

马桑毒素 B 对粘虫几种生理生化指标的影响*

李孟楼¹, 庄世宏¹, 宗 娜²

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2 中国科学院 动物研究所, 北京 100080)

[摘要] 为揭示马桑毒素的杀虫作用机理, 对每头 4 龄粘虫幼虫注射 0.5 μg 马桑毒素 B, 分析其对粘虫体内谷氨酸(Glu)和 γ-氨基丁酸(GABA)的含量及血淋巴含量、比重、酸度、电导率的影响。结果表明, 该毒素导致粘虫神经肌肉突触的传导物即兴奋性神经递质 Glu 下降 6%~12%, 抑制性神经递质 GABA 上升 14%~400%, GABA 的相对积累是导致试虫昏迷的直接原因, 其作用方式可能相似于苦皮藤 IV。马桑毒素 B 同时还导致粘虫血淋巴理化性质产生了变化, 干扰了其血淋巴环境中血糖的转化过程, 使血液中可溶性营养物质含量减少, 血淋巴中水分含量增加, 从而引起血淋巴比重下降 5.8%; 在电导质增加, 电导率升高 3.47% 的同时, 改变了血淋巴系统的 pH 值, 使 pH 升高了 0.45%。

[关键词] 马桑毒素 B; 生理生化指标; 粘虫

[中图分类号] S767.3+7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)06-0054-05

马桑内酯(Coriaria lactone=CL)即马桑毒素(Coriamyrtin=A)、羟基马桑毒素(Tutin=B)、马桑亭(Coriatin=C)和马桑宁(Corinanin=D)^[1-3]。前人研究^[4]表明, 马桑毒素与苦毒素的生理效应极其相似, 主要通过作用于试验动物的神经系统, 使其产生肌肉兴奋、呼吸亢奋、血管收缩、激活心动抑制中心, 产生抽搐、昏迷、惊厥、癫痫等反应, 是癫痫的化学点燃剂; 同时刺激呕吐中心引起恶心、呕吐、拒食, 增加内脏活动和腺体分泌。较早的研究认为, 该毒素是 γ-氨基丁酸(GABA)的拮抗剂, 而有的研究结论却与此相反^[5-7]。

含有马桑毒素的马桑干叶粉、干果粉及马桑子氯仿提取物, 对榆叶甲、榆三节叶蜂、白杨叶甲等 15 种害虫具有拒食、抑制生长、缩短成虫寿命、导致其产卵量下降等效应^[8]; 而马桑毒素 B 还能影响试虫的呼吸代谢, 影响中肠的消化酶及血液中的酯酶、过氧化物同工酶等的活性^[9-11]; 但目前已有的研究对马桑毒素的杀虫作用机理还未定论。鉴于此, 特研究了马桑毒素 B 对粘虫体内 GABA、谷氨酸(Glu)及血淋巴理化性质的影响, 以进一步揭示该毒素的作用机理。现将研究结果整理如下。

1 材料与方法

1.1 材料

试虫 粘虫(*Pseudaletia separata* Walker)购自西北农林科技大学无公害农药研究中心, 以玉米

幼叶饲养, 挑选蜕皮后第 2 天发育正常、个体大小一致的 4 龄幼虫供试。

试剂 马桑毒素 B 纯品由实验室提取于中国马桑籽中; 其他试剂均为分析纯。

仪器 PHS-2 型精密酸度计、DDS-11C 型电导仪、Backman 121MB 氨基酸分析仪。

1.2 方法

1.2.1 马桑毒素对试虫神经—肌肉递质影响的测定 每头 4 龄粘虫幼虫注射 0.5 μg 马桑毒素 B^[10], 对照试虫注射等量的蒸馏水。分别在处理后 2, 8, 24, 48 h 取试虫, 用蒸馏水洗净后用吸水纸吸干, 称重, 然后在体积分数为 80% 的乙醇中研磨, 研磨液用定量滤纸过滤, 60~80 °C 水浴锅上蒸干, 再用 pH 2.2 的柠檬酸缓冲液稀释, 用 Backman 121 型氨基酸分析仪分析 Glu 和 GABA 的含量。

1.2.2 马桑毒素对试虫血淋巴理化性质影响的测定 血淋巴含量测定: 采用排空法^[12, 13], 重复测定 6 组。血淋巴比重测定: 采用落滴法^[14, 12], 重复测定 6 组。血淋巴酸度测定: 用酸度计测定^[12], 重复测定 2 组。血淋巴电导率测定: 用电导仪测定^[12], 重复测定 2 组。

2 结果与分析

2.1 马桑毒素 B 对粘虫神经—肌肉递质 Glu, GABA 的影响 经马桑毒素 B 处理后, 试虫体内 Glu, GABA 及

* [收稿日期] 2003-05-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30170777); 西北农林科技大学科研基金

[作者简介] 李孟楼(1957-), 男, 陕西富平人, 教授, 主要从事昆虫毒理及森林害虫防治研究。

其他几种氨基酸含量的测定结果如表 1 及图 1、2 所示。由于处理后未再进行饲喂, 所测定的各氨基酸含量随时间的延续基本呈下降趋势。但对照组的 Glu

始终高于处理组, 处理组较对照组下降了 6%~12%。对照组的 GABA 则低于处理组, 且随处理时间的延续, 处理组较对照上升了 14%~400%。

表 1 马桑毒素 B 对粘虫体内 GLU、GABA 及其他几种氨基酸含量的影响

Table 1 Effect of Tutin on the content of Glu, GABA and other several amino acids in the larva of arymyom

氨基酸 Amino acid	mg/kg							
	2 h		8 h		24 h		48 h	
	处理 Treatment	对照 Control	处理 Treatment	对照 Control	处理 Treatment	对照 Control	处理 Treatment	对照 Control
谷氨酸 Glu	410.400	435.500	291.800	329.600	246.000	273.500	285.400	303.800
γ-氨基丁酸 GABA	82.700	84.000	64.300	56.400	7.200	5.200	3.000	0.600
天冬氨酸 Asp	283.400	282.200	281.300	315.000	190.000	184.700	158.300	192.700
丝氨酸 Ser	698.000	749.800	531.300	602.800	312.600	222.600	245.900	203.400
脯氨酸 Pro	905.800	756.600	964.300	619.800	190.800	269.800	201.300	371.800
苏氨酸 Thr					430.000	380.30	320.900	417.800
合计 Total	2380.300	2308.100	2133.000	1923.600	1376.600	1336.100	1214.800	1490.100

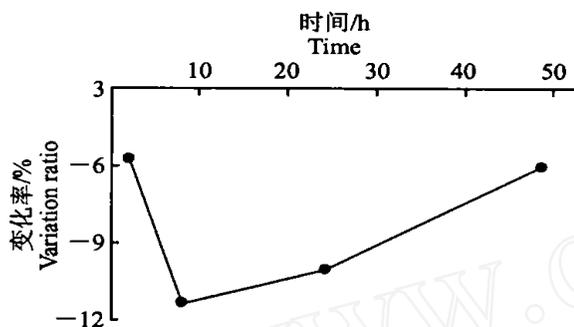


图 1 处理组 Glu 含量相对于对照的变化率

Fig. 1 The Glu content variation ratio of treatment against control

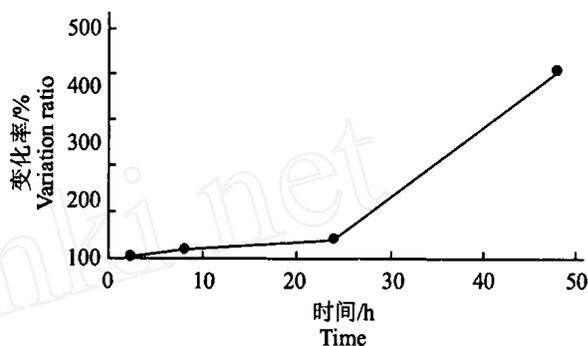


图 2 处理组 GABA 含量相对于对照的变化率

Fig. 2 The GABA content variation ratio of treatment against control

2.2 马桑毒素 B 对粘虫血淋巴理化性质的影响

2.2.1 马桑毒素 B 对粘虫血淋巴含量的影响 表 2 及图 3 表明, 随处理时间的延长, 处理组与对照组试虫的血淋巴含量具有相同的变化规律, 但处理组试虫血淋巴含量显著高于对照组, 平均增量达 11.61%。F 检验表明, 处理组与对照组血淋巴含量

差异显著。其原因可能是马桑毒素 B 进入虫体后, 影响了试虫血淋巴中有机离子、无机离子及水分代谢的平衡, 而试虫体内的生理代谢活动在主动调整上述平衡水平以维持正常渗透压的同时, 导致了血淋巴含量的增大。

表 2 马桑毒素 B 对粘虫血淋巴含量的影响

Table 2 Effect of Tutin on the hemolymph content in the larva of arymyom

组别 Group	g/g									
	2 h		8 h		12 h		24 h		48 h	
	处理 Treatment	对照 Control								
1	0.6400	0.4800	0.5100	0.4600	0.5600	0.3800	0.5600	0.5100	0.6000	0.4800
2	0.4600	0.4400	0.5100	0.3900	0.5300	0.4800	0.5300	0.5600	0.5000	0.4800
3	0.5600	0.5300	0.4800	0.5000	0.4600	0.5000	0.4600	0.4800	0.5600	0.4700
4	0.6300	0.5300	0.5300	0.5000	0.5400	0.5200	0.5400	0.5000	0.5200	0.4700
5	0.5200	0.4700	0.5300	0.3500	0.6400	0.5400	0.6400	0.5600	0.5300	0.3700
6	0.4800	0.4300	0.5000	0.4600	0.5500	0.5200	0.5500	0.5800	0.5400	0.5400
平均 Average	0.5483	0.4800	0.5100	0.4433	0.5467	0.4900	0.5467	0.5317	0.5417	0.4683

2.2.2 马桑毒素 B 对粘虫血淋巴比重的影响 处理组试虫的血淋巴比重平均比对照降低 5.8% (表 3 及图 4)。李孟楼等^[15]研究表明, 马桑毒素可导致试虫血液中的蛋白质总量、淀粉酶及酯酶含量降低

38%。因此, 引起血淋巴比重降低的原因可能与血液部分氨基酸(表 1)、酶等有机物含量的减少、水分的增多及无机离子相对含量减少等因素有关。

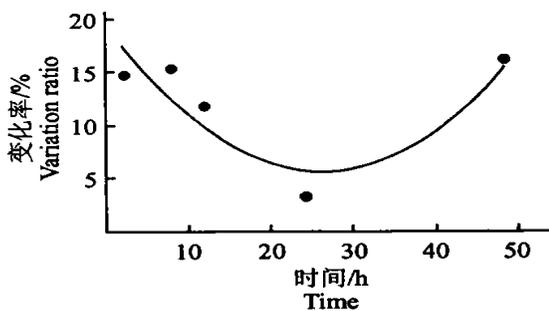


图 3 处理组血淋巴含量相对于对照的变化率

Fig 3 The hemolymph content variation ratio of treatment against control

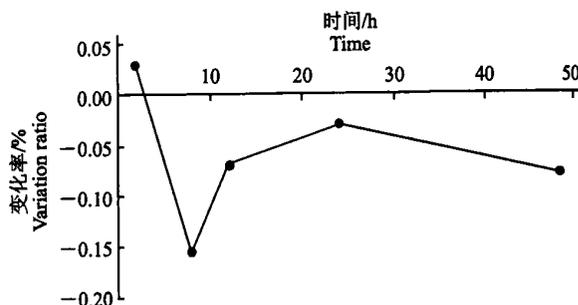


图 4 处理组血淋巴比重相对于对照的变化率

Fig 4 The variation ratio of hemolymph specific gravity of treatment against control

表 3 马桑毒素B 对粘虫血淋巴比重的影响

Table 3 Effect of Tutin on the specific gravity of hemolymph in the larvae of amywom g/L

组别 Group	2 h		8 h		12 h		24 h		48 h	
	处理 Treatment	对照 Control								
1	1.021 0	1.020 0	1.022 0	1.021 0	1.022 0	1.020 0	1.020 0	1.019 0	1.021 0	1.020 0
2	1.020 0	1.019 0	1.020 0	1.018 0	1.021 0	1.021 0	1.021 0	1.020 0	1.022 0	1.020 0
3	1.020 0	1.021 0	1.023 0	1.020 0	1.022 0	1.020 0	1.020 0	1.021 0	1.021 0	1.021 0
4	1.020 0	1.020 0	1.021 0	1.019 0	1.020 0	1.017 0	1.020 0	1.020 0	1.021 0	1.019 0
5	1.019 0	1.023 0	1.022 0	1.022 0	1.018 0	1.019 0	1.220 0	1.018 0	1.019 0	1.018 0
6	1.018 0	1.017 0	1.021 0	1.020 0	1.020 0	1.022 0	1.019 0	1.020 0	1.021 0	1.022 0
平均 Average	1.020 0	1.019 7	1.020 0	1.021 5	1.019 8	1.020 5	1.019 7	1.020 0	1.020 0	1.020 8

2.2.3 马桑毒素B 对粘虫血淋巴电导率的影响

试验结果表明, 处理组试虫血液的电导率均高于对照组, 平均增加 3.47%, 即马桑毒素B 进入试虫体

内后, 可能使其血淋巴中某些有机或无机离子等电解质含量相应增加了 3.47% (表 4, 图 5)。

表 4 马桑毒素B 对粘虫血淋巴电导率的影响

Table 4 Effect of Tutin on the conductivity ratio of the hemolymph in the larvae amywom

组别 Group	2 h		8 h		12 h		24 h		48 h	
	处理 Treatment	对照 Control								
1	0.580 0	0.540 0	0.582 0	0.548 0	0.564 0	0.548 0	0.552 0	0.549 0	0.600 0	0.579 0
2	0.560 0	0.539 0	0.570 0	0.546 0	0.558 0	0.552 0	0.560 0	0.551 0	0.569 0	0.552 0
平均 Average	0.570 0	0.539 5	0.576 0	0.547 0	0.561 0	0.550 0	0.556 0	0.550 0	0.584 5	0.565 5

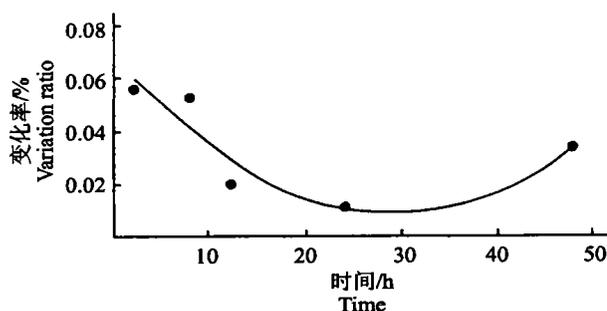


图 5 处理组血淋巴电导率相对于对照的变化率

Fig 5 The variation ratio of the hemolymph conductivity ratio of treatment against control

2.2.4 马桑毒素B 对粘虫血淋巴酸度的影响 饥饿状态下, 处理组与对照组试虫血淋巴酸度的变化

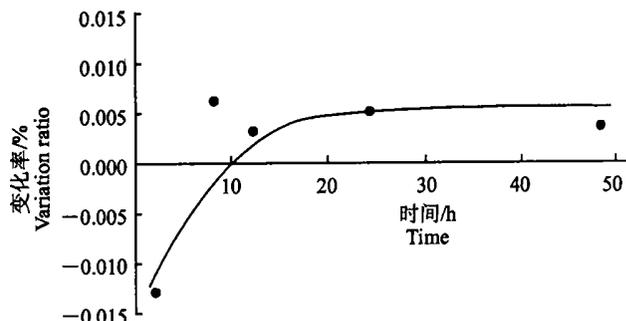


图 6 处理组血淋巴酸度相对于对照的变化率

Fig 6 The variation ratio of hemolymph acidity of treatment against control

趋势相同, 但 5 h 以后处理组均高于对照组, 平均高出 0.45% (表 5, 图 6)。其原因可能是: 马桑毒素导

致试虫血淋巴中碱性氨基酸, 如 Ser, GABA 含量上升; 碱性马桑毒素进入血淋巴; 马桑毒素致毒后, 使试虫的呼吸前期促进, 后期抑制, 因此试虫在

前期呼吸亢进时产生的二氧化碳和乳酸能迅速排除, pH 值增大, 后期呼吸受抑时 pH 降低^[12]。

表5 马桑毒素B对粘虫血淋巴酸度的影响

Table 5 Effect of Tutin on the acidity of hemolymph in the larvae of *amylwom*

组别 Group	2 h		8 h		12 h		24 h		48 h	
	处理 Treatment	对照 Control								
1	8 245 0	8 340 0	8 180 0	8 080 0	8 000 0	8 070 0	8 172 0	8 180 0	8 360 0	8 340 0
2	8 200 0	8 320 0	8 120 0	8 120 0	8 110 0	8 090 0	8 250 0	8 160 0	8 340 0	8 300 0
平均 Average	8 222 5	8 330 0	8 150 0	8 100 0	8 105 0	8 080 0	8 211 0	8 170 0	8 350 0	8 320 0

3 讨论

Glu 和 GABA 分别是神经-肌肉接触点兴奋性和抑制性神经递质。在虫体内, Glu 经脱羧酶的作用可生成 GABA, 而 GABA 的积累可导致神经-神经及神经-肌肉接头突触的后膜产生抑制性突触后电位, 使试虫的神经传导受阻而出现昏迷的中毒症状。在 GABA 受体 GABA_A 及 GABA_B 当中, 为氯离子通道复合体的 GABA_A 与突触传递有关, 该受体是许多杂环化合物杀虫剂的靶标部位^[16-21]。谷氨酸受体 GluR 与 Glu 作用后, 引起神经与肌肉接点的兴奋性突触电位, 其外源性激活剂有使君子酸、红藻氨酸、软骨藻酸等^[22]。抑制或激活谷氨酸脱羧酶活性, 就会降低或增高 GABA 的含量, 从而引起相应神经传导效应; 苦皮藤 IV 能使试虫麻痹, 导致 GABA 含量增加, 原因就在于谷氨酸脱羧酶活性的升高^[4]。

试虫取食致死中量下剂量的马桑毒素B后, 表现出“兴奋-吐出中肠液-昏迷-复苏”的中毒症状, 若取食马桑毒素B的剂量为致死中量上剂量时, 则表现为“兴奋-吐出中肠液-瘫软-昏迷-死亡”的中毒症状^[9,10]。研究表明, 处理组试虫 Glu 较对照组下降了 6%~12%, GABA 上升 14%~400%。显然马桑毒素B干扰了试虫体内 GABA 的代谢方式, 引起 GABA 的相对积累, 是导致试虫昏迷的直接原因, 其作用方式可能相似于苦皮藤 IV。由于马桑毒素B引起试虫中毒后, 先表现兴奋, 再出现昏迷现象, 其是否如 GABA_A 的抑制剂那样, 直接影响 GABA 介导的抑制性突触活动, 占据 GABA

的受体, 使 GABA 在虫体内含量增加, 通过反馈作用导致 Glu 减少; 或是增强了 Glu 脱羧酶的活性, 对 Glu 的转化产生了作用; 或是抑制 GABA 的传递, 或象软骨藻酸那样改变了神经-肌肉突触的膜对 Ca⁺ 的通透性^[22]; 或是象齐敦螨素类那样刺激 GABA 的释放^[23], 其机制有待进一步研究。需要指出的是, 徐小平等^[7]以大白鼠进行相同研究, 其结果和本研究相异(大白鼠脑内 GABA 含量变化不明显, 而谷氨酸 Glu 含量有明显升高), 原因是否为脊椎动物体内的 GABA 和 Glu 代谢方式与昆虫不同, 还是其他影响因素所致, 也有待研究证实。

昆虫的血淋巴是一个结构复杂、缓冲能力很强的生理代谢系统, 能中和 5 倍量 pH 3.4~3.6 的盐酸液, 只有能导致血淋巴代谢活动发生异常的生理活性物质, 可改变其理化性质; 一般认为, 昆虫血淋巴中营养物质含量的变化是引起其比重变化的主要因素, 电解质离子浓度决定其电导率的大小^[12]。本研究表明, 用马桑毒素B处理试虫后, 其血淋巴含量比对照增加 11.61%, 比重降低 5.8%, 电导率增加 3.47%, 处理 5 h 以后酸度高出 0.45%。因此, 马桑毒素B引起试虫血淋巴理化性质变化的原因, 可能是干扰了其血淋巴环境中血糖的转化过程, 使血液中可溶性营养物质含量减少, 血淋巴中水分含量增加而引起比重降低; 并在导致可解离性电导质增加的同时, 改变了血淋巴系统的 pH 值。由于马桑毒素能影响试虫的呼吸过程^[24], 所以这种影响是否由于三羧酸呼吸途径受到抑制, 使中间代谢物积累所致, 还需要进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] 陈新民, 李良琼, 吕太平, 等. 马桑籽有效成分的研究[J]. 中草药通讯, 1978, (10): 1-14
- [2] 四川医学院药理学系药物研究室, 中草药教研组, 中国医学科学院药物研究所合成室. 马桑寄生的化学研究(续) [J]. 中草药通讯, 1977(7): 11.
- [3] 四川医学院药理学系药物研究室, 中草药教研组, 中国医学科学院药物研究所合成室. 马桑寄生的化学研究[J]. 中草药通讯, 1977, (6): 6-13

- [4] 刘惠霞. 苦皮藤IV对粘虫体内谷氨酸脱羧酶活性的影响[J]. 西北农业学报, 1998, 7(5): 1- 3
- [5] 郭亮, 柴慧霞, 谢扬高, 等. 马桑内酯点燃大鼠海马脑片CA1的双脉冲抑制性观察[J]. 华西医科大学学报, 1992, 23(4): 399- 402
- [6] 郭亮, 柴慧霞, 谢扬高, 等. 马桑内酯在大鼠离体海马脑片上引起的癫痫样放电活动[J]. 华西医科大学学报, 1990, 21(1): 50
- [7] 徐小平, 郭平, 宋玉如. 马桑内酯对大鼠脑内 γ -氨基丁酸和谷氨酸含量的影响[J]. 华西医科大学学报, 1991, 22(2): 213- 215
- [8] 马希汉, 郭新荣, 李孟楼. 马桑毒素初提物对黑肩毛胸榆叶甲取食及生殖影响[J]. 西北林学院学报, 1995, 10(1): 64- 67
- [9] 李孟楼, 热孜万古丽, 郭新荣. 昆虫学研究进展[M]. 北京: 中国林业出版社, 1997. 105- 109
- [10] 李孟楼, 郭新荣. 马桑毒素杀虫机理研究进展[J]. 西北农业学报, 1998, 7(5): 30- 32
- [11] 李孟楼, 郭新荣, 庄世宏. 马桑毒素致毒后试虫酯酶同工酶变化的时序分析[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(4): 57- 61
- [12] 浙江农业大学. 蚕体解剖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1981. 67- 74
- [13] 张克斌, 谭六谦. 昆虫生理[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989. 72- 76
- [14] W itham F H, B laydes D F, Devlin R M. 植物生理学实验[M]. 中国科学院植物研究所生理生化研究室, 译. 北京: 科学出版社, 1974. 116 - 119
- [15] 李孟楼, 郭新荣, 唐光辉. 侧柏毒蛾幼虫酯酶对马桑毒素及4种杀虫剂的应激性反应[J]. 西北农业学报, 2000, 9(3): 23- 27
- [16] 刘惠霞, 李新岗, 吴文君. 昆虫生物化学[M]. 西安: 陕西科学出版社, 1998
- [17] 晓岚. 译. Fipromil对德国小蠊和家蚊的敏感种抗性品系的活性[J]. 农药译丛, 1998, 20(3): 5- 6
- [18] 张友军, 张文吉. 击倒抗性(KDR)的分子机理[J]. 昆虫知识, 1996, 33(1): 49- 52
- [19] 张友军, 张文吉, 韩熹菜. 杀虫剂分子靶标 γ -氨基丁酸A型受体(-)[J]. 昆虫知识, 1996, 33(4): 244- 247
- [20] A balis IM, Eldefraw iM E, Eldefraw iA T. A ffinity steres specific binding of cyclodiene insecticide and γ -hexachlohexane to γ -GABA receptors of rat brain[J]. Pestic Biochem Physiol, 1985, 24(2): 95- 102
- [21] Zhao G, Rose R L, Hodgson E, et al. Biochemical mechanisms and diagnostic microassays for pyrethroid, carbamate, and organophosphate insecticide resistance/cross-resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*[J]. Pestic Biochem Physiol, 1996, 56(3): 183- 195
- [22] Casida J E. Insecticide action at the GABA-gated chloride channel: recognition, progress, and prospects[J]. Insect Biochem Physiol, 1993, 22(1): 13- 23
- [23] 郑忱. 译. Avermectin研究的最新进展[J]. 农药译丛, 1991, 13(3): 19- 26
- [24] 李孟楼, 王倩, 唐光辉. 马桑毒素B对几种林木害虫呼吸代谢的影响[J]. 西北农业学报, 1998, 7(5): 48- 51

Effect of Tutin on several physiol-biochemical indexes of am yw om

L IM eng-lou¹, ZHUANG Shi-hong¹, ZONG Na²

(1 College of Forestry, Northwest Sci-Tech university of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: To reveal pest control mechanisms of Tutin, this study utilized the injection method and the treatment am yw om larva with 0.5 μ g Tutin injection per larva of 4 age. The content of Glu and GABA, content and specific gravity and pH value and conductance ratio of the hemolymph of am yw om larva *in vivo*, were analysed. The results indicated that the Tutin led to the content of excitable neurotransmitter Glu decreasing 6% ~ 12% and repressive neurotransmitter GABA increasing 14% ~ 400%. These two were the neurotransmitter of nerve-muscle synapse. GABA's relative accumulation was the direct reason leading to the coma of test-insect. Pest control mechanisms of Tutin and Celangulin IV can be similar. Simultaneously, the Tutin led to the changes of the physiol-biochem indexes of the hemolymph, disturbed the transformation process of the blood sugar. Content of soluble nutrition substance was decreasing, the water content of the hemolymph increased and the specific gravity decreased 5.8%. When the conductometric substance was increased and the conductance ratio raised 3.47%, pH value of the hemolymph was changed and raised by 0.45%.

Key words: Tutin; physiol-biochemical indexes; *Pseudaletia separate* Walker