

氯氰菊酯异构体对黑胸大蠊神经钠钾通道的调制作用*

刘安西 宁黔冀 陈叙龙 黄润秋

(南开大学生物学系、环境科学系、元素有机化学研究所,天津)

陈 守 同

(中央民族学院生物化学系,北京)

摘要 用电生理油间隙、单纤维、电压钳位技术研究了氯氰菊酯顺、反异构体对黑胸大蠊 [*Periplaneta fulginosa* (Serville)] 中枢神经大轴突钠通道的调节抑制作用,并探讨了反式异构体与钾通道的作用关系。结果证明: 1. 2×10^{-4} mol/L 顺式异构体作用于钠通道,先使其开放,然后抑制。2. 出现钠尾电流,表明有更多数量的钠通道处于开放状态。3. 5.4×10^{-4} mol/L 反式异构体可阻滞迟缓钾通道并降低钾电流 I_K 的峰值。

关键词 黑胸大蠊 氯氰菊酯异构体 钠通道 钾通道

氯氰菊酯是除虫菊酯衍生物的一种新型杀虫剂。除虫菊酯的作用机理是阻遏昆虫中枢神经的传导,产生长时程的负后电位(Narahashi, 1962)。在龙虾大轴突电压钳位研究中, Lund 认为钠通道开放,产生长时程的钠电流是造成负后电位的原因(Lund, 1981; 张宗炳, 1982)。因此除虫菊酯主要是影响钠通道开关的动力学过程,抑制钠通道失活,促使钠通道处于开放状态(Laufer 等, 1984)。氯氰菊酯顺、反异构体对昆虫大轴突电生理的分析到目前未见报道。本文采用油间隙、单纤维、电压钳位法研究了氯氰菊酯顺、反异构体对黑胸大蠊(*Periplaneta fulginosa*) 中枢神经大轴突钠通道的调制作用,同时用玻璃微电极插入轴突膜观察静息电位的变化,进一步探讨顺、反异构体与钾通道机能间的关系,可能对有效新品种的开发和化学保护应用提供理论依据。研究结果如下。

材料及方法

一、实验材料

1. 全部实验均采用室内饲养的黑胸大蠊雄性成虫为材料。饲养温度为 28℃。
2. 离体腹神经单根轴突的制备 沿背中线剪开体壁,剥离出整条腹神经索,置于滴有生理盐溶液的玻片上,于高倍双目镜下找到第 IV—V 神经节间的神经链索。用玻璃针小心分离出直径约 40 μ m 的单根大轴突,剪断其他所有神经元。此轴突按前文(刘安西, 1984; 刘安西等, 1988)报道的技术用于电压钳位和膜电流实验。

二、试剂

本文于 1987 年 12 月收到。

* 国家自然科学基金资助课题。

1. 氯氰菊酯: 纯品, 系南开大学元素所合成。

将氯氰菊酯顺、反体分别先溶解于少量丙酮中, 二者重量比为 1:1000。再以生理盐溶液稀释至所需浓度。顺式配制成 $2 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 溶液; 反式配制成 $2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 、 $5.4 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 溶液。

2. 四氨基嘧啶 (4-AP): 纯品, 美国 Sigma 公司出品。配制成 $2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 溶液。为钾通道阻断剂。

3. 河豚毒素 (TTX): 纯品, 秦皇岛水产研究所提供。配制成 $2 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 溶液。为钠通道阻断剂。

4. Ringer 生理溶液: NaCl 200mmol/L、KCl 3.1mmol/L、CaCl₂ 5.0mmol/L, pH 7.2。

三、实验方法——油间隙电压钳位神经小室的制作

神经小室由 $8 \times 4 \times 3 \text{cm}$ 的有机玻璃粘合而成。小室底部中央有一个直径 2mm 的小管, 一端注入生理盐溶液或试剂溶液, 另一端供流出。管道中央有一个很小的孔, 直径为 $100 \mu\text{m}$, 它是放置轴突进行电压钳位的地方。小孔两侧各有一根氯化银丝, 分别为 I 电极和 V 电极。将离体大轴突放置于小孔上, 其余部分与 I 电极、V 电极连接。然后向小孔内滴加石蜡油覆盖全部神经和电极, 这样便可以电压钳位实验 (Pichon, 1967)。

再用一根玻璃微电极插入一侧的同一根轴突内, 观察施药前后静息膜电位的变化。

结 果

一、氯氰菊酯对轴突钠电流的作用

在电压钳位条件下, 保持电位 $H \cdot P \cdot = -40 \text{mV}$, 膜电位 $V_m = 25 \text{mV}$, 可记录到

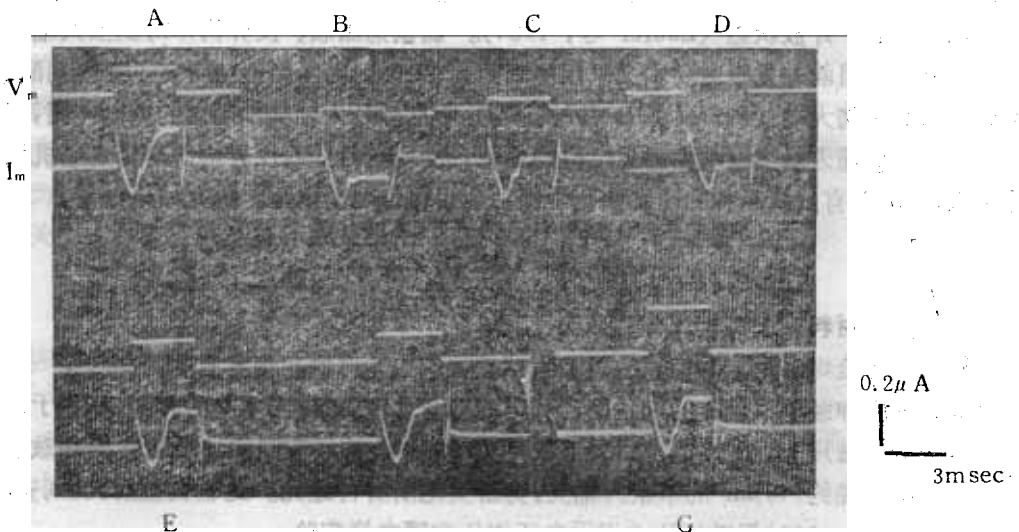


图 1 $2 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 顺式氯氰菊酯对黑胸大蠊中枢神经大轴突钠电流 I_{Na} 的作用

A. 正常膜电流 B. 加药后 25 分钟 (溶液中同时加入 $2 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 4-AP 阻断钾通道以观察 I_{Na}) C. 加药后 40 分钟 D. 加药后 70 分钟 E. 正常膜电流 F. 加药后 30 分钟 G. 加药后 80 分钟, 对 I_K 没有影响

$H.P. = -40 \text{mV}$ V_m 为膜电位 I_m 为膜电流

一个先向内后向外的电流。在去极化方波的起始端有一个向上的电容电流 (I_c)；向下弯曲的内流钠电流 (I_{Na}) 和向上弯曲的外流钾电流 (I_K)，以与其他钾电流区别 (图 1A)。当 $V_m = -10\text{mV}$ 时， I_{Na} 达到最大值约 $-0.75\mu\text{Acm}^2$ 。其峰值随膜电位的增加而减少。 I_{Na} 出现得快，但持续去极化会衰减直到最后消失 (失活)。因此钠通道的激活曲线呈“S”型，失活曲线为抛物线型。 I_{Na} 为内向电流，是负值，在 $I-V$ 关系曲线中位于横座标的下方， I_K 是正值位于横座标上方 (图 3)。 I_K 随膜电位的增加而增加，最大值约 $0.70\mu\text{Acm}^2$ (图 4)。

1. 为了便于观察药物对 I_{Na} 的作用，在生理盐溶液中加入 $2 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 4-AP 以阻断 I_K ，再滴加 $2 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ 顺式氯氰菊酯。6 分钟后 I_{Na} 峰值逐渐增加，20—25 分钟达到最大值，持续约 26—30 分钟。钠通道开放，处于兴奋状态，以后峰值减小逐渐被抑制 (图 1B、C、D)，其峰值减小到正常值的 50% 需时 55—70 分钟。

(1) 低浓度 ($1 \times 10^{-5}\text{mol/L}$) 顺式氯氰菊酯也可抑制 I_{Na} ，但需经过比较长时间的兴奋期，约 50—65 分钟。其作用是不可逆的。用生理盐溶液冲洗 120 分钟诱发不出 I_{Na} 。

(2) 加药后 20 分钟，在 I_{Na} 之后出现一个小而恒定的电流，称钠尾电流，它是内向电流，是钠通道关闭状态的表征电流。随药物作用时间的增加而显著，表示有更多数量的钠通道处于开放状态 (图 1B、C)。

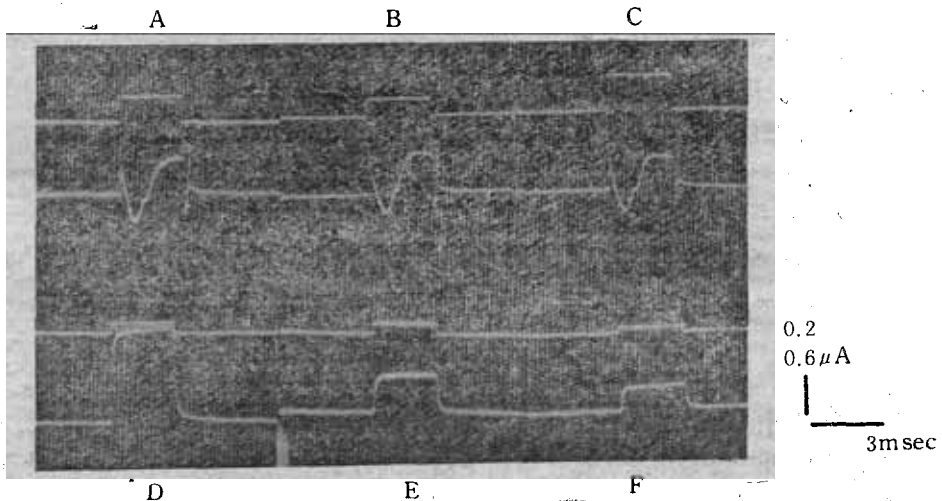


图 2 $5.4 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 反式氯氰菊酯对黑胸大蠊中枢神经大轴突 I_{Na} 、 I_K 的作用

A. 正常膜电流 B. 加药后 60 分钟， I_{Na} 减少 C. 加药后 75 分钟， I_K 降低 D. 溶液中加入 $1 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ TTX 阻断钠通道，以观察 I_K 时的正常 I_K E. 加药后 60 分钟， I_K 降低 F. 加药后 70 分钟

H. P. = -50mV

(3) 用玻璃微电极测定大轴突静息膜电位为 -60mV ，处理后 30 分钟为 -50mV 。

2. 高浓度 ($5.4 \times 10^{-4}\text{mol/L}$) 反式氯氰菊酯与顺式作用方式相似。抑制 I_{Na} 需时较长，约 70—90 分钟。顺式与反式抑制 I_{Na} 的百分数分别为 78%、56%。因此对黑胸大蠊杀虫效力顺式异构体优于反式。低浓度 ($2 \times 10^{-5}\text{mol/L}$) 反式异构体对钠、钾通道均无影响。

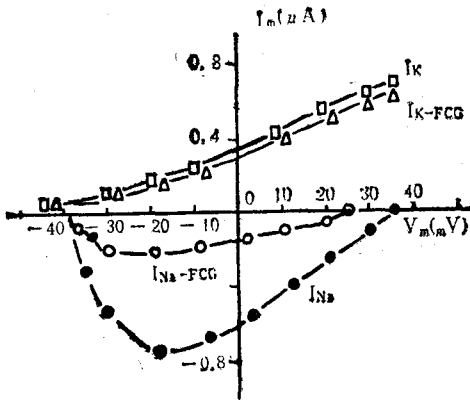


图3 顺式氯氰菊酯对黑胸大蠓中枢神经大轴突电流 I_{Na} 的作用电流-电压关系图

●—● 正常 I_{Na} , □—□ 正常 I_K , ○—○ 顺式氯氰菊酯作用后曲线 (I_{Na}), △—△ 顺式氯氰菊酯作用后曲线 (I_K), FCG: 顺式氯氰菊酯, I_m : 膜电流, V_m : 膜电位

H.P. = -40mV (I_{Na}), H.P. = -50mV (I_K)

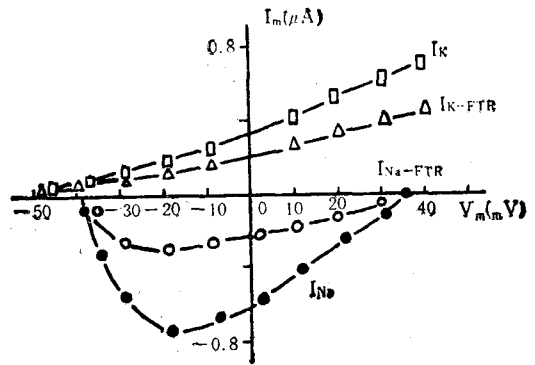


图4 反式氯氰菊酯对黑胸大蠓中枢神经大轴突钠钾电流作用的电流-电压关系图

●—● 正常 I_{Na} , □—□ 正常 I_K , ○—○ 反式氯氰菊酯作用后曲线 (I_{Na}), △—△ 反式氯氰菊酯作用后曲线 (I_K), FTR: 反式氯氰菊酯

H. P. = -40mV (I_{Na}), H.P. = -50mV (I_K)

二、氯氰菊酯对钾电流的作用

1. 为了进一步观察药物对钾电流的作用,在生理盐溶液中先加入 2.0×10^{-6} mol/L TTX,待钠通道被阻断、 I_{Na} 消失后,再加入 5.4×10^{-4} mol/L 反式氯氰菊酯。50 分钟后迟缓钾电流 I_K 峰值逐渐降低。其峰值减少到正常值 50% 需时 60—75 分钟,抑制百分数为 42—50% (图 2)。

2. 低浓度 (2×10^{-3} mol/L) 顺式氯氰菊酯不影响 I_K , 高浓度 (5.4×10^{-4} mol/L) 稍有抑制作用,但低于 5%。

讨 论

实验结果表明:顺式氯氰菊酯对黑胸大蠓神经系统作用部位主要是中枢神经大轴突的钠通道。使钠通道处于开放状态并增加了通道的开放时间,其表现有二:一是 I_{Na} 的时程延长,由处理前的 0.8—1 毫秒到处理后的 2.8—3 毫秒,增加了近 3—3.5 倍。La ufer(1984) 报道溴氰菊酯作用于美洲大蠓轴突,钠通道开放时间长达几分钟之久。二是出现了明显的尾电流,它是缓慢的内向电流,时程较长。由于它与 I_{Na} 同时出现又位于 I_{Na} 之后,故称为钠尾电流。这与离子通道的关闭有关。它的出现表示有更多的钠通道处于开放状态。钠通道开放,大量 Na^+ 快速通过, Na^+ 通道内流,神经膜迅速去极化,产生动作电位的上升相并引起冲动的传导,昆虫处于兴奋期。但是当膜持续去极化钠通道失活, I_{Na} 衰减,动作电位振幅下降最后到消失,此时昆虫由麻痹而死亡。

钠通道功能部分包括:选择性滤孔、闸门和电压感受器。通道内侧有控制激活的 m 闸门和控制失活的 h 闸门。去极化时 m 闸门打开使 Na^+ 通过,持续去极化则 h 闸门关闭。复极化时 m 闸门关闭而 h 闸门打开,钠通道才能对去极化作出反应。当溶液中加入

顺式异构体时破坏了 h 闸门的功能, 取消了钠通道的失活。这可能是钠通道开放的原因, 也是昆虫死亡的原因。这种作用机理不同于河豚毒素 (TTX)。TTX 是带有胍基的水溶性分子, 带有正电荷的胍基部分伸入到钠通道的离子选择性滤孔与通道内壁的游离羧基相结合, 毒素分子结构其余部分因太大而堵塞了通道外侧口, 这种结合非常牢固而且是简单的双分子反应。其受体部位在钠通道外侧口, 所以不影响闸门的开放与关闭。因此 TTX 是钠通道的阻塞剂。氯氰菊酯, 确切地说应该是钠通道闸门的调制剂。

顺式优于反式异构体的原因有以下可能: 一是调制钠通道开放的数量(百分比)多于反式; 二是钠通道打开的速度快于反式。

已知电压门控性钾通道有三种, 即迟缓钾通道、早期钾通道、钙激活钾通道。通过这些通道的电流分别称为 I_K 、 I_A 和 $I_{K(Ca)}$ 。 I_K 出现比 I_{Na} 晚, 迟缓钾通道在膜电位 -35 mV 时激活, 激活过程较为迟缓(刘安西, 1984、1988)。它是动作电位复极化的主要外向电流, 延长去极化的时间可使其失活, 表现于动作电位的时程越来越宽。但在通常情况下, 钾通道的关闭并非失活而是复极化。高浓度反式氯氰菊酯对 I_K 的激活和失活都有影响, 使激活曲线向负电位方向移动, 即改变门控的电压依赖关系。此时膜对 K^+ 通透性增大, 膜内 K^+ 外逸; 造成膜内外 K^+ 浓度差降低, 使膜静息电位降低, 产生轻度去极化。因而易于在受刺激时达到阈电位, 使兴奋性增高。加药后神经膜静息电位 (-50 mV) 高于正常静息电位 (-60 mV)。

因此氯氰菊酯异构体的作用有二: 一方面是取消钠通道的失活; 另一方面改变激活曲线向负电位方向移动, 致使在静息电位时的钠通道处于激活状态, 使钠通道持久激活从而延长了通道的开放时间, 这是钠通道开放的另一原因, 也是昆虫死亡的因素之一。

氯氰菊酯的毒理作用是一个比较复杂的问题, 因为它与许多杀虫剂不同, 有些机制还没有定论, 有待继续深入研究。

参 考 文 献

- 刘安西 1984 果蝇两种基因对钾通道离子电流的影响。南开大学学报 6(1): 120—6。
刘安西等 1988 杀虫环对昆虫突触前膜钙通道的调制。生物物理学报 4(4): 350—4。
张宗炳 1982 昆虫毒理学新进展。北京大学出版社。
Laufer J. et al. 1984 Pyrethroid insecticides: Actions of deltamethrin and related compounds on insect axonal sodium channels. *J. Insect Physiol.* 30(5): 341—9。
Lund A. E. & Narahashi T. 1981 Modification of sodium channel kinetics by the insecticide tetramethrin in crayfish giant axons. *Neurotoxicology* 2: 213—29。
Narahashi T. 1962 Nature of the negative after-potential increased by the insecticide allethrin in cockroach giant axons. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 67—76。
Pichon Y. & Boistel J. 1967 Current voltage relations in the isolated giant axons of the cockroach under voltage-clamp conditions. *J. Exp. Biol.* 47: 343—55。

MODIFIED ACTION OF CYPERMETHRIN ENANTIOMERS ON AXONAL SODIUM AND POTASSIUM CHANNELS OF *PERIPLANETA* *FULGINOSA* (SERVILLE)

LIU AN-XI NING QIAN-JI CHEN XU-LONG HUANG RUN-QIU

(Department of Biology, Department of Environment Science,
Institute of Element Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin)

CHEN SHOU-TONG

(Department of Biochemistry, Central Institute of Nationality, Beijing)

The action of cypermethrin enantiomers were tested on isolated giant axons of the cockroach *Periplaneta fulginosa* (Serville) by using oil-gap, single-fiber and voltage-clamp recording technique. The insecticidal activity of cypermethrin has been shown primarily related to the stereochemical features of the molecule. The results of the present studies further included the following aspects: 1. In voltage-clamp, the *cis*-cypermethrin (2×10^{-6} mol/L) did not modify potassium currents, but slowly reduced the peak inward current. 2. Prolonged sodium tail-current developed after 20—25 minutes of cypermethrin exposure, presumably due to that fact that more sodium channels were held in the open state for an extended period. 3. The suppression of both sodium and potassium currents by the *trans*-cypermethrin (5.4×10^{-6} mol/L) was noted after 75—90 minutes of exposure.

Key words *Periplaneta fulginosa* (Serville)—cypermethrin enantiomer—sodium channel—potassium channel