脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊背侧不成对中间神经元电压依赖性钾电流的影响*

王立山 李 艳 孙 芹 程 洁 高 蓉△ 肖 杭

(南京医科大学公共卫生学院神经毒理实验室 江苏 南京 210029)

摘要 目的:探讨脱氧鬼臼毒素(DOP)对美洲大蠊背侧不成对中间神经元(DUM)电压依赖性钾电流 I_K 的影响。**方法**:采用全细胞膜片钳技术研究脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊背侧不成对中间神经元电压依赖性钾电流的电流幅度,电流-电压关系以及激活曲线的影响。**结果**:DOP 能够抑制电压依赖性钾通道电流的幅度,而且此抑制作用具有浓度依赖性(5、10、20、40 μmol/L)。DOP 抑制 I_K 的半数抑制浓度(IC_{50})值为 18.064 μmol/L。20 μmol/L DOP 能使 IK 的电流-电压关系曲线下移,并能使 I_K 的激活曲线向去极化方向移动。**结论**:DOP 对美洲大蠊背侧不成对中间神经元(DUM)电压依赖性钾电流具有抑制作用,这可能是其杀虫作用的机制之一。

关键词:DOP;DUM;电压依赖性钾电流;膜片钳

中图分类号:R114,S482.3+9 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-6273(2012)26-5020-03

The Effects of Deoxypodophyllotoxin on Voltage-gated Potassium Current in Periplaneta Americana Dorsal Unpaired Median Neurons*

WANG Li-shan, LI Yan, SUN Qin, CHENG Jie, GAO Rong△, XIAO Hang

(The Ministry of Education Key Lab of Modern Toxicology of Nanjing Medical University, Nangjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of deoxypodophyllotoxin(DOP) on voltage-gated potassium current I_K in Periplaneta Americana Dorsal Unpaired Median (DUM) Neurons. Methods: I_K was obtained in DUM neurons by the whole-cell patch clamp technique,and the effects of deoxypodophyllotoxin on I_K were observed. Results: Deoxypodophyllotoxin at the concentrations of 5,10,20, 40 μmol/L inhibited I_K in DUM neurons cells significantly, with the IC_{50} value of 18.064 μmol/L.Current-voltage relationship curve decreased obviously after adding 20 μmol/L DOP, and activation curve of I_K shifted toward a depolarizing direction. Conclusion: Deoxypodophyllotoxin has inhibitory effects on I_K in Periplaneta Americana Dorsal Unpaired Median Neurons, which may be one mechanism of its insecticidal effect.

Key words: DOP; DUM; Voltage-gated potassium current; Patch clamp

Chinese Library Classification(CLC): R114, S482.3+9 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)26-5020-03

前言

脱氧鬼臼毒素(Deoxypodophyllotoxin,DOP)是鬼臼毒素类物质,属于木脂素类,主要存在于小檗科多年生草本类群鬼臼亚科中[1]。近年来,鬼臼毒素类物质因具有杀虫活性而备受关注。生物活性测定发现,脱氧鬼臼毒素作用试虫后,试虫表现出活动减少、虫体瘫软等神经系统受抑制的症状,提示神经系统可能是该化合物的作用靶标之一[2]。神经细胞膜上的离子通道是许多毒素和药物作用的靶点,很多药物是通过影响离子通道的功能而造成神经系统的损伤[3,4]。钾电流可以使动作电位复极化从而保持膜的稳定性,对神经元的兴奋性起调节作用[5-8]。本研究通过测定脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊 Periplaneta americana 背侧不成对中间神经元电压依赖性钾电流的影响,探讨该物质对昆虫神经系统的影响,为阐明鬼臼毒素类物质的杀虫机理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

美洲大蠊,取自南京市疾病预防控制中心。28 ℃,光照 12 L:12 D 的条件下的光照培养箱中饲养,取雄性成虫为实验材料。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂 IA 型胶原酶(C29891)购自美国 Sigma 公司;青霉素、链霉素购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程技术研究所;其他配制细胞生理液的试剂均为国产分析纯。

电极内液(mmol/L):KCl 140.0,HEPES 10.0,EGTA 11.0,Mg-ATP 5.0,用 Tris-base 调节 pH 至 7.4。

电极外液(mmol/L):NaCl 192.5,KCl 10.0,$CaCl_2$ 5.0,Mg-Cl_2 2.0,D-Glucose 12.0,HEPES 10.0,用 Tris-base 调节 pH 至

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81072329);江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介:王立山(1986-),男,硕士研究生,研究方向:劳动卫生与环境卫生,电话:025-86862956,E-mail:wls902@126.com

△通讯作者:高蓉,副教授,E-mail:gaorong@njmu.edu.cn

(收稿日期:2012-03-07 接受日期:2012-03-31)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

7.4。记录前加入 0.2 mmol/L $CdCl_2$ 阻断钙通道，1 μmol/L TTX 阻断钠通道。

1.2.2 仪器 EPC-9 膜片钳放大器（HEKA，Germany）；微电极拉制仪（PP-83，Narishige，Japan）；倒置显微镜（Olympus IX 70，Japan）。

1.3 DUM 神经元的急性分离

按照 Lapied 等人[9]及许鹏[10]的方法急性分离美洲大蠊 DUM 神经元，在 29 ℃环境温度下静置 24h。

1.4 全细胞膜片钳记录

应用全细胞膜片钳技术记录 I_K。微电极由玻璃毛细管（内径 1.6 mm，北京先驱威峰技术开发公司）经 PP-83 型微电极拉制仪经两步拉制而成。拉制之后玻璃微电极尖端 1~2 μmol/L，入液电阻 4～6 MΩ。采用 EPC-9 膜片钳放大器进行全细胞膜片钳记录，参考电极为 Ag-AgCl 电极，电流记录和测量采用 pulse+pulsefit 程序（德国 HEKA 公司）进行控制，通道电流经数据采集存于计算机中。系统电阻、漏电阻和电容电流均由计算机自动补偿，慢电容补偿率 60~80 %左右。刺激频率为 0.1 Hz，采集和滤波频率分别为 20 kHz 和 2 kHz。

1.5 统计方法

实验数据以平均数± 标准差（$\bar{x}$± s）表示，用 SPSS 13.0 进行分析。膜片钳数据由 Clampfit 8.1（Axon Instrument Inc，USA）、Origin8 和 Sigmaplot 12.0（Jandel Scientific，CA）软件分析处理。

2 结果

2.1 DOP 对美洲大蠊 DUM 神经元 I_k 的抑制作用

细胞破膜后，细胞钳制在 -50 mV，首先超级化至 -110 mV，持续 150 ms，随后以步长 10 mV 的阶跃刺激从 -50 mV 至 +60 mV 去极化 400 ms，即可得到 I_K。在记录到稳定电流的基础上，加入不同浓度的 DOP（5、10、20、40 μmol/L），I_K 明显减小（如图 1 A、B）。以抑制率对各浓度作图，数据由 Hill 方程%Inhibition =Imax/(1+[IC_{50}/C]^h)拟合，得出 DOP 对 I_K 作用的浓度依赖性曲线（如图 1C），其半数有效抑制浓度 IC_{50} 为 18.064 μmol/L。

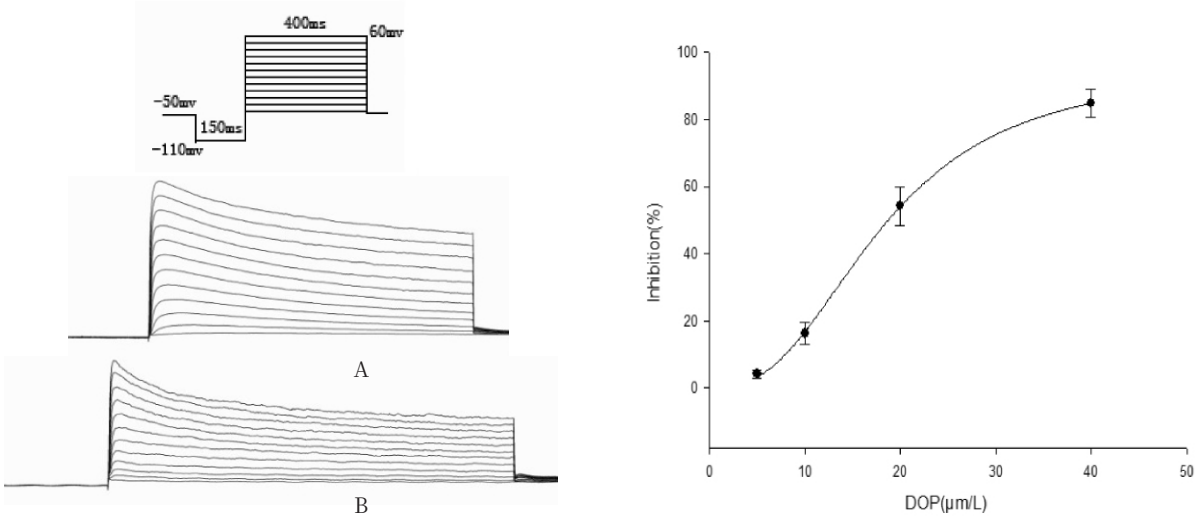

图 1 DOP 对 DUM 神经元 I_K 的抑制作用

A、B 为加 20 μmol/L DOP 前后 DUM 的电流图；C 图为 DOP 对 DUM 神经元 I_K 的剂量反应关系

Fig.1 Effects of DOP on the I_K in DUM neurons

Current traces of I_K (A and B) obtained before and after application of 20 μmol/L DOP;dose-response curve of the effect of DOP on I_K(C)

2.2 DOP 对 DUM 神经元 I_k I-V 曲线的影响

以各去极化电压为横坐标，电流值为纵坐标作 Ik 的电流-电压（I-V）关系曲线，结果显示，20 μmol/L DOP 明显减小钾电流，可使 I-V 曲线下移（P<0.05，n=6，如图 2 A）。

2.3 DOP 对 DUM 神经元 I_k 激活曲线的影响

采用公式 G=I / (V－Vr)将电流值转换为电导值，其中 G 为电导值，V 为膜电位，Vr 为反转电位。以电导值与最大电导值的比值(G/G_0)对应膜电位绘制电流的激活曲线（如图 2 B）。用 Boltzmann 方程拟合激活曲线：G/G_0=1/ {1+exp [－(V－$V_{1/2}$)/κ]}，其中 V 为膜电位，$V_{1/2}$ 为半数激活电压，κ 为曲线的斜率因子。结果表明，激活曲线向去极化方向移动，半数激活电压由 -13.135± 0.631mV 变为 -7.844± 0.756mV（n=6，P<0.05），斜率因子由 13.903± 0.5431 变为 14.038± 0.632，无显著性差异（n=6，P>0.05）。

3 讨论

对鬼臼毒素类化合物的杀虫活性国内外均有报道，国外报道了其对德国蜚蠊成虫、尖音库蚊、菜蛾、酸浆瓢虫等多种害虫的作用，国内高蓉课题组报道了其对对淡色库蚊和菜青虫等的杀虫活性[11~13]，均提示 DOP 对试虫有神经毒性。神经细胞膜上的离子通道是许多毒素和药物作用的靶点，其中钾电流是神经元细胞的主要复极化电流，在维持静息膜电位，决定神经元动作电位的形状、放电频率以及时程，调节神经元兴奋性中均有重要意义[5,7,14,15]。钾离子通道的改变会对神经细胞的兴奋性产生重大影响，甚至会引起神经元细胞的死亡[5]。

目前对杀虫剂电生理特性的研究主要集中在钠和钙离子通道上，电压门控 Na^+ 通道是产生动作电位的基础，电压门控 Ca^{2+} 通道则是再生电位产生的基础，并调节各种依赖予钙离子的生理生化过程，而电压门控 K^+ 通道在调节神经细胞膜兴奋

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

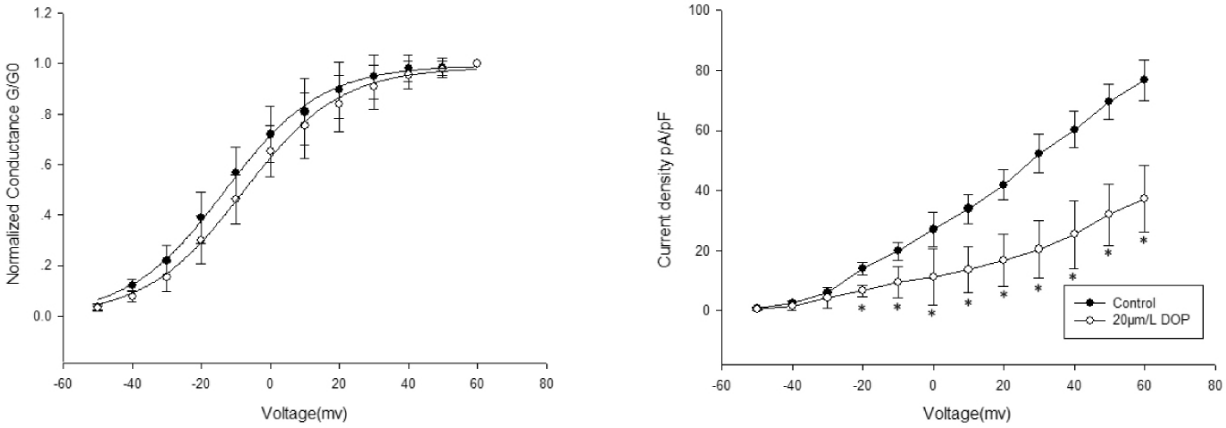

图 2 20 μmol/LDOP 对 DUM 神经元 I_K I-V 曲线及激活曲线的作用 *P<0.05 vs. 对照 (n=6)

Fig.2 Effects of 20 μmol/L DOP on I-V curve (A) and kinetic of steady-state activation(B) of I_K in DUM neurons *P<0.05 vs. control (n=6)

性和神经可塑性中起着关键性的作用，因此钾通道特性的改变能够对神经细胞的兴奋性产生较大的影响[16,17]。本研究使用全细胞膜片钳记录，探讨了不同剂量的 DOP 对美洲大蠊 DUM 神经元电压依赖性钾通道电流的作用。实验结果证实 DOP 作用于细胞后，电流幅度明显减小，呈现浓度依赖性，且下移电压依赖性钾电流的电流 - 电压曲线。DOP 使激活曲线向去极化方向移动，半数激活电压变大。离子通道的激活阈值决定该通道激活的难易程度，激活曲线向去极化方向移动，这说明 I_K 的激活过程受到抑制，使得动作电位去极化和复极化过程中电压依赖性钾通道的开放延迟，使得 I_K 减小，最终导致细胞的兴奋性降低，对神经系统造成损伤[18-20]。

本研究通过膜片钳技术，初步探讨了 DOP 对电压依赖性钾离子通道的作用，实验结果显示，美洲大蠊中枢神经细胞钾通道是 DOP 杀虫作用的靶标之一，DOP 主要通过影响电压依赖性钾通道的激活特性而改变钾通道特性，进而对电压刺激引起的钾电流起到抑制作用。钾电流受到抑制会直接导致神经细胞兴奋性的改变，影响动作电位的形成与传导。可见，钾电流受抑制可能与 DOP 对中枢神经系统的作用密切相关，这可能是 DOP 造成中枢神经系统损伤的机制之一，这对进一步研究 DOP 的杀虫机制以及新型杀虫剂的开发有一定的指导意义。

参考文献(References)

[1] Xu P, Sun Q, Wang XJ, et al. Pharmacological effect of deoxypodophyllotoxin:a medicinal agent of plant origin,on mammalian neuron[J]. Neurotoxicology, 2010, 31:680-686

[2] 孙芹，许鹏，王立山，等. 脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊背侧不成对中间神经元膜电位的影响及其与钠通道的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志，2010, 28(10):740-743
Sun Qin, Xu Peng, Wang Li-shan, et al. Effect of deoxypodophyllotoxin on membrane potential of dorsal unpaired median neurons and its relationship with sodium channel [J].Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2010,28(10):740-743

[3] 孟紫强，魏彩玲. 焦亚硫酸钠对大鼠背根节神经元钾电流的影响[J]. 应用与环境生物学报，2006, 12(2):224-228
Meng Zi-qiang, Wei Cai-ling. Effect of Sodium Metabisulfite on Potassium Currents in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons[J].Chin J ApplEnviron Biol, 2006, 12(2):224-228

[4] Remillard CV,Yuan JX.Activation of K+channels an essential pathway in programmed cell death[J]. Am J Physiol, 2004, 286(1):49-67

[5] Wang Y, He BJ, Wu Ch, et al. Inhibition effects of cyhalothrin on the delayed rectifier potassium current in the central neurons of Helicoverpa armigera [J]. Acta Entomologica, April, 2006, 49(2):235-240

[6] Michael D, Evgenya M, Ola G, et al. Mechanism of Estradiol-Induced Block of Voltage-Gated K^+ Currents in Rat Medial Preoptic Neurons [J]. PLoS ONE, 2011, 6(5):e20213

[7] Hao Shuang, Bao Yong-ming, An Li-jia, et al. Effects of Resibufogenin and Cinobufagin on voltage-gated potassium channels in primary cultures of rat hippocampal neurons [J]. Toxicology in Vitro, 2011,25 (8):1644-1653

[8] Muller W, Bittner K. Differential oxidative modulation of voltage-dependent K^+ currents in rat hippocampal neurons[J]. Neurophysiol, 2002, 87:2990-2995

[9] Lapied B, Malecot CO, Pelhate M. Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurons isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach Periplaneta americana [J]. Exp. Biol, 144: 535-549

[10] 许鹏，孙芹，陈超，等.美洲大蠊中枢 DUM 神经元的分离和电压门控 Na+ 电流的记录[J]. 昆虫学报，2009, 52(4):380-385
Xu Peng, Sun Qin,Chen Chao, et al. Isolation of dorsal unpaired median (DUM) neurons from the central nervous system of the cockroach Periplaneta americana and patch-clamp recording of their voltage-gated sodium current[J]. Acta Entomologica Sinica, 2009, 52(4):380-385

[11] 刘艳青，张守刚，程洁，等. 鬼臼毒素类物质生物活性的研究 [J].医学研究生学报，2006, 19(3):205-209
Liu Yan-qing, Zhang Shou-gang, Cheng Jie, et al. Bioactivity of several podophyllotox in analogues[J]. Journal of Medical Postgraduates, 2006, 19(3):205-209

[12] 张守刚，侯华民，高蓉，等. 脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊的毒力及几种酶系的影响[J]. 昆虫学报，2007, 50(3):248-252
Zhang Shou-Gang, Hou Hua-min, Gao Rong, et al. Toxicity of deoxypodophyllotoxin to Periplaneta americana and its effects on AChE and ATPase[J]. Acta Entomologica Sinica, 2007, 50(3):248-252

(下转第 5008 页)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

构域，也是功能体现的主要结构域。R167 氨基酸残基主要负责 VHL 蛋白结构的稳定，尤其是 α 和 β 结构的稳定。所以该氨基酸残基的改变会导致严重的中枢神经系统母细胞瘤以及肾细胞瘤等疾病的发生。具体详细的致病原因通过下一步的生物学功能研究以及结合临床表现可望得到解答。

VHL 与大多数其他疾病的不同之处是它的最初症状不是单一的，即该病往往不是出现在一个器官，且并不是发生在固定的年龄段。而且疾病的严重程度差异很大，很多家族成员只有相对无害的表现，而其他成员则病情很重。VHL 疾病通常会出现多种肿瘤同时发生，各种肿瘤在不同家族、不同人种中的发生率差异很大。法国人易患神经系统肿瘤，德国人易患嗜铬细胞瘤，日本人则更易患肾肿瘤。研究表明妊娠既不会加速 VHL 病相关的肿瘤生长也不会使其停止生长。针对 VHL 基因的诊断目前已经应用到各种 VHL 综合症患者的治疗中，尤其是一些新的产前诊断方法，如 孕妇外周血诊断胎儿 VHL 突变携带的情况也已经走入临床应用[15-17]。因此随着 VHL 疾病的基因诊断在国内的推广，越来越多一些 VHL 疾病患者将在生育下一代时得到专业的遗传学咨询与生育指导。

参考文献(References)

[1] Kaelin W G, Von Hippel-Lindau disease [J]. Annu. Rev. Pathol, 2007, 2:145-173

[2] Wanebo J E, Lonser R R, Glenn G M, et al. The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with von Hippel-Lindau disease[J]. Neurosurg, 2003, 98: 82-94

[3] Ong K R, Woodward E R, Killick P, et al. Genotype - phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease [J]. Hum. Mutat, 2007, 28: 143-149

[4] Kaelin J. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer[J]. Nat. Rev. Cancer, 2008, 8:865-873

[5] Frew I J, Krek W. Multitasking by pVHL in tumour suppression[J]. Curr. Opin. Cell Biol, 2007, 19:685-690

[6] Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma[J]. Tumor Biol, 2012, 33: 9-16

[7] Cockman M E, Masson N, Mole DR, et al. Hypoxia inducible factor-binding and ubiquitylation by the Von Hippel Lindau tumor suppressor protein[J]. J Biol Chem, 2000, 275:257-233

[8] Sumara I, Maerki S, Peter M. E3 ubiquitin ligases and mitosis: embracing the complexity[J]. Trends Cell Biol, 2008, 18: 84-94

[9] Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, et al. VHL-Regulated MiR-204 Suppresses Tumor Growth through Inhibition of LC3B-Mediated Autophagy in Renal Clear Cell Carcinoma [J]. Cancer Cell, 2012, 21(4): 532-546

[10] Maher ER, Neumann HPH, Richard S. Von Hippel - Lindau disease: a clinical and scientific review[J]. Eur J Hum Genet., 2011, 19: 617-623

[11] Wind JJ, Lonser RR. Management of Von Hippel-Lindau diseaseassociated CNS lesions[J]. Expert Rev Neurother, 2011, 11: 1433-1441

[12] Kaelin Jr WG. Von Hippel-Lindau disease[J]. Annu Rev Pathol Mech Dis, 2007, 2: 145-173

[13] Ali T, Kandil D and Piperdi B. Long Term Disease Control With Sunitinib in a Patient With Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumor (NET) Associated With Von Hippel-Lindau Syndrome (VHL) [J]. Pancreas, 2012, 41(3): 492-493

[14] Leonardi E, Murgia A, Tosatto S C E. Adding structural information to the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor interaction network[J]. FEBS Letters, 2009, 583: 3704-3710

[15] Ellison J. Novel human pathological mutations. Gene symbol: VHL Disease: Von Hippel-Lindau syndrome [J]. Hum Genet, 2010, 127 (4): 477

[16] Huang Y, Zhou D, Liu J, et al. Germline mutations of the VHL gene in seven Chinese families with von Hippel-Lindau disease [J]. Int J Mol Med, 2012, 29(1): 47-52

[17] Martino M, Klatte T, Haitel A, et al. Serum cell-free DNA in renal cell carcinoma: a diagnostic and prognostic marker[J]. Cancer, 2012, 118(1): 82-90

(上接第 5022 页)

[13] Gao Rong, Gao Cong-fen, Tian Xuan , et al. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from Juniperus sabina L,and related lignans against larvae of Pieris rapae L[J]. Pest Management Science, 2004, 60:1131-1136

[14] 程宏,王昌松,汪溪洁,等.地昔帕明对大鼠海马神经元钾电流的影响[J].中国药理学通报, 2006, 22(8):935-938
Cheng Hong, Wang Chang-song, Wang Xi-jie, et al. Effect of desipramine on potassium currents in Rat Hippocampal Neurons[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006, 22(8): 935-938

[15] 鹿勇,钟风,孔晓霞. 红霉素对小鼠海马神经元电压依赖性钾电流的影响[J]. 中国药房, 2009, 20(10) : 741-743
Lu Yong, Zhong Feng, Kong Xiao-xia. Effect of erythromycin on voltage-gated potassium current in Hippocampal Neurons of mice[J]. China Pharmacy, 2009, 20(10) :741-743

[16] Stein RT, Soderlund DM. Role of the local anesthetic receptor in the state-dependent inhibition of voltage-gated sodium channels by the insecticide metaflumizonel[J]. Mol Pharmacol, 2012, 81(3):366-374

[17] Jones PL, Pask GM, Romaine IM, et al. Allosteric antagonism of insect odorant receptor ion channels. [J]. PLoS ONE, 2012,7(1):3030

[18] Zhang XL, Michael S. Gold. Dihydropyridine block of voltage-dependent K^+ currents in rat DRG neurons[J]. 2009, 161(1):184-194

[19] Li Q, Ma HJ, Song SL, et al. Effects of anandamide on potassium channels in rat ventricular myocytes: a suppression of Ito and augmentation of KATP channels [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012,302(6): 924-930

[20] Wang RR, Li N, Zhang YH, et al. The effects of paeoniflorin monomer of a Chinese herb on cardiac ion channels [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(19):3105-3111

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net