

新型二酰胺类杀虫剂对鱼尼丁受体作用的分子机理

唐振华¹, 陶黎明²

(1. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032; 2. 上海市农药研究所, 上海 200032)

摘要: 最近发现了一类新型二酰胺类杀虫剂——氟虫酰胺和氯虫酰胺, 其作用靶标是鱼尼丁受体 (ryanodine receptors, RyRs)。本文对 RyR 的结构与功能、电压门控钙离子通道和鱼尼丁受体钙离子释放通道对细胞质钙离子内环境稳定的调节以及二酰胺类杀虫剂对 RyRs 作用的分子机理进行综述。二酰胺类杀虫剂使昆虫 RyR 通道处于持续的开放状态, 引发钙离子从肌质网腔内大量释放, 破坏了细胞质钙离子内环境的稳定, 从而产生不同的药理学特性。这些变化都是由一个不同于鱼尼丁在 RyR 上的结合部位介导的。该类杀虫剂的作用对昆虫 RyRs 是高度专一的, 结果产生选择毒性。由于二酰胺类杀虫剂的结构独特, 作用方式新颖, 对鳞翅目害虫效果好、杀虫谱广, 对各种益虫和天敌安全, 并对现用的杀虫剂无交互抗性, 故它们非常适合于抗性治理和 IPM。

关键词: 二酰胺类杀虫剂; 鱼尼丁受体; 钙离子内环境稳定; 钙离子通道; 分子机理

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2008)06-0646-06

Molecular mechanism of action of novel diamide insecticides on ryanodine receptor

TANG Zhen-Hua¹, TAO Li-Ming² (1. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Pesticide Research Institute, Shanghai 200032, China)

Abstract: Diamide insecticide flubendiamide and chlorantraniliprole, with ryanodine receptors (RyRs) as targets, were recently discovered. Here we reviewed the structure and function of RyR, regulation of intracellular calcium homeostasis by voltage-gated calcium channel and RyR/calcium release channel and molecular mechanisms of action of diamide insecticides on RyRs. Diamide insecticides stabilize insect RyR channels to open state, evoking massive calcium release from intracellular stores, and then disrupt the calcium homeostasis, and possess distinct pharmacological characteristics, which are mediated by a binding site different from that of ryanodine. The action of this class of insecticides is highly specific to insect RyRs and results in selective toxicity. Diamide insecticides have a unique chemical structure and a novel mode of action and show excellent efficacy, a broad insecticidal spectrum against lepidopterous insect pests, excellent safety against various beneficial arthropods and natural enemies, and no cross-resistance to existing insecticides. They will be very suitable for insecticide resistance management and IPM programs.

Key words: Diamide insecticides; ryanodine receptor; intracellular calcium homeostasis; calcium channel; molecular mechanism

细胞质的 Ca^{2+} 内环境稳定一直认为是害虫防治的极好靶标, 因为 Ca^{2+} 作为第二信使在许多生命过程中起着关键作用, 其中包括肌肉收缩、神经递质释放、腺体分泌和转录调控等。如能选择性地扰乱或破坏细胞质 Ca^{2+} 内环境的稳定性 (intracellular

calcium homeostasis) 则就可发现作用方式独特的新型杀虫剂。经长期研究, 日本农药公司终于在 1998 年成功地从邻苯二甲酰胺类化合物 (phenolic acid diamides, PADAs) 中发现了氟虫酰胺 (flubendiamide)。继后, 美国杜邦公司以该化合物为

基金项目: 国家重点基础研究发展规划“973”计划 (2003CB114403)

作者简介: 唐振华, 男, 1939 年生, 江苏江阴人, 研究员, 博士生导师, 研究方向为杀虫剂分子毒理学, Tel.: 021-54924264; E-mail: tangzh@sh163.net

收稿日期 Received: 2008-02-04; 接受日期 Accepted: 2008-04-14

先导,对 PADAs 作了较大改变,获得了一类新的先导化合物——邻甲酰氨基苯甲酰胺类(anthranic diamides, ADAs),通过结构修饰和构效研究,于 2000 年发现了氯虫酰胺(chlorantraniliprole, 即 rynaxypyr™)。该化合物不仅在结构上与氯虫酰胺相似,即都具有二酰胺基元(diamide motif),故称它们为二酰胺类杀虫剂(diamide insecticides),而且都作用于鱼尼丁受体(RyRs)。这类杀虫剂是一类对鳞翅目害虫高效,对哺乳动物低毒、安全,作用机理独特,无交互抗性和对环境友好的新型杀虫剂(Tohnishi *et al.*, 2005)。在杀虫剂发展史上,该类杀虫剂是继以吡虫啉为代表的烟碱类杀虫剂后的又一个新的突破。关于该类杀虫剂的发现和发展已有不少学者作了综述(Jefferies *et al.*, 1997; Tohnishi *et al.*, 2005; Lahm *et al.*, 2005; 柴宝山等, 2007; Selby *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2007)。本文对 RyR 的结构与功能,电压门控钙离子通道(voltage-gated calcium channel, VgCaC)和鱼尼丁受体钙离子释放通道(RyR/calcium release channel, RyR/CRC)对细胞质钙离子内稳定的调节以及二酰胺类杀虫剂对 RyRs 作用的分子机理作一综述。

1 鱼尼丁受体的结构与功能

鱼尼丁受体(ryanodine receptors, RyRs),由于来自一种植物碱的鱼尼丁(ryanodine)对其呈高亲和性的结合,并受后者调节而得名。Sitsapesan 和 Williams(1998)曾对 RyRs 的结构与功能作过专述。RyRs 存在于细胞质内的内质网/肌质网(endoplasmic reticulum/sarcoplasmic reticulum, ER/SR)膜上,它们是由 4 个相同亚基组成的一类钙离子释放通道(calcium release channel, CRC)。根据其不同的组织分布和药理学作用,RyRs 可分为 3 个同工型:RyR1、RyR2 和 RyR3,它们主要分别分布于骨骼肌、心肌和脑中,但也有 2 个或 3 个同工型分布于同一组织。3 个同工型的一级结构非常相似(它们的序列一致性约为 66%),约有 5 000 个氨基酸组成。C 端为跨膜结构域,N 端为疏水结构域。RyR 的 3D 重组图象也显示,RyR 由 2 个部分组成:胞质结构域区(cytoplasmic domains),又称胞质组装(cytoplasmic assembly, CA),和跨膜结构域区(transmembrane domains),又称跨膜组装(transmembrane assembly, TA)(Rademacher *et al.*, 1994; Sharma and Wagenknecht 2004)。RyR 的巨大的 N 端延伸至细胞

质,这部分含有 CRC 调节因子的结合部位,并与位于细胞膜表面的电压传感器——二氢吡啶受体(dihydropyridine receptor, DHPR)相连。鱼尼丁的结合部位虽然位于 N 端,即在 CRC 的孔区内或靠近该区,但是确切部位尚不清楚。其中 RyR 的 CA 结构呈球状,是通过多肽链相互连接而成的,其高度约为 12 nm,共分为 10 个结构域(D1 - D10),这 10 个结构域重复 4 次,呈四重对称的四方棱柱状。其中 D2、4、5、6、9 和 10 形成与 T 管(transverse tube, TT)互相作用的面,其中有些结构域可与 DHPR 互相作用,D7、8、9 和 10 面向 SR,最远处的 D10 形成 CA 每个角的顶端。每个亚基中的 D2、4、5 和 6 围成直径约为 4.5 nm 的孔道。D5 - 10 成簇,称为“夹钳(clamp)”4 个拷贝的 D3 称为“手柄(handle)”,形成 CA 的侧面。D1 连接 CA 和 TA 呈 Y 状,其 Y 的两臂分别与 D2 和 D3 结合。D3、D4 和 D7 形成与钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合的孔隙(Franzini-Armstrong, 1975)。目前关于 TA 的结构有 2 个拓扑模式(Sharma and Wagenknecht 2004),一个是由 4 个跨膜序列(M1 - M4)组成。另一个是由 12 个跨膜序列:其中 M' 和 M'' 是暂时性的,其余 8 个为 M1 - M10。第一个模式中的 M1 - M4 相当于第二个中的 M5、M6、M8 和 M10。第一个模式中 4 个跨膜(M1 - M4)的横切面呈四方形,沿四重对称拟轴方向呈圆锥状,跨越 ER/ER 膜的脂双层,其上端与 CA 的 D1 相连。M1 - M4 围成一个直径为 2 ~ 3 nm 的中心孔道,即为 Ca²⁺ 从 SR/ER 释放的通道。CA 上有调节其活性的球形密度区,即通道活塞(channel plug),由 4 个通往 TA 的小洞围住。通道活塞与 D1 直接相连。在受体与配体结合时,导致受体构象改变,使活塞开启或关闭,调控通道的开放(Harman *et al.*, 2003)。

2 细胞质钙离子内环境稳定的调节

鉴于二酰胺类杀虫剂对昆虫的中毒症状主要表现为肌肉麻痹,与肌肉收缩有关,故在此首先阐述肌肉兴奋-收缩(excitation-contraction, EC)时的细胞质 Ca²⁺ 内环境稳定的调节过程和调节机理。EC 涉及两个不同的 Ca²⁺ 通道(calcium channel, CaC):VgCaC 和 RyR/CRC。前者调节 Ca²⁺ 从细胞膜外进入细胞质内;后者调节 Ca²⁺ 从 ER 或 SR 大量释放。通过 VgCaC 和 RyR/CRC 之间的协同调节,使细胞质 Ca²⁺ 内环境保持稳定,现以骨骼肌的 L 型 Ca²⁺ 通道(L-CaC)为例,以示 EC 偶联过程(Squecco *et al.*, 2004)。

骨骼肌细胞膜去极化以动作电位的方式经 TT 系统传入肌纤维,TT 是指骨骼肌细胞膜内陷而形成的管状结构,与位于 SR 膜上的 RyR 及其他蛋白的特定区相连,共同组成三联管区(triad),EC 偶联就发生在该区。位于 TT 中的有 L-CaC 和 DHPR。L-CaC 由 5 个亚基(α_1 , α_2 , β , γ 和 δ)组成。现仅以 α_1 亚基为例,因为其余 4 个亚基仅对 α_1 亚基起调节作用,如要进一步了解 CaC 的结构与功能可参阅相关文献(Catterall, 2000; Reuter, 2004)。

Ca α_1 亚基有 4 个同源结构域(I-IV),每个结构域都有 6 个跨膜片段(S1-S6),其中 S4 含有正电荷的氨基酸残基排成 α_1 的孔道。当 TT 膜去极化时,带正电荷的 S4 产生新电位,并发生移动,这种移动称为跨膜电荷移动(intramembrane charge movement, ICM),可通过电生理技术加以记录。ICM 使 L-CaC 开启,并使连接结构域 II 和 IV 之间的“环”移动(Harman *et al.*, 2003),引起 SR 膜上的 RyR 活化,导致 RyR/CRC 开启,并使储存于 SR 腔内的 Ca $^{2+}$ 大量释放,这个过程称为 EC 偶联。RyR/CRC 构象改变反过来产生从 RyR 到 DHPR 的反向信号传导,这有助于增强 DHPR 的 CaC 的活性和稳定。T 管膜和 SR 是并列的,它们之间有一个 10 nm 的间隙,RyR 通道的 CA 跨越这个间隙,T 管中的 DHPR 以四联体(tetrads)成簇排列,这些四联体组成不同的列阵。在 SR 膜中的 RyR 通道也以一种与 DHPR 四联体相应的列阵排列,每隔一个 RyR 通道与一个 DHPR 四联体相连。RyRs 和 DHPRs 呈有序的列阵(ordered arrays),这些连接的列阵称为钙离子释放单元(calcium release units, CRUs)(Nakai *et al.*, 1998),调节 ER/SR 膜上的 CaC 除了 RyR 外,还有肌醇三磷酸受体(inositol triphosphate receptor, IP3R),大多数细胞都含有 IP3R,由肌醇三磷酸(inositol triphosphate, IP3)介导受体全或无的开放。一个基序 GXRXGGXGD 位于形成通道的结构域,它在所有的 RyR 和 IP3R 中是保守的。该保守区构成鱼尼丁结合的重要部位,并是 RyR 的重要传导途径(Zhao *et al.*, 1999)。一个 T 管膜的电压变化(ΔV_m)激活 DHPR,通过 DHPR 的钙离子流入细胞质内,T 管膜的 ΔV_m 信号是通过 DHPR-RyR 连接处传递到 RyR 通道。T 管膜的 ΔV_m 信号引发 RyR 通道开启,并释放储存于 SR 腔内的钙离子流入细胞质。这个传导机理的不同特征是它的传导速度。

肌细胞通常处于高钙(0.1~1.0 mol/L)环境,而细胞质内的游离钙浓度却非常低(10^{-7} ~ 10^{-8} mol/L),

细胞质内的钙离子浓度通常是通过细胞膜上的 Ca $^{2+}$ 泵、Na $^{+}$ -Ca $^{2+}$ 交换系统和相关离子来调节的。ER/SR 腔内的钙离子是通过 ER/SR 膜上的 Ca $^{2+}$ 泵、CRC 和相关调节剂来调节的。Ca $^{2+}$ 泵通过 ATP 供能将细胞质内的钙离子主动泵回 ER/SR 腔中来保持细胞质内的低钙环境,而 CRC 则是通过不同的调节机制将 ER/SR 腔内的钙离子释放到细胞质内发挥相应的生物效应。涉及 RyR/CRC 调节的调节剂有内源调节剂:胞质 Ca $^{2+}$ ($\mu\text{mol/L}$)、胞质 ATP(nmol/L)、SR 腔内 Ca $^{2+}$ 、细胞胞质 Ca $^{2+}$ 浓度低时的 CaM、CaM 激酶和蛋白激酶 A(PKA);药物激活剂:鱼尼丁(nmol/L~ $\mu\text{mol/L}$)、咖啡因(mmol/L)和苏拉明(suramin);拮抗剂:胞质 Ca $^{2+}$ (>100 $\mu\text{mol/L}$)、细胞胞质 Mg $^{2+}$ (mmol/L)、在细胞胞质 Ca $^{2+}$ 浓度高时的 CaM、硝苯呋海因和欧首胡毒(IpTxa)等;通道阻断剂:鱼尼丁(>100 $\mu\text{mol/L}$)、钆红和普鲁卡因等(Alexander *et al.*, 2007)。

3 二甲酰胺类杀虫剂对 RyR 的作用

3.1 昆虫的 RyR

许多昆虫富含鱼尼丁的受体结合部位,如在家蝇 *Musca domestica*(Jefferies *et al.*, 1997)、美洲大蠊 *Periplaneta americana*(Schmitt *et al.*, 1997)和美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea*(Lehmberg and Casida, 1994)的微粒体膜中均存在高亲和性的鱼尼丁结合部位。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中,在胚胎发育期及肌肉和神经系统的成熟组织中均有 RyR。黑腹果蝇基因组中只有一个 RyR 基因(*Dm-RyR*),该基因含有 26 个外显子,编码 RyR 蛋白的氨基酸序列与哺乳动物 RyR 同工型 RyR1、RyR2 和 RyR3 的一致性分别为 45%、47% 和 46%。果蝇 RyR 的 C 端部分高度保守,与哺乳动物 RyR 同工型相应区域的同源性和为 90% 以上。根据其序列和特征性结构特点,认为果蝇的 RyR 与哺乳动物是类同的(Takeshima *et al.*, 1994)。Puenta 等(2000)克隆了编码 C 端 1172 个氨基酸的烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* RyR(*Hv-RyR*)的 cDNA,其序列与 *Dm-RyR* 的一致性为 74%,与脊椎动物同工型的一致性为 47.9%~50.1%。Scott-Ward 等(2001)从烟芽夜蛾胸肌微粒体膜中分离了 RyR,并通过单通道试验和高亲和性鱼尼丁结合对其功能特性进行了研究。目前已成功地克隆和表达了双翅目、鳞翅目和同翅目昆虫全长的功能性 RyR 基因,并已申请专利(Gutteridge *et al.*, 2004),这为研究二

酰胺类的作用和高通量筛选昆虫靶标构建了很好的研究平台。

昆虫和脊椎动物的 RyRs 居然是类同的,况且鱼尼丁和二酰胺类杀虫剂的作用靶标都是 RyRs,那么为什么鱼尼丁呈现高毒,而二酰胺类杀虫剂却对昆虫呈现高效,而对哺乳动物呈现低毒,并呈现高选择性?为了阐明这个问题,下面先讨论鱼尼丁对脊椎动物和昆虫 RyR 的作用,然后再讨论二酰胺类杀虫剂对它们的作用。

3.2 鱼尼丁对其受体(RyR)的作用

鱼尼丁与其受体结合引发 RyR/CRC 的门控减缓,同时降低通过通道的离子传导,这种对单个通道功能的双重影响表明其作用方式是复杂的。还有证据证明该受体对鱼尼丁剂量具有复杂的依赖性:低剂量(~10 nmol/L)增加单个 RyR 通道开启频率;中等剂量(~1 μ mol/L)激活 RyR 通道;高剂量(~100 μ mol/L)阻断通道(Fill and Copello, 2002)。这些事实表明鱼尼丁的结合部位就是在 RyR 通道孔中或就在通道孔的附近,况且在通道孔存在结构决定簇(structural determinants),鱼尼丁结合实际上是改变了 RyR 通道孔的有效直径(Tinker and Williams, 1993; Tu *et al.*, 1994)。目前认为鱼尼丁作用之所以那么复杂,是由于每个 RyR 单聚体含有一个高亲和性结合部位,其解离常数 $K_D < 50$ nmol/L。此外,还存在低亲和性结合部位,即 $K_D > 1$ nmol/L。这些不同的鱼尼丁结合部位具有协同作用,于是就产生鱼尼丁作用的复杂性(Fill and Copello, 2002)。

鱼尼丁对昆虫是一种肌肉麻痹剂,具有触杀和胃毒作用,它的制剂早在 1945 年就引入美国,但由于其结构复杂,难于改造,成本高和毒性高等因素,未被商品化。该化合物对 RyR/CRC 特别敏感,具有高亲和性。在单通道水平,~nmol/L 级浓度的鱼尼丁对昆虫引发一个持续的亚传导态(subconductance state)(Lokuta *et al.*, 2002)。在 Ca^{2+} 浓度大于 100 nmol/L 时,鱼尼丁可阻断 RyR(Fessenden *et al.*, 2001)。由此可见,鱼尼丁既是该通道的激活剂,又是阻断剂。突变研究确定高亲和性鱼尼丁结合部位位于通道四聚体的孔道区(pore region)(Zhao *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2003)。鉴于鱼尼丁都是作用于昆虫和脊椎动物的 RyR 的同一个部位,故无选择性。

3.3 二酰胺类杀虫剂对 RyR 的作用

Ebbinghaus-Kintscher 等(2006)首先在昆虫中证明 PADAs 可激活昆虫 RyR。通过 Ca^{2+} 测定表明氟

虫酰胺及其相关化合物可使 RyR/CRC 产生瞬变(transient),这种瞬变与烟芽夜蛾神经元的细胞外钙离子浓度无关。如前所述,ER/SR 腔内的钙离子释放由 2 个不同的但在结构相关的通道调节,即 RyR 和 IP_3R 钙离子通道。由 PADAs 引发的这些瞬变几乎完全可被鱼尼丁抑制,但不被 IP_3R 的专一性抑制剂 xestospongine C 所抑制,表明这种钙离子释放是由 PADAs 激活 RyR 所致,而与 IP_3R 无关。鱼尼丁与受体结合的研究显示,鱼尼丁的 K_D 为 13.9 ~ 3.8 nmol/L, B_{max} 为 1.0 pmol/L/mg 微粒体膜蛋白,在加入氟虫酰胺(1.0 μ mol/L)后发现 RyR 以一种正别构(positive allosterism)方式增加鱼尼丁的亲性和性, K_D 降至 1.5 nmol/L,而 B_{max} 为 1.1 pmol/L/mg 蛋白,无明显变化。

在 Ca^{2+} 浓度可调节鱼尼丁与烟芽夜蛾 RyR 结合的试验中, Ca^{2+} 浓度为 μ mol/L 级时未能检测到专一性结合,当浓度增至 0.8 mmol/L 时,与 RyR 结合随之增高,当浓度高至 mmol/L 级时,则与 RyR 的结合下降。但在存在氟虫酰胺(1.0 μ mol/L)时,这种高亲和性 RyR 结合变得与 Ca^{2+} 浓度变化无关,表明这种高亲和性的鱼尼丁结合是受氟虫酰胺调节的。

Cordova 等(2006)认为氟虫酰胺及 ADAs 可刺激细胞质内 Ca^{2+} 浓度增加,在美洲大蠊神经元中,这种 Ca^{2+} 增加在一定范围内不但与氟虫酰胺的浓度呈线性关系,而且还与对昆虫所产生毒性呈线性关系,表明 Ca^{2+} 移动在昆虫毒性中起关键作用。 Ca^{2+} 移动测定显示:(1)这种 Ca^{2+} 移动与细胞外 Ca^{2+} 无关;(2)鱼尼丁可阻断这种 Ca^{2+} 移动;(3)在非内源表达 RyRs 的细胞中无这种 Ca^{2+} 移动。这些结果表明氟虫酰胺及 ADAs 对其他杀虫剂的作用靶标无活性,从而进一步证明 RyR 是氟虫酰胺及 ADAs 的作用靶标。由此可见,氟虫酰胺与氟虫酰胺一样,是昆虫 RyR 的激活剂(activator)。ADAs 未能取代或增加 [3H]鱼尼丁与美洲大蠊肌肉细胞膜的结合,说明它们的结合部位与鱼尼丁是不同的。另外,以同位素标记的氟虫酰胺进行结合研究显示,其 B_{max} 至少是鱼尼丁结合部位的 4 倍。如果这是反映每个 RyR 复合体的 4 个 PADA 分子在结合部位的化学计量,则可以解释每个单聚体有一个结合部位,因为 RyR 为由 4 个相同的单聚体组成的四聚体,不过这还得进一步证实。另外,已知的 RyR 配体,如鱼尼丁、cADP、核糖硝苯咪海因、咖啡因和 4-氯-m-甲酸(4-chloro-m-cresol)都不干扰氟虫酰胺结合,这表明

氟虫酰胺的作用部位是昆虫 RyR 复合体上的一个新的别构部位(allosteric site)。上述研究结果都说明,以氟虫酰胺为代表的 PADAs 和以氯虫酰胺为代表的 ADAs 都是作用于 RyR 的一个不同于鱼尼丁作用的部位。

在以表达哺乳动物骨骼肌 RyR1 的 C2C12 细胞进行测试时,发现高浓度的氟虫酰胺既不产生 Ca^{2+} 信号,也不阻止由咖啡因引发的 Ca^{2+} 瞬变。此外,氟虫酰胺与咖啡因混用时,并不影响 Ca^{2+} 信号值,表明氟虫酰胺并不改变鱼尼丁的解离常数。从上述的试验结果可以得出结论,氟虫酰胺及其相关的化合物对昆虫 RyR 的作用是专一性的,并不影响哺乳动物的 RyR1。另外,通过美洲大蠊肌细胞膜的 Western blot 分析和光亲和性研究显示,氯虫酰胺及相关类似物直接与 RyR 结合,而不是与辅助蛋白结合。氯虫酰胺对昆虫与哺乳动物 RyR 的比较研究显示,昆虫的 RyR 具有 350 ~ 2 500 倍以上的不同选择性(Cordova *et al.*, 2007),由此可以肯定氯虫酰胺对哺乳动物是安全的。

4 结语与展望

以氟虫酰胺为代表的 PADAs 和以氯虫酰胺为代表的 ADAs 在结构上具有相似性,即它们都有二酰胺基元。这种相似性不仅反映在结构上,而且也反映在作用方式上。二酰胺类杀虫剂与 RyR 结合,使 RyR/CRC 通道持续开启, Ca^{2+} 从 SR/ER 腔内储存处大量释放,而腔内 Ca^{2+} 迅速下降,破坏了昆虫细胞质 Ca^{2+} 内环境稳定。于是,影响昆虫心脏和运动横纹肌的运动,产生的急性毒理学作用是使幼虫快速停止取食、麻痹、死亡(Cordova *et al.*, 2006)。此外,据报道该类杀虫剂还可干扰苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 的交配(Knight and Flexner, 2007)。又由于二酰胺杀虫剂与 RyR 的结合部位不同于鱼尼丁的结合部位,对昆虫 RyR 的作用是一个专一性的新的别构部位,故该类杀虫剂呈现对鳞翅目幼虫高效,而对哺乳动物低毒,具有高度选择性。又由于其作用方式独特,故对现有的常用杀虫剂的作用靶标无影响,不存在交互抗性。鉴于此,它们不但可作为抗性治理的替代品种,又可用于害虫的综合防治。氟虫酰胺和氯虫酰胺的发现无疑可促进这类杀虫剂的进一步开发,将会出现更多、更好的新品种。与此同时,也将促进其作用的分子机理的研究,更为重要的是这类新型杀虫剂的发现为发现杀虫剂作用新靶标

的提供了很好的启示。

参考文献(References)

- Alexander SPH, Mathie A, Petters JA, 2007. Guide to receptors and channels (GRAC), 2nd edition (2007 revision). *Br. J. Pharmacol.*, 150(Suppl.): S1 - S168.
- Catterall WA, 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16 : 521 - 555.
- Chai BS, Lin D, Liu YX, Liu CL, 2007. Recent advance in novel insecticidal anthranilic diamides. *Agrochemicals*, 46(3): 148 - 153. [柴宝山, 林丹, 刘远雄, 刘长令, 2007. 新型邻甲酰氨基苯甲酰胺类杀虫剂的研究进展. *农药* 46(3): 148 - 153]
- Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y, 2006. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 84 : 196 - 214.
- Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa RJ, Lahm GP, Selby TP, Stevenson TM, Flexner L, Caspar T, Ragghianti JJ, Gutteridge S, Rhoades DF, Wu L, Smith RM, Tao Y, 2007. Elucidation of the mode of action of ryanoxypyrimidine, a selective ryanodine receptor activator. In : Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW eds. *Pesticide Chemistry*. WILEY-VCH, Weinheim. 121 - 126
- Ebbinghaus-Kintscher U, Luemmen P, Lobitz N, Schulte T, Funke C, Fischer R, Masaki T, Yasokawn N, Tohnishi M, 2006. Phthalic acid diamides activate ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels in insects. *Cell Calcium*, 39 : 21 - 33.
- Fessenden JD, Chen L, Wang Y, Paolini C, Franzini-Armstrong C, Allen PD, Pessah IN, 2001. Ryanodine receptor point mutant E4032A reveals an allosteric interaction with ryanodine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 : 2 865 - 2 870.
- Fill M, Copello JA, 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Pharmacol. Rev.*, 82 : 893 - 922.
- Franzini-Armstrong M, 1975. Membrane particles and transmission at the triad. *Fed. Proc.*, 34(5): 1 382 - 1 389.
- Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V, 1999. Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.*, 77 : 1 528 - 1 539.
- Gutteridge S, Caspar T, Cordova D, Rauh JJ, Tao Y, Wu L, Smith RM, 2004. US Patent Appl. 20040171114.
- Harman CC, Green D, Casaroto MG, 2003. The random coil C fragment of the DHPR II-III loop can activate or inhibit native skeletal RyRs. *Biol. Chem. J.*, 372 : 305 - 316.
- Jefferies PR, Yu P, Casida JE, 1997. Structure modifications increase the insecticidal activity of ryanodine. *Pestic. Sci.*, 51 : 33 - 38.
- Knight AL, Flexner L, 2007. Disruption of mating in codling moth (Lepidoptera : Tortricidae) by chlorantranilipole, an anthranilic diamide insecticide. *Pest Manag. Sci.*, 63 : 180 - 189.
- Lahm GP, Selby TP, Freudenberger JH, Stevenson TM, Myers BJ, Seburyamo G, Smith BK, Flexner L, Clark CE, Cordova D, 2005. Insecticidal anthranilic diamides: a new class of potent ryanodine receptor activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15 : 4 898 - 4 906.

- Lehmberg E, Casida JE, 1994. Similarity of insect and mammalian ryanodine binding sites. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 48:145–152.
- Lokuta AJ, Komai H, McDowell TS, Valdivia HH, 2002. Functional properties of ryanodine receptors from rat dorsal root ganglia. *FEBS Lett.*, 511:90–96.
- Nakai J, Sekiguchi N, Randos TA, Allen PD, Beam KG, 1998. Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.*, 273:13 403–13 406.
- Puente E, Suner MM, Evane AD, McCaffery AR, Windass JD, 2000. Identification of a polymorphic ryanodine receptor gene from *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30:335–347.
- Radermacher M, Rao V, Grassucci R, Frank J, Timerman AP, Fleischer S, Wagenknecht T, 1994. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 127:411–423.
- Reuter H, 2004. Voltage-sensitive Ca^{2+} channels. In: Lennarz WJ, Lane MD eds. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, Boston. (S–Z):406–408.
- Schmitt M, Turberg A, Londershausen M, 1997. Characterization of a ryanodine receptor in *Periplaneta americana*. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 17:185–197.
- Scott-Ward TS, Dunbar SJ, Windass JD, Williams AJ, 2001. Characterization of the ryanodine receptor- Ca^{2+} release channel from the thoracic tissues of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Membr. Biol.*, 179:127–141.
- Selby TP, Hughes KA, Lahm GP, 2007. Novel arylpyrazole and arylpyrimidine anthranilic diamide insecticides. In: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW eds. *Pesticide Chemistry*. WILEY-VCH, Weinheim. 141–148.
- Seo A, Tohnishi M, Nakao H, Furuya T, Kodama H, Tsubata K, Fujioka, Kodama H, Nishimatsu T, 2007. Flubendiamide, a new insecticide characterized by its novel chemistry and biology. In: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW eds. *Pesticide Chemistry*. WILEY-VCH, Weinheim. 127–135.
- Sharma MR, Wagenknecht T, 2004. Cryo-electron microscopy and 3D reconstruction of ryanodine receptor and their interactions with E-C coupling proteins. *Basic Appl. Myol.*, 14(5):299–306.
- Sitsapesan R, Williams AJ, 1998. *The Structure and Function of Ryanodine Receptors*. Imperial College Press, London. 1–86.
- Squecco R, Bencini C, Piperio C, Francini F, 2004. L-type Ca^{2+} channel and ryanodine receptor cross-talk in frog skeletal muscle. *J. Physiol.*, 555:137–152.
- Takeshima T, Nishi M, Iwabe N, Miyata T, Hosoya T, Masai I, Hotta Y, 1994. Isolation and characterization of a gene for a ryanodine receptor/calcium release channel in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.*, 337:81–87.
- Tinker A, Williams AJ, 1993. Probing the structure of the conduction pathway of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel with permeant and impermeant organic cations. *J. Gen. Physiol.*, 102:1 107–1 129.
- Tohnishi M, Nakao K, Furuya T, Seo A, Kodama H, Tsubata K, Fujioka S, Kodama H, Hirooka T, Nishimatsu T, 2005. Flubendiamide, a novel class insecticide with high activity against Lepidoptera. *J. Pestic. Sci.*, 30:354–360.
- Tu Q, Vélez P, Brodwick M, Fill M, 1994. Streaming potentials reveal a short ryanodine-sensitive selectivity filter in cardiac Ca^{2+} release channel. *Biophys. J.*, 67:2 280–2 285.
- Wang R, Zhang L, Bolsgad J, 2003. Residue Gln⁴⁸⁶³ within a predicted transmembrane sequence of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) is critical for ryanodine interaction. *J. Biol. Chem.*, 278:51 557–51 565.
- Zhao M, Li P, Li X, Zhang L, Winkfein RJ, Chen SR, 1999. Molecular identification of the ryanodine receptor pore-forming segment. *J. Biol. Chem.*, 274:25 971–25 974.

(责任编辑：赵利辉)