

冷欣夫 唐振华 王荫长 主编

中国农业出版社



Molecular Toxicology of Insecticides and
Insect Resistance

杀 虫 药 剂 分 子 毒 理 学 及 昆 虫 抗 药 性



杀虫药剂分子毒理学及 昆虫抗药性

(Molecular Toxicology of Insecticides
and Insect Resistance)

冷欣夫 唐振华 王荫长主编

中国农业出版社

1996

**杀虫药剂分子毒理学及
昆虫抗药性**

(Molecular Toxicology of Insecticides
and Insect Resistance)

冷欣夫 唐振华 王荫长 主编

* * *

责任编辑 陈岳书

中国农业出版社出版 (北京市朝阳区农展馆北路2号)
新华书店北京发行所发行 北京市密云县印刷厂印刷

787mm×1092mm16 开本 11.5 印张 255 千字

1996 年 10 月第 1 版 1996 年 10 月北京第 1 次印刷

印数 1~1 000 册 定价 40.00 元

ISBN 7-109-04497-1/S·2791

Molecular Toxicology of Insecticides and Insect Resistance

Chief Editors:

Leng, Xinfu

Institute of Zoology, Academia Sinica
Beijing 100080

Tang, Zhenhua

Shanghai Institute of Entomology
Academia Sinica, Shanghai 200025

Wang, Yinchang

Department of Plant Protection
Nanjing Agriculture University
Nanjing 210095

本书撰稿人

(以姓氏笔画为序)

王荫长	南京农业大学植保系	南京	210095
冯国藩	中国科学院动物研究所	北京	100080
平野雅亲	日本住友化学工业株式会社 宝塚 综合研究所 农业科学研究所	日本	
刘贤进	江苏省农业科学院植保所	南京	210014
李卫民	中国科学院上海昆虫研究所	上海	200025
吴文君	西北农业大学植保系	陕西杨陵	712100
冷欣夫	中国科学院动物研究所	北京	100080
李显春	南京农业大学植保系	南京	210095
周 新	中国科学院上海昆虫研究所	上海	200025
高希武	中国农业大学昆虫系	北京	100094
唐振华	中国科学院上海昆虫研究所	上海	200025
莫建初	中国科学院上海昆虫研究所	上海	200025
张光美	浙江农业大学植保系	杭州	310029

Contributors

Wang, Yinchang	Department of Plant Protection Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095
Feng, Gaolei	Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080
Hirano, Masachika	Sumitomo Chemical Co. Ltd, Takarayuka Research Center, Institute of Agricultural science, Japan
Liu, Xianjin	Institute of Plant Protection Jiangsu Academy of Agriculture Sciences, Nanjing 210014
Li, Weimin	Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica, Shanghai 200025
Wu, Wenjun	Department of Plant Protection, Northwest Agriculture University Shanxi province, Yangling 712100
Leng, Xinfu	Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing 100080
Li, Xianchun	Department of Plant Protection Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095
Zhou, Xin	Shanghai Institute of Entomology, Academia sinica, Shanghai 200025
Gao, Xiwu	Department of Entomology China Agrlcultureal University, Beijing 100094
Tang, Zhenhua	Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica, Shanghai 200025
Mo, Jianchu	Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica, Shanghai 200025
Zhang, Guangmei	Department of Plant Protection, Zhejiang Agriculture University, Hangzhou 310029

序 言

杀虫药剂的作用机理的探讨正日益趋向接近那个最根本的问题，即杀虫药剂是如何发生作用的？它所作用的靶标分子是什么？人们正试图根据其结构和性质在分子水平上来阐明具有生物活性的化合物的作用机理，即杀虫剂分子毒理。另一方面通过对生物体内的代谢酶系对杀虫剂代谢的研究可以了解这些外源化合物是如何进行生物转化的，害虫抗药性又是如何产生的？这些研究的目的是为了了解活性物质的化学结构与生物活性的关系。从而设计更为理想的药剂，采用更新的合理的用药技术以便更有效地防治有害生物。

杀虫药剂毒理学是近四十多年来形成的交叉学科，交织着昆虫学、生物化学、农药学、分子生物学和遗传学等学科的内容，它是研究、创制新药剂和害虫防治应用的理论基础。近十年来这门学科的迅速发展，如在杀虫剂作用靶点和靶分子、受体以及钠离子通道等方面研究的进展，昆虫抗药性形成机理，监测技术及治理等方面的研究成绩，从而可以从分子水平和抗性分子遗传学方面来阐明杀虫剂的毒理和抗性机理以及杀虫药剂联合作用的理论等。此外，从植物和微生物等天然产物中，发掘新的杀虫活性物质，已成为开发新型杀虫剂的重要来源。书中介绍了探索杀虫剂先导化合物的理论和途径，并对苏云金杆菌 δ -内毒素蛋白的结构、作用机理、害虫产生抗性及其治理等的研究现状作了较详细的阐述。

目前在农业和卫生害虫防治方面广泛应用的多为神经毒性杀虫药剂，其作用机理大致可分为两类：一类是作用于靶酶 (target enzyme)，一类是作用于神经传导的轴突。酶对生命至关重要，在生物体内无论是合成或降解过程都需要酶的参与，各种酶系的协同作用催化各种生物转化反应。当杀虫剂进入生物体内抑制了靶酶的正常功能，即使机体死亡，或作用于神经轴突膜阻断神经传导，而导致机体死亡。另一方面生物体内的各种酶系又能改变杀虫剂分子的结构，使其增强杀虫活性或降解失去杀虫效能。本书的1、2、3、4章对杀虫剂的这些作用机理的研究作了较为全面的论述。在论述机理研究进展的同时，也指明了机理研究中也还存在的问题。

随着杀虫剂的广泛应用，人们对杀虫剂的认识愈来愈深刻。公众心目中理想的杀虫剂是对害虫高效，发挥作用后很快分解失效，分解产物对环境安全，且有较高的选择性，即对人畜、害虫天敌等非靶标生物安全的“生物合理农药” (biorational pesticide)。创制新型的杀虫剂，其主要途径有经验筛选 (empirical screening)、类似物合成 (analogue synthesis)、从天然产物 (natural products) 中找寻新的杀虫活性物质，确定活性骨架的化学结构，发掘先导化合物，进而合成筛选更有效的化合物以及生物合理设计 (biorational design) 等，其中对天然产物，特别是对植物源杀虫剂的研究与开发更引起人们的关注。在第5章中从生物活性、分子结构、作用机理等方面综述了杀虫植物研究的新进展，并对其研究和应用前景提出了一些新的见解。在微生物杀虫剂中，目前最广为研究和应用的是苏云金杆菌。它对昆虫的致死作用中，起重要的作用的是 δ -内毒素，因而，在第6章着重讨论了苏云金杆

菌 δ -内毒素的基因结构、作用方式以及有关抗性问题的初步研究。

抗药性是害虫防治中涉及的另一个重要的问题。害虫抗药性是虫体对杀虫剂的反作用，其实质是生物体调节自身的生理生化功能，消除外源物质（杀虫剂）对生物体可能产生的危害，这是生物体自身的防御本能。关于抗药性形成机理目前有两种新学说。即基因扩增学说：一个抗性基因拷贝为多个抗性基因。这是抗性进化中的一种普遍现象。另一种是染色体重组学说，即染色体易位和倒位对抗性演化的影响，在第8章就代谢抗性和靶标抗性较深入地讨论了昆虫抗药性演化的分子生物学问题，在第9章对抗性治理策略和综合管理决策系统问题论述了害虫抗性与模拟系统的研究进展。在第10章中还结合害虫抗药性问题专题介绍了害虫抗性监测技术，由传统的生物技术发展到生化和分子生物学技术，即由一般抗性水平监测提高到群体内抗性个体频率甚至抗性基因频率监测，这对了解害虫抗性的发生、监测和治理等在理论和实际中都是有重要的意义。

近年来在害虫防治中混配药剂很多，农药混配最重要的目的是兼治，混配药剂在一定程度上也可能延缓害虫抗药性。药剂联合作用基本原理的研究，为混配提供了理论依据，有助于防止盲目混配。在第7章中详细地论述了农药联合作用的基本理论和混配药剂及应用中应注意的一些问题。

最后还需指出，这本书的内容全面涉及当前杀虫药剂毒理学及害虫抗药性问题研究的最新进展，书中对论述的有关问题列举了大量文献。希望它能成为从事这一领域研究或教学人员以及有关专业工作者的一本有用的参考书。

由于我们的水平有限，时间又很仓促，书中如有错误或不当之处，请多加指正。

冷欣夫

1996年4月于中国科学院动物学研究所

目 录

第1章	杀虫药剂分子毒理学	冷欣夫	(1)
第2章	乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的毒理学, 生物化学 和分子生物学	高希武	(30)
第3章	拟除虫菊酯类杀虫剂的研究展望	平野雅亲	(57)
第4章	拟除虫菊酯杀虫剂与钠离子通道	冯国蕾	(69)
第5章	植物源害虫控制剂研究进展与前景	吴文君	(79)
第6章	苏云金杆菌 δ -内毒素及害虫抗药性	唐振华 周 新 张光美	(104)
第7章	杀虫剂的联合作用	刘贤进 王荫长	(118)
第8章	昆虫抗药性演化的分子生物学	唐振华 李卫民	(132)
第9章	害虫抗药性模拟系统的研究进展	唐振华 莫建初	(148)
第10章	害虫抗药性监测技术	王荫长 李显春	(159)

Contents

Chapter1. Molecular Toxicology of Insecticides	<i>Leng, Xinfu</i> (1)
Chapter2. Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology of Acetylcholinesterase	<i>Gao, Xiwu</i> (30)
Chapter3. Study on Pyrethroid Insecticides in Perspective	<i>Hirano, M</i> (57)
Chapter4. Relationship between Pyrethroid Insecticides and Sodium Channel	<i>Feng, Guolei</i> (69)
Chapter5. Advances and Prospects of Plant Products Research for Pest-insects Control	<i>Wu, Wenjun</i> (79)
Chapter6. δ -Endotoxin of <i>Bacillus Thuringiensis</i> and Pest-insect Resistance	<i>Tang, Zhenhua, Zhou, Xin and Zhang, Guangmei</i> (104)
Chapter7. Joint Action of Insecticides	<i>Liu, Xianjin and Wang, Yinchang</i> (118)
Chapter8. Molecular Biology of Evolution of Insect Resistance to Insecticides	<i>Tang, Zhenhua and Li, Weimin</i> (132)
Chapter9. Advances in the Study of Simulated Systems of Insecticide Resistance in Pest-insects	<i>Tang, Zhenhua and Mo, Jianchu</i> (148)
Chapter10. Techniques for Monitoring Pest-insect Resistance	<i>Wang, Yinchang and Li, Xianchun</i> (159)

第1章 杀虫药剂分子毒理学

冷欣夫

中国科学院动物研究所 北京 100080

1. 引言
2. 有机磷和拟除虫菊酯类杀虫药剂的毒理机制
 - 2.1. 有机磷杀虫剂的毒理机制
 - 2.1.1. 有机磷杀虫剂与 AChE
 - 2.1.2. 有机磷杀虫剂与受体
 - (1) 烟碱乙酰胆碱受体 (nAChr)
 - (2) 蕈毒碱乙酰胆碱受体 (mAChr)
 - (3) 蕈毒酮样的受体 (muscaronic receptor)
 - (4) GABA 受体
 - 2.2. 轴突毒剂的毒理机制
 - 2.2.1. 钠离子通道学说
 - 2.2.2. 轴突毒剂作用机制第二种学说
 - 2.2.3. 拟除虫菊酯对蛋白质磷酸化的影响
3. 某些酶系在杀虫药剂代谢中的作用
 - 3.1. 细胞色素 P₄₅₀ 酶系
 - 3.2. 黄素酶系 (FMO)
 - 3.3. 谷胱甘肽转移酶系 (GSTs)
 - 3.4. 磷酸三酯水解酶系
 - 3.5. 羧酸酯酶系 (CaE)

1. 引言

杀虫药剂分子毒理学包括两方面的内容,一方面是从分子水平研究杀虫剂的毒杀机制,如杀虫剂与动物(昆虫)体内的酶系、受体及其它活性物质的化学反应;另一方面是从分子水平研究昆虫对杀虫药剂的作用,如杀虫剂在昆虫体内的解毒代谢、活化等生化过程。只有彻底地了解了杀虫药剂对昆虫的毒杀作用以及昆虫对杀虫药剂的反应,才能更好使用杀虫药剂以发挥它的药效。由于杀虫药剂分子与昆虫体内酶分子的作用和酶分子引起杀虫药剂分子的改变等方面的内容所涉及的范围比较广泛,而近年来这方面的发展又非常迅速,因此本章主要只对神经毒性有机磷和拟除虫菊酯类杀虫剂的毒理机制及其代谢作用的新发展进行讨论。

2. 有机磷和拟除虫菊酯类杀虫药剂的毒理机制

2.1. 有机磷杀虫剂的毒理机制

2.1.1. 有机磷杀虫剂与乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的反应

有机磷杀虫剂的生物活性是其与 AChE 和其它胆碱酯酶 (ChE) 的反应。AChE 被有机磷化合物抑制后则引起乙酰胆碱 (ACh) 在突触内的迅速积累, 因而导致突触传导中断, 甚至机体死亡。脊椎动物的 AChE 受抑制后影响呼吸中枢, 由于呼吸中断, 机体窒息死亡; 在昆虫中, 由于 AChE 受抑制, ACh 便在突触中积累继而引起神经传导中断, 机体死亡。但其中的因果关系尚不清楚。

当然要真正了解有机磷类杀虫剂对 AChE 的抑制作用, 还需要了解 AChE 的主要作用部位, 如催化部位, 结合部位和变构部位。而结合部位又分为阴离子部位、疏水部位、电荷转移复合体部位、酰酚结合部位以及硫羰基部位等。有机磷杀虫剂抑制 AChE 后, 在不同的结合部位上可引起不同的反应, 有些化合物可使酶的结构改变而改变整个酶的反应性。此外, AChE 还有许多同功酶, 昆虫体内 AChE 的同功酶与脊椎动物不同。脊椎动物的同功酶由不同的亚基组成, 在昆虫中还含有不同的糖分子及脂肪分子。因此不同的同功酶被抑制剂所抑制的情况也不尽相同。(详见第 2 章)

有机磷杀虫药剂除了能抑制 AChE 外, 还能抑制其它酶系, 如神经毒性酯酶 (neurotoxic esterase, NTE)。目前已知许多种有机磷杀虫剂, 如溴苯磷 (leptophos)、氟丙氨磷 (mipafox)、敌敌畏、敌百虫和甲胺磷以及三甲苯基磷酸酯 (TOCP) 等, 都曾先后报道引发规模不等的迟发性神经毒性 (organophosphate-induced delayed neuropathy, OPIDN)。英国的 Johnson, (1982) 提出 NTE 的抑制和老化是 OPIDN 发生的起始步骤。又如在昆虫体内的羧酸酯酶与有机磷酸酯的亲合性比 AChE 强, 容易先被抑制。而 AChE 免于受杀虫剂的抑制, 因而增加了这种昆虫对有机磷药剂的耐受力。

2.1.2. 有机磷杀虫剂与受体的作用

昆虫神经受体是许多杀虫药剂的作用靶标。其中有 ACh 受体、 γ -氨基丁酸 (GABA) 受体等。而 ACh 受体又有三种, 这三种受体为烟碱乙酰胆碱受体 (nAChR)、蕈毒碱乙酰胆碱受体 (mAChR) 和蕈毒酮样受体 (muscaronic receptor)。

(1) 烟碱乙酰胆碱受体 (nAChR) AChE 和 nAChR 都位于神经肌肉和脑部烟碱连接点的突触处, AChE 受抑制后影响 nAChR 的功能。所以在 70 年代这两种蛋白纯化之前, 要区别抗 AChE 对 nAChR 的直接影响是非常困难的, 后来才证实有机磷化合物可直接抑制 nAChR, 如 DFP 能直接抑制 nAChR 的传导 (Kuba 等, 1973)。神经毒气 VX (O-乙基 s [2-(2 异丙基)-胺基]) 甲基硫代磷酸酯抑制 nAChR 通道 (Aracava 等, 1987; Bakry 等, 1988)。此后研究证明有机磷化合物对 [^3H] ACh 和 [^3H] -phencylidine 或 [^3H] perhydro histrionicotoxins 对 nAChR 离子通道结合的影响, 发现梭曼 (soman) 和 echothiophate 在微摩尔每升浓度下, 作为激活剂, 可诱导受体脱敏。当 VX 作为该通道的一种强阻断剂时, 可增强受体的脱敏作用 (Bakry 等, 1988)。Eldefrawi 等 (1988) 发现 DFP 诱导受体脱敏化是

由于它与 nAChR 的第三部位的结合。

(2) 蕈毒碱乙酰胆碱受体 (mAChR) 有机磷化合物对 mAChR 的直接作用是用 [^3H] QNB (quinuclidinyl benzilate) 与牛脑受体相结合被有机磷化合物抑制试验首次证实的 (Volpe 等, 1985)。昆虫脑内也存在 mAChR, 并证明蕈毒碱样药物对其抑制作用很强, 如 dextetimide 莨菪碱, 但烟碱样的药物对它们完全无作用。

此外, mAChR 还有不同的亚型, 其特性可被用于发展选择性的医学治疗, 从而引起了药理学和试验医学方面的广泛兴趣 (Bonner, 1989; Hulme 等, 1990)。Hammer 等 (1980) 曾用 pirenzepine 与神经 mAChR 结合的亲合试验来区分 mAChR 的亚型, 结果发现 mAChR 可分为两个亚型: 在中枢神经系统 (CNS) 发现的为高亲合性 M_1 亚型, 在心脏和平滑肌内为低亲合性 M_2 亚型。

分子克隆技术的发展也为 mAChR 蛋白亚型分类的研究提供了重要手段。5 种不同种族人的 mAChR 即是利用 cDNAs 或基因 DNAs 的克隆和序列分析测定的; 杂交研究表明, 可能还有一些其它亚型 (Bonner, 1989)。哺乳动物脑组织含有所有受体亚型, 因此人们常以脑组织来研究 mAChR。当用 [^3H] pirenzepine 标记于 M_1 受体, 和 [^3H] cis-methyldioxolane [^3H] CD 标记于高亲合性的 M_2 受体, 进行有机磷化合物对鼠脑 mAChR 亚型影响的研究时, 发现 M_2 亚型受体对有机磷化合物最敏感 (Bakry 等, 1988), M_1 亚型则不敏感。当加入 M_2 和 M_3 时, 对氧磷在浓度很低 ($< \text{pmol/L}$) 的情况下有很强的敏感性 (Kat 和 Marquis, 1989)。

心机的蕈毒碱受体几乎全是 M_2 亚型, 只有少数 M_1 亚型 (Watson 等, 1986)。以 [^3H] CD 与大鼠心脏内 M_2 受体结合的试验中发现, 梭曼、VX、沙林和塔崩等神经毒气抑制 [^3H] CD 与 M_2 受体结合的 $K_{0.5}$ 值分别为 0.8、2、20 和 50 nmol/L (Silveira 等 1990)。一般来说, 这些 M_2 受体对有机磷杀虫剂的亲合性要低于对神经毒剂的亲合性。(图 1, 2)

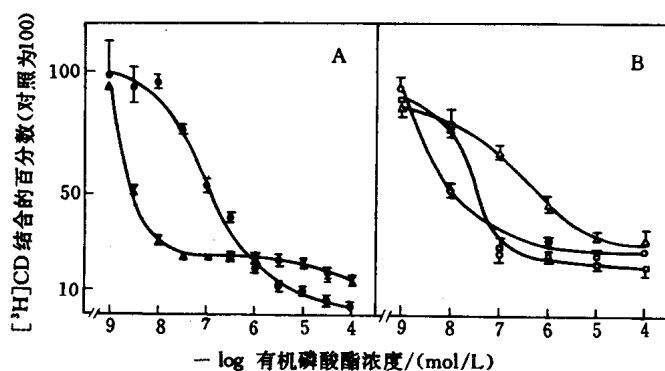


图 1 抗 AChE 有机磷化合物, 对 [^3H] CD 与鼠脑膜专属性结合的抑制作用

(A) Echothiophate (●) 和 VX (X). (B) 梭曼 (○), 沙林 (Δ) 和塔崩 (□)

(引自 Bakry 等, 1988)

如对氧磷的 $K_{0.5}$ 值为 200 nmol/L, 而敌百虫、蝇毒磷 (coumaphos)、苯硫磷和毒死蜱 (chlorpyrifos) 均大于 1 $\mu\text{mol/L}$ 。此外, 心脏与脑的 M_2 受体被 Ni^{2+} 离子和 N-乙基马来酰亚胺抑制的情况也不相同, 前者对脑受体有刺激作用而后者有抑制作用。ethothiophate 在低浓

度 nmol/L 下抑制 $[^3\text{H}]$ 顺式-甲基二氧戊环与 M_2 受体结合, 证明 M_2 受体只对某些有机磷化合物有高亲合性。所以说并不是所有与顺式-甲基二氧戊环结合的心脏 M_2 受体对有机磷化合物都有很高的亲合性。

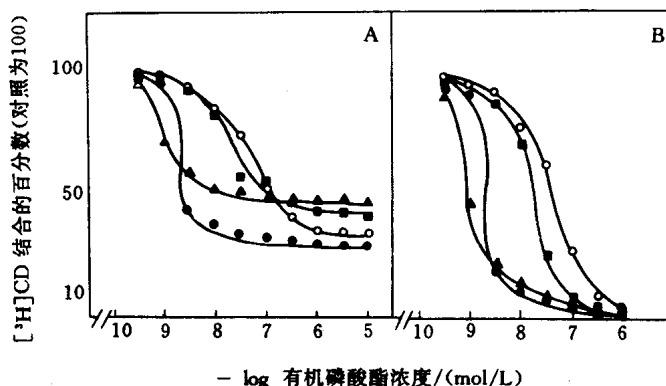


图2 有机磷化合物 VX (·), 梭曼 (▲), 沙林 (■) 和塔崩 (○) 对 $[^3\text{H}]$ CD 与心肌膜结合的抑制作用。(A) 观察值。(B) 除去 $[^3\text{H}]$ CD 结合的有机磷化合物敏感部分的校正值 (引自 Silveira 等, 1990)

抗 AChE 有机磷化合物对 mAChR 的直接作用表明, 某些 mAChR 对特异的有机磷化合物具有高亲合性, 特别是心脏的 M_2 亚型和纹状体的 M_4 亚型。这些受体的亲合性要比对 AChE ($100\mu\text{mol/L}$) 低 (Eldefrawi, 1985)。虽然, AChE 是有机磷化合物的关键靶标, 它对 AChE 是渐进的不可逆的磷酸化作用和可能进行的老化, 但从有机磷化合物对 AChE 的抑制及其与 M_2 受体的亲合性之间无明显的相关性来看, 有机磷化合物对 M_2 受体的作用是可逆的 (Eldefrawi 等, 1985)。

(3) 蕈毒酮样的受体 (muscarinic receptor) 在 AChR 中; 除了烟碱样与蕈毒碱样受体之外, 在昆虫 (家蝇和果蝇) 中还有第三种受体, 即蕈毒酮样受体。蕈毒酮对这第三种受体有很强的亲合性。研究证明蕈毒酮与蕈毒酮受体的结合, 不仅受到烟碱样和蕈毒碱样药物的抑制, 而且也为非胆碱激性的化合物所抑制。如当家蝇蕈毒酮受体与十甲镪结合后, 会受到烟碱样、蕈毒碱样以及抑制 AChE 药物的阻抑, 如受到抑制胆碱酯酶的药物 (DFP, 杀虫畏) 的阻抑。这一受体似乎具有真正的毒理意义, 因为它的被抑制与死亡有关。

(4) GABA 受体 GABA 受体有两种, 即受体 A 型和 B 型。在前突触膜内, 既有 A 型也有 B 型。但在后突触膜上只有 A 型。也只有 A 型受体与突触传递有关。在前突触膜上的 B 型受体被激活剂激活时, 它刺激前突触膜使钙离子大量进入, 因此使得更多的小泡释放出 GABA。而 GABA 则使神经传导受到抑制, 使后突触膜产生超极化作用, 即抑制动作电位的产生, 影响正常的突触传导, 因而使神经功能失常。GABA 受体的被占领或受破坏, 也同样阻断神经的正常传导。

A 型 GABA 受体除了本身是一个受体有其作用部位外, 还有一个苦毒宁作用部位、苯并二氮杂草 (benzodiazepine) 部位和吸收部位。吸收部位的功能是吸收释放出的 GABA 分子。GABA 受体受激活剂激活后, 使得各作用部位的氯离子通道开放, 而氯离子大量进入

突触后膜，由此使动作电位在膜内负，膜外正得到加强而带来了超极化效应。这样，另一个冲动到达突触后膜时就不再引起兴奋。

近年来，人们为了探索有选择毒性的杀虫药剂曾以哺乳动物和昆虫进行了研究，Bloomquit (1994) 以 β -咔啉 (β -Carline) 与哺乳动物的 GABA 受体复合体的苯并二氮杂草部位结合，证明其作用是 GABA 的颞颥剂。又以 β -咔啉的类似物 3-乙氧基 β -咔啉和三龄的黑尾果蝇 (*Drosophila melanogaster* Meign) 幼虫的中枢神经作神经生理试验表明，此化合物与 GABA 受体的亲合性低，不能作为 GABA 的颞颥剂。这说明哺乳动物与昆虫的 GABA 受体在药理上的作用是不同的。

Narahashi (1994) 报道以大鼠脊神经节神经元 (dorsal root ganglion neuron) 或人胚肾细胞株为材料，用膜片钳位 (patch clamp) 技术已证明狄氏剂、 γ -BHC 和 δ -BHC 对 GABA 受体氯离子通道亚基的不同效应。发现 GABA 受体氯离子通道复合体是环戊二烯和林丹类杀虫剂的靶标部位。此复合体为含有 5 个亚基 $6\alpha S$ 、 $4\beta S$ 、 $4\gamma S$ 、 1σ 和 $2\rho S$ 的五聚体蛋白。某些神经毒性杀虫剂可使 GABA 受体诱导聚合体蛋白中氯电流增强或减弱 (表 1)。

表 1 几种杀虫剂引起 GABA 诱导聚合体蛋白氯电流的变化

杀虫药剂	GABA 诱导聚合体蛋白氯电流变化		
	$\alpha_1\beta_2\gamma_2S$	$\alpha_1\beta_2$	$\alpha_6\beta_2\gamma_2S$
狄氏剂	↓ ↑	↓	↓ ↑
γ -BHC	↓	↓	
δ -BHC	↑	↓	

注：↑表示氯电流增强；↓表示氯电流减弱。

由表可以看出，这些药剂对 GABA 受体的亚基作用不同，表明它们在神经系统不同区域中的不同作用。

在有机磷化合物 (如 DFP) 对鼠的毒性的耐受性研究中，有人发现，以 DFP 急性处理大鼠后，会增加 GABA 和多巴胺受体的密度、谷氨酸和 GABA 的水平，但对草毒碱受体的性质无影响；如果以 DFP 亚急性处理则减小草毒碱受体的密度，却不影响其亲合性。同时增加 GABA 和多巴胺受体密度，但减少了 GABA 的吸收和释放。因而认为 DFP 使 GABA 和多巴胺系统的改变会引起脑 ACh 的浓度在 ChE 被抑制后再一次上升。这些神经递质水平的持续变化能增加突触后膜受体的密度，并可调节对 DFP 的耐受性 (Sivam 等, 1983)。

2. 2. 轴突毒剂的作用机理

2. 2. 1. 钠离子通道学说

一般认为轴突毒剂是影响轴突传导的药剂，如除虫菊酯类杀虫剂和滴滴涕等，主要通过改变轴突膜的通透性，影响膜的电位差，从而阻断轴突的传导。轴突膜是半透性的，膜内外的各种离子的分布并不相同。在正常情况下，膜内 K^+ 离子多， Na^+ 离子少，此外还有其它有机阴离子和 Cl^- 离子等。而膜外 Na^+ 离子多， K^+ 离子少，也有 Cl^- 离子存在。膜上有依赖于 ATP 能量的 Na^+/K^+ 泵，使 Na^+ 离子泵出膜外，而 K^+ 离子进入膜内，这样膜内外由于离子的浓度差而产生了膜电位。在无神经冲动时即称静息电位。若静息电位发生变化，

即是膜上的几种离子通透性发生了改变。当轴突膜受刺激静息电位发生改变时,主要是膜对 Na^+ 离子和 K^+ 离子通透性发生了变化,而 Cl^- 离子的通透性则未改变。首先是 Na^+ 离子通透性增强,有大量的 Na^+ 离子进入膜内造成膜的去极化,膜电位上升。去极化持续的时间是短暂的,立即会产生钠通道的失活和钾通道的活化,即 Na^+ 离子的通透性降低而 K^+ 离子的通透性增强。于是膜电位又下降,这是极化的恢复阶段。当膜电位下降到比原来膜电位更负的水平,这时由于 K^+ 离子外流继续增加,膜对它的通透性也继续增强,而钠通道此时完全失活,膜电位再度降低到钾的平衡电位之下,此时极化程度加强了,为超极化阶段,又称正相。由于膜外 K^+ 离子过多,它们会回流入膜内,这个向内的 K^+ 电流造成了膜电位的又一次短暂的上升,一般达不到钠阈值,这个微小的去极化阶段,即称负后电位。任何一个刺激产生的动作电位都有这四个阶段。滴滴涕和除虫菊酯类杀虫剂对轴突膜的影响,就是因为它们使轴突膜产生的负后电位的加强与延长。当负后电位增加到一定水平,一个单刺激就会触发动作电位的一连串重复后放,即是兴奋,重复后放的停止,即为麻痹。

为了研究离子通透性的改变与负后电位的产生之间的确切关系,必须测定离子通透性的变化。因此在实验中采用电压钳位法及两种专一性的抑制剂。一为河豚毒素(TTX),它能完全抑制钠电流,而对钾无影响;另一种是3,4-二氨基吡啶完全抑制钾电流,而对钠无影响。利用这两种药物,就能区分钠钾电流。研究发现,滴滴涕和除虫菊酯的毒理作用是使 Na^+ 离子通道打开,延迟其关闭。有的拟除虫菊酯类如含CN-基的溴氰菊酯甚至能使 Na^+ 离子通道长时间不关闭(Herve', 1982)。 Na^+ 离子的延缓关闭就使得负后电位加强。负后电位如果超过了钠阈值,就会引起电位又一次上升,这是轴突毒剂所引起重复后放的主要原因,即 Na^+ 离子通道学说。

拟除虫菊酯类化合物又分为 I 型和 II 型两类: I 型为天然除虫菊酯和不含CN-基及光不稳定的拟除虫菊酯类化合物,它通过对负后电位的加强引起重复后放; II 型为含CN-基及光稳定的化合物,它们能使钠闸门永久开放,但不引起重复后放。

关于钠闸门的关闭问题,有人用 TTX 及其它药物作试验,认为钠闸门有两个:在膜内侧的为 m,外侧的为 h,钾闸门只在内部有一个为 n。TTX 能使 h 门永远关闭,阻止钠电流。藜芦碱(veratrine)对钠闸门的 m 和 h 两个门都起作用,使 m 门延缓关闭,阻止 h 门关闭,这样 Na^+ 离子永远可以出入。拟除虫菊酯类化合物只影响 h 门,使其延缓关闭(见第 4 章)。

Narahashi 等(1994)以大鼠脊神经节神经元为材料,用细胞钳位(whole-cell patch clamp)技术研究了胺菊酯对河豚毒敏感型的(tetrodotoxin-sensitive, TTX-S)和抗性型(TTX-R)通道上的影响。发现 TTX-R 通道对(+)-反式胺菊酯要比 TTX-S 型通道更敏感,但(-)-反式胺菊酯对两者的影响极小。这可证明,在大鼠脊神经元中有两个钠通道,即 TTX-S 和 TTX-R 型通道。而在钠通道上又至少有两个胺菊酯靶标部位,其一使稳态失活曲线位移,其二是控制通道上动力学的变化,而引起神经系统的过度兴奋。由此可见, Narahashi 等的研究证明,拟除虫菊酯使轴突膜通透性产生了改变,并提出了主要改变的是 Na^+ 离子通道,而且还进一步证实了 Na^+ 通道的两个作用部位。

2.2.2. 轴突毒剂作用机理的第二种学说

轴突毒剂作用机理的第二个学说是 Ca^{2+} 离子对神经兴奋的影响及 Ca^{2+} -ATP 酶的被抑制作用。在神经传导上另一个重要的阳离子 Ca^{2+} 离子与轴突的兴奋有密切关系,钙离子

在轴突膜内外都存在,在膜外的浓度高,由 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换泵使 Ca^{2+} 离子进入膜内,另一个是 Ca^{2+} 泵,它把 Ca^{2+} 离子送出膜外。所以在正常情况下,由这两个泵调节其平衡。在轴突膜上大部分 Ca^{2+} 离子与膜上的其它组分结合在一起,膜内的 Ca^{2+} 离子有一部分结合在细胞器中,为非游离状态。这与 Na^+ 离子和 K^+ 离子有所不同。 Ca^{2+} 离子对轴突起一定的稳定作用。膜外 Ca^{2+} 离子浓度高时,能抵消轴突毒剂所引起的兴奋效应,并可引起重复后放。如果 Ca^{2+} 离子的浓度不变,即使是一个持续的去极化电流,也不会引起重复后放。所以重复后放必然涉及到膜外 Ca^{2+} 离子浓度的变化。

Ca^{2+} 离子通道中的主要功能是控制钠及钾闸门的开闭,也可认为 Ca^{2+} 离子保护钠闸门,不使其为轴突毒剂所打开。 Ca^{2+} 离子还影响轴突运输,神经递质的释放,如当轴突膜受到刺激时,钙通道的通透性加强, Ca^{2+} 离子的先于 Na^+ 离子流入,当 Ca^{2+} 离子流入后,能促使突触膜上神经递质小泡的释放。

提出这第二个学说的主要依据是,人们发现了滴滴涕抑制多种 ATP 酶,如 Na^+/K^+ -ATP 酶, Mg^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶等。已知 (Na^+,K^+) -ATP 酶是神经突触体的标记酶,是一个普遍存在的利用 ATP 作为能量驱动三个 Na^+ 离子从细胞移出,同时两个 K^+ 离子进入细胞的酶。它控制着神经细胞中 Na^+,K^+ 离子泵。神经兴奋后, (Na^+,K^+) -ATP 酶恢复膜的钠钾离子浓度梯度。此外,它维持 Na^+ 离子梯度,驱动其它物质的运输,如 Na^+,K^+ 交换,为有机化合物的吸收提供能量来源,在保持静息膜电位及调节细胞体积方面起重要作用 (Lees, 1991)。现已知, (Na^+,K^+) -ATP 酶由两个亚基组成,一个 α -亚基,相对分子质量为 112ku;一个 β -亚基分子量为 35ku (Lingrel, 1990)。 α -亚基执行 (Na^+,K^+) -ATP 酶的催化活性,而 β -亚基在酶的成熟及运输中起重要作用 (Gering, 1990)。 α -与 β -亚基存在有多种同功形式,并且这些形式的表达具有组织与发育的特异性 (Lingred 等, 1990)。

(Na^+,K^+) -ATP 酶受强烈的抑制时, Na^+ 离子流受抑制,水被吸收, Ca^{2+} 离子滞留,引起各种谷氨酸盐及其它神经递质的释放,因此有人提出此酶抑制能引发中枢神经系统的疾病 (Lees, 1991)。 (Na^+,K^+) -ATP 酶的抑制剂是神经毒性的 (Lees, 1991)。有关 (Na^+,K^+) -ATP 酶抑制剂对神经系统影响的研究发现,强心苷 (cardiac glycosides)、钒酸盐 (vanadate)、寡霉素 (oligomycin) 及肠多肽 (intestinal peptides) 是 (Na^+,K^+) -ATP 酶的抑制剂,其中强心苷是 (Na^+,K^+) -ATP 酶的专一抑制剂。这一发现对于 (Na^+,K^+) -ATP 泵的定位、识别及其鉴定是很重要的 (Skou, 1992)。有人发现用藜芦碱及金叶树苷 (monensin) 处理大鼠脑后膜碎片后, (Na^+,K^+) -ATP 酶活性降低。局部缺血、高血糖,则产生几个强的抑制剂,引起 (Na^+,K^+) -ATP 酶的可逆与不可逆抑制,似乎是通过直接与乌本苷 (ouabain) 结合位点作用而抑制 (Na^+,K^+) -ATP 酶,目前有几个动力学方面的研究证实了这一论点 (Lees, 1991)。二价金属阳离子也抑制 (Na^+,K^+) -ATP 酶的活性, Zn^{2+} 离子是此酶的最有效的重金属抑制剂,将其作活体内心室注射则产生不可逆抑制 (Lees, 1991)。

神经冲动是通过突触传导实现的。突触体含大量的 (Na^+,K^+) -ATP 酶。将不同浓度的溴氰菊酯与家蝇脑突触体保温,通过监测无机磷的释放来测定 ATP 酶的活力,实验结果表明溴氰菊酯在 10^{-7}mol/L 与 10^{-3}mol/L 之间抑制 (Na^+,K^+) -ATP 酶与 Mg^{2+} -ATP 酶的活力。同时还证明溴氰菊酯在 10^{-9}mol/L 与 10^{-6}mol/L 之间抑制大鼠脑突触体 (Na^+,K^+) -ATP 酶的活力。