

· 专论与综述 ·

昆虫鱼尼丁受体及其为靶标的杀虫剂的研究进展

董卫莉, 徐俊英, 刘幸海, 赵卫光, 李正名*

(南开大学 元素有机化学研究所, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要: 植物保护领域以昆虫鱼尼丁受体 (ryanodine receptor RyR) 为靶标的杀虫剂的研发取得了突破性进展。对近年来 RyR 在分子结构、功能调节, 以及对以 RyR 为靶标的杀虫剂的作用机制方面的研究进展进行了综述。昆虫 RyR 与哺乳动物 RyR 仅有约 47% 的同源性, 因而是一个有效的杀虫剂靶标。昆虫 RyR 克隆与表达技术的成熟为新型杀虫剂的开发和作用机制的研究提供了有力的工具。昆虫 RyR 单通道、配体结合和免疫学特性的研究补充了 RyR 的电生理学数据。近年来开发的新型 RyR 杀虫剂通过激活害虫鱼尼丁敏感的细胞内钙离子释放通道来达到杀虫的效果。

关键词: 鱼尼丁受体; 钙离子通道; 杀虫剂; 作用机制

中图分类号: TQ450.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)02-0178-08

Progress on Insect Ryanodine Receptor and Insecticides Targeting at Ryanodine Receptor

DONG Wei-li XU Jun-ying LU Xing-hai ZHAO Wei-guang LI Zheng-ming*

(Research Institute of Elemento-organic Chemistry, State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Significant progress has been made in developing insecticides targeting at RyR recently. Insect RyR possesses characteristics of the species which plays an important role in developing environment-friendly new pesticides. The progress of research on their structural functional characteristics and novel mode of action were reviewed. Insect RyR shares only ~ 47% homology with the mammalian isoforms of RyRs which could serve as potential targets for the potent insecticides that interact specifically with the insect but not the mammalian. The clone and expression of entire cDNA sequence encoding insect RyR could potentially provide the basis for the discovery of novel and more intrinsically selective insecticides. The research on the single channel ryanodine binding and immunological characteristics of insect RyR supplement electrophysiological data of RyR. These novel insecticides have been found to exhibit their action by release of intracellular Ca^{2+} stores mediated by the ryanodine receptor.

Key words ryanodine receptor; calcium channel; insecticides; mode of action; biological attributes

植物病虫害对农药品种产生抗性的问题一直是农药科研工作者面临的难题之一。目前, 在真

正商品化且有应用价值的杀虫剂中, 95% 的杀虫剂其主要作用靶标为乙酰胆碱受体、 γ -氨基丁酸受

收稿日期: 2007-12-11; 修回日期: 2008-01-25.

作者简介: 董卫莉 (1980-), 女, 河南开封人, 博士研究生, 从事新型生物活性物质的设计与合成研究, E-mail: dwllily@163.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 李正名 (1931-), 男, 上海人, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 从事有机化学和农药化学的研究. 联系电话: 022-23503732 E-mail: nkzm@vip.163.com

基金项目: 国家自然科学基金重点基金资助项目 (20432010).

体 (GABA)、钠离子通道、线粒体呼吸链和几丁质^[1-3]。随着害虫对现有杀虫剂抗性的快速发展, 研发具有新的作用机制的杀虫剂是植物保护成功的关键要素之一。近年来, 日本农药公司^[4]、拜耳公司^[5]和杜邦公司^[6]先后开发了新型邻苯二甲酰胺类 (phthalic acid diamides) 和邻甲酰氨基苯甲酰胺类 (anthranilic diamides) 杀虫剂, 并发现其作用靶标均为鱼尼丁受体 (ryanodine receptor, RyR)。这是首次发现作用于 RyR 的合成杀虫剂。

有关 RyR 国内外曾有学者进行过综述^[7-12], 但大多是集中于抑制剂的化学合成、结构修饰以及在医药方面的应用上。也有一些关于许多种属和组织的 RyR 在生物化学、生理学和分子遗传学方面的研究报道, Rossi 等人^[13]对 RyR 的结构和功能的研究进行了详细的综述。但是这些电生理方面的研究主要集中在脊椎动物的范围。关于无脊椎动物, 尤其是昆虫 RyR 及其电生理方面的相关综述尚不多见。笔者对 RyR 结构与功能、昆虫 RyR 研究的最新进展以及以 RyR 为靶标的杀虫剂的作用机理进行了综述。

1 鱼尼丁受体

Ca^{2+} 是细胞内最重要的第二信使之一, 机体的每种活动都与 Ca^{2+} 息息相关。研究发现, Ca^{2+} 作为一种重要的细胞信号物质, 可参与突触神经递质释放, 蛋白质激素的合成、分布和代谢及细胞内外多种酶的激活, 生物信号的跨膜传递, 维持神经、肌肉正常兴奋性, 调节腺体分泌等一系列生理活动。正常情况下, 细胞内 Ca^{2+} 浓度是处在平衡状态的, 一旦严重失去平衡, 机体就会趋向死亡, 所以钙信号也是生存和死亡信号。胞内 Ca^{2+} 的平衡是胞内钙库对 Ca^{2+} 释放和摄取保持平衡的结果, 而这种调节作用是通过改变胞质溶胶中的 Ca^{2+} 浓度进行的。细胞内 Ca^{2+} 的释放主要由两类通道蛋白所调节, 一类是三磷酸肌醇受体 (IP₃), 另一类就是 RyR。RyR 是一类最主要的 Ca^{2+} 释放通道 (calcium release channel, CRC), 因能与植物碱鱼尼丁 (ryanodine) 发生高亲和性结合, 故得名鱼尼丁受体 (RyR)^[14]。

1.1 鱼尼丁受体的结构

研究表明, 按照 RyR 在哺乳动物组织中的分布可将 RyR 分为 3 种同工型 (isoform), 即骨骼肌型 (RyR1)、心肌型 (RyR2) 和脑型 (RyR3)^[15, 16]。

RyR 属同四聚体结构, 它是由 4 个相同的亚基组成的寡聚蛋白, 每个亚基的分子质量大约为 560 kD, 这是目前所知最大的离子通道蛋白。三种同工型的 RyR 各包含约 5 000 个氨基酸残基, 且并非完全是组织特异性表达的, 它们的 cDNA 序列具有超过 65% 的同源性。

用冷冻电子显微镜与计算机三维重组技术, 已先后得到了它们的结构模型, 其空间分辨率约为 3~4 nm, 3 种 RyR 的结构有很大相似性。图 1 为从不同角度看到的 RyR 三维结构的图像。从侧面看, RyR 蛋白的结构类似于蘑菇状, 较大的伞部为胞浆区 (cytoplasmic domains), 该结构将 RyR 与细胞膜联系起来; 较小的柄部为 RyR 的跨膜区 (transmembrane domains), 位于 C 末端, 大约包括 4~12 个跨膜片段 (transmembrane segments), 其约占整个受体蛋白体积的 1/5, 并形成 CRC 的孔道, 孔径约 1~2 nm, 它不仅是释放 Ca^{2+} 的通道, 而且能将 RyR 固定于肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, SR) 上。从顶部和底部看, 胞浆区和跨膜区均呈正方形^[17, 18]。图 2^[19] 更形象地显示了 RyR 的结构, RyR 分子在肌质网膜 (SR membrane) 上排列成规则的二维阵列 (two-dimensional array), 类似于国际象棋盘, 正方形的 RyR 分子以角对角的方式排列。

1.2 鱼尼丁受体的功能

RyR 通过把 Ca^{2+} 从肌浆网 (SR) / 内质网体 (endoplasmic reticulum, ER) (SR/ER) 释放到细胞质 (cytosol) 中, 从而将细胞外的刺激传导给细胞内钙信号或者增强和调节细胞内 Ca^{2+} 浓度。目前对 RyR1 和 RyR2 的功能已研究得比较清楚: 它们分别在骨骼肌和心肌的兴奋-收缩偶联 (excitation-contraction coupling, E-C 偶联) 中发挥重要作用。从图 2 中可以看出, RyR 的胞浆区在 T-小管膜 (T-tubule membrane) 处与细胞膜二氢吡啶受体 (dihydropyridine receptor, DHPR) / L-型电压门控 Ca^{2+} 通道 (voltage-gated calcium channels, VGCCs) 相邻并相互作用, DHPR 作为电压感受器, 感受到 T-小管膜去极化时, 其构象发生改变并通过蛋白质间的相互作用激活 RyR, Ca^{2+} 释放通道开放, 肌浆网上的 Ca^{2+} 大量释放, 最终引起肌肉的收缩。由 DHPR 和肌浆网 RyR 介导的 Ca^{2+} 信号转导是 E-C 偶联的基础^[20]。另外, DHPR 在不同肌细胞中与 RyR 的偶联方式不同: 在骨骼肌中, DHPR 和 RyR1 的 E-C 偶联主要是去极化诱导的钙释放

(depo larization-induced Ca^{2+} release DICR) 机制; 在心肌细胞中, DHPR 和 RyR2 的 E-C 偶联则主要

是钙诱导钙释放 (calcium-induced calcium release, CICR) 机制^[21]。

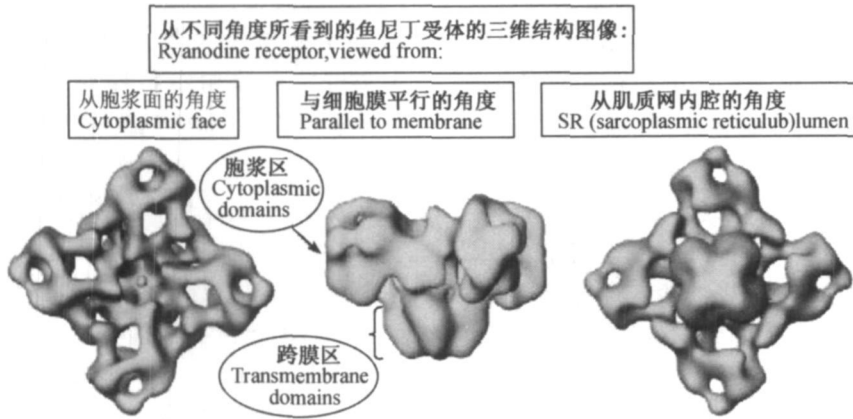


图 1 RyR 的三维结构图像——四聚体“蘑菇状”^[17]

Fig. 1 Three views of a 3D reconstruction of the structure of the RyR-tetrameric mushroom shaped^[17]

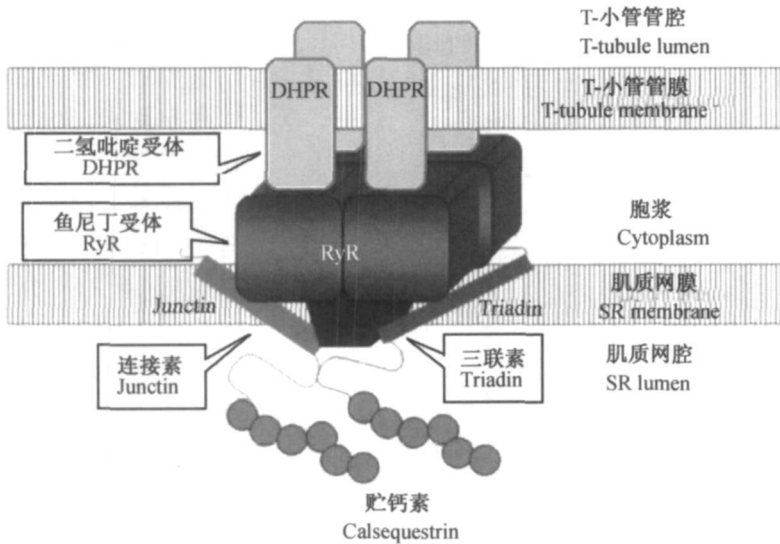


图 2 鱼尼丁受体与二氢吡啶受体^[19]

Fig. 2 The ryanodine receptor (RyR) and dihydropyridine receptor (DHPR)^[19]

1.3 鱼尼丁受体的调节

RyR通道胞质结构域区包含了大量的伸入胞浆的N末端结构域, 这些结构域上分布着通道调节物的结合位点, 可以与不同的内源性调节蛋白(FK结合蛋白、钙调素、钙结合蛋白)和一些离子(Ca^{2+} 、 Mg^{2+})相互作用, 从而共同调节通道的活性^[22]。RyR也可以在肌浆网内腔表面结合蛋白, 如贮钙素(calsequestrin)、三联素(triadin)和连接素(junctin)等^[23], 它们都是RyR的调节剂(图2)。除了这些生理上的内源性调节物质外, 许多外源性的物质也可以调节RyR通道功能, 如咖啡因、Camosine、特异抗体、鱼尼丁、钆红、免疫抑制

剂FK506与雷伯霉素等。将纯化的RyR嵌入脂质双分子层可以研究不同物质对RyR的影响。

1.4 鱼尼丁与鱼尼丁受体的作用

鱼尼丁存在于植物Ryania speciosa的茎和根中, 鱼尼丁生物碱作为潜在的杀虫剂于1948年由Rogers等人首次分离出来^[24], 因其结构复杂而难以合成^[25]。鱼尼丁是一种肌肉麻痹毒剂, 能影响肌肉收缩, 对脊椎动物和无脊椎动物能引起肌肉松弛性麻痹。鱼尼丁与RyR的结合具有高度敏感性和选择性。在早期的观察鱼尼丁对嵌入脂质双分子层的RyR作用的研究中, 鱼尼丁对RyR的作用呈剂量依赖关系, 即在鱼尼丁低浓度(1 mol-

10 μmol) 下能增加 RyR 的开放机率, 而在高浓度 (0.3~2 mmol) 下可引起 RyR 长时间的亚传导状态, 最终完全阻断 RyR^[26]。另外, 鱼尼丁对单通道 RyR 具有双重影响, 即在使通道门控长时间开放的同时还能降低通道的电导性。研究表明, 上述复杂的作用机制可能与鱼尼丁的结合位点有关, 鱼尼丁的结合位点位于 RyR 的 C 末端区, 位于 RyR 通道的孔道内或孔道附近^[27], 而鱼尼丁与 RyR 的结合改变了该孔道的有效直径, 从而影响受体的功能^[28]。另外, 实验结果表明, RyR 还存在一个低亲和性的鱼尼丁结合位点, 而 RyR 不同单体中鱼尼丁结合位点之间又相互作用, 这些都是引起鱼尼丁与 RyR 作用方式复杂的原因。

2 昆虫鱼尼丁受体

鱼尼丁作为杀虫剂已有几十年的历史, 研究已证明, 鱼尼丁是通过作用于 RyR 而产生杀虫效果的^[29], 但由于鱼尼丁对人畜的毒性很高, 因而限制了其作为杀虫剂的使用^[30]。近年来, 以 RyR 为靶标的杀虫剂的研究取得了突破性进展, 新型杀虫剂氟虫酰胺 (flubendimide)^[31] 和氯虫酰胺 (chloranthaniliprole)^[32, 33] 的发现再次引起了人们对该受体的关注。目前对 RyR 的研究大部分仅限于脊椎动物的范围, 例如在中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cells CHO)^[34, 35]、爪蟾卵母细胞 (Xenopus oocytes)^[36] 和转染的非洲绿猴肾细胞 (Transformed African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells COS-1 cells)^[37] 中成功表达了 RyR 的 cDNA, 并获得了功能性 CRC。而对无脊椎动物 RyR 的研究还处于初级阶段, 尤其是对昆虫 RyR 的研究。对昆虫 RyR 功能的深入研究, 以及受体特征的阐明, 将为设计高选择性的杀虫剂提供理论依据。

2.1 昆虫 RyR 分子特征与表达

不同种类的昆虫肌肉细胞中存在大量的 RyR 位点^[38]。生理学研究已经得出结论, 在昆虫的复眼上有 RyR/CRC 的存在。Baumann 等人^[39] 利用龙虾肌肉 RyR 的亲纯化抗体对昆虫感光器中的 RyR 进行了识别和定位, 并利用蛋白免疫印迹 (western blotting) 和间接免疫荧光 (indirect immunofluorescence) 方法检测了该抗体和昆虫肌肉中 RyR 的交叉反应情况。在蜜蜂 *Apis mellifera* 和飞蝇如野生型红头丽蝇 (*Calliphora erythro-*

phala, wild type), 突变型白眼果蝇 (*Drosophila melanogaster*, white-eyed mutant) 的眼组织中, 该抗体识别出一个单一的蛋白。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE) 分析证明了该组织中存在 RyR。采用免疫荧光及激光扫描共聚焦显微镜技术对 RyR 在蜜蜂眼睛中的分布进行检测, 结果显示 RyR 存在于感光器中, 并在 ER 上表现出非均态的分布。另外, 对飞蝇复眼中 RyR 分布的研究发现, 在丽蝇 *C. erythrocephala* 和果蝇 *D. melanogaster* 的感光器中同样存在 RyR。

Hasan 等人^[40] 在果蝇 *Drosophila* 肌肉和神经系统的卵细胞和成年细胞中成功表达了 RyR。Takeshima 等人^[41] 利用来自哺乳动物的 3 种同工型 RyR 简并 cDNA 探针, 对黑腹果蝇 *D. melanogaster* RyR 完整的基因组 DNA 进行了序列测定。通过序列分析和部分 cDNA 克隆发现, 这个基因的蛋白编码序列由 26 个外显子组成, 并发现这个推导蛋白的氨基酸序列与哺乳动物 RyR 仅有 45%~47% 的同源性。而果蝇 RyR 的 C 末端区域具有很高的保守性, 与哺乳动物的相应区域有超过 90% 的同源性, 具有相同的结构特点。对果蝇不同发展阶段进行印迹杂交分析发现, 在 6~12 h 的果蝇胚胎上鉴定出一个大约 16 kb 的 RyR-RNA 片段, 而在 2 和 3 龄幼虫中该受体仅有低水平的表达。另外, 多线染色体原位杂交定位实验表明, 这个基因位于第二染色体的一条带 (44F) 上。

Puente 等人^[42] 对鳞翅目害虫烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* RyR 中编码羧基端 1172 个氨基酸的 cDNA 进行了克隆和表达。通过对烟芽夜蛾 RyR (Hv-RyR) 和其他种类 RyR 的 C 端氨基酸序列进行比较, 发现它们具有一定的同源性, 如与黑腹果蝇具有 74% 的同源性, 与脊椎动物具有 47.9%~50.1% 的同源性。昆虫 RyR 的克隆与表达及其同源性方面的研究对新型 RyR 杀虫剂的合理设计和筛选提供了一定的理论基础。

Xu 等人^[43] 采用 cDNA 文库筛选和逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 的方法, 对果蝇 RyR 完整 cDNA 编码序列进行了克隆与表达, 这个完整的 cDNA 具有 15402 个碱基对。Xu 等人为了鉴定该果蝇 RyR 的 Ca^{2+} 释放通道的活性, 在 CHO 膜表面对果蝇 RyR 的 cDNA 和一个缺失突变株 (*Drosophila* RyR-C, lacking aa 277-3650) 进行了

表达,并成功构建了 *Drosophila RyR* 和 *Drosophila RyR-C* 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein GFP) 融合表达载体,应用共聚焦显微镜分析了它在细胞中的亚细胞定位,并观察到 *Drosophila RyR* 和 *Drosophila RyR-C* 均定位于 SR 膜上。该蛋白被瞬时表达 (transient expression) 后,微粒体膜被分离并制备成平板双分子层脂膜以测定单个 CRC 的活性。结果发现,在果蝇 *RyR* 的 C 端形成的功能性 CRC 与哺乳动物骨骼肌 *RyR* 在该结构域的功能性 CRC 具有相似的特征,并发现 CRC 的传导孔位于 *RyR* 蛋白的 C 端。但是完整果蝇 *RyR* 的蛋白表达水平仍比较低,在 CHO 中仅有瞬时的表达,这使人们对完整果蝇 CRC 功能性特征缺少更详细的了解。

Gutteridge 等人^[44]在重组细胞系中对不同种属昆虫的功能性 *RyR* 的全长基因进行了克隆与表达,这些昆虫包括鳞翅目烟芽夜蛾、同翅目桃蚜 *Myzus persicae*、玉米飞虱 *Peregrinus maidis*、棉蚜 *Aphis gossypii* 和黑腹果蝇。这些被表达的基因序列具有广泛的用途,如可用于分离其他害虫的 *RyR*、用于大量化合物杀虫活性筛选方法的建立、用于该受体蛋白抗体的制备、用于杀虫剂结合位点结构的判定,以及用于杀虫剂与 *RyR* 作用机制的研究等。不同种属昆虫 *RyR* 基因序列的克隆与表达为各种载体的重组构建提供了有利条件,并克服了重组蛋白对宿主细胞 (host cells) 的毒性影响,这些影响包括过表达 (over-expression), 反义抑制 (antisense inhibition) 和共抑制 (co-suppression) 等,为新型 *RyR* 杀虫剂的开发和作用机制的研究提供了一个有力的工具。

2.2 昆虫 *RyR* 的功能与调节

Lockyer 等人^[45]对烟芽夜蛾 SR 钙泵 (Ca^{2+} -ATPase) 进行了克隆与表达,发现可能存在一个使 Ca^{2+} 从胞浆 (cytoplasm) 游离出来并重新回到 SR 的功能性体系。

Scottward 等人^[46]对烟芽叶蛾 *RyR* 的功能和调节进行了比较详细的研究。

首先进行了 Hv-*RyR* 配体结合的研究。从匀浆预冷的烟芽叶蛾胸肌提取细胞膜,采用放射配基结合受体分析方法对 Hv-*RyR* 和 [^3H]-鱼尼丁的亲合力进行检测。在鱼尼丁纳摩尔级浓度下, Hv-*RyR* 的结合容量 (B_{max}) 为 $(1.19 \pm 0.21) \times 10^{-3}$ nmol/mg Pro, 平衡解离常数 K_D 值为 3.82 nmol/L ($n = 4$), Hv-*RyR* 与鱼尼丁的结合与

鱼尼丁浓度呈现明显的双曲线关系。在 [^3H]-鱼尼丁浓度一定的条件下, [^3H]-鱼尼丁和 Hv-*RyR* 的亲合力呈现出一定的钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]$) 依赖性的双向作用性,即低浓度的 Ca^{2+} 提高了 [^3H]-鱼尼丁和 Hv-*RyR* 的亲合力,而高浓度的 Ca^{2+} 却降低了其结合的亲和力。他们还就咖啡因 (咖啡因及其类似物是已知哺乳动物 *RyR* 的激活剂) 对 Hv-*RyR* 的影响进行了研究,结果表明,咖啡因对 Hv-*RyR* 的作用具有钙离子浓度依赖性,在 Ca^{2+} 为纳摩尔或微摩尔级浓度下,毫摩尔浓度的咖啡因不能引起 [^3H]-鱼尼丁和 Hv-*RyR* 的结合。仅能引起 [^3H]-鱼尼丁和兔子 *RyR* 的结合。Lehmborg 等人^[47]也发现 [^3H]-鱼尼丁和家蝇 *RyR* 的结合对咖啡因不敏感。但是 Walz 等人^[48]发现咖啡因能引起蝗虫 (locust) 脏肌 (visceral muscle) 的肌肉收缩和蜜蜂光感受器细胞 (photoreceptor cell) 的鱼尼丁敏感内钙库的 Ca^{2+} 释放。Zhang 等人^[49]发现毫摩尔浓度的咖啡因能引起 [^3H]-鱼尼丁和龙虾 (lobster) *RyR* 的结合。这些结论表明不同种属 *RyR* 的功能性特征存在一定的差异性。另外,Scottward 等人通过 [^3H]-鱼尼丁与 Hv-*RyR* 微粒体膜的结合实验,还研究了 Ca^{2+} 、ATP 和钿红对 *RyR* 亲和性和对通道开放概率的影响,发现烟芽夜蛾 *RyR* 通道闸门对 ATP 和钿红敏感,作用方式与哺乳动物的 *RyR* 相似。

然后他们对 Hv-*RyR* 的进行了免疫学特性的研究。用 SDS-PAGE 及银染法测定了烟芽夜蛾微粒体膜中 Hv-*RyR* 蛋白的相对分子质量,电泳谱图显示该 *RyR* 蛋白的分子质量 ≥ 400 kDa, 蛋白质印迹免疫分析 (western blot) 结果显示,该 *RyR* 蛋白与抗体发生了免疫反应。

最后他们对 Hv-*RyR* 进行了 Ca^{2+} 通道特性的研究。采用不连续梯度密度分离烟芽夜蛾微粒体膜得到适合膜片钳实验的细胞膜微囊,将具有毫秒开放时间和高单位电导值的 Ca^{2+} 通道蛋白重组于来自梯度分离的烟芽夜蛾微粒体膜的脂双层,用膜片钳单通道记录法记录 Ca^{2+} 通道电流,观察 Ca^{2+} 通道特性, Hv-*RyR* 通道的 Ca^{2+} 电导值约为 110×10^{-6} pS (110 pS), 当加入 100 nmol/L 鱼尼丁后,胞内游离 Ca^{2+} 浓度和通道闸门有一个持续的特征性变化,该通道的门控和电导特征和兔子骨骼肌 *RyR* 的通道特性相似。这些结论表明,在烟芽夜蛾胸肌组织中存在一个功能性 *RyR* / Ca^{2+} 释放通道,该受体与其他亚型 (例如哺乳动物的

RyR)具有相似的特征。这是首次对膜结合昆虫RyR进行的单通道特性、 $[^3\text{H}]$ -鱼尼丁结合和免疫学特性的研究,这些结论有力地补充了RyR的电生理学数据。

3 新型鱼尼丁受体杀虫剂的作用机理

钙信号在许多生理过程中具有重要作用,包括肌肉收缩和神经递质的释放^[50]。肌肉收缩包括两种不同的 Ca^{2+} 通道调节方式,一个是 VgCCs 主要调节细胞外 Ca^{2+} 的内流;另一个是RyR,主要调节细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放^[51]。钙稳态调节机制是一个潜在的杀虫剂作用靶点。但是,从现有合成杀虫剂的发现过程来看,目前对这些靶标的研究仍处于初级阶段,对钙稳态机理的理解也还不是很透彻。张一宾等曾对新型RyR杀虫剂氟虫酰胺

和氯虫酰胺的作用机理分别进行了阐述^[52,53],本文对该类新型杀虫剂的作用机制进行简要的回顾与总结。

通过作用机制的研究发现,新型RyR杀虫剂是一个RyR调节剂,作用于鱼尼丁敏感CRC,它们使昆虫RyR的 Ca^{2+} 通道处于打开状态,促使 Ca^{2+} 从内质网膜中释放出来,这种对内钙库的调节作用是产生杀虫活性的基本原因。从图3可以看出,在氟虫酰胺的作用下,RyR处于打开状态,促使大量 Ca^{2+} 从内钙库释放出来,导致细胞质中钙离子浓度上升,使肌肉细胞完成一次收缩,持续的 Ca^{2+} 释放引起虫体不断的收缩、呕吐、脱粪,进而导致进食停止,最终导致虫体死亡^[54]。因此新型RyR杀虫剂通过介导RyR从而调节钙移动(calcium mobilization)的变化。

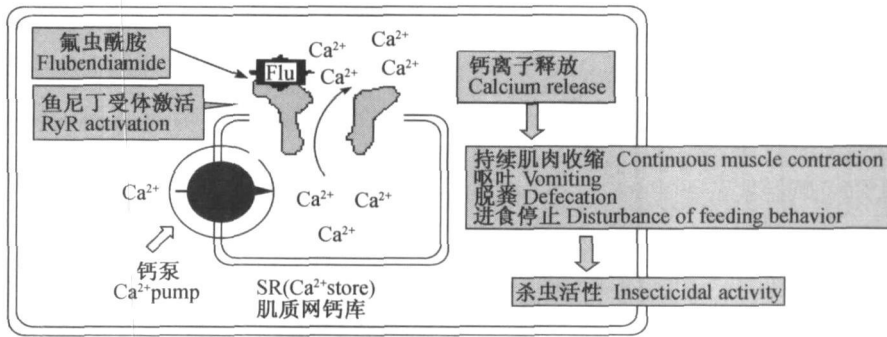


图3 氟虫酰胺作用于鱼尼丁受体的过程示意图^[54]

Fig 3 Proposed mode of action of flubendiamide^[54]

通过作用机制的研究还发现新型RyR杀虫剂具有以下特点^[55,56]: 1) 在RyR上具有一个高亲和性的结合位点。生物化学和分子生物学研究表明,氟虫酰胺和氯虫酰胺与受体的结合位点与其他RyR调节剂的作用位点不同(例如鱼尼丁),它们在昆虫RyR上具有一个新的变构位点,且该结合位点具有特异性、可饱和性、高亲和性的特点。到目前为止,仅发现该位点位于RyR的一个孔状区域,其具体的作用位置还不明确。2) 对昆虫RyR的高选择性。与鱼尼丁不同,氟虫酰胺和氯虫酰胺对鳞翅目害虫具有很好的杀虫活性,而对哺乳动物的毒性很低。在对昆虫RyR结构的研究中发现,鳞翅目害虫烟芽夜蛾RyR与哺乳动物RyR的氨基酸序列仅有47.9%~50.1%的同源性。这些结构上的差异和新型RyR杀虫剂对昆虫RyR作用位点的特异性使其具有高选择性的作用

方式,这是它们对哺乳动物低毒的主要因素。

有研究表明,氟虫酰胺和氯虫酰胺是一种高效的、选择性的昆虫RyR激活剂,它们激活RyR引起内钙库 Ca^{2+} 无节制地释放从而导致钙库耗竭,引起肌肉收缩,最终导致昆虫死亡。到目前为止,对这两类新型RyR杀虫剂的作用机制还不是很明确,只是通过一些实验来说明了它们是通过激活害虫鱼尼丁敏感的细胞内 Ca^{2+} 释放通道来达到杀虫的效果。对这类杀虫剂作用机制的进一步研究将有助于我们更深入地了解其作用特性,为高效杀虫剂的合理设计和今后杀虫剂抗性问题的研究提供理论依据。

4 总结与展望

邻苯二甲酰胺类和邻甲酰氨基苯甲酰胺类化合物是首次发现作用于靶标RyR的合成杀虫剂,

这是继双酰胺类杀虫剂之后的又一重大发现,是对害虫综合治理策略有力的补充。该发现将有利于害虫抗性问题的解决。这些杀虫剂将成为那些选择性差、对哺乳动物毒性高的有机磷类杀虫剂的重要替代品。尽管目前对 RyR 确切的结合位点尚不完全清楚,但随着对昆虫 RyR 的克隆与表达技术的成熟,人们对鱼尼丁及其衍生物和作用于该受体的活性物质对昆虫的毒理学机制将会有深入的了解,这也将为新型杀虫剂的创制提供理论依据。

参考文献:

- [1] NAUEN R, BRETSCHNEIDER T. New Modes of Action of Insecticides [J]. *Pesticide Outlook*, 2002, 13(6): 241-245.
- [2] NARAHA SHIT. Nerve Membrane Ion Channels as the Target Site of Insecticides [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2002, 2(4): 419-432.
- [3] DEKEYSER M A. Acaricide Mode of Action [J]. *Pest Manag Sci* 2005, 61(2): 103-110.
- [4] TOHNISHIM, NAKAO H, KOHNO E, et al Preparation of Phthalic Acid Dimides as Agricultural and Horticultural Insecticides EP 919542 [P]. 1999-06-02.
- [5] KONZE J ANDERSCH W, STÜBLER D, et al Synergistic Insecticidal and Acaricidal Compositions WO 2004034786 [P]. 2004-04-29.
- [6] LAHM G P, MYERS B J SELBY T P, et al Preparation of Insecticidal Anthranilamides WO 2001070671 [P]. 2001-09-27.
- [7] FILL M, COPELLO JA. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(4): 893-922.
- [8] CHAI Bao-shan (柴宝山), YANG Ji-chun (杨吉春), LIU Chang-ling (刘长令). 新型邻苯二甲酰胺类杀虫剂的研究进展 [J]. *Fine Chemical Intermediates (精细化工中间)*, 2007, 37(1): 1-8.
- [9] CHAI Bao-shan (柴宝山), LIN Dan (林丹), LIU Yuan-xiong (刘远雄), et al 新型邻甲酰氨基苯甲酰胺类杀虫剂的研究进展 [J]. *Agrochemicals (农药)*, 2007, 46(3): 148-153.
- [10] LEHNART S E. Novel Targets for Treating Heart and Muscle Disease Stabilizing Ryanodine Receptors and Preventing Intracellular Calcium Leak [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2007, 7(2): 225-232.
- [11] YANO M, YAMAMOTO T, KEDA Y, et al Mechanisms of Disease Ryanodine Receptor Defects in Heart Failure and Fatal Arrhythmia [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2006, 3(1): 43-52.
- [12] MATKSA R. Ryanodine Receptors/Calcium Release Channels in Heart Failure and Sudden Cardiac Death [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(4): 615-624.
- [13] ROSSID, SORRENTINO V. The Ryanodine Receptors Gene Family: Expression and Functional Meaning [J]. *Basic Appl Mol* 2004, 14(5): 323-343.
- [14] OGAWA Y. Role of Ryanodine Receptors [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1994, 29(4): 229-274.
- [15] TAKEISHI M, H S, NISHIMURA S, MATSUMOTO T, et al Primary Structure and Expression from Complementary DNA of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor [J]. *Nature*, 1989, 339(6224): 439-445.
- [16] HAKAMATA Y, NAKAI J TAKEISHI M, et al Primary Structure and Distribution of a Novel Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel from Rabbit Brain [J]. *FEBS Lett*, 1992, 312(2-3): 229-235.
- [17] RADERMACHER M, RAO V, GRASSUCCIR, et al Cryo-Electron Microscopy and Three-Dimensional of the Calcium Release Channel/Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle [J]. *J Cell Biol*, 1994, 127(2): 411-423.
- [18] SHARMA M R, JEYAKUMAR L H, FLEISCHER S et al Three-Dimensional Structure of Ryanodine Receptor Isoform Three in Two Conformational States as Visualized by Cryo-Electron Microscopy [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(13): 9485-9491.
- [19] DULHUNTY A F, FOULQUIN P. What We don't know about the Structure of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2003, 30(10): 713-723.
- [20] PROTASIEF. Structural Interaction between RYRs and DHPR s In cardiac Release Units of Cardiac and Skeletal Muscle Cells [J]. *Front Biosci*, 2002, 7: d650-d658.
- [21] SCHUHMEIER R P, GOUDON E, URSU D, et al Functional Interaction of CaV Channel Isoforms with Ryanodine Receptors Studied in Dysgenic Myotubes [J]. *Biophys J*, 2005, 88(3): 1765-1777.
- [22] WAGENKNECHT T, GRASSUCCIR, FRANK J et al Three Dimensional Architecture of the Calcium Channel/Foot Structure of Sarcoplasmic Reticulum [J]. *Nature*, 1989, 338(6211): 167-170.
- [23] PAOLINIC, PROTASIEF, FRANZIN FARMSTRONG C. The Relative Position of RyR Feet and DHPR Tetrads in Skeletal Muscle [J]. *J Mol Biol*, 2004, 342(1): 145-153.
- [24] ROGERS E F, KONUSZY F R, SHAVEL J et al Plant Insecticides I Ryanodine a New Alkaloid from *Ryania Speciosa* Vahl [J]. *J Am Chem Soc*, 1948, 70(9): 3086-3088.
- [25] JENDEN D JA, D FA RHURST A S. The Pharmacology of Ryanodine [J]. *Pharmacol Rev*, 1969, 21: 1-25.
- [26] CORONADO R, MORRISSETTE J SUKHAREVA M, et al Structure and Function of Ryanodine Receptors [J]. *Am J Physiol*, 1994, 266(6 Pt 1): C1485-C1504.
- [27] CALLAWAY C, SERY SHEV A, WANG JP, et al Localization of the High and Low Affinity [³H]-Ryanodine Binding Sites on the Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(22): 15876-15884.
- [28] TU Q, VELEZ P, BRODWICK M, FILL M. Streaming Potentials Reveal a Short Ryanodine-sensitive Selectivity Filter in Cardiac Ca²⁺ Release Channel [J]. *Biophys J*, 1994, 67: 2280-2285.
- [29] OGAWA Y. Role of Ryanodine Receptors [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1994, 29(4): 229-74.
- [30] PEPPER B B, CARRUTH L A. New Plant Insecticide for

- Control of the European Com Borer [J]. *J Econ Entomol*, 1945, 38: 59-66.
- [31] TOHN ISHIM, NAKAO H, FURUYA T, et al Flubendiamide, a Novel Insecticide Highly Active against Lepidopterous Insect Pests [J]. *J Pestic Sci*, 2005, 30(4): 354-360.
- [32] LAHM G. P, STEVENSON T M, SELBY T P, et al Rynaxypyr: A New Insecticidal Anthranilic Diamide that Acts as a Potent and Selective Ryanodine Receptor Activator [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 6274-6279.
- [33] LAHM G P, SELBY T P, FREUDENBERGER J H, et al Insecticidal Anthranilic Diamides: A New Class of Potent Ryanodine Receptor Activators [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15 (12): 4898-4906.
- [34] PENNER R, NEHER E, TAKESHIMA H, et al Functional Expression of the Calcium Release Channel from Skeletal Muscle Ryanodine Receptor cDNA [J]. *FEBS Lett*, 1989, 259 (1): 217-221.
- [35] MAGAWA T, NAKAI J, TAKESHIMA H, et al Expression of Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release Channel Activity from Cardiac Ryanodine Receptor cDNA in Chinese Hamster Ovary Cells [J]. *J Biochem*, 1992, 112 (4): 508-513.
- [36] NAKAI J, MAGAWA T, HAKAMATA Y, et al Primary Structure and Functional Expression from cDNA of the Cardiac Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel [J]. *FEBS Lett*, 1990, 271 (1-2): 169-177.
- [37] CHEN S R, VAUGHAN D M, A REY J A, et al Functional Expression of cDNA Encoding the Ca^{2+} Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Skeletal Muscle Sarcoplasmic in CO₂-1 Cells [J]. *Biochemistry*, 1993, 32 (14): 3743-3753.
- [38] SCHMITT M, TURBERG A, LONDERSHAUSEN M. Characterization of a Ryanodine Receptor in *Periplaneta americana* [J]. *J Recept Signal Transduction Res*, 1997, 17(1-3): 185-97.
- [39] BAUMANN O. Distribution of Ryanodine Receptor Ca^{2+} Channels in Insect Photoreceptor Cells [J]. *J Comp Neurol*, 2000, 421 (3): 347-61.
- [40] HASAN G, RO SBASH M. Drosophila Homologs of two Mammalian Intracellular Calcium-release Channels: Identification and Expression Patterns of the Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate and the Ryanodine Receptor Genes [J]. *Development*, 1992, 116 (4): 967-75.
- [41] TAKESHIMA H, NISHIM, WABE N, et al Isolation and Characterization of a Gene for a Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel in *Drosophila melanogaster* [J]. *FEBS Lett*, 1994, 337(1): 81-87.
- [42] HUENTE E, SUNER M-M, EVANS A. et al Identification of a Polymorphic Ryanodine Receptor Gene from *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 30 (4): 335-347.
- [43] XU X, BHAT M B, NISHIM, et al Molecular Cloning of cDNA Encoding a *Drosophila* Ryanodine Receptor and Functional Studies of the Carboxy-terminal Calcium Release Channel [J]. *Biophys J*, 2000, 78 (3): 1270-1281.
- [44] CASPAR T, CORDOVA D, GUTTERIDGE S, et al Cloning and Characterization of Insect Ryanodine Receptors and their Use for Screening for Insecticidal Compounds WO2004027042 [P]. 2004-04-01.
- [45] LOCKYER P J, FUENTE E, WINDASS J et al Cloning and Expression of an Insect Ca^{2+} -ATPase from *H. virescens* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1369 (1): 14-18.
- [46] SCOTT-WARD T S, DUNBAR S J, WINDASS J D, et al Characterization of the Ryanodine Receptor- Ca^{2+} Release Channel from the Thoracic Tissues of the Lepidopteran Insect *Heliothis virescens* [J]. *J Membrane Biol*, 2001, 179 (2): 127-141.
- [47] LEHMBERG E, CASIDA J E Similarity of Insect and Mammalian Ryanodine Binding Sites [J]. *Pest Biochem Physiol*, 1994, 48 (2): 145-152.
- [48] WALZ B, BAUMANN O, ZMMERMANN B, et al Caffeine-resistant and Ryanodine-sensitive Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release from the Endoplasmic-reticulum in Honeybee Photoreceptors [J]. *J Gen Physiol*, 1995, 105 (4): 537-567.
- [49] ZHANG J J, WILLIAMS A J, SITSAPESAN R. Evidence for Novel Caffeine and Ca^{2+} Binding Sites on the Lobster Skeletal Ryanodine Receptor [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 126 (4): 1066-1074.
- [50] BERRISGEM J LIPP P, BOOTMAN M D. The Versatility and Universality of Calcium Signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(1): 11-21.
- [51] MELZER W, HERRMANN-FRANK A, LUTTGAU H C. The Role of Ca^{2+} Ions in Excitation-contraction Coupling of Skeletal Muscle Fibres [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1241 (1): 59-116.
- [52] ZHANG Yi-bin (张一宾). 鱼尼汀受体及其为靶标的杀虫剂的作用机理 [J]. *World Pesticides (世界农药)*, 2007, 29 (4): 1-6.
- [53] OU Xiao-Ming (欧晓明), TANG De-Xiu (唐德秀), LIN Xue-Mei (林雪梅). 新型邻甲酰胺基苯甲酰胺类农药氯虫酰胺的研究概述 [J]. *World Pesticides (世界农药)*, 2007, 29 (5): 6-10.
- [54] OHKAWA H, MIYAGAWA H, LEE P W. *Pesticide Chemistry* [M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007, 137-140.
- [55] OHKAWA H, MIYAGAWA H, LEE P W. *Pesticide Chemistry* [M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007, 121-125.
- [56] MASALI T, YASOKAWA N, TOHNISHI M, et al Flubendiamide, a Novel Ca^{2+} Channel Modulator Reveals Evidence for Functional Cooperation between Ca^{2+} Pumps and Ca^{2+} Release [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69 (5): 1733-1739.

(Ed JIN SH)