

眼鏡蛇毒對大白鼠血流力學之直接效應

王夕堯 吳京一*

國立臺灣師範大學生物學系

摘 要

本研究主要觀察眼鏡蛇毒對大白鼠循環系統之流體力學上的效應。給蛇毒後在多用途記錄儀上同時記錄心搏量、平均血液流量、脈波血流量、心跳速率、以及心縮壓、心舒壓。在離體實驗(*in vitro*)中，記錄心肌活動電位、及心縮機械張力之消長。實驗結果在文中給與詳細討論。

關鍵詞：眼鏡蛇毒、血流力學

緒 言

眼鏡蛇(*Naja naja atra* (Cantor))是臺灣地區常見毒蛇之一，其分泌的眼鏡蛇毒(cobra venom)含有心臟毒素(cardiotoxin, CTX)與神經毒素(neurotoxin, NTX)(Lee, 1969)。

CTX 是一種鹼性多 Ca^{2+} ，使膜上 Ca^{2+} 釋出引起肌肉收縮(Lin-Shiau *et al.*, 1976; Lin-Shiau and Fu, 1983; Wu, *et al.*, 1982)，具有細胞膜賦活性，能引起細胞膜發生不可逆性的去極化(Wu, *et al.*, 1982)。

Phospholipase A_2 (PLA $_2$)是從 NTX 純化得的神經毒素，能抑制 phosphorylation、腸系膜與骨骼肌肉血管收縮、也可使神經肌肉傳導受阻(Ho and Lee, 1981; Lee and Ho, 1982; Ueno and Rosenberg, 1996; Wilson and Nicholson, 1997)。

由靜脈注入 CTX，它會聚集血小板(Huang and Kwan, 1996a)，對循環系統的效應為：能刺激心臟引起心跳增加，隨後心跳速率減慢至心跳停止、週邊血管阻力上升、

肺循環系統及體動脈血壓升高、心電圖發生異常如：P-R 期延長(prolonged P-R interval)，QRS 波變大、房室傳導阻滯(A-V block)及心室跳動過速(ventricular tachycardia)(Huang *et al.*, 1993)。

在離體(*in vitro*)實驗，CTX 可引起短暫的加強心肌之收縮，但 Ca^{2+} free 液中，CTX 即不能引心肌之收縮(Huang and Kwan, 1996b)。

本研究欲觀察眼鏡蛇毒對流體力學因子的效應，並以細胞內記錄法來研究單一心房細胞內的膜電位，以及測定心房肌之等張性收縮來探討心肌收縮機能變化之原因。

材 料 與 方 法

本實驗所用之眼鏡蛇毒，購自蛇毒藥商所出售的粗製蛇毒蛋白結晶粉末，此蛇毒中應含有 CTX 及 NTX 成份。

* 通信作者(corresponding author): 吳京一(Chin-Yih Wu); FAX: 886-2-29312904; E-mail: Chinyih@ms1.palmary.nct.tw

活體實驗(*in vivo*)

本實驗以 31 隻，生後 7~9 個月，體重 300 ± 30 公克的雌雄大白鼠(Sprague-Dawley)為對象。實驗前 30 分鐘，動物先接受 atropine 1mg/kg 腹腔注射，以預防氣管黏液之分泌而阻塞氣管。繼以腹腔注射 sodium pentobarbital 40mg/kg 使動物麻醉。麻醉後進行氣管插管、頸動脈插管及股靜脈插管等手術。氣管插管接上人工呼吸儀(3~4mL/kg, 80~90 次/min)以預防隨後將進行的開胸手術所引起的肺葉塌陷(collapse)。切開圍心囊，找出大動脈弓，並清除包住血管的結締組織後，套上血流計(SP 2204, GOULD)之探棒。以浸潤保溫($37 \pm 1^\circ\text{C}$)之生理食鹽水的脫脂棉覆蓋住胸腔創口以防創口乾燥。血流計經由生理放大器接到記錄儀。待血壓穩定後，在多用途記錄儀上同時記錄心搏量(stroke volume, SV)、平均血液流量(mean blood flow, MBF)、脈波流量(pulsatile blood flow, PBF)以及心跳速率(heart rate, HR)，並算出心輸出量(cardiac output, CO)。以導管由頸動脈插管接到血壓轉換器(P50, GOULD)，再經由輸送放大器接到多用途記錄儀以記錄心縮壓(AoP.Sys.)及心舒壓(AoP.Dias.)。導管內注入適量之 heparin(500 I.U./mL)以防血液凝固。

手術後由股靜脈注入蛇毒每體重(公克) $0.4 \sim 0.6 \mu\text{g}$ ($0.4 \sim 0.6 \mu\text{g/g}$)。每一次之注射液量限定為 0.4mL。

離體(*in vitro*)心房電生理實驗

取雌雄大白鼠腹腔注射 sodium pentobarbital 40mg/kg 使麻醉。俟麻醉後，剪開胸腔，迅速剪出心臟，置於冰冷(4°C)且經飽和氧氣的 Tyrode 生理液中。切出含竇房結(S-A node)的整個心房，然後移入維持

在 38°C 的恆溫槽內。

心肌標本槽內 Tyrode 溶液全量為 2mL。以 95% O_2 混合 5% CO_2 氣體充分打氣的 Tyrode 生理液灌流之。灌流速度每分鐘 1.6mL。

(一)心收縮機械張力(systolic mechanical tension, MT)之測定：

心房肌的一端以細鋼絲鉤起後接至張力轉換器及張力放大器後接至多用途記錄儀，記錄心房肌之心縮機械張力(圖一)。

(二)心肌細胞活動電位(action potential of myocardial cell, AP)之測定：

時常以 Tyrode 生理液灌流標本槽內之心房肌，等其心跳穩定後，用微小玻璃電極(尖端電阻為 $30 \sim 40 \text{M}\Omega$)內灌滿 3M KCl 溶液，以有彈性鎢絲($\phi = 0.3\text{mm}$)接上電極，插入心房內，記錄其細胞內之活動電位。儘量確保每次實驗之電極插入位置，如果實驗中電極脫離細胞時，在該處 1mm^2 範圍內重插。細胞所產生的訊號經過微小電極放大儀後，接至示波儀監視，並使用連續照相記錄裝置照相。計算 AP 高度、 PD_{50} 、 PD_{75} 、 PD_{90} (duration of potential, 即指基線到心活動電位 O phase 之頂點所需要時間的 50%、75% 及 90% 之維持時間; Hoffman and Suckling, 1952)做資料數據。

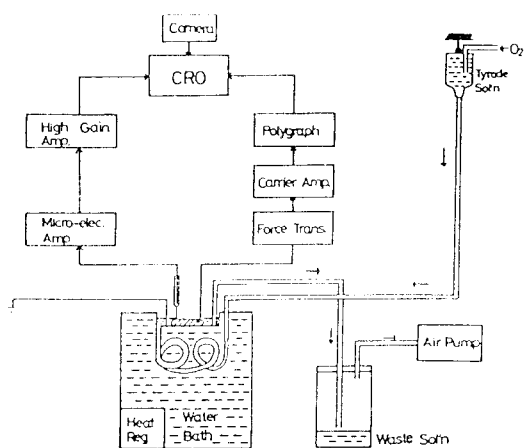
在無灌流之狀態下給予蛇毒。以注射筒吸取實驗所需之蛇毒量(總量為 0.2mL)，在 5 秒之內點滴給予於標本槽內。實驗所用之蛇毒濃度即指在標本槽內 Tyrode 生理液中所含之蛇毒濃度。俟心房標本受藥物處理發生效應，再經兩分鐘之後，以 Tyrode 生理液灌流洗濯，觀察並記錄恢復情形。

所有數據都以平均值 \pm 標準誤差 (Mean \pm SE) 表示，用變方法分析(analysis of variance)檢驗其對照組差異的顯著性。

結果

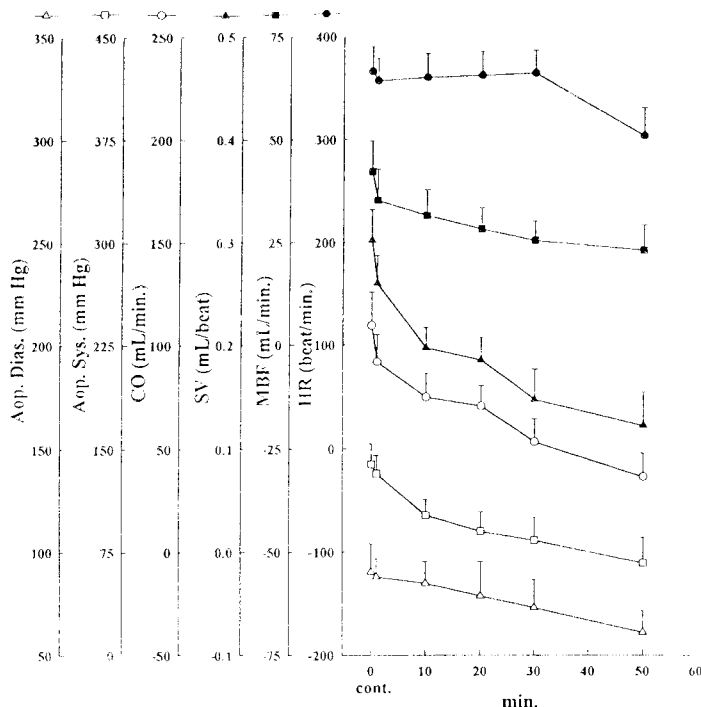
活體實驗

若不給予蛇毒時，在三小時內其 MBF、SV、CO、AoP 都能維持恒定狀態；即 MBF： $42.2 \pm 7.5 \text{ mL/min}$ ，SV： $0.302 \pm 0.03 \text{ mL/beat}$ ，CO： $109.4 \pm 16.3 \text{ mL/min}$ ，HR： $366 \pm 24 \text{ beat/min}$ ，AoP.Sys./AoP.Dias： $138.8 \pm 14.8/90.4 \pm 13.6 \text{ mmHg}$ (圖二)。若經靜脈給予蛇毒 ($0.4 \mu\text{g/g}$)；即 MBF 漸減，在 20 分鐘以後顯著減少 ($P < 0.05$)，SV 亦漸減，在 10 分鐘內顯著減少 ($P < 0.05$)，30 分鐘以後極顯著減少 ($P < 0.01$)。AoP.Sys. 漸降低，至 20 分鐘以後顯著降低 ($P < 0.05$)，50 分鐘以後極顯著降低 ($P < 0.01$)；AoP.Dias. 則在第 50 分鐘以後才顯著降低 ($P < 0.05$) (圖二) ($n=13$)。給蛇毒經平均



圖一、離體心房實驗裝置。Camera：照像裝置，CRO：示波儀，High Gain Amp.：高感度放大器，Micro-Elec. Amp.：微小電極放大器，Polygraph：多用途記錄儀，Carrier Amp：輸送放大器，Force trans.：張力轉換器，Water Bath：水浴，Heat Reg.：溫度調節器，Tyrode sol'n：Tyrode 液，Pump：吸唧筒，Waste sol'n：廢液

Figure 1. Experimental apparatus.



圖二、眼鏡蛇毒 ($0.4 \mu\text{g/g}$) 對心搏量 (SV)、平均血液流量 (MBF)、心跳速率 (HR)、心輸出量 (CO)、心縮壓 (AoP.Sys.) 及心舒壓 (AoP.Dias.) 之影響

Figure 2. Effects of cobra venom ($0.4 \mu\text{g/g}$) on SV, MBF, HR, CO, AoP.Sys. and AoP.Dias. SV: stroke volume (\blacktriangle), MBF: mean blood flow (\blacksquare), HR: heart rate (\bullet), CO: cardiac output (\circ), AoP.Sys.: systolic pressure (\square), AoP.Dias.: diastolic pressure (\triangle).

表一、眼鏡蛇毒對離體心房細胞之影響

Table 1. Effects of Cobra venom (1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on Action potential (AP), Resting potential (RP), and Duration of action potential (PD) of isolated atrium myocardial cell of rat.

	Control	After treatment (min)				After washing (min)		
		2	6	11	50	80	85	88
AP(mv)	116 \pm 12	98 \pm 4	63 \pm 3	66 \pm 3	83 \pm 4	126 \pm 7	125 \pm 9	121 \pm 8
RP(mv)	84 \pm 6	74 \pm 5	64 \pm 3	49 \pm 3	76 \pm 4	81 \pm 3	78 \pm 3	80 \pm 3
PD ₅₀ (ms)	10 \pm 3	9 \pm 3	9 \pm 2	9 \pm 2	16 \pm 3	12 \pm 4	14 \pm 4	15 \pm 2
PD ₇₅ (ms)	50 \pm 3	33 \pm 3	30 \pm 3	22 \pm 3	52 \pm 3	40 \pm 4	38 \pm 4	40 \pm 2
PD ₉₀ (ms)	93 \pm 4	75 \pm 2	58 \pm 3	55 \pm 3	93 \pm 3	80 \pm 7	85 \pm 4	90 \pm 3

78~80 分鐘，血壓卻消失、心跳停止。如果注射蛇毒 0.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，毒性作用較快發生，平均 30 \pm 18 分鐘心跳即停止(n=5)。

離體心房肌實驗

離體心房置放在僅用 Tyrode 溶液灌流之標本槽內，靜俟心跳穩定後，插入微小電極，至出現正常細胞活動電位能維持 5 分鐘後才開始做實驗。不做任何處理時，在 2 小時內能維持 AP: 116 \pm 12mv，靜止膜電位 (resting potential, RP): 84 \pm 6 mv，PD₅₀: 10 \pm 3ms，PD₇₅: 50 \pm 3ms，PD₉₀: 93 \pm 4ms，HR: 140 \pm 26/min 及收縮張力 (Mechanical tension, MT): 163 \pm 21mg 都不會改變(表一、圖四)。

在標本槽內之蛇毒濃度為 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，AP、RP 均有降低。AP 在第 11 分鐘下降為處理前的 57 \pm 3%。兩分鐘內以 Tyrode 生理溶液灌流洗濯標本槽後，AP 逐漸恢復，至第 50 分鐘後已恢復為處理前的 72 \pm 4%，至第 80 分鐘以後恢復為處理前之水準(圖三)。RP 在處理後至第 11 分鐘也降低為處理前的 58 \pm 4%，俟心房停止收縮 2 分鐘內，若以 Tyrode 生理液迅速換洗，RP 即逐漸恢復，至第 50 分鐘即恢復至處理前的 90 \pm 5%，在第 80 分鐘恢復至處理前之 96 \pm 3%(圖三)。PD₅₀ 在眼鏡蛇毒處理後略有減少，處

理後第 11 分鐘 PD₇₅ 已減少為處理前之 44 \pm 4%，俟心房停止收縮 2 分鐘後，以 Tyrode 生理溶液迅速換洗，第 50 分鐘恢復至處理前之水準，其後略減至 80 \pm 3%。PD₉₀ 在處理後 11 分鐘，減為處理前之 59 \pm 3%，洗後 88 分鐘即恢復為處理前之 97 \pm 2%(表一)。

在處理後第 12 分鐘，MT 先漸增為處理前之 260 \pm 12%，然後即時下降，在第 20 分鐘，回降為處理前之 150 \pm 11%；但 HR 在處理後逐漸變慢。至第 12 分鐘即減為處理前之 11 \pm 3%，但至第 20 分鐘時，回升為處理前之 40 \pm 4%。(n=12)(圖四)。

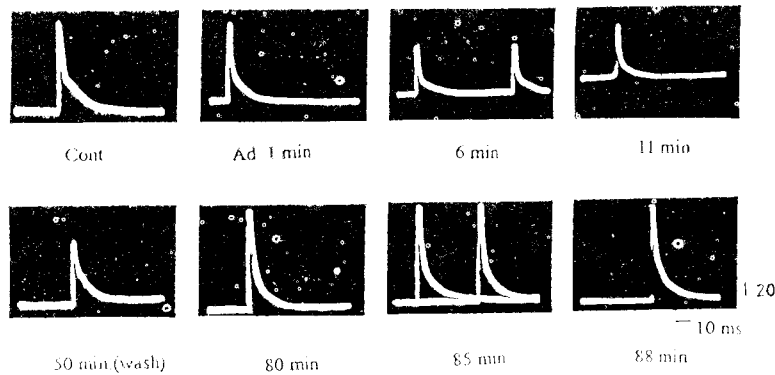
討 論

為減少動物年齡差異，本實驗採年齡為生後 7~9 個月，體重 300 \pm 30 公克之大白鼠為對象(Toda, 1980)。用胞內記錄法記錄 AP，而且每次之實驗以心房同一部位為對象。如果電極脫離細胞時，只有在周圍 1mm² 處重插並找到相似 AP 後再開始做實驗(Nilius and Boldt, 1980)。Tyrode 液之溫度、pH 值和離子濃度均維持不變，使實驗誤差減至最小(Lin and Huang, 1981; Nilius and Boldt, 1980)。

一般認為直接影響心跳的因子有四：即

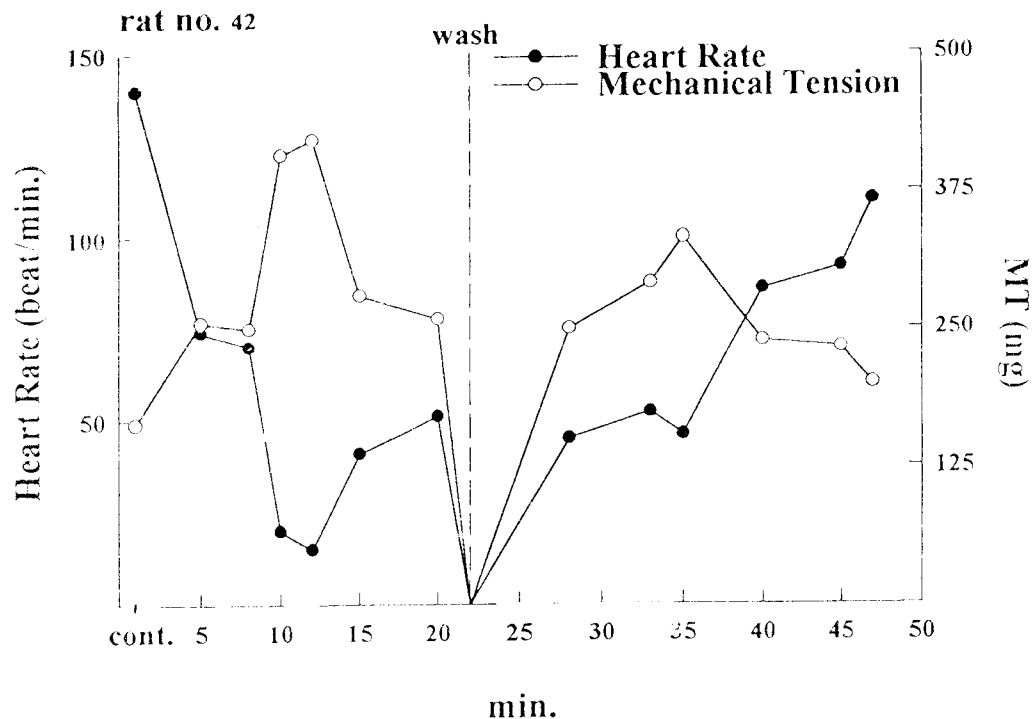
前負載(pre-load)、後負載(after-load)、心跳速率(heart rate)及心肌收縮性(myocardial contractility)。前兩者與心臟血管系統特性有關,後兩者與心臟本身組織特性有關(Guyton,

1989)。余曾以色素稀釋法研究眼鏡蛇毒對狗體循環的影響,認為眼鏡蛇毒引起低血壓的主要原因為心臟血管系統之直接作用(余, 1977),但其詳細機制則未做研究。



圖三、眼鏡蛇毒(1.2 μ g/mL)對離體心房肌細胞活動電位之影響。rat No. 40, Cont: 未處理(對照), Ad: 給蛇毒後, Wash: 灌流洗濯後

Figure 3. Effects of cobra venom (1.2 μ g/mL) on action potential of isolated atrial cardiac muscle.



圖四、眼鏡蛇毒對離體心房肌心跳速率(heart rate)、收縮機械張力(mechanical tension)之影響及以 Tyrode 生理液灌流洗濯後其恢復之情形。左縱軸:心跳速率;右縱軸:收縮機械張力; wash: 灌流洗濯後

Figure 4. Effects of cobra venom on heart rate and mechanical tension of isolated atrial myocardial cell and its recovery after washing with Tyrode solution.

本實驗由活體試驗得知眼鏡蛇毒處理後，引起 MBF、AoP.Sys.、AoP.Dias，以及 SV 與 CO 均極顯著減少。因此其 AoP.Sys. 與 AoP.Dias. 之下降是受血管擴張的影響，而 SV 與 CO 極顯著減少也是因蛇毒直接作用在心肌細胞上，使心臟收縮功能受損(Wang *et al.*, 1997)；這也由離體心房之 AP 減小而獲得證實。不同濃度之眼鏡蛇毒對活體試驗效應，開始時 AoP 等均緩慢下降，經一段時間後驟降。眼鏡蛇毒濃度之高低只表示發生抑制作用時間(onset)之快慢而已。

處理後心肌 AP 之漸低，引起 SV 及 CO 在活體實驗處理後極顯著減少的趨勢。其可能機制為： Na^+ - K^+ -ATPase 主要分布於細胞膜上，司 Ca^{2+} 唧筒之功能，以維持細胞內低 Na^+ 狀況，使細胞產生極化(polarization)以便接受外來刺激(Schwartz *et al.*, 1975)。本實驗心房細胞在處理後 AP 漸小，可能是眼鏡蛇毒之 CTX 與 ATPase 作用產生離子反應(Lin-Shiau and Fu, 1983)，影響 ATP 合成，且相對使 adenosine 增加；依 Jochem and Nawrath (1983)實驗證明，adenosine 對 K^+ 傳導性有賦活作用，可引起心房活動電位及收縮張力變小。眼鏡蛇毒處理， Na^+ 無法快速進入細胞內，使心房細胞 AP 振幅降低。此外，心肌上 Ca^{2+} 的運輸機制(electrogenic Ca^{2+} transport)是產生於去極化活動電位之第二相(phase 2 of action potential)，即心肌 sarcolemma 上的 Ca^{2+} 離子道開啓， Ca^{2+} 通過進入細胞內，維持 AP 穩定狀態(Kate, 1977)。本實驗心房在蛇毒處理後 PD_{50} ， PD_{75} ， PD_{90} 均有減少的趨勢，可能是細胞膜受蛇毒作用，使 Ca^{2+} 離子道不能正常開啓，使 Ca^{2+} 無法進入心房細胞，致 AP 無法維持穩定，使其 PD 變小。唯清洗後 AP 逐漸恢復至略低於處理前水平準，表示眼鏡蛇毒的作用步

驟是可逆性的。

Winegrad 等(1983)實驗證明，取自大白鼠心臟的高通透性細胞含有一個 cAMP-dependent 系統，能增加 Ca^{2+} 賦活力，也就是能增加收縮蛋白質的最大收縮力。Chen 等(1993)的眼鏡蛇毒在家兔離體實驗中，發現心肌收縮張力大受 Ca^{2+} 之影響，而本離體實驗中，心房在處理後，其每分鐘心跳率漸減，但心肌張力漸增，是開始該濃度眼鏡蛇毒改變心房細胞通透性使 Ca^{2+} 賦活增加而增加收縮力。惟收縮力有一極限(Kate, 1977)，故不在增加，促使心跳代償性略回升，此亦見於活體試驗有相同情形。

在 *in vitro*，蛇毒發生效應時隨膜通透性改變影響膜內外離子平衡，心肌不再收縮、張力完全消失而 AP 減至最低，此時即是 *in vivo* 實驗時之整個心臟受眼鏡蛇毒作用，不能正常收縮而打出血液之狀態，故 SV、CO 極顯著下降。若這時候，經迅速灌洗後，心房恢復自發性跳動、心肌張力亦漸增加，表示此步驟亦是可逆性的，但若給以較高濃度或處理時間較久，則心肌不能恢復收縮。其原因可能係心肌已受損害所致(Wang *et al.*, 1997)。惟其詳細機制，有待以 patch clamp 實驗及電子顯微鏡觀察心肌細胞之構造來做進一步的解釋。

參考文獻

- Chen, K. M., Y. Y. Guan and J. J. Sun. 1993. Effects of direct lytic factors from southern Chinese cobra venom on Ca^{2+} movement in rabbit aorta strip. (Abstract). *Chung-Kuo Yao-Li-Hsueh-Pao, Acta Pharmacologica Sinica*. 14(6): 500--504.

- Guyton, A. G., 1989. Textbook of Medical Physiology. W. B. Saunders Company. Philadelphia, London. Toronto.
- Ho, C. L. and C. Y. Lee, 1981. Cardiovascular effects of phospholipases A_2 purified from various snake venoms. Proc. Nat'l. Sci. Council. ROC. B. 5(2): 181-189.
- Hoffman, B. F. and E. E. Suckling, 1952. Cellular potentials of intact mammalian hearts. *Am. J. Physiol.* 107: 357-362.
- Huang, M. Z., Q. C. Wang and G. F. Liu, 1993. Effects of an acidic phospholipase A_2 purified from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom on the rat heart. (Abstract). *Toxicol.* 31(5): 627-635.
- Huang, S. J. and C. Y. Kwan, 1996a. Cobra venom cardiotoxin induces aggregation of washed rat platelets: dual effects of Ca^{2+} . (Abstract). *Res. Comm. Mol. Pathol. & Pharmacol.* 94(1): 103-110.
- Huang, S. J. and C. Y. Kwan, 1996b. Inhibition by multivalent cations of contraction induced by Chinese cobra venom cardiotoxin in guinea pig papillary muscle. (Abstract). *Life Sciences.* 59(4): 55-60.
- Jochem, G. and H. Nawrath, 1983. Adenosine activates a potassium conductance in Guinea-Pig atrial heart muscle. *Experientia.* 39: 1347-1349.
- Kate, A. M., 1977. Physiology of the heart. pp. 107-118. Raven Press. N. Y.
- Lee, C. Y., 1969. Pharmacological studies of purified toxins from Elapid venoms. *J. Formosan. Med. Assoc.* 68: 556-557.
- Lee, C. Y. and C. L. Ho., 1982. The pharmacology of phospholipases A_2 isolated from snake venoms, with particular reference. *Pharm. and Therap.* Vol.4. from collected Papers of the Inst. Biol. Chem. Academia Sinica. 8: 54-68.
- Lin, E. L. and T. F. Huang., 1981. The effects of the external K^+ pH and hypoxia on the transmembrane potential of normal and ischemic myocardium. Proc. Natl. Sci. Council. B. 5: 106-109.
- Lin-Shiau, S. Y., M. C. Huang and C. Y. Lee, 1976. Mechanism of action of cobra cardiotoxin in the skeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 196: 758-771.
- Lin-Shiau, S. Y. and W. M. Fu, 1983. Effects of cardiotoxin on ATPase activities of the normal and tumor cells. Nat'l. Sci. Council. ROC. 11: 1165-1176.
- Nilius, B. and W. Boldt, 1980. Stretching-induced changes in the action potential of the atrial myocardium. *Acta Biol. Med. Germ.* 39: 255-264.
- Schwartz, A., C. E. Lindemayer and J. C. Allen, 1975. The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27: 3-134.
- Toda, N., 1980. Age-related changes in the transmembrane potential of isolated rabbit sino-atrial nodes and atria. *Cardio. Res.* 14: 58-63.
- Ueno, E. and P. Rosenberg, 1996. Differential effects of snake venom phospholipase A_2 neurotoxin (beta-bungarotoxin) and enzyme (*Naja naja atra*) on protein kinase. *Biochem. Pharmacol.* 52(8): 1287-1293.
- Wang, H. X., S. Y. Lau, S. J. Huang, C. Y.

- Kwan and T. M. Wong, 1997. Cobra venom cardiotoxin induces perturbations of cytosolic calcium homeostasis and hypercontracture in adult rat ventricular myocytes. (Abstract). *J. Mole. & Cell. Cardiol.* 229(10): 2759-2770.
- Wilson, H. I. and G. M. Nicholson, 1997. Presynaptic snake beta-neurotoxins produce tetanic fade and endplate potential run-down during neuromuscular blockade in mouse diaphragm. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv.* (Abstract). *Pharmacol.* 356 (5): 626-634.
- Winegrad, S., G. McClellan, M. Tucker and L. Lin, 1983. Cyclic AMP regulation of myosin isozymes in mammalian cardiac muscle. *J. Gen. Physiol.* 81: 749-765.
- Wu, S. H., M. J. Tseng and K. T. Wang, 1982. Separation of four cardiotoxins of Taiwan cobra (*Naja naja atra*) by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 242: 369-373.
- Yu, Y. C. 1977. Hemodynamic study of effect of the cobra venom on the circulation in the dog by the dye dilution method. *J. Taipei Med. College* 7: 43-50.
- Winegrad, S., G. McClellan, M. Tucker and L. Lin, 1983. Hemodynamic study of effect of the cobra venom on the circulation in the dog by the dye dilution method. *J. Taipei Med. College* 7: 43-50.

(接受日期：1998.10.16)

Hemo-dynamic Action of Crude Cobra Venom in Rat

Shih-Yau Wang and Chin-Yih Wu*

Department of Biology, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

ABSTRACT

Effects of crude cobra venom on the hemo-dynamic actions in rat were studied. After infusion of venom to intact animal, the change of stroke volume, mean blood flow, pulsatile blood flow, heart rate, and systolic/diastolic blood pressures were recorded simultaneously with polygraph. For *in vitro* experiment, before and after administration of venom, prosperity and decays of action potential and mechanical tension of isolated atrial muscle were observed. Results were discussed in text.

Key words: Cobra venom, Hemo-dynamics