

DPH 标记法研究杀虫剂对二化螟线粒体膜流动性的影响^{*}

李海平^{1,2} 史学岩¹ 梁 沛¹ 高希武^{1**}

(1. 中国农业大学昆虫学系 北京 100193; 2. 内蒙古农业大学农学院 呼和浩特 010019)

摘 要 以 DPH 为荧光探针,采用荧光偏振法研究了几种常用农药对二化螟 *Chilo suppressalis* (Walekr) 线粒体膜流动性的影响。结果表明,DPH 是一种有效的荧光探针,可以用来研究线粒体膜脂的流动性。不同种类的农药对二化螟线粒体膜的流动性都有一定的影响,但是以三氟氯氰菊酯、高效氯氰菊酯和硫丹影响较大,甲胺磷、三唑磷和克百威影响较小。三氟氯氰菊酯和高效氯氰菊酯可使膜的流动性下降,而硫丹、甲胺磷、三唑磷和克百威则使膜的流动性增强。对膜影响较大的三氟氯氰菊酯和硫丹对膜流动性的影响,还存在一定的剂量-效应关系。另外,膜的流动性受温度的影响很大,在温度分别为 17、27、37℃ 的条件下,在药剂浓度为 1×10^{-4} mol/L 时,甲胺磷在 3 个温度下对膜的流动性影响都很小,在误差范围内几乎没有影响;硫丹不同温度下都使膜的流动性增强,而三氟氯氰菊酯则使膜的流动性降低。

关键词 二化螟, 线粒体膜, DPH, 流动性, 杀虫剂

Effects of insecticides on mitochondrial membrane fluidity of *Chilo suppressalis* measured by a fluorescent DPH probe

LI Hai-Ping^{1,2} SHI Xue-Yan¹ LIANG Pei¹ GAO Xi-Wu^{1**}

(1. Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Department of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract The effects of some insecticides on the fluidity of the mitochondrial membrane in *Chilo suppressalis* (Walker) was measured using DPH as a fluorescent probe. The results show that DPH was an effective fluorescent probe with which to study mitochondrial membrane fluidity in *C. suppressalis*. Cyhalothrin, alphamethrin and endosulfan had a greater effect on membrane fluidity than ethamidophos, triazophos and carbufuran. Membrane fluidity was increased by Cyhalothrin and alphamethrin, but decreased by the other tested insecticides. On the other hand, membrane fluidity was also affected by temperature. The effects of cyhalothrin, endosulfan and ethamidophos on mitochondrial membrane fluidity were measured at three different temperatures (17, 27 and 37℃) at insecticide concentrations of 1×10^{-4} mol/L. Membrane fluidity was increased by endosulfan, decreased by cyhalothrin and relatively unaffected by ethamidophos, within the range of temperatures tested.

Key words *Chilo suppressalis*, mitochondrial membrane, fluorescence probe (DPH), fluidity, insecticides

细胞膜的正常生理功能有赖于膜结构的完整和膜脂的恒定流动,流动性是生物膜结构的基本特征,细胞膜的流动性是其重要的动力学特征。研究膜脂流动性的方法很多,可以用差示扫描量热法(DSC)、X 射线衍射、电子自旋共振(ESR)及

荧光偏振等方法,从不同角度对膜的流动性进行研究。其中荧光偏振法比较简便,测出的参数—荧光偏振度能够定量地描述膜脂流动性,是一种最为常见的方法。用于研究膜脂流动性的荧光探针有很多种,其中 DPH (1, 6-Diphenyl-1, 3, 5-

^{*} 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(201103012)。

^{**} 通讯作者, E-mail: gaoxiwu@263.net.cn

收稿日期:2012-02-06,接受日期:2011-02-28

hexatriene)被认为是一种比较敏感的用于研究膜脂流动性的荧光探针。

有研究表明,杀虫剂可与非能化态的生物膜发生作用而改变膜脂的流动性,从而增加膜对 K^+ 、电解质、非电解质及离子载体复合物的通透性。杀虫剂对生物膜的毒性效应主要表现在 2 个方面:一是对膜生化性质的影响,其中主要是对脂膜(如 ATPase)的影响;二是对膜通透性及生物物理性质的影响,其中主要是对膜流动性的影响。从目前发表的文献资料看,对膜脂流动性影响的研究主要集中在医学领域,研究药剂对高等动物的生物膜及人工膜的影响(唐促跃等,1988,1989a,1989b; Sarkar *et al.*, 1993; Braguini *et al.*, 2004)。而农药对昆虫膜脂流动性的研究却很少。所以我们选择几种常用的杀虫药剂和农业上重要的害虫二化螟 *Chilo suppressalis* (Walker),更进一步地研究农药对昆虫膜脂流动性的影响。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

二化螟为室内人工饲养。饲养条件: $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, RH 80% ~ 90%, 光周期 L: D = 16: 8。

1.2 供试药剂及试剂

96.4% 三氟氯氰菊酯原药和 93.2% 高效氯氰菊酯原药,为江苏扬农化工股份有限公司提供; 80.5% 三唑磷原药,浙江永农化工有限公司提供; 70% 甲胺磷原药,江苏省苏州化工农药集团公司提供; 97% 呋喃丹原药,江苏省海安农药厂提供; 90% 硫丹原药,江苏省如东农药厂提供。DPH (1, 6-Diphenyl-1, 3, 5-hexatriene) 1, 6-二甲基-1, 3, 5-己三烯, Fluka 公司产品, 纯度 98%; 牛血清白蛋白 (BSA), 美国 Sigma 公司产品, 纯度 99%; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 二化螟线粒体膜的提取

取二化螟 4 龄幼虫,用玻璃匀浆器按 18 头/2 mL 冷蔗糖提取液 (pH 7.4, 1 L 缓冲液中含 Tris 1.21 g、EDTA 0.0372 g、蔗糖 3.42 g、NaCl 8 g, BSA 0.5%) 在冰浴条件下匀浆,匀浆液在 4°C , 3 000 g 离心 10 min, 取上清液, 在 10 000 g 离心 30 min, 弃去上清液, 用上述冷蔗糖提取液悬浮沉淀, 再次离心, 最后制得的线粒体沉淀用相同提取液悬浮备用。所有操作均在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 进行。

1.4 DPH 的制备

参照林克椿等 (1981) 的方法。DPH 使用前, 先配以四氢呋喃作溶剂, 浓度为 2×10^{-3} mol/L 的储备液, 低温保存在棕色瓶中, 可使用 1 个月。试验需要的 DPH 溶液, 于使用前新鲜配制, 用 PBS (0.01 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.4; 0.14 mol/L NaCl) 稀释储备液, 使 DPH 浓度为 2×10^{-6} mol/L。因四氢呋喃为有机溶剂, 配制 2×10^{-6} mol/L 溶液时, 需猛烈震荡 5 ~ 10 min。

1.5 荧光探针标记

将线粒体悬浮液加入到缓冲液中, 调整蛋白含量为 250 ~ 300 $\mu\text{g/mL}$, 再加 2 mL 2×10^{-6} mol/L DPH 荧光探针, 反应总体积为 4 mL, 在 25°C 下温育 30 min 即可。

1.6 荧光偏振度的测定

用 Perkin-Elmer 公司 LC-55 型荧光分光光度计 (带偏振附件) 测定线粒体膜的偏振度。激发波长 362 nm, 发射波长 432 nm, 狭缝宽度 10 nm, 用恒温水浴控制测试温度。以不加 DPH 溶液的线粒体悬浮液测定体系作为对照, 以消除散射光和其它因素的影响。按照以下公式计算荧光强度 F 和偏振度 P :

$$F = I_{\parallel} + 2I_{\perp}, P = \frac{I_{\parallel} - G I_{\perp}}{I_{\parallel} + G I_{\perp}}, G: \text{校正因子 } G = I_{HV}/I_{HH}I_{HV}。$$

$I_{\parallel}$: 起偏器光轴为垂直方向, 检偏器光轴也为垂直方向时所测的荧光强度; $I_{\perp}$: 起偏器光轴为垂直方向, 检偏器光轴为水平方向时所测的荧光强度; I_{HV} : 起偏器光轴为水平方向, 检偏器光轴为垂直方向时所测的荧光强度; I_{HH} : 起偏器光轴为水平方向, 检偏器光轴为水平方向时所测的荧光强度。

1.7 蛋白质含量的测定

参照 Bradford (1976) 考马斯亮蓝 G-250 法, 用牛血清白蛋白 (BSA) 测定蛋白质含量, 绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 DPH 与二化螟线粒体膜结合后荧光光谱的变化

DPH、DPH 标记的二化螟线粒体膜以及二化螟线粒体膜的激发光谱和荧光光谱如图 1 所示。DPH 溶液的激发峰值为 382 nm, 荧光峰值为 442 nm, 荧光强度很小。DPH 放大后的激发光谱和荧

光光谱见图 2。二化螟线粒体膜用 DPH 标记后, 激发峰值出现蓝移, 由 382 nm 移至 360 nm, 荧光峰值出现蓝移, 由 442 nm 移至 430 nm, 荧光强度比单纯 DPH 溶液增大 30 倍(图 1)。由荧光理论可知, 在极性溶剂中, 由于被激发分子处于 Franck-Condon 激发态很不稳定, 很快回到平衡激发态而消耗能量, 而在非极性溶剂中或极性较小的溶剂中, 无此现象或消耗能量较小。因此, 发荧光的分子, 当它由极性溶剂转到非极性溶剂或极性较小的溶剂时, 荧光峰值往往出现蓝移。由此可见, DPH 结合在脂肪分子上非极性的烃链区。DPH 掺入到细胞膜脂的烃链区以后, 介质粘度变大, 顺反异构受到抑制, 成为全反构型即唯一能发荧光的构型。由于 DPH 分子长轴接近于和脂肪链分子长轴平行, 所以荧光偏振度能很好地反映膜脂区域的微粘度。

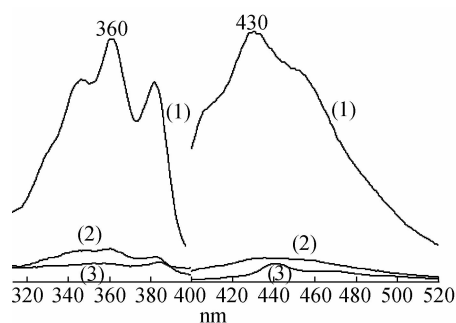


图 1 DPH、二化螟线粒体膜、DPH 标记的二化螟线粒体膜的激发光谱和荧光光谱

Fig.1 Excitation and fluorescence spectrum of DPH membrane and mitochondria membrane by DPH

左 left—激发光谱 excitation spectrum

右 right—荧光光谱 fluorescence spectrum

狭缝 Slit10, $10\lambda_{em}; 382\text{ nm}$ $10\lambda_{ex}; 442\text{ nm}$

(1) 二化螟线粒体膜用 DPH 标记后的激发光谱和荧光光谱 excitation and fluorescence spectrum of mitochondria membrane by DPH ,

(2) 二化螟线粒体膜的激发光谱和荧光光谱 excitation and fluorescence spectrum of mitochondria membrane ,

(3) DPH 溶液激发光谱和荧光光谱 excitation and fluorescence spectrum of DPH。(DPH 放大后见图 2)

2.2 线粒体与 DPH 温育时间与荧光强度及荧光偏振度的关系

荧光偏振度在反应 10 min 前, 增加很快, 10 ~

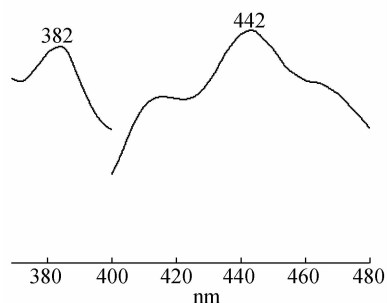


图 2 DPH 溶液放大激发光谱和荧光光谱

Fig.2 Excitation and fluorescence spectrum of DPH

左 left—激发光谱 excitation spectrum

右 right—荧光光谱 fluorescence spectrum

狭缝 Slit10, $10\lambda_{em}; 382\text{ nm}$ $10\lambda_{ex}; 442\text{ nm}$

20 min 间增加较慢, 20 ~ 30 min 后基本稳定在 0.22 min 左右, 不随时间的延长而加大, 不因为 DPH 进入而加大或降低, 所以偏振度能很好地反应膜脂的流动性, 是膜脂流动性的可靠参数(图 3)。

图 4 显示了荧光强度与温育时间的关系。30 min 前荧光强度加大快, 30 min 后, 缓慢增加。因

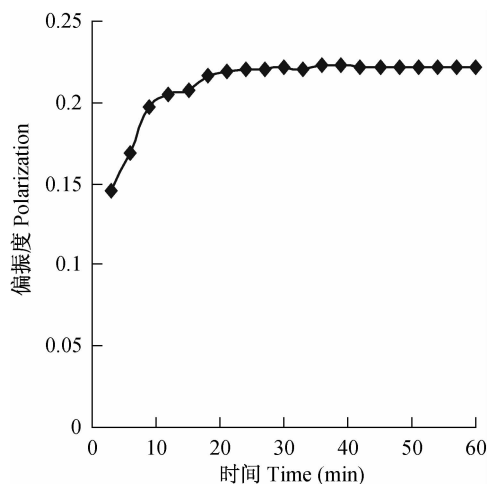


图 3 荧光偏振度与温育时间的关系

Fig.3 Relationship of polarization and incubated time

为线粒体膜是生物材料, 所以以反应 30 min 为好。

2.3 不同杀虫剂对二化螟线粒体膜流动性的影响

不同杀虫剂对二化螟线粒体膜流动性的影响

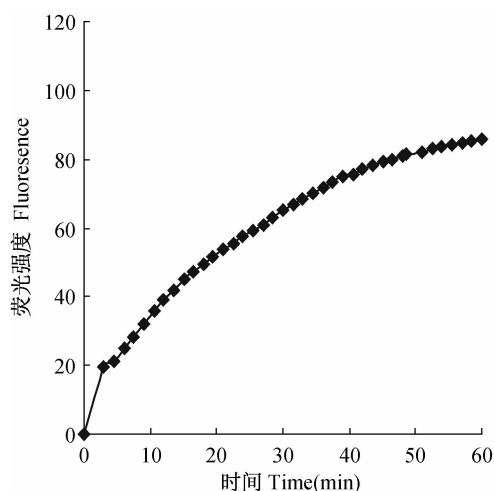


图 4 荧光强度与温育时间的关系

Fig. 4 Relationship of intensity and incubated time

见表 1。不同种类的杀虫剂对线粒体膜流动性的影响不同。三氟氯氰菊酯和高效氯氰菊酯属于拟除虫菊酯类杀虫剂,这 2 种药剂对线粒体膜流动性的影响较大,荧光偏振度 P 比对照要大,说明药剂降低了膜的流动性。硫丹属于有机氯杀虫剂,对二化螟线粒体膜流动性的影响与上述 2 种菊酯杀虫剂不同,荧光偏振度 P 值减小,硫丹增加了膜的流动性。三唑磷和甲胺磷属于有机磷杀虫剂,克百威属于氨基甲酸酯类杀虫剂,它们对线粒体膜的流动性也有一定的影响,可是影响很小,这可能与他们作用的靶表位点有关,这两类杀虫剂的作用靶标是乙酰胆碱酯酶,所以对膜的流动性影响很小。各向异性和微粘度也反应了相同的变化情况。

表 1 不同杀虫剂对 DPH 标记的二化螟线粒体膜流动性的影响

Table 1 Effects of insecticides on fluidity of mitochondria membrane in *Chilo suppressalis*

药剂 Insecticides *	偏振度 P Polarization	各向异性 γ Anistropy	微粘度 η Microviscosity
对照 CK	0.226 ± 0.002	0.161 ± 0.002	1.932
三氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	0.251 ± 0.002	0.182 ± 0.002	2.402
高效氯氰菊酯 Alphamethrin	0.233 ± 0.001	0.168 ± 0.001	2.053
硫丹 Endosulfan	0.213 ± 0.003	0.158 ± 0.003	1.725
甲胺磷 Methamidophos	0.223 ± 0.008	0.158 ± 0.003	1.882
三唑磷 Triazophos	0.223 ± 0.004	0.159 ± 0.003	1.882
克百威 Carbafuran	0.225 ± 0.001	0.160 ± 0.001	1.915

* :终浓度 Concentration: 1×10^{-4} mol/L.

2.4 三氟氯氰菊酯和硫丹对二化螟线粒体膜流动性影响的浓度效应关系

图 5 显示了 2 种杀虫剂对二化螟线粒体膜流动性影响的浓度效应关系。三氟氯氰菊酯可以降低膜的流动性,随着浓度的增加,对膜流动性的影响也增大。但在低浓度时 ($10 \sim 80 \mu\text{m}$),影响较小,高浓度时 ($80 \sim 100 \mu\text{m}$)影响大,偏振度 P 值增加很大,膜的流动性迅速降低。硫丹对流动性的影响与三氟氯氰菊酯正好相反,浓度越大,膜的流动性越增加。

2.5 药剂在不同温度下对二化螟线粒体膜流动性的影响

生物膜在不同温度下流动性不同,一般认为低温下膜的流动性小,高温下膜的流动性大。但不同药剂在不同温度下对膜的流动性影响不同

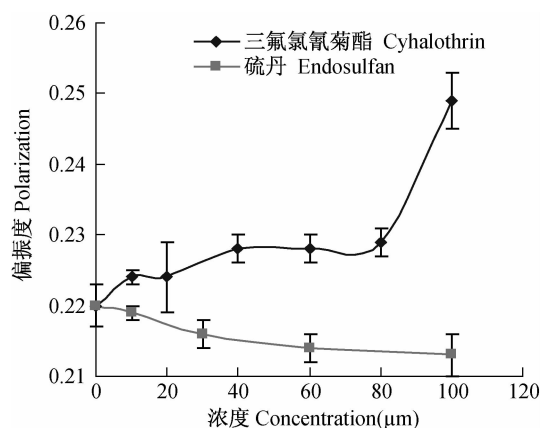


图 5 2 种药剂对二化螟线粒体膜流动性影响的浓度效应关系

Fig. 5 Effects of cyhalothrin and endosulfan on fluidity in different concentrations

(表 2)。甲胺磷在不同温度下对膜的流动性影响都比较小,在误差范围内和膜本身的流动性相同。三氟氯氰菊酯在高温下(37,27℃)对膜的影响较

大,而在低温下(17℃),对膜的影响较小。硫丹在不同温度下对线粒体膜的影响基本相同,不因温度的改变而变化。

表 2 不同温度下药剂对 DPH 标记的线粒体膜偏振度的影响

Table 2 Effects of insecticides on DPH polarization of mitochondria membrane in *C. suppressalis* in different temperatures

药剂 Insecticides	偏振度 Polarization		
	37℃	27℃	17℃
对照 CK	0.195 ± 0.002	0.212 ± 0.001	0.228 ± 0.003
三氟氯氰菊酯 Cyhalothrin	0.222 ± 0.004 (0.027) *	0.242 ± 0.004 (0.030)	0.252 ± 0.002 (0.024)
甲胺磷 Methamidophos	0.192 ± 0.002 (-0.003)	0.214 ± 0.004 (0.002)	0.227 ± 0.003 (-0.001)
硫丹 Endosulfan	0.189 ± 0.003 (-0.006)	0.206 ± 0.002 (-0.006)	0.224 ± 0.005 (-0.004)

注:() = 药剂影响后膜的偏振度值 - 对照膜的偏振度值。药剂浓度为 1×10^{-4} mol/L。

* : () = Polarization of mitochondria membrane effected by insecticides-polarization of mitochondria membrane checked. Concentration: 1×10^{-4} mol/L.

3 讨论

一般认为,膜脂流动性反映膜脂双层中磷脂分子的运动状态,包括侧向扩散、旋转异构运动、振荡伸缩运动、旋转以及在膜脂双层中的翻转运动等,而膜脂流动性是磷脂分子各种运动状态总和的平均表现(杨福愉,1981)。引起膜脂流动性改变的因素主要有 2 个,一是膜组成成分的改变,二是进入膜中的外源分子诱导膜有序结构紊乱,或影响膜蛋白和膜脂正常的相互作用。已有的研究已经证实,农药主要是通过和膜结构的相互作用而改变膜脂的流动性(唐促跃等,1989a,1989b;曾晓芃,1996)。

很多研究证实了杀虫剂和膜流动性的关系。Martins 等(2003)认为杀虫剂可以进入膜从而引起膜流动性的改变;Sarkar 等(1993)研究了溴氰菊酯对老鼠肝线粒体膜和人工合成膜的影响;Braguini 等(2004)研究了氰戊菊酯对老鼠脑突触体膜流动性的影响,结果表明这 2 种杀虫剂都可以改变膜的流动性。曾晓芃(1996)研究了几种杀虫剂对家蝇飞翔肌线粒体膜流动性的影响,I 型拟除虫菊酯杀虫剂可以增加膜的流动性,而 II 型拟除虫菊酯杀虫剂则降低膜的流动性,与唐促跃等(1988)的结论一致。本实验仅研究了三氟氯氰菊酯和高效氯氰菊酯(II 型)对二化螟线粒体膜流动性的影响,结果表明这 2 种药剂都可以降低膜的流动性,与他们的结果一致。Martins 等(2003)

研究了硫丹对真菌脂质体膜流动性的影响,证明硫丹在不同浓度下,都可以增加膜的流动性,与本实验的结论一致。

膜的流动性受很多因素的影响,其中温度是最主要的因素之一。一般认为拟除虫菊酯类杀虫剂具有负温度效应。Sparks 等(1982)认为,不含 α -氰基的拟除虫菊酯比含 α -氰基的拟除虫菊酯更趋向于负温度系数。但负温度系数受很多因素的影响,Scott 和 Georghiou(1984)认为膜脂溶性的差异是负温度系数的产生机制之一。曾晓芃等(1998)研究了几种菊酯类杀虫剂在不同温度下对家蝇飞翔肌线粒体膜流动性的影响,结果表明氯菊酯在低温下对膜荧光偏振度的影响大,而溴氰菊酯在高温下对膜流动性的影响更大。Li 等(2009)的研究也有和曾晓芃类似的结论,本实验结果中,三氟氯氰菊酯结构中含有 α -氰基,对膜脂流动性的影响表现为正温度系数。但 Braguini 等(2004)在研究氰戊菊酯对老鼠脑突触体膜流动性的影响时,却发现氰戊菊酯无论是对老鼠脑突触体膜还是人工膜,都是在低温下影响大,高温下影响小,表现为负温度系数。以上的研究说明温度对拟除虫菊酯类杀虫剂对膜流动性的影响可能比较复杂,除与拟除虫菊酯类杀虫剂的结构有关外,可能还受很多因素的影响,需要更进一步地研究。

参考文献 (References)

- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248—254.
- Braguini WL, Cadena SM, Carnieri EG, Rocha ME, de Oliveira MB, 2004. Effects of deltamethrin on function of rat liver mitochondria and on native and synthetic model membranes. *Toxicol. Lett.*, 152:191—202.
- Li HP, Feng T, Si XY, Liang P, Zhang O, Gao XW, 2009. Effects of pyrethroids and endosulfan on fluidity of mitochondria membrane in *Chilo suppressalis* (Walker). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 95:72—76.
- Martins JD, Monteiro JP, Antunes-Madeira MC, Jurado AS, Madeira VMC, 2003. Use of the microorganism *Bacillus stearothermophilus* as a model to evaluate toxicity of the lipophilic environmental pollutant endosulfan. *Biochem. Biophys. Acta*, 1617:595—601.
- Sarkar SN, Balasubramanian SV, Sikdar SK, 1993. Effect of fenvalerate, a pyrethroid insecticide on membrane fluidity. *Biochem. Biophys. Acta*, 1147:137—142.
- Scott JG and Georgiou GP, 1984. Influence of temperature on knockdown, toxicity and resistance to pyrethroids in the house fly, *Musca domestica*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21:53—62.
- Sparks TC, Shour MH, Wellemeyer EG, 1982. Temperature-toxicity relationships of pyrethroids on three lepidopterans. *J. Econ. Entomol.*, 75:643—646.
- 曾晓芃, 1996. 用荧光探针 DPH 研究家蝇线粒体膜脂流动性. 中国媒介生物学技控制杂志, 7(2):89—94.
- 曾晓芃, 马彦, 佟颖, 韩玉华, 薛素琴, 1998. 杀虫剂对家蝇线粒体膜脂流动性影响的研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 9(6):429—435.
- 林克椿, 聂松青, 薄慧卿, 乔玉兰, 1981. 用荧光探针 DPH 研究腹水细胞膜脂流动性. 生物化学与生物物理进展, 8(6):32—35.
- 唐促跃, 马谭庚, 刘毓谷, 1988. 氯菊酯和氯氰菊酯对大鼠红细胞膜流动性的影响. 环境科学学报, 8(4):500—504.
- 唐促跃, 马谭庚, 刘毓谷, 1989a. 两型拟除虫菊酯类杀虫剂对突触体膜流动性影响的研究. 卫生毒理学杂志, 3(3):146—149.
- 唐促跃, 马谭庚, 刘毓谷, 1989b. 氯菊酯和氯氰菊酯对突触体膜流动性影响的研究. 生物化学杂志, 6(5):80—90.
- 杨福愉, 1981. 生物膜的流动性. 生物化学与生物物理进展, 8(5):1—6.