

苦皮藤素V对昆虫选择毒性机理的进一步研究^{*}

刘惠霞¹, 杨从军¹, 吴昊², 吴文君¹, 廉喜红¹

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨陵 712100; 2 青岛出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002)

[摘要] 研究了苦皮藤素V对粘虫(*Mythimna separata*)和小地老虎(*Agrotis ypsilon*)幼虫的选择毒性机理。结果表明, 对照组小地老虎幼虫血液、中肠和整体匀浆的酯酶活性显著高于粘虫幼虫。经苦皮藤素V注射或胃毒处理后, 粘虫幼虫酯酶活性均受到显著抑制而降低, 血液和中肠酯酶同工酶谱主带减弱; 而小地老虎幼虫血液酯酶活性显著升高, 血液酯酶同工酶谱主带加强。因此认为, 酯酶活性和酯酶同工酶的差异是苦皮藤素V对粘虫和小地老虎幼虫选择毒性的机制之一。

[关键词] 苦皮藤素V; 酯酶活性; 酯酶同工酶; 选择毒性

[中图分类号] Q 965.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)02-0083-04

苦皮藤素V是从杀虫植物苦皮藤(*Celastrus angulatus* Max.)根皮中分离的一种对昆虫具毒杀活性的新化合物。已有研究表明^[1-3], 苦皮藤素V主要作用于昆虫中肠肠壁细胞的质膜及内膜系统, 引起中肠穿孔, 试虫体液大量流失致死。采用胃毒处理, 在粘虫和小地老虎间有明显的选择毒杀作用, 即对粘虫有毒杀活性, 对小地老虎则没有活性, 而且推测中肠酯酶活性差异可能是选择机制之一, 但未经试验证实。本研究采用生化分析法, 进一步研究了苦皮藤素V对试虫酯酶活性及酯酶同工酶的影响, 以期进一步阐明其选择毒性的机理。

1 材料与方法

1.1 供试材料

昆虫 粘虫(*Mythimna separata*), 小地老虎(*Agrotis ypsilon*), 均为室内人工饲养。

药剂 苦皮藤素V由苦皮藤根皮中提取分离得到, 纯度95%以上, 使用时配成质量浓度为100 mg/L的丙酮溶液; 其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 试虫处理 挑选蜕皮后1 d的6龄粘虫和小地老虎幼虫, 饥饿12 h后随机分组, 采用载毒叶蝶(0.5 cm × 0.5 cm 小麦叶片)饲喂和体腔注射两种给药方式。饲喂每叶点涂药量与注射处理每虫注射药量相同, 均为1 μL 100 mg/L的苦皮藤素V丙

酮溶液, 对照处理均为1 μL 丙酮(分析纯)。

1.2.2 取样 试虫出现脱水症状时取血液、中肠及整体幼虫; 血液采于已加入少许苯基硫脲的小管中, 加适量缓冲液; 在冰冷缓冲液中解剖出中肠, 去围食膜及食物残渣。中肠及整体试虫加入定量缓冲液匀浆1 min(血样不匀浆), 然后以12 000 r/min离心15 min, 取上清液, 并稀释适当倍数后作为酶液。所有操作均在低温(4℃)下进行。

1.2.3 酯酶活性测定 蛋白质含量、酯酶活性的测定参照文献[4], [5]的方法。

1.2.4 酯酶同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 试虫处理与取样同1.2.1和1.2.2, 所采血淋巴加入4倍体积的质量分数20%蔗糖溶液, 中肠则加入适量的质量分数20%蔗糖溶液, 以12 000 r/min离心15 min, 取上清液存放于冰箱中备用。

PAGE分离胶浓度为10%, pH 8.9; 浓缩胶质量分数为3%, pH 6.7; 血样点样100 μL, 粘虫中肠酶液点样80 μL, 小地老虎中肠酶液点样20 μL。

染色参照黄生民等^[6]的方法。

2 结果与分析

2.1 苦皮藤素V对酯酶活性的影响

用苦皮藤素V处理试虫后, 试虫酯酶活性的变化见表1, 表2。

^{*} [收稿日期] 2001-05-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970505)

[作者简介] 刘惠霞(1945-), 女, 西安人, 教授, 主要从事昆虫生理生化教学和毒理学研究。

表 1 苦皮藤素 V 对粘虫酯酶活性的影响

Table 1 Effects of Celangulin V on esterase activity of *Mythimna separata* larvae

处理 Treatment	血液 Haemolymph			中肠 Midgut			整体 Integral body		
	比活力 Specific activity	抑制率/% Inhibition rate	差异显著性 Significance of difference	比活力 Specific activity	抑制率/% Inhibition rate	差异显著性 Significance of difference	比活力 Specific activity	抑制率/% Inhibition rate	差异显著性 Significance of difference
对照 Control	0.003 3 ± 0.000 4		a	74.90 ± 2.83		a	19.93 ± 1.23		a
胃毒 Oral administration	0.002 0 ± 0.000 2	41	b	69.43 ± 2.30	7.3	b	13.57 ± 1.03	31.9	b
注射 Injection	0.000 7 ± 0.000 1	78	c	59.83 ± 3.80	20.1	c	8.87 ± 0.63	55.5	c

注: 酶比活力以每毫克蛋白每分钟水解底物 α -萘酚乙酸酯的量表示, 单位为: $\mu\text{g}/(\text{mg} \cdot \text{min}^{-1})$, 下表同。

Note: The activity of esterase is expressed by the quantity of α -naphthylacetate esterase hydrolysed per minute per milligram protein. The following table is the same.

表 2 苦皮藤素 V 对小地老虎酯酶活性的影响

Table 2 Effects of Celangulin V on esterase activity of *A. ypsilon* larvae

处理 Treatment	血液 Haemolymph			中肠 Midgut			整体 Integral body		
	比活力 Specific activity	升高率/% Inhibition rate	差异显著性 Significance of difference	比活力 Specific activity	升高率/% Inhibition rate	差异显著性 Significance of difference	比活力 Specific activity	升高率/% Inhibition rate	差异显著性 Significance of difference
对照 Control	0.004 4 ± 0.001 0		a	164.90 ± 3.47		a	47.13 ± 2.93		a
胃毒 Oral administration	0.005 4 ± 0.000 5	23.3	b	173.37 ± 4.23	5.1	a	46.23 ± 2.70		a
注射 Injection	0.009 5 ± 0.000 8	53.3	c	166.43 ± 2.97		a	54.36 ± 2.40	15.1	b

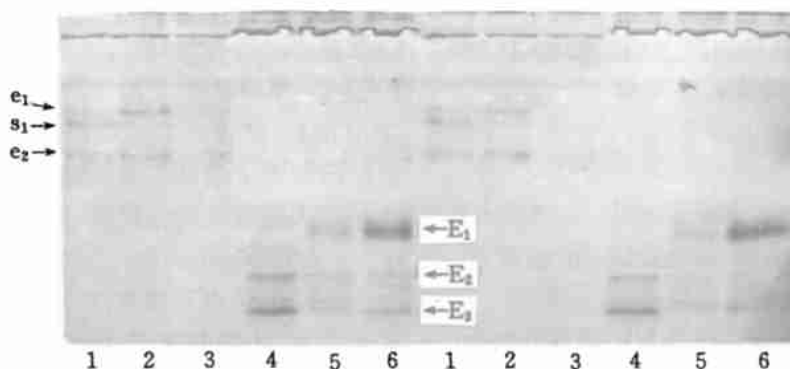


图 1 苦皮藤素 V 对幼虫血液酯酶同工酶的影响

粘虫: 1. 胃毒处理; 2. CK; 3. 注射处理; 小地老虎: 4. 胃毒处理; 5. CK; 6. 注射处理

Fig. 1 Effects of Celangulin V on esterase isozyme of haemolymph of tested larvae

Mythimna separata: 1. treated with Celangulin V by oral administration; 2. control; 3. treated with injection

Agrotis ypsilon: 4. treated with Celangulin V by oral administration; 5. control; 6. treated with injection

从表 1 可以看出, 用苦皮藤素 V 体腔注射和载毒叶蝶饲喂粘虫幼虫后, 其血液、中肠、整体匀浆的酯酶活性明显受到抑制。注射组粘虫血液酯酶活性抑制率最高, 达 78%。方差分析表明, 各处理与对照在 $F_{0.05}$ 水平上均有极显著差异。

由表 2 可以看出, 苦皮藤素 V 不论载毒叶蝶饲喂还是体腔注射处理小地老虎幼虫, 其血液酯酶活性均极显著高于对照, 注射组血液酯酶活性升高

53.3%; 中肠酯酶活性与对照无显著差异。整体匀浆酯酶活性, 注射组显著高于对照组, 胃毒组与对照无显著差异。

由表 1, 表 2 还可看出, 两种试虫幼虫对照组酯酶活性差异显著, 小地老虎幼虫酯酶活性明显高于粘虫幼虫。小地老虎幼虫血液酯酶活性为粘虫的 1.33 倍; 中肠酯酶活性为粘虫的 2.20 倍; 整体匀浆酯酶活性为粘虫的 2.36 倍。表明小地老虎幼虫在正

常生理状态下酯酶活性远高于粘虫。经苦皮藤素 V 处理后, 小地老虎幼虫酯酶活性升高, 而粘虫幼虫酯酶活性受到抑制, 两者酯酶活性差异更大。

2.2 苦皮藤素 V 对酯酶同工酶的影响

用苦皮藤素 V 处理试虫后, 酯酶同工酶谱的改变见图 1, 图 2, 图 3。

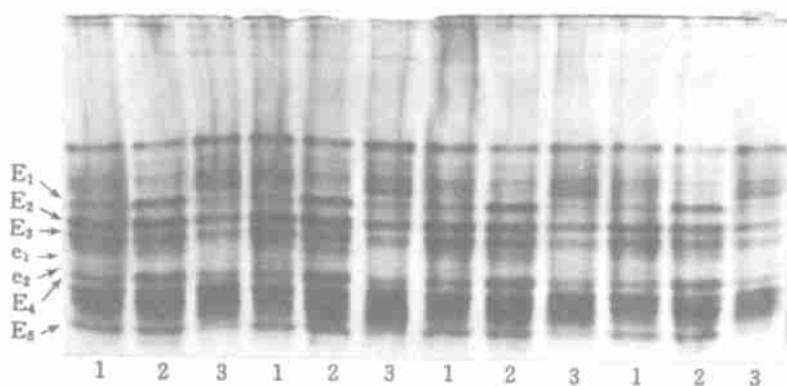


图 2 苦皮藤素 V 对粘虫幼虫中肠酯酶同工酶的影响

1 胃毒处理; 2 CK; 3 注射处理

Fig 2 Effects of Celangulin V on esterase isozyme of midgut of *Mygimna separata* larvae

1 Treated with Celangulin V by oral administration; 2 Control; 3 Treated with injection

从图 1 可以看出, 经饲毒和注射处理的粘虫幼虫, 血液酯酶同工酶谱两主带 e_1 , e_2 减弱, 注射处理较胃毒处理减弱更显著, 胃毒处理出现 1 条新带 S_1 ; 而两种处理的小地老虎幼虫血液酯酶同工酶谱主带加强, 但二者加强的酯酶带不同。注射处理组的 E_1 带特别加强; 饲毒处理组 E_1 带减弱, E_2 , E_3 带加强。

从图 2 可以看出, 粘虫幼虫中肠 5 条主要酯酶带 E_1 , E_2 , E_3 , E_4 , E_5 在两种处理之后减弱。注射组减弱更显著, 主带 E_1 , E_4 , E_5 几乎消失, 次带 e_1 消失; 胃毒处理组 E_1 , E_4 , E_5 减弱, E_2 , E_3 无变化, 产生 1 条弱的次带 e_2 。

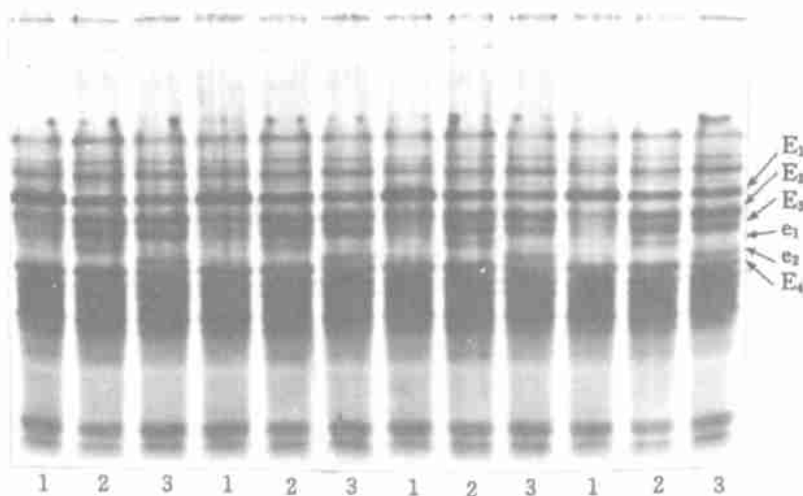


图 3 苦皮藤素 V 对小地老虎幼虫中肠酯酶同工酶的影响

1 胃毒处理; 2 CK; 3 注射处理

Fig 3 Effects of Celangulin V on esterase isozyme of midgut of *Agrotis ypsilon* larvae

1 Treated with Celangulin V by oral administration; 2 Control; 3 Treated with injection

从图 3 可以看出, 小地老虎中肠酯酶同工酶注射处理组变化不大, 3 条主带 E_1 , E_2 , E_3 基本无变化, E_4 略减弱, 产生 1 条新的更强于 e_1 的次带 e_2 ; 饲毒处理组, 主带 E_1 显著加强, E_2 , E_3 减弱, 次带 e_1 几

乎消失, 未出现新带。

3 讨论

已有的研究结果曾认为^[1,2], 苦皮藤素 V 对粘虫

和小地老虎胃毒选择作用机理可能表现在两方面,一方面是穿透作用的差异,即苦皮藤素 V 很易从粘虫消化道进入血淋巴,也易从血淋巴进入消化道,但是小地老虎幼虫体内,既不能从消化道到血淋巴,也不能从血淋巴到消化道;另一方面可能是中肠羧酸酯酶活性的差异。本研究结果说明,对照组小地老虎,血液、中肠及整体匀浆的酯酶活性都远高于粘虫幼虫;经苦皮藤素 V 注射或胃毒处理试虫后,粘虫幼虫体内酯酶活性被显著抑制,血液中酯酶同工酶谱的 2 条主带、中肠酯酶同工酶谱的 5 条主带都减弱,而小地老虎幼虫相应组织的酯酶活性却进一步增强,血液中酯酶同工酶主带显著加强。在这两种因子的共同作用下,对于苦皮藤素 V 这样的多元酯类化合物,在小地老虎幼虫体内就被迅速降解,使其到达

靶标的量很难达到有效剂量。而在粘虫幼虫体内则降解速度相对缓慢,从而造成了苦皮藤素 V 在供试的两种幼虫之间的选择毒杀作用。

苦皮藤素 V 与苏云金杆菌 δ 内毒素对试虫的作用症状极为相似^[2,3],因而推测苦皮藤素 V 可能有与 δ 内毒素相似的作用机理,即作用于试虫中肠肠壁细胞膜上的特异受体蛋白^[8~10]。本研究还发现,粘虫和小地老虎幼虫中肠肠壁细胞 BBM V 蛋白谱差异很大,但这是否就意味着苦皮藤素 V 在这两种试虫中肠的细胞膜的受体蛋白有很大差异,从而造成苦皮藤素 V 对两种试虫敏感性的差异(即选择毒性)呢?这种推测还有待苦皮藤素 V 作用的受体蛋白分离鉴定后才能证实。

[参考文献]

- [1] 刘惠霞, 吴文君, 姬志勤, 等. 苦皮藤毒杀成分对昆虫的选择毒性作用及其机制研究[J]. 西北农业学报, 1998, 7(2): 41- 44
- [2] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博, 等. 天然产物杀虫剂——原理·方法·实践[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998
- [3] 刘惠霞, 董育新, 吴文君. 苦皮藤素 V 对东方粘虫中肠细胞极其消化酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 1998, 41(3): 261- 264
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1984
- [5] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1998
- [6] 黄生民, 丁琳华, 潘淑英, 等. 蓖麻蚕不同组织酯酶同工酶的研究[J]. 动物学研究, 1985, 6(3): 287- 290
- [7] 张继红, 王琛柱, 钦俊德, 等. 苏云金芽孢杆菌 δ 内毒素的杀虫机理及其增效途径[J]. 昆虫学报, 1998, 41(3): 323- 332
- [8] Hofmann C, L üthy P, H üter R, et al. Specificity of *Bacillus thuringiensis* endotoxin is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 17844- 17848
- [9] Sarjeet S, Gill S S, Cowles E A A, et al. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins[J]. Annu Rev Entomol, 1992, 37: 615- 636
- [10] 农 广, 庞 义. 昆虫中肠 Bt 晶体蛋白受体的研究进展[J]. 昆虫学报, 1999, 42(3): 327- 332

Further studies on the mechanism of selective toxicity of celangulin V

L IU Hui-xia¹, YANG Cong-jun¹, W U Hao², W U Wen-jun¹, L IAN Xi-hong¹

(1 Agricultural Institute, College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Shaanxi, Yangling 712100, China;

2 Qingdao Check and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266002, China)

Abstract: This paper discussed the mechanism of selective toxicity of celangulin V against the larvae of *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon*. In normal groups, the esterase activity of haemolymph, midgut and integral body of *A. ypsilon* was significantly higher than that of *M. separata*. In *M. separata* larvae treated with celangulin V by body lumen injection or oral administration, the activity of esterase of haemolymph, midgut and integral body was inhibited remarkably. The main zymogram bands of esterase isozyme of haemolymph and midgut were weakened. However, in *A. ypsilon* larvae treated with same ways, the activity of esterase of haemolymph was increased notably, the main zymogram bands of esterase isozyme in haemolymph were strengthened. These results indicated the difference of the activity of esterase and the esterase isozyme might be one of the mechanism of selective toxicity of celangulin V against the larvae of *M. separata* and *A. ypsilon*. In addition, the distribution difference of midgut brush border membrane protein zymograms of *M. separata* and *A. ypsilon* showed indirectly another mechanism of selective toxicity of celangulin V.

Key words: celangulin V; esterase activity; esterase isozyme; mechanism of selective toxicity