

杨琳, 李莉. 膜片钳技术在杀虫剂神经毒性研究中的应用[J]. 农药, 2014, 53(2): 83-89.

膜片钳技术在杀虫剂神经毒性研究中的应用

杨琳 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 膜片钳技术是研究细胞膜离子通道的电生理学技术,也是从细胞水平探讨杀虫剂神经毒性作用机制的重要研究方法,在杀虫剂的研制、合理使用等方面具有很好的指导作用。综述了利用膜片钳技术研究多种膜蛋白杀虫剂靶标(电压门控钠、钾、钙通道,氯通道,烟碱型乙酰胆碱受体通道, P2X通道, TRP通道)在杀虫剂毒性机理分析中的应用,为开发高效、安全的杀虫剂提供参考。

关键词 膜片钳技术; 杀虫剂神经毒性; 应用

中图分类号: TQ450 文献标志码: A 文章编号: 1006-0413(2014)02-0083-07

Application of Patch-clamp Technique in Insecticide Neurotoxicology

YANG Lin, LI Li

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

Abstract: The patch-clamp technique is a fundamental method in modern electrophysiological research on cell membrane ion channels which are the primary targets for several classes of neurotoxic insecticides. Consequently, this technique has gained increasing recognition in insecticide mechanism research. This paper summarizes the application of patch-clamp technique in the research of ion channels of insecticidal targets to supply the conceptual and technical basis for the design of future insecticides.

Key words: patch-clamp technique; insecticide neurotoxicology; application

有机农药有品种多、见效快、成本低和使用方便等诸多优点,广泛应用于农业、医药、工业等领域,为人类的生活质量和水平的提高做出了重要贡献。然而,农药的大规模使用带来各种各样的“副作用”,如环境污染、害虫抗药性的产生、非靶标生物的毒性等,这些负面影响已经引起了社会的极大关注。因此,对杀虫剂效果、特异性、安全性等进行全面的评价,阐明杀虫剂的作用机制,探求对高等动物安全的杀虫剂成为一个关键问题。膜片钳技术作为研究电生理的主要工具为解决这一问题提供了有力的手段,在农药开发与毒理学研究中发挥了重要作用。

1 膜片钳技术

离子通道是生物电活动的基础,自1976年德国生理学家Neher等^[1]建立膜片钳技术(patch-clamp technique)以来,膜片钳技术就成为研究离子通道的“金标准”。科学家利用该技术证实了细胞膜上离子通道的存在并对其电生理特性、分子结构、药物作用机制等进行深入的研究,推动了生理学、神经科学和细胞生物学等生命科学领域研究的发展。现在,膜片钳技术已经成为与细胞分子生物学方法(蛋白质化学、克隆和表达技术、显微荧光技术)并驾齐驱的现代细胞生物学研究的基础研究方法之一^[2]。

膜片钳技术的核心原理是通过玻璃微电极与细胞膜之间形成千兆欧姆以上阻抗的封接(高阻封接, gigaseal),使微电极尖端开口处的膜片在电学上与周围的细胞膜绝缘,进而通过一个极为敏感的电流监视器(膜片钳放大器)记录离子通道电活动^[2]。高阻封接技术大大降低了电流记录的背景噪声,从而使电流测量灵敏度达0.1 pA,时间和空间分辨率达10 μs和1 μm,为从分子水平了解生物膜离子通道的开启和关闭、动力学、选择性和通透性等膜信息,提供了直接手段^[3]。

膜片钳实验最常采用的标本是培养或急性分离的细胞,方便在显微镜下监视玻璃微电极与细胞膜接触过程。也可以使用组织片(脑片、脊髓片等)作为标本,这样能保持神经元在体发育的程序及空间结构,有相对完整的突触联系,同时神经元没有受到消化酶的破坏,细胞生物活性接近生理状态^[4-5]。膜片钳的研究对象包括细胞膜离子通道(如电压门控离子通道、配体门控离子通道),各种由于载体运输而产生可测量电信号的离子交换泵(如Na⁺-Ca²⁺交换器、氨基酸转运体)等^[2]。

根据细胞膜片与电极之间的相对性位置不同,膜片钳技术可以分为4种基本记录模式(recording configuration): 细胞贴附式(cell-attached recording)、膜内向外式(inside-out

收稿日期 2013-09-12 修返日期 2013-11-15

作者简介 杨琳(1980—),女,河北石家庄人,工程师。Tel 010-64807955-801 E-mail yanglin@ioz.ac.cn.

通讯作者 李莉(1981—)。E-mail lili2008@ioz.ac.cn.

recording)、膜外向式(outside-out recording)和全细胞式(whole-cell recording)^[3](见图1)。它们的优缺点见表1。

膜片钳技术可以用于研究细胞膜离子通道的电导、动力学、生理功能、药理学特征和调节机制等,也可以通过在细胞内外施加各种不同浓度的药物或毒素,用于了解选择性作用于通道的药物影响人和动物生理功能的分子机理,也可以提供有关通道蛋白亚单位结构与功能关系的信息。

膜片钳技术还可以监测与细胞胞吐、胞吞活动有关的膜电容细微变化,是一种研究细胞分泌机制的新方法^[3]。现代膜片钳技术与其他技术的结合,使其应用范围更加广泛。

表1 膜片钳基本记录模式优缺点总结

记录模式	用途	优点	缺点
细胞贴附式	单通道记录	细胞内环境正常(生理状态);记录模式容易获得	不能准确测量胞内电压;细胞内环境条件不能人为直接控制
膜外向式	单通道记录	可以通过灌流自由改变细胞外液;细胞内环境可以人为控制	有可能丢失细胞内调控因子;细胞骨架结构被破坏
膜内向式	单通道记录	可以直接通过改变浴液而调控细胞内液;细胞外环境可以人为控制	浴液必需用细胞内液替换,较难获得;细胞骨架结构被破坏
全细胞式	大电流记录	离子通道性质分析;可以通过更换浴液就某种离子进行针对性研究;细胞内环境可以人为控制	胞内可流动的小分子能渗漏到微电极内液中

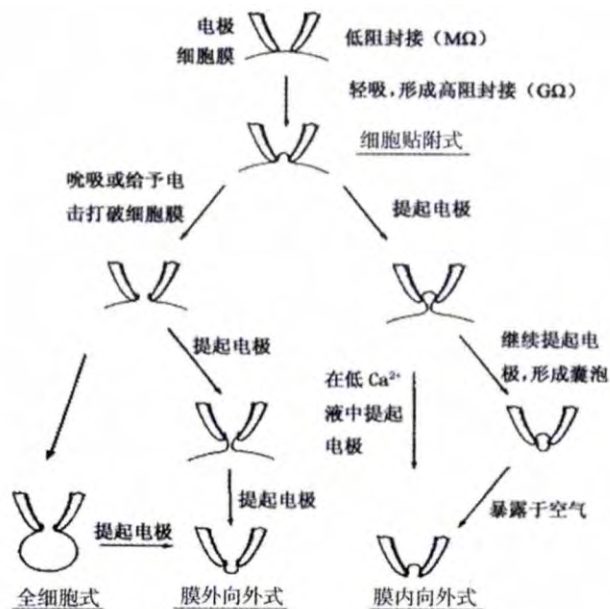


图1 膜片钳技术的4种记录模式

2 膜片钳技术在杀虫剂神经毒性研究中的应用

约90%左右的杀虫剂都具有较强的神经毒性,可以损害中枢神经系统和周围神经系统,干扰昆虫正常的神经活动并引起死亡。神经元上的电压门控钠、钾、钙、氯离子通道和多种配体门控通道都是杀虫剂发挥作用的靶标。借助膜片钳技术可以对这些靶标进行深入分析,有助于开展杀虫剂的作用机理和对非靶标生物的毒性研究。

2.1 电压门控钠离子通道

电压门控钠离子通道广泛存在于可兴奋细胞中,主要作用是使细胞去极化,并传播动作电位,在维持细胞的兴

膜片钳与荧光检测法相结合,可以同时测定通道离子电流、细胞内外游离钙离子浓度变化等信息,即可以对细胞的信号传导过程及分泌活动等进行全面的分析研究,进而分析这些变化间的相互关系^[6]。膜片钳与单细胞逆转录多聚酶链式反应(single cell RT-PCR)的结合,可以对形态相似的细胞作出基因水平的区别鉴定,还可以从分子生物学角度揭示通道对刺激产生不同反应的机理。膜片钳与重组DNA技术结合,通过改变通道蛋白中关键氨基酸序列,即可对相关氨基酸与通道功能的关系进行分析研究^[6]。

奋性和正常生理功能上起着重要作用,是许多药物作用的靶标。钠离子通道上存在9个神经毒素受体结合位点,其中有3个位点为目前已发现的钠离子通道抑制杀虫剂的靶标位点(见表2)^[7]。

表2 电压门控钠通道上的神经毒素和杀虫剂作用位点

位点	毒素	生理影响	别构偶联
1	河豚毒素(tetrodotoxin, TTX) 蛤蚌毒素(saxitoxin, STX) μ -芋螺毒素(conotoxin)	抑制转运	+3, 5, -2
2	树蛙毒素(batrachotoxin, BTX) 藜芦定(veratridine) 乌头碱(aconitine) 木藜芦毒素类(grayanotoxin) N-烷基酰胺类(N-alkylamides)	引起持续激活	+3, -6
3	α -蝎毒素类(α -scorpion toxins) 海葵毒素(sea anemone, ATX)	抑制失活 促进持续活化	+2
4	β -蝎毒素类(β -scorpion toxins)	改变激活的电压依赖性	
5	双鞭甲藻毒素类(brevetoxins) 雪卡毒素(ciguatoxins)	改变激活的电压依赖性	+2, 4, -3
6	δ -芋螺毒素(δ -conotoxins, δ -TxVIA)	抑制失活	
7	滴滴涕及其类似物 拟除虫菊酯类(DDT and analogues; pyrethroids)	抑制失活 改变电压依赖性和激活速率	+2, 3, 5
8	<i>Goniopora coral</i> 毒素 <i>Conus striatus</i> 毒素	抑制失活	
9	局部麻醉剂(local anesthetics) 抗惊厥剂(anticonvulsant) 二氢吡唑类(dihydropyrazoles)	抑制离子转运	+2

作用于昆虫钠离子通道的杀虫剂主要包括滴滴涕及其类似物、拟除虫菊酯类、吡唑类、噁二嗪类、藜芦定类杀虫剂等,其作用机理可以通过膜片钳实验并结合选择性阻

断剂来进行研究。

拟除虫菊酯类(pyrethroids)杀虫剂和滴滴涕及其类似物,虽然化学结构不同,但以同样的方式干扰钠通道的门控机制。该类化合物主要引起神经元电压门控性钠通道延迟关闭、引起重复后放,造成神经系统的过度兴奋,表现为运动失调、惊厥抽搐、易激惹、震颤等^[8]。利用大鼠背根神经节神经元(rat dorsal root ganglion neuron)和小脑浦肯野神经元检测胺菊酯(tetramethrin)对钠通道的影响,研究结果表明拟除虫菊酯类对哺乳动物和昆虫钠通道毒效差别的原因可归为5点:自身钠通道的敏感性、拟除虫菊酯的负温度系数特性、钠通道失活后的恢复特性、拟除虫菊酯的酶解速度和生物体个体大小^[9]。在蜜蜂触角嗅觉感受器神经元上的研究显示,胺菊酯和氯菊酯(permethrin)诱导钠电流产生缓慢衰减的尾电流,说明二者与通道结合后可以使激活的通道难以去活化(deactivation)恢复关闭状态,同时通道的开放可以进一步促进化合物与通道的结合,使更多处于静默状态的通道开放,而2种化合物作用后延迟钠电流(late current)增大则说明二者可以通过延长通道开放时间延缓通道失活。另外通过比较发现胺菊酯对通道的修饰作用要强于氯菊酯^[10]。利用体外海马神经元原代培养,观察溴氰菊酯(deltamethrin)和氯菊酯对神经元兴奋性和神经传导的影响,发现二者可以通过降低自发放电活动和神经递质谷氨酸释放,来实现浓度依赖性的抑制海马神经元中谷氨酸能神经元的活性,并且这种抑制作用主要是通过电压门控钠通道来实现^[11]。利用哺乳动物细胞表达系统(HEK 293细胞系)可以研究杀虫剂对各种钠通道亚型的影响。用七氟菊酯(tefluthrin)和溴氰菊酯处理HEK-Na_{v1.6}细胞后发现,二者可以浓度依赖性的修饰静息状态的钠通道,在去极化状态产生持续的延迟电流,而在复极化状态时产生缓慢衰减的尾电流。化合物还使通道的激活电压和失活电压向超极化的方向移动,持续的去极化刺激可以使溴氰菊酯诱导的电流增大2.3倍而对七氟菊酯诱导的电流无影响。该结果更加接近拟除虫菊酯在生理状态下对神经元离子通道的影响,而与在爪蟾卵母细胞中表达的通道结果不同^[12]。胺菊酯对HEK-Na_{v1.7}细胞也有相似作用^[13]。

二氢吡唑类(dihydropyrazole)杀虫剂RH-3421可以抑制大鼠背根神经节神经元上河豚毒素(tetrodotoxin,TTX)不敏感钠通道。RH-3421不可逆的抑制钠电流,并具有时间和剂量依赖性,对大鼠DRG细胞的IC₅₀为0.7 μmol/L。在10~1 mmol/L时,可以完全阻断动作电位。RH-3421对通道的激活电压没有影响,却可以使失活电压向超极化方向移动,说明RH-3421可以与通道静息状态和失活状态结合,其阻断作用和该化合物与通道失活状态更有亲和力有关^[14]。

茚虫威(indoxacarb)是噁二嗪类新型高效杀虫剂,具

有钠离子通道阻断作用,其在鳞翅目昆虫体内的有效代谢产物为N-去甲氧羰基代谢物(DCJW)。在美洲大蠊(*Periplaneta americana* L.)胸神经节神经元上存在2种不同失活电压的TTX敏感的钠通道电流,茚虫威和DCJW主要作用于这2种类型通道的失活状态,并且在2种通道上表现出不同的阻断作用,这可能与2种通道的电压失活依赖性不同有关。在对I型钠通道的阻断作用中,茚虫威是可逆的而DCJW不可逆,这与DCJW具有更强的杀虫剂毒性相印证^[15]。在美洲大蠊背侧不成对中间神经元(dorsal unpaired median neurons, DUM neurons)上的进一步研究表明,钠通道对DCJW的敏感性与钙离子相关的细胞内信号转导通路有关,而钙调蛋白激酶(CaM-kinase)是其中的关键因子^[16]。

藜芦定(veratridine)是从百合科藜芦属植物藜芦中提取的藜芦生物碱(veratrum alkaloids)中的一种类固醇类化合物。藜芦定通过阻止钠通道失活并降低通道的激活电位,从而使钠离子通道在静息膜电位水平处于开放状态,导致神经元的兴奋性显著提高,而且使通道电导降低。通过对钠通道进行点突变,结合膜片钳技术进行研究,表明藜芦定在钠通道的结合位点与局部麻醉剂作用位点广泛重叠,在通道开放状态时与之结合,使其稳定在开放状态从而引发钠通道的持续激活^[17]。

2.2 氯离子通道

氯离子通道包括配体门控和电压门控氯离子通道。配体门控氯离子通道是抑制剂激发膜兴奋性的基础元件,是目前杀虫剂的主要作用位点。电压门控氯离子通道具有维持电兴奋性、释放和吸收氯离子、内囊酸化、调节细胞内容物等功能。

2.2.1 γ-氨基丁酸受体相关的氯离子通道

配体门控氯离子通道在不同的组织中被一系列递质所激发。γ-氨基丁酸(GABA)是神经系统中主要的抑制性神经递质。γ-氨基丁酸受体相关的氯离子通道(GABA_ACl_s)广泛分布在昆虫的中枢神经及周围神经系统以及哺乳动物的中枢神经系统中。GABA由神经细胞末端突触前膜释放,与突触后部存在的受体结合,主要通过开放细胞膜上的Cl⁻通道,使Cl⁻内流进而导致神经元超极化而发挥其抑制性调节作用^[18]。

在HEK 293细胞系中表达大鼠重组GABA_A受体α1β2γ2S,研究伊维菌素(ivermectin)对其的作用,发现伊维菌素可以激活重组受体,并且表现出与GABA不同的激活方式。离子通道动力学研究表明,GABA与受体有3个结合位点,而伊维菌素仅为2个,伊维菌素与受体的结合速度与GABA相似,而解离速度较慢,与GABA不同,伊维菌素不会使受体脱敏,另外伊维菌素不能增强GABA的激活作用,

说明二者的结合位点是各自独立的^[19]。

利用全细胞和单通道记录模式研究氟虫腈(fipronil)及其代谢物砒化物对大鼠 $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA_A受体的影响。结果表明氟虫腈不影响受体的亲和力、通道的门控特点和离子通道电导,其抑制作用是通过使通道长时间处于阻断状态而实现。氟虫腈对通道的失活作用和通道的脱敏作用是2个独立、并行的过程。代谢物砒化物的抑制效果比氟虫腈慢10倍,而通道的恢复速率则快2倍。说明氟虫腈在哺乳动物大脑中的代谢是解毒过程^[20]。在美洲大蠊端腹神经节(terminal abdominal ganglion, TAG)神经元上的研究进一步表明,神经元中的GABA受体的2个亚型(GABAR1和GABAR2)受PKC和CaM-kinase的调节,GABAR2对氟虫腈更加敏感,并且可以通过抑制PKC活性降低GABAR2的敏感性,而抑制CaM-kinase无影响^[21]。

狄氏剂(dieldrin)对GABA受体具有双向调节作用,激活作用的EC₅₀为4 nmol/L,而抑制作用的IC₅₀为16 nmol/L^[22]。通过分别比较狄氏剂和氟虫腈对昆虫和哺乳动物GABA受体的不同作用,发现氟虫腈对激活受体的阻断速度是狄氏剂的10倍,但是其阻断作用是部分可逆的,而狄氏剂的阻断作用不可逆。氟虫腈对昆虫的选择性毒性与其对昆虫GABA受体更敏感有关。狄氏剂对2种GABA受体表现出相似的作用,说明其选择性毒性与对GABA受体的敏感性无关,可能存在其他因素。在因Rdl基因突变而产生抗性的蜚蠊上,狄氏剂浓度需要提高128倍才能获得抑制作用,而氟虫腈仅需要提高15倍。进一步研究发现氟虫腈是通过降低通道开放时间来实现阻断作用^[23]。

全细胞膜片钳实验发现,有机磷化合物沙林(sarin)可以通过抑制大鼠海马脑片CA1区锥体神经元 γ -氨基丁酸(GABA)受体进而抑制TTX敏感的突触后电位(PSCs)发放^[24]。

多杀菌素(spinosyns)是一种新型天然杀虫剂,来源于土壤放线菌多刺糖多孢菌(*Saccharopolyspora spinosa*)在培养介质中经有氧发酵所获得的次级代谢产物,其有效成分是spinosyn A和spinosyn D。电生理研究表明,在美洲大蠊(*Periplaneta americana*)分离的中枢神经系统小尺寸神经元上,spinosyn A可能通过与GABA受体结合从而加速其电流的衰减,但是当电流衰减被抑制后,spinosyn A则可以诱导产生一个内向的、对阻断剂苦毒宁(picotoxin, PTX)敏感的Cl⁻电流,同时受体对GABA的反应被削弱,说明多杀菌素具有GABA拮抗剂的作用。这种效果类似于阿维菌素的效应,然而多杀菌素并不能取代阿维菌素在蜚蠊等昆虫上的结合位点,表明多杀菌素和阿维菌素的作用在生理学上类似但在药理学上是不同的^[25]。

林丹(γ -六氯环己烷, γ -hexachlorocyclohexane)和新型杀虫剂4'-乙炔基-4-*n*-丙基双环原苯甲酸盐(4'-ethynyl-4-

n-propylbicycloorthobenzoate, EBOB)均不可逆的抑制美洲大蠊端腹神经节(terminal abdominal ganglion, TAG)神经元上的GABA_ACl_s。与林丹不同, EBOB对GABA_ACl_s的抑制作用表现出2个稳态抑制过程,第2个抑制过程的出现可能与其在液体中的降解有关。2种都可以加速受体脱敏,并且与静息状态和激活状态的受体均可发生作用^[26]。

2.2.2 抑制性谷氨酸受体相关的氯离子通道

抑制性谷氨酸受体(inhibitory glutamate receptor, IGluRs)或谷氨酸门控氯离子通道(glutamate-gated chloride channel, GluCl_s),目前仅在无脊椎动物中发现,是高选择性杀虫剂的理想靶标。IGluRs主要分布在无脊椎动物的神经和肌肉组织中,介导抑制性的神经传递,对控制吞咽、运动、感知和保幼激素的生物合成等起关键作用。就生理功能和药理特性而言, IGluRs与GABA受体最为类似,但其氨基酸序列却与甘氨酸受体相似性最高^[27]。目前作用于IGluRs的化合物主要包括阿维菌素/美倍霉素(ivermectin/milbemycin)类和苯基吡唑类杀虫剂氟虫腈等。

研究发现,飞蝗后胸神经节的背侧不成对中间神经元上表达有谷氨酸门控氯通道,该通道通过调节Cl⁻流动影响膜电位。在用1 μ mol/L伊维菌素处理后谷氨酸诱发的氯电流被抑制,并且洗脱后不能恢复,而用10 μ mol/L氟虫腈或100 μ mol/L苦毒宁处理后可逆的抑制氯电流达87%和39%,洗脱后可以恢复^[28]。美倍霉素(milbemycin, MIL)是从链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*和*Streptomyces cyaneogriseus*)的发酵物中分离得到的大环内酯类抗寄生虫药物。利用突变技术以及放射性配体结合技术和膜片钳技术,发现受体 β 折叠股上的Leu²⁵⁶、M2-M3连接域上的Pro³¹⁶以及M3跨膜区的Gly³²⁹是美倍霉素结合受体的关键位点^[29]。

对美洲大蠊神经中存在的谷氨酸门控氯离子通道进行动力学及药理学研究,发现存在有2种谷氨酸门控氯通道:脱敏型和非脱敏型,二者对鹅膏蕈氨酸和谷氨酸都敏感,并且与GABA激活的氯通道并存而功能上独立。2种GluCl_s主要差别在于对阻断剂苦毒宁敏感性不同,非脱敏GluCl_s对苦毒宁的阻断作用比脱敏GluCl_s更为明显。1 μ mol/L的氟虫腈和狄氏剂可以抑制56%和13%的脱敏GluCl_s,对非脱敏GluCl_s的抑制率为98%和43%。说明2种谷氨酸门控氯通道具有不同的动力学和药理学特性^[30]。

利用膜片钳技术配合基因重组突变技术,发现林丹和氟虫腈对重组人谷氨酸受体 $\alpha 1$ 、 $\alpha 1\beta$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 均有抑制作用,IC₅₀为0.2~2 μ mol/L,二者与孔道衬里(pore-lining)的6'苏氨酸残基通过疏水作用和氢键相互吸引,而氟虫腈在孔道和非孔道区都有结合位点^[26]。氟虫腈的代谢产物砒化物对脱敏和非脱敏状态的GluCl_s也有浓度依赖的抑制作

用。相较于氟虫腈,其砷化物具有更慢的解离速率,因此具有更强的毒性和对非脱敏通道更大的使用依赖性^[15]。

与之前认为EBOB只选择性的抑制GABA_ACl_s(pIC_{50} 为 8.00 ± 0.17)不同,实验证明EBOB也可逆的抑制谷氨酸诱发的氯电流, pIC_{50} 是 6.65 ± 0.13 。林丹也有类似作用,只是对2种通道发挥作用的差别要比EBOB大, pIC_{50} 分别是 8.76 ± 0.21 和 6.83 ± 0.12 ^[31]。

2.2.3 电压门控氯通道

电压门控氯离子通道被膜电势的变化所介导,广泛存在于多种组织细胞中,在细胞膜电位、细胞容积调节、维持正常细胞内pH值及细胞增殖、凋亡等生理过程中发挥重要作用。

电压门控钠通道是拟除虫菊酯类作用的主要靶标,但是电生理研究表明低浓度的溴氰菊酯可以降低电压门控氯通道的开放概率,这对拟除虫菊酯由钠通道引发的毒性效果起了补充或放大作用^[32]。之后,通过研究14种不同结构类型的拟除虫菊酯类杀虫剂对小鼠成神经瘤细胞(N1E-115)上的电压门控氯通道的影响,发现只有溴氰菊酯、氯氰菊酯(cypermethrin)和生物丙烯菊酯(bioallethrin)对电压门控氯通道有抑制作用,这表明并不是所有型拟除虫菊酯对电压门控氯通道都有作用,而型中也有起抑制作用的化合物存在,推测与溴氰菊酯有类似醇部分的拟除虫菊酯类杀虫剂对通道有抑制作用,而结构上带有较大酸部分的则抑制作用不明显^[33]。

2.3 烟碱型乙酰胆碱受体通道

烟碱乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs),在昆虫中广泛分布于中枢神经系统,在哺乳动物中分布于神经节和神经骨骼肌接头处,能与烟碱(nicotine)特异性结合并被激活,负责胆碱能突触的快速神经传递,在神经兴奋性方面发挥着重要的作用。nAChRs是新烟碱类(neonicotinoids, NNs)杀虫剂、多杀菌素的作用靶标^[34]。

新烟碱类杀虫剂是在分析烟碱结构的基础上开发出来的新型杀虫剂,也是目前受到特别关注的一类高效低毒杀虫剂。吡虫啉(imidacloprid)是第一个成功商品化的新烟碱类杀虫剂。应用全细胞膜片钳技术,将包括吡虫啉在内的6种具有杀虫作用的硝基亚甲基化合物(nitromethylene heterocycle, NMH)分别作用于蝗虫胸神经节神经元、小鼠N1E-115成神经细胞瘤细胞和小鼠BC3H1肌肉细胞,发现6种硝基亚甲基化合物对蝗虫神经元可诱导瞬时内向电流,并且和ACh诱导的内向电流交互脱敏,表明硝基亚甲基类化合物是蝗虫nAChR的激动剂,和ACh作用于相同的靶标。BC3H1和N1E-115细胞中的哺乳动物nAChR对硝基亚甲基类化合物则较不敏感。这可能是硝基亚甲基类

化合物在靶标位点水平对昆虫具有选择毒性的原因^[35]。在耳蜗核星型细胞上的膜片钳实验也显示,与昆虫神经元相反,哺乳动物神经元对吡虫啉的敏感性要弱于烟碱,此外吡虫啉对脑片上星型细胞的毒性要比体外培养细胞更强,说明吡虫啉可以通过改变中枢神经系统的功能进而影响动物行为^[36]。

在蜜蜂肯氏细胞(Kenyon cell)上的全细胞膜片钳实验表明,吡虫啉不仅对昆虫GABA受体有抑制作用,还是nAChR的部分激动剂(partial agonist)^[37]。在果蝇3龄幼虫中枢神经系统神经元上的研究也证实,吡虫啉和烟碱对nAChR的激活效应小于ACh,仅为ACh诱导最大电流的10%~14%,而噻虫胺(clothianidin)和P-CH噻虫胺(P-CH-clothianidin)诱导出的电流超过ACh的56%,因此后两者可以称为nAChR的超级激动剂(super agonist)^[38]。

噻虫胺对大蠓DUM神经元上的2种nAChR(吡虫啉敏感型nAChR1和吡虫啉不敏感型nAChR2)均有激活作用,而其在不同昆虫神经元上表现出不同的部分激动剂、全激动剂或超级激动剂的作用与神经元上的nAChR种类有关^[39]。深入研究显示,nAChR2对啶虫脒和啶虫脒的敏感性与跨膜电位极性、胞内钙离子信号转导通路和高电压激活钙通道介导的钙内流有关^[40]。

利用细胞贴附式膜片钳单通道电流记录技术比较了吡虫啉和杀螟丹(cartap)对大鼠副神经节嗜铬瘤细胞(PC12)nAChR的作用。发现ACh主要诱导主电导态(main conductance state)电流,而吡虫啉作为部分激动剂主要诱导亚电导态(subconductance state)电流,杀螟丹则是通过缩短通道的开放时间从而抑制神经肌肉传导^[41]。

在研究多杀菌素A对美洲大蠓胸神经节神经元上nAChR两种亚型(脱敏型nAChD和非脱敏型nAChN)的影响时发现,spinosyn A可以别构激活nAChN受体, EC_{50} 为27 nmol/L,但仅能微弱抑制nAChD受体,10 μ mol/L的抑制率为23%^[42]。

2.4 其他通道

除了上面介绍的多种杀虫剂的作用靶标通道外,很多杀虫剂对电压门控钾、钙离子通道等也有作用。

拟除虫菊酯主要是抑制钠通道失活,促使钠通道处于开放状态。利用全细胞膜片钳技术,在急性分离的新生大鼠海马CA3区锥体细胞上研究了高效氯氰菊酯顺反异构体对瞬时外向钾电流(transient outward potassium current, I_A)和延迟整流钾电流(delayed rectifier potassium current I_K)的影响。结果表明瞬时外向钾通道和延迟整流钾通道同样是高效氯氰菊酯的作用靶点,这可能是高效氯氰菊酯对哺乳动物产生毒性作用的原因之一^[43-44]。

鱼藤酮(rotenone)可以经蛋白激酶A(PKA)途径对延迟

整流钾电流起浓度依赖性抑制作用,而对瞬时外向钾电流无作用^[45]。除此之外,鱼藤酮还可以使PC12细胞上的ATP敏感钾通道开放,而该通道的长时程开放会抑制酪氨酸羟化酶的表达,进而影响多巴胺的合成^[46]。

二甲基二硫醚(fumigant dimethyl disulfide, DMS)是一种植物性杀虫熏蒸剂,可以通过升高 $[Ca^{2+}]_i$ 调节美洲大蠊背侧不成对中间神经元上钙离子敏感的钾通道电流($I_{K,Ca}$),进而导致神经元自发放电频率增加,而后超极化电压幅度降低^[47]。

在研究七氟菊酯对垂体瘤细胞(GH₃)和下丘脑神经元(GT1-7)上电压门控离子通道的作用中发现,七氟菊酯除了抑制钠通道失活外,还可以抑制L型钙电流($I_{Ca,L}$),仅轻微抑制外向钾电流,而对钙激活的钾通道无作用^[47]。氯菊酯通过部分抑制钙通道来调节果蝇投射神经元上胆碱能微小兴奋性突触后电流^[48]。

P2X受体家族是一类细胞膜上以胞外ATP(adenosine triphosphate)为配体的非选择性阳离子通道(ligand gated ion channels, LGICs)。在哺乳动物细胞内,有7个P2X(P2X₁₋₇)受体已被克隆并阐明其药理学特性。研究表明不同浓度伊维菌素对P2X₄离子通道的作用不同:高浓度与低浓度伊维菌素都可显著增大P2X₄通道电流,但高浓度时可明显增强ATP与受体结合,减慢通道失活,而低浓度则无相似作用^[49]。另外,研究发现伊维菌素在P2X₄受体上有2个结合位点:高亲和位点和低亲和位点,与前者结合可以减缓通道脱敏、增加电流幅度,而与后者结合可以通过稳定通道的开放状态来减缓通道失活^[50]。利用半胱氨酸扫描突变技术结合膜片钳检测,发现受体上的Gln³⁶、Leu⁴⁰、Val⁴³、Val⁴⁷、Trp⁵⁰、Asn³³⁸、Gly³⁴²、Leu³⁴⁶、Ala³⁴⁹、Ile³⁵⁶与伊维菌素的毒性有关,而Met³¹、Tyr⁴²、Gly⁴⁵、Val⁴⁹、Gly³⁴⁰、Leu³⁴³、Ala³⁴⁴、Gly³⁴⁷、Thr³⁵⁰、Asp³⁵⁴、Val³⁵⁷与通道门控有关^[51]。

最近的研究显示瞬间受体电位离子通道(transient receptor potential ion channels, 简称TRP离子通道)可能是杀虫剂的一个新作用位点。TRPA1受体在小鼠伤害性感受神经元中表达,果蝇体内也存在其同源物-Painless。全细胞和单通道膜片钳实验表明,TRPA1通道可以被异硫氰酸烯丙酯(isothiocyanate)激活,表现出电压依赖的快激活、慢脱敏特性,并且Ca²⁺对这一过程有调节作用^[52]。

3 结语

综上所述,膜片钳技术在杀虫剂的毒性、毒理、结构与活性关系等方面的研究中应用广泛。加强对杀虫剂机理及其抗药性的研究有利于杀虫剂的深度开发,保障害虫综合治理的正常实施,延长新药剂的生命力。杀虫剂通过影响神经信息传导系统达到干扰昆虫正常生理活动的目的,其中涉及信号转导、相关物质分泌等生理活动,这些活动都与细胞膜上的离子通道密切相关。膜片钳技术是研究

细胞膜离子通道最基本和最直接的实验方法,因此随着膜片钳技术的进一步发展完善以及与其他技术的结合,必将在阐明杀虫剂的作用机制等方面发挥重大作用,还能为提高活性和高选择性的杀虫剂的合成、混配及筛选开发等工作提供十分有益的理论指导。

参考文献:

- [1] NEHER E, SAKMANN B. Single-channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres[J]. Nature, 1976, 260: 799-802.
- [2] SAKMANN B, NEHER E. Single-channel Recording[M]. New York and London: Plenum Press, 1995: 3-8.
- [3] HAMILL O P, MARTY A, NEHER E, *et al.* Improved Patch-Clamp Techniques for High-resolution Current Recording from Cells and Cell-free Membrane Patches[J]. Pflügers Arch, 1981, 391: 85-100.
- [4] BLANTON M G, LO TURCO J J, KRIEGSTEIN A R. Whole Cell Recording from Neurons in Slices of Reptilian and Mammalian Cerebral Cortex[J]. J Neurosci Methods, 1989, 30: 203-210.
- [5] EDWARDS F A, KONNERTH A, SAKMANN B, *et al.* A Thin Slice Preparation for Patch Clamp Recordings from Neurons of the Mammalian Central Nervous System[J]. Pflügers Arch, 1989, 414: 600-612.
- [6] FURUYA K, ENOMOTO K. Real-time Imaging of Intracellular Calcium Change with Simultaneous Single Channel Recording in Mammary Epithelial Cells[J]. Brain Res Bull, 1990, 25(5): 779-781.
- [7] ZLOTKIN E. The Insect Voltage-gated Sodium Channel as Target of Insecticides[J]. Annu Rev Entomol, 1999, 44: 429-455.
- [8] NARAHASHI T. Neuroreceptors and Ion Channels as the Basis for Drug Action: Past, Present, and Future[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294: 1-26.
- [9] NARAHASHI T, CARTER D B, FREY J, *et al.* Sodium Channels and GABA_A Receptor-channel Complex as Targets of Environmental Toxicants[J]. Toxicol Lett, 1995, 82-83: 239-245.
- [10] KADALA A, CHARRETON M, JAKOB I, *et al.* A Use-Dependent Sodium Current Modification Induced by Type I Pyrethroid Insecticides in Honeybee Antennal Olfactory Receptor Neurons[J]. Neurotoxicology, 2011, 32(3): 320-330.
- [11] MEYER D A, CARTER J M, JOHNSTONE A F, *et al.* Pyrethroid Modulation of Spontaneous Neuronal Excitability and Neurotransmission in Hippocampal Neurons in Culture[J]. Neurotoxicology, 2008, 29(2): 213-225.
- [12] HE Bing-jun, SODERLUND D M. Differential State-dependent Modification of Rat Nav_{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.
- [13] HE Bing-jun, SODERLUND D M. Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells Express Endogenous Voltage-gated Sodium Currents and Nav_{1.7} Sodium Channels[J]. Neurosci Lett, 2010, 469(2): 268-272.
- [14] TSURUBUCHI Y, ZHAO Xi-long, NAGATA K, *et al.* Modulation of Tetrodotoxin-resistant Sodium Channels by Dihydropyrazole Insecticide RH-3421 in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons[J]. Neurotoxicology, 2001, 22(6): 743-753.
- [15] ZHAO Xi-long, IKEDA T, SALGADO V L, *et al.* Block of Two Subtypes of Sodium Channels in Cockroach Neurons by Indoxacarb

- Insecticides[J]. *Neurotoxicology*, 2005, 26(3): 455-465.
- [16] LAVIALLE-DEFAIX C, MOIGNOT B, LEGROS C, *et al.* How Does Calcium-Dependent Intracellular Regulation of Voltage-dependent Sodium Current Increase the Sensitivity to the Oxadiazine Insecticide Indoxacarb Metabolite Decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in Insect Pacemaker Neurons[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333(1): 264-272.
- [17] WANG G K, WANG S Y. Veratridine Block of Rat Skeletal Muscle Nav1.4 Sodium Channels in the Inner Vestibule[J]. *J Physiol*, 2003, 548(Pt 3): 667-675.
- [18] JENTSCH T J. Chloride Channels: A Molecular Perspective[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 1996, 6(3): 303-310.
- [19] ADELSBERGER H, LEPIER A, DUDEL J. Activation of Rat Recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2S$ GABA_A Receptor by the Insecticide Ivermectin[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 394(2/3): 163-170.
- [20] LI Ping, AKK G. The Insecticide Fipronil and Its Metabolite Fipronil Sulphone Inhibit the Rat $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA_A Receptor[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155: 783-794.
- [21] MURILLO L, HAMON A, ES-SALAH-LAMOUREUX Z, *et al.* Inhibition of Protein Kinase C Decreases Sensitivity of GABA Receptor Subtype to Fipronil Insecticide in Insect Neurosecretory Cells[J]. *Neurotoxicology*, 2011, 32(6): 828-835.
- [22] ZHAO Xi-long, SALGADO V L, YEH J Z, *et al.* Differential Actions of Fipronil and Dieldrin Insecticides on GABA-Gated Chloride Channels in Cockroach Neurons[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 306(3): 914-924.
- [23] ZHAO Xi-long, SALGADO V L. The Role of GABA and Glutamate Receptors in Susceptibility and Resistance to Chloride Channel Blocker Insecticides[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2010, 97(2): 153-160.
- [24] CHEBABO S R, SANTOS M D, ALBUQUERQUE E X. The Organophosphate Sarin, at Low Concentrations, Inhibits the Evoked Release of GABA in Rat Hippocampal Slices[J]. *Neurotoxicology*, 1999, 20(6): 871-882.
- [25] WATSON G B. Actions of Insecticidal Spinosyns on γ -Aminobutyric Acid Responses from Small-diameter Cockroach Neurons[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2001, 71: 20-28.
- [26] ISLAM R, LYNCH J W. Mechanism of Action of the Insecticides, Lindane and Fipronil, on Glycine Receptor Chloride Channels[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(8): 2707-2720.
- [27] ULTSCH A, SCHUSTER C M, LAUBE B, *et al.* Glutamate Receptors of *Drosophila Melanogaster*: Cloning of a Kainate-selective Subunit Expressed in the Central Nervous System[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10484-10488.
- [28] JANSSEN D, DERST C, BUCKINX R, *et al.* Dorsal Unpaired Median Neurons of *Locusta Migratoria* Express Ivermectin- and Fipronil-sensitive Glutamate-gated Chloride Channels[J]. *J Neurophysiol*, 2007, 97(4): 2642-2650.
- [29] YAMAGUCHI M, SAWA Y, MATSUDA K, *et al.* Amino Acid Residues of Both the Extracellular and Transmembrane Domains Influence Binding of the Antiparasitic Agent Milbemycin to *Haemonchus Contortus* AVR-14B Glutamate-gated Chloride Channels[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 419(3): 562-566.
- [30] ZHAO Xi-long, SALGADO V L, YEH J Z, *et al.* Kinetic and Pharmacological Characterization of Desensitizing and Non-Desensitizing Glutamate-gated Chloride Channels in Cockroach Neurons[J]. *Neurotoxicology*, 2004, 25(6): 967-980.
- [31] IHARA M, ISHIDA C, OKUDA H, *et al.* Differential Blocking Actions of 4'-Ethynyl-4-*n*-Propylbicycloorthobenzoate (EBOB) and γ -Hexachlorocyclohexane (γ -HCH) on γ -Aminobutyric Acid- and Glutamate-Induced Responses of American Cockroach Neurons[J]. *Invert Neurosci*, 2005, 5(3/4): 157-164.
- [32] RAY D E, SUTHARSAN S, FORSHAW P J. Actions of Pyrethroid Insecticides on Voltage-gated Chloride Channels in Neuroblastoma Cells[J]. *Neurotoxicology*, 1997, 18(3): 755-760.
- [33] BURR S A, RAY D E. Structure-activity and Interaction Effects of 14 Different Pyrethroids on Voltage-gated Chloride Ion Channels[J]. *Toxicol Sci*, 2004, 77(2): 341-346.
- [34] TOMIZAWA M, LEE D L, CASIDA J E. Neonicotinoid Insecticides: Molecular Features Conferring Selectivity for Insect Versus Mammalian Nicotinic Receptors[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(12): 6016-6024.
- [35] ZWART R, OORTGIESEN M, VIJVERBERG H P. Nitromethylene Heterocycles: Selective Agonists of Nicotinic Receptors in Locust Neurons Compared to Mous N1E-114 and BC3H1 Cells[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1994, 48(3): 202-213.
- [36] BAL R, ERDOGAN S, THEOPHILIDIS G, *et al.* Assessing the Effects of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in the Cholinergic Synapses of the Stellate Cells of the Mouse Cochlear Nucleus Using Whole-cell Patch-clamp Recording[J]. *Neurotoxicology*, 2010, 31(1): 113-120.
- [37] DÉGLISE P, GRÜNEWALD B, GAUTHIER M. The Insecticide Imidacloprid is a Partial Agonist of the Nicotinic Receptor of Honeybee Kenyon Cells[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 321(1/2): 13-16.
- [38] BROWN LA, IHARA M, BUCKINGHAM S D, *et al.* Neonicotinoid Insecticides Display Partial and Super Agonist Actions on Native Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors[J]. *J Neurochem*, 2006, 99(2): 608-615.
- [39] THANY S H. Agonist Actions of Clothianidin on Synaptic and Extrasynaptic Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed on Cockroach Sixth Abdominal Ganglion[J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(6): 1045-1052.
- [40] BODEREAU-DUBOIS B, LIST O, CALAS-LIST D, *et al.* Transmembrane Potential Polarization, Calcium Influx, and Receptor Conformational State Modulate the Sensitivity of the Imidacloprid-insensitive Neuronal Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor to Neonicotinoid Insecticides[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(2): 326-339.
- [41] NAGATA K, IWANAGA Y, SHONO T, *et al.* Modulation of the Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Channel by Imidacloprid and Cartap[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1997, 59: 119-128.
- [42] SALGADO V L, SAAR R. Desensitizing and Non-desensitizing Subtypes of Alpha-Bungarotoxin Sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors in Cockroach Neurons[J]. *J Insect Physiol*, 2004, 50: 867-879.
- [43] TIAN Yu-tao, LIU Zhao-wei, YAO Yang, *et al.* Effect of Alpha-Cypermethrin and Theta-Cypermethrin on Delayed Rectifier Potassium Currents in Rat Hippocampal Neurons[J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(2): 269-273.
- [44] TIAN Yu-tao, LIU Zhao-wei, YAO Yang, *et al.* Effects of Alpha- and Theta-Cypermethrin Insecticide on Transient Outward Potassium Current in Rat Hippocampal CA3 Neurons[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2008, 90: 1-7.
- [45] GAO Xiao-Fei, WANG Wei, HE Cheng. Rotenone Inhibits Delayed Rectifier K⁺ Current via a Protein Kinase A-Dependent Mechanism[J]. *Neuroreport*, 2008, 19(14): 1401-1405.

(下转第115页)

表1 7种农药保留时间、定性定量离子、线性回归方程、线性范围、相关系数(r)和定量限 (S/N=10)

序号	农药	保留时间/ min	二级质谱条件						线性回归方程(y=)	线性范围/ (mg·L ⁻¹)	相关 系数r	检测限/ (mg·kg ⁻¹)
			Q1	Q2	E(V)	Q1	Q2	E(V)				
1	西玛津	14.728	201	158	10	201	173	10	$1.79 \times 10^6 x - 5.76 \times 10^6$	0.01~2.5	0.9996	0.01
2	莠去津	15.572	215	200	5	200	122	10	$6.56 \times 10^6 x - 1.43 \times 10^6$	0.05~5.0	0.9993	0.01
3	甲萘威	16.031	144	115	20	144	116	10	$7.93 \times 10^5 x - 3.01 \times 10^5$	0.05~5.0	0.9990	0.01
4	三唑酮	17.692	208	181	11	209	111	25	$4.18 \times 10^7 x - 1.51 \times 10^7$	0.01~5.0	0.9994	0.01
5	多效唑	18.086	236	125	10	236	167	10	$5.19 \times 10^5 x - 4.25 \times 10^6$	0.04~5.0	0.9995	0.01
6	烯效唑	19.391	234	137	15	234	131	11	$5.15 \times 10^5 x - 9.65 \times 10^5$	0.01~2.5	0.9994	0.01
7	戊唑醇	23.290	250	153	10	250	163	10	$2.45 \times 10^6 x - 2.93 \times 10^6$	0.05~5.0	0.9996	0.01

表2 苹果、番茄和玉米中7种农药回收率、相对标准偏差 (n=8)

序号	农药	苹果			番茄			玉米		
		添加水平/ (mg·kg ⁻¹)	回收率/%	相对标准 偏差/%	添加水平/ (mg·kg ⁻¹)	回收率/%	相对标准 偏差/%	添加水平/ (mg·kg ⁻¹)	回收率/%	相对标准 偏差/%
1	西玛津	0.01~0.1	81.4~90.1	7.5~10.1	0.01~0.1	81.4~109.2	4.8~7.9	0.01~0.1	74.8~108.7	2.8~6.5
2	莠去津	0.01~0.1	83.8~99.8	5.4~11.2	0.01~0.1	91.7~103.3	3.6~10.2	0.01~0.1	84.8~99.4	3.4~7.9
3	甲萘威	0.01~0.1	86.7~90.8	5.0~6.2	0.01~0.1	76.2~98.3	6.4~8.9	0.01~0.1	75.7~92.5	5.1~14.8
4	三唑酮	0.01~0.1	88.5~108.2	4.1~6.4	0.01~0.1	85.9~9.8	5.3~10.8	0.01~0.1	80.6~102.6	8.1~9.6
5	多效唑	0.01~0.1	88.2~101.8	3.1~5.6	0.01~0.1	82.4~101.5	5.9~13.0	0.01~0.1	87.9~103.2	7.5~10.4
6	烯效唑	0.01~0.1	75.1~92.5	4.8~11.9	0.01~0.1	86.6~94.7	4.5~10.1	0.01~0.1	80.1~95.3	5.6~11.7
7	戊唑醇	0.01~0.1	105.7~103.3	2.7~3.4	0.01~0.1	80.0~106.3	5.0~8.3	0.01~0.1	89.7~103.4	5.4~9.8

3 结论

本文建立了苹果、番茄和玉米中7种植物生长调节剂类农药残留检测的气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)确证方法。选用乙腈为提取溶剂、PSA粉末和石墨化炭黑粉末结合的分散萃取技术为净化方法,考察了不同提取溶剂和净化填料对回收率的影响。实验结果表明,该方法操作简单,准确性和重复性好,为植物源性食品中植物生长剂的检测提供了一定的理论依据。

参考文献:

[1] 张峰, 潘康标, 田子华. 植物生长调节剂研究进展及应用对策[J]. 现代农业科技, 2012(1): 193-195.
 [2] 袁志华, 程波, 常玉海, 等. 15%多效唑可湿性粉剂对土壤微生物多样性的影响研究[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5): 1848-1852.
 [3] 潘瑞焯. 重视植物生长调节剂的残毒问题[J]. 生物学通报, 2002, 37(4): 4-7.

[4] 何瑞, 刘艾平, 曹玉广. 植物生长调节剂使用中的安全问题[J]. 中国卫生监督, 2003, 10(2): 90-101.
 [5] 宋莹, 张耀海, 黄霞, 等. 气相色谱-串联质谱法快速检测水果中的多效唑残留[J]. 分析化学, 2011, 39(8): 1270-1273.
 [6] 于红, 鹿毅, 王静静, 等. HPLC-MS/MS法测定水果中残留的多效唑和烯效唑[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(1): 187-193.
 [7] 白桦, 邱月明, 张青. 气相色谱-质谱法测定苹果中多效唑残留量[J]. 分析测试学报, 2005, 24(4): 64-66.
 [8] 金芬, 邵华, 杨锚, 等. 国内外几种主要植物生长调节剂残留限量标准比较分析[J]. 农业质量标准, 2007(6): 26-27.
 [9] GE L, PEH C Y, YONG J W, *et al.* Analyses of Gibberellins by Capillary Electrophoresis-mass Spectrometry Combined with Solid-phase Extraction[J]. J Chromatogr A, 2007, 1159: 242-249.
 [10] 蒋施, 赵颖, 金雁, 等. 大米中78种农药残留的GC-MS-SIM确证方法研究[J]. 福建分析测试, 2009, 18(4): 1-6.
 [11] 李琰, 蔡跃, 杨胜琴, 等. 改进的QuEChERS方法配合GPC-GC-MS在线联用系统测定果蔬中31种农药残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 277-279.

责任编辑 李新

(上接第89页)

[46] BAI Qun-hua, HE Jun-lin, QIU Jing-fu, *et al.* Rotenone Induces KATP Channel Opening in PC12 Cells in Association with the Expression of Tyrosine Hydroxylase[J]. Oncol Rep, 2012, 28(4): 1376-1384.
 [47] GAUTIER H, AUGER J, LEGROS C, *et al.* Calcium-activated Potassium Channels in Insect Pacemaker Neurons as Unexpected Target Site for the Novel Fumigant Dimethyl Disulfide[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324(1): 149-159.
 [48] WU Sheng-nan, WU Yung-han, CHEN Bing-shuo, *et al.* Underlying Mechanism of Actions of Tefluthrin, a Pyrethroid Insecticide, on Voltage-gated Ion Currents and on Action Currents in Pituitary Tumor (GH₃) Cells and GnRH-Secreting (GT1-7) Neurons[J]. Toxicology, 2009, 258(1): 70-77.

[49] KHAKH B S, BAO X R, LABARCA C, *et al.* Neuronal P2X Transmitter-gated Cation Channels Change Their Ion Selectivity in Seconds[J]. Nat Neurosci, 1999, 2(4): 322-330.
 [50] PRIEL A, SILBERBERG S D. Mechanism of Ivermectin Facilitation of Human P2X₄ Receptor Channels[J]. J Gen Physiol, 2004, 123(3): 281-293.
 [51] JELÍNKOVA I, VÁVRA V, JINDRICOVA M, *et al.* Identification of P2X₄ Receptor Transmembrane Residues Contributing to Channel Gating and Interaction with Ivermectin[J]. Pflugers Arch, 2008, 456(5): 939-950.
 [52] NAGATA K. TRP Channels as Target Sites for Insecticides: Physiology, Pharmacology and Toxicology[J]. Invert Neurosci, 2007, 7(1): 31-37.

责任编辑 李新