

苦皮藤素Ⅳ杀虫机理电生理研究初报

胡兆农¹, 吴文君¹, 高永闯², 刘安西²

S482.39

(1 西北农林科技大学植物源农药研究与开发陕西省重点实验室, 陕西杨陵 712100)

(2 南开大学生物系, 天津 300071)

[摘要] 应用电生理技术研究了苦皮藤素Ⅳ对兴奋性突触后电位(EPSP)和神经-肌肉接头兴奋性接点电位(EJPs)的作用。甘露醇间隙法对美洲大蠊(*Periplaneta americana*)中枢神经离体标本兴奋性突触后电位(EPSP)的测定表明, 质量浓度为0.1 g/L的苦皮藤素Ⅳ在用药后72 min阻断了EPSP。细胞内微电极记录法对果蝇(*Drosophila melanogaster*)运动神经, 即腹纵肌离体标本的神经-肌肉兴奋性接点电位(EJPs)的测定表明, 0.1 g/L的苦皮藤素Ⅳ作用19.5 min可阻断EJPs。

[关键词] 植物性杀虫剂; 苦皮藤素Ⅳ; 作用机制; 麻醉作用; 电生理

[中图分类号] S482.39 **[文献标识码]** A

苦皮藤(*Celastrus angulatus* Max.)是卫矛科南蛇藤属杀虫植物。就杀虫活性而言, 苦皮藤主要含两类活性成分, 即以苦皮藤素Ⅳ为代表的对昆虫具麻醉作用的成分和以苦皮藤素Ⅴ为代表的对昆虫具毒杀作用的成分^[1~3]。苦皮藤制剂对昆虫主要是麻醉作用, 根据其作用症状及初步毒理学研究结果, 推测其麻醉成分可能作用于神经-肌肉接头处, 明显地抑制了兴奋性接点电位(EJPs), 因而兴奋传导被阻断, 试虫出现肌肉松弛, 虫体瘫软^[4], 本文采用电生理的方法对苦皮藤素Ⅳ有关这一方面的作用机理进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 美洲大蠊(*Periplaneta americana*)为室内累代人工饲养的种群。以体长约30 mm的雄性成虫为材料制备中枢神经离体标本。果蝇(*Drosophila melanogaster*)以室内饲养正常型果蝇(wild-type canton-S)3龄幼虫为制备运动神经-腹纵肌标本的材料。

1.1.2 供试药剂 苦皮藤素Ⅳ纯度约为840 g/kg, 自制, 其他试剂均为分析纯或生化试剂。药液的配制: 在电生理试验中, 将苦皮藤素Ⅳ溶于丙酮配成5 g·L⁻¹的母液, 然后加入50 g·L⁻¹的乳化剂。试验时, 以生理溶液稀释母液为0.5, 0.1 g·L⁻¹的试验液。丙酮含量不超过5 g·L⁻¹时, 对电生理试验结果不会有影响。

1.2 试验方法

1.2.1 兴奋性突触后电位(EPSP)的测定 参照刘安西^[5]方法, 对雄性美洲大蠊成虫用

[收稿日期] 1999-06-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(29523003)

[作者简介] 胡兆农(1970—), 男, 助理研究员, 在读博士生

甘露醇间隙法记录腹神经索突触传导的电活动,苦皮藤素 IV 质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.2 神经轴突兴奋性和传导性的测定 仿 Sattelle and Callec 用 Whole-connective recording^[5]法。苦皮藤素 IV 质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 神经-肌肉接头的兴奋性接点电位的测定 参照刘安西^[5]细胞内微电极记录法,记录 3 龄果蝇神经-肌肉接头的兴奋性接点电位(excitatory junction potentials,简称 EJPs),试验测定中苦皮藤素 IV 质量浓度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 对兴奋性突触后电位 EPSP 的影响

把已解剖制备的雄性美洲蜚蠊 A_6 神经节浸泡在蜚蠊生理溶液中,刺激尾须神经 XI,逐渐增加刺激强度,直至在 EPSP 基础叠加稳定的突触后动作电位。从加药后动作电位幅值增加的时间为神经兴奋的时间,动作电位消失的时间为突触传导的阻断时间。

不加药,仅用含有与所配药液浓度相同的丙酮及乳化剂的 Ringer 生理溶液,处理美洲蜚蠊 A_6 神经节 120 min,结果表明对兴奋性突触后电位(EPSP)基本上没有影响。

用生理盐水配制系列浓度的 α -银环蛇毒药液,浸泡美洲蜚蠊 A_6 神经节, $0.25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 α -银环蛇毒对突触传导的影响很小, $2.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上浓度的 α -银环蛇毒均能降低电位的幅值,最终阻断突触传导。 α -银环蛇毒是 AchR 的占领剂,阻止了 Ach 与 AchR 的结合,从而阻断了突触传导。加入苦皮藤素 IV,初时至 10 min 左右,药剂对 EPSP 无明显的影响,随着时间延长 EPSP 逐渐降低,至加药 72 min 左右降低为零,突触传导完全阻断(表 1)。

表 1 苦皮藤素 IV 和 α -银环蛇毒对 EPSP 的作用

药 剂	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	电位降低的时间/min	阻断时间/min
苦皮藤素 IV	20	15	72
α -银环蛇毒	0.025	3.5	30
α -银环蛇毒	0.25	3.5	28
α -银环蛇毒	2.5	3	25

将苦皮藤素 IV 对突触传导的影响与 α -银环蛇毒的作用相比较分析,可以看出 α -银环蛇毒在 $0.025 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低浓度情况下,可在 30 min 左右使神经突触传导完全阻断,而苦皮藤素 IV 在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 浓度下对神经突触传导的阻断时间在 70 min 以上,这说明苦皮藤素 IV 对昆虫产生麻醉的主要原因并不是影响了神经突触传导,不象 α -银环蛇毒那样由于占领乙酰胆碱受体而导致了昆虫麻醉。

2.2 对轴突传导 AP 的影响

不加药,仅用含有与所配药液浓度相同的丙酮及乳化剂的 Ringer 生理溶液,处理美洲蜚蠊撕开结缔组织鞘的腹神经索,直接刺激 A_6 神经节,在 120 min 中,记录到单相动作电位 AP 的结果表明,对神经轴突兴奋性和传导性无明显的影响。用苦皮藤素 IV 处理的结果(图 1)表明,其对轴突传导没有明显影响,用药 100 min 后 AP 仅略有下降。

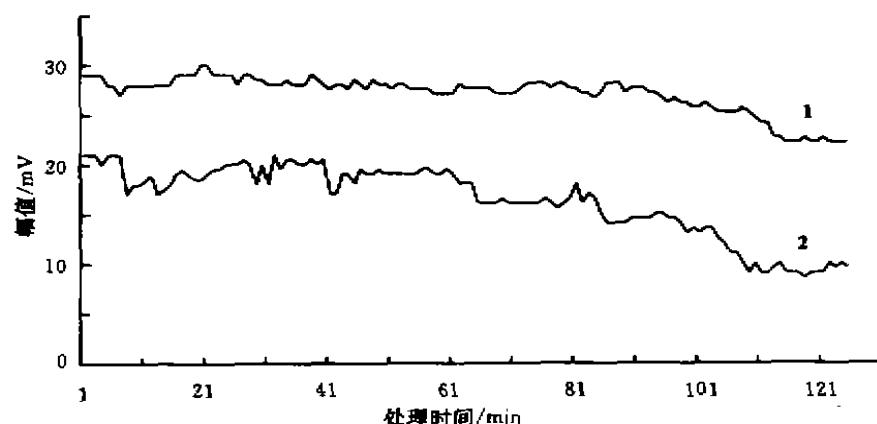


图1 苦皮藤素Ⅳ对轴突传导AP的作用

1. 不加药对照; 2. 苦皮藤素Ⅳ处理

2.3 对EJPs的作用

苦皮藤素Ⅳ对果蝇幼虫神经肌肉兴奋性接点电位的影响表现为逐渐抑制、最后阻断,其阻断时间为19.5 min(图2)。

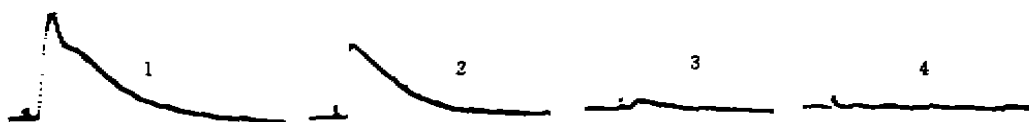


图2 苦皮藤素Ⅳ对EJPs的作用

1. 加药前; 2. 加药后5 min; 3. 加药后15 min; 4. 加药后19.5 min

4 讨论

神经电生理结果表明,苦皮藤素Ⅳ对轴突传导没有明显影响,说明苦皮藤素Ⅳ并不是直接阻断 Na^+ 通道而导致昆虫麻醉;尽管长时间作用可使EPSP降低,导致神经突触传导的完全阻断,但并不象 α -银环蛇毒的作用在 $0.025 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低浓度下,30 min左右使突触传导完全阻断,而是很高浓度下,所需时间要增加1倍以上。这说明苦皮藤素Ⅳ对昆虫产生麻醉的主要原因并不是影响了中枢神经系统突触的兴奋性传导^[6],即不象 α -银环蛇毒那样占领乙酰胆碱受体而导致昆虫神经中毒症状。在试验中突触传导的阻断,可能是离体情况下药剂的浸泡致使神经细胞中毒所引起。

苦皮藤素Ⅳ对果蝇幼虫神经-肌肉兴奋性接点电位(EJPs)的影响表现为逐渐抑制、最后阻断,其阻断时间为19.5 min,这一点也证实了麻醉的产生并不是由于在中枢神经系统的突触传导中占领乙酰胆碱受体,而是直接作用于神经-肌肉接头的突触所致。

对神经-肌肉EJPs的测定说明是阻断了EJPs的传导,分析其原因可能如下:①作用于突触前膜,使兴奋性递质不能释放,兴奋传导阻断^[7]。但苦皮藤同属植物扶芳藤根部麻

醉成分的毒理学研究结果^[8]表明,麻醉粘虫体内谷氨酸含量升高,这说明突触前膜兴奋性递质释放的减少可能不是麻醉的真正原因;②作用于谷氨酸受体,即苦皮藤素Ⅳ作为谷氨酸的拮抗剂,与谷氨酸受体结合,但并不导致受体构象的改变,而受体处于一种脱敏状态,使兴奋传导阻断,昆虫麻醉。所以,谷氨酸受体有可能是苦皮藤素Ⅳ导致昆虫麻醉的真正靶标。这一点还有待于进一步的验证。

[参考文献]

- [1] 吴文君,涂永强,刘惠霞.苦皮藤毒杀成分的结构鉴定[J].西北农业大学学报,1993,21(1):1~5.
- [2] 吴文君,涂永强,刘惠霞.苦皮藤麻醉成分的结构鉴定[J].西北农业大学学报,1993,21(1):6~10.
- [3] 吴文君,刘惠霞,涂永强.新化合物苦皮藤素Ⅴ的分离与结构鉴定[J].西北农业大学学报,1994,22(4):116~117.
- [4] 吴文君,刘惠霞,朱靖博,等.天然产物杀虫剂——原理·方法·实践[M].西安:陕西科学技术出版社,1998.
- [5] 刘安西,陈守同.昆虫电生理学实验研究法[M].北京:科学出版社,1990.
- [6] 刘惠霞,吴文君,李新岗.昆虫生物化学[M].西安:陕西科学技术出版社,1998.
- [7] 翟启慧.昆虫分子生物学的一些进展:神经递质和离子通道[J].昆虫学报,1995,38(3):379~379.
- [8] 任志刚,刘惠霞,吴文君.扶芳藤根部麻醉成分的初步毒理学研究[J].西北农业学报,1998,(7)5:1~3.

Narcosis action electrophysiology of Celangulin Ⅳ from *Celastrus angulatus*

HU Zhao-nong¹, WU Wen-jun¹, GAO Yong-chuang², LIU An-xi²

(1 Lab of Phytoresources Medicine Development, Northwest Science and Technology
University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2 Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Studies have been conducted on the narcotic compound Celangulin Ⅳ from *Celastrus angulatus* with electrophysiological technique. Using sucrose-gap recordings of synaptic transmission across the cockroach cercal nerve-giant fiber synapse, it was observed that the excitatory postsynaptic potential (EPSP) was blocked by 0.1 g/L Celangulin Ⅳ after 72 min of medication. Neurophysiological effect of Celangulin Ⅳ was recorded on the excitatory junction potentials (EJPs) of the drosophila larval neuromuscular junction by using an intracellular microelectrode. After bath-applied Celangulin Ⅳ (0.1 g/L), EJPs was blocked in 19.5 min. It shows that the Celangulin Ⅳ effected the neuromuscular junction of insect to cause narcosis.

Key words: botanical insecticides; Celangulin Ⅳ; mechanism of action; narcotic action; electrophysiology