

苦皮藤素IV对东方粘虫肌细胞超微结构的影响^{*}

廉喜红, 刘惠霞, 吴文君, 杨从军

(西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用电子显微镜技术, 研究了苦皮藤素IV对东方粘虫(*Mythimna separata* Walker)肌肉系统的影响。电镜观察发现, 苦皮藤素IV对东方粘虫成虫飞行肌和幼虫体壁肌均具有毒性; 中毒试虫肌细胞, 特别是质膜和内膜系统以及肌原纤维发生明显病变, 表现为肌膜破坏、脱落, 线粒体肿胀、崩解, 内质网扩张, 肌丝排列紊乱乃至消解; 麻痹期间细胞内产生晶状包含体。结果表明, 肌细胞可能是苦皮藤素IV的又一作用部位。

[关键词] 苦皮藤素IV; 东方粘虫; 肌细胞

[中图分类号] S481⁺. 1; S482 3⁺ 9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)03-0095-04

苦皮藤素IV是从杀虫植物苦皮藤(*Celastrus angulatus* Max.)根皮中分离的1种对昆虫具麻醉活性的二氢沉香呋喃类化合物^[1], 试虫摄食苦皮藤素IV后, 主要表现为虫体软瘫、麻痹, 对外界刺激无反应^[2]。电生理和生化研究^[3]表明, 苦皮藤素IV对中枢神经系统轴突传导无明显影响, 但显著影响神经-肌肉接点兴奋性接点电位(EJP); 苦皮藤素IV可激活谷氨酸脱羧酶(GAD), 使兴奋性神经递质谷氨酸(Glu)含量降低, 同时使抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(GABA)含量升高, 从而阻断神经-肌肉接点兴奋性传导, 导致试虫肌肉松弛、虫体瘫软。但肌肉组织作为神经系统的效应器, 也可能是苦皮藤素IV的又一作用部位, 但迄今未见有关苦皮藤素IV对肌细胞影响的研究报道。本文试图通过电子显微镜技术, 研究苦皮藤素IV对东方粘虫肌细胞的影响, 以期进一步探讨苦皮藤素IV的作用部位和导致试虫麻痹的深层机理。

1 材料与方法

1.1 材料

试虫 室内饲养的东方粘虫(*Mythimna separata*)幼虫与成虫。

药剂 苦皮藤素IV[1 β 2 β 6 α -三乙酰氧基-8 β 9 α -二(β -呋喃甲酰氧基)-12-异丁酰氧基-4 α -羟基- β -二沉香呋喃], 纯度为84%, 配成浓度为1%的丙酮溶液供试。

1.2 试验方法

1.2.1 试虫处理 挑选羽化后第4天的东方粘虫成虫, 在前胸背板肌肉注射1 μ L 100 mg/mL 苦皮藤素IV丙酮溶液, 对照注射1 μ L 的丙酮, 注射后12 h 取中胸背纵肌制备样品。

挑选蜕皮后第2天的6龄幼虫, 饥饿24 h, 随机分为胃毒处理组及对照组。处理组试虫饲喂载毒叶碟(在0.5 cm $\times$ 0.5 cm 小麦叶片上均匀点涂1 μ L 100 mg/mL (亚致死剂量)苦皮藤素IV丙酮溶液, 溶剂挥发后喂虫, 1虫1叶^[4]; 对照组试虫饲喂同样大小点涂1 μ L 丙酮的小麦叶片; 分别于试虫食毒1 h (麻痹初期)、24 h (深度麻痹期)、168 h (苏醒期)取幼虫腹部第2~6节间体壁肌制备样品。

1.2.2 电镜观察 成虫飞行肌取中胸背纵肌^[5], 幼虫取腹部第2~6节间体壁肌。4条件下用40 mL/L 戊二醛前固定, 10 g/L 锇酸后固定, 系列丙酮脱水, Epon 812包埋, 于35, 45, 60 $^{\circ}$ C各聚合1 d, LKBV型超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。JEM-2000EX透射电子显微镜观察样品并拍照, 加速电压为80 kV。

2 结果与分析

2.1 苦皮藤素IV对东方粘虫成虫飞行肌的作用

苦皮藤素IV作用于试虫后, 起初表现为翅轻微振颤, 继而腹部伸展, 试虫进入麻痹状态。电镜观察表明, 对照组试虫成虫飞行肌肌膜完好, 肌节、肌原

^{*} [收稿日期] 2004-04-12

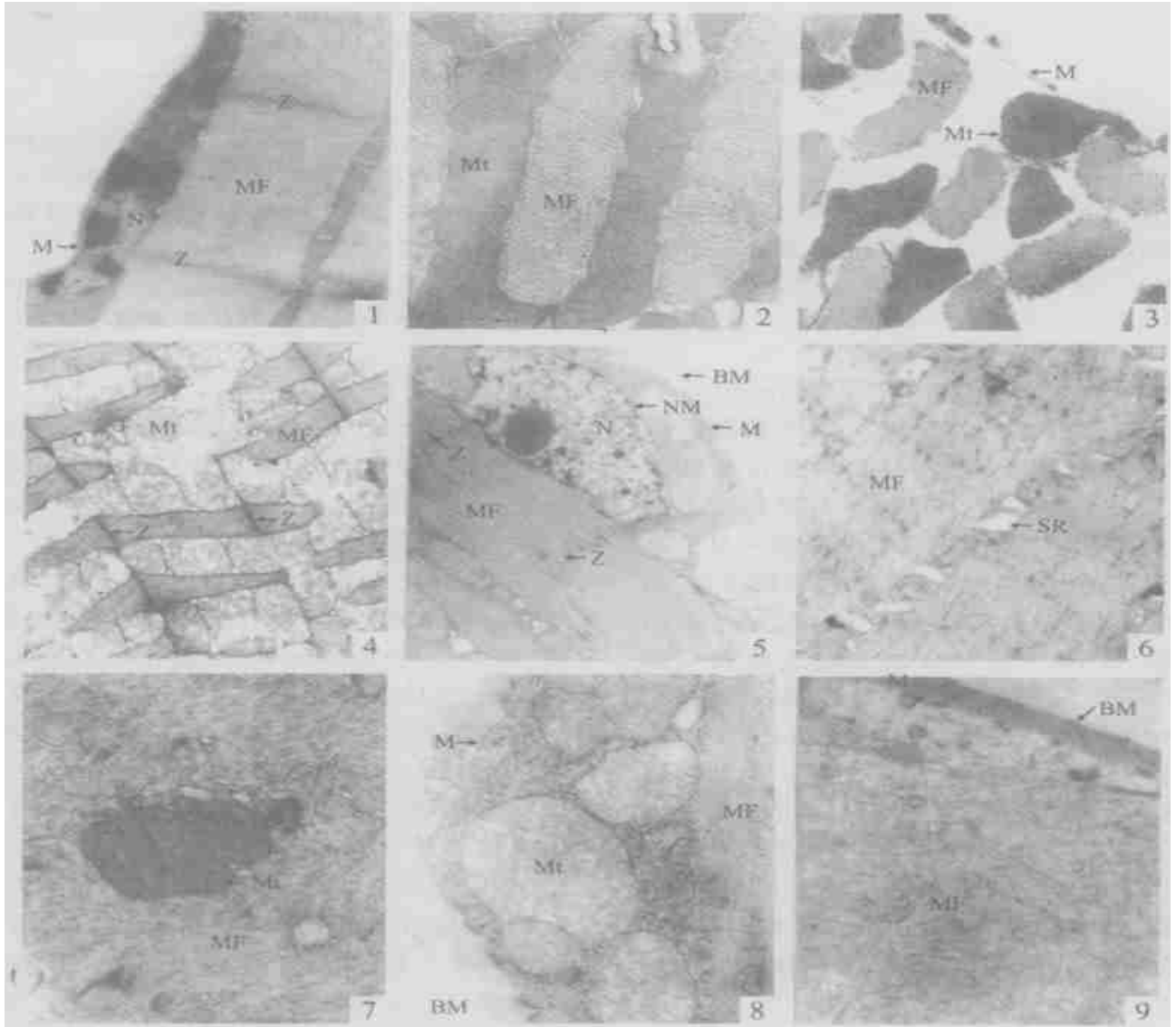
[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30130130)

[作者简介] 廉喜红(1971-), 男, 山西临猗人, 主要从事昆虫生理研究。

[通讯作者] 刘惠霞(1945-), 女, 陕西西安人, 教授, 主要从事昆虫生理生化及昆虫毒理学研究。E-mail: huixialiu@nwsuaf.edu.cn

纤维、线粒体排列规则整齐(图版 I-1); 线粒体结构完好, 嵴清晰, 并和肌原纤维紧密接触(图版 I-2)。苦皮藤素 IV 处理后, 粘虫成虫飞行肌肌膜局部损伤

脱落; 肌原纤维与线粒体之间间隙增大, 肌质网与线粒体分离(图版 I-3); 肌丝断裂, 排列紊乱, 部分肌纤丝消失; 线粒体肿胀、崩解, 嵴断裂(图版 I-4)。



图版 I 苦皮藤素 IV 对粘虫肌细胞超微结构的影响

M. 肌膜; MF. 肌原纤维; Mt. 线粒体; N. 细胞核; NM. 核膜; BM. 底膜; SR. 肌质网; Z. Z-线

- 1 对照组试虫的飞行肌的纵切面, 10 000 ×; 2 对照组试虫飞行肌的横切面, 10 000 ×; 3 处理组粘虫成虫飞行肌横切面, 肌膜溶解, 10 000 ×; 4 处理组成虫飞行肌纵切面, 肌丝断裂, 线粒体结构破坏, 10 000 ×; 5 对照组试虫幼虫体壁肌结构完好, 7 500 ×; 6 对照组试虫幼虫体壁肌质网结构完好, 7 500 ×; 7 对照组试虫体壁肌线粒体完好, 15 000 ×; 8 初度麻痹期肌膜断裂, 线粒体肿胀, 10 000 ×; 9 深度麻痹期肌膜溶解, 肌丝部分消失, 肌膜与肌原纤维间隙增大, 10 000 ×

Plate I Ultrastructural effect of Celangulin IV on the Myocyte of *Mythimra separata* (Walker)

M. Muscular membrane; MF. Myofibril; Mt. Mitochondria; N. Nucleus; NM. Nuclear membrane;

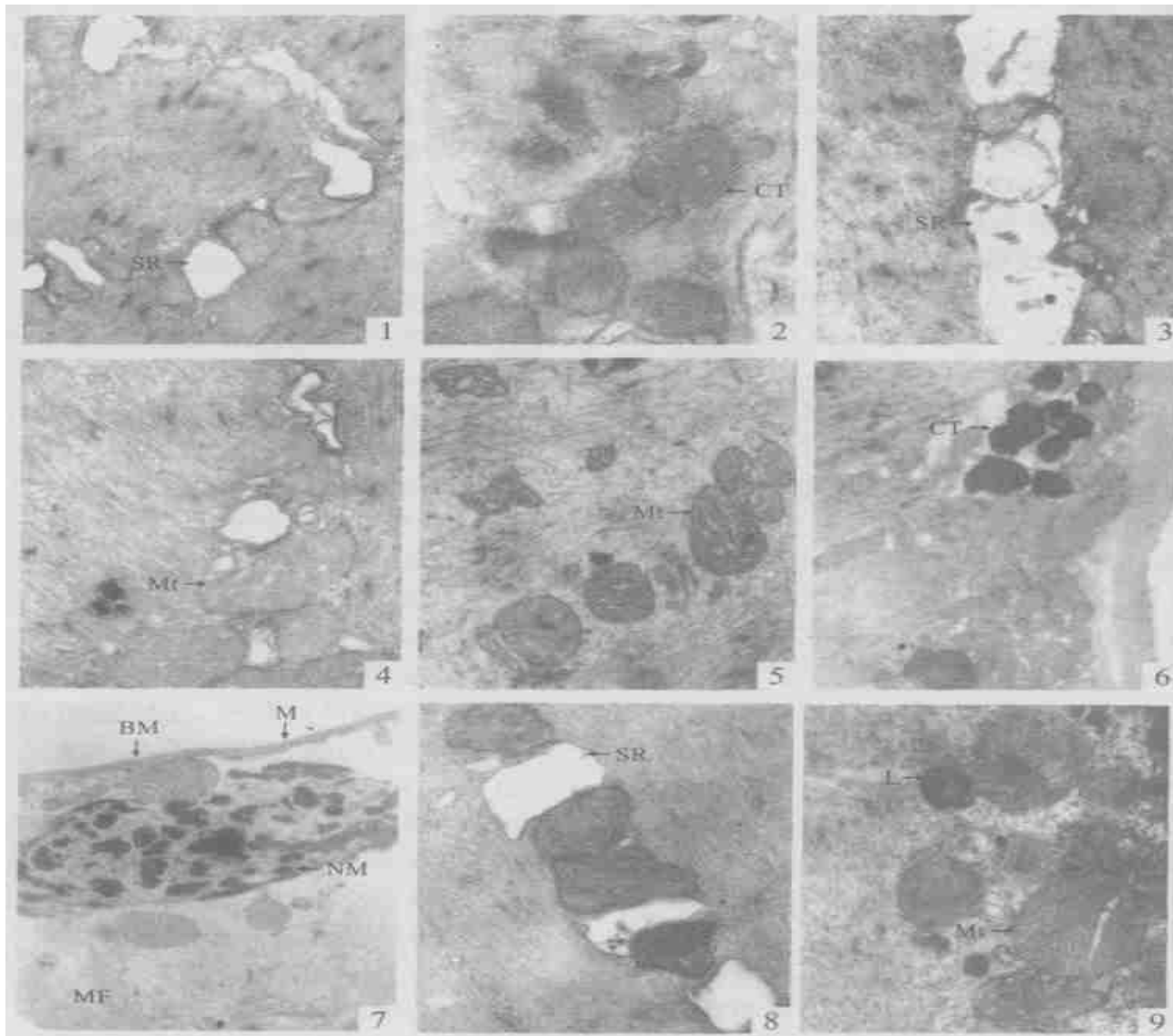
BM. Basilar membrane; SR. Sarcoplasmic reticulum; Z. Z-line

- 1 Longitudinal section of flight muscle of untreated adult, 10 000 ×; 2 Cross-section of flight muscle of untreated adult, 10 000 ×; 3 Muscular membrane dissolved of treated flight muscle, 10 000 ×; 4 Myofibril ruptured and the structure of mitochondria destroyed, 10 000 ×; 5 The structure of body wall muscle of untreated larva, 7 500 ×; 6 Undamaged sarcoplasmic reticulum of untreated larva, 7 500 ×; 7 Untreated mitochondria, 15 000 ×; 8 It shows the ruptured muscular membrane and the swollen mitochondria on the paralysis stage, 10 000 ×; 9 It shows the dissolved both membrane and myofibrils and the increasing space on the deeply paralysis stage, 10 000 ×

2.2 苦皮藤素IV对粘虫幼虫体壁肌的作用

试虫取食苦皮藤素IV后, 首先表现为虫体瘫软、麻痹, 食毒剂量小的试虫经过一定时间后可以苏醒。电镜观察结果表明, 对照组试虫体壁肌肌细胞结构

完好, 肌膜完整; 肌原纤维排列规则有序, Z-线致密清晰, 线粒体与肌原纤维相间排列(图版 I -5); 肌质网膜完整(图版 I -6); 线粒体内膜、外膜、嵴清晰可见(图版 I -7)。



图版 II 苦皮藤素IV对粘虫肌细胞超微结构的影响

CI 晶状包含体; L. 溶解体

- 1 初度麻痹期肌质网肿胀, 肌原纤维排列紊乱, 15 000 ×; 2 初度麻痹期出现晶状包含体, 30 000 ×; 3 深度麻痹期肌质网仍肿胀, 15 000 ×; 4 初度麻痹期线粒体肿胀, 15 000 ×; 5 深度麻痹期线粒体出现空腔, 15 000 ×; 6 深度麻痹期出现晶状包含体, 10 000 ×; 7 苏醒期肌原纤维消解, 肌膜断裂, 核膜破坏核质溢出, 10 000 ×; 8 苏醒期肌质网仍肿胀, 15 000 ×; 9 苏醒期线粒体嵴断裂, 出现溶解体, 15 000 ×

Plate II Ultrastructural effect of Celangulin IV on the Myocyte of *Mythimra separata* (Walker)

CI The cryinstalline inclusion; L. Lysosome

- 1 It shows the swollen SR and disordered myofibrils on the primary paralysis stage, 15 000 ×; 2 The cryinstalline inclusions appear on the primary paralysis stage, 30 000 ×; 3 The swollen SR on the deeply paralysis stage, 15 000 ×; 4 It shows the swollen mitochondria on the primary paralysis stage, 15 000 ×; 5 Vacuolation appears in the mitochondria on the deeply paralysis stage, 15 000 ×; 6 The cryinstalline inclusions appear on the deeply paralysis stage, 10 000 ×; 7 It shows the dissolved the muscular membrane and myofibrils with nuclear membrane was disrupted and nuclear was extravasted on the anabiosis stage, 10 000 ×; 8 The swollen SR on the anabiosis paralysis stage, 15 000 ×; 9 The Cristae of mitochondria was destroyed and lysosome appeared on the anabiosis paralysis stage, 15 000 ×

试虫麻痹初期至深度麻痹期,肌细胞呈进行性病变。麻痹初期,肌膜局部断裂(图版 I-8)Z-线点状弥散,肌丝排列不规则(图版 II-1),细胞内出现晶状包含体(图版 II-2);至深度麻痹期,肌膜脱落,肌丝弥散、排列紊乱,基膜与肌原纤维之间间隙增大,部分肌原纤维丝消失(图版 I-9);麻痹初期至深度麻痹期,肌质网呈进行性扩张(图版 II-1, 3),线粒体肿胀,出现空白亮区(图版 II-4, 5);至深度麻痹期,晶状包含体电子致密度加深(图版 II-6)。

苏醒后,肌细胞仍表现为肌膜断裂;细胞核膜破坏,核质溢出;肌丝部分崩解(图版 II-7);部分肌质网仍扩张(图版 II-8);线粒体结构破坏,嵴断裂;胞内出现初级溶酶体,晶状包含体消失(图版 II-9)。

上述结果表明,苦皮藤素 IV 可以直接作用于粘虫成虫的飞行肌和幼虫的体壁肌组织,明显破坏肌细胞的质膜和内膜系统(如线粒体膜、肌质网膜和核膜)以及肌肉收缩机械——肌原纤维。肌膜的断裂与脱落会引起兴奋传导阻断^[3], Ca^{2+} 是肌肉兴奋-收缩耦联的触发剂,肌质网是 Ca^{2+} 的释放及回收场所,其结构的破坏使其无法对肌肉收缩进行调节;线粒体结构的破坏,致使肌肉收缩所需的能量代谢受阻而不能正常收缩,虫体表现为麻痹症状。由此推测,肌细胞是苦皮藤素 IV 的又一作用部位。

3 讨 论

已有研究结果^[3]认为,苦皮藤素 IV 对中枢神经系统的兴奋性和传导性无明显影响,而主要作用于试虫神经-肌肉接点,激活谷氨酸脱羧酶(GAD),使兴奋性神经递质——谷氨酸含量降低,同时使抑制性神经递质—— γ -氨基丁酸(GABA)含量升高;电生理研究^[3]表明,苦皮藤素 IV 明显抑制兴奋性接点电位(EJP),致使兴奋性传导被阻断,试虫表现出

肌肉松弛、虫体瘫软等症状。本研究结果表明,苦皮藤素 IV 不仅作用于神经—肌肉接点,也作用于肌细胞的质膜和内膜系统以及肌原纤维,引起试虫肌细胞质膜和内膜系统(如线粒体膜、肌质网膜、核膜等)及肌原纤维不同程度的瓦解和破坏。质膜的断裂、损伤必然影响肌细胞动作电位的产生与传导;线粒体结构的破坏,致使肌肉收缩缺乏能量供应;而肌质网的破坏,则直接影响 Ca^{2+} 的释放与回收;肌肉收缩机械——肌原纤维的排列紊乱直接导致肌肉不能正常收缩。

由此认为,苦皮藤素 IV 造成的肌细胞结构损伤,可能是引起试虫麻痹的原因之一。

本研究发现,苦皮藤素 IV 对成虫飞行肌与幼虫体壁肌的破坏程度间存在差异,这可能与处理方法有关。成虫处理采用的是注射法,毒物可直接作用于肌肉组织;而幼虫处理采用的是载毒叶碟法,毒物由消化道经循环系统到达肌细胞的过程中,可能会发生部分降解作用,到达靶标的剂量不同可能是二者损伤程度不同的主要原因。 Ca^{2+} 作为肌肉兴奋—收缩耦联的触发剂,苦皮藤素 IV 是否通过影响 Ca^{2+} 的水平变化而影响肌肉收缩,还有待进一步研究。

本研究还发现,在苦皮藤素 IV 作用下,试虫肌细胞内出现晶状包含体。从微观水平看,晶状包含体主要是蛋白质翻译过程中,在特定的 pH、离子浓度等因素的作用下,蛋白质分子在三维空间按某种周期重复方式和某些对称操作堆砌而成^[6],其可在许多细胞器(如细胞核、线粒体、内质网和胞质基质等)内形成,可在病理条件下发生,也可在药物作用下发生^[7~9]。本研究中,处理试虫幼虫肌细胞内出现晶状包含体,可能是在苦皮藤素 IV 的作用下,肌细胞某种结构蛋白的空间结构发生了变化,从而引起其空间折叠障碍,对此尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 吴文君,涂永强,刘慧霞,等.苦皮藤麻醉成分(苦皮藤素 IV)的结构鉴定[J].西北农业大学学报,1993,21(1): 1- 5
- [2] 刘惠霞,王启坤,吴文君,等.苦皮藤麻醉成分对昆虫的选择毒性及其机制的初步研究[J].西北农业学报,1993,2(2): 31- 36
- [3] 刘惠霞,吴文君,胡兆农,等.苦皮藤素 IV 作用机理的初步研究[J].世界农药,1999,21(增刊): 79- 82
- [4] 吴文君.植物化学保护实验技术导论[M].西安:陕西科学技术出版社,1988: 85- 88
- [5] 罗礼智.粘虫蛾飞行肌的发育:超微结构特征分析[J].昆虫学报,1996,39(4): 366- 373
- [6] 陈世芝.蛋白质晶体中的分子堆砌与晶体生长[J].生物化学与生物物理进展,1990,17(8): 416- 420
- [7] Bensch K G, Malawista S M. Microtubular crystals in mammalian cells[J]. Cell Biol, 1969, 40: 95- 107.
- [8] Dustin P, Flament-Durand J, Couck A M. Vincristine-induced tubulin paracrystals in the nuclei of mammalian neurons[J]. Submicrosc Cytol, 1980, 12: 611- 616
- [9] Feremans W W, Neve P, Caudren M. IgM lambda cytoplasmic crystals in three cases of immunocytoma: a clinical, cytochemical and ultrastructure study[J]. Clin Path, 1978, 31: 250- 258

(下转第 104 页)

- [46] 罗益镇 生物多样性与害虫的综合防治[J]. 世界农业, 1995, (10): 26- 27.
- [47] 董应才, 贾桂花 生物多样性与天敌——资源保护[J]. 生物学杂志, 1995, (4): 8- 10
- [48] 万方浩, 陈常铭 综防区和化防区稻田害虫—天敌群落组成及多样性的研究[J]. 生态学报, 1986, 6(2): 159- 169
- [49] 董文霞, 张钟宁, 李生才, 等 不同棉田昆虫群落的比较研究[J]. 昆虫知识, 2001, 38(2): 112- 116

The effect of globalization of economy on insect diversity in China

DAI Wu, ZHANG Ya-lin, ZHANG Chun-ni

(Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, College of Plant Protection,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In the paper, the effect of globalization of economy on insect diversity in China after China's entering the WTO is discussed. In our opinion, protection and utilization of insect diversity in China face both good opportunity and challenge. The factors that will sharply accelerate insect diversity loss are invasive alien species, habitat destruction, excessive utility of biological technology and insect resources, and these will restrict the achievement of insect diversity conservation practice. On the other hand, insect diversity conservation will be improved by globalization of economy in some cases. Suggestions for conservation and utilization of insect diversity are also proposed here.

Key words: insect diversity; globalization of economy; conservation and utilization of insect resources

(上接第 98 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)03-0095-EA

Ultrastructural effect of Celangulin IV on the myocyte of *Mythim a separata* (Walker)

LIAN Xi-hong, LIU Hui-xia, WU Wen-jun, YANG Cong-jun

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Studies have been conducted with electric microscope on the ultrastructure of myocyte on the armyworm, *Mythim a separata*. The main results are as the followings: Celangulin IV had myotoxicity on both the flight muscles of the adult and the body muscles of the larvae. The myocyte, especially the muscular membrane and internal membrane system and myofibrils went progressive myotoxicity. Mitochondria were swollen and broke down. Sarcoplasmic reticulum was expanded. Myofibril arrangement was out of order and even dissolved. The cryo-inclusions appeared on the paralysis stage. The results indicate that the myocyte is possibly another target of Celangulin IV.

Key words: Celangulin IV; *Mythim a separata*; myocyte