

# 苦参碱对棉铃虫幼虫神经细胞钠通道的影响

杜育哲<sup>1,2</sup>, 李杰<sup>1</sup>, 贺秉军<sup>1</sup>, 刘安西<sup>1</sup>

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 天津农学院, 天津 300381)

**摘要:** 用全细胞膜片钳技术研究了生物碱类植物杀虫剂苦参碱对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫离体培养中枢神经细胞钠离子通道门控过程的影响。结果表明: 苦参碱对棉铃虫幼虫神经细胞所表达的 TTX (tetradotoxin, 河豚毒素) 敏感钠通道具有浓度依赖性阻滞作用, 1, 10 和 100  $\mu\text{mol/L}$  的苦参碱作用 5 min 后, 分别使钠电流峰值较给药前下降  $(12.49 \pm 1.67)\%$ 、 $(18.79 \pm 2.16)\%$  和  $(43.15 \pm 8.17)\%$  ( $n = 8, P < 0.05$ )。苦参碱使钠电流的电流-电压关系曲线上移, 但并不改变其激活电压、峰电压和电流-电压关系曲线的形状。苦参碱对钠通道的阻滞作用可能是其具有某些毒理效应的离子基础。

**关键词:** 棉铃虫; 钠通道; 苦参碱; 膜片钳

**中图分类号:** Q965.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2004)02-0189-04

## Effects of matrine on the sodium channel in central neurons of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*

DU Yu-Zhe<sup>1,2</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, HE Bing-Jun<sup>1</sup>, LIU An-Xi<sup>1</sup> (1. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Tianjin Agricultural College, Tianjin 300381, China)

**Abstract:** The effects of botanical alkaloids pesticide matrine on inward sodium channel gating properties of the central neurons isolated from the thoracic and abdominal ganglia of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) were studied using whole-cell patch clamp technique. It was found that matrine inhibited TTX-sensitive sodium current ( $I_{\text{Na}}$ ) in a concentration dependent manner. Matrine at 1, 10 and 100  $\mu\text{mol/L}$  decreased peak  $I_{\text{Na}}$  by  $(12.49 \pm 1.67)\%$ ,  $(18.79 \pm 2.16)\%$  and  $(43.15 \pm 8.17)\%$  ( $n = 8, P < 0.05$ ), respectively in 5 minutes after matrine was added to the external solution. Matrine shifted up the current-voltage relation (I-V) curve, without changing the active and peak current potential and the shape of I-V curve. The results demonstrated that matrine could inhibit  $I_{\text{Na}}$ , which may partially explain the mechanism of its toxicity effects.

**Key words:** *Helicoverpa armigera*; sodium channel; matrine; patch clamp

苦参碱(matrine)是从豆科槐属植物苦豆子中分离提纯的一种喹啉(quinolizidin)类生物碱(郑永权等, 2000), 在农业上, 具有触杀和胃毒等作用, 可杀死菜青虫、菜蚜和粘虫等农作物害虫, 对水稻象甲、白背飞虱、棉铃虫和小菜蛾等害虫也有较好的防治效果(罗万春等, 1997)。而且苦参碱具有高效、广谱和低毒等优点, 与化学农药混配, 具有显著的增效作用(张牢牢等, 1997)。但有关苦参碱作用机理的研究基本上是从症状学观察着手, 并进行了一些生化测定。我们首次应用全细胞膜片钳技术, 研究了苦参碱对棉铃虫幼虫神经细胞钠通道的影响, 旨在进一步确证其作用, 从细胞离子通道水平阐明其作用

机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 神经细胞的分离与培养

棉铃虫由中国农业科学院植物保护研究所提供, 在室内不接触任何药剂情况下连续饲养。解剖棉铃虫 3 龄幼虫, 迅速取出胸、腹神经节, 置消化酶液(0.15% 胶原酶, 0.3% 胰蛋白酶)中, 孵育 15 min 后除去神经鞘, 继续振动消化 30 min。然后移至培养液(L-15 与 TC-100 按 5:1 混合, 3 000 mg/L 酵母提取物, 2 800 mg/L 水解乳蛋白, 700 mg/L 葡萄糖, 400

mg/L 果糖, 80 U/mL 庆大霉素, 使用时增补 10% 胎牛血清, pH 6.8) 中用内径递减的玻璃管打散细胞, 并接种于 35 mm 的培养皿中, 在  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  下静置培养, 2 h 后用于膜片钳实验(贺秉军等, 2002)。

### 1.2 全细胞膜片钳记录

在细胞贴壁 2 ~ 4 h 后, 选择直径 18 ~ 25  $\mu\text{m}$  表面光洁的神经细胞进行膜片钳记录。微电极采用微电极控制仪 (PP-83, 日本光电公司) 两步控制而成, 尖端直径 1 ~ 2  $\mu\text{m}$ 。待形成高阻封接后, 置保持电压于 -70 mV, 给予脉冲宽度为 80 ms, 从 -60 mV 到 +70 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-IIIb, 华中科技大学) 输出后经 5 kHz 滤波输入计算机处理。测量增益 1 或 2 mV/pA, 采样间隔 100  $\mu\text{s}$ 。刺激脉冲序列的给出及数据采入均通过 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。数据经 P/N 漏减处理后进行统计分析, 结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm SE$ ) 表示, 方差分析借助软件 SAS (Statistical analysis system, version 6.12) 完成。

### 1.3 溶液与试剂

细胞外液 (mmol/L): NaCl 100, KCl 4,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgCl}_2$  2, Hepes 10, 葡萄糖 10, 氯化四乙胺 (tetraethylammonium chloride, TEA-Cl) 20,  $\text{CdCl}_2$  0.5, 用 NaOH 调至 pH 6.8; 电极内液 (mmol/L): CsF 100, CsCl 40,  $\text{MgCl}_2$  3, EGTA 10, Hepes 5, 用 CsOH 调至 pH 6.8。电极电阻 3 ~ 5 M $\Omega$ 。CsCl、EGTA 和 Hepes 为 Gibco 产品, CsF 和 CsOH 为 Sigma 产品, 其他试剂均为国产分析纯。

苦参碱由西北农林科技大学农药研究所提供, 先用双蒸水配置成 100 mmol/L 的母液, 低温保存备用。使用前以细胞外液稀释药液至 100、10 和 1  $\mu\text{mol/L}$ , 待对照电流稳定后, 把药液加入尖端直径为 50  $\mu\text{m}$  的电极中, 在倒置显微镜下用微操纵器操纵加药电极加药, 加药时施加压力使药喷出, 镜下可见药液流过选定细胞。以加药前电流为对照, 观察苦参碱对棉铃虫神经细胞 TTX (tetrodotoxin, 河豚毒素)-敏感钠电流的影响。

## 2 结果

在全细胞膜片钳模式下, 可在棉铃虫幼虫神经细胞记录到能够快速激活与失活的内向钠电流, 该电流对 TTX (tetrodotoxin, 河豚毒素) 敏感, 能够被 TTX 完全阻断, 为 TTX-敏感钠电流。该电流在 -50

mV 左右激活, 在 -30 ~ -20 mV 左右达到峰值。待该电流稳定后, 分别吹加不同浓度的苦参碱, 图 1 为加入 10  $\mu\text{mol/L}$  苦参碱 5 min 后钠电流 ( $I_{\text{Na}}$ ) 的变化, 可见  $I_{\text{Na}}$  峰值减小, 比给药前下降了  $(18.79 \pm 2.16)\%$ , 而 1 和 100  $\mu\text{mol/L}$  的苦参碱作用 5 min 后, 也分别使  $I_{\text{Na}}$  峰值下降  $(12.49 \pm 1.67)\%$  和  $(43.15 \pm 8.17)\%$  ( $n = 8, P < 0.05$ )。图 2 为 10  $\mu\text{mol/L}$  的苦参碱作用不同时间, 钠通道电流-电压关系 ( $I$ - $V$ ) 曲线的变化, 可见随时间延长,  $I_{\text{Na}}$  减小,  $I$ - $V$  曲线上移, 但  $I_{\text{Na}}$  的激活电压、峰电压、电流到达峰值的时间和  $I$ - $V$  曲线的形状并无显著改变。 $I_{\text{Na}}$  峰值随苦参碱浓度和加药时间的变化见图 3, 可见苦参碱对  $I_{\text{Na}}$  的抑制程度随浓度增加和时间延长而增加, 但不同浓度苦参碱对  $I_{\text{Na}}$  的抑制作用趋势相似, 是一个逐渐而缓慢的过程, 5 ~ 15 min 内作用较强, 15 min 后普遍趋缓。

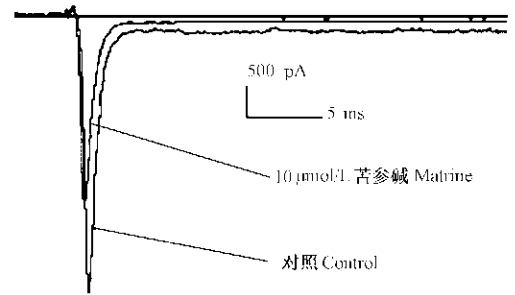


图 1 10  $\mu\text{mol/L}$  苦参碱作用 5 min 后棉铃虫  $I_{\text{Na}}$  的变化  
Fig. 1 Changes of sodium channel current ( $I_{\text{Na}}$ ) 5 minutes later when 10  $\mu\text{mol/L}$  matrine was added to the external solution in the central neurons of *Helicoverpa armigera*

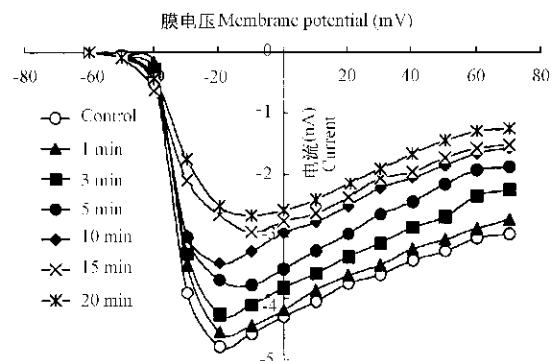


图 2 吹加 10  $\mu\text{mol/L}$  苦参碱不同时间内棉铃虫  $I_{\text{Na}}$  电流-电压关系 ( $I$ - $V$ ) 曲线的变化  
Fig. 2  $I$ - $V$  curve of  $I_{\text{Na}}$  after the action of 10  $\mu\text{mol/L}$  matrine in the central neurons of *Helicoverpa armigera* at different time

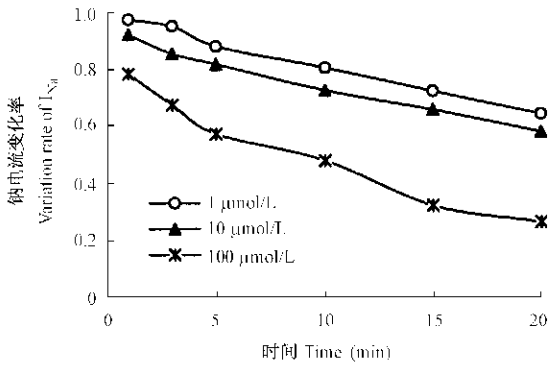


图3 吹加不同浓度苦参碱后棉铃虫  $I_{Na}$  峰值减小率随时间的变化

Fig. 3 Variation percentage of  $I_{Na}$  peak vs time after action of matrine to the sodium channels in the central neurons of *Helicoverpa armigera*

### 3 讨论

膜片钳技术可直接测定膜离子通道电流的大小,是研究药物对离子通道活性影响最为直接的手段。本实验结果表明:苦参碱对棉铃虫幼虫神经细胞钠通道具有浓度依赖性阻滞作用,而且此作用是一个逐渐而缓慢的过程。这可能主要与苦参碱本身的水溶性有关,它弥散到细胞膜上钠通道结合部位的速度明显小于脂溶性的杀虫剂。随时间延长,弥散的苦参碱越多,与钠通道结合得越多,因此阻滞程度增加。同样随着苦参碱浓度增加,阻滞作用也逐渐增加。

不同浓度苦参碱均使  $I_{Na}$  的 I-V 曲线上移,但并不使 I-V 曲线发生偏移,  $I_{Na}$  的激活电压、峰电压和 I-V 曲线的形状也不发生明显改变,且不同浓度苦参碱对钠通道抑制趋势相似。因此,揭示了苦参碱对钠通道的每一个膜电位在其不同浓度时均发生同样比例的、同样数量的阻滞作用(黄从新等,1997;陈江斌等,2000)。

从植物中提取的大量生物碱在医学上得到了广泛的应用,氧化苦参碱(陈霞等,2001)、莲心碱(王嘉陵等,2000)和青藤碱(丁仲如等,2000)对豚鼠心室肌细胞  $I_{Na}$  均具有浓度依赖性抑制作用,使  $I_{Na}$  的 I-V 曲线上移,但不使其峰电位偏移。而且莲心碱、青藤碱以及山莨菪碱(陈江斌等,2000)还对心室肌细胞 L-型钙通道具有阻滞作用,它们对心室肌细胞膜上钠、钙通道的阻滞作用是其发挥抗心律失常作用的重要机制。在医学上,苦参碱对人中枢神经系统具

有镇静、镇痛、解热和中枢抑制的作用,出现以流涎、脉搏加快、步态不稳等神经系统为主的中毒症状(郑永权等,2000)。在害虫防治上,中毒的韭蛆表现出皱缩、瘫痪,甚至有的个体出现大脑受影响通过口而外翻的神经中毒症状(郑方强等,2002)。苦参碱对钠通道的阻滞作用可能正是其具有这些毒理效应的离子基础,它对昆虫神经细胞所表达的钙通道可能也有影响,将在今后工作中做进一步研究。

### 参考文献 (References)

- Chen JB, Huang CX, Tang QZ, Li JJ, 2000. Effect of anisodamine on L-type calcium channels of rabbit ventricular myocardium. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 16(2): 162-164. [陈江斌, 黄从新, 唐其柱, 李建军, 2000. 山莨菪碱对家兔心肌细胞 L-型钙通道的影响. 中国药理学通报, 16(2): 162-164]
- Chen X, Li YJ, Zhang WJ, Ge JY, Zhong GG, 2001. Effects of oxymatrine on sodium current in isolated ventricular cells in guinea pig. *J. N. Bethune Univ. Med. Sci.*, 27(1): 34-36. [陈霞, 李英骥, 张文杰, 葛敬岩, 钟国赣, 2001. 氧化苦参碱对豚鼠心室肌细胞钠电流的影响. 白求恩医科大学学报, 27(1): 34-36]
- Ding ZR, Li GS, Jiang XJ, Xu JL, 2000. The effect of sinomenine on sodium current and L-type calcium current in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology*, 14(1): 39-41. [丁仲如, 李庚山, 蒋锡嘉, 许家俐, 2000. 青藤碱对豚鼠单个心室肌细胞膜钠、钙离子的阻碍作用. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 14(1): 39-41]
- He BJ, Liu AX, Chen JT, Sun JS, Rui CH, Meng XQ, 2001. Acute isolation and culture of nerve cell from the cotton bollworm and the 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]
- Huang CX, Ding ZR, Li GS, Jiang XJ, 1997. The effect of extractant of *Angelica sinensis* Diels on sodium current and L-type calcium current in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology*, 11(2): 96-98. [黄从新, 丁仲如, 李庚山, 蒋锡嘉, 1997. 当归提取液对豚鼠心室肌细胞钠、钙离子通道的影响. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 11(2): 96-98]
- Luo WC, Mu LY, Li YS, 1997. Toxic effects of alkaloids from plants against insect pests. *Pesticides*, 36(7): 11-15. [罗万春, 慕立义, 李云寿, 1997. 植物源生物碱的杀虫作用. 农药, 36(7): 11-15]
- Wang JL, Nong Y, Yao WX, Jiang MX, 2000. Effect of liensinine on action potential and  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca-L}$  in guinea pig ventricular myocytes. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 31(3): 193-196. [王嘉陵, 农艺, 姚伟星, 江明性, 2000. 莲心碱对豚鼠心室肌细胞动作电位及钠与钙电流的影响. 中草药, 31(3): 193-196]
- Zhang LL, Zhang SM, Yin ML, 1997. Abstracting method studies of alkaloids in radix *Sophora flavescens*. *Pesticides*, 36(5): 26-27. [张牢牢, 张淑梅, 殷美玲, 1997. 植物农药苦参生物碱的研究.

农药, 36(5): 26-27]

Zheng FQ, Liu ZD, Pei CH, 2002. Studies on the control of Chinese chive maggot by some insecticides and insecticidal action on the pest. *Pesticides*, 41(6): 26-28. [郑方强, 刘忠德, 裴翠花, 2002. 无公害杀虫剂防治韭蛆的药效试验及苦参碱杀虫作用的研究. 农药, 41(6): 26-28]

Zheng YQ, Yao JR, Shao XD, 2000. Review on the constituents and

agricultural application of *Sophora flavescens* Ait. *Pesticide Science and Administration*, 21(1): 24-26. [郑永权, 姚建仁, 邵向东, 2000. 苦参化学成分及农业应用研究概况. 农药科学与管理, 21(1): 24-26]

(责任编辑: 黄玲巧)