

氯虫酰胺对甜菜夜蛾神经元钠离子 通道电流的影响

郭直岳¹, 王国红¹, 甄 静², 贺秉军³

(1. 新乡医学院 生理与神经生物学教研室, 河南 新乡 453003;

2. 河南省微生物工程重点实验室, 河南 郑州 450008; 3. 南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 为了研究新型杀虫剂氯虫酰胺对甜菜夜蛾(*Laphygma exigua*)的杀虫机制,应用全细胞膜片钳技术记录了氯虫酰胺对急性分离的甜菜夜蛾幼虫中枢神经细胞电压门控钠离子通道的影响。结果显示,在电压钳模式下,0.1 g/L 药物作用 1 min、5 min、15 min 后平均钠离子通道电流峰值分别是 (-9.627 ± 0.114) nA、 (-11.668 ± 0.131) nA、 (-8.726 ± 0.398) nA。在电流钳模式下,0.4 g/L 药物作用 1 min、3 min、5 min 后动作电位峰值分别为 (94.366 ± 4.596) mV、 (90.363 ± 2.258) mV、 (83.15 ± 2.959) mV,时程分别为 (5.025 ± 0.884) ms、 (6.032 ± 0.073) ms、 (6.387 ± 0.376) ms,药物作用 10 min 后只能产生电紧张,无法发放动作电位。以上结果表明,氯虫酰胺对钠电流的作用明显具有时间依赖性,0.1 g/L 药物初始可增加钠离子通道电流峰值,但随用药时间延长效果减弱。高质量浓度氯虫酰胺可时间依赖性地降低动作电位峰值和延长时程,降低细胞膜兴奋性。甜菜夜蛾中枢神经细胞钠离子通道是氯虫酰胺药物的作用靶标之一。

关键词: 氯虫酰胺; 甜菜夜蛾; 神经元; 钠离子通道; 膜片钳技术

中图分类号: S481⁺.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)10-0079-05

Effects of Chlorantraniliprole on Sodium Channel Currents of Central Neurons from *Laphygma exigua*

GUO Zhi-yue¹, WANG Guo-hong¹, ZHEN Jing², HE Bing-jun³

(1. Department of Physiology and Neurobiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

2. Henan Key Laboratory of Microbial Engineering, Zhengzhou 450008, China;

3. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: In order to study the insecticidal mechanism of the new insecticide chlorantraniliprole on *Laphygma exigua*, the effects of chlorantraniliprole on sodium channel currents of acutely isolated central neurons from *Laphygma exigua* were studied using whole-cell patch clamp technique. The results showed that after application of chlorantraniliprole (0.1 g/L), the current spike was (-9.627 ± 0.114) nA in 1 minute, (-11.668 ± 0.131) nA in 5 minutes, (-8.726 ± 0.398) nA in 15 minutes. In current clamp mode, after application of the drug (0.4 g/L) the action potential spike was (94.366 ± 4.596) mV in 1 minute, (90.363 ± 2.258) mV in 3 minutes, (83.15 ± 2.959) mV in 5 minutes. The duration was prolonged from (5.025 ± 0.884) ms in 1 minute to (6.032 ± 0.073) ms in 3 minutes to (6.387 ± 0.376) ms in 5 minutes. After 10 min of drug action, only electric tension was produced, with no action potential. The results indicated that chlorantraniliprole changed the inward sodium current in a concentration-dependent manner. After

收稿日期: 2013-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071714); 天津市动植物抗性重点实验室开放基金项目

作者简介: 郭直岳(1983-), 女, 河南新乡人, 助教, 硕士, 主要从事神经电生理学研究。E-mail: zhiyueguo@126.com

treatment with the drug of 0.1 g/L, the current peak was increased in the beginning, and then reduced slowly. The decrease of action potential spike and the extension of the duration maybe result from the inhibition effects of chlorantraniliprole on the sodium currents. In conclusion, the sodium channel in central neurons of *Laphygma exigua* was one of the action targets of chlorantraniliprole.

Key words: chlorantraniliprole; *Laphygma exigua*; central neuron; sodium channel; patch clamp technique

甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* Hübner)属鳞翅目夜蛾科,是一种世界性害虫,主要危害甜菜、棉花、玉米等 100 多种作物^[1-2]。自 1986 年以来,甜菜夜蛾在我国的成灾频率和发生程度越来越重,已成为制约我国农业生产发展的一种重要害虫^[3-4]。氯虫酰胺(Chlorantraniliprole)商品被引入我国市场将在很大程度上缓解这一问题。氯虫酰胺具有良好的渗透性、优异的内吸性、极高的杀虫活性、药效期长等优异特性,对鳞翅目害虫具有优异的杀灭活性^[5]。尤其是它作用机制独特,与传统杀虫剂无交互抗性,对哺乳动物安全^[6],所以应用前景非常广阔。本研究应用全细胞膜片钳技术记录了氯虫酰胺对甜菜夜蛾幼虫离体培养中枢神经细胞 Na^+ 通道门控特性的影响,在分析其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,以期对氯虫酰胺类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 溶液、试剂

细胞外液(mmol/L): NaCl 100、KCl 4、 CaCl_2 2、 MgCl_2 2、HEPES 10、Glucose 5、TEA-Cl 30、 CdCl_2 0.5、4-AP 2,用 NaOH 溶液调 pH 值至 6.85。电极内液(mmol/L): CsCl 140、 MgCl_2 2、EGTA 10、HEPES 10,用 CsOH 溶液调 pH 值至 6.85。生理盐水(mmol/L): NaCl 100、KCl 4、 CaCl_2 2、 MgCl_2 1、HEPES 10、Glucose 5、Mannitol 130,用 NaOH 溶液调 pH 值至 6.85。胰蛋白酶溶液:50 mL 生理盐水,用 NaOH 溶液调 pH 值至 6.85;加 0.15 g 胰蛋白酶,混匀,再用 NaOH 溶液调 pH 值至 6.85,过滤分装后于 0℃ 保存,避免反复冻融。细胞培养液(g/L): 葡萄糖 0.7、果糖 0.4、琥珀酸 0.06、咪唑 0.06、乳蛋白 2.6、酵母提取物 2.6、HEPES 2.38,使用时增补 15% 已灭活胎牛血清^[7]。其中 CsOH、4-AP、TEA-Cl 均为 Sigma 公司产品,EGTA、HEPES 为 Gibco 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。氯虫酰胺由南开大学元素所提供,纯度为

99.9%,使用时先用丙酮溶解,然后用超纯水稀释到所需浓度。

1.2 神经细胞的分离与培养

所用甜菜夜蛾初始种群来源于中国农业科学院植物保护研究所。取三龄幼虫,用 75% 乙醇表面消毒 3 次,然后在生理盐水中清洗 2 次,洗净虫体表面的乙醇。在解剖镜下剪开其背部皮肤,去除消化道,暴露呈念珠状排列的神经节,用眼科剪和显微解剖镊子剪断神经节的背根和腹根,分离神经节,置于生理盐水中。用自制解剖针去除神经节鞘,移至胰蛋白酶溶液(3 g/L)中消化 6~7 min。将神经节接种于滴加有 1 mL 培养液的直径为 35 mm 塑料培养皿中,停止消化,并用内径递减的玻璃吹打管离散神经细胞,使细胞均匀地分散于培养皿中。离体细胞在 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ 条件下静置培养 1~2 h 贴壁后,用于电生理试验。

1.3 全细胞膜片钳记录

在室温下($20 \sim 25^\circ\text{C}$),生物信号由膜片钳放大器(EPC10, HEKA, Lambrecht, 德国)采集,输出脉冲设置为保持电压 -70 mV ,波宽 60 ms,试验脉冲 $-60 \sim 50\text{ mV}$,去极化刺激电压递增步幅 10 mV。电信号经 5 kHz 滤波后传输至计算机处理,测量增益 0.5 mV/pA 或 1 mV/pA,采样间隔 1 s。电极电阻 $2 \sim 4\text{ M}\Omega$ 。选择细胞膜表面光滑、胞体饱满的健康细胞作为试验细胞。建立全细胞记录模式,待记录电流稳定后,记录到的钠离子通道电流为对照组结果;用微操纵器调节加药电极至细胞旁边(距细胞约 100 μm),使药液浸没细胞,此时记录到的钠离子通道电流为施药组结果。

1.4 数据处理

应用 Iqro Pro 5.02 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) 读取数据,采用 Microcal Origin 6.0 (Origin Lab Corp, Northampton, MA, USA) 和 SPSS 进行数据分析、拟合和统计学处理。统计学处理方法包括非配对 t 检验、单因素方差分析、多因素方差分析。数据用 $(\bar{x} \pm SD, n = \text{细胞数})$ 表示,以 $P < 0.05$ 表示显著性差异, $P < 0.01$ 表示极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 氯虫酰胺对甜菜夜蛾神经细胞 Na⁺ 通道电流的影响

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,使药液浸没细胞。表 1 为 0.1 g/L 氯虫酰胺作用于细胞不同时刻后的 Na⁺ 通道电流峰值及变化率。药物作用 1 min 时,药物组电流峰值为(-9.627±0.114)nA,与初始值相比增幅约为 11.7%。5 min 时电流峰值为(-11.668±0.131)nA,与药物作用 1 min 后的电流峰值相比显著增大(85%以上神经细胞的 Na⁺ 通道有这种现象),平均峰值约为初始值的 1.316 倍,导致 Na⁺ 通道电流密度与电压关系曲线(I_d-V 曲线)明显下移(图 1)。随着作用时间推移,药物对电流峰值的促进作用减弱,到 15 min 时电流峰值衰减至(-8.726±0.398)nA,约为初始值的 96.7%。以上结果表明,氯虫酰胺对甜菜夜蛾幼虫中枢神经细胞 Na⁺ 通道电流的影响存在时间依赖性,且药物对 Na⁺ 通道电流增强作用突出表现在施药后最初几分钟内,而在记录后期 Na⁺ 通道电流逐渐表现出衰减趋势。

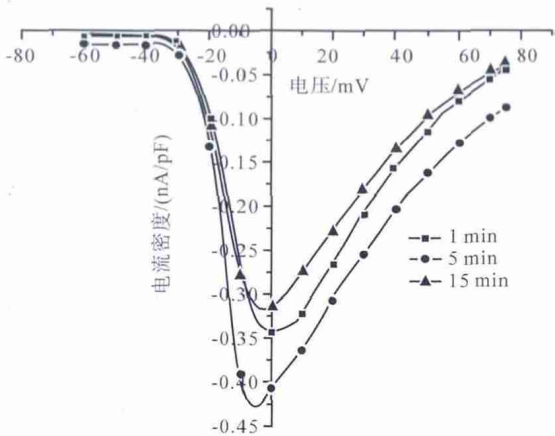


图 1 处理组药物作用不同时间的 Na⁺ 通道 I_d-V 曲线

由表 1 可见,施药后 1 min、5 min、15 min 药物组 Na⁺ 通道电流峰值始终大于对照组,施药后 1 min 时,药物组电流峰值与对照组差异显著;施药后 5 min 时,电流峰值增幅更加明显,与对照组相比差异极显著;施药后 15 min 时,处理组电流峰值虽然有所下降,但与对照组相比仍有增高。从图 2 可以看出,施药后 1 min、5 min、15 min 药物组 I_d-V 曲线相比对照组都出现了不同程度的下移,其中 5 min 时下移幅度更大。这些结果表明氯虫酰胺短期内提高了甜菜夜蛾幼虫中枢神经细胞 Na⁺ 通道的兴奋性。

表 1 不同时间对照组与处理组 Na⁺ 通道电流峰值及变化率统计学结果(n=6)

时间/min	电流峰值/nA		P 值	电流峰值变化率		P 值
	对照组	处理组		对照组	处理组	
0	-8.612±0.361	-8.792±0.379	0.490	1	1	—
1	-8.503±0.374	-9.627±0.114	0.017*	0.997±0.105	1.117±0.123	0.041*
5	-8.281±0.464	-11.668±0.131	0.000**	0.959±0.112	1.316±0.153	0.000**
15	-6.313±0.283	-8.726±0.398	0.031*	0.72±0.088	0.967±0.131	0.018*

注:与对照组相比,*表示 P<0.05,**表示 P<0.01。

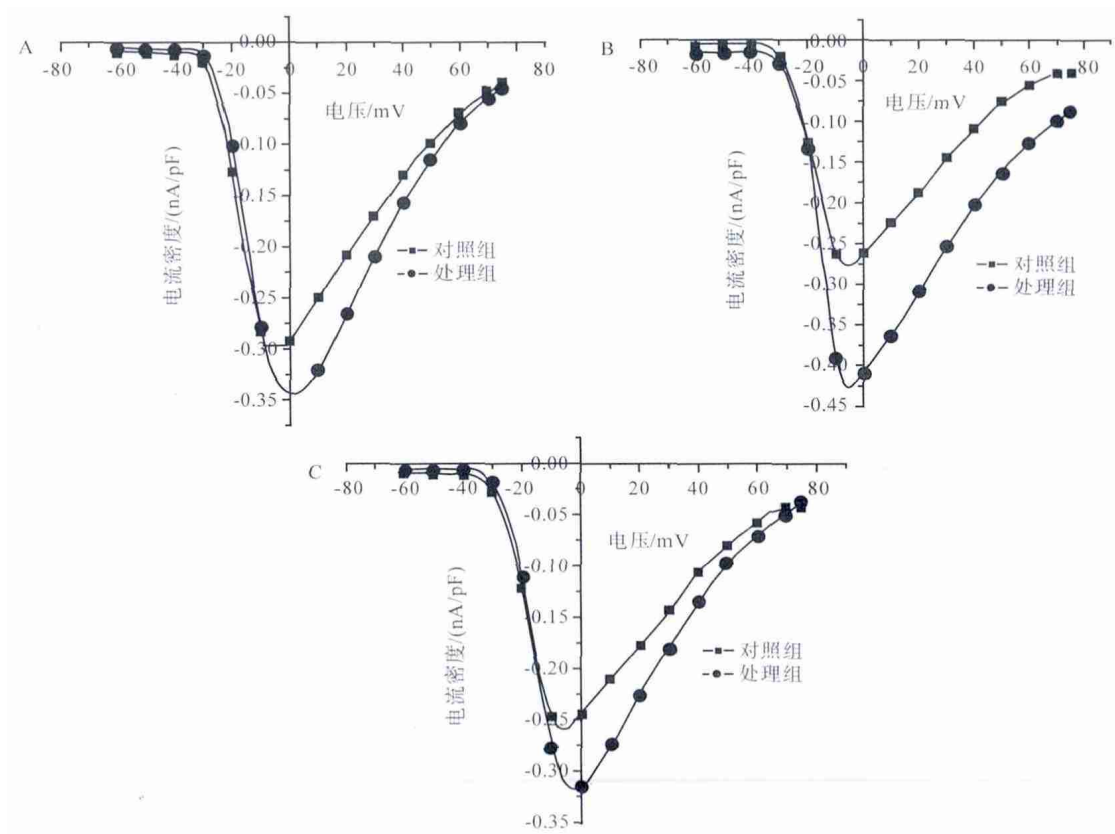
2.2 氯虫酰胺对甜菜夜蛾神经细胞动作电位的影响

待电流钳模式建立,电流稳定,用微操纵器将质量浓度为 0.4 g/L 的氯虫酰胺加到神经细胞附近。图 3 为神经细胞在逐渐增强的刺激电流作用下爆发的动作电位,显示氯虫酰胺可以降低动作电位的幅度,且具有明显的时间依赖性,甚至 10 min 后无法发放动作电位。对照组在 1 min、3 min、5 min 的动作电位峰值分别为(101.96±3.22)mV、(101.54±2.02)mV、(100.96±1.69)mV。施药后的对应值分别为(94.366±4.596)mV、(90.363±2.258)mV、(83.15±2.959)mV(n=10)。动作电位的时程随着施药后时间的延长而逐渐变大,施药后 1 min、3 min、5 min 时动作电位的时程分别为(5.025±0.884)ms、(6.032±0.073)ms、(6.387±

0.376)ms。表明药物作用时间越长,细胞爆发动作电位所需要的最小刺激电流强度越大且峰值减小,说明该质量浓度药物导致神经细胞兴奋性下降且可能影响 Na⁺ 通道电流的大小。

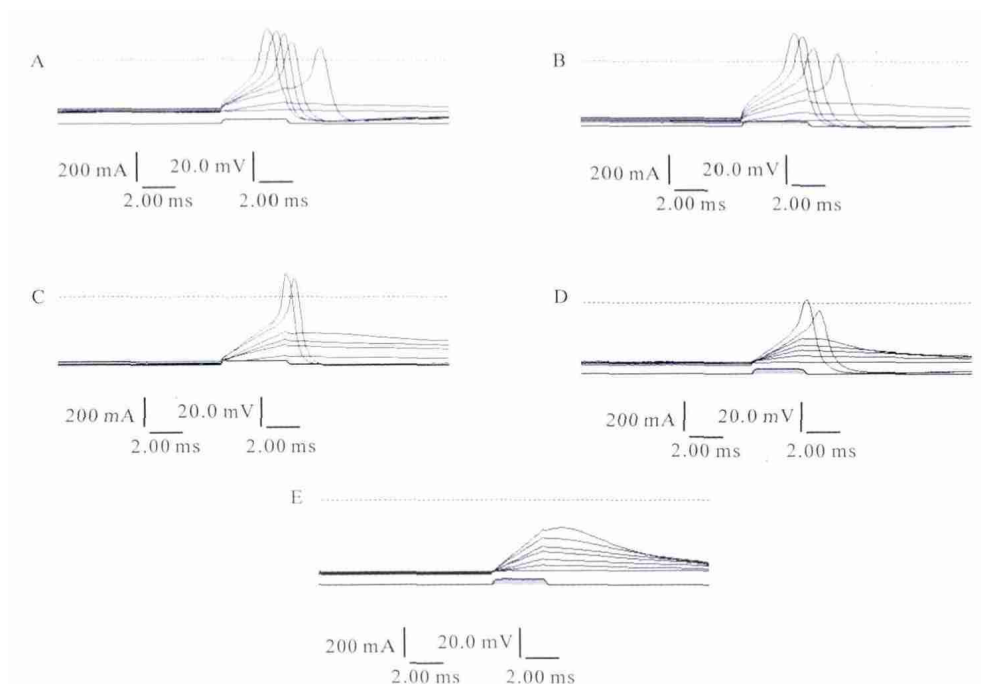
3 结论与讨论

本试验详细记录并分析了新型杀虫剂氯虫酰胺对神经元电压门控 Na⁺ 通道的调控效应,发现氯虫酰胺对 Na⁺ 通道电学特性存在影响。从试验结果来看,0.1 g/L 的药物对 Na⁺ 通道电流密度有增加作用,且发生非常迅速,一般在用药 5 min 时已表现得非常明显,施药后 1 min 和 5 min 时,Na⁺ 通道电流峰值分别为(-9.627±0.114)nA 和(-11.668±0.131)nA,但是随着作用时间延长,电流峰值有所



A、B、C 分别示施药后 1 min、5 min、15 min 的结果

图 2 对照组与处理组 Na^+ 通道 I_a -V 曲线比较



A 为对照组; B、C、D、E 分别表示处理组施药后 1 min、3 min、5 min、10 min 的结果

图 3 对照组与处理组神经细胞发放的动作电位

下降。由此可以得出, Na^+ 通道是氯虫酰胺的作用靶标, 0.1 g/L 氯虫酰胺可以在短时间内提高 Na^+ 通道兴奋性, 但这一作用效果会随作用时间延长而

衰减。考虑到神经元兴奋性过强可能导致细胞损伤, 而且在大田的实际环境中, 农药与昆虫接触时间更久, 因此推测氯虫酰胺最终是通过抑制并损伤神

经系统兴奋性来达到毒杀效果。为了印证这一推断, 试验中记录了神经元动作电位的发放情况, 因为 Na^+ 内流是产生动作电位的基础, Na^+ 电流减少在宏观上表现为动作电位峰值降低, 所以动作电位的特征可以直观反映 Na^+ 通道的电学特性。当在细胞外液中施加 0.4 g/L 的氯虫酰胺后, 不仅动作电位的峰值随作用时间延长而下降, 时程也随之延长, 10 min 后无法发放动作电位, 说明高浓度药物抑制了细胞兴奋性, 而这一现象可能正是由于药物作用初期细胞兴奋性大幅增强而导致的。之前有报道^[8]证明, 电压依赖性 Na^+ 电流的增大, 使得胞内 Na^+ 浓度增加, 抑制 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶的活性, 进一步增大了胞内 Na^+ 浓度, 从而加速能量消耗。同时胞内 Na^+ 浓度过高, 又会影响细胞膜上的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换, 使得胞内 Na^+ 浓度更高^[9-10], 导致蛋白酶、磷脂酶、核酸内切酶活化, 引起蛋白质、磷脂和 DNA 损伤, 而且还会启动耗能代偿机制, 导致与功能有关的系统紊乱, 甚至诱导细胞凋亡^[11-12]。许多神经毒物都是通过类似机制发挥其毒性的^[13-14], 根据本试验的数据, 氯虫酰胺可能具有类似的作用机制。此外, 采用激光共聚焦技术得到的结果表明, 氯虫酰胺可以作用于细胞内质网上的鱼尼丁受体通道, 释放钙库中的 Ca^{2+} 到胞质中, 引起胞内 Ca^{2+} 富集^[15-16]。由于 Ca^{2+} 本身为第二信使, 与细胞的多种生理功能有关, 因此, Na^+ 通道门控特性的变化是杀虫剂的直接作用还是间接作用, 有待更加严密合理的试验去验证。但是通过本试验可以确定, 甜菜夜蛾中枢神经细胞 Na^+ 通道是氯虫酰胺药物的作用靶标之一, 氯虫酰胺对 Na^+ 通道电流的作用具有明显时间依赖性。

参考文献:

- [1] 段学慧, 段澄, 李红. 石家庄地区甜菜夜蛾的发生及防治[J]. 天津农业科学, 2005, 11(4): 39-41.
- [2] 王泽奇, 于振连, 王朝忠. 甜菜夜蛾的发生与防治[J]. 西北园艺: 蔬菜, 2011(4): 45.
- [3] 韩鹏杰, 封云涛, 范仁俊, 等. 20% 虫酰肼悬浮剂防治甘蓝甜菜夜蛾试验[J]. 山西农业科学, 2011, 39(5): 456-458.
- [4] 岑彩霞, 肖彤斌, 岳建军. 5 种杀虫剂对甜菜夜蛾的室内毒力与田间应用效果评价[J]. 广东农业科学, 2012, 39(13): 110-111.
- [5] Lahm G P, Selby T P, Stevenson T M. Arthropodicidal anthranilamides; WO, 2003015519 A1[P]. 2003-02-27.
- [6] 李洋, 李森, 柴宝山. 新型杀虫剂氟虫酰胺[J]. 农药, 2006(10): 697-699.
- [7] Lee D, Adams M. Sodium channels in central neurons of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*: Basic properties and modification by scorpion toxins [J]. Journal of Insect Physiology, 2000, 46: 499-508.
- [8] Boening J A, Kass I S, Cottrell J E, et al. The effect of blocking sodium influx on anoxic damage in the rat hippocampal slice[J]. Neuroscience, 1989, 33(2): 263-268.
- [9] Haigney M C P, Lakataa E G, Stern M D, et al. Sodium channel blockade reduces hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading [J]. Circulation, 1994, 90(1): 391-399.
- [10] Sang N, Meng Z. Blockade by magnesium of sodium currents in acutely isolated hippocampal CA1 neurons of rat [J]. Brain Res, 2002, 952(2): 218-221.
- [11] Choi D W. Calcium: Still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death [J]. Trends Neurosci, 1995, 18(2): 58-60.
- [12] Peterson C, Ratan R, Shelanski M. Changes in calcium homeostasis during aging and Alzheimer's disease [J]. Ann N Y Acad Sci, 1989, 568(3): 262-270.
- [13] Meir A, Ginsburg S, Butkevich A. Ion channels in pre-synaptic nerve terminal and control of transmitter release[J]. Physiological Reviews, 1999, 79(3): 1019-1087.
- [14] Meng Z Q, Sang N. Effect of SO_2 derivatives on sodium currents in acutely isolated hippocampal CA1 neurons[J]. Acta Physiologica Sinica, 2002, 54(3): 267-270.
- [15] Ebbinghaus-Kintscher U, Luemmen P, Funke C. Phthalic acid diamides activate ryanodine sensitive Ca^{2+} release channels in insects [J]. Cell Calcium, 2006, 39: 21-33.
- [16] Li Y X, Mao M Z, Li Y M. Modulations of high-voltage activated Ca^{2+} channels in the central neurones of *Spodoptera exigua* by chlorantraniliprole[J]. Physiol Entomol, 2011, 36: 230-234.