

## 发形霞水母触手提取物对大鼠离体心脏传导系统的影响

蔡滨欣,郭玉峰,张智,肖良,张黎明(第二军医大学海医系防化医学教研室,上海 200433)

**[摘要]** 目的 观察水母触手提取物(TOE)对大鼠离体心脏传导功能的影响,探讨其心脏毒性可能的作用机制。方法 72只SD雄性大鼠随机分为6组( $n=12$ ),利用大鼠离体心脏Langendorff模型,分别给予不同剂量的TOE,观察其对大鼠心脏传导系统的影响。结果 给予TOE后,与空白组比较,心率减慢和心律失常的几率明显增大,并呈现剂量依赖性。结论 TOE对心脏的传导系统具有显著影响,是其心脏毒性的原因之一。

**[关键词]** 水母毒素;离体心脏;传导系统

**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)02-0112-03

## Effects of tentacle-only extract from jellyfish *Cyanea capillata* on the conduction system of isolated rat heart

CA IB in-xin, GUO Yu-feng, ZHANG Zhi, XIAO Liang, ZHANG Li-ming (Department of Chemical Defense Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of tentacle-only extract (TOE) from *Cyanea capillata* on the conduction system of isolated rat heart and investigate the mechanism of its cardiac toxicity. **Methods** Seventy-two Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups ( $n=12$ ), and Langendorff heart perfusion models were established, then different doses of TOE were applied to each group to observe the effects of TOE on the conduction system of the isolated rat hearts. **Results** Compared with the control group, all the doses of TOE induced a significant decrease of heart rate, and the incidence of arrhythmia was significantly increased. Moreover, both the effects were dose-dependent. **Conclusion** The TOE of *C. capillata* induced significant changes of the conduction system of isolated rat heart, which could partly interpret the mechanism of its cardiac toxicity.

**[Key words]** *Cyanea capillata*; tentacle-only extract; isolated rat heart; conduction system HPMC

发形霞水母(*Cyanea capillata*)属刺胞动物门(Coelenterata)钵水母纲(Scyphozoa)旗口水母目(Semaeostomeae)霞水母科(Cyaneidae),系全球广布性大型水母,是我国东南沿海的主要致伤水母。

既往研究发现水母毒素具有心血管、溶血及神经毒性<sup>[1~3]</sup>,而心血管活性是水母毒素最为常见的一种生物学活性<sup>[1]</sup>。本研究利用Langendorff离体心脏模型研究发形霞水母触手提取物(tentacle-only extract, TOE)对离体心脏传导系统的影响,为研究其心脏毒性机制及中毒防治提供基础。

### 1 材料和方法

**1.1 TOE的提取与分离** *C. capillata*样品采自浙江三门湾(集美大学水产学院洪惠馨教授鉴定)。捕捉到水母后迅速剪下触手并于干冰冷冻条件下运回上海,-70℃备用。

取样品入等体积自配海水(NaCl 8 g, MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 5 g, KCl 0.8 g, CaCl<sub>2</sub> 1.033 g,加蒸馏水至1 000 ml),自溶4 d,磁力搅拌器每日搅拌2次,每次30 min,1 000目细胞筛网过滤3次,滤液10 000×g离心3次,每次15 min,弃沉淀,收集上清,用pH=7.35~7.45的改良Krebs-Henseleit(KH)灌注液(mmol/L: NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5,葡萄糖 11.0)透析,每12 h更换一次液体,36 h后15 000×g离心20 min,弃沉淀,收集上清即为TOE,存于-70℃冰箱备用。Bradford法测蛋白浓度。

**1.2 Langendorff灌注模型的建立** 成年Sprague-Dawley(SD)大鼠,雄性,体质量280~320 g,购自上海西普尔必凯实验动物有限公司。离体鼠心模型的建立:将SD大鼠用乌拉坦(1.2 g/kg)和肝素(400 U/kg)混合液腹腔麻醉后,迅速开胸取心,按经典的Langendorff方法,经升主动脉逆行插入灌注管,使其置于主动脉瓣上方,以利冠状动脉灌注。采用改良KH灌注液进行平衡灌注,于灌注前30 min及灌注时将其充以混合气体(95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>),使平衡灌

**[基金项目]** 全军“十一五”专项项目(06Z020),上海市自然科学基金(06ZR14111)。

**[作者简介]** 蔡滨欣(1985-),女,硕士研究生。E-mail: caibinxin@163.com。

**[通讯作者]** 张黎明。E-mail: lzhang1969@yahoo.com.cn。

注的 K-H 液充分达到氧饱和, pH 维持在 7.30 ~ 7.40, 保持灌注温度 37.0 ~ 37.5, 灌注压力为 60 mmHg。将两根悬浮心电图记录电极分别放置于肺动脉圆锥及心尖部引导出心电图。心律失常参考 Johnston 标准<sup>[4]</sup> (离体心脏灌流和心功能分析系统 MPA-2000, 上海奥尔科特生物科技有限公司产品)。平衡灌注 20 min, 待各项心功能参数稳定后, 侧管给予 TOE, 观察 30 min。空白对照组同样平衡灌注 20 min, 待各项心功能参数稳定后, 观察 30 min。

1.3 实验分组 72只 SD大鼠分为 6组 (n=12):

空白对照组: KH 液灌流, 不给 TOE; 0.1 mg TOE; 0.2 mg TOE; 0.3 mg TOE; 0.4 mg TOE; 0.5 mg TOE。

1.4 统计学分析 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 t 检验。各剂量组进行重复测量资料的方差分析, 所有分析过程采用 SAS9.1.3 完成。

2 结果

2.1 TOE对大鼠心率的影响 结果表明, 在观察时间内 TOE可显著减慢大鼠离体心脏的心率, 并从剂量依赖性 (表 1)。

表 1 TOE对大鼠心率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=12, \text{次} / \text{min}$ )

组别	给 TOE前	10 min	20 min	30 min
空白组	289 ±31	272 ±22	277 ±22	282 ±26
TOE组 (mg)				
0.1	216 ±33	201 ±14	212 ±16	214 ±18
0.2	247 ±38	201 ±46	213 ±51	221 ±52
0.3	208 ±28	143 ±31	140 ±24	153 ±15
0.4	253 ±9	147 ±16	155 ±15	151 ±16
0.5	205 ±11	143 ±41	135 ±43	141 ±42

注: 各 TOE剂量组与空白组比较,  $P < 0.05$ ; 各 TOE剂量组之间比较  $P < 0.05$

2.2 TOE的致心律失常作用 空白对照组灌流 K-H 液, 观察记录的 30 min内无心律失常出现。TOE 各剂量组, 在离体心脏稳定 15 min后, 分别侧管给予 0.1~0.5 mg TOE, 结果表明, 各个剂量组在观察时间内均出现不同程度的心律失常 (表 2), 且呈明显剂量依赖性, 其中从 0.2 mg剂量组开始, 单位时间内心律失常发生率较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ , 图 1)。提示 TOE对大鼠离体心脏有致心律失常的作用。当 TOE达到 0.5 mg时, 可诱发三度房室传导阻滞的发生 (图 2)。

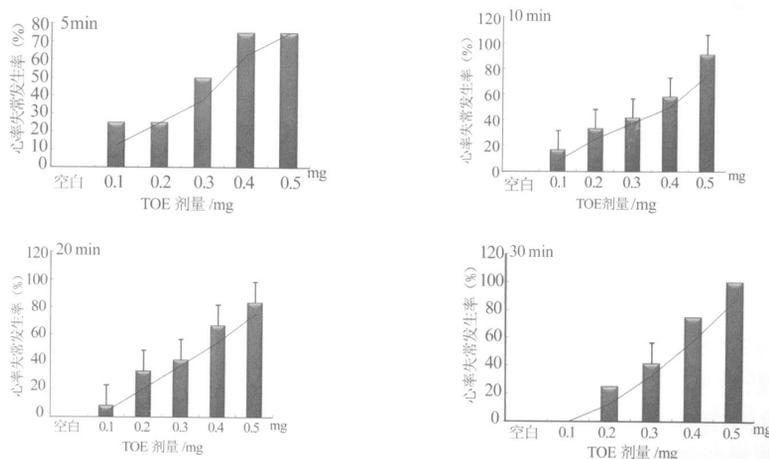


图 1 给予 TOE后不同时间点心律失常发生率与剂量之间的关系  
各剂量组之间比较,  $P < 0.05$

表 2 TOE引发的心律失常现象统计

TOE剂量组 (mg)	5 min	10 min	20 min	30 min
0.1	3 <sup>1)</sup>	2 <sup>1)</sup>	1 <sup>1)</sup>	0
0.2	2 <sup>1)</sup> 、1 <sup>3)</sup>	2 <sup>1)</sup> 、2 <sup>3)</sup>	2 <sup>1)</sup> 、1 <sup>2)</sup> 、1 <sup>3)</sup>	3 <sup>1)</sup>
0.3	4 <sup>1)</sup> 、2 <sup>3)</sup>	3 <sup>1)</sup> 、2 <sup>3)</sup>	3 <sup>1)</sup> 、2 <sup>3)</sup>	3 <sup>1)</sup> 、2 <sup>3)</sup>
0.4	6 <sup>1)</sup> 、3 <sup>3)</sup>	4 <sup>1)</sup> 、3 <sup>3)</sup>	5 <sup>1)</sup> 、3 <sup>3)</sup>	5 <sup>1)</sup> 、1 <sup>2)</sup> 、3 <sup>3)</sup>
0.5	4 <sup>1)</sup> 、3 <sup>3)</sup> 、2 <sup>4)</sup>	4 <sup>3)</sup> 、7 <sup>4)</sup>	2 <sup>1)</sup> 、8 <sup>4)</sup>	12 <sup>4)</sup>

注: 1) 二联律, 2) 三联律, 3) 房性期前收缩, 4) 三度房室传导阻滞, 0表示无心律失常现象。与表注相对应的数字为观察样本中该时间点出现该心律失常现象的例数。

(下转第 125页)

使用时会造成眼部刺激,因此我们在处方中加入了羟丙甲基纤维素作为增稠剂,与胶凝剂卡波普共同作为主要基质,通过考察不同浓度的配比,得到了优选处方。本文研制的盐酸左氧氟沙星即型凝胶,以液体形式滴入眼部后,在眼部 pH 环境作用下,在眼部给药部位发生相变形成凝胶,延长药物在结膜囊滞留时间,提高药物在眼内生物利用度,使药效得到更充分的发挥。

### 【参考文献】

[收稿日期] 2010-01-04

[修回日期] 2010-03-15

[1] 陈 樱,甘晓萍.左氧氟沙星治疗细菌性角膜炎的疗效[J].

中国医药杂志,2001,10(3):216

- [2] Wilson CG, Zhu YP, Frier M, *et al* Ocular contact time of a carbomer gel (Gel Tears) in humans [J]. *Br J Ophthalmol*, 1998, 82(10): 1131.
- [3] Yoshiki O, Murat D, Kazuo T, *et al* Laboratory findings in tear fluid analysis [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 369(1): 17.
- [4] 宁黎丽. 眼用即型凝胶特点及研发过程中需关注的问题 [J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(13): 988.
- [5] 郑俊民. *药用辅料手册* [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 107.

(上接第 113页)



图 2 给予 TOE 0.5 mg 后典型心电图变化, 示三度房室传导阻滞

### 3 讨论

水母毒素属多肽类毒素,相对分子质量 10 ~ 600 kDa,其生物活性广泛,具有溶血毒性、心血管毒性、神经肌肉毒性、皮肤毒性以及抗氧化和杀虫活性等<sup>[5]</sup>。由于水母毒素的疏水性和热不稳定性,且易黏附、易分解<sup>[5]</sup>,阻碍了对其分离纯化和生物活性的研究,使其研究进展明显滞后于蛇毒和蝎毒等其他常见生物毒素。1998年, Bloom 等<sup>[6]</sup>建立了新的刺丝囊毒素提取方法,使得毒素活性的保持大为改善,水母毒素的研究报道才逐渐增多,其中心血管活性尤为受到关注。

本课题组前期在整体动物实验中发现,心脏毒性是水母毒素致死大鼠的主要原因<sup>[7]</sup>,并且在研究过程中记录到大鼠心律失常的现象,因此推测 TOE 具有诱导心脏心律失常的作用。为了进一步明确 TOE 对心脏传导系统的影响,进行了大鼠 Langendorff 离体心脏灌流试验,在排除神经及其他因素干扰的情况下分析 TOE 对大鼠心率和心律的影响。结果表明,TOE 显著减缓大鼠心率,并诱发大鼠离体心脏心律失常的发生。心律失常的程度随 TOE 剂量增加而加重,也随着作用时间的延长而加深。同时,我们发现大鼠离体心脏出现了多种形式的缓慢性心律失常,在 TOE 剂量较小时,出现多种冲动形成的异常,提示可能是由于电解质紊乱、儿茶酚胺增多等原因而导致的冲动形成异常<sup>[8]</sup>;当 TOE 剂量

达到 0.5 mg 时,离体心脏发生三度房室传导阻滞,此时心电图 QRS 波群正常,心率也较为稳定,故推测其阻滞部位可能位于希氏束及其近郊<sup>[8]</sup>。

本研究的意义在于从离体器官水平上证实了 TOE 可以诱发心律失常,为阐明其心脏毒性的机理提供了新的依据。此外,由于 TOE 0.5 mg 能够诱发三度房室传导阻滞的发生,为临床上对水母毒素致死原因机理与治疗对策的研究提供了新的思路。

### 【参考文献】

- [1] Ramasamy S, Isbister GK, Seymour JE, *et al* Pharmacologically distinct cardiovascular effects of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom and a tentacle-only extract in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2005, 155(2): 219
- [2] Xiao L, He Q, Guo Y, *et al* Cyanea capillata tentacle-only extract as a potential alternative of nematocyst venom: its cardiovascular toxicity and tolerance to isolation and purification procedures [J]. *Toxicon*, 2009, 53(1): 146.
- [3] Sanchez-Rodriguez J, Torrens E, Segura-Puertas L. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom [J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80(3): 163.
- [4] Johnston KM, Macleod BA, Wakker MJA. Responses to ligation of a coronary artery in conscious rats and the actions of antiarrhythmics [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1983, 61(11): 1340.
- [5] 肖 良,张黎明.水母毒素的研究进展 [J]. *中国海洋药物杂志*, 2007, 26(6): 40.
- [6] Bloom DA, Bumett JW, Alderslade P. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside [J]. *Toxicon*, 1998, 36(8): 1075.
- [7] Xiao L, Liu GS, Wang QQ, *et al* The lethality of tentacle-only extract from jellyfish *Cyanea capillata* is primarily attributed to cardiotoxicity in anaesthetized SD rats [J]. *Toxicon*, 2010, 55(4): 838.
- [8] 叶任高,陆再英. *内科学* [M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2006: 210.

[收稿日期] 2010-03-02

[修回日期] 2010-03-16