

马桑毒素 B 对试虫马氏管及中肠组织的影响

庄世宏¹, 宗 娜², 李孟楼¹

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

[摘 要] 采用中性红染色及石蜡切片法, 研究了马桑毒素 B (Tutin = CLB) 对粘虫和苹掌舟蛾的马氏管及中肠组织的影响。结果表明, CLB 可引起试虫马氏管壁肌肉的持续收缩, 使进入管内的物质积累, 降低其排泄能力, 导致马氏管的皱褶数增多、马氏管及其基部的球体直径增大; 同时, 试虫取食 CLB 后可导致中肠围食膜消失, 对中肠的肠壁细胞层也有伤害作用。

[关键词] 马桑毒素 B; 马氏管; 中肠; 粘虫; 苹掌舟蛾

[中图分类号] S481⁺1; S482.3⁺9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0127-04

Tutin 's effect on poisoned larvae 's malpighian tubules and midgut tissue

ZHUANG Shi-hong¹, ZONG Na², LI Meng-lou¹

(1 College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Institution of Animal, China Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract : This paper studied the tutin 's effect on poisoned larvae 's malpighian tubules and midgut tissue of *Mythimna separate* (Walker) and *Phalera flavescent* (Bremer et Grey) by means of neutral red indication dyeing and paraffin wax section. The results showed that tutin could cause the malpighian tubules wall muscles continual shrinking, make the materials going into the malpighian tubules accumulating, reduce its ' excretion ability, and increase the folds number of the malpighian tubule and the diameter of the malpighian tubule and the spheroid of its base. Meanwhile, after eating tutin, poisoned larvae 's peritroohic membrane disappeared. Tutin also harms the wall cells of midgut.

Key words : tutin; malpighian tubules; midgut; *Mythimna separate*; *Phalera flavescent*

马桑 (*Coriaria sinica Maxim*) 是分布于我国秦岭以南的常见灌木, 该植物所含的马桑毒素 B (Tutin = CLB) 对大白鼠的海马脑和部分神经具有损伤性影响^[1], CLB 又是神经-肌肉接点抑制性递质 γ -氨基丁酸受体 GABA_AR 的拮抗剂, 其作用机理与神经-肌肉传导突触中的氯离子通道 (chloride channel) 有关^[2-4]。国内学者自 1995 年开始进行了马桑毒素 B 的杀虫作用与机理研究, 已证实该毒素对试虫有显著的杀虫活性^[5]。

探讨新杀虫活性物质的作用机理, 通常需要进行 3 方面的工作: 一是在分子水平上研究其作用靶标及作用原理, 二是研究其引起虫体内代谢过程及参与代谢的酶类等变化程度, 三是观察和研究其对试虫组织或细胞的损伤。笔者已对马桑毒素 B 进行了前两方面的研究^[3, 6-10], 结果表明该毒素对脊椎动物的神经有损伤作用, 但对昆虫组织的影响还未见报道。

本试验研究了该毒素对试虫排泄器官即马氏管

* [收稿日期] 2006-06-09

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

[作者简介] 庄世宏 (1971 -), 男, 陕西佳县人, 副教授, 主要从事昆虫毒理及森林害虫防治研究。

[通讯作者] 李孟楼 (1957 -), 男, 陕西富平人, 教授, 主要从事森林昆虫及昆虫毒理学研究。

及中肠的影响,以期从组织毒理学角度进一步阐明 CLB 的作用方式。

1 材料与方法

1.1 材料

试虫 粘虫(*Mythimna separate* (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。苹掌舟蛾(*Phalera flavescens* (Bremer et Grey))采自西北农林科技大学南校区校内木瓜树上,以鲜木瓜叶饲养。

试剂 马桑毒素 B 纯品提取于马桑籽,其他试剂均为分析纯。

仪器 手摇式 202 型切片机,HH-112B 电热恒温水浴锅,XSZ-G 型光学显微镜,SMZ140-N2T 体视摄影显微镜。

1.2 方法

1.2.1 马桑毒素对试虫排泄系统的影响 (1)试虫处理。以苹掌舟蛾 4 龄幼虫为试虫,每头试虫注射 CLB 0.5 mg,并以注射相同量水的试虫为对照。处理 2 h 后分别注射 2 mL 中性红水溶液。(2)排泄机能观察。分别于注射中性红后 4 h 和 8 h 解剖试虫,观察中性红颗粒在马氏管中的分布,及试虫马氏管

与中后肠交接处球体中内容物的状态。(3)马氏管形态观察与测定。分别观察测量对照及处理试虫马氏管的直径,马氏管与中后肠交接处球体的大小及其褶皱数,重复 5 次,然后在解剖镜下观察拍照。对照与处理的差异大小用“[(处理 - 对照)/对照] × 100 %”表示。

1.2.2 马桑毒素对试虫中肠组织结构的影响 (1)试虫处理。挑选蜕皮后第 2 天、个体大小一致、发育正常的 4 龄粘虫幼虫为试虫。处理前饥饿 12 h,然后用载有 15.07,60.28,150.70 和 301.40 mg 马桑毒素 B 的 1 cm² 玉米叶叶碟饲喂^[3],以未载毒叶片为对照。待试虫于 10 h 食完叶碟后,饥饿、排空消化道中的食物残渣,然后再解剖。(2)石蜡切片观察。解剖试虫后取出中肠中段,用 Bouin 氏固定液固定 24 h,按常规方法脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(厚度 5 ~ 8 mm)、脱蜡,再用伊红染色、封片、干燥。在光学显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 马桑毒素 B 对苹掌舟蛾排泄系统的影响

给苹掌舟蛾 4 龄幼虫注射 CLB 后,其马氏管在 1 mm 内的褶皱数及宽度见表 1 和表 2。

表 1 CLB 对苹掌舟蛾 4 龄幼虫 1 mm 长度内马氏管褶皱数的影响

Table 1 Fold quantity of Malpighian tubules of *Phalera flavescens* of treatment and CK insect in length 1 mm

项目 Item	测量值/mm Measurement					平均 Average	差异率/% Difference percent
	1	2	3	4	5		
对照 CK	63	70	77	63	53	65.20 ±8.96	-
处理 Treatment	77	105	91	84	98	91.00 ±11.07	39.570 6

注:差异率/%=[(处理-对照)/对照]×100%。下表同。

Note :Difference percent/%=[(Treatment - CK)/CK]×100%. The following tables are the same.

表 2 CLB 对苹掌舟蛾 4 龄幼虫马氏管直径的影响

Table 2 Diameter of Malpighian tubules of *Phalera flavescens* of treatment and CK insect

项目 Item	测量值/mm Measurement					平均 Average	差异率/% Difference percent
	1	2	3	4	5		
对照 CK	0.388 9	0.466 7	0.388 9	0.350 0	0.311 1	0.381 1 ±0.057 4	-
处理 Treatment	0.583 3	0.622 2	0.466 7	0.505 6	0.544 4	0.544 4 ±0.061 6	42.849 6

由表 1 和表 2 可以看出,处理组试虫马氏管褶皱增多、直径增大,其中马氏管内的中性红呈颗粒状,马氏管组织不透明;而对照组试虫马氏管褶皱数较少、直径较小,其中残余在马氏管内的中性红分布均匀,马氏管组织透明(图 1)。同样,用 CLB 处理后,试虫马氏管基部的球体也明显增大且不透明(图 2),测量数据见表 3。

观察对照及处理组试虫马氏管对中性红的排泄

情况发现,注射中性红后 4 h,对照组试虫马氏管总长度的 1/2 端部均有中性红分布,中性红在马氏管内分布均匀,其液体呈红色透明状;处理组试虫只在马氏管端部约 1/4 的长度内可见中性红,且中性红呈结晶状。注射中性红后 8 h,对照组试虫马氏管内的中性红已基本被排泄完;而处理组试虫马氏管内仍有未排泄完的中性红颗粒。

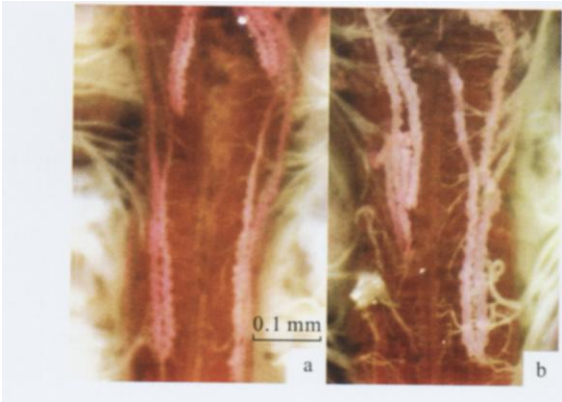


图 1 苹掌舟蛾幼虫对照与 CLB 处理组的马氏管特征
a. 对照;b. 处理
Fig.1 Morphology change of Malpighian tubules of *Phalera flavescens* between CK and CLB treatment
a. CK;b. Treatment

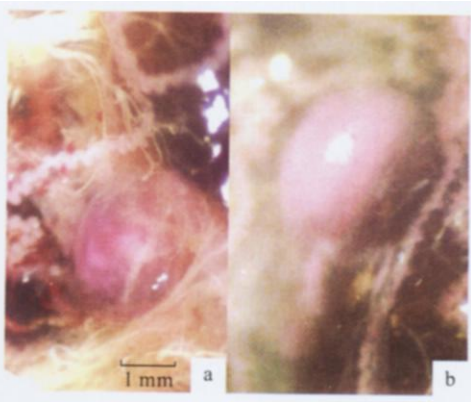


图 2 苹掌舟蛾幼虫对照与 CLB 处理组马氏管基部小球特征
a. 对照;b. 处理
Fig.2 Size change of the basal spheroid of Malpighian tubules of *Phalera flavescens* between CK and CLB treatment
a. CK;b. Treatment

表 3 CLB 对苹掌舟蛾 4 龄幼虫马氏管基部球体大小的影响

Table 3 Size of the basal spheroid of Malpighian tubules of *Phalera flavescens* of treatment and CK insect

项目	Item	测量值/mm Measurement					平均 Average	差异率 % Difference percent
		1	2	3	4	5		
对照 CK	横径 Broadwise diameter	1.944 4	1.944 4	1.944 4	2.333 3	2.000 0	2.033 3 ±0.169 4	-
	纵径 Longitudinal diameter	2.333 3	2.527 8	2.333 3	2.722 2	2.222 2	2.427 8 ±0.198 0	19.402 0
处理 Treatment	横径 Broadwise diameter	3.111 1	2.500 0	3.333 3	3.388 9	3.222 2	3.111 1 ±0.357 9	-
	纵径 Longitudinal diameter	3.333 3	3.222 2	4.000 0	3.555 6	3.666 7	3.555 6 ±0.304 3	14.287 6

2.2 马桑毒素 B 对粘虫幼虫中肠组织结构的影响
光学显微镜下粘虫 4 龄幼虫中肠中段组织的石蜡切片见图 3。

每头试虫饲喂 15.07 mg CLB 时,试虫的围食膜还可见(图 3b);每头饲喂 60.28 mg CLB 时,试虫的围食膜已消失;每头饲喂 150.70 mg CLB 时,试虫的围食膜已消散,肠壁组织层明显变薄(图 3c);当饲喂剂量达到每头 301.40 mg CLB 时,试虫中肠的肠腔缩小,围食膜消失(图 3d)。

3 讨 论

CLB 作用于试虫后首先引起兴奋,再麻痹^[1,10];兴奋虽是神经活动的表现,但最终的体现乃是肌肉收缩。CLB 是一种神经-肌肉接点抑制性递质 γ -氨基丁酸受体 $GABA_A$ R 的拮抗剂,其作用于试虫后,既干扰试虫 γ -氨基丁酸 GABA 的代谢方式、引起 GABA 的积累,又会导致作用位点氯离子通道的变化,使神经正常传导受到阻碍^[2-4,11]。本研究在 1 mm 长的马氏管上观察到,CLB 处理组比对照组的皱褶数增多了近约 25 个,这也间接证实 CLB 作用于 $GABA_A$ R 后引起了试虫马氏管肌肉层收缩性能的变化。其原因可能是导致了神经膜内的氯离子流向了膜外,使神经膜在较长的时间内保持去极化状态、保持动作电位,进而使肌肉进入了强直收缩过程,试虫产生痉挛麻痹,最终致使马氏管的皱褶数增

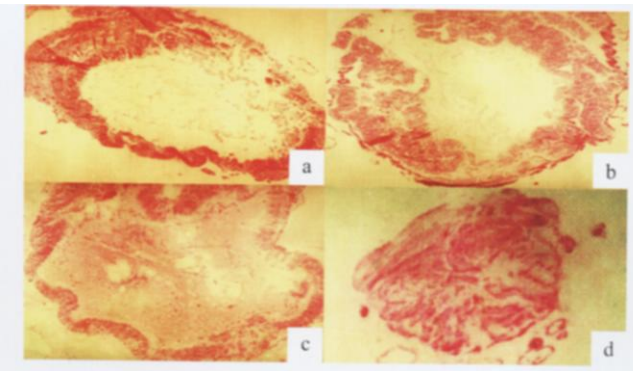


图 3 粘虫幼虫对照与 CLB 处理组的中肠组织
a. 对照;b~d. 分别示用 15.07,150.7 和 301.4 mg CLB 处理组
Fig.3 Variation of midgut tissue of *Mythimna separate* larva between CK and CLB treatment
a. CK;b - d. Treatment by Tutin B 15.07,150.7,301.4 mg

图 3 表明,对照组粘虫中肠组织正常,肠腔内的围食膜清晰可见、完整(图 3a)。但用马桑毒素 B 处理后,粘虫中肠组织发生了变化,且随着 CLB 处理剂量的加大,中肠组织病理变化有加重的趋势。在

加^[11-12];但如果是导致了 Cl^- 进入膜内、膜处于超极化状态不能兴奋,突触后膜的静息电位不能消失,试虫则发生瘫软麻痹,肌肉难以收缩,马氏管的皱褶数也不会增多^[13]。因此,CLB 虽然影响了其作用位点氯离子通道的变化,但这种影响是导致 Cl^- 进入膜内还是流向膜外,还有待进一步的试验研究。

CLB 作用于虫体后引起试虫马氏管肌肉层的收缩,肌肉收缩的结果应该使马氏管直径缩小。但本研究表明,CLB 可导致试虫马氏管及其基部的球体扩张,中性红在马氏管内为颗粒状,且长时间不能从马氏管中排出。其原因可能是 CLB 在使试虫产生其他中毒症状的同时,破坏了马氏管的吸收-排泄循环方式,其吸收过程不断进行而排出过程中断,使进入马氏管内的物质积累,导致其直径增大。马氏管是昆虫重要的排泄器官,有毒物质进入虫体后的排毒代谢途径之一,就是经过马氏管将其排出体外,CLB 对试虫马氏管排泄机能的损伤可进一步加强其对试虫其他组织的伤害,但 CLB 是否对马氏管组织的细胞产生伤害尚不清楚。

试虫取食植物源有毒物质后,常影响其中肠的消化酶活性,对围食膜产生伤害等^[8,13-14]。同样,试虫取食 CLB 后也使其中肠围食膜遭到破坏,肠壁细胞层的厚度显著变薄;但其是抑制了中肠细胞对围食膜的分泌途径或是破坏了分泌细胞,对中肠组织的细胞是否也产生了破坏,尚需继续进行研究。

[参考文献]

- [1] 郭亮,柴慧霞,谢扬高,等. 马桑内酯点燃大鼠海马脑片 CAI 的双脉冲抑制观察[J]. 华西医科大学学报,1992,23(4):399-402.
- [2] 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.
- [3] 李孟楼,庄世宏,宗娜. 马桑毒素 B 对粘虫几种生理生化指标的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(6):54-58.
- [4] Ozoe Y, Hasegawa H, Mochida K, et al. Picrodendrins, a new group of picotoxane terpenoids: structure-activity profile of action at the GABA_A receptor-coupled picrotoxinin binding site in rat brain[J]. Biosci Biotech Biochem,1994,58:1506-1507.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 张克斌,谭六谦. 昆虫生理[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1989:166-167.
- [12] 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(一)[J]. 昆虫知识,1996,33(4):244-247.
- [13] 刘惠霞,赵德金,钱洪. 苦皮藤麻醉成分对粘虫生理生化指标的影响[J]. 西北农业大学学报,1992,20(3):37-41.
- [14] 张兴,王兴林,冯俊涛. 植物性杀虫剂川楝素的开发研究[J]. 西北农业大学学报,1993,21(4):1-5.
- [3] 严海燕. 小麦辐射突变体及原始品种不同发育期酯酶、过氧化物酶同工酶分析[J]. 武汉植物学研究,2005,23(4):342-346.
- [4] 黄训端. ⁶⁰Co γ 射线辐照对花魔芋同工酶与品质的影响[J]. 激光生物学报,2005(6):213-217.
- [5] Hayashi T, todorki S, Nagao A. Effect of Gamma irradiation on the membrane permeability and lipid composition of patato tuber[J]. Environment Experiment Botany,1992(32):265-271.
- [6] 孙静. 盐胁迫对小麦过氧化物酶同工酶基因表达的影响[J]. 麦类作物学报,2006,26(1):42-44.
- [7] Thomas B, Chain F. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear[J]. Plant physiol,1997(59):411-416.
- [8] 陈文强. 天麻 3 种变型过氧化物酶的同工酶研究[J]. 西北植物学报,2005,25(8):1665-1668.
- [9] 蒋全熊. 我区富士苹果不同品系过氧化物酶同工酶研究[J]. 宁夏农学院学报,2003,24(1):14-18.
- [10] 袁海娜. 冬瓜贮藏过程中 PPO、POD 和 CAT 活性及同工酶研究[J]. 食品研究与开发,2005,26(1):61-63.
- [11] 罗广华. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示[J]. 植物生理学通讯,1983(6):44-45.
- [12] 尹淑霞. ⁶⁰Co- γ 辐射对多年生黑麦草植株过氧化物同工酶和酯酶同工酶的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2005(5):596-598.
- [13] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版社,2000.
- [14] 余泽高. ⁶⁰Co γ 射线辐射小麦种子对生长发育的影响[J]. 湖北农学院学报,2003,2(1):1-4.

(上接第 126 页)