

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)

摘 要 【目的】戊吡虫胍是将新烟碱类和缩氨基脲类杀虫剂杀虫活性部分重新组合的新型杀虫剂。但对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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 通道峰值电流 (I_{peak}) 有不同程度的降低。随着浓度增大 I_{peak} 降低有减小的趋势。此外, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 戊吡虫胍作用后钙离子的窗口电流 (I_{w}) 面积增加幅度较 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 Ca^{2+} 通道数目增多。另外, 其作用后电压门控钾通道 I_{peak} 降低。随着浓度增大 I_{peak} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of Guadipyr on Ca^{2+} and K^{+} channels were studied using the patch clamp technique. 【Results】All three concentrations of Guadipyr significantly ($P < 0.05$) shifted Ca^{2+} channel $I-V$ and activation curves about 10-15 mV in the negative direction. The inactivation curves of Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Guadipyr than by treatment with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The number of Ca^{2+} channels activated increased after Guadipyr treatment at a test voltage of -60 mV to $+10 \text{ mV}$. 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 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ to $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. $I-V$ 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 Ca^{2+} and K^{+} channels, and shift the activation and inactivation curves of these channels, thereby affecting the gating of Ca^{2+} channels and K^{+} channels. Therefore, Ca^{2+} 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基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^{+} 、 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 通道和 K^{+} 通道门控过程的影响, 旨在明确电压门控 Ca^{2+} 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, 然后背面向上小心剥离出腹神经索, 置于冰浴的生理溶液中去掉神经鞘。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, $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖, $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺, $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 2 h 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 Ca^{2+} 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 5 kHz 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 Ca^{2+} 电流的细胞外液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 100, CsCl 4, BaCl_2 5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2, Hepes 10, 葡萄糖 5, 4-AP 5, TEA-Cl 20, TTX $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaOH 调至 pH6.8。电极内液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): CsCl 120, $\text{Na}_2\text{-ATP}$ 5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2, EGTA 11, Hepes 5, CsOH 调至 pH6.8。电极电阻 3-5 M Ω 。

记录 K^{+} 电流的细胞外液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 148, KCl 5, CaCl_2 2, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1, Hepes 10, 葡萄糖 10, CdCl_2 0.5, TTX $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaOH 调至 pH6.8。电极内液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): KCl 150, $\text{Na}_2\text{-ATP}$ 0.2, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2, EGTA 10, Hepes 10, KOH 调至 pH6.8。电极电阻 3-5 M Ω 。

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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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} 。

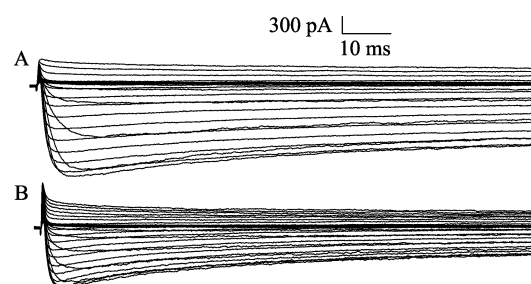


图 1 戊吡虫胍作用前后棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道电流

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

A. 对照; B. 戊吡虫胍 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用后的 I_{Ca} 。

A. Control; B. I_{Ca} after Gua ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.2 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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, Ca^{2+} 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

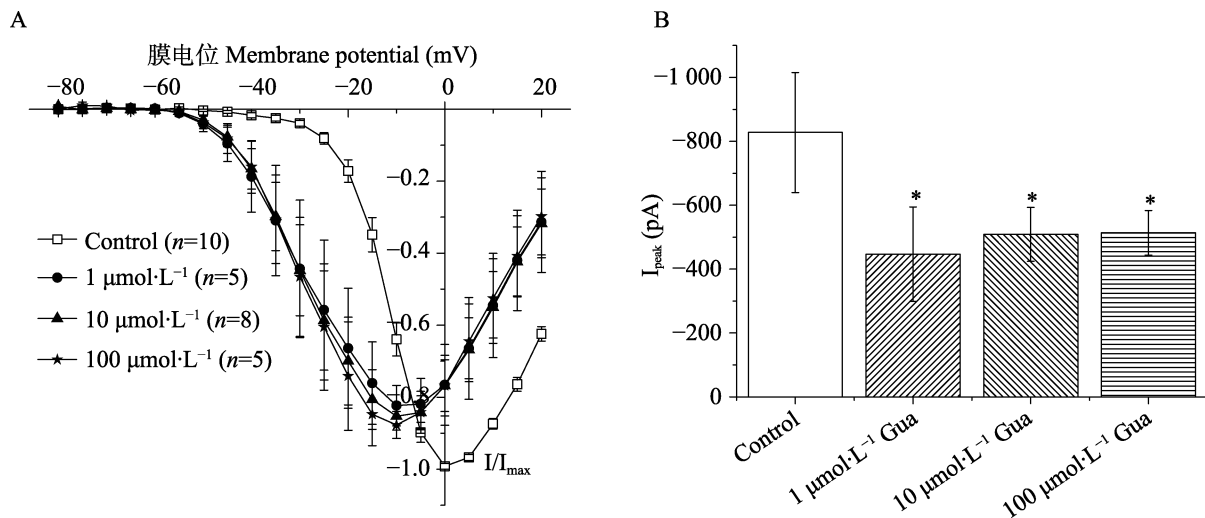


图 2 不同浓度戊吡虫胍作用下 Ca^{2+} 通道的 $I-V$ 曲线及 I_{peak}
Fig. 2 The $I-V$ curves and I_{peak} of Ca^{2+} channels before and after the application of Gua

A. 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道 $I-V$ 曲线的影响: 电流幅值标准化; B. 戊吡虫胍作用后 Ca^{2+} 通道 I_{peak} 变化。* 表示对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 $I-V$ curve of Ca^{2+} channels: Standardized current amplitude;

B. The I_{peak} of Ca^{2+} channels after Gua. * indicates 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 ($n=10$), $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后 I_{peak} 降为 (-446.79 ± 147.65) pA ($n=5$), $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后 I_{peak} 降为 (-508.75 ± 84.21) pA ($n=8$), $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后 I_{peak} 降为 (-513.44 ± 69.63) pA ($n=5$)。随着浓度升高 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 通道峰值电流。

2.3 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道电压依赖性激活的影响

Gua 对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道的激活不具有浓度差异性 (图 3)。1、10 和 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Gua 作用于 Ca^{2+} 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 $-10\ \text{mV}$, 激活电压由 $-30\ \text{mV}$ 降至 $-60\ \text{mV}$ 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, $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用后 $V_{0.5}$ 为 (-22.85 ± 5.02) mV, 向超极化方向

移动约 $13\ \text{mV}$ 。 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后 $V_{0.5}$ 为 (-23.45 ± 3.36) mV, 向超极化方向移动约 $14\ \text{mV}$ 。 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后 $V_{0.5}$ 为 (-24.21 ± 3.74) mV, 向超极化方向移动约 $15\ \text{mV}$ 。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 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Guadipyr 作用下的 Ca^{2+} 通道更容易被激活。 $V_{0.5}$ 和 k 的统计学差异见表 1。

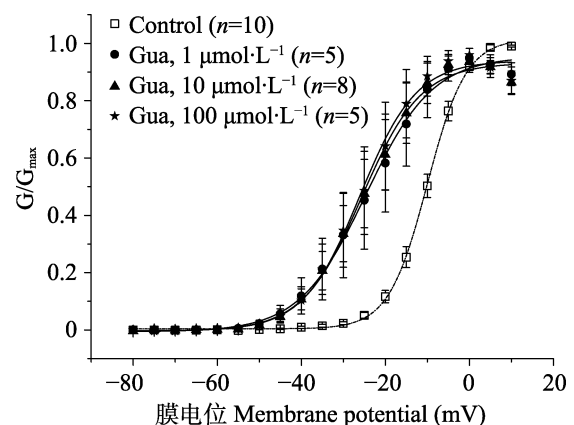


图 3 不同浓度戊吡虫胍对 Ca^{2+} 通道稳定性激活的影响
Fig. 3 Effects of Gua on the steady-state activation of I_{Ca}

表 1 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道稳定性激活的影响

Table 1 Effects of Gua on the steady-state activation of I_{Ca}

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

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; * indicates 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 Ca^{2+} 通道稳态失活的影响

Gua 对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道的稳态失活不具有浓度差异性 (图 4)。1、10 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用于 Ca^{2+} 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。

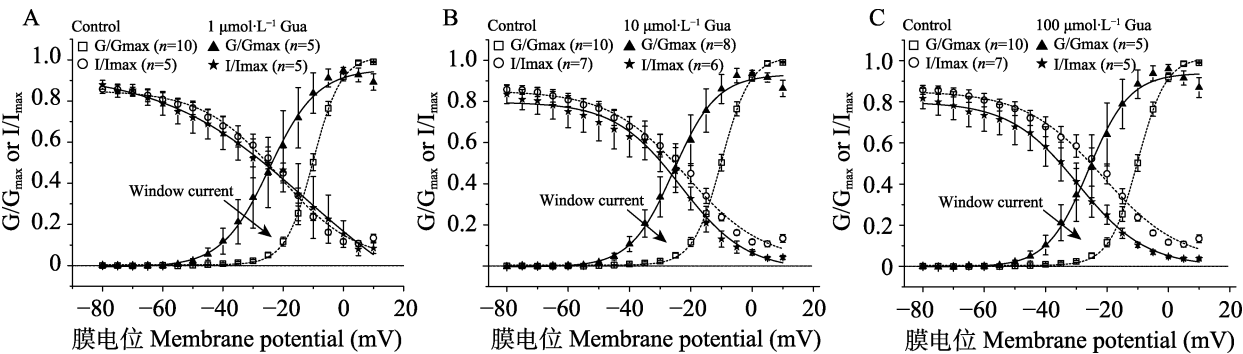


图 5 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道 Window current 的影响对比
Fig. 5 Comparative analysis about the effect of Gua on the Window current of I_{Ca}

A. $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊吡虫胍; B. $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊吡虫胍; C. $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊吡虫胍。
A. $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gua; B. $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gua; C. $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gua.

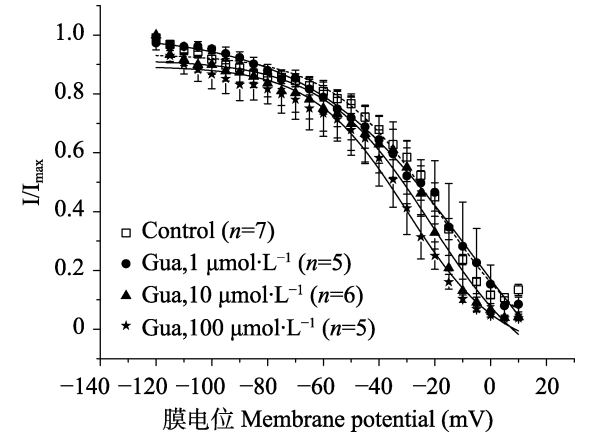


图 4 不同浓度戊吡虫胍对 Ca^{2+} 通道失活的影响
Fig. 4 Effects of Gua on the steady-state inactivation of I_{Ca}

表 2 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道失活的影响

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

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

2.5 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 Ca^{2+} 通道 Window current 的影响

图 5 显示的是不同浓度 Gua 诱发的激活和

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, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后面积变为 11.65, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后为 10.34, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后为 8.81。其中 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 $+60 \text{ mV}$, 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。

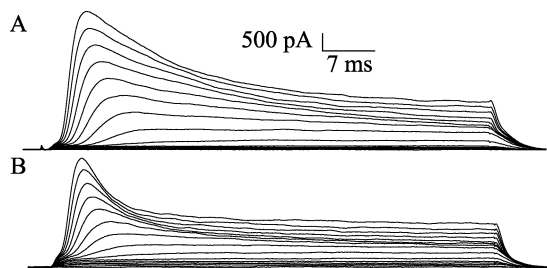


图 6 戊吡虫胍作用前后棉铃虫中枢神经细胞 K^{+} 通道电流

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

A. 对照; B. 戊吡虫胍 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用后的 I_K 。

A. Control; B. I_K after Gua ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

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 $I-V$ 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} 降低有减小的趋势。其中对照组 I_{peak} 为 ($3\,534.33 \pm 733.58$) pA ($n=13$), $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua 作用后 I_{peak} 分别降为 ($2\,690.35 \pm 372.04$) pA ($n=7$)、($3\,318.29 \pm 604.46$) pA ($n=4$) (图 7: B)。经单因素方差分析 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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

$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 , $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 ($P < 0.05$)。 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 Ca^{2+} 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) 能引起抗性敏感棉铃虫神经细胞 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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

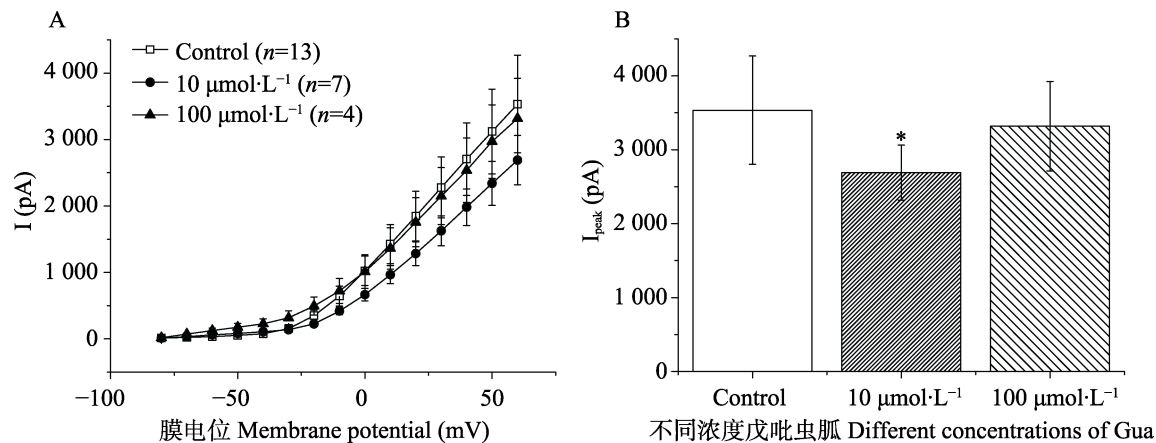


图 7 不同浓度戊吡虫胍作用下 I_K 的 $I-V$ 曲线及 I_{peak}

Fig. 7 The $I-V$ curves and I_{peak} of I_K before and after the application of Gua

A. 不同浓度戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 K^+ 通道 $I-V$ 曲线的影响: 电流幅值未标准化;
B. 戊吡虫胍对棉铃虫中枢神经细胞 K^+ 通道电流的峰值影响。

A. Gua's effects on the $I-V$ curve of K^+ channels: Current amplitude is not standardized;
B. The I_{peak} of K^+ channels after Gua.

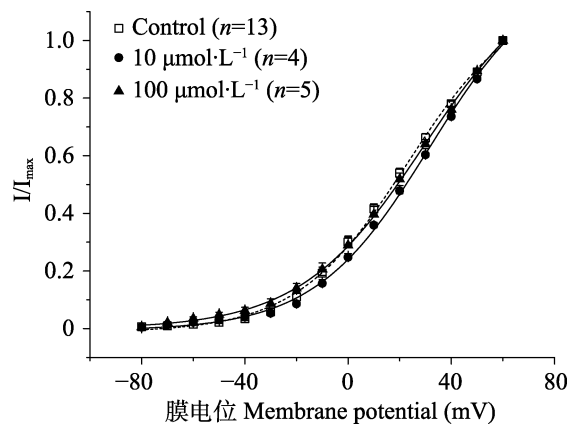


图 8 不同浓度戊吡虫胍对 K^+ 通道稳定性激活的影响

Fig. 8 Effects of Gua on the steady-state activation of I_K

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 Effects of Gua on the steady-state activation of I_K				
条件 Condition	激活 Activation			n
	$V_{0.5}^a$	k^b		
对照 Control	22.15±1.72	21.10±0.74		13
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 戊吡虫胍 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Gua	31.72±1.07*	22.31±0.78		7
100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 戊吡虫胍 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 Ca^{2+} 通道的激

活和失活发生显著性的改变,引起电压门控 Ca^{2+} 通道峰值电流、晚电流和尾电流的增加。Von 等 (2013) 揭示氢氟虫脒等缩氨基脒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脒类这两种杀虫剂,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基脒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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 通道激活曲线明显向超极化方向移动,半数激活电压 $V_{0.5}$ 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, Ca^{2+} 通道可以在更负的电位下被激活。此外,戊吡虫胍作用后 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 通道在较负的电位下即失活。同时,戊吡虫胍对 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 通道的峰值电流。但仔细分析发现峰值电流在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 通道的结合达到饱和状态,促进 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 通道的持续开放势必会增加 Ca^{2+} 的内流,促进动作电位的形成,同时胞内 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 fuliginosa* 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 mechanisms 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. *Pflügers 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 ultrastructural analysis of central nerve ganglia 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^+ 、 Ca^{2+} 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.]
- 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 Fuliginosa* (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 neurophysiological 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 chitinase 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 nonsteroidal 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 Ca^{2+} 通道及 Ca^{2+} 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 structure-activity 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 cyhalothrin 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.]