

雷公藤总生物碱对摇蚊幼虫杀灭活性和谷胱甘肽硫转移酶的影响

李修伟^{1,2}, 张 兴¹, ZHU Kun-yan²

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心/陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100;

2 Department of Entomology, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA)

[摘要] 【目的】研究雷公藤总生物碱对摇蚊4龄幼虫的杀灭活性、谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性以及GST相关基因表达的影响。【方法】以摇蚊4龄幼虫为试虫,分别用5, 10, 15 $\mu\text{g/L}$ 雷公藤总生物碱进行处理,以用丙酮处理为对照,24~72 h后观察幼虫反应,测定雷公藤总生物碱对摇蚊幼虫的致死中浓度(LC_{50})及谷胱甘肽硫转移酶活性,并用RT-PCR方法,检测了摇蚊11个GST基因的表达情况。【结果】雷公藤总生物碱对摇蚊4龄幼虫具有杀灭活性,24, 48, 72 h的致死中浓度(LC_{50})分别为33.019, 19.092和16.760 $\mu\text{g/L}$ 。在亚致死质量浓度(5, 10, 15 $\mu\text{g/L}$)下,雷公藤总生物碱对摇蚊4龄幼虫谷胱甘肽硫转移酶活性具有显著的抑制作用,与同期对照相比,酶活性最大下降幅度分别为73.49%(以1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)为底物)和73.20%(以3,4-二氯硝基苯(DCNB)为底物)。RT-PCR检测结果显示,在摇蚊11个谷胱甘肽硫转移酶基因中,有2个基因(*CtGSTu3*和*CtGSTu4*)在mRNA水平上被诱导上调表达,且mRNA表达量随着雷公藤总生物碱质量浓度的增加而升高,存在着剂量依赖关系。【结论】雷公藤总生物碱对摇蚊幼虫具有较高的杀灭活性,有被开发为摇蚊控制剂的潜能。在亚致死质量浓度(5~15 $\mu\text{g/L}$)处理下,雷公藤总生物碱能显著抑制摇蚊谷胱甘肽硫转移酶活性,并诱导*CtGSTu3*和*CtGSTu4* mRNA上调表达。

[关键词] 雷公藤总生物碱;摇蚊;杀灭活性;谷胱甘肽硫转移酶;基因表达

[中图分类号] S482.3⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)04-0157-07

Effects of *Tripterygium wilfordii* total alkaloids on insecticidal activity, glutathione S-transferase of *Chironomus tentans*

LI Xiu-wei^{1,2}, ZHANG Xing¹, ZHU Kun-yan²

(1 Research and Development Center of Biorational Pesticide/Technology and Engineering Center of Biopesticide,

Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Department of Entomology,

Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA)

Abstract: 【Objective】This study was to evaluate insecticidal activity and effects of *Tripterygium wilfordii* total alkaloids on glutathione S-transferase (GST) activity and gene expression in the aquatic midge *Chironomus tentans*. 【Method】After treatment with *T. wilfordii* total alkaloids, the insecticidal activity in fourth-instar larvae of *C. tentans*, the GST activity and gene expression were determined. 【Result】The *T. wilfordii* total alkaloids showed significant insecticidal activity with the median lethal concentrations (LC_{50}) of 33.019, 19.092 and 16.760 $\mu\text{g/L}$ at 24, 48 and 72 h, respectively. The total alkaloids at highest

* [收稿日期] 2009-10-12

[基金项目] K-State Ecological Genomics Center and Kansas Agricultural Experiment Station, Kansas State University to Dr. Kun Yan Zhu; 陕西省“13115”重大科技专项(2007ZDKG-04)

[作者简介] 李修伟(1978—),男,山东鱼台人,在读博士,主要从事植物化学保护及农药分子毒理学研究。
E-mail: xiuwei001@yahoo.com.cn

[通信作者] 张 兴(1952—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事农药学与植物化学保护研究。
E-mail: zhxing1952@126.com

Zhu Kun-yan (1955—),男,浙江绍兴人,教授,博士生导师,主要从事昆虫分子毒理学和昆虫基因组学研究。
E-mail: kzhu@ksu.edu

sub-lethal concentration (15 $\mu\text{g/L}$) decreased the GST activities by 73.49% and 73.20% *in vivo* when CDNB and DCNB were used as substrates respectively. The results of gene expression study indicated that total alkaloids significantly increased the mRNA levels of two GST genes (*CtGSTu3* and *CtGSTu4*) in a concentration-dependent manner. 【Conclusion】 The *T. wilfordii* total alkaloids had significant insecticidal activity, and can be potentially used as a natural midge control agent. The total alkaloids at sub-lethal concentration can decrease the GST activities of the midge. However, the total alkaloids may regulate different GST genes, leading to significantly increased transcriptional levels of *CtGSTu3* and *CtGSTu4* in 11 GST genes examined in this study.

Key words: *Tripterygium wilfordii* total alkaloid; *Chironomus tentans*; insecticidal activity; glutathione S-transferase; gene expression

近年来,随着水体富营养化的加剧,水体中底栖生物种群发生了变化,摇蚊幼虫大量滋生繁殖,个体密度和生物量快速增加^[1-2]。这些滋生的摇蚊大量羽化聚集、群飞,对人畜造成滋扰。摇蚊种类繁多,其成虫和幼虫均具有较强的变应原活性,可致人出现哮喘、鼻炎、喷嚏、清水样鼻涕及鼻黏膜水肿等过敏性变态反应疾病^[3-6]。此外,摇蚊幼虫能够携带细菌、病毒、立克次体等病原体,给人类健康造成威胁^[7]。

目前,用于控制摇蚊的主要是双硫磷(Temephos)、马拉硫磷和拟除虫菊酯类农药^[8]。其中双硫磷是 WHO 推荐的杀灭蚊幼的首选药物,可用于防治孑孓、摇蚊,也可用于防治蛾和毛蠓科幼虫。但这些有机磷农药的大量使用,在防治摇蚊的同时造成了大面积的水域残留污染^[9],并经消化道、呼吸道和皮肤黏膜进入人体,引起神经系统以及其他细胞、组织发生病变,影响人类身体健康。因此,研发天然生物制剂代替有机农药防治摇蚊具有积极的意义。

雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook)为卫矛科雷公藤属植物,又名黄藤根、霹雳木等,它是传统的中草药,具有抗炎、抗肿瘤、调节免疫等功效,可用于关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫疾病及其他疾病的治疗^[10]。很早以前我国民间即用雷公藤防治农业害虫,其是著名的杀虫植物^[11-12]。近年来,西北农林科技大学无公害农药研究服务中心对雷公藤的杀虫作用进行了较为系统的研究,初步明确了该植物中的主要杀虫活性成分为生物碱和雷公藤甲素^[13-14]。为探讨雷公藤总生物碱杀灭摇蚊的活性,评价其在摇蚊防治中的应用价值和开发前景,本研究以摇蚊 4 龄幼虫为试材,在室内测定了雷公藤总生物碱对水生摇蚊的杀灭活性、谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性及 GST 相关基因表达的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 摇蚊(*Chironomus tentans*)由美国堪萨斯州立大学(Kansas State University)昆虫毒理实验室(Insect Toxicology Laboratory)提供。按照美国 EPA 方法饲养^[15],饲养条件为(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$;光周期 16 h/8 h(光/暗)。

1.1.2 仪器与试剂 (1)仪器。主要仪器有 Ultra-spec 3000 紫外可见分光光度计(Pharmacia Biotech, Ltd.)、MJ Research PTC-100 PCR 仪(MJ Research Inc.)、Kodark 电泳凝胶成像仪(Kodark Inc. USA)、组织匀浆机、冷冻离心机、电泳仪等。

(2)试剂。Trizol 试剂盒,Invitrogen 公司产品;DNase 试剂盒、cDNA 合成试剂盒、Master mix 试剂盒,均为 Fermentas 公司产品;谷胱甘肽还原型(GSH)、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、3,4-二氯硝基苯(DCNB)、氯仿、异丙醇、体积分数 75% 乙醇(用 RNase-free 水配制)、RNase-free 水等,均购自 Sigma 公司。所用缓冲液均按照文献^[16]的方法配制。

雷公藤总生物碱(HPLC 法测定纯度为 98%),由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.2 雷公藤总生物碱对摇蚊幼虫杀灭活性的测定

挑选个体大小一致、健康的摇蚊 4 龄初期幼虫,置于 1 000 mL 烧杯中,每烧杯 15 虫,并根据幼虫筑巢习性,每烧杯加入 10 g 消毒的细沙^[17]。试验设处理和对照 2 组处理,其中处理组中均添加 100 μL 分别含有 5, 10, 15 $\mu\text{g/L}$ 雷公藤总生物碱的丙酮溶液,对照组中仅添加 100 μL 丙酮。将试虫置于光照培养箱中饲养 72 h,培养箱温度(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,光周期 16 h/8 h(光/暗)。每处理重复 5 次,于处理 24, 48, 72 h 定时观察幼虫反应,并采用 Probit 方法^[18]计算回归方程、致死中浓度(LC₅₀)和 95% 置信限。

1.3 谷胱甘肽硫转移酶活性的测定

用含 5,10,15 $\mu\text{g/L}$ 雷公藤总生物碱的丙酮溶液处理 72 h 后,分别收集各处理下存活的摇蚊 4 龄幼虫,参照 Rakotondravelo 等^[19]的方法,取各质量浓度处理组试虫和对照组试虫放入预冷的玻璃匀浆器中,加入 pH 8.9、0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液,匀浆后 10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为待测酶液。取 0.1 mL 上清液,加入 pH 8.9、0.1 mol/L Tris-HCl 1.4 mL,分别加入底物 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)和 3,4-二氯硝基苯(DCNB)后,分别于 340,344 nm 波长下检测 1 min 内光密度的变化值,结合毫摩尔消光系数 9.6 L/(cm·mmol),计算 340,344 nm 波长下每毫克蛋白每分钟的光密度变化值,即得谷胱甘肽硫转移酶的活性。

1.4 GST 基因表达的 RT-PCR 测定

分别收集用雷公藤总生物碱亚致死浓度处理

72 h 后的摇蚊 4 龄幼虫,提取总 RNA,反转录合成 cDNA,进行 PCR 扩增,检测摇蚊 4 龄幼虫在雷公藤总生物碱处理下,其 GST 基因 mRNA 的表达情况。

1.4.1 总 RNA 提取 总 RNA 提取严格按照 Trizol 试剂盒说明书进行。用紫外分光光度计对总 RNA 进行定量检测,用 RNA 凝胶电泳检测其完整性,再经 DNase 试剂盒处理,消除 DNA 污染后,于-80℃保存备用。

1.4.2 cDNA 合成 严格按照 cDNA 合成试剂盒使用说明书进行总 RNA 反转录。合成的 cDNA 置于-20℃保存备用。

1.4.3 引物设计及 RT-PCR 摇蚊 GST 基因引物均采用 Beacon designer 软件(<http://www.premierbiosoft.com>)设计,退火温度(T_m)为 55℃左右,引物序列及其参数见表 1。

表 1 GST 基因的引物序列及相关参数

Table 1 Sequences and relevant parameters of GST primers used for RT-PCR					
序号 No.	基因 Gene	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	长度/bp Length	$T_m/^\circ\text{C}$
1	<i>CtGSTd1</i>	CtGSTd1F	TACCCACAATTATTCGCCAAAG	22	54.5
		CtGSTd1R	AGCATCATAGGAAGAGACAGTAG	23	54.6
2	<i>CtGSTd2</i>	CtGSTd2F	TAATGTTGAGGAACGACAAAAGAG	24	55.4
		CtGSTd2R	ACCATTTGAACGGCAGCAGAC	19	55.8
3	<i>CtGSTu1</i>	CtGSTu1F	CGAAACAAGAACTGAGCCATC	21	54.8
		CtGSTu1R	TTCACCTGCTACCCAAATACG	21	55.2
4	<i>CtGSTu2</i>	CtGSTu2F	ACAAAGGTGAACAAAATACTCCAG	24	55.5
		CtGSTu2R	CCCTTGCTTCCGTCAACAC	19	55.8
5	<i>CtGSTu3</i>	CtGSTu3F	AAATGCCGTCAATATACTCAATGG	24	55.6
		CtGSTu3R	CAGGAACTTTCATAGTTGGGTTG	23	55.3
6	<i>CtGSTu4</i>	CtGSTu4F	ATGGATGGAATCAATGGTTCAATG	24	55.7
		CtGSTu4R	AACATCAGCACCTTTCTTATTAGC	24	55.4
7	<i>CtGSTs1</i>	CtGST1F	TGCCTCTTGGACAAATGCC	19	55.0
		CtGST1R	AGGTAGCGACAGATTGGAATG	21	55.0
8	<i>CtGSTs2</i>	CtGST2F	GGAAACCTTGCCTTACTATTTGG	23	55.4
		CtGST2R	GTTTGGAATGCTGCGATGTAC	21	55.5
9	<i>CtGSTs3</i>	CtGST3F	TGGGCTGATGTGTACTTTACTG	22	55.5
		CtGST3R	ATTCTTGATTCCAGGTGTAGC	22	55.5
10	<i>CtGSTs4</i>	CtGST4F	GCTGTTC AATATGAGCCTGATG	22	55.0
		CtGST4R	TTACCCAATGCGAAGTGACC	20	55.2
11	<i>CtGSTo1</i>	CtGSTo1F	ATTCTGCCCCGATGCTCAAC	20	55.3
		CtGSTo1R	CCATGTCCAGGAATTTCTAAAGC	23	55.4
12	<i>CtRPS3</i>	CtRPS3F	CTTACTCGTGAAGTTGCTGAAG	22	54.9
		CtRPS3R	TGATAATTTCGGTACGGGATGG	22	55.5

注:*CtRPS3* 为内标参比基因。
Note:The ribosomal S3 (*CtRPS3*) gene is used as a reference gene.

PCR 反应体系为 20 μL :10 μL 2×Master mix, 10 mmol/L 正向和反向引物各 1 μL ,1 μL cDNA (合成的 cDNA 稀释 10 倍),7 μL ddH₂O。优化的 PCR 反应条件为:94℃变性 2 min;循环参数为 94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,循环 28

次。在 PCR 产物中加入 5 μL 溴酚蓝后进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶质量浓度 12 g/L,添加 EB 染色剂,电压 70 V,缓冲液为 TBE。电泳结束后,用 Kodark 电泳凝胶成像仪照相并进行观察比较。

1.5 试验数据处理方法

采用 ProStat 软件,对数据进行 ANOVA 分析、最小显著差异(LSD)检验。

2 结果与分析

2.1 雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫的杀灭活性

雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫的杀灭活性如

表 2 雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫的杀灭活性

Table 2 Toxic activity of *T. wilfordill* total alkaloid against the 4th instar larvae of *C. tentans*

处理时间/h Time for treatment	回归方程 Regression equation	LC ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	95% 置信限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 95% fiducial limits	相关系数 R	χ^2
24	$Y=0.825+2.749X$	33.019	19.004~57.367	0.999	0.38
48	$Y=-0.994+4.641X$	19.092	15.007~24.287	0.984	0.65
72	$Y=1.578+2.795X$	16.760	11.024~25.481	0.871	2.23

2.2 雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫谷胱甘肽硫转移酶活性的影响

由表 3 可以看出,与对照相比,在用亚致死质量浓度分别为 5,10,15 $\mu\text{g/L}$ 的雷公藤总生物碱处理 72 h 后摇蚊 4 龄幼虫的谷胱甘肽硫转移酶活性被显著抑制,其中以 CDNB 为底物时,谷胱甘肽硫转移酶活性分别下降了 57.88%,64.52%和 73.49%;以 DCNB 为底物时,谷胱甘肽硫转移酶活性分别下降了 57.23%,64.18%和 73.20%。表明雷公藤总生物碱在一定质量浓度下能显著降低谷胱甘肽硫转移酶的活性。

表 3 雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫谷胱甘肽硫转移酶活性的影响(72 h)

雷公藤总生物碱/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) <i>T. wilfordill</i> total alkaloids	谷胱甘肽硫转移酶活性 GST activity	
	1-氯-2, 4-二硝基苯 CDNB	3, 4-二氯硝基苯 DCNB
0 (CK)	557.14±4.18 a	55.11±4.00 a
5	234.68±37.07 b	23.57±2.02 b
10	197.65±39.29 c	19.74±3.80 b
15	147.68±5.10 c	14.77±0.51 bc

注:数据为 3 次重复的平均值±标准差。同列数据后标不同字母者表示经 LSD 检验差异显著($P<0.05$)。

Note:Data are presented as the (mean±standard) error ($n=3$). Means followed by the different letter within the same column are significantly different ($P<0.05$, Fisher's LSD multiple comparison test).

2.3 雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫 GST 基因表达的影响

由图 1 可以看出,在摇蚊 11 个 GST 基因中,*CtGSTu3* 和 *CtGSTu4* 2 个基因被诱导上调表达,且

表 2 所示。由表 2 可以看出,雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫具有较高的毒杀活性,24,48 和 72 h 的致死中浓度(LC₅₀)分别为 33.019,19.092 和 16.760 $\mu\text{g/L}$ 。观察发现,试虫接触雷公藤总生物碱后表现出的中毒症状为:活动减少,中肠发黑,表皮由红色变成白色透明,直至虫体僵硬死亡。

mRNA 表达量随着雷公藤总生物碱质量浓度的增加而升高,存在着明显的剂量依赖关系,说明雷公藤总生物碱可以诱导摇蚊幼虫至少 2 种 GST 基因特异性上调表达。

3 讨论

3.1 雷公藤总生物碱被开发为摇蚊控制剂的潜能

随着经济发展及生活水平的提高,人们对生活环境质量的要求越来越高。如何采用无公害化的方法控制摇蚊污染,越来越受到国内外的重视^[20-21]。本研究结果表明,雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫具有较高的杀灭活性,24,48 和 72 h 的 LC₅₀ 分别为 33.019,19.092 和 16.760 $\mu\text{g/L}$,优于有机氯农药林丹(林丹对摇蚊 2 龄末期幼虫 24,48 和 72 h 的 LC₅₀ 分别为 82.74,39.77 和 12.56 $\mu\text{g/L}$)^[22]。平新亮等^[23]的研究结果表明,雷公藤对白蚊伊蚊幼虫亦具杀灭活性。以上结果均表明,雷公藤具有被开发为摇蚊控制剂的潜能。

3.2 雷公藤总生物碱对谷胱甘肽硫转移酶活性的影响

谷胱甘肽硫转移酶主要通过代谢体内某些内源及外来有害物质,使其分解后排出血体外,从而达到解毒的目的^[24]。周琳等^[25]报道,雷公藤总生物碱对粘虫 5 龄幼虫谷胱甘肽硫转移酶活性具有明显的影响,在处理 12 和 24 h,该酶活性被明显激活,36 和 48 h 时,该酶比活力接近于同期对照,表现出了先激活、后抑制的趋势。陈列忠等^[26]研究发现,用低浓度(LC₁₀)雷公藤总生物碱处理小菜蛾后,其谷胱甘肽硫转移酶的活力在 1~2 龄期被显著诱导升高,为对照的 2.83 倍;而 2 龄以后酶活力则被显著抑制,分别仅为对照的 0.20 倍(3 龄)、0.39 倍(4 龄

初)和 0.27 倍(4 龄末)。本研究发现,雷公藤总生物碱对摇蚊体内的解毒酶系谷胱甘肽硫转移酶活性有着较为显著的影响,在亚致死质量浓度下,雷公藤

总生物碱显著抑制了摇蚊谷胱甘肽硫转移酶的活性。

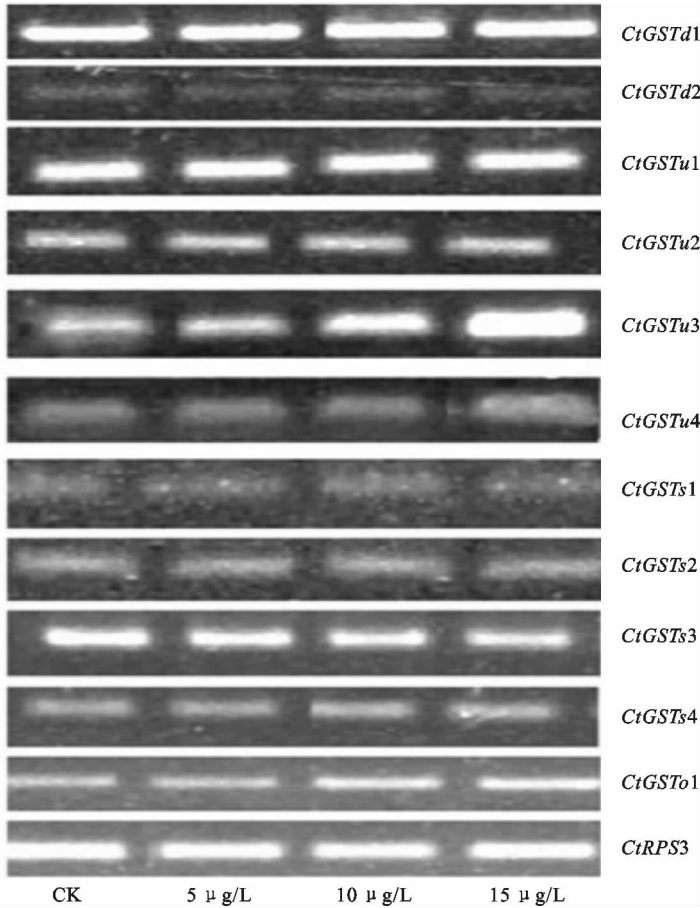


图 1 不同质量浓度雷公藤总生物碱处理后摇蚊 4 龄幼虫 GST 基因表达的半定量 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR analysis results of fourth-instar larvae of *C. tentans* GST after *T. wilfordill* total alkaloids treatment

3.3 GST 相关基因上调表达的反馈机制

本研究中,雷公藤总生物碱在抑制摇蚊谷胱甘肽硫转移酶活性的同时,也诱导 *CtGSTu3* 和 *CtGSTu4* mRNA 上调表达。这可能是雷公藤总生物碱影响了谷胱甘肽硫转移酶的合成或者抑制了其活性,而机体为维持正常的代谢,必须对摄入体内的雷公藤总生物碱及时进行降解,以消除其影响,避免因谷胱甘肽硫转移酶活性削弱而带来潜在的生理损害;也可能存在一种反馈机制,即当生物有机体谷胱甘肽硫转移酶活性受到抑制后,其在基因表达调控上作出了相应的反应,在 mRNA 水平上促进了某些能降解外源有害物质的特异性 GST 基因的上调表达,合成了更多的谷胱甘肽硫转移酶。本研究中半定量 RT-PCR 的结果在一定程度上印证了这种分析,说明雷公藤总生物碱可以诱导摇蚊幼虫至少 2 个特异性 GST 基因的上调表达。由此可知,某些家

族的谷胱甘肽硫转移酶,可能是摇蚊幼虫降解雷公藤总生物碱的主要影响因素。

3.4 *CtGSTu3* 和 *CtGSTu4* 在雷公藤总生物碱降解代谢中的作用

昆虫不同家族谷胱甘肽硫转移酶行使着不同功能,如 Delta 家族谷胱甘肽硫转移酶在功能上主要行使对农药的代谢功能^[27];Sigma 家族谷胱甘肽硫转移酶在脂质过氧化中起作用,特异性地催化带羰基基团的小分子化合物,延长不饱和基团^[28-29]。在当前昆虫谷胱甘肽硫转移酶超家族分类中,一般将与已知氨基酸序列同源性小于 40% 的归类为 un-classify,以 U 命名^[30],而其中谷胱甘肽硫转移酶的功能尚不明确。Li 等^[31]对摇蚊谷胱甘肽硫转移酶氨基酸序列进行比对后发现,*CtGSTu3* 和 *CtGSTu4* 的保守序列与其他家族相同,但在 GSH 结合域(G-site)和疏水底物结合位域(H-site)中,大部分活性

位点与其他家族谷胱甘肽硫转移酶氨基酸序列存在差异,这暗示以上 2 种谷胱甘肽硫转移酶与其他物种的成员存在着不同的底物特异性及催化功能的差异。本研究发现,雷公藤总生物碱抑制谷胱甘肽硫转移酶活性后,诱导 *CtGSTu3* 和 *CtGSTu4* 在 mRNA 水平上特异性上调表达,而摇蚊通过上调表达某些可以特异性地阻断代谢雷公藤总生物碱的谷胱甘肽硫转移酶来解除抑制,表明 *CtGSTu3* 和 *CtGSTu4* 2 种 GST 基因,在雷公藤总生物碱降解代谢中可能起着重要作用,但其作用机理和催化机制尚需进一步研究和探讨。

4 结 论

雷公藤总生物碱对摇蚊幼虫具有较高的杀灭活性,存在被开发为摇蚊控制剂的潜能。在亚致死质量浓度下,雷公藤总生物碱可显著抑制摇蚊谷胱甘肽硫转移酶的活性,诱导 *CtGSTu3* 和 *CtGSTu4* mRNA 上调表达。雷公藤总生物碱对摇蚊 4 龄幼虫谷胱甘肽硫转移酶活性的抑制与相关基因的上调表达间可能存在着某种反馈机制。*CtGSTu3* 和 *CtGSTu4* 在雷公藤总生物碱的降解代谢中可能起着重要作用。

[参考文献]

[1] 况琪军,夏宜峥,庄德辉,等. 安徽太平湖水库饵料生物资源及其变化研究 [J]. 长江流域资源与环境,1996,5(4):316-320.
Kuang Q J, Xia Y Z, Zhuang D H, et al. Study on the natural resources and changes in the standing crop of fishfood organisms in taipinghu reservoir, Anhui province [J]. Resources and Environment in the Yangtze Basin, 1996, 5(4): 316-320. (in Chinese)

[2] 熊金林,梅兴国,胡传林. 不同污染程度湖泊底栖动物群落结构及多样性比较 [J]. 湖泊科学,2003,15(2):161-168.
Xiong J L, Mei X G, Hu C L. Comparative study on the community structure and biodiversity of zoobenthos in lakes of different pollution states [J]. Journal of Lake Science, 2003, 15(2): 161-168. (in Chinese)

[3] Mchugh S, Credland P F, Tee R, et al. Evidence of allergic hypersensitivity to chironomid midges in an English village community [J]. Clinical & Experimental Allergy, 1988, 18(3): 275-285.

[4] Wirtz R A. Allergic and toxic reactions to non-stinging arthropods [J]. Annual Review of Entomology, 1984, 29(1): 47-69.

[5] Peter S C. Allergens of non-biting midges (Diptera: Chironomidae): a systematic survey of chironomid haemoglobins [J]. Medical and Veterinary Entomology, 1988, 2(2): 117-127.

[6] 周 承,温廷桓. 太湖德永摇蚊过敏的调查 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报,1994,1(2):42-47.

Zhou C, Wen T H. Survey on hypersensitivity of *tokunagay-usurika taihuensis*, (Dipteka: Chironomidae) [J]. Acta Parasitologica Et Medica Entomologica Sinica, 1994, 1(2): 42-47. (in Chinese)

[7] 张瑞雷,王新华,周 令,等. 城市供水系统摇蚊污染发生与防治研究 [J]. 昆虫知识,2004,41(3):10-25.
Zhang R L, Wang X H, Zhou L, et al. Advances in the studies on infesting and controlling chironomids in municipal water system [J]. Entomological Knowledge, 2004, 41(3): 10-25. (in Chinese)

[8] 姜志宽,王以燕. 我国的卫生杀虫剂发展概况 [J]. 中华卫生杀虫药械,2006,12(6):413-418.
Jiang Z K, Wang Y Y. Development of hygienic insecticides in China [J]. Chinese Journal of Hygienic Insecticides & Equipments, 2006, 12(6): 413-418. (in Chinese)

[9] Lores E, Moore J, Moody P, et al. Temephos residues in stagnant ponds after mosquito larvicide applications by helicopter [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1985, 35(1): 308-313.

[10] Duan H, Takaishi Y, Momota H. Immunosuppressive sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium wilfordii* [J]. Journal of Natural Product, 2001, 64: 582-587.

[11] 王翠娣,郭玉璞. 雷公藤的有效成分、药理作用及临床作用 [J]. 中国中西医结合杂志,1993,13(8):507.
Wang C D, Guo Y P. The active constituents of *Tripterygium wilfordii* and their pharmacological actions and clinical application [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 1993, 13(8): 507. (in Chinese)

[12] 曹 敏,孙荣奇,吴达俊. 中药雷公藤的研究进展 [J]. 中成药,1996,18(4):40.
Cao M, Sun R Q, Wu D J. Progress in studies on *Tripterygium wilfordii* [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 1996, 18(4): 40. (in Chinese)

[13] 罗都强,冯俊涛,胡 瓚,等. 雷公藤总生物碱分离及杀虫活性研究 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(2):61-64.
Luo D Q, Feng J T, Hu Z, et al. Isolation and bioactivities of the alkaloids from *Tripterygium wilfordii* against *Pieris rapae* L [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2001, 29(2): 61-64. (in Chinese)

[14] 周 琳,冯俊涛,张锦恬,等. 雷公藤总生物碱对几种昆虫的生物活性研究 [J]. 植物保护,2007,33(6):60-64.
Zhou L, Feng J T, Zhang J T, et al. Bioactivity of the total alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook against several important pests [J]. Plant Protection, 2007, 33(6): 60-64. (in Chinese)

[15] US EPA. Standard operating procedures for laboratory cultures of *Chironomus tentans* [R]. ERL-D-Sop CTI-015, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, 1993.

[16] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory

- Press, 2001.
- [17] Jin-Clark Y, Anderson T, Zhu K. Effect of alachlor and metolachlor on toxicity of chlorpyrifos and major detoxification enzymes in the aquatic midge, *chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 54(4): 645-652.
- [18] Finney D. Probit analysis; a statistical treatment of the sigmoid response curve [M]. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1971: 333.
- [19] Rakotondravelo M, Anderson T D, Charlton R, et al. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 51(3): 360-366.
- [20] 孙兴滨, 崔福义, 张金松, 等. 水源水中摇蚊幼虫的孳生与生态控制 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2006, 7(8): 1-5.
Sun X B, Cui F Y, Zhang J S, et al. Excessive propagation and ecological control of *chironomus* larva in raw water [J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2006, 7(8): 1-5. (in Chinese)
- [21] 吴一鹭, 周思辰, 聂 静, 等. 几种甲萘醌化合物对摇蚊幼虫的杀生研究 [J]. 同济大学学报: 自然科学版, 2006, 34(12): 1668-1673.
Wu Y F, Zhou S C, Nie J, et al. Study on Inactivation of chironomid larvae by menadione compounds [J]. Journal of Tongji University: Natural Science Edition, 2006, 34(12): 1668-1673. (in Chinese)
- [22] Watts M M, Pascoe D. A comparative study of *chironomus riparius* meigen and *chironomus tentans* fabricius (Diptera: Chironomidae) in aquatic toxicity tests [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2000, 39(3): 299-306.
- [23] 平新亮, 李保同, 曾鑫年, 等. 56 种植物甲醇提取物对白蚊伊蚊的生物活性 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(1): 30-33.
Ping X L, Li B T, Zeng X N, et al. Bioactivity of the methanol extracts from 56 species of plants against *Aedes albopictus* [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2007, 29(1): 30-33. (in Chinese)
- [24] Hayes J, Strange R. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences [J]. Pharmacology, 2000, 61: 154-166.
- [25] 周 琳, 马志卿, 冯俊涛, 等. 雷公藤总生物碱对粘虫生长发育及几种代谢酶系的影响 [J]. 昆虫学报, 2008, 51(11): 1151-1156.
Zhou L, Ma Z Q, Feng J T, et al. Effects of total alkaloid from *Tripterygium wilfordii* Hook f. on the growth and development of *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) and its metabolic enzymes [J]. Acta Entomologica Sinica, 2008, 51(11): 1151-1156. (in Chinese)
- [26] 陈列忠, 王开金, 陈建明, 等. 雷公藤生物碱对小菜蛾幼虫生长及其解毒酶系的影响 [J]. 华东昆虫学报, 2005, 14(3): 238-242.
Chen L Z, Wang K J, Chen J M, et al. Effect of *Tripterygium wilfordii* alkaloids on diamondback moth (*plutella xylostella*) larval growth and detoxification enzyme activities [J]. Entomological Journal of East China, 2005, 14(3): 238-242. (in Chinese)
- [27] Lumjuan N, McCarroll L, Prapantadara L A, et al. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(8): 861-871.
- [28] Singh S P, Coronella J A, Benes H, et al. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products [J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268: 2912-2923.
- [29] Agianian B, Tucker P A, Schouten A, et al. Structure of a *Drosophila* sigma class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products [J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 326(1): 151-165.
- [30] Chelvanayagam G, Parker M, Board P. Fly fishing for GSTs: A unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases [J]. Chemico-Biological Interactions, 2001, 133: 256-260.
- [31] Li X, Zhang X, Zhang J, et al. Identification and characterization of eleven glutathione S-transferase genes from the aquatic midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 39(10): 745-754.