

在 A 型肉毒杆菌毒素作用下神经末梢电活动的消失

施玉樑 沈克飞

(上海生理研究所)

已知肉毒杆菌毒素选择性地作用于胆碱能神经纤维,使突触传递功能在突触前受到阻遏。Burgen 等^[1]曾提出过,这可能是由于肉毒素使神经冲动不再到达末梢,但许多实验资料^[2-7]却支持肉毒素的作用是阻止乙酰胆碱的释放,而神经冲动在末梢的传播可能是不受影响的。我们曾观察到^[8],在 A 型肉毒杆菌毒素作用下传递完全阻遏的(对间接重复刺激肌肉不收缩)大白鼠膈神经膈肌接头,终板电位早已消失,但随机发放的小终板电位仍能被记录到,虽然其频率较正常标本为低。此时使神经末梢产生去极化作用的手段不再增加小终板电位的发放频率;而高渗溶液和盐酸胍(2.5×10^{-3})却仍能提高小终板电位的频率,使之达到正常发放水平,但不能使已消失的终板电位恢复。这些观察使我们决定直接用细胞外微电极记录,考查肉毒素作用下神经末梢动作电位的命运以及在中毒发展过程中它与终板电位的关系。下面就是这些结果的报导。

方 法

实验主要在青蛙(*Rana nigromaculata hallowell*)的坐骨神经-缝匠肌标本上进行。标本制备后放置在生理溶液中平衡一小时。生理溶液的成份为 NaCl 111.2mM; KCl 1.87mM; CaCl_2 1.09mM,以磷酸缓冲液调整 pH 为 7.4,实验于 5—9 月份进行,肌槽温度维持在 25℃。

所用的肉毒杆菌毒素为 A 型干粉,实验前以磷酸缓冲液稀释,其毒力为 4×10^6 小

鼠最小致死量/毫升溶液。中毒时将离体标本置入含有 A 型肉毒素的生理溶液内,其毒力相当于 3.3×10^5 小鼠最小致死量/毫升生理溶液。标本经肉毒素处理 30 分钟后换以正常生理溶液,洗去多余的毒素,将标本固定在以生理溶液不断更新的肌槽内,待间接刺激不能诱起肌肉收缩反应时开始电生理观察。

部分实验是在大白鼠的膈神经-膈肌标本上观察的。标本制备、中毒及保养方法同前文所述^[9]。肌槽温度维持在 35℃—37℃。

电生理记录观察按 Katz 等^[9]及 Hubbard 等^[10]的方法,以尖端外径为 2—3 μ ,内灌有 3M NaCl 的玻璃微电极在接头部位作细胞外记录,以同时记录神经末梢动作电位和终板电位。我们在连续观察肉毒素作用下一个单位神经末梢和终板电反应的变化过程中,随时注意胞外小终板电位的振幅和发放频率,以作为监视电极是否移动的指标。

结 果

一、神经末梢动作电位的命运

上述经肉毒素处理的标本,随着毒素作用的发展,肌肉对刺激神经的收缩反应变得很微弱,此时在传递已阻遏的接头便可做神经末梢动作电位的细胞外记录。从这时起,直到整个标本对间接刺激完全不收缩之后的一段时间内,都可以在刺激神经时由不同末梢记录到神经末梢和终板的电反应。在这种情

本文 1974 年 6 月 3 日收到。

况下记到的神经末梢动作电位的波形特征与Katz等^[9]在低 Ca^{++} 条件下所记到的相似。靠近末梢部位记录,波形呈正-负双相,其振幅为80—300微伏。在神经末梢动作电位之后,都跟着一个振幅较大的终板电位。图1分别引自青蛙和大白鼠的神经肌肉接头。

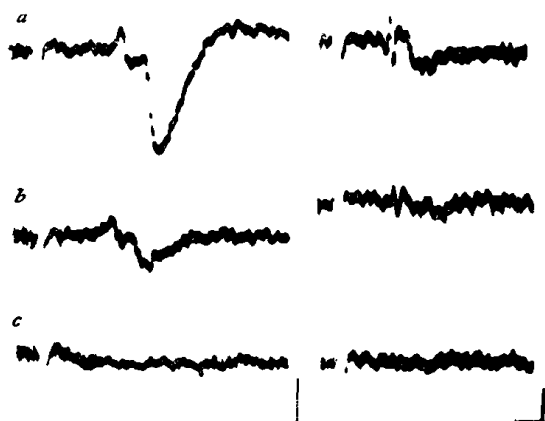


图1 A型肉毒杆菌毒素对神经末梢电反应及终板电位的作用

左列: 青蛙坐骨神经缝匠肌, 右列: 大鼠膈神经膈肌标本。a、b、c为肉毒毒素作用下电反应的系列记录。电压标记200微伏, 时间标记1毫秒。细胞外记录, 波形向上为正, 向下为负, 以下各图同

对青蛙的坐骨神经-缝匠肌标本的同一末梢部位的连续观察表明, 随着毒素作用的进一步发展, 神经末梢动作电位的振幅逐渐降低, 从肌肉对间接刺激不收缩之后一般经过1.5—2小时, 突触前反应完全消失。在反应将近消失前, 有时还会出现神经末梢动作电位的脱落, 即不一定对每一个刺激都出现诱发反应。图2表示反应的变化过程。可以看出, 在神经末梢动作电位振幅降低过程中, 潜伏期亦有所延长(从a到d延长0.25—0.30毫秒)。

在实验过程中, 有时我们将另一电极直接插在有髓鞘神经纤维的分支处, 以同时观察神经干的动作电位。结果表明, 在肉毒素作用下, 神经末梢动作电位消失后, 神经干的动作电位却没有明显变化。为了排除神经末梢动作电位的消失是由于微电极记录压迫了神经末梢而造成的可能性, 我们对未中毒标本在低 Ca^{++} 条件下以同样的方法记录神经

末梢的动作电位, 在长达四小时的连续观察中, 神经末梢动作电位的振幅及潜伏期没有变化。这些对照鉴别实验表明, 我们观察到的神经末梢动作电位的消失确是肉毒素对神经末梢作用的结果。

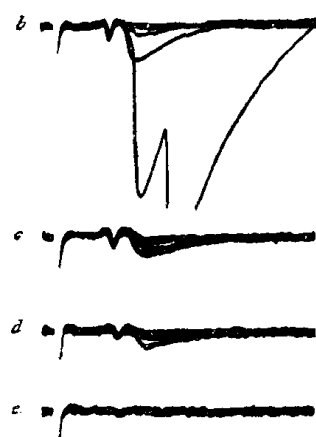


图2 肉毒毒素作用下神经末梢及终板电反应的逐步消失过程

青蛙坐骨神经缝匠肌标本。a—e为一系列连续观察, 每组记录由五次反应重叠而成。标本于10:00以肉毒毒素处理半小时, 记录分别在下列时间: a—17:15; b—17:50; c—18:15; d—18:55; e—19:27, 25℃, 电压标记250微伏, 时标1毫秒

在大白鼠膈神经-膈肌标本上也同样观察到神经末梢动作电位在肉毒素作用下振幅逐步减小, 并最终完全消失。而且, 在神经末梢动作电位完全消失后, 给标本降低温度还可以使神经末梢恢复传导能力, 末梢电反应重新出现^[11], 这也说明神经末梢动作电位的消失不是由于电极移动的结果。

顺便指出, 无论青蛙坐骨神经-缝匠肌或者大白鼠膈神经-膈肌标本, 即使在肉毒素作用下神经末梢动作电位完全消失后, 代表乙酰胆碱量子释放的小终板电位仍以较正常为低的频率随机地发放着。

二、终板电位的消失及其与神经末梢动作电位的关系

当神经肌肉标本在肉毒素作用下刚刚对间接刺激不收缩时, 在神经末梢动作电位之后都能记到一个振幅较大且相对恒定的终板电位。但随着神经末梢动作电位振幅的减小, 终板电位的幅度在较大范围内发生以不同量子等级忽大忽小的波动。有时在神经末梢动作电位后出现先后两个终板反应, 或

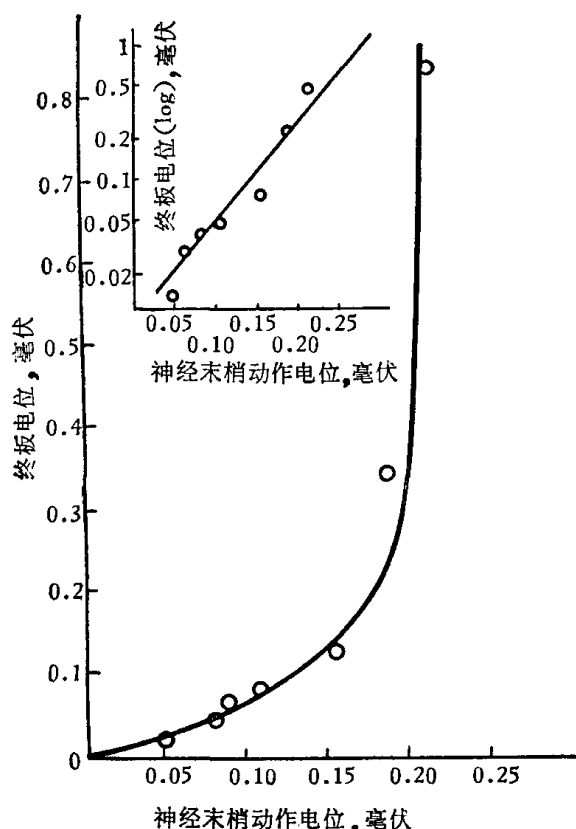


图3 肉毒毒素作用下神经末梢电反应与终板电位消失过程中两者的振幅关系

左上角图中终板电位以对数值表示。青蛙坐骨神经缝匠肌标本。25℃

前后参差地一个叠在另一个反应之上；有时完全不出现反应，即终板反应的脱落。随着神经末梢动作电位振幅的降低，终板反应脱落

越来越多，但是只要神经末梢的动作电位没有最后消失，观察到终板电位都是可能的。

以神经末梢动作电位的平均振幅为横座标，终板电位平均幅度为纵座标，根据图2，两种反应的关系可绘出图3的曲线。由图3可以看出，在接头传递受到部分阻遏，单个间接刺激不足以引起肌肉的收缩反应时，神经末梢动作电位的振幅稍稍下降便可使终板电位平均幅度大大降低；在此之后，随着神经末梢电反应振幅的降低，终板电位的平均幅度缓慢下降。若取终板电位平均振幅的对数值为纵座标，则两者的关系呈一直线，即终板电位的平均幅度，也就是乙酰胆碱的释放量以对数关系随着神经末梢动作电位振幅的下降作直线减少。

我们尚对在肉毒素作用下神经末梢动作电位降低过程中的突触延搁，即自突触前反应的负波波峰至终板电位的开始之间的时程，进行了测量。结果表明，在肉毒素作用下神经末梢和终板的电反应虽然逐渐减小，但突触延搁却不发生变化。图4是从青蛙缝匠肌标本的一个单位上观察结果的一例。图5是我们对13个单位1822个反应测量的突触延搁分布图。从图中可以看出，三分之二的突触延搁集中在0.3毫秒，最小的突触延搁是

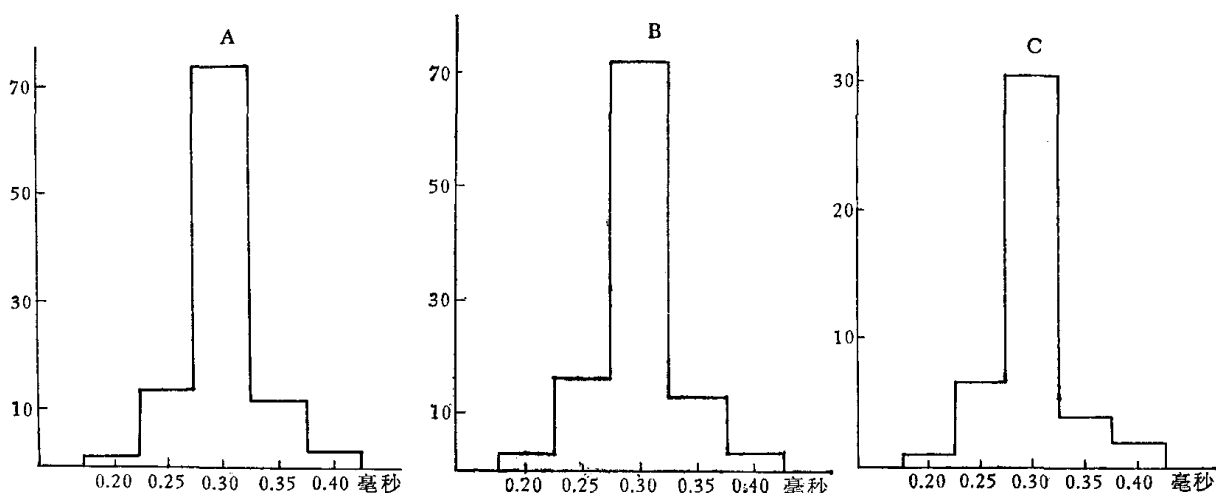


图4 肉毒中毒的不同阶段突触延搁分布图

青蛙坐骨神经缝匠肌标本。25℃。标本于9:35以肉毒毒素处理半小时，16:50麻痹。得到各分布图的时间：A—17:05；B—17:58；C—18:46。纵座标：统计反应数，横座标：突触延搁(毫秒)

0.2 毫秒。这些结果也表明,肉毒素作用下乙酰胆碱从膜内冲出的速度、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受到阻碍。肉毒素的主要作用是影响了神经末梢的电兴奋性。

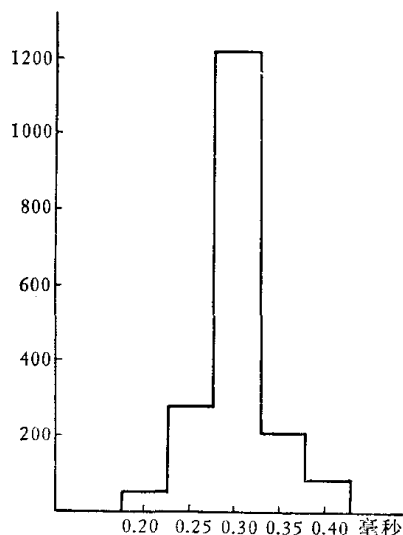


图5 肉毒中毒后神经肌肉接头突触延搁分布图

在青蛙坐骨神经缝匠肌标本上的13个接头上测量的1822次反应的突触延搁分布图。座标表示同图4

三、重复刺激的效应

运动神经末梢动作电位的振幅由于肉毒素的作用而逐渐减小时,施加重复刺激(10—200次/秒)于神经干上可使神经末梢动作电位的振幅暂时增大,终板电位振幅也相应增大。重复刺激停止后还出现强直刺激后加强。这和 Hubbard 等^[10]在高 Mg^{++} 情况下观察到的相似。而且,在神经末梢动作电位刚刚消失后,施加重复刺激还可短暂地使消失了的神经末梢动作电位和终板电位重新出现。图6是反应的一个例子。附带指出,在神经末梢动作电位还存在时,重复刺激亦可使小终板电位发放频率增加。必须说明,肉毒素的作用并不因末梢电反应在重复刺激后暂时恢复而停止发展。随着肉毒素作用的继续发展,重复刺激便不再能诱起末梢电反应,也不再能改变小终板电位的发放频率。但是正如前文所报导的那样,小终板电位却仍以

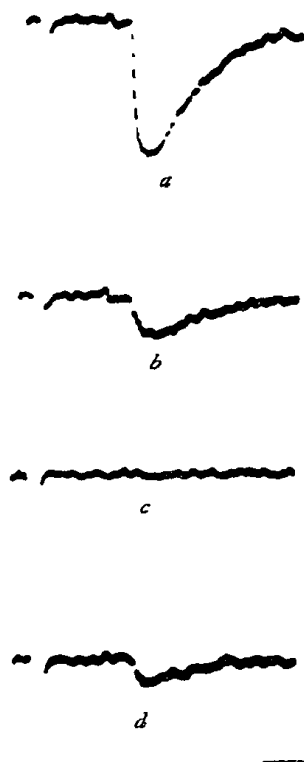


图6 神经末梢和终板电反应在重复刺激后的重新出现

青蛙坐骨神经缝匠肌标本。a—b为一系列连续观察。随中毒过程的发展神经末梢和终板电反应逐步减小(a—b)以至完全消失(c),施加重复刺激(300次/秒,15秒,)可短暂地使刚消失的电反应重新出现(d)。电压标记100微伏,时标1毫秒

较正常为低的频率随机地发放着^[8]。

讨 论

本文报导的在A型肉毒杆菌毒素作用下,运动神经末梢电活动的逐步消失,为肉毒素直接作用于神经末梢电兴奋性使神经末梢丧失传导冲动的能力,提供了第一个实验证据。

神经末梢作为神经肌肉接头的一个突触前组成部分,从解剖关系上看,虽然是神经纤维的延续,但在精细结构及生理功能上,它与神经纤维已有很多不同。因此,肉毒素选择性地作用于神经末梢而对神经纤维没有什么影响是完全可以理解的。失去髓鞘是神经末梢与运动神经纤维不同之一,但肉毒素不影

响无髓鞘纤维神经干的动作电位的观察^[12]不能作为运动神经末梢也不受肉毒杆菌毒素作用的证据。

在前一工作中^[8],我们对肉毒素作用的机制曾提出设想:肉毒素对接头传递的阻遏作用,可能主要是由于它以某种方式改变了神经末梢兴奋膜的选择通透性,从而使神经纤维传来的冲动不再能象通常那样引起末梢膜去极化,产生正常的末梢动作电位,实现兴奋传递。在肉毒素作用下神经末梢丧失对冲动的传导能力的实验结果为我们这个设想提供了进一步的支持。终板电位是由神经冲动到达末梢发动的乙酰胆碱量子的同步释放所引起的,神经末梢动作电位的降低和最后消失,对终板电位势必具有决定意义。虽然由于我们只能从肌肉不收缩时方能开始记录神经末梢与终板的电反应,而无法知道它们从中毒开始直至肌肉麻痹的整个过程中的变化,以及二者的相互关系,但从已测定的二者振幅之间的相互关系所绘出的曲线来看,在麻痹的更早阶段只需神经末梢动作电位振幅的微小降低就可造成终板电位的陡然下降。

我们在肉毒素中毒后所绘出的神经末梢-终板反应强度关系曲线和 Hubbard 等^[10]在标本处于高 Mg^{++} 情况下,以及 Katz 等^[13,14]在河豚毒处理的标本上进行的观察十分相似。已知河豚毒选择性地阻遏刺激时神经和肌肉膜钠电导增加的机制,而对突触传递过程却没有影响。由此我们推论,肉毒素对神经冲动引起的乙酰胆碱的释放以及乙酰胆碱的作用于突触后膜的影响可能不大。对肉毒素处理的接头的突触延搁的测定也从另一个侧面提示肉毒素作用下,乙酰胆碱从膜内冲出的速度、由突触前至突触后膜的弥散速度以及它与突触后膜的反应速度没有受到阻碍。

在我们整理实验结果时看到了 Harris 和 Miledi^[15]对人工培养条件下肉毒素处理的青蛙坐骨神经-缝匠肌标本的神经末梢动作电位的观察报导,在经2—6天培养,接头传递阻遏的标本上只能记到神经末梢动作电位而终板电位已不复存在。对于这一结果与我们的研究不同的原因目前我们尚不能给予确切地说明,除去实验条件不同外,我们还注意到,他们所用的是D型肉毒素,而我们所用的是A型。虽然一般不认为毒型不同作用机制有异,但同一种动物对不同型毒素的敏感度差异却可以很大。

参 考 资 料

- [1] Burgen, A. S. V., Dickens, F. & Zatman, L. J., *J. Physiol.*, **108** (1949), 10—24.
- [2] Ambache, N., *J. Physiol.*, **108** (1949), 127—141.
- [3] Brooks, V. B., *Fed. Proc.*, **15** (1956), 25.
- [4] Brooks, V. B., *J. Physiol.*, **134** (1956), 264—277.
- [5] Thesleff, S., *J. Physiol.*, **151** (1960), 598—607.
- [6] Zacks, S. I., Metzger, J. F., Smith, C. W. & Blumberg, H. M., *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **21** (1962), 610—633.
- [7] Stover, J. H., Fingerman, J. M. & Forester, R. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84** (1953), 146—147.
- [8] 施玉樑、沈克飞, 科学通报, **20** (1975) 1, 97.
- [9] Katz, B. & Miledi, R., *Proc. Roy. Soc. B.*, **161** (1965), 453—482.
- [10] Hubbard, J. I. & Willis, W. D., *J. Physiol.*, **163** (1962), 115—137.
- [11] 施玉樑、沈克飞, 肉毒杆菌毒素阻遏的大鼠神经肌肉接头在降温后传递功能的恢复(待发表).
- [12] Westhues, M., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmacol.*, **246** (1964), 308—315.
- [13] Katz, B. & Miledi, R., *Proc. Roy. Soc. B.*, **167** (1967), 23—38.
- [14] Katz, B. & Miledi, R., *J. Physiol.*, **192** (1967), 407—436.
- [15] Harris, A. J. & Miledi, R., *J. Physiol.*, **217** (1971), 497—515.