

杨琳, 石凯威, 李莉. 高效氯氟氰菊酯对大鼠皮层神经元钠通道的影响[J]. 农药, 2016, 55(12): 891-893.

高效氯氟氰菊酯对大鼠皮层神经元钠通道的影响

杨琳, 石凯威, 李莉

(中国科学院 动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100101)

摘要 [目的]研究旨在评价高效氯氟氰菊酯对哺乳动物的神经毒性作用。[方法]实验利用全细胞膜片钳技术研究高效氯氟氰菊酯对大鼠皮层神经元电压门控钠通道的影响。[结果]高效氯氟氰菊酯使钠电流的峰电压、稳态激活和失活曲线都产生超极化向移动,对最大峰电流和通道恢复没有显著性影响。[结论]高效氯氟氰菊酯与离子通道的开放状态结合力更强,从而影响其失活过程,但对钠通道动力学效应的影响却具有I型菊酯特征。

关键词 高效氯氟氰菊酯,电压门控钠通道,大鼠皮层神经元

中图分类号:TQ450.2 文献标志码:A 文章编号:1006-0413(2016)12-0891-03

Actions of Lambda-cyhalothrin on Sodium Channel in Rat Cerebral Cortical Neurons

YANG Lin, SHI Kai-wei, LI Li

(State Key Laboratory of Integrated Pest Management, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [Aims] Voltage-gated sodium channel is important sites for the neurotoxic actions of pyrethroid insecticides in mammals. The aim was to evaluate the neurotoxic effects of lambda-cyhalothrin. [Methods] We studied the mode of action of lambda-cyhalothrin on the native sodium channel in cerebral cortical neurons prepared from newborn rat brain, where the toxic effects are largely generated. [Results] Lambda-cyhalothrin caused a hyperpolarizing shift in steady-state activation and inactivation. No significant lambda-cyhalothrin-induced effect was observed at the peak current and the recovery from channel inactivation. [Conclusions] These results suggest that lambda-cyhalothrin binds to and modifies sodium channel in open state and exhibits the behavior of type I pyrethroids.

Key words: lambda-cyhalothrin; voltage-gated sodium channel; rat cerebral cortical neurons

DOI:10.16820/j.cnki.1006-0413.2016.12.009

拟除虫菊酯(pyrethroids)因其具有高效、广谱等特性而被广泛使用^[1-2],其对哺乳动物神经毒性的影响也引起关注。拟除虫菊酯类杀虫剂的神经毒性主要是通过结合电压敏感钠通道,影响其门控动力学过程,进而造成神经系统的过度兴奋^[3]。根据其化学结构和毒性表现分为I型和II型:I型不含 α -氰基,中毒症状以震颤为主,称为“T综合征”;II型含 α -氰基,中毒症状以痉挛、流涎为主,称为“CS综合征”^[4]。该分类法使用已久,但是不能全面、准确地反应结构和毒性的关系,特别是一些拟除虫菊酯类杀虫剂的毒性表现较为复杂,如甲氰菊酯的中毒症状具有T和CS综合征的表征。因此,结合化合物对钠通道的动力学效应进行更详细的研究、分类及毒性评价就显得更为有必要^[5-6]。

最简单的电压门控钠通道模型可以分为3个状态:

关闭或静息状态(可以被激活)、开放状态和失活状态(关闭并且不能被激活),这3个状态之间的变化可以通过电压钳实验来实现。大量的电压钳实验表明拟除虫菊酯可以和钠通道的开放状态或关闭状态结合,从而改变通道的门控特性。不同类型的菊酯对通道的影响不同,I型菊酯使通道激活和失活速度要比II型快^[6-9],同一类型的菊酯也会有不同,I型菊酯中顺式苯味菊酯和关闭状态结合,氯氟氰菊酯和溴氟氰菊酯却是影响通道的开放状态^[10]。因此,本实验以我国病虫害防治的重要农药之一的高效氯氟氰菊酯(Lambda-cyhalothrin,又名三氟氯氟氰菊酯、功夫菊酯)^[11]为对象,使用膜片钳技术,以体外培养的大鼠皮层神经元为研究对象,考察其对其电压门控钠通道的动力学作用,为深入研究高效氯氟氰菊酯的毒性机制奠定了基础。

收稿日期 2016-08-04,修返日期 2016-11-01

基金项目 国家自然科学基金(21177155,31401773)

作者简介 杨琳,女,工程师。E-mail yanglin@ioz.ac.cn。

通讯作者 李莉,女,山西人,副研究员,博士,主要研究方向为农药残留分析与环境毒理。E-mail lili2008@ioz.ac.cn。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和药剂

Multiclamp 700A放大器(美国Molecular Devices公司), P97电极拉制仪(美国Sutter公司)。

高效氯氟氰菊酯(纯度98.5% Dr. Ehrenstotfer GmbH); 胰蛋白酶、神经细胞培养液(美国Gibco公司) ;PBS磷酸缓冲液(日本TAKARA公司) ;多聚赖氨酸、电极内外液(美国Sigma公司)。

1.2 神经细胞的分离和培养

皮层神经元取自出生24 h的乳鼠皮层^[12]。新生大鼠迅速断头, 无菌操作取出大脑的皮层部分(冰上操作) 将皮层组织剪碎, 用0.125%胰酶37 °C消化10 min。胎牛血清终止消化, 1000 r/min离心5 min, 弃上清液。加15 mL完全培养基(DMEM/F12+10%胎牛血清)重悬, 将收集到的细胞放入预先铺好的10 μg/L多聚赖氨酸培养皿中摇匀。细胞于37 °C、5% CO₂孵箱中培养。4 h待细胞贴壁后, 换成含B27无血清培养液(DMEM/F12+2% B27), 以后隔天半量换液。正常培养7 d后用于试验。

1.3 膜片钳实验

培养7~10 d的细胞用于膜片钳实验。将培养细胞的爬片置于灌流槽中, 连续细胞外液灌流。Multiclamp 700A放大器采用电压钳模式, Bessel滤波器滤波频率为2 kHz, 采样频率为20 kHz, 串联电阻 $R_a < 20$ Mohm的细胞进行实验。细胞旁灌流给药, 记录钠通道电流。膜片钳电极为P97电极拉制仪控制, 入水电阻3~5 Mohm。实验在室温(21±1) °C下进行。

记录钠电流的电极外液(mmol/L) :CsCl 50, NaCl 10; HEPES 10, CsF 60, EGTA 20, CsOH调至pH值7.2。电极内液(mmol/L) :NaCl 140, KCl 3.5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, HEPES 10, 葡萄糖10, NaH₂PO₄ 1.25, NaOH调至pH值7.4。

1.4 高效氯氟氰菊酯检测

高效氯氟氰菊酯先用二甲基亚砜(DMSO)配制成50 mmol/L的母液, 试验时以细胞外液稀释至所需浓度。当DMSO浓度小于10%时对实验结果无影响。

1.5 数据分析

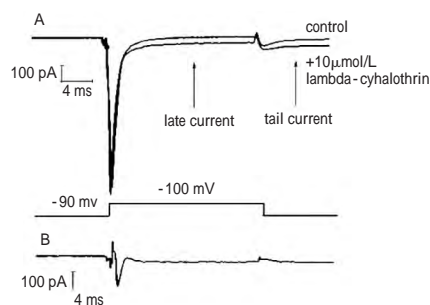
数据使用pClamp 9.0软件采集存储于计算机中, 使用GraphPad Prism 5.0软件进行数据分析。所有数据以 $\bar{x} \pm SEM$ 给药前后差异的显著性用 t -检验分析, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 高效氯氟氰菊酯对电压门控钠电流的影响

将细胞钳制在-90 mV超极化状态, 研究高效氯氟氰菊酯对电压门控钠通道静息状态的影响。如图1A所示,

10 μmol/L高效氯氟氰菊酯对钠电流的峰值几乎没有影响。电流从峰值衰减到基线的时间未受影响, τ_{inact} 大约为0.7 ms, 与对照基本一致, 说明在去极化阶段电流失活没有明显延长。10 μmol/L高效氯氟氰菊酯处理后, 尾电流持续时间长, τ_{tail} 从对照的1.9 ms延长到2.3 ms。

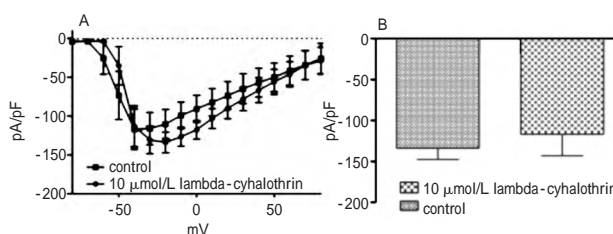


(A)加药前(Control)和加药后单细胞记录的电压门控钠电流; (B)将同一细胞上记录到的加药后电流扣除加药前电流获得的净电流

图1 高效氯氟氰菊酯对电压门控钠电流的影响

2.2 高效氯氟氰菊酯对电压门控钠通道的I-V曲线影响

以全细胞电压钳方式记录电压门控钠电流。钳制电位为-80 mV, 系列去极化刺激脉冲-100~100 mV, 步阶10 mV, 脉宽100 ms, 以峰电流密度做I-V曲线。如图2A所示, 高效氯氟氰菊酯使I-V曲线向超极化方向移动, 最大电流膜电位从-20 mV偏移到-40 mV。如图2B所示, 高效氯氟氰菊酯对最大峰电流无显著影响($P=0.54$ $n=11$)。



(A)加药前后电压门控钠通道的I-V曲线; (B)加药前后钠电流峰电流密度

图2 高效氯氟氰菊酯对电压门控钠通道的I-V曲线影响

2.3 高效氯氟氰菊酯对电压门控钠通道的稳态激活、失活和恢复的影响

按上述方法记录钠电流, 利用公式 $G=I/(V_m-V_{rev})$ 将钠电流值转化为电导值。式中 G 为电导(nS), V_m 为膜电位(mV), V_{rev} 为翻转电位(mV)。以电导值与最大电导值的比值对应膜电位, 绘制出给药前后钠电流的激活曲线, 所得曲线用Boltzmann方程 $G/G_{max}=1/(1+\exp[(V_m-V_{0.5})/k])$ 进行拟合(图3A)。式中 G_{max} 为最大电导值(nS), V_m 为膜电位(mV), $V_{0.5}$ 为半数激活电压(mV), k 为曲线的斜率因子。高效氯氟氰菊酯激活曲线向超极化方向移动大约7 mV, 曲线的斜率因子也增大。经过 t -检验分析, 只有半数激活

电压 $V_{0.5}$ 有显著性差异(见表1)。

表1 高效氯氟氰菊酯对电压门控钠通道的稳态激活、失活和恢复的影响

	激活		失活		恢复
	$V_{0.5}/mV$	k	$V_{0.5}/mV$	k	τ/ms
对照组 ($n=11$)	$-38.48 \pm 1.80^{(1)}$	4.99 ± 1.64	$-49.11 \pm 0.58^{(2)}$	$-4.63 \pm 0.55^{(2)}$	2.23 ± 0.34
加药组 $10 \mu mol/L$ ($n=9$)	$-45.62 \pm 2.64^{(1)}$	5.56 ± 2.08	$-58.46 \pm 1.24^{(2)}$	$7.86 \pm 1.11^{(2)}$	3.29 ± 0.44

注 采用 Boltzmann 曲线拟合 ¹⁾表示与对照有显著性差异 $P < 0.05$ ²⁾表示与对照有非常显著性差异 $P < 0.0001$ 。

将细胞钳制在 $-80 mV$, 给一个从 -120 至 $+10 mV$ 、阶跃为 $10 mV$ 的去极化方波 , 时程 $1000 ms$, 然后再给予一个 $0 mV$ 的测试脉冲 , 在 $50 ms$ 去极化脉冲下 , 记录钠电流。以电流峰值与最大电流值的比值对应预脉冲刺激电压 , 绘制给药前后钠电流的失活曲线 , 所得曲线用 Boltzmann 方程 $I/I_{max} = 1/[1 + \exp [(V_m - V_{0.5})/k]]$ 进行拟合 (图 3B)。式中 I 为电流值 (pA) , V_m 为膜电位 (mV) , $V_{0.5}$ 为半数失活电压 (mV) k 为曲线的斜率因子。经过 t -检验分析 , 加药前后 $V_{0.5}$ 和 k 的变化具有非常显著性差异。高效氯氟氰菊酯还可以使通道中去极化不能被激活的部分增加 ($0 mV$ 处) , 未加药处理时这部分所占比例是 3.4% , 加药后增加为 5.1% , 但是没有显著性差异。

为了研究高效氯氟氰菊酯对通道失活后重新开放的速率的影响 , 将细胞钳制在 $-80 mV$, 条件脉冲 $-80 mV$, 去极化测试脉冲 $-10 mV$, 时间 $5 ms$, 条件脉冲和测试脉冲时间间隔为 5 、 10 、 $15 ms$ 至 $145 ms$ 。以测试脉冲电流 I 和条件脉冲电流 I_{max} 之比为纵坐标、相应时间间隔为横坐标 , 绘制恢复曲线 (见图 3 C) , 用单指数方程拟合 $I/I_{max} = A_0[1 - \exp(-t/\tau)]$, 式中 A_0 为截距 t 为时间间隔 (ms) , τ 为恢复时间常数 (ms)。经过 t -检验分析 , 加药前后 τ 的变化没有显著性差异。

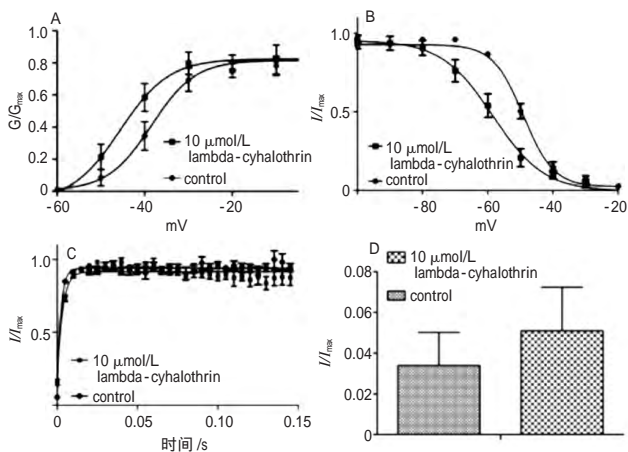


图3 高效氯氟氰菊酯对电压门控钠通道(A)稳态激活(B)失活和(C)恢复的影响(D)加药前后不能被激活的通道比例

3 结论

拟除虫菊酯是一类化学合成杀虫剂。具有杀虫效能高、在环境低滞留等特点 , 被广泛用于农、林和卫生害虫的防治。然而拟除虫菊酯的大量使用 , 使得人类对拟除虫菊酯的暴露问题日益严重。拟除虫菊酯对人类神经毒性的主要靶点是电压门控钠通道 , 但是不同类型的菊酯对其影响不同 , 本实验研究了高效氯氟氰菊酯对大鼠皮层神经元的作用。

电压门控钠通道负责神经元上的动作电位在中枢神经系统中的发生和传导 , 对电压门控钠通道特性的调节是改变神经元电活性的基本要素。从激活曲线和失活曲线的参数比较看出 , 高效氯氟氰菊酯使激发最大钠电流的电压 (图 2A) 和稳态激活和失活曲线 (图 3A、B) 都向超极化方向的移动。钠电流峰电压、稳态激活以及失活曲线的负向移动意味着钠通道从一个关闭的构象转变成一个开放的构象变得更加容易 , 这也意味着钠通道更容易被激活。

将同一神经元上加药后的电流扣除加药前的电流 , 获得只由高效氯氟氰菊酯作用的通道电流。从这个电流可以看出 , 高效氯氟氰菊酯对钠电流的峰值几乎没有影响 , 也没有使去极化阶段电流失活明显延长 (晚钠电流 , late current) , 只使尾电流 (tail current) 失活延长。而比较高效氯氟氰菊酯对激活和失活曲线的影响 , 发现其对失活曲线影响更大 , 加药前后 $V_{0.5}$ 和 k 的变化具有非常显著性差异。因此可以推断高效氯氟氰菊酯很有可能与离子通道的开放状态结合力更强 , 从而影响其失活过程。

鉴于高效氯氟氰菊酯对电压门控钠通道动力学影响 , 其特点更符合 I 型菊酯的对钠通道影响的电生特点 , 适度减慢的激活和恢复 , 快速失活的尾电流^[9]。因此 , 高效氯氟氰菊酯虽然在结构上具有 α -氰基 , 但是在对钠通道动力学效应的影响上却具有 II 型菊酯特征。

综上所述 , 实验结果首次揭示了高效氯氟氰菊酯对电压门控钠通道动力学影响 , 也说明利用膜片钳实验研究通道动力学影响是拟除虫菊酯分类的一个有利补充^[13]。

参考文献 :

- [1] CASIDA J E, GAMMON D W, GLICKMAN A H, et al. Mechanisms of Selective Action of Pyrethroid Insecticides [J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1983, 23: 413-438.
- [2] 刘尚种, 王敏, 陈馥衡. 拟除虫菊酯类农药的研究和展望 [J]. 农药, 2004, 43(7): 289-293.
- [3] NARAHASHI T. Neuroreceptors and Ion Channels as the Basis for Drug Action: Past, Present, and Future [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294(1): 1-26.

(下转第 914 页)

3 结论

国内外文献报道中未见将碱性乙腈提取和PSA固相吸附剂净化结合高效液相色谱法应用于同时检测ETU和PTU残留量的工作中。本研究建立了简便、快速、省时的番茄中ETU和PTU残留检测方法,与现有文献[1-7]方法相比,水平振荡提取减少了番茄共提物对ETU和PTU的影响,PSA分散固相萃取替代固相萃取或基质固相分散萃取,减少了净化过程中溶剂夹带的损失,方法的灵敏度、准确度和精密度均符合农药残留分析的要求,适用于监测检测工作中ETU和PTU在番茄上的残留量测定。

参考文献:

- [1] 王艳丽. 代森锰锌及其代谢产物ETU在几种农产品中的残留检测研究(硕士论文)[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011.
- [2] 朱宏. 丙森锌及其代谢物在水稻上的残留研究(硕士论文)[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [3] 余苹中, 贾春红, 赵尔成, 等. 代森联和乙撑硫脲在西瓜和土壤

中的消解及安全性评价[J]. 农药, 2014, 53(5): 350-352, 585.

- [4] ZHOU Li, LIU Xiao-liang, KANG Shu, *et al.* A Rapid Determination Method for Ethylenethiourea in Potato and Cucumber by Modified QuEChERS-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry [J]. Food Chemistry, 2013 (138): 1355-1359.
- [5] TRAN K, MACTAL L P, CROMER M R, *et al.* Development and Validation of Ethylenethiourea Determination in Foods Using Methanol-Based Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup and LC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2013(140): 340-342.
- [6] LOPEZ-FERNANDEZ O, RIAL-OTERO R, CID A, *et al.* Combined Determination and Confirmation of Ethylenethiourea and Propylenethiourea Residues in Fruits at Low Levels of Detection[J]. Food Chemistry, 2012(134): 366-374.
- [7] BLASCO C, FONT G, PICO Y. Determination of Dithiocarbamates and Metabolites in Plants by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2004(1028): 267-276.
- [8] 赵志远, 石志红, 康健, 等. 液相色谱-四级杆/飞行时间质谱快速筛查与确证苹果、番茄和甘蓝中281种农药残留量 [J]. 色谱, 2013, 31(4): 372-379.

责任编辑 李新

(上接第 893 页)

- [4] GAMMON D W, LAWRENCE L J, CASIDA J E. Pyrethroid Toxicology: Protective Effects of Diazepam and Phenobarbital in the Mouse and the Cockroach [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1982, 66(2): 290-296.
- [5] BRECKENRIDGE C B, HOLDEN L, STURGESS N, *et al.* Evidence for a Separate Mechanism of Toxicity for the Type I and the Type II Pyrethroid Insecticides[J]. Neurotoxicology, 2009, 30S: S17-S31.
- [6] CHOI J S, SODERLUND D M. Structure-activity Relationships for the Action of 11 Pyrethroid Insecticides on Rat Na_v 1.8 Sodium Channels Expressed in Xenopus Oocytes[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 211(3): 233-244.
- [7] TAN Jian-guo, SODERLUND D M. Divergent Actions of the Pyrethroid Insecticides S-bioallethrin, Tefluthrin, and Deltamethrin on Rat Na_v 1.6 Sodium Channels[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 247(3): 229-237.
- [8] TAN Jian-guo, SODERLUND D M. Independent and Joint Modulation of Rat Na_v 1.6 Voltage-gated Sodium Channels by Coexpression with the Auxiliary Beta1 and Beta 2 Subunits[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(4): 788-792.
- [9] HE Bing-jun, SODERLUND D M. Differential State-dependent Modification of Rat Na_v 1.6 Sodium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells by the Pyrethroid Insecticides Tefluthrin and Deltamethrin[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 257(3): 377-387.
- [10] SODERLUND D M. State-dependent Modification of Voltage-gated Sodium Channels by Pyrethroids[J]. Pestic Biochem Physiol, 2010a, 97(2): 78-86.
- [11] RAY D E, FRY J R. A Reassessment of the Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides[J]. Pharmacol Ther, 2006, 111(1): 174-193.
- [12] JOHNSON M D, KINOSHITA Y, XIANG H, *et al.* Contribution of P53-dependent Caspase Activation to Neuronal Cell Death Declines with Neuronal Maturation[J]. J Neurosci, 1999, 19(8): 2996-3006.
- [13] LIN Yang, LI Li. Actions of the Pyrethroid Insecticide Bifenthrin on Sodium Channels Expressed in Rat Cerebral Cortical Neurons[J]. Toxicol Mech Methods, 2015, 25(1): 63-69.

责任编辑 李新

欢迎订阅 2017 年《农化市场十日讯》

《农化市场十日讯》始创于 1990 年,是国内创刊最早的农化信息类期刊之一,是国内目前唯一的一本农化市场信息旬刊,每月 8 日、18 日、28 日出版。凭靠资深专家、学者群落和全国近百家信息部门的鼎力合作,以农化生产、销售、科研、海外登记、农资植保及相关配套单位为主要读者对象。紧紧结合行业的特点、热点,快速报导农化市场动向。2011 年《农化市场十日讯》杂志全新改版,“原药版”“海外版”“植保版”三版齐下,更专业、更全面地为广大读者提供优质服务。2012 年,加盟植物源产业联盟,首创国内第一家植物源联盟专栏,发布国内植物源产学研一体化信息。中国农化市场十日讯网(WWW.NH10.CN)网罗农药界最新资讯,发布行业要闻,原药行情,市场分析,境外培训等,是融资讯、供求、调剂为一体的综合性农化市场信息服务平台。

编辑部地址 江苏省南通市青年中路 136 号 南通科技职业学院生物工程系 5 楼《农化市场十日讯》编辑部,邮编 226000,联系人 陈萍

电话 0513-83556825;15720742272 传真 0513-83554785 电子信箱 shirixun@126.com QQ:1913725207(通联部)。