



高原牧区不同害鼠胃肠内容物对D型肉毒神经毒素的破坏强度分析

李生庆^{1,2}, 胡国元^{1,2}, 李淑萍^{1,2}, 范玉霞¹, 韩生义^{1,2*}

(1. 青海省畜牧兽医科学院, 西宁, 810016;

2. 青海省动物疾病病原诊断与绿色防控技术研究重点实验室, 西宁, 810016)

稿件运行过程

收稿日期: 2023-06-07

修回日期: 2023-07-29



关键词: 草地鼠害;

D型肉毒毒素;

肠内容物;

破坏强度;

青藏高原牧区

Key words: Rodent damage in grass-

land;

Botulinum toxin type D;

Intestine contents;

Breaking strength;

Qinghai-Xizang Plateau pa-

storal area

中图分类号: S812.6

文献标识码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-02-0321-07

DOI: 10.12375/ysdwxb.20240211

摘要

为探明高原牧区不同害鼠胃肠内容物对D型肉毒毒素的破坏强度与害鼠对毒素的敏感性之间的关系,采用霍恩氏法测定了D型肉毒毒素对高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)、高原鼯鼠(*Eospalax baileyi*)及青海松田鼠(*Neodon fuscus*)的灌胃半数致死剂量(LD₅₀),并测定3种害鼠胃肠内容物及其上清液与D型肉毒毒素作用后的毒素残留量。结果表明:D型肉毒毒素对高原鼠兔、高原鼯鼠及青海松田鼠的LD₅₀分别为5 110、5 840、50 100 MLD/kg。害鼠胃肠内容物对毒素的破坏强度由高到低依次是青海松田鼠、高原鼯鼠、高原鼠兔。3种害鼠胃肠内容物对D型肉毒毒素的破坏作用存在差异,且LD₅₀与毒素残留量之间呈正相关性。胃肠道环境差异是导致不同害鼠对D型肉毒毒素产生敏感性差异的原因之一,研究结果对今后选育高效、特异性D型肉毒毒素生物灭鼠剂具有指导意义。

Analysis of the Destructive Intensity of D-type Botulinum Neurotoxin by Gastrointestinal Contents of Different Harmful Rodents in Plateau Pastoral Areas

LI Shengqing^{1,2}, HU Guoyuan^{1,2},
LI Shuping^{1,2}, FAN Yuxia¹, HAN Shengyi^{1,2*}

基金项目: 青海省自然科学基金面上项目(2021-ZJ-923)

第一作者简介: 李生庆(1980—),男,研究员;主要从事高原动物疾病病原诊断及生物毒素灭鼠剂的研制与应用研究。E-mail:lsq_8008@163.com

*通信作者: 韩生义, E-mail: 283258707@qq.com

- (1. Qinghai Academy of Animal and Veterinary Sciences, Xining, 810016, China;
2. Qinghai Provincial Key Laboratory of Pathogen Diagnosis for Animal Diseases and Green Technical Research for Prevention and Control, Xining, 810016, China)

Abstract: In order to investigate the relationship between the damage intensity by different gastrointestinal contents to the botulinum toxin type D and the sensitivity of the rodents to the botulinum toxin type D of rats in plateau grazing area, the median lethal dose (LD_{50}) of botulinum toxin type D to *Ochotona curzoniae*, *Eospalax baileyi* and *Neodon fuscus* were determined by Hohn's method. The toxin residues of three kinds of gastrointestinal contents and their supernatant after interaction with type D botulinum toxin were determined. The results showed that the LD_{50} of type D botulinum toxin to *Ochotona curzoniae*, *Eospalax baileyi*, and *Neodon fuscus* were 5,110, 5,840, and 50,100 MLD/kg, respectively. The damage intensity of the order of the stomach and intestinal contents to the toxin was *Neodon fuscus*, *Eospalax baileyi*, and *Ochotona curzoniae*. The gastric and intestinal contents of the three kinds of rodents had different destructive effects on botulinum toxin type D, and there was a positive correlation between LD_{50} and toxin residue. The difference of gastric and intestinal environment is one of the reasons for the difference of sensitivity of different harmful rodents to botulinum toxin type D. The result of this study is of significance for the future selection and breeding of efficient and specific botulinum toxin type D biological rodenticide.

由D型肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)所产毒素研制成的D型肉毒灭鼠剂,在草地鼠害防治过程中通过害鼠自然采食后进入其胃肠道,进而通过肉毒毒素“四步”作用机制达到毒素中毒的效果。第一步,肉毒毒素与细胞表面受体特异结合;第二步,通过受体介导胞吞毒素内化,进入胞浆;第三步,毒素链选择性切割胞内底物SNARE蛋白;最后,通过封闭乙酰胆碱的释放^[1]导致呼吸麻痹引起害鼠死亡。因此,分析毒素进入害鼠胃肠道,在肠上皮细胞吸收内化之前,胃肠内容物对D型肉毒毒素的破坏强度的差异,是分析D型肉毒毒素对不同害鼠敏感性差异产生的必不可少的环节之一。

生物因为所处的生态领域丰富多样,自然环境的特殊性使得各种生物的食物结构组成各不相同,药物作为一种外源性摄入的物质,在机体内将受到不同因素的影响,特别是口服药物进入机体后,先后通过口腔、食道、胃肠道等消化器官,接触到机体分泌的各种酶类物质,继而发生物理、化学反应,这一生理过程势必会影响药物在不同生物体内的生物利用度,从而影响药物在机体内的实际效果^[2]。赵德华等^[3]研究也证实食物可影响一部分小分子靶向药物的生物利用度,应重视食物与小分子靶向药物之间的相互作用,选择合理的服药时间,以避免增加药物不良反应或降低药物疗效。

关于高寒草甸主要害鼠高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)、高原鼯鼠(*Eospalax baileyi*)的食性研究^[4]结果显示,高原鼠兔的食谱主要为禾草、莎草等单子叶植物及其种子,而高原鼯鼠由于常年生活在地底,俗称“瞎老鼠”,该鼠种的食物主要由一些植物的发达轴根、根茎、球茎和块根类物质组成。从几种害鼠的采食特性可以看出其食物组成存在一定的差异。测定并分析不同害鼠胃肠内容物对D型肉毒毒素的破坏强度,对于补充分析害鼠对D型肉毒毒素敏感性差异,研制驱避胃肠道对D型肉毒毒素的破坏,提高害鼠胃肠道对毒素吸收的D型肉毒毒素灭鼠剂新剂型非常有必要。因此,本研究主要分析了不同害鼠胃肠内容物对D型肉毒毒素蛋白的破坏强度,在补充完善D型肉毒毒素对不同害鼠敏感性差异的基础上,为下一步研制免受胃肠道破坏的新型D型肉毒毒素新制剂提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

青海松田鼠(*Neodon fuscus*)捕捉自青海省海北州刚察县青海湖农场,体质量25~35 g,在室内人工饲养1周后供实验室用。

高原鼠兔捕捉自青海省海北州祁连县野牛沟乡达玉村野外牧区,体质量125~153 g,在室内人工饲

养1周后供实验室用。

高原鼯鼠捕捉自青海省海南藏族自治州贵南县野外,体质量200~270 g,正常饲喂,在室内有土的铁桶内避光人工饲养1周后供实验室用。

1.2 试验药品

取D型肉毒毒素原药(批号:2018036,毒价:2 000万MLD/mL),做2 mL毒素+18 mL冻水的10倍稀释,再做1:4倍稀释,即为40万MLD/mL小鼠静注毒价毒素。

2 方法

2.1 D型肉毒毒素对3种害鼠灌胃半数致死量(LD₅₀)的测定

2.1.1 对高原鼠兔灌胃LD₅₀的测定

LD₅₀的测定按霍恩氏法进行,以每毫升分别含2 150、4 640、10 000、21 500 MLD的不同毒素浓度灌服量分为4个试验组。将野生高原鼠兔20只,随机分为4组,每组5只,以每100 g体质量灌服1 mL的标准灌服,观察10 d,记录中毒症状和死亡情况。

2.1.2 对高原鼯鼠灌胃LD₅₀的测定

将抓捕的高原鼯鼠置于铁皮桶中,饲喂甘蓝。试验时将试验鼯鼠编号,放置于相应编号桶内,夜间放回装有泥土的原桶内。用霍恩氏法测定LD₅₀,以每千克体质量设置2 150、4 640、10 000、21 500 MLD剂量组,每组5只,以每100 g体质量分别灌服215、464、1 000、2 150 MLD的毒素,饲喂甘蓝,观察10 d,记录死亡情况。

2.1.3 对青海松田鼠灌胃LD₅₀的测定

用霍恩氏法测定LD₅₀,以每千克体质量设置

21 500、464 00、100 000、215 000 MLD剂量组,每组灌服5只,即每20 g体质量分别灌服430、930、2 000、4 300 MLD毒素,喂以燕麦和胡萝卜,观察5 d,记录死亡结果。

2.2 三种害鼠胃肠内容物对D型肉毒毒素的破坏强度分析

将3种试验鼠分别麻醉后,固定在小动物解剖台上,按试验需求先进行心脏穿刺采血,待试验鼠死亡后,分别从每只鼠胃肠内容物中取样品2 g置于离心管中,加入4 mL生理盐水稀释摇匀,再加入1 mL稀释好的毒素,充分混匀,作用24 h后,离心,测毒。所有试验程序均经青海省畜牧兽医科学院实验动物管理委员会审查批准。

2.3 三种害鼠胃肠内容物上清液对D型肉毒毒素的破坏强度分析

另取胃肠内容物分别置于离心管中,加入4 mL生理盐水稀释摇匀,4 °C放置2 h,以4 000 r/min离心20 min,上清转移至另一离心管中,再加入1 mL 40万MLD/mL的毒素,充分混匀,室温作用24 h后,离心,稀释测毒。

3 结果

3.1 D型肉毒毒素对高原鼠兔、高原鼯鼠和青海松田鼠的灌胃LD₅₀

试验测得D型肉毒毒素对高原鼠兔灌胃LD₅₀为5 110 MLD/kg(可信限2 550~10 200 MLD/kg),对高原鼯鼠灌胃LD₅₀为5 840 MLD/kg(可信限3 430~9 950 MLD/kg),对青海松田鼠灌胃LD₅₀为5.01万MLD/kg(可信限3.08万~8.14万MLD/kg)(表1)。

表1 D型肉毒毒素对3种害鼠的LD₅₀

Tab. 1 LD₅₀ of botulinum toxin type D rodenticide on three species of rats

组别 Groups	灌服剂量/(MLD·kg ⁻¹) Gavage dose	试验动物数量 Number of animal	平均体质量/g Average weight	平均灌胃量/mL Average dose	死亡比 Mortality rate	LD ₅₀ / (MLD·kg ⁻¹)
高原鼠兔 <i>Ochotona curzoniae</i>	2 150	5	138.7	1.38	1/5	5 110
	4 640	5	151.4	1.51	2/5	
	10 000	5	135.2	1.35	4/5	
	21 500	5	139.6	1.39	5/5	
高原鼯鼠 <i>Eospalax baileyi</i>	2 150	5	212.2	1.47	0/5	5 840
	4 640	5	230.6	1.29	3/5	
	10 000	5	208.8	1.52	3/5	
	21 500	5	254.6	1.32	5/5	
青海松田鼠 <i>Neodon fuscus</i>	21 500	5	21.7	1.08	0/5	50 100
	46 400	5	27.9	1.39	3/5	
	100 000	5	24.7	1.23	4/5	
	215 000	5	29.2	1.46	5/5	

3.2 青海松田鼠胃肠内容物及离心上清液对毒素的影响

将肉毒毒素置于青海松田鼠胃肠内容物中作用24 h后,可发现溶液中D型肉毒毒素含量均有降低,

尤其肠内容物的毒素含量只有原毒素的1/8,但胃肠内容物经离心后的上清液对肉毒毒素的破坏强度明显低于肠内容物原液的破坏强度,上清液与毒素作用后,剩余毒力基本为原毒素的1/4(表2)。

表2 青海松田鼠胃肠内容物及内容物离心上清液对毒素的破坏强度

Tab. 2 The destructive intensity of the gastrointestinal contents and centrifuge supernatant of *Neodon fuscus* to botulinum toxin type D

组别 Groups	试验前含毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Toxic content before experiment	作用后含毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Toxic content after action	小鼠死亡结果 Death of mouse	剩余毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Residual toxicity
胃内容物 Stomach contents	40	40	0/2	10
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
胃内容物上清液 Stomach contents supernatant	40	40	0/2	10
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
肠内容物 Intestinal contents	40	40	0/2	5
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	0/2	
		5	2/2	
肠内容物上清液 Intestinal contents supernatant	40	40	0/2	10
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
对照组 Control	40	40	2/2	40
		20	2/2	

3.3 高原鼠兔胃肠内容物及离心上清液对毒素的影响

将肉毒毒素置于高原鼠兔胃肠内容物中作用24 h后,发现溶液中D型肉毒毒素含量也有不同程度的降低,肠内容物的毒素含量为原毒素的1/4,但胃肠内容物经离心后的上清液对肉毒毒素的破坏强度同样低于肠内容物原液的破坏强度,上清液与毒素作用后,剩余毒力基本为原毒素的1/2(表3)。

3.4 高原鼯鼠胃肠内容物及离心上清液对毒素的影响

将肉毒毒素置于高原鼠兔胃肠内容物中作用24 h后,发现溶液中D型肉毒毒素含量均有不同程度的降低,尤其肠内容物的毒素含量只有原毒素的1/8,但胃肠内容物经离心后的上清液对肉毒毒素的破坏强度明显低于肠内容物原液的破坏强度,上清液与毒素作用后,剩余毒力基本为原毒素的1/4(表4)。

表3 高原鼠兔胃肠内容物及内容物离心上清液对毒素的破坏强度

Tab. 3 The destructive intensity of gastrointestinal contents and centrifugation supernatant of *Ochotona curzoniae* to botulinum toxin type D

组别 Groups	试验前含毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Toxic content before experiment	作用后含毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Toxic content after action	小鼠死亡结果 Death of mouse	剩余毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Residual toxicity
胃内容物 Stomach contents	40	40	0/2	10
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
胃内容物上清液 Stomach contents supernatant	40	40	0/2	20
		30	0/2	
		20	2/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
肠内容物 Intestinal contents	40	40	0/2	10
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
肠内容物上清液 Intestinal contents supernatant	40	40	0/2	20
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
对照组 Control	40	40	2/2	40
		20	2/2	

4 讨论与结论

国内外已有很多关于肉毒毒素作用机制的报道,肉毒梭菌菌株培养液中肉毒神经毒素主要是以前体毒素复合物的形式存在,前体复合物中的非毒素组分能够保障神经毒素不被消化道内的各种酶分解破坏而失去活性。当毒素通过消化系统进入小肠后,内部的微碱性环境可以引起毒素复合物的解离,部分神经毒素可穿过小肠黏膜^[5-6],并通过血液和淋巴两个体内的循环系统阻止神经递质乙酰胆碱的胞吐释放,最终导致肌肉麻痹,引起动物死亡。肉毒毒素作为一种细菌分泌毒素蛋白,同样存在易失活、不稳定的特性,使得口服蛋白的应用增加了一定难度^[7-8],极大地限制了毒素蛋白在各领域中的应用。

本研究结果显示,3种害鼠胃肠内容物对D型肉毒毒素的破坏作用由高到低依次为青海松田鼠、高原鼫鼠、高原鼠兔,且肠内容物对毒素的破坏强度明显高于胃内容物。初步推断不同害鼠对D型肉毒毒素敏感性差异的产生与害鼠体内肠内容物的破坏有一定相关性。该研究对今后选育肠道释放型高效、特异性D型肉毒毒素生物灭鼠剂具有很好的指导意义。

D型肉毒灭鼠剂是利用D型肉毒梭菌所产毒素研制的生物灭鼠剂,自2005年开始大面积示范应用以来,取得了良好的生态和社会效益^[9-10],然而,从本研究中不同害鼠对D型肉毒毒素的LD₅₀分析看,其LD₅₀及害鼠对药物的敏感性明显不同。有研究报道表明,由于保守的VAMP1序列中的单个残基变化(Q78V),已显示出大鼠VAMP1(突触小泡缔合性膜

表4 高原鼯鼠胃肠内容物及内容物离心上清液对毒素的破坏强度

Tab. 4 The destructive intensity of the gastrointestinal contents and the centrifugation supernatant of *Eospalax baileyi* to botulinum toxin type D

组别 Groups	试验前含毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Toxic content before experiment	作用后含毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Toxic content after action	小鼠死亡结果 Death of mouse	剩余毒量/(万MLD·mL ⁻¹) Residual toxicity
胃内容物 Stomach contents	40	40	0/2	20
		30	0/2	
		20	2/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
胃内容物上清液 Stomach contents supernatant	40	40	0/2	20
		30	0/2	
		20	2/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
肠内容物 Intestinal contents	40	40	0/2	10
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
肠内容物上清液 Intestinal contents supernatant	40	40	0/2	20
		30	0/2	
		20	0/2	
		10	2/2	
		5	2/2	
对照组 Control	40	40	2/2	40
		20	2/2	

蛋白)在体外对 BoNT/B(肉毒神经毒素)有抗性^[11],而人体内 VAMP1 对 BoNT/D 显示出一定的抗性,这是由于另一个残基变化(M48I)导致的^[12]。这些长期体外观察的数据似乎与体内毒性数据相关,因为长期以来一直观察到大鼠对 BoNT/B 不敏感,LD₅₀的中位数为小鼠的 10 000 倍^[13]。

很多口服性小分子靶向药物制剂在机体内的生物利用度非常容易受到不同食物组成的影响,导致药物效果出现明显差异^[14-15]。本研究通过胃肠内容物对 D 型肉毒毒素的破坏强度分析得出,不同害鼠肠内容物对 D 型肉毒毒素蛋白均有一定程度的破坏,毒素在胃内容物中作用 24 h 后,剩余毒素的有效毒力基本上在原毒素的 50% 以下;从研究结果对比分析可以看出:(1)离心后的胃肠内容物上清液对毒

素的破坏强度明显低于胃肠内容物的直接破坏强度;(2)青海松田鼠胃肠内容物不论原液还是上清液对 D 型肉毒毒素的破坏强度明显高于高原鼠兔和高原鼯鼠;(3)肠内容物原液对 D 型肉毒毒素的破坏强度明显比胃内容物高。

参考文献:

- [1] DOLLY J O, BLACK J, WILLIAMS R S, *et al.* Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization[J]. *Nature*, 1984, 307(5950):457-460.
- [2] 任夏洋, 丛明华. 食物与药物的相互作用[J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2019, 6(1):7-12.
REN X Y, CONG M H. Food and drug interactions: a general review[J]. *Electronic Journal of Metabolism and Nutrition of Cancer*, 2019, 6(1):7-12.
- [3] 赵德华, 楚明明, 陈静, 等. 食物对小分子靶向药物生物利用

- 度的影响[J]. 医药导报, 2019, 38(6): 796-799.
- ZHAO D H, CHU M M, CHEN J, *et al.* Effect of food on the bio-availability of small molecule targeted drugs[J]. *Herald of Medicine*, 2019, 38(6): 796-799.
- [4] 王权业, 张堰铭, 魏万红, 等. 高原鼯鼠食性的研究[J]. 兽类学报, 2000, 20(3): 193-199.
- WANG Q Y, ZHANG Y M, WEI W H, *et al.* Food habit of the plateau zokor [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2000, 20 (3) : 193-199.
- [5] SIMPSON L L. Identification of the major steps in botulinum toxin action [J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2004, 44: 167-193.
- [6] MONTECUCCO C, PAPINI E, SCHIAVO G. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism [J]. *FEBS Letters*, 1994, 346(1): 92-98.
- [7] JAENICKE R, BÖHM G. The stability of proteins in extreme environments [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, 8 (6): 738-748.
- [8] FIELDS P A. Review: protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2001, 129(2/3): 417-431.
- [9] 阎高峰, 张西云, 陆艳. 肉毒梭菌毒素灭鼠研究进展[J]. 草业科学, 2001, 18(6): 55-59.
- YAN G F, ZHANG X Y, LU Y. Progress of deratization study on *Clostridium botulinum* toxin [J]. *Pratacultural Science*, 2001, 18 (6): 55-59.
- [10] 张生合, 任程, 陈国民, 等. 青海省草地鼠害防治及今后设想 [J]. 青海草业, 2001, 10(2): 22-24.
- ZHANG S H, REN C, CHEN G M, *et al.* Status of controlling rodents in Qinghai Province [J]. *Qinghai Pratacultural*, 2001, 10 (2): 55-59.
- [11] SCHANTZ E J, JOHNSON E A. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine [J]. *Microbiological Reviews*, 1992, 56(1): 80-99.
- [12] YAMAMOTO H, IDA T, TSUTSUKI H, *et al.* Specificity of botulinum protease for human VAMP family proteins [J]. *Microbiology and Immunology*, 2012, 56(4): 245-253.
- [13] BURGEM A S V, DICKENS F, ZATMAN L J. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction [J]. *The Journal of Physiology*, 1949, 109(1/2): 10-24.
- [14] 张师, 王明霞, 冯章英, 等. 靶向抗肿瘤药物的药理学相互作用研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(20) : 2871-2874.
- ZHANG S, WANG M X, FENG Z Y, *et al.* Progress in pharmacokinetic interactions of targeted antitumor drugs [J]. *China Pharmacy*, 2016, 27(20): 2871-2874.
- [15] 周虹, 付国斌, 张文, 等. 酪氨酸激酶抑制剂的药物相互作用研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2016, 35 (12) : 854-860.
- ZHOU H, FU G B, ZHANG W, *et al.* Research progress of drug interactions of tyrosine-kinase inhibitors [J]. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*, 2016, 35 (12) : 854-860.