

日本鬼 蜚伤与 P 物质和生长抑素的关系 及其粗毒对免疫细胞活性影响^{*}

张克凌 刘晓萍 杜 卫 于业军 孙衍增 王海青 秦士德
(青岛大学医学院 青岛 266021)

提要 1997 年 6 月在山东省日照市岚山头附近海域收集日本鬼 , 采用放射免疫学方法检测了注射毒腺粗提物大鼠局部肌肉组织、血浆、脊髓、延髓、中脑、下丘脑及免疫器官内 P 物质和生长抑素含量变化; 用 MIT 法检测了毒腺粗提物在整体和离体条件下对免疫细胞活性的影响; 用生化方法检测了毒腺组织中透明质酸酶活性。结果表明, 与对照组大鼠相比, 实验组大鼠局部肌肉及延髓、中脑、胸腺和脾脏中 P 物质含量增加, 而下丘脑中 P 物质含量下降。生长抑素在中脑、延髓、脊髓、胸腺中显著增高。毒腺粗提物对胸腺细胞和脾细胞的活性具有显著的抑制作用。提示日本鬼 蜚伤造成局部症状及其伴随的恶心、呕吐、心慌、胸闷等全身症状和继发感染可能与 P 物质和生长抑素含量变化有关。

关键词 日本鬼 粗毒 P 物质 生长抑素 淋巴细胞 透明质酸酶

学科分类号 R595.8

日本鬼 属于毒 科棘毒鱼, 在我国沿海广泛分布, 其背鳍中含有毒腺组织(刘晓萍等, 1999), 被该毒鳍棘蜚伤是渔业工作者尤其是渔民中常见的职业病。被蜚伤者不仅局部组织明显肿胀, 剧烈疼痛, 其疼痛的剧烈程度远远超过局部损伤的程度, 会出现肢体麻痹, 而且伴有恶心、呕吐、心慌、胸闷甚至休克等全身症状, 并极易发生继发感染(张克凌等, 1999), 但其致病的机理尚不清楚。P 物质(Substance P, SP) 和生长抑素(Somatostatin, SS) 是体内重要的调节性多肽, 又是伤害感受中重要的神经递质, 并且对免疫功能具有调节作用。透明质酸酶(Hyaluronidase, HAase) 具有溶解组织透明质酸并促进毒素扩散作用。本文研究被蜚伤大鼠体内 SP 和 SS 含量与蜚伤的关系及毒腺提取物对免疫细胞活性的影响, 并测定了毒腺组织内透明质酸酶的活力, 以期对蜚伤的治疗提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本鬼 (*Inimicus japonicus*) 于 1997 年 6 月在山东省日照市岚山头附近海域收集, 立即置于新鲜的海水中运回青岛。在实验室用海水暂养 1d 后, 迅速剪下毒鱼的背鳍棘并立即置入预冷的 4℃ 平皿中, 去掉皮肤, 将分离出的毒腺组织在冰浴环境中匀浆。将匀浆液离心(7000r/min, 4℃, 30min), 取上清液冷冻抽干, 在 -30℃ 保存一周。检测前用生理盐

^{*} 国家自然科学基金资助项目, 39270645 号。张克凌, 女, 出生于 1957 年 12 月, 副教授, Fax: 0086- 0532- 3801449
收稿日期: 1999- 08- 25, 收修改稿日期: 1999- 12- 28

水溶解,使其浓度为100mg/ml。

选取20只2—2.5月龄的健康雄性Wistar大鼠(购自山东医科大学实验动物中心),随机分为实验组和对照组。实验组大鼠右后肢脱毛后肌肉注射毒腺粗提物0.3ml;对照组大鼠右后肢脱毛后肌肉注射生理盐水0.3ml。20min后,将动物快速断头取血、局部组织及脊髓(L1—5),按脑区自然界线分离出丘脑、下丘脑、中脑和延髓。待以放射免疫分析法测定其SP和SS含量。取出胸腺和脾脏,检测毒腺粗提物对免疫功能的影响。

实验用RPMI1640营养液、十六烷基溴化三甲基铵由Sigma公司提供;杆菌肽由丽宝生物化学制药厂提供;噻唑兰(MTT)由Fluka BioChemika公司提供;溶菌酶(Lysozymun)、醋酸洗必肽(Hibitone)、小牛血清和透明质酸由海泰公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 P物质(SP)和生长抑素(SS)含量测定

(1) 血样的采集和处理 取抗凝血,置含300 μ g杆菌肽的预冷试管中,经离心和用丙酮与石油醚处理后,冷冻抽干, -20 $^{\circ}$ C冰箱保存、待测。

(2) 组织标本的采集处理 迅速取下组织,立即置于正沸的生理盐水中灭活蛋白酶,称重,加1ml 0.1mol/L的HCl匀浆,加0.4ml PELH缓冲液(0.1mol/L, pH=7.5的磷酸缓冲液中含EDTA二钠盐0.03mol/L、溶菌酶0.1%、醋酸洗必肽0.002%)和0.6ml综合液(0.5mol/L, pH=7.4的磷酸缓冲液与1mol/L NaOH溶液以7:3体积比混合)(陈家津等,1985),离心(4500r/min, 4 $^{\circ}$ C, 30min),取上清液待测。

(3) 放射免疫分析 由海科锐生物检测中心协助测定。

1.2.2 免疫细胞的活性检测

将实验组和对照组大鼠断头处死后,无菌操作取出脾脏和胸腺,按常规制成脾细胞和胸腺细胞悬液。用台盼蓝检查细胞活性>95%,计数、并用RPMI-1640(含10%的小牛血清)调整细胞至 10^7 个/ml(终浓度)。分别置于24孔板中,每孔1ml,每组6个孔,置含5%CO₂的37 $^{\circ}$ C恒温箱中孵育1h,然后加入噻唑兰(MTT)溶液100 μ l,继续孵育4h。终止培养,离心收集细胞后,每孔加入二甲亚砜200 μ l,振荡10min。选490nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。

另取对照组大鼠的胸腺和脾细胞,置24孔板中,分2组。A组:RPMI-1640组(细胞悬液中仅有RPMI-1640,作为对照);B组:毒腺粗提物组,细胞悬液中加毒腺粗提物,使其终浓度分别为10%、5%、1%。置含5%CO₂的37 $^{\circ}$ C恒温箱中孵育2h后,同上方法记录结果。

1.2.3 HAase活力的测定

(1) HAase活力测定 基本按Ferrante比浊法(Ferrante, 1956)测定。反应总体积1ml,其中底物0.4ml(1ml 0.2mol/L pH=5.0乙酸钠缓冲液中含乙酸500 μ g), 0.2mol/L pH=5.0乙酸钠缓冲液(内含0.15mol/L NaCl) 0.55ml。37 $^{\circ}$ C预温20min后加入酶液50 μ l,在37 $^{\circ}$ C反应15min,立即加入4ml预热的内含2.5%十六烷基溴化三甲基铵的2%NaOH液,30min后,在400nm比浊。以200 μ g底物形成的浊度被降低50%所需的酶量为1个活力单位。

(2) 蛋白浓度的测定 按Lowry等(1951)方法,以牛血清白蛋白为标准。

1.2.4 统计学处理

数据的统计学处理根据两组数据的方差齐性检验结果选择 t 或 t' 检验。

2 结果

2.1 毒腺粗提物注射对大鼠组织 P 物质和生长抑素含量的影响

将实验组与对照组相比,可见注射日本鬼 毒腺粗提物的大鼠局部组织迅速肿胀、肢体麻痹、全身颤抖、呼吸急促和大小便失禁等症状。注射 20min 后,放免检测结果可见局部肌组织、延髓、中脑、下丘脑、胸腺和脾脏中 SP 的含量显著增加 ($P < 0.05$); 脊髓(L1-5)、延髓、中脑和胸腺内 SS 的含量显著增加 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 毒腺粗提物注射对大鼠组织 P 物质和生长抑素含量 (pg/ml or pg/mg) 的影响

Tab.1 Effects of venom injection on the contents (pg/ml or pg/mg) of SP and SS in some tissues of rat

项目	P 物质		生长抑素	
	实验组	对照组	实验组	对照组
血浆	110.96 ± 11.82	97.08 ± 33.76	39.17 ± 7.27	41.26 ± 5.64
肌肉	1.23 ± 0.32*	0.79 ± 0.25	0.28 ± 0.10	0.24 ± 0.08
脊髓	63.73 ± 27.23	70.13 ± 24.86	3.59 ± 1.37**	1.58 ± 0.61
延髓	160.33 ± 74.44**	70.63 ± 24.86	6.99 ± 1.12*	3.65 ± 1.75
中脑	173.8 ± 58.72**	97.79 ± 33.43	12.15 ± 5.27*	6.88 ± 4.64
丘脑	79.75 ± 37.14	24.42 ± 50.03	6.83 ± 3.18	6.75 ± 4.60
下丘脑	79.25 ± 50.64**	283.2 ± 64.58	15.37 ± 7.85	14.96 ± 3.85
淋巴结	97.63 ± 10.25**	47.21 ± 2.32	19.86 ± 5.27	19.42 ± 3.31
胸腺	0.57 ± 0.04*	0.36 ± 0.05	0.29 ± 0.04*	0.15 ± 0.02

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 10$

2.2 毒腺粗提物对淋巴细胞活性的影响

与对照组相比,实验组大鼠胸腺细胞和脾细胞的活性显著降低 ($P < 0.05$); 体外毒腺提取物孵育可显著抑制淋巴细胞的活性,且当毒腺粗提物的浓度逐渐增大时,对淋巴细胞的抑制作用逐渐增强(表 2、表 3)。

表 2 毒腺粗提物注射对大鼠淋巴细胞活性的影响

Tab.2 The effects of crude venom on the activities of rat's lymphocytes

组 别	胸 腺	脾
对照组	0.359 ± 0.013	0.498 ± 0.006
实验组	0.198 ± 0.009**	0.306 ± 0.009**

** $P < 0.01$, $n = 10$

表 3 毒腺粗提物体外孵育对大鼠淋巴细胞活性的影响

Tab.3 The effects of crude venom in vitro on the activities of lymphocytes

细胞名称	RPMI-1640 组	毒腺粗提物组		
		1%	5%	10%
胸腺细胞	0.359 ± 0.013	0.263 ± 0.054*	0.178 ± 0.010**	0.167 ± 0.004**
脾细胞	0.498 ± 0.006	0.250 ± 0.014**	0.189 ± 0.005**	0.181 ± 0.003**

注:与 RPMI-1640 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

2.3 日本鬼 毒腺粗提物中透明质酸酶(HAase)活力测定结果

日本鬼 毒腺粗提物中蛋白总量为 22.8mg, 单位质量蛋白 HAase 的活力为 120.00U/mg, 总活力为 2736.00U。

3 讨论

SP 属于激肽类活性物质, 是感受伤害性刺激的初级感觉神经元的重要神经递质, SP 可优先与神经激肽 1(Neurokinin-1, NK-1) 受体结合。Hopkins 在研究毒 科棘毒鱼 *S. trachynis* 毒液对平滑肌的影响时, 发现 NK 受体拮抗剂(CP96345) 可显著抑制回肠平滑肌对 *S. trachynis* 毒 毒液的反应, 说明该毒液对 NK-1 受体有影响, 提示毒液可能通过内源性 SP 的释放而发挥作用(Hopkins *et al*, 1996)。SP 还有促进肥大细胞释放组织胺和白三烯的作用; 另一方面这些炎症介质又可刺激 SP 的释放, 进一步增强毛细血管的通透性(张万会等, 1992)。本研究发现, 在毒腺粗提物注射区域的肌组织内 SP 的含量显著增高, 而 SS 含量无显著改变, 因此认为日本鬼 蜚伤后造成的局部肿、痛与 SP 代谢密切相关。而毒腺组织内是否含有 SP 尚待进一步探讨。脊髓后角、延髓后角和中脑导水管周围灰质是疼痛信息传递、调节的驿站, 其内含有 SP 等多种神经活性物质, 大部分可能与伤害性刺激传入的调节有关。其中 SP 已被公认为传递痛觉的兴奋性递质。有研究表明, 当机体受到伤害性刺激时, 这些部位的 SP 免疫反应活性显著增强, 提示外周伤害性刺激可能经 SP 能纤维传到延髓内, 又将信息传至中枢神经系统的其它部位(Jin *et al*, 1994)。本实验发现, 当注射毒腺粗提物时, 不仅局部组织的 SP 含量显著增加, 而且延髓及中脑内的 SP 含量也显著增加, 提示日本鬼 蜚伤造成局部的剧烈疼痛一方面与局部组织内的 SP 作用有关; 另一方面, 毒液的作用可能使到达延髓和中脑的一级传入纤维终末释放 SP, 同时也引起该区域内部神经元 SP 的释放从而产生与局部损伤不相适合的剧痛。脊髓在处理和调节伤害性感受的输入中非常重要, 而本研究发现 SP 的含量在脊髓腰 1—5 区域(L1—5) 并无显著增强。

脊髓伤害性感受不仅可通过 SP 免疫反应阳性神经元向上行传递至延髓或中脑导水管周围灰质; 同时脊髓伤害性感受又受到延髓和中脑的下行抑制作用的调节。SS 是一种具有广泛抑制作用的调节性肽。有研究表明, 在脊髓水平 SS 具有提高痛阈和镇痛的作用(Rawal, 1995)。静脉注射 SS 可以逆性抑制腰脊髓背角核的有害性热激发的反应; 而脑内微注射 SS 入延髓或导水管周围灰质, 可抑制该区域接受脊髓后角对有害性热激发反应(Helmchen *et al*, 1995)。日本鬼 毒腺粗提物局部注射后这些区域 SS 含量增高, 说明该伤害不仅造成局部及中枢作为感受伤害性刺激的递质或调质 SP 的含量增加, 加强痛的传导; 而且也促使中枢神经系统的中脑、延髓及脊髓中的镇痛物质 SS 的合成和释放。在脊髓水平, SP 的含量并无显著改变, 可能是一种代偿性调节的结果。延髓又是心血管中枢所在, 在此部位注射 SS 有使血压下降的作用(Koda, 1985)。日本鬼 蜚伤后可以造成病人心慌或休克等症状, 其原因可能与延髓内的 SS 含量增高有关。

在整体条件下, 被毒棘蜚伤极易造成局部组织继发感染, 说明毒腺对免疫功能有影响。SP 和 SS 均对免疫功能产生调节作用, 有研究认为 SS 具有抑制作用, 而 SP 则有双向调节作用(刘晓萍等, 1992)。本研究发现, 与对照组相比, 实验组大鼠胸腺和脾细胞活性降低, SS 含量增高, SP 无显著变化, 提示毒棘蜚伤后继发感染可能通过 SS 抑制免疫细胞

的活性、降低机体免疫力而引起。另一方面,在离体的条件下,毒腺粗提物对免疫细胞的活性具有抑制作用,随毒腺粗提物的浓度增加,这种抑制作用显著增强,提示毒液可能通过直接和间接的作用抑制免疫功能。本研究采用生化方法检测到毒腺提取物内含有一定量的透明质酸酶,说明蜇伤造成的局部组织明显肿胀与被蜇伤组织的分子筛被破坏、加速毒素扩散有关。

下丘脑是重要的内分泌调节器官,与脑垂体有密切的联系,可调节垂体的分泌活动,而垂体又通过释放激素调节其它内分泌器官的功能。其内 SP 含量显著下降,提示毒液一方面通过局部损伤,另一方面通过影响机体的神经-内分泌-免疫活动而发挥作用,可对人体造成广泛的损伤。

参 考 文 献

- 刘晓萍,吴景兰,于业军,1992. 电针效应及 P 物质、5-HT 体外孵育对后者淋巴细胞相应受体的影响. 青岛医学院学报, 28(3): 223—226
- 刘晓萍,于业军,张克凌,1999. 中国沿海常见棘毒鱼的毒性研究——日本鬼背鳍棘中的毒腺结构. 海洋与湖沼, 30(6): 597—603
- 张克凌,刘晓萍,于业军,1999. 中国沿海常见棘毒鱼的毒性研究——日本鬼蜇伤的调查研究. 海洋环境科学, 18(4): 19—23
- 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—121
- 陈家津,崔瑞耀,祝元祥等,1985. 神经降压素的放射免疫测定. 青岛医学院学报, 21: 1—5
- Ferrante N D, 1956. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. J Biol Chem, 220: 303—306
- Helmchen C, Fu Q G, Sandkuhler J, 1995. Inhibition of spinal nociceptive neurons by microinjections of somatostatin into the nucleus raphe magnus and the midbrain periaqueductal gray of the anesthetized cat. Neurosci Lett, 187(2): 137—41
- Hopkins B J, Hodgson W C, Sutherland S K, 1996. Evidence for adrenergic and tachykinin activity in venom of the stonefish (*Syngnaja trachynis*). Toxicon, 34(5): 541—544
- Jin G R, Rao Z R, Shi J W, 1994. Visceral noxious stimulation induced expression of FOS protein in medullary catecholaminergic neurons projecting to nucleus accumbens in the rat: a study with triple labeling method of HRP tracing combined with FOS and TH immunohistochemistry. Brain Res, 648(2): 196—200
- Koda L Y, 1985. Blood pressure following microinjection of somatostatin related peptides into the rat nucleus tractus solitarius. Eur J Pharmacol, 113: 25—28
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265—275
- Rawal N, 1995. Spinal antinociception: clinical aspects. Ann Med, 27(2): 263—268

EFFECT OF INJURY STUNG BY STONEFISH (*INIMICUS JAPONICUS*) ON THE CONTENTS OF SUBSTANCE P AND SOMATOSTATIN AND ACTIVITY OF LYMPHOCYTES IN RATS

ZHANG Ke-ling, LIU Xiao-ping, DU Wei, YU Ye-jun,
SUN Yan-zeng, WANG Hai-qing, QIN Shi-de
(Medical College of Qingdao University, Qingdao, 266021)

Abstract The injury stung by stonefish *Inimicus japonicus* is an professional disease for fishermen, which cause intense pain, swelling, severe infection around the wound, accompanying some systemic symptoms. In order to identify the mechanism of the damage, the contents of SP and SS in the wounded tissue, plasma, spinal cord(L1—5), medulla oblongata, midbrain, hypothalamus and immune organs of rats and the activity of lymphocytes were detected. The activity of hyaluronidase in crude venom was determined. Compared to that in control group rats, the content of SP in the rats with injection of crude venom increases in muscle, medullary bulb, midbrain, thymus and spleen, but decreases in hypothalamus. The content of SS is enhanced in spinal cord, medullary bulb, midbrain and thymus. The crude venom could inhibit the activities of lymphocytes in vitro and in vivo. The results suggest that the local symptoms caused by *Inimicus japonicus* may be mediated by SP and the systemic signs may be related to the changes of SP and SS.

Key words Stonefish (*Inimicus Japonicus*) Crude venom Substance P (SP) Somatostatin (SS) Lymphocyte Hyaluronidase

Subject classification number R595.8