

苦皮藤素对果蝇幼虫神经肌肉兴奋性 接点电位的影响*

胡兆农¹, 吴文君¹, 姬志勤¹, 刘安西²

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100; 2 南开大学 生物系, 天津 300071)

[摘要] 利用细胞内微电极技术, 研究了杀虫植物苦皮藤中的麻醉成分苦皮藤素IV和毒杀成分苦皮藤素V对果蝇3龄幼虫腹纵肌神经-肌肉兴奋性接点电位(EJPs)和自发电位(SP)的作用。结果表明, 苦皮藤素IV可使自发电位发放频率明显降低, 而苦皮藤素V可使发放频率先增加, 后降低, 并且在某些标本中记录到明显的重复簇状发放; 苦皮藤素IV和V对神经-肌肉兴奋性接点电位(EJPs)的影响表现为逐渐抑制, 最后阻断, 其阻断时间与浓度有一定的相关性, 高浓度下短时间内就能被阻断, 而低浓度下则需较长时间才能被阻断。

[关键词] 植物杀虫剂; 苦皮藤素; 作用机制; 电生理; 兴奋性接点电位(EJPs)

[中图分类号] S482.3⁺9; S481⁺.1

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2004)06-0059-05

谷氨酸受体通道广泛存在于昆虫神经-肌肉接点的肌细胞中, 是由细胞膜上特殊的大分子蛋白跨膜形成的亲水孔道, 其功能是介导神经-肌肉之间的信息传递, 但至今尚未有真正商业化的、以该位点为靶标的杀虫剂^[1]。苦皮藤(*Celastrus angulatus* Max.)是广泛分布于我国长江和黄河流域的杀虫植物, 其杀虫成分主要是以二氢沉香呋喃环为骨架的多元醇酯类化合物^[2,3]。作者的研究表明, 以苦皮藤素IV为代表的麻醉成分, 对神经-肌肉接点电位有显著影响^[4,5]; 以苦皮藤素V为代表的毒杀成分产生的兴奋性症状, 与中枢神经系统无明显关系^[6,7]; 并认为苦皮藤素V对神经肌肉突触的作用, 才是引起昆虫兴奋的主要原因。但这些研究并未就苦皮藤素IV和V对神经-肌肉接点电生理特性的影响及其差异进行系统研究, 因此本试验采用细胞内微电极技术, 对昆虫神经-肌肉兴奋性接点电位的影响进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 果蝇(*Drosophila melanogaster*)饲养 果蝇饲料配方为玉米粉82.5g, 琼脂6.2g, 酵母7g, 水750mL, 丙酸5mL。将5~10对果蝇接入装有饲料的培养瓶中, 放入25℃恒温箱内培养5~6d, 便可

得到试验用3龄幼虫。

1.1.2 果蝇幼虫神经-肌肉标本制备 取室内饲养的正常型果蝇(wild-type, Canton-s)3龄幼虫, 体长3~4mm, 置于自制的小型磁性解剖盘中, 滴加生理溶液, 以小刀片在双目解剖镜下沿幼虫背中线划开体壁, 以小钩拉开并固定虫体, 去除消化道、内脏器官和腺体, 露出脑和咽下神经节及其发出的许多条运动神经, 用微型剪刀剪断运动神经, 将标本浸入果蝇生理溶液中, 以备电生理试验。

1.2 试剂

二氢沉香呋喃类化合物, 纯度为92%的苦皮藤素IV, 纯度为95%的苦皮藤素V, 均由西北农林科技大学农药研究所提供。其他试剂均为分析纯。

果蝇幼虫生理溶液的配制: NaCl 128.0 mmol/L, KCl 2.0 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, MgCl₂ 14.0 mmol/L, 蔗糖 35.5 mmol/L, 二羟乙基哌嗪乙烷磺酸(HEPES, Sigma) 5.0 mmol/L, pH 7.1。

将苦皮藤素IV和V溶于丙酮, 配成 10^{-1} mol/L母液贮存于4℃冰箱中, 试验时以果蝇幼虫生理溶液将母液分别稀释至 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 和 10^{-7} mol/L。

1.3 电生理试验方法

1.3.1 自发电位的记录 通过与刺激器连接的刺

* [收稿日期] 2003-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金倾斜项目(39970505); 国家自然科学基金重点项目(30130130)

[作者简介] 胡兆农(1970-), 男, 甘肃临夏人, 副教授, 博士, 主要从事天然产物农药和昆虫毒理学研究。

激电极吸入果蝇幼虫神经-肌肉标本相应体节的运动神经,用 1 根尖端直径约为 $1\ \mu\text{m}$,内灌 $3\ \text{mol/L}$ KCl 溶液,电极阻抗为 $8\sim 10\ \text{M}\Omega$ 的玻璃微电极刺入相应体节的腹纵肌细胞,可直接记录到神经肌肉接点的自发电位。试验时,首先记录腹纵肌细胞在生理溶液中的自发电位发放频率,记录 $5\ \text{min}$ 作为对照值;然后吸出生理溶液,加入含有药剂的生理溶液,观察记录自发电位发放频率和幅值变化,重复 5 次。

1.3.2 兴奋性接点电位(EJPs)的记录 通过刺激器给神经 1 个 $1.5\ \text{V}$ 的方波刺激,由该刺激诱发的 EJPs 通过记录电极由微电极放大器(NIHON KOHDEN,MEZ-8201)放大,在数字存储示波器(HITACHI,VC-6020)上显示,照相记录。进行毒理试验时,首先记录在生理溶液中由方波刺激所引发的 EJPs 幅值,记录 $5\ \text{min}$,取其平均值作为对照;然后吸出生理溶液,加入不同浓度的药剂试验液,每隔 $30\ \text{s}$ 记录 1 次 EJPs 的幅值,并记录 EJPs 被阻断的时间。

2 结果与分析

2.1 苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ对自发电位的影响

苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ对自发电位发放频率的影响见

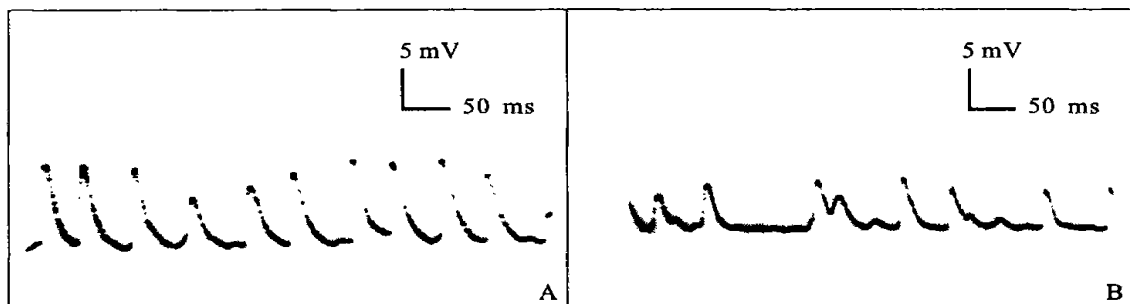


图 2 $10^{-4}\ \text{mol/L}$ 苦皮藤素Ⅴ引起果蝇幼虫腹纵肌细胞自发电位产生的簇状发放

A. 连续性簇状发放; B. 间歇性簇状发放

Fig. 2 Repetitive burst discharging of spontaneous potentials on the ventral longitudinal

body-wall muscle fibers of the third-instar larvae of *Drosophila melanogaster* raised by $10^{-4}\ \text{mol/L}$ Celangulin V

A. Persisting repetitive burst discharging; B. Intermission repetitive burst discharging

2.2 苦皮藤素Ⅳ和Ⅴ对兴奋性接点电位(EJPs)的作用

2.2.1 苦皮藤素Ⅳ对 EJPs 的作用 以 $10^{-6}\ \text{mol/L}$ 苦皮藤素Ⅳ处理标本,对果蝇幼虫神经-肌肉兴奋性接点电位幅值的影响见图 3。从图 3 可以看出,加入苦皮藤素Ⅳ前到加入后 $1\ \text{min}$,EJPs 幅值变化不大(图 3A,3B),随着时间的推移,在 $3, 5, 8\ \text{min}$ 后,幅值逐渐变小(图 3C~3E),直至 $11\ \text{min}$ 时被阻断

图 1。从图 1 可以看出,不加药,仅用含有 0.5% 丙酮的果蝇生理溶液处理,对自发电位发放频率和幅值在 $20\ \text{min}$ 内无明显影响。用苦皮藤素Ⅳ处理后,发放频率明显减小;而用苦皮藤素Ⅴ处理,发放频率于加药后 $7\ \text{min}$ 明显增加, $11\ \text{min}$ 时又开始降低,并且在某些标本中记录到明显的重复簇状发放,结果见图 2。

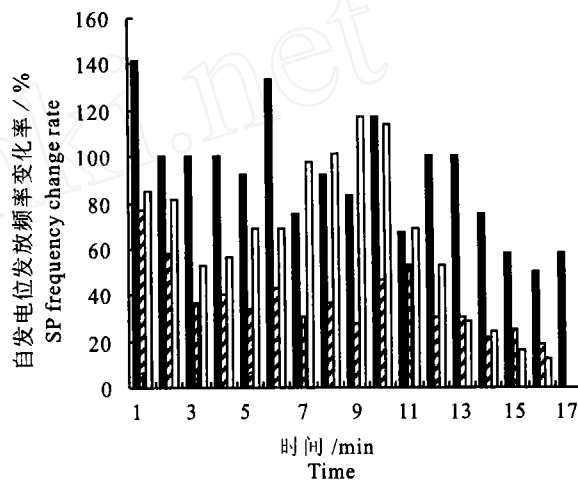


图 1 $10^{-4}\ \text{mol/L}$ 苦皮藤素对自发电位发放频率的影响

□ 对照; □ 苦皮藤素Ⅳ; □ 苦皮藤素Ⅴ

Fig. 1 Effects of $10^{-4}\ \text{mol/L}$ celangulins on the spontaneous potentials frequency

□ CK; □ Celangulin IV; □ Celangulin V

(图 3F)。不同浓度苦皮藤素Ⅳ对果蝇幼虫神经-肌肉兴奋性接点电位幅值变化率的趋势见图 4,各浓度在不同时间内 EJPs 变化率的回归分析结果见表 1。从图 4 和表 1 可以初步看出,与不加药的对照相比,苦皮藤素Ⅳ对果蝇幼虫神经-肌肉兴奋性接点电位的阻断表现为一定的浓度效应,即随着浓度的降低,EJPs 的抑制中时和最终阻断时间均逐渐延长。

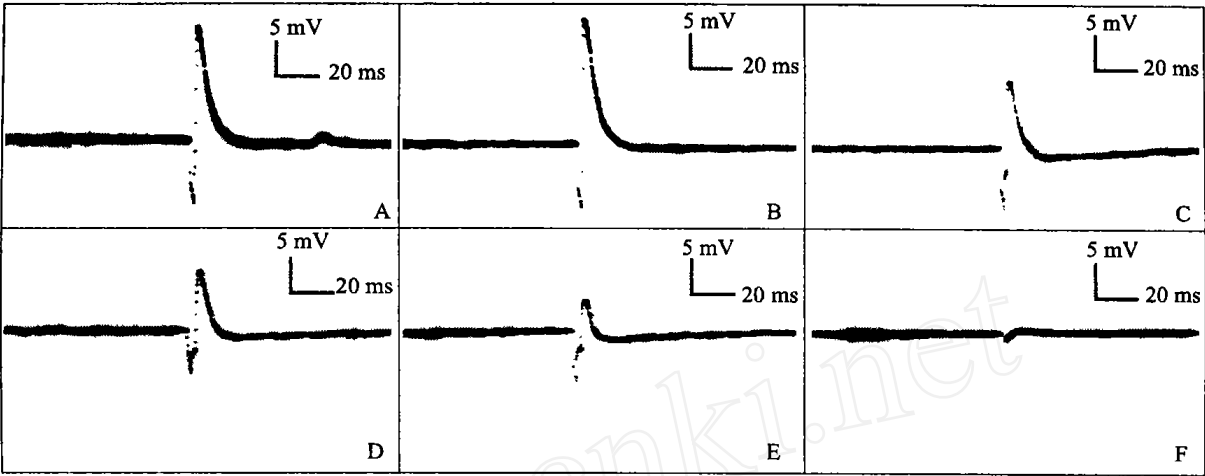


图 3 10^{-6} mol/L 苦皮藤素 IV 对 EJPs 的影响
A. 加药前; B~ E 分别为药后 1, 3, 5, 8 m in; F. 药后 11 m in, EJPs 被阻断
Fig 3 Effect of 10^{-6} mol/L Celangulin IV on EJPs
A. EJPs before treatment with celangulin IV; B~ E. Represent the change of EJPs after 1, 3, 5 and 8 m in treated with celangulin IV; F. Blocking of EJPs after 11 m in with celangulin IV

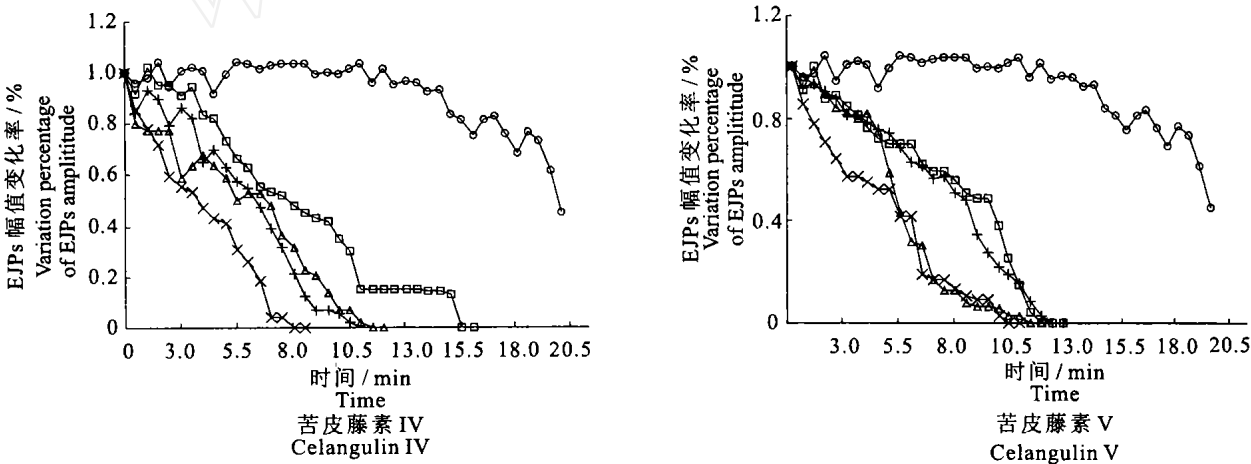


图 4 苦皮藤素对 EJPs 作用后的变化率曲线
- x - 10^{-4} mol/L; - - - 10^{-5} mol/L; - + - 10^{-6} mol/L; - □ - 10^{-7} mol/L; - o - CK
Fig 4 Curve of the variation percentage of EJPs amplitude after being treated with celangulins

表 1 苦皮藤素影响 EJPs 回归计算的抑制中时和阻断终时

Table 1 Results of the mid-point and final-point of blocking EJPs of Celangulins			
化合物 Compounds	处理浓度/(mol · L ⁻¹) Treatment concentration	抑制中时/m in M id-point of blocking	阻断终时/m in Final-point of blocking
苦皮藤素 IV Celangulin IV	10^{-4} (n= 3)	4 0 a	8 5 a
	10^{-5} (n= 4)	5 5 ab	11 5 b
	10^{-6} (n= 4)	6 5 b	11 0 b
	10^{-7} (n= 6)	8 0 c	15 5 c
苦皮藤素 V Celangulin V	10^{-4} (n= 3)	4 5 a	10 5 a
	10^{-5} (n= 7)	5 5 a	11 5 ab
	10^{-6} (n= 4)	7 5 b	12 0 b
	10^{-7} (n= 3)	8 5 b	12 5 b

2.2.2 苦皮藤素 V 对 EJPs 的作用 以 10^{-6} mol/L 苦皮藤素 V 处理标本, 对果蝇幼虫神经- 肌肉兴奋性接点电位幅值的影响见图 5。从图 5 可以看出, 加药后 1 m in 与未加药前相比, EJPs 幅值略有增大

(图 5A, 5B), 这点与苦皮藤素 IV 的情况有所差异; 加药后 3~ 8 m in, 随时间延长, EJPs 幅值逐渐变小 (图 5C~ 5E), 直至 12 m in 时被阻断 (图 5F)。不同浓度苦皮藤素 V 对果蝇幼虫神经- 肌肉兴奋性接点

电位幅值变化率的趋势见图 4, 各浓度在不同时间内 EJP_s 变化率的回归分析结果见表 1。由图 4 和表 1 可见, 苦皮藤素 V 对果蝇幼虫神经-肌肉兴奋性接点电位的阻断也表现为一定的浓度效应, 随着浓

度的降低, EJP_s 的抑制中时和最终阻断时间亦逐渐延长。但这种浓度效应与苦皮藤素 IV 的影响相比, 并不明显。例如从 10^{-6} ~ 10^{-7} mol/L, 浓度相差 10 倍, 但阻断终时只相差 0.5 min。

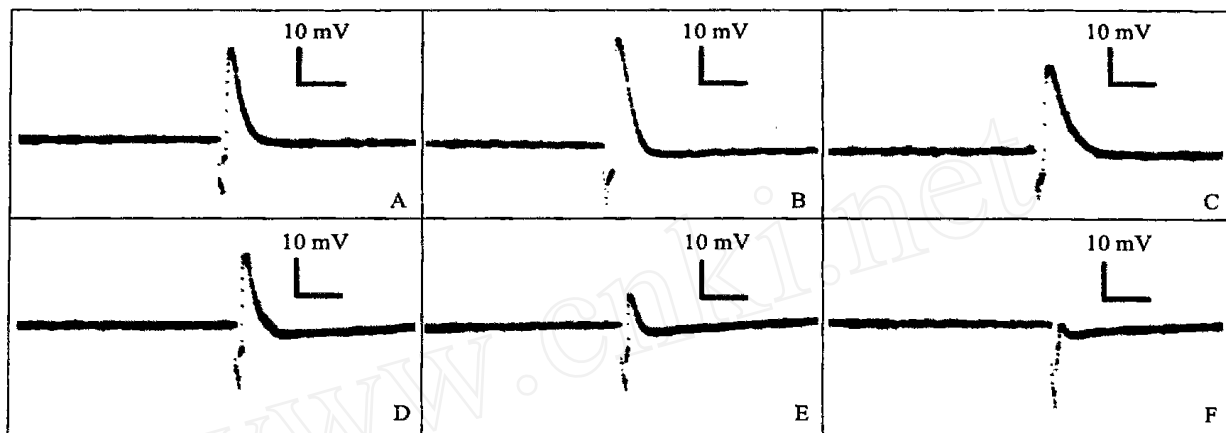


图 5 10^{-6} mol/L 苦皮藤素 V 对 EJP_s 的作用

A. 加药前; B~E 分别为加药后 1, 3, 5, 8 min; F. 加药后 12 min, EJP_s 被阻断

Fig 5 Effects of 10^{-6} mol/L Celangulin V on EJPs

A. EJPs before being treated with celangulin V; B~E Represent the change of EJPs after 1, 3, 5 and 8 min in treated with celangulin IV; F. Blocking of EJPs after 12 min in with celangulin V

3 讨 论

按照文献[8~10], 昆虫幼虫腹纵肌细胞的自发电位可分为两类: 一类是幅值较大的中枢神经依赖性自发动作电位(spontaneous action potential); 另一类是幅值很低(大约为 1~3 mV)的微小兴奋性接点电位(miniature EJP), 这是由突触前膜不断自发地释放兴奋性递质, 兴奋性递质与突触后膜作用, 造成突触后膜去极化而产生的一种微小的电位。一般认为, 肌细胞自发电位发放频率的变化依赖于突触前膜的膜电位, 自发电位频率个体间差异较大, 但在同一个体中的频率和幅值不会发生明显的变化^[11, 12]。本研究结果表明, 苦皮藤素 IV 减小自发电位发放频率, 而苦皮藤素 V 则增加自发电位发放频率, 说明这 2 种化合物对果蝇幼虫神经-肌肉接点突触前膜的膜电位影响不同, 这可能是由 2 个化合物空间结构的差异所致。即苦皮藤素 IV 和苦皮藤素 V 的作用位点可能都是细胞膜上的钠通道, 均可改变钠通道的门控动力学, 但苦皮藤素 V 可能类似拟除虫菊酯类杀虫剂的作用, 可延长钠通道的开放时间, 减小突触前膜的膜电位, 使自发电位的频率极大地增加(即出现重复簇状发放), 从而导致神经递质的耗竭, 阻断神经肌肉的传导^[8, 9]; 而苦皮藤素 IV 可能增加了细胞膜的膜电位, 使细胞膜更不易兴奋,

从而阻断神经肌肉传导。最终, 苦皮藤素 V 在症状上表现出兴奋性症状的挛缩性麻痹(contract paralysis), 而苦皮藤素 IV 表现出麻醉, 即软瘫性麻痹(flaccid paralysis)。

Jan 等^[13]证明, 果蝇幼虫神经-肌肉接点处兴奋性递质是谷氨酸。谷氨酸受体通道是位于昆虫神经-肌肉突触后膜(肌细胞膜上)上的大分子跨膜蛋白, 它与突触前膜释放的兴奋性递质——谷氨酸结合后, 通道开放, 使特定的离子(Na^+)由胞外进入胞内, 改变细胞内外的膜电位, 从而实现神经信息在神经-肌肉之间的传递。试验中记录到的 EJP 是通过对咽下神经给予方波刺激, 产生冲动, 再传递到神经末梢(突触前膜), 突触前膜释放出兴奋性递质谷氨酸, 谷氨酸与突触后膜(肌细胞膜)上的谷氨酸受体通道结合, 使钠通道打开, 突触后膜去极化, 从而产生兴奋性接点电位^[14]。

苦皮藤素 IV 和 V 对果蝇幼虫神经-肌肉兴奋性接点电位(EJP_s)的影响表现为逐渐抑制, 最后阻断, 其阻断时间与浓度有一定的相关性, 高浓度下易在短时间内阻断, 而低浓度下则需较长时间才能阻断。因此可初步认为, 苦皮藤素 IV 和 V 这类化合物对突触传导的阻断作用基本相似, 其对神经系统的影响与对神经-肌肉接点突触谷氨酸受体通道的作用有一定关联。

[参考文献]

- [1] Casida J E, Quistad G B. Golden age of insecticide research: past, present or future[J]. *Annu Rev Entomol*, 1998, 43: 1- 16
- [2] 吴文君, 王明安, 朱靖博, 等. 杀虫植物苦皮藤毒杀成分的研究[J]. *有机化学*, 2002, 22(9): 631- 637.
- [3] 吴文君, 王明安, 刘惠霞, 等. 杀虫植物苦皮藤麻醉成分的研究[J]. *农药学学报*, 2001, 3(1): 46- 48
- [4] 刘惠霞, 吴文君, 胡兆农, 等. 苦皮藤素IV作用机理的初步研究[J]. *世界农药*, 1999, 21(增刊 2): 79- 83
- [5] 胡兆农, 吴文君, 高永闯, 等. 苦皮藤IV杀虫机理电生理研究初报[J]. *西北农业大学学报*, 2000, 28(2): 35- 38
- [6] 吴文君, 刘惠霞, 姬志勤, 等. 植物杀虫剂0.2%苦皮藤素乳油的研究与开发[J]. *农药*, 2001, 40(3): 17- 19
- [7] 杨润亚, 刘惠霞, 胡兆农, 等. 苦皮藤素V引起昆虫兴奋的作用机理初探[J]. *西北农业大学学报*, 2000, 28(5): 18- 21.
- [8] Salgado V L, Irving S N, Miller T S. Depolarization of motor nerve terminals by pyrethroids in susceptible and kdr-resistant house flies[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1983, 20: 100- 114
- [9] Salgado V L, Irving S N, Miller T S. The importance of nerve terminal depolarization in pyrethroid poisoning of insects[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1983, 20: 169- 182
- [10] A idley D J. Muscular contraction[A]. Kerkut G A, Gilbert L I. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*[C]. New York: Pergamon Press, 1985, 5: 407- 466
- [11] 张友军, 韩喜莱, 张文吉. 棉铃虫对菊酯类杀虫剂抗药性的神经电生理研究[J]. *昆虫学报*, 1997, 40(2): 113- 121
- [12] 刘贤进, 杜正文, 王荫长, 等. 甲醚菊酯和溴氰菊酯在果蝇幼虫外周神经系统的协同毒理作用[J]. *昆虫学报*, 1996, 39(1): 1- 5
- [13] Jan L Y, Jan Y N. Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*[J]. *J Physiol*, 1976, 262: 215- 236
- [14] 高永闯, 赵 勇, 刘安西. 用昆虫谷氨酸电位检测磷酸酯化合物的活性[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2000, 33(1): 6- 9

Effects of Celangulin IV and V from *Celastrus angulatus* on excitatory junction potentials of *Drosophila melanogaster* Larvae

HU Zhao-nong¹, WU Wen-jun¹, JI Zhi-qin¹, LIU An-xi²

(1 College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

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

Abstract: Celangulin IV and celangulin V isolated from the root bark of the plant *Celastrus angulatus* are the major active ingredients of this botanical insecticide. Studies on the effects of celangulin IV, celangulin V on insect nerve-muscular junction glutamate potential have been carried out by using the intracellular microelectrode recording on the ventral longitudinal body-wall muscle fibers of the third-instar *Drosophila melanogaster* larvae. The results indicated that celangulin IV could decrease the spontaneous firing frequency. But, when the neuromuscular preparation was treated with celangulin V, the frequency of spontaneous potentials increased, then decreased. In the same time, the distinctly repetitive burst discharging of spontaneous firing was recorded. The effects of celangulin IV and V on neuromuscular excitatory junction potentials (EJPs) of *Drosophila* larvae were gradually restrained and finally blocked. The blocking time had some relativity with the concentration of celangulin IV and V.

Key words: botanical insecticides; Celangulin; mechanism of action; electrophysiology; excitatory junction potentials (EJPs)