

砂地柏提取物对粘虫肠道组织的影响

付昌斌 张 兴

(西北农业大学无公害农药研究服务中心, 陕西杨凌 712100)

摘 要 对新发现的一种杀虫植物砂地柏 (*Sabina vulgaris* Ant.) 果实提取物影响粘虫 (*Mythimna separata* Walker) 幼虫肠道组织进行了研究。结果表明, 砂地柏提取物对粘虫肠道组织的膜结构及亚细胞结构均能造成一定的损伤和影响, 对马氏管结构亦有破坏作用, 这可能是导致粘虫中毒死亡的主要原因。

关键词 砂地柏, 植物性杀虫剂, 粘虫, 肠道组织

中图分类号 S482.39

砂地柏是一种具有开发前景的新杀虫植物, 发现从该种子和其他部位中所提取的多种成分具有较强的杀虫生物活性, 其作用方式包括拒食、胃毒毒杀和抑制生长发育等^[1-4]。前人对砂地柏中多种化学成分对哺乳动物的药理学研究, 包括药理活性、作用方式和作用机理均有较深入的探讨^[5-9], 但对于砂地柏的杀虫作用机理尚未见报道。本研究对中毒粘虫幼虫肠道组织的组织切片和亚细胞结构进行了观察, 旨在为探讨其杀虫作用机理提供初步的研究依据。

1 材料和方法

1.1 砂地柏提取物

先将砂地柏种子烘干 (60°C) 粉碎过 60 目筛, 然后利用水蒸汽蒸馏法提取 4~5 h, 提出其中的精油成分。将残渣晾干并称量后, 加入石油醚 (沸程 $60\sim 90^{\circ}\text{C}$) 于室温下浸提 12 h, 重复提取 3 次。合并 3 次提取液, 用旋转薄膜蒸发器浓缩该提取液至膏状, 收率为 7.22%。将膏状物同石英砂混匀于索氏提取器中用甲醇回流 4 h, 得甲醇回流液并浓缩至膏状, 收率为 26.53%。将两种提取液置于冰箱中备用。

1.2 试虫

粘虫为用黑光灯诱捕活成虫, 在养虫室条件 [$T = (25 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$; $RH = 70\% \sim 80\%$; $L/D: 12\text{ h}/12\text{ h}$] 下让其产卵, 用新鲜小麦叶或玉米叶饲养幼虫并连续繁殖。试验时挑取健康、整齐的五龄中期幼虫供试。

1.3 组织切片和透射电镜切片的制作及观察

挑取蜕皮后 1 d 的五龄粘虫幼虫饥饿 4 h, 随机分成两组, 一组用浸过 $15\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 砂地柏甲醇回流物丙酮液的小麦叶饲喂, 为处理组; 另一组用只浸丙酮的小麦叶饲喂, 为对照组。等试虫表现出明显中毒症状 (大量失水, 且后肠拉出体外) 时, 在冰浴中迅速解剖, 取其

收稿日期 1997-07-04

课题来源 国家自然科学基金资助项目

作者简介 付昌斌, 男, 1969 年生, 助理农艺师; 现在大连动植物检疫局工作, 116001

中肠和后肠备用。将上述各组织块投入 $40\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊二醛中低温下固定 24 h , 然后将固定好的组织块按电镜切片制作方法进行处理^[10]。切片后, 用 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚甲基兰 天青 II 染色制成玻片, 在光学显微镜下观察各组织病理变化。按透射电镜观察要求制作切片, 用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 用透射电镜 (HITACHI 100CX-II) 进行超微结构观察。

1.4 中肠组织的扫描电镜观察

先将中毒试虫和对照试虫的中肠投入 $40\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛中固定 $2\sim 4\text{ h}$, 取出后分别从其前端和后端剪断肠体, 再投入 $40\text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛中固定 24 h , 用 $0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7.3$) 的磷酸缓冲液漂洗 $2\sim 3$ 次, 再在乙醇液中逐级脱水, 脱水完后将样品放入醋酸异戊酯中 20 min , 经 CO_2 临界点干燥后喷金。在 HITACHI S-450 型扫描电镜下观察试虫中肠内外侧的病理变化情况。

2 观察结果

2.1 光学显微镜观察结果

光学显微镜观察结果表明, 中毒试虫中肠组织变化明显, 中肠细胞层已遭破坏。某些部位呈消融状, 从已被破坏的中肠细胞中释放出很多细胞内容物 (图 1, A-T R)。而正常的中肠组织细胞排列十分规则, 柱状细胞与杯状细胞相间排列, 并可在基部看到一些再生细胞 (图 1, A-CK)。同时还观察到处理试虫的后肠内膜与肠壁细胞发生了明显分离现象, 而正常的后肠肠壁内膜与肠壁细胞层紧贴在一起 (图 1, B)。另外还发现处理试虫的马氏管管壁组织很薄且管腔大, 而对照试虫的较厚且管腔小。

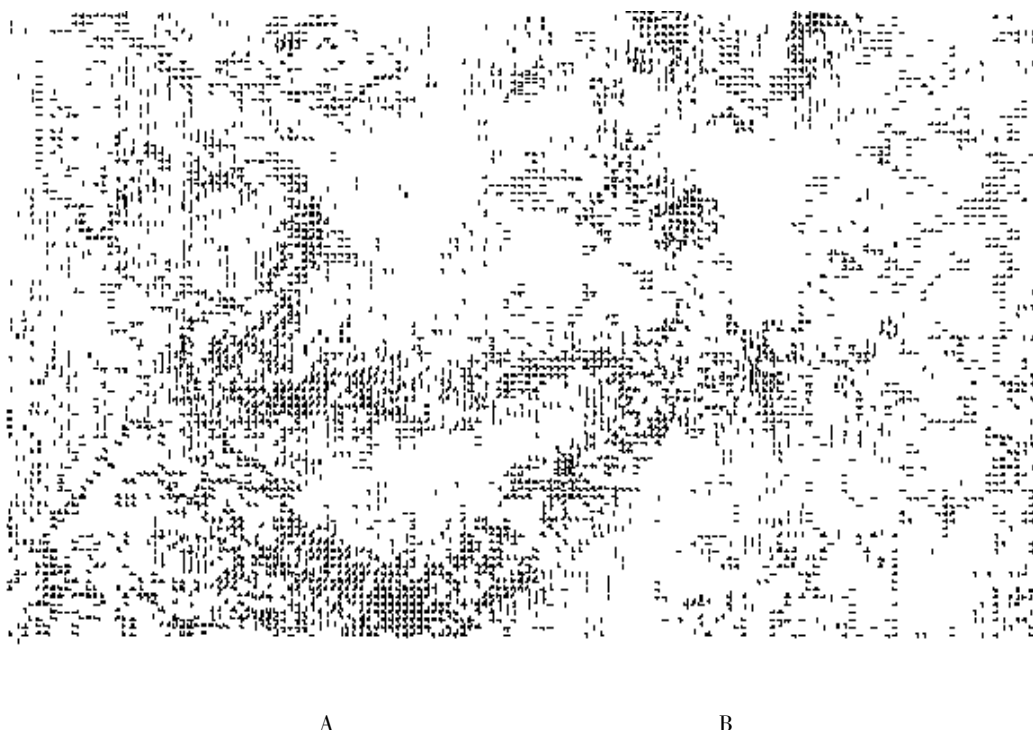


图 1 砂地柏提取物对棉铃虫肠道组织的影响 (光镜切片 $\times 100$)

A. 中肠; B. 后肠组织

2.2 扫描电镜观察结果

分别对处理组和对照组试虫中肠组织的内、外表面进行扫描电镜观察,结果表明,两组试虫中肠肠壁内侧显著不同,处理试虫肠壁内侧部分区域已看不见肠壁细胞层,仅能看到肠壁细胞层下的肌肉层;而对照组试虫中肠肠壁内侧布满浓密的微绒毛状结构,为中肠的肠壁细胞层。同时还发现处理试虫中肠肠壁纵肌部分区段的外层围膜已消失,只剩裸露的肌纤维(图 2, T R);而正常幼虫的中肠纵肌和环肌外都有一层围膜包被(图 2, CK)。

2.3 超微结构观察结果

超微结构观察结果表明,试虫的中肠和后肠在亚细胞水平上发生了显著变化,主要表现在以下几个方面:① 处理试虫中肠的杯状细胞发生显著的病变,其伸向杯腔的质膜突起所形成的微绒毛已大部分脱落,杯腔明显变大(图 3, A-T R) 而正常的杯状细胞杯腔内微绒毛较多,杯腔相对较小(图 3, A-CK);② 处理试虫中肠细胞内几乎找不到粗面内质网,但能观察到在细胞内出现大量的初级溶酶体和次级溶酶体 内质网正在被这些溶酶体逐渐消融,有的已被溶酶体完全消融掉,只剩一些游离的细胞质物质附于溶酶体外(图 3, B-T R) 这显著不同于正常的中肠细胞,其内质网呈线状排列于细胞核附近,附着很多核糖体(图 3, B-CK);③ 后肠细胞的结构也发生了一些变化,处理试虫的后肠细胞顶膜上的微绒毛已部分脱落,且微绒毛的排列较为零乱,而对照的后肠细胞顶膜微绒毛较多且排列有序(图 3, C)。

3 讨 论

砂地柏提取物对消化系统的破坏是导致昆虫死亡的主要原因。从砂地柏对哺乳动物的药理作用研究中可知其可能有两个重要毒理作用:① 能使哺乳动物的消化道粘膜发炎,进而导致消化道穿孔^[9];② 通过阻止细胞蛋白微管的形成而影响细胞有丝分裂,导致细胞坏死^[10]。本研究通过组织学观察可初步认为:砂地柏果实提取物主要作用于昆虫消化系统。当其随食物进入试虫中肠后,首先刺激中肠的蠕动并破坏围食膜的完整性或阻止围食膜的分泌形成,导致肠壁细胞直接受到食物的机械磨损,并受到砂地柏果实提取物的药理作用影响,使消化系统特别是中肠的各部位结构受到破坏,从而使其消化、吸收的功能丧失,致试虫最终死亡。

砂地柏提取物对试虫的组织病理学变化需进一步深入研究。本研究只是对粘虫取食砂地柏后 36 h 和 48 h 两个时间点的作用结果进行了初步的组织学观察,而对于砂地柏果实提取物对试虫的整个作用过程缺乏系统的观察和了解。例如砂地柏果实提取物在肠道中的穿透和扩散而作用于其他靶标组织,肠道组织遭破坏后砂地柏提取物能否进入血淋巴等还不甚了解。另外,后肠肠壁内膜与肠壁细胞发生了明显分离现象,长时间可能导致内膜断裂,从而影响后肠通透性。试虫马氏管的变化在毒理学中的意义有多大,是否为次级作用靶标等均尚待进一步探讨。对上述这些问题的研究将有助于较全面揭示砂地柏提取物的作用机理,为研制和开发新的植物性杀虫剂提供理论依据。

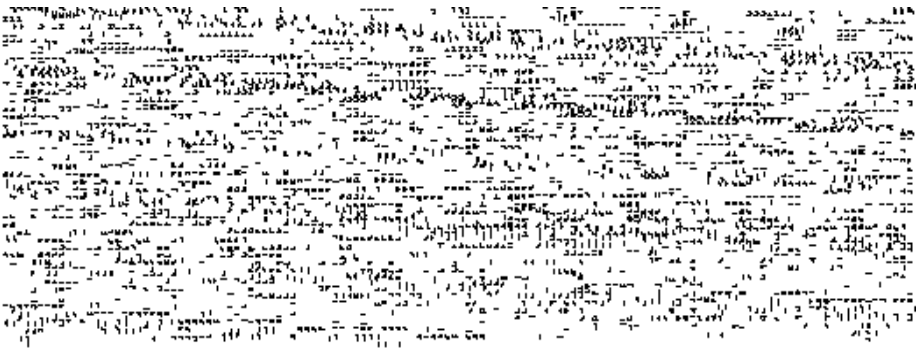


图 2 砂地柏提取物对棉铃虫肠壁纵肌的影响 (扫描电镜× 1000)

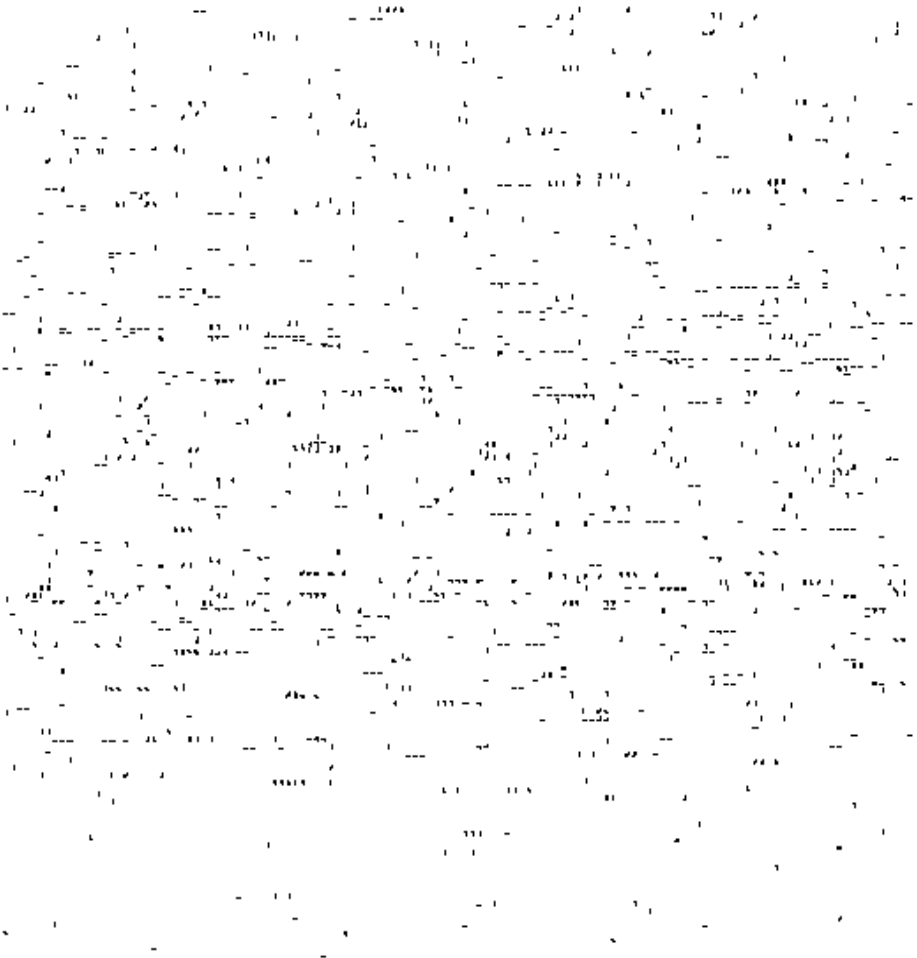


图 3 砂地柏提取物对棉铃虫肠道细胞的影响

A. 中肠环状细胞 (透射电镜× 10000); B. 中肠细胞内质网 (透射电镜 a 为 1.9 万倍, b 为 3.6 万倍);

C. 后肠细胞 (透射电镜 2.9 万倍)

参 考 文 献

- 1 张 兴,王兴林,胡兆农.抑制赤拟谷盗种群形成的植物样品筛选研究.粮食储藏, 1992, 21(3): 3~ 9
- 2 张 兴,王兴林,杨 凌.抑制玉米象种群的植物样品筛选研究.粮食储藏, 1993, 22(4): 3~ 8
- 3 王兴林,杨崇珍,崔婧芳等. 10种植物提取物对棉铃虫生长发育的影响.西北农业大学学报, 1996, 24(6): 99~ 101
- 4 张 兴,付昌斌,高聪芬等.新杀虫植物砂地柏研究进展.西北农业大学学报, 1995, 23(4): 51~ 57
- 5 Pascual T J, Feliciano A D, Miguel D C, et al. Componentes de los frutos de *juniperus oxycedrus* L. III. Anales de Química, 1974, 70 1015~ 1019
- 6 Rewer C, John D L, Susan B H. Conformational analysis of podophyllotoxin and its congeners, structure-activity relationship in microtubule assembly. Journal of Medicinal chemistry, 1979, 22(3): 215~ 221
- 7 Lee K H, Scott A B, Masamimi H B, et al. Antitumor agents III. New 4-hydroxylated and 4-halogenated anilino derivatives of human DNA Topoisomerase II. J Med Chem, 1990, 33: 1364~ 1368
- 8 San F A, Gordaliza M, Miguel L J, et al. Antineoplastic and antiviral activities of some cyclolignans. Planta Med, 1993, 59 246~ 249
- 9 江苏医学院编.中药大辞典(下册).上海:上海科学技术出版社, 1979
- 10 张景强,朴英杰,蔡 福等.生物电子显微技术.广州:中山大学出版社, 1987

Effects of Extract from *Sabina Vulgaris* on Gut-Tissue of *Mythimna separata* Walker.

Fu Changbin Zhang Xing

(Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwestern
Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract The pathological changes of the larvae of *Mythimna separata* were observed by means of light microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope. The results showed that the cell of midgut, hindgut and malpighian tubules were seriously destroyed by the extracts from the fruit of *Sabina vulgaris*. These effects probably were the main reasons for the death of treated larvae.

Key words *Mythimna separata* Walker, *Sabina vulgaris* Ant, botanical insecticide, gut tissue