2020, 57(4): 841-849.

戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞电压门 控钙通道和钾通道的影响^{*}

关丹阳^{1**} 姜笑维¹ 李清亚¹ 刘 晓¹ 马永强² 陈 强¹ Li-Byarlay Hongmei³ 贺秉军^{1***}

(1.南开大学生命科学学院,生物活性材料教育部重点实验室,天津 300071;2.中国农业大学理学院应用化学系,北京 100193;3.中央州立大学农业与生命科学系农业研究与开发计划,Wilberforce OH 45384)

【目的】 戊吡虫胍是将新烟碱类和缩氨脲类杀虫剂杀虫活性部分重新组合的新型杀虫剂。但对 摘 要 于该类杀虫剂究竟如何影响离子通道,通道门控特性和功能是如何变化目前尚未见报道。本实验旨在明 确该杀虫剂是否影响电压门控钙通道和钾通道的门控过程,探究其是否为该杀虫剂的潜在作用靶标。 【方法】 应用全细胞膜片钳技术检测戊吡虫胍对棉铃虫 Helicoverpa armigera Hübner 中枢神经细胞电压 门控 Ca²⁺通道和 K⁺通道的影响。【结果】 戊吡虫胍作用后 I-V曲线和激活曲线均向超极化方向移动 10-15 mV,具有显著性统计学差异 (P<0.05)。稳态失活曲线向超极化方向移动约 5 mV,不具有统计学差 异(P>0.05)。电压门控 Ca²⁺通道峰值电流(I_{neak})有不同程度的降低。随着浓度增大 I_{neak} 降低有减小的 趋势。此外,1 μmol·L⁻¹ 戊吡虫胍作用后钙离子的窗口电流(I_w)面积增加幅度较 10 μmol·L⁻¹ 和 100 µmol·L⁻¹大,为 93.20%。提示在一定的测试电压下,该药物作用后处于激活状态的 Ca²⁺通道数目增多。 另外,其作用后电压门控钾通道 Ipeak 降低。随着浓度增大 Ipeak 降低有减小的趋势。同时 I-V 曲线下移, 激活曲线向去极化方向移动约8 mV,不具有统计学差异(P>0.05)。这表明戊吡虫胍作用后 K⁺通道在较 高电位下才能激活。【结论】 戊吡虫胍能够有效抑制 Ca²⁺通道和 K⁺通道 I_{peak},并使通道的激活曲线和失 活曲线发生移动,影响 Ca²⁺通道和 K⁺通道的门控特性。表明棉铃虫中枢神经细胞上的电压门控 Ca²⁺通道 和 K⁺通道是戊吡虫胍的潜在作用靶标之一。

关键词 戊吡虫胍;棉铃虫;电压门控 Ca²⁺通道;电压门控 K⁺通道;全细胞膜片钳

Effects of Guadipyr on voltage-gated calcium and potassium channels in central neurons of *Helicoverpa armigera*

GUAN Dan-Yang^{1**} JIANG Xiao-Wei¹ LI Qing-Ya¹ LIU Xiao¹ MA Yong-Qiang² CHEN Qiang¹ LI-Byarlay Hongmei³ HE Bing-Jun^{1***}

(1. The Key Laboratory of Bioactive Materials of Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100093, China; 3. Agricultural Research and Develop Program, Department of Agriculture and Life Science, Central State University, Wilberforce OH 45384, U.S.A)

Abstract [Objectives] Guadipyr is a novel insecticide that has both neonicotinoid and semicarbazone insecticidal activity. How it affects ion channels and channel gating characteristics and functions is currently unknown. We examined the effects of Guadipyr on voltage-gated calcium and potassium channels, and explored whether these channels are potential targets for this pesticide. [Methods] The effects of three concentrations (1, 10, and 100 μ mol·L⁻¹) of Guadipyr on Ca²⁺ and K⁺ channels were studied using the patch clamp technique. [Results] All three concentrations of Guadipyr significantly (*P*<0.05) shifted Ca²⁺ channel I -V and activation curves about 10-15 mV in the negative direction. The inactivation curves of Ca²⁺ channels

^{*}资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金(31871992, 31371974)

^{**}第一作者 First author, E-mail: dy13512892573@163.com

^{***}通讯作者 Corresponding author, E-mail: hebj@nankai.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-01-10; 接受日期 Accepted: 2020-04-09

were also shifted 5 mV towards the hyperpolarizing direction, which is a not significant shift (P>0.05). The Ca²⁺ peak current was significantly decreased by Guadipyr treatment relative to the control. The I_{peak} decreased more slowly as the concentration of Guadipyr increased. The area of window current increased the most (93.20%) following treatment with 1 µmol·L⁻¹ Guadipyr than by treatment with 10 µmol·L⁻¹ and 100 µmol·L⁻¹. The number of Ca²⁺ channels activated increased after Guadipyr treatment at a test voltage of -60 mV to +10 mV. The K⁺ peak current decreased gradually when Guadipyr was added to the external solution; the I_{peak} decreased more slowly as the Guadipyr concentration increased from 10 µmol·L⁻¹ to 100 µmol·L⁻¹. I - V curves declined and the activation of K⁺ channels was shifted 8 mV towards the depolarizing direction, which was not significant (P>0.05). This shows that K⁺ channels can be activated at higher potentials by Guadipyr. **[Conclusion]** Guadipyr can effectively inhibit the I_{peak} of the Ca²⁺ and K⁺ channels, and shift the activation and inactivation curves of these channels, thereby affecting the gating of Ca²⁺ channels and K⁺ channels. Therefore, Ca²⁺ and K⁺ channels in the central neurons of *H. armigera* are potential Guadipyr target sites.

Key words Guadipyr; *Helicoverpa armigera*; voltage-gated calcium channels; voltage-gated potassium channels; Whole-cell Patch Clamp Technique

戊吡虫胍(Guadipyr, Gua)是 2008 年中国 农业大学研发的新型杀虫剂,是将新烟碱类和 缩氨脲类杀虫剂杀虫活性部分的重新组合,兼具 新烟碱类和钠离子通道抑制剂的活性特点(Qi et al., 2013)。经过大田试验验证,其对蚜虫和 褐飞虱 Nilaparvata lugens Stål等害虫具有很好的 防治效果,且对哺乳动物等毒性较低(Su et al., 2012)。由于其高效,成本低廉和潜在的环境优势, 戊吡虫胍具有较大的潜在市场价值。但该杀虫剂 究竟是如何影响离子通道,通道门控特性及其功 能是如何变化,从而导致害虫致死目前尚未见报 道。这很大程度限制了该杀虫剂的广泛应用。

棉铃虫 Helicoverpa armigera 属鳞翅目夜蛾 科,是一种典型的世界性农业害虫,危害性极大。 自 20 世纪 90 年代以来棉铃虫灾害日益严重,我 国每年因棉铃虫的损失达数十亿(盛承发等, 2001),其防治在很大程度上依赖于化学杀虫剂。 其中拟除虫菊酯类农药是最为广泛使用的一类 人工合成的具有神经毒性的杀虫剂,具有广谱, 低毒,高效等特点。昆虫细胞膜离子通道是多种 杀虫剂的作用靶标。拟除虫菊酯的主要作用靶标 为电压门控钠离子通道(Bloomquist, 1996)。 此外,许多研究发现拟除虫菊酯还可以影响电压 门控钙通道(Soderlund et al., 2001)、钾通道 (Rao and Rao, 1997)和细胞内钙离子浓度(Clark and Symington, 2007; Cao et al., 2010)等。但 随着拟除虫菊酯类杀虫剂大量使用,棉铃虫神经 敏感性降低(Ahmad et al., 1989),表皮防御能 力和多功能氧化酶代谢反应增强(Ahmad and McCaffery, 1991)致其产生了严重的抗药性。 抗药性的产生与 Na⁺、K⁺、Ca²⁺等电压门控性离 子通道的功能密切相关。基于上述情况,新型杀 虫剂研发及其作用机理的明确成为害虫治理工 作的重心。这不仅可以有效防治害虫,同时可以 延缓害虫抗药性的形成。本实验利用全细胞膜片 钳技术探究戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞电 压门控 Ca²⁺通道和 K⁺通道门控过程的影响,旨 在明确电压门控 Ca²⁺通道和 K⁺通道是否为此类 新型农药的潜在作用靶标,进一步探究该新型杀 虫剂的作用机理,指导其科学使用,以期对棉铃 虫的防治有所贡献。

1 材料与方法

1.1 试虫

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科研人员自河北保定棉 田采集,并在室内以人工饲料饲养,不接触任何 药剂。

1.2 神经细胞的分离与培养

将预先饥饿处理约 24 h 的棉铃虫 3 龄幼虫 浸于 75%的酒精中消毒 3-5 min,用棉铃虫生理 溶液清洗 2 次,然后背面向上小心剖离出腹神 经索,置于冰浴的生理溶液中去除神经鞘。将 腹神经索置消化酶液(0.15%胶原酶,0.3%胰蛋 白酶)中,孵育 10 min,然后转移至培养液 (TC-100与L-15等体积混合,增补20%胎牛血 清,200 mmol·L⁻¹葡萄糖,1.0 mmol·L⁻¹谷氨酰 胺,0.6 mmol·L⁻¹谷胱甘肽,80 U/mL 庆大霉素, pH6.6)中用内径递减的玻璃管离散细胞,并接 种于35 mm 培养皿中,(27±1) 静置培养,细 胞2h后可用于电生理实验(贺秉军等,2001)。

1.3 全细胞膜片钳记录

用高阻封接全细胞膜片钳技术记录 Ca²⁺和 K⁺通道电流(Hamill et al., 1981)。得到全细胞 构型之后,置保持电压于 - 120 (或 - 80) mV, 给予从 - 80 mV 到+65(或+60)mV, 步幅 5(或 10) mV, 时程 300 (或 60) ms 的阶跃去极化刺 激。信号由膜片钳放大器 Axopatch 200B (Molecular Devices, USA)采集, 经5kHz 滤波 传输至计算机处理,采样频率设为 50 kHz。电 信号记录在细胞贴壁 2-4 h 之内, 记录软件为 pClamp 10.2 (Molecular Devices, USA)。采用 Clampex (Molecular Devices, USA)的 P/N 漏减 功能去除漏电流。应用 Origin8.5 (OriginLab Corp., USA)和 Clampfit10.2(Molecular Devices, USA) 对采集的数据进行处理, 使用统计分析软 件 SPSS20(IBM) 对数据进行单因素方差分析, P<0.05 表示具有显著性差异。

记录 Ca²⁺电流的细胞外液(mmol·L⁻¹):NaCl 100, CsCl 4, BaCl₂ 5, MgCl₂·6H₂O 2, Hepes 10, 葡萄糖 5, 4-AP 5, TEA-Cl 20, TTX 1 μmol·L⁻¹, NaOH 调至 pH6.8。电极内液 (mmol·L⁻¹): CsCl 120, Na₂-ATP 5, MgCl₂·6H₂O 2, EGTA 11, Hepes 5, CsOH 调至 pH6.8。电极电阻 3-5 MΩ。

记录 K⁺电流的细胞外液 (mmol·L⁻¹): NaCl 148, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂·6H₂O 1, Hepes 10, 葡萄糖 10, CdCl₂ 0.5, TTX 1 μ mol·L⁻¹, NaOH 调至 pH6.8。电极内液 (mmol·L⁻¹): KCl 150, Na₂-ATP 0.2, MgCl₂·6H₂O 2, EGTA 10, Hepes 10, KOH 调至 pH6.8。电极电阻 3-5 MΩ。

杀虫剂:戊吡虫胍(Guadipyr,中国农业大 学提供),用二甲基亚砜(Dimethylsulfoxide, DMSO)溶解配成储存液,使用时用细胞外液稀 释成所需浓度,稀释液中 DMSO 的终浓度不超过 0.1%。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫幼虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道的电生 理学特性

在全细胞记录模式下,将细胞膜电压钳制在-120 mV,给予从-80 mV到+65 mV,步幅5 mV,时程300 ms的阶跃去极化刺激,采样频率为50 kHz,记录到的全细胞 Ca²⁺通道电流如图 2.1 所示,记录到一系列快激活,慢失活的 L 型 I_{Ca}。



图 1 戊吡虫胍作用前后棉铃虫中枢神经 细胞 Ca²⁺通道电流

Fig. 1 I_{Ca} of the *Helicoverpa armigera* before and after the application of Gua

A. 对照; B. 戊吡虫胍 (10 μmol·L⁻¹) 作用后的 I_{Ca}。
A. Control; B. I_{Ca} after Gua (10 μmol·L⁻¹).

2.2 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道 电流的影响

全细胞膜片钳记录中 I_{Ca} 的"Rundown"现 象比较普遍,适当提高电极内液中 ATP 浓度可 以起到一定的缓减作用,但随着记录时间延长, I_{Ca} 也会有不同程度衰减。全细胞记录模式建立 后,先记录对照组数据,后通过灌流系统分别从 低到高依次加入不同浓度的 Gua 后记录电流。结 果表明,如图 2: A 所示,对照组的棉铃虫中枢 神经细胞 I_{Ca}在 - 50- - 40 mV 激活,0-10 mV 达 峰值。不同浓度 Gua 加入细胞外液后 Ca²⁺通道 I-V曲线均向负电位方向移动 10-20 mV。如图 2: B 所示,细胞外液中加入不同浓度的 Gua 后, Ca²⁺通道的峰值电流(I_{peak})均减小。经单因素 方差分析,与对照之间存在显著性统计学差异



图 2 不同浓度戊吡虫胍作用下 Ca²⁺通道的 |-V 曲线及 I_{peak} Fig. 2 The |-V curves and I_{peak} of Ca²⁺ channels before and after the application of Gua

A. 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道 I-V曲线的影响: 电流幅值标准化; B. 戊吡虫胍作用后 Ca²⁺

通道 Ipeak变化。* 表示对照组相比具有显著性差异(P<0.05,单因素方差分析)。图7同。

A. Gua's effects on the | -V| curve of Ca²⁺ channels: Standardized current amplitude;

B. The I_{peak} of Ca²⁺ channels after Gua. * indicats significant difference compared with

the control (P<0.05, One-way analysis of variance). The same as Fig.7.

(*P*<0.05)。其中对照组 I_{peak}为(827.66±187.83) pA(*n*=10), 1 μmol·L⁻¹ Gua 作用后 I_{peak}降为 (-446.79±147.65)pA(*n*=5), 10 μmol·L⁻¹ Gua 作用后 I_{peak}降为(-508.75±84.21)pA(*n*=8), 100 μmol·L⁻¹ Gua 作用后 I_{peak}降为(-513.44± 69.63)pA(*n*=5)。随着浓度升高 Ca²⁺通道 I_{peak} 的降低幅度有减小的趋势。这一结果提示 Gua 不仅对通道电流的激活和峰值电位有影响,同时 也能够显著抑制 Ca²⁺通道峰值电流。

2.3 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道 电压依赖性激活的影响

Gua 对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道的激 活不具有浓度差异性(图 3)。1、10 和 100 μ mol·L⁻¹的 Gua 作用于 Ca²⁺通道后,通道的稳 定性激活曲线都向超极化方向移动,峰值电位由 0 变为 - 10 mV,激活电压由 - 30 mV 降至 - 60 mV 左右。通道的半数激活电压(V_{0.5})向 超极化方向有不同程度的移动,与对照之间相比 均具有显著的统计学差异(*P*<0.05)。其中对照 组的 V_{0.5}为(-9.83±0.73)mV,1 μ mol·L⁻¹作 用后 V_{0.5}为(-22.85±5.02)mV,向超极化方向 移动约 13 mV。10 μmol·L⁻¹ Gua 作用后 V_{0.5} 为 (-23.45±3.36) mV, 向超极化方向移动约 14 mV。100 μmol·L⁻¹ Gua 作用后 V_{0.5} 为 (-24.21±3.74) mV, 向超极化方向移动约 15 mV。激活曲线的斜率因子(k)均增加, 经 单因素方差分析 k 值不具有显著的统计学差异 (*P*>0.05)。由此可以看出100 μmol·L⁻¹ Guadipyr 作用下的 Ca²⁺通道更容易被激活。V_{0.5} 和 k 的统 计学差异见表 1。



图 3 不同浓度戊吡虫胍对 Ca²⁺通道稳定性激活的影响 Fig. 3 Effects of Gua on the steady-state activation of I_{Ca}

Table	1	Effects of Gua on the steady-state
		通道稳定性激活的影响
表 1	戊	吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca ²

activation of I_{Ca}

条件	激活 Activation		
Condition	$V_{0.5}{}^{a}$	k^{b}	n
对照 Control	$-9.83{\pm}0.73$	4.55 ± 0.38	10
1 μmol·L ⁻¹ 戊吡虫胍 1 μmol·L ⁻¹ Gua	- 22.85±5.02*	5.27±0.26	5
10 μmol·L ⁻¹ 戊吡虫胍 10 μmol·L ⁻¹ Gua	- 23.45±3.36*	5.48±0.21	8
100 µmol·L ⁻¹ 戊吡虫胍 100 µmol·L ⁻¹ Gua	- 24.21±3.74*	5.46±0.26	5

a: 半数激活电压; b: 斜率因子; n: 细胞个数; *表示与 对照组相比具有显著性差异(P<0.05, 单因素方差分析)。 下表同。

a: Half activation voltage; b: Slope factor; n: Number of cells; * indicats significant difference compared with the control (P<0.05, One-way analysis of variance). The same below.

2.4 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道 稳态失活的影响

Gua 对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道的 稳态失活不具有浓度差异性(图 4)。1、10 和 100 μ mol·L⁻¹ 作用于 Ca²⁺通道后半数失活电压 (V_{0.5})分别向超极化方向移动 4、2 和 6 mV。 失活曲线斜率因子(k)均减小, V_{0.5}和 k 与对照 相比均不具有显著性统计学差异(*P*>0.05)。V_{0.5} 和 k 的统计学差异见表 2。



图 4 不同浓度戊吡虫胍对 Ca²⁺通道失活的影响 Fig. 4 Effects of Gua on the steady-state inactivation of I_{Ca}

表 2 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺ 通道失活的影响

Table 2Effects of Gua on the steady-state
inactivation of I_{Ca}

条件	失活 Inactivation		
Condition	$V_{0.5}{}^{a}$	k^{b}	п
对照 Control	$-22.30{\pm}2.46$	$18.45{\pm}3.60$	7
1 μmol·L ⁻¹ 戊吡虫胍 1 μmol·L ⁻¹ Gua	- 26.26±2.86	13.58±3.36	5
10 μmol·L ⁻¹ 戊吡虫胍 10 μmol·L ⁻¹ Gua	- 24.76±2.44	12.28±2.95	6
100 µmol·L⁻¹戊吡虫胍 100 µmol·L⁻¹ Gua	- 28.69±3.12	13.41±3.13	5

2.5 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道 Window current 的影响

图 5 显示的是不同浓度 Gua 诱发的激活和





A. 1 μmol·L⁻¹戊吡虫胍; B. 10 μmol·L⁻¹戊吡虫胍; C. 100 μmol·L⁻¹戊吡虫胍。 A. 1 μmol·L⁻¹Gua; B. 10 μmol·L⁻¹Gua; C. 100 μmol·L⁻¹Gua. 稳态失活向超极化方向移动对 Ca^{2+} 通道电流的 联合影响。如图 5 所示,随着 Gua 浓度的增加 Ca^{2+} 通道 Window current 增大幅度逐渐减小。 其中对照组的 Window current 面积大小为 6.03, 1 µmol·L⁻¹ Gua 作用后面积变为 11.65, 10 µmol·L⁻¹ Gua 作用后为 10.34,100 µmol·L⁻¹ Gua 作用后为 8.81。其中 1 µmol·L⁻¹ Gua 作用后面积增加幅度 最大,为 93.20%。说明在一定的膜电位范围内, Gua 作用后处于激活状态的 Ca^{2+} 通道数目增加。 揭示了在一定测试电压下, Gua 作用下 Ca^{2+} 通道 增加了开放频率。

2.6 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 K⁺通道的 电生理学特性

在全细胞记录模式下,将细胞膜电压钳制在 - 80 mV,给予从 - 80 mV 到+60 mV,步幅 10 mV, 时程 60 ms 的阶跃去极化刺激,采样频率为 50 kHz,记录到的全细胞 K⁺通道电流如图 6 所示。



图 6 戊吡虫胍作用前后棉铃虫中枢神经 细胞 K⁺通道电流

Fig. 6 I_K of the *Helicoverpa armigera* before and after the application of Gua

A. 对照; B. 戊吡虫胍 (100 μmol·L⁻¹) 作用后的 I_K。
A. Control; B. I_K after Gua (100 μmol·L⁻¹).

2.7 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 K⁺通道电 流的影响

全细胞记录模式建立后,运行棉铃虫神经细胞 K⁺通道激活刺激方案。先采集对照组数据。 后通过灌流系统分别从低到高依次加入不同浓度的 Gua,待药物充分作用于细胞后再次运行激活刺激方案并记录数据。结果表明,如图 7 所示, 对照组棉铃虫中枢神经细胞中 I_K 在 - 60- - 40 mV 激活。不同浓度 Gua 加入细胞外液后 I_K的 I I-V曲线向下移动且 I_{peak} 降低。低浓度作用后 I_{peak} 幅值降低较大,随着浓度增大 I_{peak} 降低有減 小的趋势。其中对照组 I_{peak} 为(3534.33±733.58) pA(*n*=13), 10 µmol·L⁻¹和 100 µmol·L⁻¹ Gua 作用后 I_{peak} 分别降为(2690.35±372.04) pA (*n*=7)、(3318.29±604.46)pA(*n*=4)(图7:B)。 经单因素方差分析 10 µmol·L⁻¹ Gua 与对照间存 在显著统计学差异(*P*<0.05)。说明低浓度 Gua 能够有效抑制 K⁺通道峰值电流。

2.8 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 K⁺通道电 压依赖性激活的影响

10 µmol·L⁻¹和 100 µmol·L⁻¹的 Gua 作用于 K⁺通道后,棉铃虫中枢神经细胞 K⁺通道激活的电 压依赖性发生改变,致使激活曲线向去极化方向 移动(图 8)。半数激活电压(V_{0.5})呈现不同程 度的增加。其中对照组的 V_{0.5}为(22.15±1.72) mV,10 µmol·L⁻¹ Gua 作用后 V_{0.5}为(31.72±1.07) mV,向去极化方向移动约 9 mV,与对照相比具 有显著的统计学差异(P<0.05)。100 µmol·L⁻¹ Gua 作用后 V_{0.5}为(29.35±1.55) mV,向去极化 方向移动约 7 mV,与对照相比不具有统计学差 异(P> 0.05)。激活曲线的斜率因子(k)均增加, 两者之间和两者与对照之间均不具有显著的统 计学差异(P>0.05)。由此可以看出 Gua 作用下 的 K⁺通道需在更高的电位下才能激活。V_{0.5}和 k的统计学差异见表 3。

3 结论与讨论

现有研究已经证明神经细胞膜上的电压门 控 Na⁺通道为拟除虫菊酯类和缩氨基脲类杀虫 剂的作用靶标(Bloomquist, 1996)。另外,同样 在神经细胞动作电位形成中发挥重要作用的电 压门控 Ca²⁺通道(Soderlund *et al.*, 2001)及K⁺ 通道(Rao and Rao, 1997)也相继被证明是拟除 虫菊酯杀虫剂的重要作用靶标。贺秉军等(2002) 发现三氟氯氰菊酯(Cyhalothr)能引起抗性及敏 感棉铃虫神经细胞 Ca²⁺通道电流 I-V曲线左移 10-20 mV。贺锡文等(1997)报道氟戊菊酯 (Fenvalerate)和四钾菊酯(Tramethrin)对电压 门控 Ca²⁺通道的影响表现为低剂量激活高剂量抑 制,但激活作用较弱,抑制作用明显。Neal等







B. The I_{peak} of K^+ channels after Gua.





表 3	戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 K
	通道激活的影响
Table 3	B Effects of Gua on the steady-state

activation of $I_{\rm V}$

activation of I _K						
条件	激活 Activation					
Condition	$V_{0.5}{}^a$	k^{b}	п			
对照 Control	22.15 ± 1.72	$21.10{\pm}0.74$	13			
10 μmol·L ⁻¹ 戊吡虫胍 10 μmol·L ⁻¹ Gua	31.72±1.07*	22.31±0.78	7			
100 µmol·L ⁻¹ 戊吡虫胍 100 µmol·L ⁻¹ Gua	29.35±1.55	24.16±1.93	4			

(2010)研究发现丙烯菊酯(I型拟除虫菊酯类 杀虫剂)致使大鼠 PC12 细胞 L型 Ca²⁺通道的激

活和失活发生显著性的改变,引起电压门控 Ca²⁺ 通道峰值电流、晚电流和尾电流的增加。Von 等 (2013)揭示氢氟虫腙等缩氨基脲类杀虫剂是通 过选择性的结合在钠离子通道上,阻断钠离子通 过轴突膜,进而抑制神经冲动,导致害虫死亡。而 新烟碱类杀虫剂的主要作用机制不同于拟除虫 菊酯和缩氨基脲类这两种杀虫剂,其主要是通过 选择性控制昆虫神经系统烟碱型乙酰胆碱酯酶 受体,阻断昆虫中枢神经系统的正常传导,从而 导致害虫出现麻痹进而死亡(张梅凤等,2009)。 Nishimura 等(1994) 用美洲蜚蠊 Periplaneta americana 和蝗虫所做的电生理实验揭示吡虫啉 及其类似化合物可以增强神经突触后电位。但是 目前由于这些农药的不科学使用,棉铃虫神经敏 感型降低导致对其产生了严重的抗药性(Ahmad et al., 1989)。因此新型杀虫剂的研发就成为害 虫防治的迫切之需。戊吡虫胍是一种从烟碱类和 缩氨脲类杀虫剂活性结构拼接而成的系列化合 物中筛选出来的新型杀虫剂,兼具新烟碱类和钠 离子通道抑制剂的活性特点。有相关文献提到该 杀虫剂在大田实验验证发现其对棉铃虫、甜菜夜 蛾 Spodoptera exigua Hübner 等鳞翅目害虫具有 良好的防治效果 (Qi et al., 2013)。李冬植等 (2006)的研究结果表明戊吡虫胍防治蚜虫和褐

飞虱效果优于吡虫啉,对其他土壤动物、水生生物、意大利蜜蜂和鸟类日本鹌鹑均低毒。特别是 对蜜蜂的毒性远远低于目前市场的新烟碱类杀 虫剂。但是目前对于戊吡虫胍这类新型杀虫剂究 竟如何影响离子通道,通道门控特性及其功能是 如何变化,从而导致害虫致死目前尚未见报道。

本实验通过全细胞膜片钳技术从电压依赖 性激活和失活等角度探究了新型杀虫剂戊吡虫 胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道门控特性的 修饰效应。实验结果表明戊吡虫胍作用后的 Ca²⁺ 通道激活曲线明显向超极化方向移动,半数激活 电压 V0.5 向负电位方向移动, 与对照相比均具有 显著性统计学差异。表明戊吡虫胍作用之后, Ca²⁺通道可以在更负的电位下被激活。此外,戊 吡虫胍作用后 Ca²⁺通道的稳态失活曲线均向负 电位方向移动。说明戊吡虫胍作用后 Ca2+通道在 较负的电位下即失活。同时,戊吡虫胍对 Ca²⁺ 通道激活和稳态失活电压依赖性的影响,使得棉 铃虫神经细胞的 Ca²⁺通道窗口电流向负电位方 向移动,且区域面积和对照相比均增大。随着浓 度的增加,区域面积增加的幅度减小。这显示戊 吡虫胍使得 Ca²⁺通道的激活和失活都提前,即在 较低的电位下开始激活和失活。表明,在一定的 测试电压下,药物作用后处于激活状态的 Ca²⁺ 通道数目增多,增加了其开放频率。另外,戊吡 虫胍有效的抑制了棉铃虫 Ca²⁺通道的峰值电流。 但仔细分析发现峰值电流在 1 μ mol·L⁻¹ Gua 作 用后降低幅度最大。当增加药物浓度时,峰值电 流呈现增加的趋势。这不仅说明戊吡虫胍对 Ca²⁺ 通道的作用具有浓度依赖性,也进一步说明当药 剂浓度增加时,药剂与全细胞膜上 Ca2+通道的结 合达到饱和状态,促进 Ca²⁺通道的开放,同时使 通道关闭延迟,从而促使峰值电流增加。而 Ca²⁺ 通道的持续开放势必会增加 Ca²⁺的内流, 促进动 作电位的形成,同时胞内 Ca²⁺浓度的增加会刺激 神经细胞轴突末端囊泡内的兴奋性神经递质的 释放,引起神经细胞乃至整个神经系统兴奋性的 增加。以上实验结果与溴氢菊酯对 Ca²⁺通道的修 饰效应类似(商学良, 2014)。这个结果表明棉 铃虫中枢神经细胞 Ca²⁺通道是戊吡虫胍的作用

靶标之一,为戊吡虫胍的科学使用提供了理论 基础。

对于杀虫剂对电压门控 K⁺通道的影响主要 集中在拟除虫菊酯类杀虫剂上。刘安西和陈守同 (1990)用油间隙和电压钳等方法研究了氯氰菊 酯对黑胸大蠊 *Periplaneta fulginosa* 神经细胞钠 钾通道的调制作用,发现药物可以阻滞迟缓钾通 道并降低钾电流的峰值。Salgado(1992)用蔗 糖间隙记录法记录蜚蠊神经节突触传递的实验 证实 RH-5849 能够延长兴奋性突触后电位,引起 轴突冲动反复发放,实验表明它阻断了慢钾电流, 而对快钾通道电流影响甚小。Wang 等(2006a) 发现三氟氯氰菊酯作用于棉铃虫神经细胞钾离 子通道后,瞬时外向钾电流没有明显的变化,而 延迟整流钾电流被显著抑制(Wang *et al.*, 2006b)。关于电压门控 K⁺通道是否为新型杀虫 剂的作用靶标鲜有报道。

本实验利用全细胞膜片钳技术发现, 戊吡虫 胍能够改变棉铃虫神经细胞 K⁺通道激活曲线的 半数激活电压, 使其向去极化方向移动, 致使 K⁺通道需在较高电位下才能被激活。同时戊吡虫 胍能够有效抑制 K⁺通道的峰值电流。但随着药 物浓度的增加, 抑制作用减小。这表明高浓度的 戊吡虫胍可导致动作电位延长, 峰值电流增加。 钾通道的电生理特性的改变, 会关系到动作电位 的发生, 从而影响细胞的兴奋性, 因此, 棉铃虫 神经细胞上的钾通道是戊吡虫胍的作用靶标之 一。但是由于钾离子通道种类很多, 戊吡虫胍具 体作用于哪一种钾离子通道还需要进一步的电 生理实验验证。

参考文献 (References)

- Ahmad M, Gladwell RT, McCaffery AR, 1989. Decreased nerve sensitivity is a mechanism of resistance in a pyrethroid resistant strain of *Heliothis armigera* from Thailand. *Pesticide Biochemistry* and Physiology, 35(2): 165–171.
- Ahmad M, McCaffery AR, 1991. Elucidation of detoxication mechansims involved in resistance to insecticides in the third instar larvae of field-selected strain of *Helicoverpa armigera* with the use of synergists. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 41(1): 41–52.
- Bloomquist JR, 1996. Ion channels as targets for insecticides. Annual

Review of Entomology, 41: 163-190.

- Cao Z, Shafer TJ, Murray TF, 2010. Mechanisms of pyrethroid insecticide-induced stimulation of calcium influx in neocortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336(1): 197–205.
- Clark JM, Symington SB, 2007. Pyrethroid action on calcium channels: Neurotoxicological implications. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1): 3–6.
- Hamill OF, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ, 1981. Improved patch clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2): 85–100.
- He BJ, Chen JT, Guo SY, Rui HH, Meng XQ, Wang XL, Wang YN, Sun JS, Liu AX, 2001. Nerve cell culture and ultrastrucal analysis of central nerve genglia from resistant *Helicoverpa armigera*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 34(1): 30–36. [贺秉军, 陈家童, 郭世宜, 芮黄辉, 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 BJ, Liu AX, Chen JT, Sun JS, Rui CH, 2002. Study on the mechanism of action of cyhalothrin on sodium and calcium channels of nerve cells from *Helicoverpa armigera*. Acta Biophysica Sinica, 18(2): 201–205. [贺秉军, 刘安西, 陈家童, 孙金生, 芮昌辉, 2002. 三氟氯氰菊酯对棉铃虫神经细胞钠及 钙通道作用机理研究. 生物物理学报, 18(2): 201–205.]
- He XW, Yin RY, Chen YH, LV J, Xie ZP, He FS, 1997. Effect of pyrethroids on Na⁺、Ca²⁺ channel currents in rat brain neurons. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 15(5): 261–264. [贺锡文, 殷若元, 陈寅红, 吕京, 谢佐平, 何 风生, 1997. 拟除虫菊酯对神经细胞膜 Na⁺、Ca²⁺离子通道的 影响. 中华劳动卫生职业病杂志, 15(5): 261–264.]
- Li DZ, Wang K, Xu L, Chai TT, Cui F, Qiu LH, Zheng MQ, Qin ZH, Wang CJ, 2006. Acute toxicity of guadipyr to non-target organisms. Asian Journal of Ecotoxicology, 11(3): 331–337. [李 冬植, 王凯, 徐莉, 柴婷婷, 崔峰, 邱立红, 郑明奇, 覃兆海, 王成菊, 2006. 戊吡虫胍对几种非靶标生物的急性毒性. 生态 毒理学报, 11(3): 331–337.]
- Liu AX, Chen ST, 1990. Modified action of cypermethrin enantiomers on axonal sodium and potassium channels of *Periplaneta Fulginosa* (Serville). *Acta Entomologica Sinica*, 33(1): 1–6. [刘 安西,陈守同, 1990. 氯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.]
- Neal AP, Yuan Y, Atchison WD, 2010. Allethrin differentially modulates voltage-gated calcium channel subtypes in rat PC12 cells. *Toxicological Sciences*, 116(2): 604–613.
- Nishimura K, Kanda Y, Okazawa A, Ueno T, 1994. Relationship between insecticidal and neyrophysiological activities of imidacloprid and related compounds. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 50(1): 51–59.
- Qi SZ, Wang C, Chen XF, Qin ZH, Li XF, Wang CJ, 2013. Toxicity

assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.013.

- Rao GV, Rao KS, 1997. Modulation of K⁺ transport across synaptosomes of rat brain by synthetic pyrethroids. *Journal of the Neurological Sciences*, 147(2): 127–133.
- Salgado VL, 1992. The neurotoxic insecticidal mechanism of the nonsterodial ecdysone agonist RH-5849: K⁺ channel block in nerve and muscle. *Pestic Biochem. Physiol.*, 43(1): 1–13.
- Shang XL, 2014. Effects of tefluthrin and deltamethrin on calcium channels and BK channels in central neurons isolated from *Helicoverpa armigera*. Master dissertation. Tianjin: Nankai University. [商学良, 2014. 七氟菊酯和溴氰菊酯对棉铃虫神 经细胞 Ca²⁺通道及 Ca²⁺激活 K⁺通道(BK)作用机理的研究. 硕 士学位论文. 天津: 南开大学.]
- Sheng CF, Xuan WJ, Su JW, Wang HT, 2001. A protracted disaster of cotton bollworm in China and the role of sex pheromone in the disaster reduction. *Journal of Natural Disasters*, 10(1): 75–79. [盛承发, 宣维健, 苏建伟, 王红托, 2001. 棉铃虫灾害 的长期性及性信息素的减灾控害作用. 自然灾害学报, 10(1): 75–79.]
- Soderlund DM, Clark JM, Sheets L P, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML, 2001. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1): 3–59.
- Su W, Zhou Y, Ma Y, Wang L, Zhang Z, Rui C, Duan H, Qin Z, 2012. N'-Nitro-2-hydrocarbyliden-ehydrazinecarboximidamides: Design, synthesis, crystal structure, insecticidal activity, and structureactivity relationships. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 60(20): 5028–5034.
- Von Stein RT, Silver KS, Soderlund DM, 2013. Indoxacarb, metaflumizone, and other sodium channel inhibitor insecticides: Mechanism and site of action on mammalian voltage-gated sodium channels. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3): 101–112.
- Wang Y, He BJ, Zhao Q, Liang Z, Liu AX, 2006a. Effects of cyhalothrin on the transient outward potassium current in central neurons of *Helicoverpa armigera*. *Insect Science*, 13(1): 13–17.
- Wang Y, He BJ, Wu CL, Liu AX, 2006b. Inhibition effects of cyhaliothrin on the delayed rectifier potassium current in the central neurons of *Helicoverpa armigera*. Acta Entomologica Sinica, 49(2): 235–240.
- Zhang MF, Fan JY, Zhang HW, Zhang XZ, Ma XG, 2009. Research development of studies on neonicotinoid insecticides. World Pesticides, 31(1): 34–37, 64. [张梅凤, 范金勇, 张宏伟, 张秀 珍, 马新刚, 2009. 新烟碱类杀虫剂的研究进展. 世界农药, 31(1): 34–37, 64.]