

三种植物源杀虫活性成分对东方粘虫中肠细胞的毒力测定^{*}

刘亚强¹ 彭大勇² 祁志军^{1**}

(1. 西北农林科技大学农药研究所 陕西 712100 2. 江西农业大学理学院 南昌 330045)

Evaluation of cytotoxicity of three botanical insecticidal activities against the midgut cell of *Mythimna separata*.

LIU Ya-Qiang¹, PENG Da-Yong², QI Zhi-Jun^{1**} (1. *Institute of Pesticide Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*, Shaanxi 712100, China; 2. *Collage of Science, Jiangxi Agricultural University*, Nanchang Jiangxi 330045, China)

Abstract The toxicities of celangulin V, fraxinellon and dictamnine against the midgut cell of *Mythimna separata* have been assayed with the methods of MTT, Neutral red and Trypan blue stain, respectively. The result showed that the midgut cell grew well in Grace's insect cell culture medium. These three phytochemicals have obvious toxicity to the cell. The LC_{50} of celangulin V against the midgut cell by the methods of MTT, Neutral red and Trypan blue stain were 9.08, 7.79 and 10.94 $\mu\text{g/mL}$, those of fraxinellon were 27.85, 31.77 and 36.42 $\mu\text{g/mL}$, and those of the dictamnine were 186.66, 164.00 and 192.34 $\mu\text{g/mL}$.

Key words botanical insecticidal activities, *Mythimna separata*, midgut cell, cytotoxicity

摘 要 采用 MTT([3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基] 四氮唑溴盐)比色法、中性红摄取法和台盼蓝拒染法,分别测定植物源杀虫活性成分苦皮藤素 V、白鲜碱和薹皮酮对东方粘虫中肠细胞的毒力。结果表明:急性分离的东方粘虫中肠细胞能在 Grace's 昆虫细胞培养基中维持生长;3 种供试药剂对中肠细胞均有明显的细胞毒性。MTT 比色法、中性红摄取法和台盼蓝拒染法测得苦皮藤素 V 对中肠细胞的 LC_{50} 依次为 9.08, 7.79 和 10.94 $\mu\text{g/mL}$;白鲜碱为 27.85, 31.77 和 36.42 $\mu\text{g/mL}$;薹皮酮为 186.66, 164.00 和 192.34 $\mu\text{g/mL}$ 。

关键词 植物源杀虫活性成分, 东方粘虫, 中肠细胞, 细胞毒性

目前,国内外主要采用活体昆虫进行杀虫剂的筛选和毒力测定,虽然活体生测比较可信,但其测定周期长,费时费力,昆虫对药剂的敏感性也受季节、温度和昆虫品系的影响,而且在天然产物研究中,由于分离得到的化合物量少,传统方法已难满足现实的需要^[1]。近年来,昆虫细胞培养技术已经日臻成熟,利用昆虫细胞来检测药物活性的离体测试体系也逐步发展起来。

苦皮藤素 V 是从卫矛科植物苦皮藤中分离的一种二氢沉香呋喃多元酯类化合物,研究表明它对鳞翅目许多作物害虫具有毒杀作用^[2];白鲜碱和薹皮酮是从芸香科植物白鲜中分离到的 2 种化合物,关于这 2 种化合物的杀虫活性

已有报道^[3]。

本文分别采用 MTT 比色法、中性红摄取法和台盼蓝拒染法测定了 3 种植物源杀虫活性物质苦皮藤素 V、白鲜碱和薹皮酮对东方粘虫中肠细胞的毒力作用,以期以后的植物源杀虫活性成分微量测定提供一些思路。

1 材料与方法

1.1 培养基

昆虫细胞培养基: Grace's 培养基(gibicol)

* 西北农林科技大学青年基金项目(08080235)资助。

** 通讯作者, E-mail: qzhij@nwsuaf.edu.cn.

收稿日期: 2006-11-22, 修回日期: 2007-03-09

补加 10% 胎牛血清 (gibicol)。

1.2 供试昆虫

东方粘虫 *Mythimna separata* Walker, 由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.3 供试药剂

苦皮藤素 V、白鲜碱和藜皮酮。纯度均在 97% 以上, 由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.4 试验方法

1.4.1 东方粘虫中肠细胞的急性分离与培养: 取生理状态一致的初蜕东方粘虫 6 龄幼虫, 于直径 6 cm 培养皿中饥饿 24 h, 用 2% NaClO 溶液浸泡 8 min, 再用 75% 的酒精体表消毒 8 min, 无菌 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.4) 清洗 3 次, 解剖取其中肠组织, 在显微镜下剔除其它附着物, 再用 PBS 冲洗数遍后, 用无菌眼科剪将中肠剪碎, 离心后加入少量 PBS, 用手指稍用力弹击离心管底, 使细胞充分悬浮并从底膜上脱落分散, 离心收获细胞, 用 Grace's 昆虫培养基于 28 °C 下培养待用。

1.4.2 MTT 比色法测定细胞毒性

参照周青春^[1]、毛黎娟^[4] 等方法并有所改动。将培养的中肠细胞于 1 000 r/min 离心后, 用无血清培养基稀释成 $3.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ cell/mL 的细胞悬液, 取一定量的细胞悬液, 向其加入一定量的 MTT 母液 (5 mg/mL MTT 溶液), 培养 4 h 后, 取 0.5 mL 作为对照, 其余的分成 3 份, 分别加入细胞裂解液二甲亚砜、酸化异丙醇溶液 (pH = 4.5) 和 10% SDS 溶液 (pH = 4.5) 溶解甲紫结晶, 取溶解液的上清液在 UV-2550 分光光度计 (SHIMADZU) 上 400 ~ 700 nm 范围内连续扫描, 以确定甲紫结晶溶解液的最大吸收波长。将制备好的细胞悬液接种在 96 孔细胞培养板的第 2 ~ 8 行, 每孔加入量为 100 μ L。28 °C 培养 24 h 后, 第 1 行加入培养基作调零用, 第 2 行加入含 1% 二甲亚砜的培养基作对照, 其它各行依次加入不同浓度梯度的药液。每浓度梯度 6 孔, 加入量为每孔 100 μ L, 加完后于 28 °C 下继续培养 24 h。在培养结束前向每孔加入 MTT 母液使其终浓度为 0.5 mg/mL, 继

续培养 4 h 后, 向每孔加入 100 μ L 细胞裂解液二甲亚砜。待蓝紫色甲紫结晶物完全溶解后, 置于 MK-3 酶标仪 (thermo) 上在 492 nm 下读取 OD 值, 每一浓度的 OD 值均为 6 孔的平均值。将得到的 OD 值按如下公式换算成细胞抑制率:

细胞抑制率 (%) =

$$\frac{\text{对照孔的平均 OD 值} - \text{处理孔的平均 OD 值}}{\text{对照组的平均 OD 值}} \times$$

100%。

1.4.3 中性红摄取法测定细胞毒性: 参照张卓然^[3] 的方法并有所改动。将制备好的细胞悬液接种在 96 孔细胞培养板上, 每孔接种量为 100 μ L, 28 °C 培养 24 h 后, 第 1 行不加药剂作对照, 第 2 ~ 8 行加入依次加入不同浓度梯度的药液。每浓度梯度 6 孔, 加入量为每孔 100 μ L, 加完后于 28 °C 下继续培养 24 h, 在培养结束后, 轻轻倒掉培养基并用 PBS 清洗 3 次, 加入 100 μ L 的中性红溶液继续培养 3 h 后倒掉中性红溶液, 再用 PBS 清洗 3 次, 加入 200 μ L 中性红细胞固定液 (各含 1% 的乙酸与甲醛的水溶液) 固定 5 min 后倒掉固定液, 再加入 100 μ L 中性红提取液 (含 1% 乙酸与 50% 乙醇的水溶液), 置于酶标仪上在 570 nm 下测定 OD 值, 将读取的 OD 值按如下公式换算成中性红相对摄取率:

$$\text{中性红相对摄取率 (\%)} = \frac{\text{受试药物组吸光值}}{\text{对照组吸光值}}$$

$\times 100\%$ 。

1.4.4 台盼蓝拒染法: 将制备好的细胞悬液接种在 96 孔细胞培养板上, 每孔接种量为 100 μ L, 28 °C 培养 24 h 后, 第 1 行不加药剂作对照, 第 2 ~ 8 行由低向高依次加入不同浓度梯度的供试药液。每浓度梯度 6 孔, 加入量为每孔 100 μ L, 加完后于 28 °C 下继续培养 24 h, 在培养结束后, 每孔加入 50 μ L 0.3% 台盼蓝溶液混匀, 染色 3 ~ 5 min 后, 血球计数板计数, 记录每孔中活细胞的数目, 按下列公式计算细胞死亡率:

$$\text{细胞死亡率 (\%)} = 1 - \frac{\text{未蓝染细胞数}}{\text{对照组总细胞数}} \times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 东方粘虫中肠细胞的急性分离与培养

急性分离到的中肠细胞在培养 3 d 后, 未从底膜上游离出来的细胞逐渐游离出来, 而单细胞开始疏松贴壁, 经 2~3 次更换培养基后, 死亡的细胞通过换液逐渐被换掉, 活细胞疏松切壁, 以后每隔 7 d 半量更换培养基, 分离的细胞处于原代培养阶段。

2.2 MTT 比色法测试波长的确定

用 3 种裂解液溶解甲₁结晶, 取上清液在 UV-2550 分光光度仪上 400~700 nm 连续范围内连续扫描, 得到吸收光谱曲线(见图 1)。从

图 1 中可以看出: 酸化异丙醇溶解甲₁结晶所得到的上清液的吸收曲线(b)在 558 nm 处有最大吸收值 0.392, 10% SDS 溶解甲₁结晶的上清液的吸收曲线(c)在 568 nm 处有最大吸收值 0.498, 二甲亚砆溶解甲₁结晶得到的上清液的吸收曲线(d)在 485~570 nm 之间的吸收值变化范围在 0.642~0.651 之间, 在 497 nm 处有最大值为 0.651, 对照组的吸收曲线(a)在 480~700 nm 范围内无显著的变化, 说明残留的 MTT 和培养基对上述上清液的 OD 值影响可以忽略不计, 因此, 在毒力测定中, 本实验选二甲₁砆为甲₁结晶裂解液, 选 492 nm 作为酶标仪的测试波长是合适的。

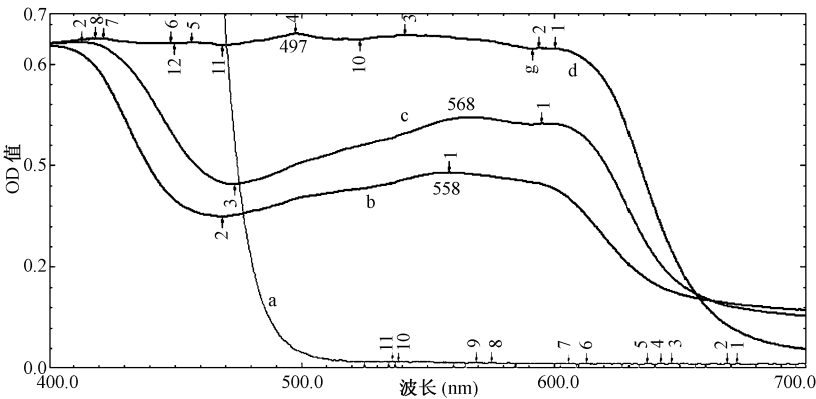


图 1 不同裂解液溶解甲₁结晶的吸收曲线
a. 对照组的吸收曲线 b. 10% SDS 溶液的吸收曲线
c. 酸化异丙醇的吸收曲线 d. 二甲亚砆的吸收曲线

2.3 三种植物源活性物质对粘虫中肠细胞的毒力

利用 MTT 比色法、中性红摄取法和台盼蓝拒染法分别测得了苦皮藤素 V、白鲜碱和₁皮酮对粘虫中肠细胞的毒力。在实验过程中, 根据试验预试, 将供试化合物苦皮藤素 V 用二甲亚砆稀释成 2, 5, 10, 15 和 20 $\mu\text{g/mL}$; 白鲜碱稀释成 10, 20, 30, 40 和 50 $\mu\text{g/mL}$; ₁皮酮稀释成 140, 160, 180, 200 和 220 $\mu\text{g/mL}$, 所有供试药液二甲亚砆的终质生分数为 1%, 对照组也加 1% 的二甲亚砆, 3 种供试药剂的生测结果均用

DPS 数据处理系统处理, 求得毒力回归方程和致死中浓度(LC₅₀), 结果见表 1。

从表 1 中我们可以看出, 对同一化合物而言, 3 种测试方法测试得到的 LC₅₀ 值差异并不是很大, MTT 比色法、中性红摄取法和台盼蓝拒染法测得的苦皮藤素 V 对粘虫中肠细胞的 LC₅₀ 分别为 9.08, 7.79 和 10.94 $\mu\text{g/mL}$; 白鲜碱为 27.85, 31.77 和 36.42 $\mu\text{g/mL}$; ₁皮酮为 186.66, 164.00 和 192.34 $\mu\text{g/mL}$; 3 种化合物相对而言, 苦皮藤素 V 对细胞毒性最强, 白鲜碱次之, 而₁皮酮较差。

表 1 三种植物源杀虫活性成分对粘虫中肠细胞的毒力

药剂	方法	回归方程	<i>r</i>	LC ₅₀ (mg·L ⁻¹)	95%置信限(mg·L ⁻¹)
苦皮藤素 V	MTT 比色法	<i>Y</i> = 3. 3934+1. 6772 <i>x</i>	0. 9933	9. 08	5. 85 ~ 17. 65
	中性红摄取法	<i>Y</i> = 3. 6283+1. 5380 <i>x</i>	0. 9897	7. 79	4. 69 ~ 18. 49
	台盼蓝拒染法	<i>Y</i> = 3. 6897+1. 2612 <i>x</i>	0. 9821	10. 94	5. 31 ~ 50. 52
白鲜碱	MTT 比色法	<i>Y</i> = 2. 5030+1. 7284 <i>x</i>	0. 9964	27. 85	16. 94 ~ 55. 61
	中性红摄取法	<i>Y</i> = 2. 5733+1. 6156 <i>x</i>	0. 9972	31. 77	19. 95 ~ 59. 32
	台盼蓝拒染法	<i>Y</i> = 2. 1498+1. 8256 <i>x</i>	0. 9962	36. 42	21. 40 ~ 76. 28
皮酮	MTT 比色法	<i>Y</i> = 0. 3285+2. 0570 <i>x</i>	0. 9992	186. 66	130. 18 ~ 283. 26
	中性红摄取法	<i>Y</i> = 0. 1342+2. 1969 <i>x</i>	0. 9991	164. 00	111. 44 ~ 258. 28
	台盼蓝拒染法	<i>Y</i> = 0. 6562+1. 9073 <i>x</i>	0. 9980	192. 34	108. 69 ~ 382. 32

3 结论与讨论

苦皮藤素 V、白鲜碱和 皮酮这 3 种化合物在植物体内的含量很低,经多步分离纯化后,得到的量往往难以进行后续研究,这是研究植物化学产品中遇到的一个瓶颈问题。本研究以急性分离的东方粘虫中肠细胞为材料,对这 3 种活性物质进行了细胞毒性测定,研究结果表明:3 种供试杀虫活性物质都具有明显的细胞毒性,且 3 种不同测试方法均可对药物的毒力进行定量测定,利用昆虫细胞进行杀虫活性物质的微量测定是完全可行的。

昆虫细胞作为实验材料具有整齐一致和用药量少等优点,利用昆虫细胞进行药物筛选已经逐渐成为开发新农药的途径之一,特别是随着细胞大规模培养技术和机械化操作水平的提高,使得杀虫剂的微量化高通量筛选成为可能。但离体细胞作为毒力测定对象也存在一些问题,昆虫相对于细胞而言是一个生命有机体,体内发生着许多复杂的生理生化代谢过程,这往往造成活体和离体毒力测定在结果上的不一致。例如,有些对细胞有活性的物质,会由于昆虫体内酶的降解代谢而失去杀虫活性;相反,有些对细胞无活性的物质,也有可能经过昆虫体内的代谢会对试虫产生很强的毒性。

细胞毒性测定的方法有台盼蓝拒染法、MTT 比色法、WST-1 法、³H-TdR 掺入法、乳酸脱氢酶活力测定法、结晶紫染色法及荧光染色法等^[9]。本研究采用了目前最为常用的 MTT 比色法、中性红摄取法和台盼蓝拒染法,对这 3 种

测定方法进行比较发现:MTT 比色法相对来说比较快速、简便、准确,但研究中发现溶液的颜色会随时间的延长而不断加深,使测定结果的 OD 值升高^[7]。因此建议在甲 结晶刚溶解完后立刻测定 OD 值;中性红摄取法准确、重复性好,但对实验操作要求较高,特别是在洗涤摄取中性红的细胞时,往往使部分细胞丢失而影响实验结果;台盼蓝拒染法相对来说成本低廉且操作简单,但在具体操作中也存在一些问题,例如本研究中的供试化合物作用于中肠细胞后,细胞裂解成碎片而无法统计死细胞的数目,只能用对照组与处理组活细胞数的差值来代替处理组的死细胞数,而且在细胞计数时由于各人计数标准不同而使结果之间稍有偏差。

吴文君等研究发现苦皮藤素 V 为昆虫消化毒剂,能破坏东方粘虫的中肠组织^[8]。本研究结果也表明这 3 种物质均可导致东方粘虫中肠细胞的裂解,它们是否具有相同的作用机理还有待进一步的研究。

参 考 文 献

1 周青春,杨红,汪虹,洪华珠. 华中师范大学学报, 1997, 31(4):456~459.

2 吴文君(主编). 从天然产物到新农药创制——原理与方法. 北京:化学工业出版社, 2006. 242~244.

3 Liu Z. L., Xu Y. J., Wu J. J. *Agricul. Food Chem.*, 2002, 50(6): 1 447~1 450.

4 毛黎娟,魏方林,朱国念. 农药学学报, 2005, 7(1): 45 ~ 48.

5 张卓然(主编). 培养细胞学与细胞培养技术. 上海: 上海科学技术出版社, 2004. 426~427.

6 刘锐克,周军兰,梁建辉. 中国药理学与毒理学杂志, 2003, 17(1): 74~78.

7 王征,张天宝,朱玉平,谢宗华. 卫生研究, 2006 35(3): 286.

8 吴文君,胡兆农,刘惠鑫,祁志军. 昆虫学报, 2005, 48(5): 770~777.