

脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊乙酰胆碱受体信号通路分子 mRNA 表达水平的影响

李艳¹, 王立山¹, 刘景丽¹, 王军¹, 程洁¹,
高聪芬², 肖杭¹, 高蓉^{1,*}

(1. 南京医科大学教育部现代毒理重点实验室, 南京 211166;

2. 南京农业大学植物保护学院, 农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

摘要:【目的】探讨脱氧鬼臼毒素(deoxyopodophyllotoxin, DOP)对美洲大蠊 *Periplaneta americana* 神经系统乙酰胆碱受体信号通路的影响。【方法】从美洲大蠊头部克隆乙酰胆碱受体信号通路上的关键信号分子 nAChR $\alpha 6$ 亚基、CaM 和 CaMK II 的部分 mRNA, 并测定其序列。应用荧光定量 PCR 技术分别观察注射不同浓度(10, 45, 80, 115 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) DOP 24 和 48 h 后上述 3 种基因表达水平的变化。【结果】测序结果显示, 克隆出的美洲大蠊 nAChR 基因部分序列(539 bp)与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* nAChR $\alpha 6$ 亚基基因的核苷酸序列一致性为 84%; 美洲大蠊 CaM 基因(435 bp)与雕叶蝉 *Graphocephala atropunctata* CaM 基因的核苷酸序列一致性为 85%; 美洲大蠊 CaMK II 基因(513 bp)与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* CaMK II 基因的核苷酸一致性为 77%。实时定量荧光 PCR 实验表明: DOP 处理 48 h 后对美洲大蠊 nAChR $\alpha 6$ 亚基、CaM 和 CaMKII 基因表达水平大体表现出低剂量激活, 高剂量抑制的特点。45 ~ 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DOP 浓度范围内 3 种基因表达水平达到高峰, 80 ~ 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度范围内表现为抑制作用, 基因表达水平呈下降趋势。【结论】DOP 需要在美洲大蠊体内蓄积一定时间才有明显的的作用, 能与 nAChR 结合引起 CaM-CaMK II 级联反应, 使 3 种基因的表达在低浓度组上调、高浓度组被抑制, 进而对美洲大蠊产生潜在的毒杀作用。

关键词: 美洲大蠊; 脱氧鬼臼毒素; 实时荧光定量 PCR; 基因克隆; N 型乙酰胆碱受体; 信号分子
中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2013)07-0772-07

mRNA expression profiling of signal molecules on the pathway of nicotinic acetylcholine receptor in *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae) treated with deoxyopodophyllotoxin

LI Yan¹, WANG Li-Shan¹, LIU Jing-Li¹, WANG Jun¹, CHENG Jie¹, GAO Cong-Feng², XIAO Hang¹, GAO Rong^{1,*} (1. Key Laboratory of Modern Toxicology, Ministry of Education, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China; 2. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Pests, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:【Aim】To investigate the effect of deoxyopodophyllotoxin on the signal pathway of nicotinic acetylcholine receptor of *Periplaneta americana*.【Methods】Three critical signal molecule genes (mRNA of nAChR, CaM and CaMK II) extracted from the head of *P. americana* adults were cloned and sequenced. After *P. americana* were injected with different concentrations (10, 45, 80, 115 and 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) of DOP, the mRNA expression levels of three genes at 24 and 48 h after treatment were assayed, respectively, by real-time PCR.【Results】Sequence alignment of mRNA revealed that *P. americana* nAChR gene (539 bp) shares 84% nucleotide sequence identity to nAChR $\alpha 6$ gene from *Tribolium castaneum*; *P. americana* CaM gene (435 bp) has 85% nucleotide sequence identity to *Graphocephala atropunctata* CaM gene; *P. americana* CaMK II gene (513 bp), however, shows 77% nucleotide sequence identity to *Drosophila melanogaster* CaMK II gene. In *P. americana* treated with DOP for 48 h, the mRNA expression of nAChR $\alpha 6$, CaM and CaMKII all increased in treatments with

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971939); 江苏高校优势学科建设工程项目

作者简介: 李艳, 女, 1987 年生, 江西萍乡人, 硕士研究生, 研究方向为劳动与环境卫生学, E-mail: putishengxiang@gmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: gaorong@njmu.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-01-29; 接受日期 Accepted: 2013-05-22

low concentration of DOP, reached the peak at 45 – 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, and then decreased when the DOP concentration was 80 – 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 【Conclusion】 After long-term accumulation in *P. americana*, DOP binding with nAChR leads to the triggering of CaM-CaMKII cascade, resulting in the changes in mRNA expression of three genes (nAChR, CaM and CaMK II genes), which are up-regulated by low concentration of DOP and inhibited by high concentration of DOP. Therefore, DOP could exert the potential toxic effects on of the nervous system of *P. americana*.

Key words: *Periplaneta americana*; deoxyopodophyllotoxin; real-time PCR; gene cloning; nicotinic acetylcholine receptor; signal molecule

脱氧鬼臼毒素 (deoxyopodophyllotoxin, DOP) 是对多种试虫有拒食、毒杀、生长发育抑制作用的木脂素类化合物 (Yamamoto *et al.*, 1988; Gao *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009)。其对美洲大蠊产生“低浓度兴奋, 高浓度抑制”的“烟碱样症状”(张守刚等, 2007)。对其活性机制研究表明: 脱氧鬼臼毒素对离子通道、细胞活性、细胞因子产生影响 (Xu *et al.*, 2010; Velazquez-Jimenez *et al.*, 2011; 刘艳青等, 2011)。药物产生烟碱样症状的原因或是作用于胆碱酯酶 (cholinesterase, ChE); 或是直接作用于神经元突触膜烟碱乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptor, nAChR), 引起神经元膜上的烟碱受体内部构象发生变化, 从而因为突触后膜的膜电位发生变化, 产生突触后电位 (唐振华和毕强, 2003)。对 DOP 引起“烟碱样症状”的毒理机制进行的研究表明: DOP 对美洲大蠊 AChE 活性没有影响 (张守刚等, 2007); 而对兴奋性突触后电位 (excitatory postsynaptic potential, EPSP) 有抑制作用, 且存在浓度依赖关系。因此, 突触后膜上的 nAChR 在 DOP 的杀虫作用中可能扮演着重要角色。

nAChR 属于半胱氨酸环配体门控离子通道超家族成员之一, 是由 5 个亚基以不同组合形式围成一个中央离子通道形成的五聚体寡蛋白 (Karlin, 2002), 是杀虫剂主要作用靶点之一 (Matsuda *et al.*, 2001)。已见大量文献报道从多种昆虫体内克隆出 nAChR 亚基基因 (刘泽文等, 2010; Millar and Lansdell, 2010)。Courjaret 和 Lapied (2001) 对美洲大蠊 DUM 神经元 nAChR 研究表明, 烟碱受体与配体结合后引起通道开放, 能够激活细胞内 CaM 相关的转导通路。为验证脱氧鬼臼毒素是否作用于这一通路, 本研究克隆了 nAChR 信号通路上关键信号分子 nAChR $\alpha 6$ 亚基、钙调蛋白 (CaM) 和钙调蛋白激酶 II (CaMK II) 的部分 mRNA 序列, 从分子水平探讨脱氧鬼臼毒素对乙酰胆碱受体的作用机制。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

美洲大蠊 *P. americana*, 购自丹阳市飞天药用生物有限公司, 为室内人工饲养的种群。购回后在光周期为 12L:12D 的光照培养箱中饲养, 以全价颗粒鼠料喂育。培养箱养温度 $29 \pm 1^\circ\text{C}$, 相对湿度 70%。

培养箱中饲养 2 周后, 选取体长约 30 mm 的 60 头雌性和 60 头雄性成虫为实验材料, 随机分成 6 组, 每组雌雄各 10 头重复生物测定试验。前期得到 DOP 作用于美洲大蠊 LD_{50} 为 258.03 $\mu\text{g}/\text{头}$, 据此本研究其中一组给予溶剂 DMSO 作为对照组, 另外 5 个实验组分别给予脱氧鬼臼毒素, 浓度依次为 10, 45, 80, 115 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。采用注射法从成虫腹部的第 3 和第 4 腹节间的节间膜处每头注射 3 μL 。并依据前期脱氧鬼臼毒素对菜青虫 *Pieris rapae* 杀虫活性的研究结果, 在 12 h 和 48 h 两个时间点 (Gao *et al.*, 2004), 每组取活虫 3 头, 进行实时荧光定量 PCR 实验。实验重复 3 次。

1.2 供试化合物和试剂

供试化合物: 脱氧鬼臼毒素, 由兰州大学有机分析组田瑄教授提供。

试剂: Trizol 为 Invitrogen 公司产品; M-MLV 反转录酶、Long-Taq Mix 酶等购自 Biotek 公司; pUCm-T vector, T4-DNA ligase, IPTG, X-gal, DNA Agarose Gel Purification Kit (BIOMIGA) 等购自上海生工公司; PrimeScript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser (DRR047A) 及 PrimeScript[®] RT Reagent Kit Perfect Real Time (DRR037A) 购自 TaKaRa 公司。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

取 3 头美洲大蠊雄性成虫头部, 按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 根据反转录试剂盒的说明获得第一链 cDNA, 以此作为 PCR 模板。

1.4 引物设计与合成

用 BioEdit, Primer Premier 5.0 及 Oligo 7 软件

比较已报道昆虫的 nAChR, CaM 以及钙调蛋白激酶 II 的 mRNA 序列, 根据比对得到的保守区结合 PCR 引物设计原则, 设计简并引物(表 1)进行 PCR 扩增

反应, 克隆目标基因; 根据测序获得的部分 mRNA 序列设计实时荧光定量 PCR 引物(表 1)。引物合成均由上海英骏生物技术有限公司完成。

表 1 用于基因克隆及实时荧光定量的 PCR 引物
Table 1 Primers used in gene cloning and real-time PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence	用途 Use of primers
nAChRF	TGGAARCCNGAYRTNCTYATGTA	基因克隆 (Gene cloning)
nAChRR	GGCADNGWYTCNCCNACVADRITNAG	
CaMF	GATCARCTDACRGARGARCAG	
CaMR	GTCATCATDGTBACGAAATC	
CaMK II F	GARTTYGCBGCVAARATHAT	
CaMK II R	GAYTCYTTBACYTGNGADC	
nAChRF	TCTCTCCGACTTCATCACCAACCG	实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)
nAChRR	TCAGCACGCAGGGCACAATCAG	
CaMF	CGGTACAATCGACTTCCCCGA	
CaMR	TCAGTCAGCTTTTCTCCAGGT	
CaMK II F	ATCTGCCAAAGGGAGCGTGTTC	
CaMK II R	GCAGGAGGTTTCACCACGACGAC	
GAPDHF	TCCGTGTTCTGTTCCCAATGT	
GAPDHR	TTCAGTGTAGTCCAAGATGCCCT	

1.5 PCR 产物克隆、鉴定及序列测定

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离和 DNA 纯化回收试剂盒纯化目标片段后连接到 pUCm-T 载体, 再转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 培养过夜后进行蓝白斑筛选, 质粒酶切和 PCR 检测, 获得阳性克隆, 送至上海英骏生物技术有限公司测序。

1.6 序列分析

将测序得到的 mRNA 序列上传到 NCBI 数据库, 利用在线工具 Blastn 进行序列比对分析, 并利用专业软件 Sequin, 将序列上传到 GenBank 数据库。

1.7 实时荧光定量 PCR

从上述 6 组试虫头部获取 cDNA, 按照 PrimeScript[®] RT Reagent Kit Perfect Real Time 配制反应体系 20 μ L, 在 ABI PRISM[™] 7900HT 上进行实时荧光定量 PCR。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 随后 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s。定量方法采用比较 C_t 相对定量法 (Schmittgen and Livak, 2008), 此法前提是假设目标基因与内参基因片段扩增效率一致, cDNA 模板量为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_t$ 目标基因 - C_t

内参基因, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ 实验组 - ΔC_t 对照组)。本研究采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH 基因作为内参基因。每组取 3 头试虫, 每头试虫作为单个样品, 每个样品重复测定 3 次, 取平均值。

1.8 数据统计与分析

所有数据用平均数 \pm 标准差 ($n=3$) 表示, 利用 SPSS 16.0 软件分析处理, 应用单因素方差分析或 t 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 利用 Graph Prism 5.0 进行作图。

2 结果与分析

2.1 美洲大蠊 nAChR $\alpha 6$ 亚基、CaM 和 CaMK II 部分 mRNA 序列克隆

从 GenBank 中选取黑腹果蝇 *D. melanogaster*, 家蚕 *Bombyx mori*, 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*, 西方蜜蜂 *Apis mellifera* 等 10 余种昆虫相应 cDNA 序列, 利用 BioEdit 软件 ClustaW 比对之后, 按照序列保守区域, 设计相应简并引物, 克隆目标基因。测序后得到 nAChR 亚基基因部分序列 539 bp

(GenBank 登录号: KC473398), 与目标片段大小一致, NCBI 进行 BLAST 比对发现, 其与基因库中已有的美洲大蠊 nAChR $\alpha 6$ 亚基亚型 VI 基因全长序列(GenBank 登录号: JX466888.1)核苷酸一致性达 99%, 与赤拟谷盗 *T. castaneum* nAChR $\alpha 6$ 亚基亚型 XII 基因(GenBank 登录号: EU930069.1)核苷酸一致性达 84%。测序得到 CaM 部分序列 435 bp (GenBank 登录号: KC473397), 与目标片段大小一致, 与基因库中已有的美洲大蠊 CaM 基因全长序列(GenBank 登录号: HQ176458.1)核苷酸一致性达 99%, 与雕叶蝉 *G. atropunctata* CaM 基因全长序列(GenBank 登录号: DQ445514.1)核苷酸一致性达 85%。测序得到 CaMK II 基因部分序列 513 bp (GenBank 登录号: KC473399), 与目标片段大小一致, 上传到 NCBI 进行 BLAST 比对发现, 其与基因库中已有的美洲大蠊 CaMK II 亚型 A, B, C 和 D 基因全长序列(GenBank 登录号: HQ176454.1 (HQ176457.1)核苷酸一致性均为 99%, 与黑腹果蝇的核苷酸一致性为 77%。

2.2 脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊成虫头部 nAChR $\alpha 6$ 亚基基因表达水平的影响

不同浓度 DOP (10 ~ 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 处理雌雄成虫 12 h 和 48 h 后, 观察其头部乙酰胆碱受体 $\alpha 6$ 亚

基基因表达水平(图 1)。设定对照组基因表达水平为 1.0, 雄虫 DOP 处理 12 h 后, 10, 80 和 115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 3 个处理组基因表达水平与对照组相比均显著降低($P < 0.05$), 115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组 nAChR $\alpha 6$ 基因表达水平最低, 是对照组的 35%; 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平升高, 是对照组的 2.47 倍; 药物处理雄虫 48 h 后, 45 和 115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 2 个处理组基因表达水平与对照组相比存在显著性差异($P < 0.05$), 其中 45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组基因表达水平升高, 是对照组的 1.60 倍, 115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组基因表达水平降低。

雌虫 DOP 处理 12 h 后, 5 个处理组基因表达水平与对照组相比均无显著性差异; 但 48 h 后, 5 个处理组的基因表达水平与对照组相比均存在显著性差异, 其中 10, 45 和 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 3 个处理组基因表达水平升高, 45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平最高, 是对照组的 3.72 倍; 而 115 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平降低。

上述结果显示: DOP 对雄虫作用 12 h 后 nAChR $\alpha 6$ 基因表达水平发生变化, 但趋势无明显规律, 而对雌虫作用后基因表达水平不发生显著变化。DOP 作用 48 h 后基因表达水平均随 DOP 浓度升高而上升, 45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 表达水平达到最高, 随后 nAChR $\alpha 6$ 基因表达量随浓度升高而下降。

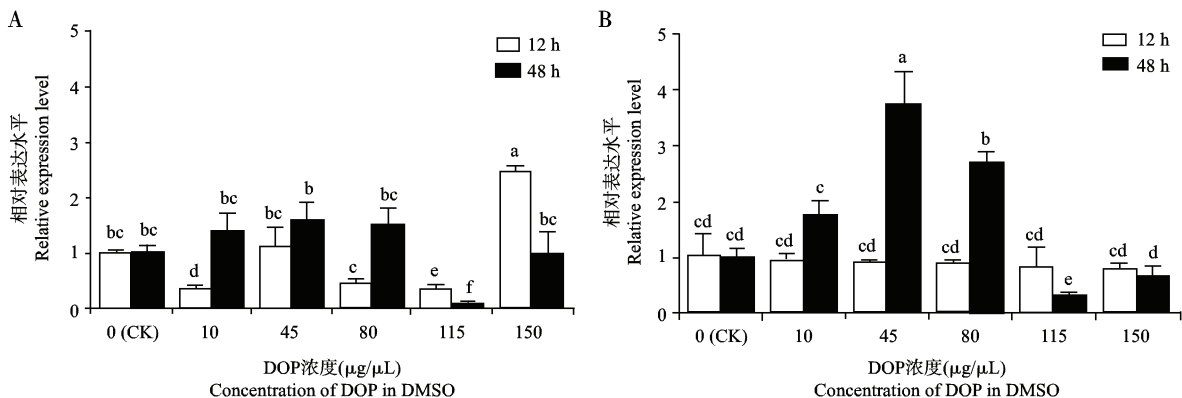


图 1 DOP 对美洲大蠊雄(A)和雌(B)成虫 nAChR $\alpha 6$ 亚基基因表达水平的影响

Fig. 1 Effects of DOP on expression of nAChR $\alpha 6$ subunit mRNA in male (A) and female (B) adults of *Periplaneta americana* CK: DMSO. 图中数据均为平均数 \pm 标准差 ($n = 3$), 柱形图上不同小写字母表示同一处理时间不同浓度 DOP 处理间存在显著性差异 (Tukey 氏检验, $P \leq 0.05$); 图 2 和 3 同。All values in the figure are represented as mean \pm SD ($n = 3$). Different small letters above histograms denote a significant difference among treatments with different concentrations of DOP at the same treatment time by Tukey's test ($P \leq 0.05$). The same for Figs. 2 and 3.

2.3 脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊成虫头部 CaM 基因表达水平的影响

测定了不同浓度 (10 ~ 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) DOP 处理美洲大蠊 12 h 和 48 h 成虫头部钙调蛋白基因表达水

平(图 2)。设定对照组基因表达水平为 1.0, 雄虫 DOP 处理 12 h 后, 10, 45 和 115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 3 个处理组基因表达水平与对照组相比显著降低($P < 0.05$), 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平最低, 是对照组的

35%；而 80 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平与对照组比较显著升高 ($P < 0.05$)。药物处理雄虫 48 h 后, 45 ~ 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 4 个处理组的基因表达水平与对照组均存在显著性差异, 45 和 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平较对照组升高, 其中 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平是对照组的 3.34 倍; 而 115 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平降低, 其中 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平是对照组的 72%。

DOP 处理雌虫 12 h 后, 5 个处理组的基因表达水平与对照组比较均无显著性差异 ($P > 0.05$); 但

48 h 后, 45 和 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平与对照组比较显著升高 ($P < 0.05$), 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平达到高峰, 是对照组的 2.08 倍。

以上结果表明: DOP 处理 12 h 后, 雄虫 CaM 基因表达水平发生明显变化, 趋势无明显规律; 而雌虫 CaM 基因表达水平不发生显著变化。48 h 后 CaM 基因水平均随 DOP 浓度升高而上升, 浓度为 45 ~ 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时, CaM 基因表达水平达到高峰, 随着浓度的进一步升高, CaM 基因表达量下降。

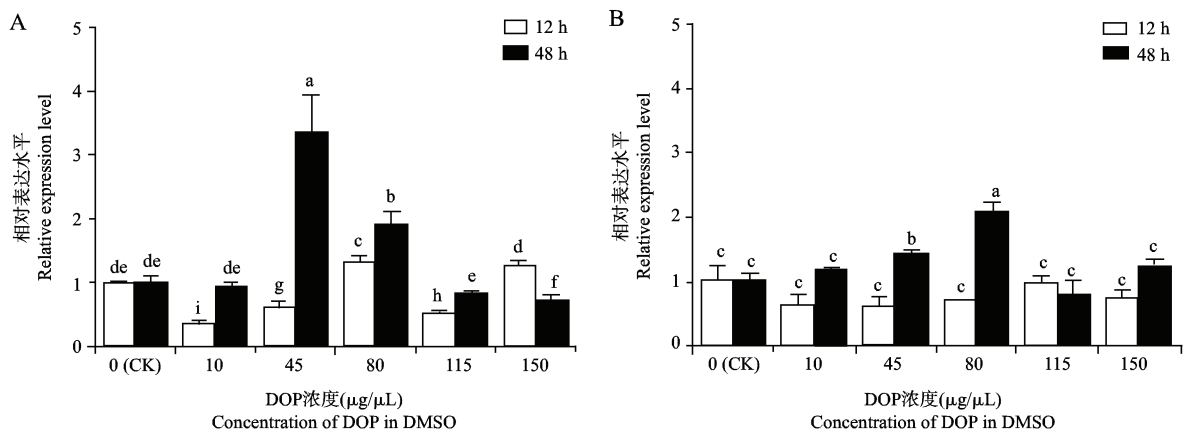


图 2 DOP 对美洲大蠊雄(A)、雌(B)成虫 CaM 基因表达水平的影响

Fig. 2 Effects of DOP on expression of CaM mRNA in male (A) and female (B) adults of *Periplaneta americana*

2.4 脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊成虫头部 CaMK II 基因表达水平的影响

不同浓度(10 ~ 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) DOP 处理雌雄成虫 12 h 和 48 h 后, 观察其头部 CaMK II 基因表达水平。由图 3 所示, DOP 处理雄虫 12 h 后, 10, 45 和 115 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 3 个处理组 CaMK II 基因表达水平较对照组显著降低 ($P < 0.05$)。10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DOP 处理组 CaMK II 表达水平最低, 是对照组的 16%, 而 80 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度组 CaMK II 基因表达水平与对照组比较显著升高 ($P < 0.05$), 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DOP 处理组该基因表达水平是对照组的 1.96 倍; DOP 处理雄虫 48 h 后, 45 ~ 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 4 个处理组基因表达水平与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 其中 45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组基因表达水平升高, 其中 45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平是对照组的 3.57 倍, 而 115 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平降低, 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平仅为对照组

的 44%。

DOP 处理雌虫 12 h 后, 45 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平与对照组相比存在显著性差异 ($P < 0.05$), 表现为 45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DOP 处理组 CaMK II 基因表达水平降低, 而 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组基因表达水平升高; DOP 处理雌虫 48 h 后, 10, 45, 80 和 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 4 个处理组基因表达水平与对照组相比存在差异 ($P < 0.05$), 其中 10, 45 和 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DOP 处理组基因表达水平升高, 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平最高, 是对照组的 4.41 倍, 而 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 处理组基因表达水平较对照组降低。

结果显示: 12 h 后 DOP 使雌雄虫基因表达水平发生变化, 但趋势无明显规律。48 h 后雌雄虫 CaMK II 基因水平随 DOP 浓度升高而上升, DOP 处理浓度为 45 ~ 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时 CaMK II 基因表达水平达到高峰, 随着浓度的进一步升高, CaM 基因表达量下降。

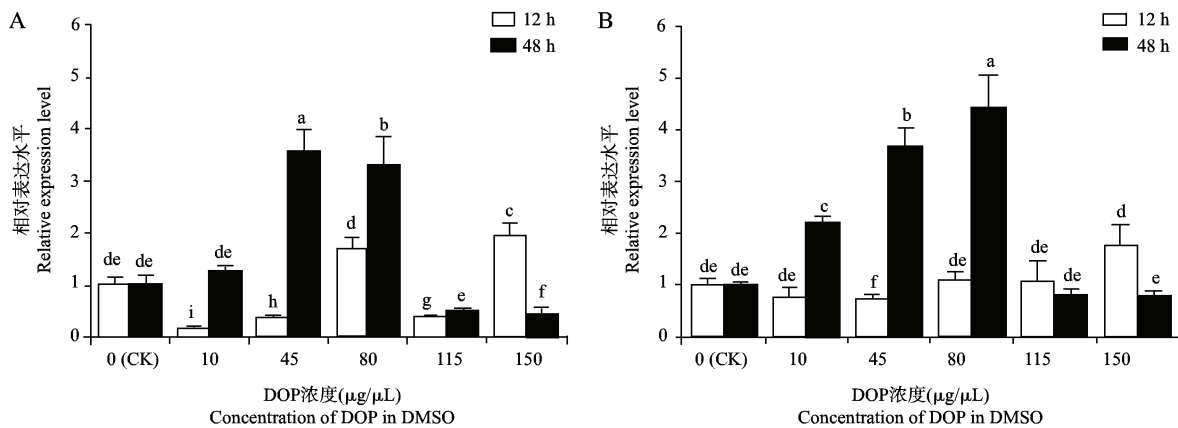


图3 DOP对美洲大蠊雄(A)、雌(B)成虫CaMK II基因表达水平的影响

Fig. 3 Effects of DOP on expression of CaMK II mRNA in male (A) and female (B) adults of *Periplaneta americana*

3 讨论

前期研究表明脱氧鬼臼毒素作用于美洲大蠊中枢神经系统,高浓度下主要表现为急性症状,低浓度下则表现出延迟毒杀作用,其作用机制与神经中毒有关。但对美洲大蠊几种酶系研究发现脱氧鬼臼毒素对乙酰胆碱酯酶离体活性无影响,故排除乙酰胆碱酯酶作为美洲大蠊中枢神经系统作用靶点的可能性,另一方面,脱氧鬼臼毒素对 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase产生低剂量激活,高剂量抑制的作用表现(张守刚等,2007),这说明ATPase在脱氧鬼臼毒素的作用途径中有重要影响。

nAChR作为杀虫剂主要作用靶点之一,其研究由来已久,但nAChR这一配体门控离子通道,在细胞内具体通过何种信号分子以何种方式转导信号目前尚无定论。法国Laphied实验室通过全细胞膜片钳电生理实验研究,提出了美洲大蠊nAChR激活后,其细胞内信号转导可能性机制(Courjaret and Lapied, 2001)。

本研究表明,DOP进入美洲大蠊12 h后,雄虫nAChR $\alpha 6$, CaM和CaMK II基因均有显著性变化,但在试验浓度范围内变化趋势无明显规律,雌虫3个基因基本无变化。而48 h后,3个基因表达水平大体呈倒U型趋势,在中间浓度45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 或80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 达到高峰,之后随浓度升高而下降。说明DOP需要在美洲大蠊体内蓄积一定时间才有明显的作用,并能与nAChR结合引起CaM-CaMK II级联反应,使这3个分子相应基因表达水平发生一致的变化规律。此趋势与前期DOP对美洲大蠊ATPase研究结果相符。

结合Laphied提出的机制(Courjaret and Lapied, 2001)nAChR激活后可能通过胞内ATPase提供的磷酸基团使受体构象改变,进而使受体功能发生变化,故可推测DOP与nAChR结合之后,胞内钙离子浓度升高,胞内钙稳态变化,激活CaM,引发级联反应:一方面促使ATP水解成cAMP,为PKA磷酸化受体胞内结构提供磷酸化基团引发兴奋作用;另一方面,活化的CaMK II一部分与受体直接发生交互作用引发兴奋作用,另有一部分在cAMP浓度饱和之后被激活使得被磷酸化的受体去磷酸化,启动抑制路径。

根据此假说,可推测在低浓度DOP组中,磷酸化占主要地位,显示出兴奋效应,此时nAChR, CaM和CaMK II基因表达水平逐渐升高;DOP浓度45~80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 范围内,胞内ATPase消耗殆尽,cAMP逐渐趋于饱和,3个基因表达水平达到最高;高浓度DOP组中,去磷酸化占主导地位呈现抑制效应,nAChR关闭,3个基因表达水平逐渐下降。

本研究通过基因克隆,利用实时荧光定量PCR技术,从基因表达水平验证了nAChR细胞内信号转导机制,为下一步从蛋白水平变化及nAChR功能的变化研究具有成功的指导意义,并为新烟碱型杀虫剂的毒性机制研究提供了一定科学价值。

参考文献 (References)

- Courjaret R, Lapied B, 2001. Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Molecular Pharmacology*, 60 (1): 80-91.
- Gao R, Di XD, Liu YQ, Yu XY, Liu XJ, Xiao H, 2009. Effects of four podophyllotoxin analogues on spontaneous action potentials of the

- ventral nerve cord of *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(2): 168–174. [高蓉, 狄旭东, 刘艳青, 余向阳, 刘贤进, 肖杭, 2009. 四种鬼臼毒素类似物对美洲大蠊腹神经索动作电位的作用. *昆虫学报*, 52(2): 168–174]
- Gao R, Gao C, Tian X, Yu X, Di X, Xiao H, Zhang X, 2004. Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L. and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. *Pest Management Science*, 60(11): 1131–1136.
- Karlin A, 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2): 102–114.
- Liu YQ, Xiao H, Cheng J, Wang CS, Zhao LP, Wang J, Gao R, 2011. The effects of deoxypodophyllotoxin on voltage-dependant K^+ channels of rat dorsal root ganglion (DRG) neurons. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science)*, 31(11): 1550–1555. [刘艳青, 肖杭, 程洁, 王昌松, 赵丽萍, 王军, 高蓉, 2011. 脱氧鬼臼毒素对大鼠背根神经元电压依赖性钾通道的作用. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 31(11): 1550–1555]
- Liu ZW, Zhang YX, Yao XM, Li J, Bao HB, 2010. Imidacloprid resistance mechanisms in *Nilaparvata lugens* and pharmacological properties of its nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Entomologica Sinica*, 53(6): 683–688. [刘泽文, 张懿熙, 姚香梅, 李健, 鲍海波, 2010. 褐飞虱对吡虫啉的抗性机理和靶标分子毒理学. *昆虫学报*, 53(6): 683–688]
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB, 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11): 573–580.
- Millar NS, Lansdell SJ, 2010. Characterisation of insect nicotinic acetylcholine receptors by heterologous expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 683: 65–73.
- Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative $C(T)$ method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101–1108.
- Tang ZH, Bi Q, 2003. *Molecular Behavior of Insecticide Action*. Shanghai Far East Publishers, Shanghai. 255–256. [唐振华, 毕强, 2003. 杀虫剂作用的分子行为. 上海: 上海远东出版社. 255–256]
- Velázquez-Jiménez R, Torres-Valencia JM, Cerda-García-Rojas CM, Hernández-Hernández JD, Román-Marín LU, Manríquez-Torres JJ, Gómez-Hurtado MA, Valdez-Calderón A, Motilva V, García-Maurino S, Talero E, Avila J, Joseph-Nathan P, 2011. Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*, 72(17): 2237–2243.
- Xu H, Wang J, Sun H, Lv M, Tian X, Yao X, Zhang X, 2009. Semisynthesis and quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of novel aromatic esters of 4'-demethyl-4-deoxypodophyllotoxin as insecticidal agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17): 7919–7923.
- Xu P, Sun Q, Wang X, Zhang S, An S, Cheng J, Gao R, Xiao H, 2010. Pharmacological effect of deoxypodophyllotoxin: a medicinal agent of plant origin, on mammalian neurons. *NeuroToxicology*, 31(6): 680–686.
- Yamamoto D, Ohishi H, Kozawa M, Inamori Y, Ishida T, Inoue M, 1988. Study on conformations-biological activities relationships for podophyllotoxin analogues based on crystal structure of deoxypodophyllotoxin (anthricin). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 36(9): 3239–3247.
- Zhang SG, Hou HM, Gao R, Liu YQ, He B, Di XD, Cheng J, Xiao H, 2007. Toxicity of deoxypodophyllotoxin to *Periplaneta americana* and its effects on AChE and ATPase. *Acta Entomologica Sinica*, 50(3): 248–252. [张守刚, 侯华民, 高蓉, 刘艳青, 何斌, 狄旭东, 程洁, 肖杭, 2007. 脱氧鬼臼毒素对美洲大蠊的毒力及几种酶系的影响. *昆虫学报*, 50(3): 248–252]

(责任编辑: 赵利辉)