the wound tissues. The results show that the injection of the crude venom from *Inimicus japonicus* could cause the wound tissues severe swelling, damage and hemorrhage, decreased the SDH activities, specially in the red and intermediate muscle cells, but markedly increased the AChE activities and the contents of SP. This indicates that the cause of severe pain and swelling stung by *Inimicus japonicus* may be related to SP and the cause of paresthesia may be mediated by accelerating the degradation of ACh, muscular and nervous fiber damage induced by crude venom.

Key words Stonefish (*Inimicus japonicus*) AChE SP SS

Subject classification number R996.3