

眼镜蛇神经毒素急性毒性试验

吴宁¹, 张金娟^{2*}, 熊英², 肖俊³, 杨勤⁴

(1. 贵州医科大学 生化与分子生物学教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 机能实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 物理教研室, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州医科大学 病理生理学教研室, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 观察眼镜蛇神经毒素(科博肽注射液)的急性毒性, 为药物的临床安全使用提供依据。方法: 选取3个批次的眼镜蛇神经毒素(样品1、2、3), 通过预实验设计各样品组数和剂量, 分别给每组小鼠一次性肌肉注射相应批次和剂量的眼镜蛇神经毒素, 观察给药后14 d内各受试小鼠的反应、死亡情况及主要脏器有无明显病理改变; Bliss法计算出各样品的半数致死量(LD₅₀)及其95%可信限。结果: 小鼠肌肉注射眼镜蛇神经毒素注射液后, 部分小鼠从出现右后肢(给药侧)跛行, 逐渐发展至全身肌张力降低, 出现呼吸减慢, 最后死亡, 部分小鼠症状持续约2~6 h后开始缓解并逐渐恢复正常, 尸检结果显示各脏器肉眼观察均未见明显异常; 3个批次的眼镜蛇神经毒素经LD₅₀及其95%的可信限分别为: 样品1 LD₅₀为202.097 μg/kg, 95%的可信限为174.358~234.249 μg/kg; 样品2 LD₅₀为146.425 μg/kg, 95%的可信限为132.904~161.322 μg/kg; 样品3 LD₅₀为160.726 μg/kg, 95%的可信限为138.863~186.030 μg/kg。结论: 眼镜蛇神经毒素注射液具有一定急性毒性, 且其毒性作用可能主要累及肌肉神经系统。

[关键词] 眼镜蛇神经毒素类; 急性毒性试验; 小鼠; 注射, 肌肉内; 半数致死量

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)01-0057-03

Study on Acute Toxicity of Kebotai Neurotoxin

WU Ning¹, ZHANG Jinjuan², XIONG Ying², XIAO Jun³, YANG Qin⁴

(1. Chemistry and Biochemistry Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Medical Function Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Department of Physics, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 4. Department of Pathophysiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the acute toxicity of kebotai neurotoxin in order to provide guidance for clinical application of medicine. **Methods:** Mice were given 3 different batches of kebotai to test minimum total dead dose (Dm) and maximum total undead dose (Dn) for grouping and designing doses. 180 Kunming mouse were used in formal experiments. According to the designed groups in pre-examination, 10 mice in each group were given disposable intramuscular injection of kebotai neurotoxin with corresponding batches and doses. Reaction and death conditions of mice within 14 days after injection were observed. Dead mice were dissected and pathological changes of major organs were observed by naked eyes. The number of dead mice in each group were calculated, Bliss method was used to calculate lethal median dose (LD₅₀) and 95% confidence limits of samples. **Results:** After injection, right hind led (medication leg) lameness happened in some animals, then developed to whole body muscular tension decreased, breathing slow, and died; right hind led lameness appeared in some animals, then develop to whole body muscular tension decreased, in contrast, bradypnea were not observed, animals recovered after 2 to 6 hours. LD₅₀ of 3 batches of kebotai injection samples were as follows: 202.097 μg/kg, 146.425 μg/kg and 160.726 μg/kg; and the 95% confidence limits were

* 通信作者 E-mail: zj216@163.com

网络出版时间: 2016-01-07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160107.2006.026.html>

174.358 ~ 234.249 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 132.904 ~ 161.322 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 138.863 ~ 186.030 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion:** Kebotai injection has a certain toxicity, and muscle and nerve system may be mainly involved in.

[**Key words**] cobra neurotoxins; acute toxicity tests; mice; injection, intramuscular; lethal dose 50

眼镜蛇毒神经毒素是一种非麻醉性镇痛剂^[1],具有不成瘾、不产生耐受、镇痛作用强、疗效持久等优点,对慢性特别是持续性、顽固性疼痛有独特疗效,临床上用于慢性、顽固性疼痛及晚期癌症疼痛的治疗,疗效确切^[2]。本研究采用的科博肽注射液主要成分为眼镜蛇毒神经毒素,该毒素为眼镜蛇毒的主要成分之一,是眼镜蛇毒中最主要的致死成分^[3]。本研究选取 3 个批次的科博肽注射液进行小鼠急性毒性试验,为眼镜蛇毒神经毒素的临床安全应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 药物试剂与动物

眼镜蛇毒神经毒素(科博肽注射液),批号分别为:20110101(简称样品 1)、20110601(简称样品 2)及 20110602(简称样品 3),规格均为 2 mL:70 μg (云南南诏药业提供)。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,使用前临时用 0.9% NaCl 注射液配制。健康昆明种小鼠,体质量 18 ~ 22g,雌雄各半(购于重庆滕鑫生物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(渝)2007-005);小鼠雌雄分笼饲养,5 只/笼。动物室光照充足,通风良好,环境温度为 18 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 50% ~ 70%,按常规定期消毒;动物适应性饲养 3 d 后,用于实验。

1.2 方法

通过预实验找出各受试样品的最小全死量(Dm)和最大全不死量(Dn),根据各样品的 Dm 和 Dn 值设计组数,按下式^[4-5]计算出相邻两组剂量之比(即公比), $K: \frac{1}{K} = (N - D) \sqrt{\frac{Dm}{Dn}}$ (式中 N 为所设组数),再根据所得 K 值和要设定的组数设计好各样品的相应剂量。根据预试验结果对各样品进行的分组及剂量设计,样品 1: Dm = 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、Dn = 105 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、Dm/ Dn \approx 2.67 倍,可分为 5 个剂量组,则相邻两剂量之比 $K \approx 0.78$;故样品 1 试验动物分为对照组、剂量 1 组(280.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 2 组(218.400 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 3 组(170.352 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 4 组(132.875 $\mu\text{g}/\text{kg}$)及剂量 5 组(103.642 $\mu\text{g}/\text{kg}$)6 个组。样品 2: Dm = 227.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、

Dn = 105 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、Dm/ Dn \approx 2.16 倍,可分为 5 组,则相邻两剂量之比 $K \approx 0.82$;故样品 2 试验动物分为对照组、剂量 1 组(227.500 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 2 组(186.550 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 3 组(152.971 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 4 组(125.436 $\mu\text{g}/\text{kg}$)及剂量 5 组(102.858 $\mu\text{g}/\text{kg}$)6 个组。样品 3: Dm = 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、Dn = 105 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、Dm/ Dn \approx 2.67 倍,可分为 5 个剂量组,则相邻两剂量之比 $K \approx 0.78$;故样品 3 试验动物对照组、剂量 1 组(280.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 2 组(218.400 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 3 组(170.352 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、剂量 4 组(132.875 $\mu\text{g}/\text{kg}$)及剂量 5 组(103.642 $\mu\text{g}/\text{kg}$)6 个组。按以上各样品设计的组数将小鼠按体重进行随机分组,每组 10 只,雌雄各半。将 3 个样品分别用 0.9% NaCl 注射液梯度稀释成所需浓度,再将稀释好的各溶液按 0.1 mL/10 g 体重的容积一次性肌肉注射给相应小鼠,对照组小鼠肌肉注射等容积 0.9% NaCl 注射液。给药时,用碘酒、酒精依次消毒小鼠右后肢外侧皮肤,将注射针头插入肌肉内注射给药。

1.3 观察指标

给药后,观察 14 d 内动物所发生的异常反应及死亡情况,并将死亡动物及时进行解剖,肉眼观察各主要脏器有无明显病理改变,未死亡动物于两周后处死进行尸检,观察主要脏器有无病理改变^[6]。

1.4 统计学方法

将各样品组数、各组剂量、各组动物数和各组死亡动物数输入 Bliss 统计软件包中,按 Bliss 法计算出各样品的半数致死量(LD₅₀)及 95% 可信限^[7]。各样品死亡雌雄动物数采用卡方检验进行比较^[8]。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

对照组小鼠给药后表现正常。3 个样品各剂量组动物给药后约 15 min 内活动自如,少数动物有舔舐注射部位现象。自给药后 15 min 起,有小鼠陆续出现异常表现并进行性加重,最后部分动物死亡,而部分动物能重新恢复正常。小鼠从出现异常表现到死亡的发展过程为:首先出现右后肢(给药侧)跛行,然后表现为活动减少、双后肢无力、行

走时双后肢向后拖,随后发展至全身肌张力降低,俯卧于笼中、腹部贴地,腹式呼吸,翻正反射消失,继而逐渐出现呼吸减慢,进而进一步出现叹息样呼吸,最后死亡。部分动物死亡时眼球明显外凸。若反应过程中未出现呼吸显著减慢的动物,在症状持续约 2~6 h 后开始缓解并逐渐恢复正常。给药后,在 30 min 左右开始有动物死亡,6 h 后未记录到动物死亡,各样品死亡动物与其性别无关。死亡小鼠尸检时肉眼未见心、肝、脾、肺、肾、脑等脏器出现明显异常改变。所有给药后存活的小鼠在给药

24 h 后表现完全正常,其毛皮光滑,饮食、大小便正常,眼、口、鼻未见异常分泌物,黏膜无明显充血、水肿等表现。体重增长与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察 14 d 后,处死存活小鼠,对心、肝、脾、肺、肾、脑、胃及肠等主要脏器进行大体解剖学观察,均未发现所检器官出现肿胀、囊肿、萎缩、出血、水肿、颜色异常、粘连、硬化等异常改变,与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 个样品的 LD_{50} 及 95% 的可信限。见表 1。

表 1 眼镜蛇神经毒素经肌肉注射后小鼠死亡、 LD_{50} 与 95% 可信限

Tab. 1 Death condition of rats, LD_{50} and 95% confidence limits of samples after intramuscular injection of kebotai neurotoxin

受试样品	组别	n	死亡动物数			$LD_{50}(\mu\text{g}/\text{kg})$	95% 可信限($\mu\text{g}/\text{kg}$)
			♀	♂	共计		
样品 1	对照组	10	0	0	0	202.097	174.358 ~ 234.249
	280.000	10	5	4	9		
	218.400	10	3	4	7		
	170.352	10	0	1	1		
	132.875	10	1	0	1		
	103.642	10	0	0	0		
样品 2	对照组	10	0	0	0	146.425	132.904 ~ 161.322
	227.500	10	5	5	10		
	186.550	10	4	5	9		
	152.971	10	3	3	6		
	125.436	10	0	2	2		
	102.858	10	0	0	0		
样品 3	对照组	10	0	0	0	160.726	138.863 ~ 186.030
	280.000	10	5	5	10		
	218.400	10	4	4	8		
	170.352	10	2	5	7		
	132.875	10	1	1	2		
	103.642	10	0	0	0		

3 讨论

LD_{50} 的测定是一种经典的急性毒性试验方法^[9]。 LD_{50} 测定的方法有多种,其中 Bliss 法具有严谨精确、考虑周密、适应性强等特点,被认为是最正规的方法^[10],虽然该方法非常繁复,但由于有相应计算机软件的出现,计算过程复杂已不再是问题。

本试验采用 Bliss 法对眼镜蛇神经毒素注射液 3 个样品的 LD_{50} 及其 95% 可信限进行了测定,根据各样品不同剂量组小鼠的死亡情况计算出各

样品的 LD_{50} 分别为 202.097 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、146.425 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及 160.726 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 95% 的可信限分别为 174.358 ~ 234.249 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、132.904 ~ 161.322 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及 138.863 ~ 186.030 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。而从给药后小鼠的反应来看,给药后 15 min 左右开始出现肌注给药侧肢体的跛行,进行性加重,至出现全身肌张力降低的过程考虑主要是给药后小鼠的神经肌肉系统受累的过程。小鼠给药侧肢体肌肉张力降低使该侧肢体出现跛行,然后是双后肢肌张力降低致双后肢无力。再逐渐发展至全身肌肉张力降低,肌张力降低使小鼠无力维持机体站立姿势,表现为俯卧位,且腹部贴地。当累及到肋间肌,使小鼠不能完成正常

(下转第 66 页)

- [5] The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Steering Committee (NASCET). North American symptomatic carotid endarterectomy trial. methods, patients characteristics and progress[J]. Stroke, 1991(6): 711-720.
- [6] Wang PQ, Liu JJ, Wang AP, et al. Recurrent ischemic events and risk factors in patients with symptomatic intracranial artery stenosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015(14):2608-2613.
- [7] Koenig W, Twardella D, Brenner H, et al. Plasma concentration of Cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than simply a marker of glomerular filtration rate [J]. Clin Chem, 2005(2):321.
- [8] Hasegawa A, Naruse M, Hitoshi S, et al. Regulation of glial development by cystatin C [J]. J Neurochem, 2007(1):12-22.
- [9] Angelidis C, Deftereos S, Giannopoulos G, et al. Cystatin C: an emerging biomarker in cardiovascular disease [J]. Curr Top Med Chem, 2013(2):164-179.
- [10] Akalin A, Alatas O, Colak O. Relation of plasma homocysteine levels to atherosclerotic vascular disease and inflammation markers in type 2 diabetic patients [J]. Eur J Endocrinol, 2008(1):47-52.
- [11] 张新勇, 文成才, 刘冬梅, 等. 高同型半胱氨酸血症对急性脑梗死患者脑血管的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2014(6):851-853.
- [12] Cui R, Moriyama Y, Koike KA, et al. Serum total homocysteine concentrations and risk of mortality from stroke and coronary heart disease in Japanese: The JACC study [J]. Atherosclerosis, 2008(198):412-418.
- [13] 陈阳, 付建辉, 肖伟忠, 等. 血浆同型半胱氨酸水平与脑梗死患者动脉搏动指数的相关性[J]. 贵阳医学院学报, 2014(2):206-217.
- [14] Liu CY, Chen CQ. Intra-and extracranial atherosclerotic stenosis in China: epidemiology, diagnosis, treatment and risk factors [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014(22):3368-3379.
- [15] Li MN, Li Y, Liu JY. Metabolic syndrome with hyperglycemia and the risk of ischemic stroke [J]. Yonsei Med J, 2013(2):283-287.
- [16] Walter NK, Bruce O, Henry R, et al. Guidelines for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack [J]. Stroke, 2014(45):2160-2236.
- (2015-10-11 收稿, 2015-12-05 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 59 页)

的胸式呼吸, 而表现为腹式呼吸。此时作翻正反射检查, 动物无力将身体翻转, 故翻正反射消失。若呼吸肌严重受累, 致呼吸显著减慢甚至停止, 则机体缺氧而死亡。对死亡小鼠进行解剖, 肉眼未见心、肝、脾、肺、肾、脑等脏器出现明显异常改变。故推测该药的毒性作用主要累及肌肉神经系统。

综上所述, 本研究测定了 3 个批次的科博肽注射液的 LD₅₀, 并根据试验中小鼠的反应情况推测出该药的毒性作用可能主要累及肌肉神经系统, 为眼镜蛇毒神经毒素临床安全用药及进一步研究提供了依据。

4 参考文献

- [1] 罗志冬, 冯莹莹. 科博肽含量测定方法研究[J]. 中国药物评价, 2013(4):207-209.
- [2] 朱天新, 袁彩君, 李晓红. 科博肽与三种药物配伍使用的实验研究[J]. 中国现代应用药学杂志, 2007(5):415-418.
- [3] 王重洋, 颜培钢. 眼镜蛇神经毒素药理作用实验研究进展[J]. 亚太传统医药, 2009:165-167.
- [4] 张金娟, 熊英, 李玮, 等. 了哥王生品及 X 种炮制品的急性毒性比较研究[J]. 中国中药杂志, 2011(9):1172-1174.
- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991:203.
- [6] 姜草. 甲磺酸普立地诺注射液的临床前研究[D]. 西南大学, 2014.
- [7] 周俊峰, 田淑琴. 复方龙瞿提取液的安全性研究[J]. 西南民族大学学报, 2009(5):532-535.
- [8] 沈杰. 卡方检验在调研结果分析中的应用[J]. 科学大众: 科学教育, 2012(8):856-859.
- [9] 黄晓洁, 邢成锋, 魏刚. β-细辛醚对小鼠急性毒性作用的初步研究[J]. 山东医药, 2013(1):26-28.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993:112-113.
- (2015-07-29 收稿, 2015-10-11 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅