

光学活性拟除虫菊酯对棉铃虫神经细胞 钠通道电流的影响

贺秉军¹, 刘东波¹, 陈强¹, 刘安西¹, 汪清民², 黄润秋², 芮昌辉³

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 南开大学元素有机化学研究所, 天津 300071;

3. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要: 用全细胞膜片钳技术对比分析了 α 体氯氰菊酯与 θ 体氯氰菊酯对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫离体培养中枢神经细胞 Na^+ 通道门控过程的影响。结果表明, α 体氯氰菊酯作用后, 神经细胞 Na^+ 通道电流 (I_{Na}) 先增大, 同时通道的激活电压向负电位方向移动约 10 mV, 提示 α 体氯氰菊酯使通道激活电位降低, 通道更容易被激活。药剂作用约 10 min 后, I_{Na} 又迅速降低, 表明 α 体氯氰菊酯对开放状态的 Na^+ 通道有抑制作用。另外, α 体氯氰菊酯使 I_{Na} 到达峰值的时间缩短, 但对失活时间无明显影响。 θ 体氯氰菊酯也使 I_{Na} 激活电位左移, 幅值降低, 但降低速率较慢。总的结果表明 α 体氯氰菊酯与 θ 体氯氰菊酯对棉铃虫中枢神经细胞处于关闭和开放状态的钠通道均有作用, 且 α 体氯氰菊酯对钠通道电流的抑制作用强于 θ 体氯氰菊酯。

关键词: 棉铃虫; 神经细胞; Na^+ 通道; 光学活性; 膜片钳

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2003) 02-0156-05

Effect of optically-active pyrethroid on sodium channels in the central neurons of *Helicoverpa armigera*

HE Bing-Jun¹, LIU DONG-Bo¹, CHEN Qiang¹, LIU An-Xi¹, WANG Qing-Min², HUANG Run-Qiu², RUI Chang-Hui³ (1. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Research Institute of Element-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: Effects of the optically-active pyrethroids, α -cypermethrin and θ -cypermethrin upon the voltage dependent sodium channels of central neurons of larval *Helicoverpa armigera* (Hübner) were studied using the whole-cell patch clamp technique. Results show that the sodium currents (I_{Na}) of central neurons increased quickly after the application of α -cypermethrin. At the same time, the activation voltage of the sodium channel shifted about 10 mV in the direction of hyperpolarization, which indicated that α -cypermethrin caused sodium channels of larval *H. armigera* to be more easily activated. After treatment with α -cypermethrin for 10–15 min, I_{Na} decreased quickly, which revealed that α -cypermethrin also had an effect on opening sodium channels. The latency to peak current was shortened after the application of α -cypermethrin, while the time constants of decay did not change. The activation voltage of the sodium channel also shifted towards more negative potentials (around 10 mV) after the application of θ -cypermethrin. I_{Na} decreased slowly during the action of θ -cypermethrin and more time was required to depress it. In conclusion, these data indicate that α -cypermethrin and θ -cypermethrin have effects on both closed and open states of sodium channels in the central neurons of larval *H. armigera* and that α -cypermethrin is the more effective of these two pyrethroids.

Key words: *Helicoverpa armigera*; neuron; sodium channel; optically-active; patch clamp

拟除虫菊酯的分子结构复杂, 大多含有手性碳原子、三碳环或烯键, 存在多个旋光异构体和顺反

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30100119); 天津市自然科学基金资助项目 (023614511)

作者简介: 贺秉军, 男, 1973 年 7 月生, 博士, 副教授, 主要研究方向为动物生理生化, E-mail: hebj@eyou.com

收稿日期 Received: 2002-03-27; 接受日期 Accepted: 2003-01-10

异构体(冯坚, 2000), 通过对其外消旋体进行拆分转换, 不仅可减少进入环境的低效体、无效体, 提高高效异构体含量, 同时也可降低制药成本。因此, 随着立体化学的发展和拟除虫菊酯光学结构研究的不断深入, 在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 等重要农业害虫已对外消旋体拟除虫菊酯产生抗性的情况下, 光学活性拟除虫菊酯(optically-active pyrethroids)的开发和应用受到普遍重视。目前还未见到应用膜片钳技术分析光学活性拟除虫菊酯对棉铃虫神经细胞离子通道影响的报道。本文作者用全细胞膜片钳技术对比分析了 α 体氯氰菊酯与 θ 体氯氰菊酯对棉铃虫幼虫离体培养中枢神经细胞 Na^+ 通道门控过程的影响, 在分析两种光学活性拟除虫菊酯神经毒性机制的同时, 尝试将膜片钳技术引入杀虫剂筛选领域, 以期对光学活性农药的开发应用和抗性害虫的治理有所裨益。

1 材料和方法

1.1 神经细胞的分离与培养

棉铃虫初始种群于 1992 年 8 月由中国农业科学院植物保护研究所自河北保定棉田采集, 并在室内不接触任何药剂连续饲养。从第 3 龄幼虫胸、腹神经节分离培养神经细胞。消化酶液为 0.15% 胶原酶(IV, Sigma)与 0.3% 胰蛋白酶(Gibco)混合液。培养液为: TC-100(Gibco)与 L-15(Gibco)等体积混合, 增补 20% 胎牛血清, 200 mmol/L 葡萄糖, 1.0 mmol/L 谷氨酰胺, 0.6 mg/mL 谷胱甘肽, 80 U/mL 庆大霉素, NaHCO_3 调至 pH 6.6(贺秉军和陈家童等, 2001)。离体细胞在 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下静置培养 1~2 h 后用于电生理实验。

1.2 全细胞膜片钳记录

得到全细胞模型后, 置保持电压于 -70 mV , 给予脉冲宽度为 80 ms, 从 -60 mV 到 50 mV , 以 10 mV 步幅递增的去极化电压刺激。信号由膜片钳放大器(PC-IIB, 华中理工大学)输出后经 5 kHz 滤波输入计算机处理。刺激脉冲序列的给出及数据采集均通过 IBBClamp 软件包和 DAQ-2B 数据采集接口装置一起构成的 IBBDigitizer 数字化系统完成。电信号记录在细胞贴壁 2~4 h 内进行, 细胞直径为 $16\sim 18\ \mu\text{m}$ 。数据经 P/N 漏减除处理后进行统计分析。方差分析借助 SAS(Statistical Analysis System, version 6.12)统计分析系统软件完成。

记录 Na^+ 电流的细胞外液 (mmol/L): NaCl

100, KCl 4, CaCl_2 2, MgCl_2 2, Hepes 10, 葡萄糖 10, 氯化四乙胺 20, CdCl_2 0.5, NaOH 调至 pH 6.6; 电极内液 (mmol/L): CsF 100, CsCl 40, MgCl_2 3, EGTA 10, Hepes 5, CsOH 调至 pH 6.6。电极电阻 $3\sim 5\ \text{M}\Omega$ 。CsCl、EGTA、Hepes 为 Gibco 产品, CsF、CsOH 为 Sigma 产品, 其余药品均为国产分析纯。

杀虫剂: α 体氯氰菊酯与 θ 体氯氰菊酯由南开大学元素及有机化学研究所提供。先用丙酮配制成 10^{-3} mmol/L 的母液, 用时以细胞外液稀释至所需浓度。

2 结果

2.1 α 体氯氰菊酯对神经细胞 Na^+ 通道的影响

建立全细胞记录模式, 待对照电流稳定后, 用微操纵器调节加药电极至细胞旁边(距细胞约 $100\ \mu\text{m}$), 使药液浸没细胞。图 1 为 α 体氯氰菊酯 (10^{-5} mmol/L) 作用于细胞后不同时刻的电流-电压(I-V)关系曲线。棉铃虫幼虫离体培养中枢神经细胞表达河豚毒素敏感型 Na^+ 通道(贺秉军和刘安西等, 2001), 无杀虫剂作用时, I_{Na} 在 -40 mV 左右激活, $-30\sim -20\text{ mV}$ 达峰值。 α 体氯氰菊酯作用 1 min 后, I_{Na} 迅速增大(85% 以上神经细胞的钠通道有这种现象), 从 $2.49 \pm 0.27\text{ nA}$ 增加到 $2.96 \pm 0.32\text{ nA}$, 增幅约 19%, 3 min 时增幅最大, 达对照的 1.28 倍, 5 min 时有所降低, 但仍为对照的 1.24 倍, 10 min 时为 1.19 倍, 此后 I_{Na} 迅速降低, 15 min 时降幅达 90% 左右, 25~30 min 后, I_{Na} 几乎被完全抑制。 α 体氯氰菊酯浓度较低时 ($10^{-9}\sim 10^{-7}\text{ mmol/L}$), I_{Na} 被抑制所需时间较长(60~90 min)。

α 体氯氰菊酯对棉铃虫神经细胞 Na^+ 通道的另一个影响是使 I_{Na} 的激活电压向超极化方向移动约 10 mV, 达 -50 mV 。这提示 α 体氯氰菊酯可使通道激活电位降低, 更易激活。另外, 对照实验表明, 随记录时间延长, I_{Na} 到达峰值所需时间逐渐缩短, 但一定时间后即保持不变。 α 体氯氰菊酯作用后, I_{Na} 达峰值所需时间更短, 对照 1 min 时 I_{Na} 到达峰值需 $0.99 \pm 0.32\text{ ms}$ ($n=28$), α 体氯氰菊酯作用 1 min 时, I_{Na} 到达峰值需时较对照缩短 12%, 5 min 时缩短 20.6%, 10 min 时缩短 39%, 15 min 时缩短 43%, 此后基本保持不变。而对照组在 30 min 前缩短幅度未超过 35%。 α 体氯氰菊

酯对通道电流的失活时间常数无明显影响。这些结果表明 *alpha* 体氯氰菊酯不仅对棉铃虫幼虫中枢神经细胞 Na^+ 通道的全细胞电流幅值、通道激活电压有影响，而且使电流到达峰值所需时间缩短。

2.2 *theta* 体氯氰菊酯对神经细胞 Na^+ 通道的影响

同样方法分析 *theta* 体氯氰菊酯 (10^{-5} mmol/L) 对神经细胞 Na^+ 通道的作用。图 2 为 *theta* 体氯氰菊酯作用后不同时间 Na^+ 通道电流的 I-V 关系曲

线。由图可知，*theta* 体氯氰菊酯作用后，通道的激活电压也向负电位方向移动 10 mV 左右，电流幅值持续降低，但降低速率较慢，35 min 时电流由对照时的 1.59 ± 0.66 nA 降至 0.51 ± 0.22 nA，降幅为 68% 左右。*theta* 体氯氰菊酯也使 I_{Na} 到达峰值的时间缩短 0.2 ms 左右，但对电流失活时间无明显影响。

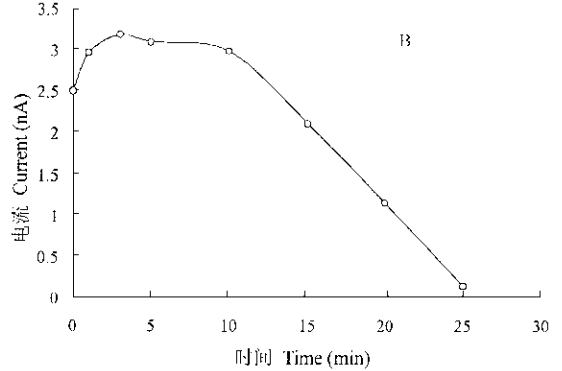
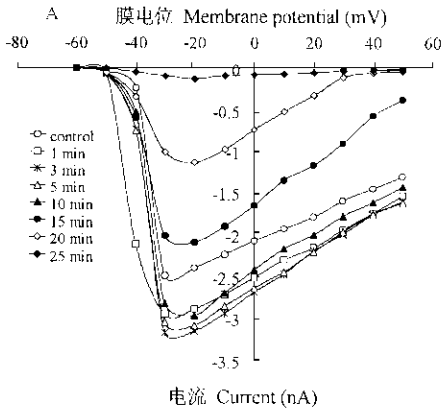


图 1 *alpha* 体氯氰菊酯对棉铃虫神经细胞钠通道的影响

Fig. 1 Effect of *alpha*-cypermethrin on voltage-dependent sodium channels in central neurons of larval *H. armigera*

A. *alpha* 体氯氰菊酯作用于细胞后，不同时刻 Na^+ 通道电流的 I-V 关系曲线 I-V curve of whole cell sodium currents after application of *alpha*-cypermethrin (10^{-5} mmol/L); B. 电流-时间曲线，显示 *alpha* 体氯氰菊酯作用期间 Na^+ 通道峰值电流的变化 Current vs time curve, showing the change in peak currents during the action of *alpha*-cypermethrin

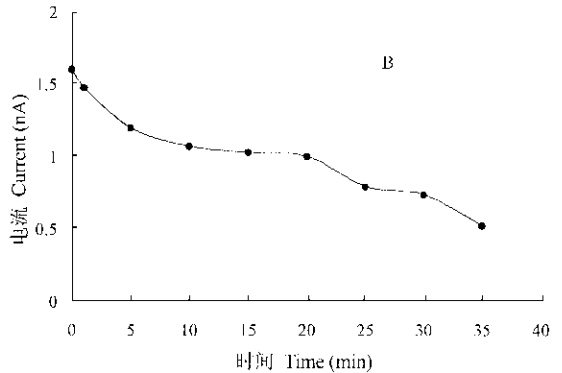
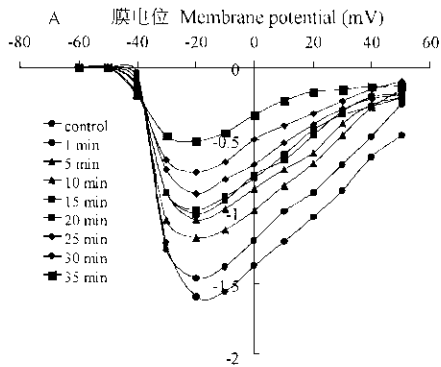


图 2 *theta* 体氯氰菊酯对棉铃虫神经细胞钠通道的影响

Fig. 2 Effect of *theta*-cypermethrin on voltage-dependent sodium channels in central neurons of larval *H. armigera*

A. *theta* 体氯氰菊酯作用于细胞后，不同时刻 Na^+ 通道电流的 I-V 关系曲线 I-V curve of whole cell sodium currents after application of *theta*-cypermethrin (10^{-5} mmol/L); B. 电流-时间曲线，显示 *theta* 体氯氰菊酯作用期间 Na^+ 通道峰值电流的变化 Current vs time curve, showing the change in peak currents during the action of *theta*-cypermethrin

3 讨论

拟除虫菊酯是在天然除虫菊酯化学结构研究的

基础上开发的高效神经致毒性杀虫剂，其作用位点主要是神经膜上的 Na^+ 通道 (Soderlund and Bloomquist, 1989; Narahashi, 1996)，通过干扰 Na^+ 通道的门控过程，使 Na^+ 通道关闭延迟，开放时间

延长, 引起重复后放和突触传递的阻断 (Soderlund and Bloomquist, 1989; Bloomquist, 1993; Narahashi, 1992)。膜片钳实验表明拟除虫菊酯可使 Na^+ 通道的激活电压向超极化方向移动 (Narahashi, 1996; 贺锡雯等, 1997)。本实验结果显示 α 体氯氰菊酯和 θ 体氯氰菊酯均可使棉铃虫神经细胞 Na^+ 通道的激活电压向负电位方向移动, 与文献报道一致。但同时这也表明, α 体氯氰菊酯与 θ 体氯氰菊酯的光学活性差异在对通道激活电位的影响上区别不明显。药物引起 Na^+ 通道激活电位漂移的确切原因目前并不清楚。William (1995) 认为 Na^+ 通道至少有 5 个神经毒素的结合位点, 其中 β -蝎子毒素结合于位点 4, 可改变通道激活的电压依赖性, 使激活通道所需电压更低; 位点 5 结合西加毒素 (ciguatoin), 导致重复的神经冲动, 改变通道的电压依赖性以及抑制通道灭活。 α 体氯氰菊酯与 θ 体氯氰菊酯使棉铃虫神经细胞 Na^+ 通道激活电位漂移的原因还有待进一步研究。

通道的工作状态是门控特性的具体表现, 也是抗性分析的基础, 拟除虫菊酯究竟作用于 Na^+ 通道五种工作状态的 (开放、失活和三个关闭状态) 哪个状态, 目前也无定论。有学者认为, 尽管拟除虫菊酯修饰 Na^+ 的开放状态, 但对关闭状态有更高的亲和性 (de Weille *et al.*, 1988; Brown and Narahashi, 1992)。Chinn 和 Narahashi (1986) 也报道溴氰菊酯可使鼠神经细胞 Na^+ 通道的关闭和失活状态均延长, 开放状态减少, 修饰作用主要发生在关闭状态。但也有研究表明通道开放可增强拟除虫菊酯的结合, 即拟除虫菊酯主要修饰静息关闭状态的 Na^+ 通道, 但通道开放后拟除虫菊酯的亲性和性增强 (Salgado and Narahashi, 1990)。实验结果显示 α 体氯氰菊酯作用后 Na^+ 通道激活电压向负电位方向移动, 且 I_{Na} 先增大然后迅速减小。激活电位向左移意味着激活电压降低, 通道更易激活。与此相应, I_{Na} 增大表明记录时刻有更多 Na^+ 通道处于开放状态, 提示 α 体氯氰菊酯对关闭状态的 Na^+ 通道有激活作用, 使 Na^+ 的通道开放频率增加或开放时间延长。 I_{Na} 在药物作用后期迅速降低提示 α 体氯氰菊酯对 I_{Na} 有抑制作用, 即 α 体氯氰菊酯对 Na^+ 通道的开放状态也有作用, 且这种作用有一定的时间依赖性, 作用一定时间后对 I_{Na} 的抑制作用才趋于明显。这可能与拟除虫菊酯作用位点位于 Na^+ 通道靠近质膜内侧 (Osborne and Pepper, 1991)

有关, 因为 α 体氯氰菊酯穿过细胞质的外膜到达 Na^+ 通道靠近内膜的作用位点需要一定时间。

对于到底是 α 体氯氰菊酯还是 θ 体氯氰菊酯的杀虫效力强, 由于拟除虫菊酯的作用存在种属特异性, 因此不能一概而论。刘安西等 (1990) 用油间隙和电压钳方法研究表明顺式氯氰菊酯对黑胸大蠊 *Periplaneta fuliginosa* 的毒杀效力强于反式。本实验结果显示, α 体氯氰菊酯作用 15 min 时 I_{Na} 降幅为 90% 左右, θ 体氯氰菊酯作用 35 min 时 I_{Na} 降幅约为 68%, 即 α 体氯氰菊酯对钠通道电流的抑制作用比 θ 体氯氰菊酯的强。由于顺、反式的区别仅在于它们空间构型的不同, 提示 Na^+ 通道上拟除虫菊酯的结合部位可能存在某种立体选择性。由于拟除虫菊酯的作用具有物种差异性, 因此对于棉铃虫与黑胸大蠊等昆虫而言, 顺式氯氰菊酯的毒杀效力强, 对于其它昆虫而言可能有所不同。

总之, 本实验结果表明 α 体氯氰菊酯可使 Na^+ 通道的激活电位向超极化方向移动, 使通道更易被激活, 同时对 I_{Na} 也有抑制作用, 即对关闭和开放状态的 Na^+ 通道都有作用。 θ 体氯氰菊酯也使神经细胞 Na^+ 通道的激活电位左移, 但完全阻断钠电流需时较长。同时也可知道利用膜片钳技术可快速判断药剂是否对所研究的细胞 (靶标) 有效及药物不同光学异构体的生物活性差异, 因此可用于杀虫剂的筛选分析。

参 考 文 献 (References)

- Bloomquist J R, 1993. Neuroreceptor mechanisms in pyrethroid mode of action and resistance. *Rev. Pestic. Toxicol.*, 2: 185 - 203.
- Brown G B, Narahashi T, 1992. Modulation of nerve membrane sodium channels activation by deltamethrin. *Brain Res.*, 584: 71 - 76.
- Chinn K, Narahashi T, 1986. Stabilization of sodium channel states by deltamethrin in mouse neuroblastoma cells. *Journal of Physiology*, 380: 191 - 207.
- de Weille J R, Vijverberg H P M, Narahashi T, 1988. Interactions of pyrethroids and octylguanidine with sodium channels of squid giant axons. *Brain Res.*, 247: 14 - 22.
- Feng J, 2000. An outline on development of optical-active pyrethroids. *Pesticides*, 39 (2): 1 - 6. [冯强, 2000. 具有光学活性的拟除虫菊酯杀虫剂开发概况. 农药, 39 (2): 1 - 6]
- He B J, Liu A X, Chen J T, Sun J S, Rui C H, Meng X Q, 2001. Acute isolation and culture of nerve cell from cotton bollworm and patch clamp study on the voltage-gated ion channels in the cultured neurons. *Acta Entomologica Sinica*, 44 (4): 422 - 427. [贺秉军, 刘安西, 陈家童, 孙金生, 芮昌辉, 孟香清, 2001. 棉铃虫幼虫神经细胞的急性分离培养及其电压门控通道的膜片钳研究. 昆虫学报,

- 44 (4): 422 - 427]
- He B J, Chen J T, Guo S Y, Rui C H, Meng X Q, Wang X L, Wang Y N, Sun J S, Liu A X, 2001. Nerve cell culture and ultrastructural analysis of central nerve ganglia from resistant cotton bollworm. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 34 (1): 30 - 36. [贺秉军, 陈家童, 郭世宜, 芮昌辉, 孟香清, 王秀玲, 王亦农, 孙金生, 刘安西, 2001. 抗性棉铃虫神经细胞的离体培养和超微结构分析. 南开大学学报, 34 (1): 30 - 36]
- He X W, Yin R Y, Chen Y H, Lu J, Xie Z P, He F S, 1997. Effect of pyrethroids on Na^+ , Ca^{2+} ion channel currents in rat brain neurons. *Chin. J. Ind. Hyg. Occup. Dis.*, 15 (5): 261 - 264. [贺锡雯, 殷若元, 陈寅红, 吕京, 谢佐平, 何凤生, 1997. 拟除虫菊酯对神经细胞膜 Na^+ 、 Ca^{2+} 离子通道的影响. 中华劳动卫生职业病杂志, 15 (5): 261 - 264]
- Liu A X, Ning Q J, Chen X L, Huang R Q, Chen S T, 1990. Modified action of cypermethrin enantiomers on axonal sodium and potassium channels of *Periplaneta fuliginosa* (Serville). *Acta Entomologica Sinica*, 33 (1): 1 - 6. [刘安西, 宁黔冀, 陈叙龙, 黄润秋, 陈守同, 1990. 氰菊酯异构体对黑胸大蠊神经钠钾通道的调制作用. 昆虫学报, 33 (1): 1 - 6]
- Narahashi T, 1992. Nerve membrane Na^+ channels as targets of insecticides. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 236 - 241.
- Narahashi T, 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology*, 78: 1 - 14.
- Osborne M P, Pepper D R, 1991. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Mullen C A, Scott J G, 1992. ACS Symposium. Washington DC: American Chemical Society. 71.
- Salgado V L, Narahashi T, 1990. Immobilization of sodium channel gating charge in crayfish giant axons by the insecticide fenvalerate. *Mol. Pharmacol.*, 43: 626 - 633.
- Soderlund D M, Bloomquist J R, 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Ann. Rev. Entomol.*, 34: 77 - 96.
- William A C, 1995. Structure and function of voltage gated-sodium channels. *Ann. Rev. Biochem.*, 64: 493 - 531.