

苦瓜叶提取物对亚洲玉米螟的生物活性及 对斜纹夜蛾卵巢细胞的毒力*

刘 欢** 朱春亚 张茂新 凌 冰***

(华南农业大学资源环境学院 昆虫生态研究室, 广州 510642)

摘 要 【目的】为研究苦瓜(*Momordica charantia* L.)叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Güenée) 生长发育及生殖力的影响,并探讨其作用机理。【方法】采用饲料混药法测定了苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟幼虫存活率、发育历期和雌成虫产卵量的影响。【结果】用 0.025%、0.1%和 0.2%浓度的苦瓜叶正丁醇萃取物混合饲料饲喂亚洲玉米螟 2 龄幼虫 3 d 后,幼虫存活率明显降低,校正死亡率分别为 27.43%、39.23%和 54.93%,且发育历期明显延长,雌成虫产卵量与对照相比分别下降了 12.63%、22.74%和 37.27%。进一步的研究结果表明,苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾卵巢细胞(SL)的形态、增殖和生长密度有明显的抑制作用。处理后的 SL 细胞皱缩变圆,细胞核偏移甚至消失,胞质外泄。处理 24、48 和 72 h 后,对 SL 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 180.96、158.54 和 122.87 $\mu\text{g/mL}$;处理 6~72 h 后,SL 细胞相对生长密度随药剂浓度和处理时间的增加而明显下降;用 125 $\mu\text{g/mL}$ 浓度处理 SL 细胞 2、3、4 和 5 d 后,SL 细胞对葡萄糖吸收的抑制率分别为 7.66%、13.97%、19.45%和 27.30%。【结论】苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞表现出的较强毒杀作用可能是其导致亚洲玉米螟生殖能力降低的主要作用机制之一。

关键词 苦瓜叶提取物, 亚洲玉米螟, 斜纹夜蛾卵巢细胞, 生物活性, 细胞毒力

Bioactivity of extracts of *Momordica charantia* leaves against *Ostrinia furnacalis* and their cytotoxicity to *Spodoptera litura* ovary cells

LIU Huan** ZHU Chun-Ya ZHANG Mao-Xin LING Bing***

(Laboratory of Insect Ecology, The college of Natural Resource and Environment of South China Agricultural University,
Guangzhou 510642, China)

Abstract [Objectives] To ascertain the effect of n-butyl alcohol extracts of *Momordica charantia* leaves on the growing, development and fecundity of *Ostrinia furnacalis* (Güenée). [Methods] The effects of n-butyl alcohol extracts of *M. charantia* leaves on the survival rate and the developmental duration of *O. furnacalis* larvae and the fecundity of *O. furnacalis* adult females were investigated by adding these extracts to the food provided to *O. furnacalis* larvae and adult females under laboratory conditions. [Results] The results demonstrated that after treating the survival rate of second instar respectively. In addition, developmental duration of treated larvae was significantly longer than that of the control group, and the rates of fecundity inhibition were 12.63%, 22.74% and 37.27%, respectively. Extracts of *M. charantia* leaves had an apparent

* 资助项目: 国家自然科学基金项目(31171849); 华南农业大学资源环境学院科技创新项目

**E-mail: huanhuan446688@126.com

***通讯作者, E-mail: gzhbling@scau.edu.cn

收稿日期: 2013-04-19, 接受日期: 2013-10-10

inhibitory effect on *Spodoptera litura* cell proliferation, cellular morphology and growth density; cells shrunk, cellular nuclei migrated and even disappeared and cytoplasm leaked out after treatment. The IC_{50} values were 180.96, 158.54 and 122.87 $\mu\text{g/mL}$ at 24, 48 and 72 h after treatment, respectively. The growth density of cells decreased significantly compared with control cells, after 6-72 h of exposure with increasing concentration and the treatment time. Treating cells with 125 $\mu\text{g/mL}$ n-butyl alcohol extracts of *M. charantia* leaves for 2, 3, 4 and 5 days inhibited glucose absorption by 7.66, 13.97, 19.45 and 27.30%, respectively. [Conclusion] These results suggest that the n-butyl alcohol extracts of *M. charantia* leaves are strongly cytotoxic to *Spodoptera litura* cells, which may account for the observed decline in female fecundity of *O. furnacalis*.

Key words extracts of *Momordica charantia* leaves, *Ostrinia furnacalis*, *Spodoptera litura* ovary cell, bioactivity, cytotoxicity

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 目前作为食用蔬菜和保健食品已经在全世界广泛种植。苦瓜富含多种生物活性成分, 其果实具有除邪热、降血糖、降血脂、抗氧化等多种功效, 其叶片提取物对多种农作物害虫都表现出明显的抑制生长发育活性 (陈宏等, 1996, 1999; Chandravada *et al.*, 1997; Yasui *et al.*, 1998; 李绍勤等, 2001; Mekuria *et al.*, 2005; 凌冰等, 2008, 2009; 向亚林等, 2009; 杨舒媚等, 2010; 骆颖等, 2012a, 2012b)。凌冰等 (2008) 和骆颖等 (2012a) 的研究结果表明, 苦瓜叶乙酸乙酯提取物对小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus) 和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (Fabricius) 幼虫的生长发育有明显的抑制作用, 特别是斜纹夜蛾雌成虫的产卵量明显减少。有关苦瓜叶提取物对昆虫作用机制的研究报道较少, 对昆虫离体细胞的活性及其作用机理尚不明确。利用离体昆虫细胞代替活体进行毒力测定是一种直接反映化合物毒性作用的检测方法, 为进一步探究苦瓜叶提取物对昆虫的作用机制, 我们测试了苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Güenée) 幼虫存活、生长发育和雌成虫生殖力的影响, 同时测定了苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾离体卵巢培养细胞 (SL) 的毒力, 旨在细胞水平探讨苦瓜叶正丁醇萃取物的杀虫作用机理, 为筛选新型作用机制的生物农药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试昆虫及培养 亚洲玉米螟由作者课题组采用人工饲料在人工气候室内饲养的种群。亚洲玉米螟人工饲料配制参考冯书亮 (1987) 和周大荣等 (1995) 方法。

供试细胞系及培养 供试细胞系为斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞系, 由华南农业大学昆虫毒理研究室张志祥老师惠赠, 并由作者课题组采用常规方法传代培养。细胞培养所用培养基为 Grace's 昆虫干粉培养基 (Gibco 公司产品)、热灭活胎牛血清 (FBS, Gibco 公司产品)、酵母提取物和水解乳蛋白 (Sigma 公司产品), 培养温度为 27°C , 无需 CO_2 , 当单层细胞生长至铺满整个瓶壁时, 用玻璃弯管轻轻吹打成细胞悬液, 以 1:3 的比例传代培养。

供试药剂与试剂 苦瓜叶正丁醇萃取物为作者课题组从苦瓜叶片乙醇提取物中萃取获得的苦瓜叶片正丁醇膏状物; 98% MTT (溴化[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基]四氮唑), 为 Sigma 公司产品; 99.9% DMSO (二甲基亚砜)、丙酮、D-葡萄糖和蒽酮, 为天津科密欧化学试剂有限公司产品。

试验仪器 包括超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司)、SZ-93 自动双重纯水蒸馏器 (上

海亚容生化仪器厂)、Plus 酶标仪(美国 Bio-RELD 公司)、倒置相差显微镜(重庆光电仪器有限公司)、体视显微镜(广州明美光电技术有限公司)、CO₂ 细胞培养箱(赛默飞世尔科技公司)、纯水仪(英国 ELGA Lab Water 公司)、高温高压灭菌锅(日本 HIRAYAMA 公司)、高温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)、移液器(德国 Eppendorf 公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟幼虫生长发育的活性测定

1.2.1.1 不同浓度药液混合饲料的配制 参考冯书亮(1987)和 Nathan 等(2006)的方法,准确称取 1 g 苦瓜叶正丁醇萃取物,用少量丙酮溶解后再用 50%的丙酮水溶剂配制成 1.25、5 和 10 mg/mL 3 个浓度药液,按饲料:药液为 5:1 的比例配制含有 0.025%、0.1%和 0.2%苦瓜叶正丁醇萃取物的混合饲料,以 50%的丙酮水溶液为对照,待混合饲料中的溶剂自然挥发并凝固后,4℃保存备用。

1.2.1.2 幼虫生长发育抑制活性的测定方法 选取同一天蜕皮、生长状态一致、饥饿 4 h 的亚洲玉米螟 2 龄幼虫 20 头为一重复,接入垫有滤纸的培养皿(直径为 9 cm)中,分别以不同浓度的苦瓜叶正丁醇萃取物混合饲料饲喂。每个处理重复 3 次。3 d 后,移入果冻盒(直径为 3.5 cm,高为 4 cm)内换上新鲜饲料单头饲养,每 2 d 换一次饲料。处理后每天记录试虫的龄期和死亡数。

1.2.2 苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟雌成虫产卵量的影响测定 参考骆颖等(2012a)和游灵等(2012)的方法,将用 1.2.1.1 方法饲喂的进入预蛹期的试虫按照不同处理分别放入垫有纱布的塑料盒内让其化蛹。待蛹羽化后,各处理的成虫分别雌雄配对,放入用 A4 纸制作的产卵装

置中让其产卵。以 10%的蜂蜜水作为成虫的补充营养,收集并记录每头雌虫每天的产卵量,直至雌成虫死亡。以上试验均在温度为(27±2)℃、相对湿度为 65%~75%和光照时间为 L:D=14:10 的室内条件下进行。当处理组试虫产卵量与对照组试虫产卵量差异性显著时,按公式(1)计算成虫产卵抑制率:

$$\text{产卵抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组产卵量} - \text{处理组产卵量}}{\text{对照组产卵量}} \times 100 \quad (1)$$

1.2.3 苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞增殖的抑制作用测定 参考 Himeji 等(2007)和李娜等(2010)的 MTT 检测法,苦瓜叶正丁醇萃取物用少量 DMSO 溶解,用细胞培养基稀释药液,控制稀释液中 DMSO 最终含量为 0.5%,以含 0.5% DMSO 的细胞培养基为对照。在 96 孔培养板的每孔内加入 100 μL 处于对数生长期的细胞悬浮液(1×10⁵ 个/mL),孵育 24 h 待 SL 细胞贴壁后,翻转 96 孔培养板将原培养液倒出,然后每孔加入 100 μL 含有不同浓度药剂的培养液,每个处理 10 次重复。在 27℃ CO₂ 细胞培养箱中分别培养 24、48 和 72 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL,轻微震荡后继续培养 4 h,弃去孔内上清液,每孔分别加入 100 μL DMSO 溶液,置室温避光孵育 30 min,等到紫色结晶物完全溶解后,在酶标仪上(n=570 nm)测定各孔吸收值(OD 值),按公式(2)计算细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组 OD 均值} - \text{处理组 OD 均值}}{\text{对照组 OD 均值}} \times 100 \quad (2)$$

1.2.4 苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞生长密度和形态特征的影响测定 参考黄素青等(2010)的方法,在 6 孔培养板每孔中加入 2 mL 处于对数

生长期且生长状态良好的 SL 细胞 (1×10^5 个/mL), 孵育 24 h 待细胞贴壁后, 翻转 6 孔培养板弃去条件培养液, 处理组分别加入 125、250 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 苦瓜叶正丁醇萃取物培养液, 以 0.5% DMSO 溶液为对照, 27°C CO_2 细胞培养箱中继续孵育, 分别于处理 6、12、24、48 和 72 h, 在倒置相差显微镜下随机选择 5 个视野 (面积 $640 \text{ mm} \times 480 \text{ mm}$), 统计 SL 细胞生长密度。并观察 SL 细胞的形态变化, 统计细胞变形率, 拍照。

1.2.5 苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞葡萄糖吸收的影响测定

1.2.5.1 葡萄糖标准曲线的制作 参考张国洲等 (2000) 的方法。取葡萄糖标准溶液 0 (参比管)、0.04、0.08、0.12、0.3 和 0.4 mL 分别加入 6 只试管中, 用双蒸水补充至每管 1 mL, 再分别加入 0.3 mL 蒽酮试剂和 3 mL 浓硫酸, 摇匀后反应 20 min, 每管取 100 μL 加入 96 孔板中, 用酶标仪检测波长为 655 nm 的 OD 值, 每处理重复 3 次。用最小二乘法求出每孔葡萄糖含量与其对应 OD 值的回归直线方程。

1.2.5.2 SL 细胞培养基中葡萄糖含量的测定 参考程东美等 (2007) 的方法。取 6 瓶处于对数期且生长状态良好的 SL 细胞, 用玻璃弯管轻轻吹打成细胞悬浮液, 然后接入 24 孔细胞培养板中, 每孔 1 mL, 孵育 24 h 待细胞贴壁后, 翻转 24 孔板弃去原培养基, 加入含有 125 $\mu\text{g/mL}$ 的苦瓜叶正丁醇萃取物培养液继续培养, 以 0.5% DMSO 培养液为对照。分别于 1、2、3、4 和 5 d 后取 24 孔板培养液 1 mL 加入到 10 mL 试管中, 再分别加入 6 mol/L HCl 溶液 3 mL, 混合均匀后沸水中煮 10 min, 然后静置 20 min。用 6 mol/L NaOH 溶液将培养液调至中性, 再用双蒸水补充至 10 mL, 定性滤纸过滤。取滤液 200 μL 加入

试管中, 用双蒸水补充至 1 mL, 参比管用 1 mL 双蒸水, 分别加入蒽酮试剂 0.3 mL 和浓硫酸 3 mL, 摇匀后反应 20 min, 每管取 100 μL 加入 96 孔板中, 用酶标仪检测波长为 655 nm 的 OD 值, 每处理重复 6 次。将所得 OD 值代入标准曲线方程, 求出实测值。按公式 (3) 计算出 SL 细胞培养基中的葡萄糖含量。

$$\text{SL 细胞培养基中葡萄糖含量 (mg/mL)} = \text{实测值} \times \text{稀释倍数} \quad (3)$$

1.3 数据处理

试验数据应用 SAS 数据处理平台统计分析, 并用邓肯氏新复极差法 (Duncan's multiple range test, DMRT) 和 t -检验对各处理数据进行差异显著性分析。应用 DPS 9.50 统计学软件进行毒力回归分析。

2 结果与分析

2.1 苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟幼虫存活率和发育历期的影响

从表 1 可以看出, 用含有不同浓度苦瓜叶正丁醇萃取物的混合饲料喂养亚洲玉米螟 2 龄幼虫 3 d 后, 幼虫的死亡率明显高于对照组 ($P < 0.05$)。浓度为 0.025%、0.1% 和 0.2% 处理的幼虫校正死亡率分别为 27.43%、39.23% 和 54.93%, 呈显著的浓度效应关系。与对照组相比, 苦瓜叶正丁醇萃取物处理的亚洲玉米螟 2~4 龄幼虫的发育历期均明显延长, 且随着处理浓度的增加, 平均历期也随着延长; 但各处理 5 龄幼虫的平均历期与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟雌成虫产卵量的影响

用含有苦瓜叶正丁醇萃取物 0.025%、0.1% 和 0.2% 的混合饲料饲喂亚洲玉米螟 2 龄幼虫 3 d

后,各处理组中雌成虫的平均产卵量均显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 1),且随着浓度的增加产卵抑制率明显提高,其产卵抑制率分别为 12.63%、22.74%和 37.27%。

表 1 苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟幼虫生长发育的影响

Table 1 Effect of n-butyl alcohol extracts of *Momordica charantia* leaves on the development of *Ostrinia furnacalis* larvae

浓度 (%) Concentration	校正死亡率 (%) Corrected mortality	幼虫历期 Larvae duration (d)				
		2 龄 2 nd instar	3 龄 3 rd instar	4 龄 4 th instar	5 龄 5 th instar	2~5 龄 2 nd -5 th instar
CK	—	1.10±0.10a	2.00±0.02a	1.22±0.04a	5.47±0.04a	9.79±0.02a
0.025	27.43±3.00b	1.41±0.01b	2.27±0.06b	1.29±0.08a	5.50±0.06a	10.46±0.18b
0.1	39.23±3.00ab	1.58±0.05c	2.46±0.05c	1.44±0.04b	5.49±0.13a	10.97±0.11c
0.2	54.93±1.12a	1.79±0.04d	2.61±0.03d	1.84±0.04c	5.41±0.11a	11.65±0.17d

注:表中数据为平均数±标准误,同列数据后字母不同者表示在 0.05 水平差异性显著(邓肯氏新复极差法, $P<0.05$)。表 2 同。

The data in the table are mean±SE, and followed by different letters in the same column indicate significantly different at the 0.05 level (Duncan's multiple range test, $P<0.05$). The same for Table 2.

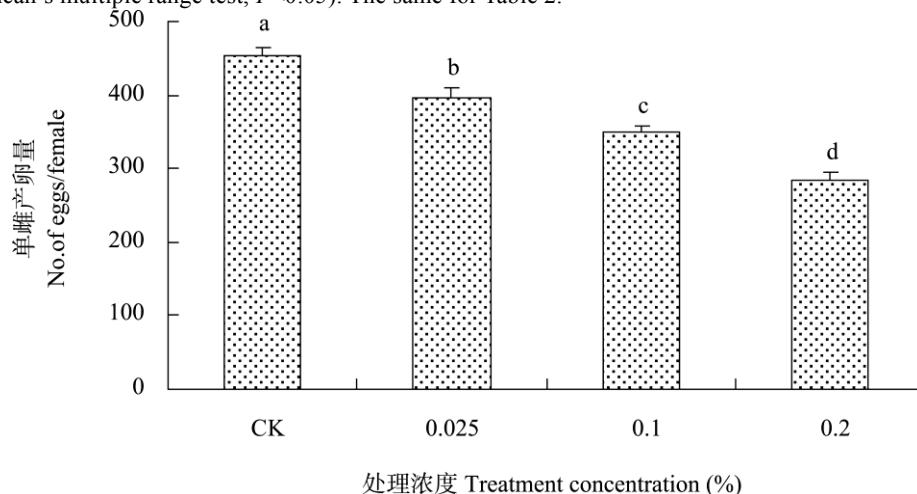


图 1 苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟雌成虫生殖力的影响

Fig. 1 Effect of n-butyl alcohol extracts of *Momordica charantia* leaves on the fecundity of female adults of *Ostrinia furnacalis*

注:柱上字母不同者表示在 0.05 水平差异性显著(邓肯氏新复极差法, $P<0.05$)。

Data with on the column are significantly different at the 0.05 level (Duncan's multiple range test, $P<0.05$).

2.3 苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾 SL 细胞增殖的抑制作用

从表 2 可以看出,不同浓度苦瓜叶正丁醇萃取物作用 SL 细胞 24、48 和 72 h 后,均有良好的增殖抑制作用,且随着处理时间的延长抑制中浓度 (IC_{50}) 明显降低,表明其增殖抑制作用也越来越强。在供试的处理浓度中,250 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 3 个浓度处理对 SL 细胞增殖的抑制作用最为明显。处理 24 h,这 3 个浓度对 SL 细胞的增殖抑制率分别为 46.56%、91.80%和 94.07%;处理 72 h,对 SL 细胞的增殖抑制率分别达 66.88%、96.65%和 96.89%。

2.4 苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾 SL 细胞生长密度的影响

由图 2 可见,苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞生长密度有明显的影响。处理 6~72 h 后,对照组细胞的生长密度呈直线性增加,由 37.8 个/视野逐渐增加到 73.0 个/视野。浓度为 125 $\mu\text{g/mL}$ 的苦瓜叶正丁醇萃取物处理组 SL 细胞在 24 h 前的生长密度是逐渐增加的,与对照组差异不显著,但随着处理时间的延长 SL 细胞的生长密度明显减少,在 48 h 和 72 h,其生长密度分别为

57.6 个/视野和 49.2 个/视野,与对照差异显著。250 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 两个浓度处理在 6~72 h 时的 SL 细胞生长密度均明显少于对照。处理 72 h,250 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 处理的 SL 细胞密度分别为 27.6 个/视野和 16.0 个/视野。说明苦瓜叶正丁醇萃取物能显著降低 SL 细胞的数量。

2.5 苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾 SL 细胞形态特征的影响

图 3 显示了在倒置相差显微镜下观察到的不同浓度苦瓜叶正丁醇萃取物处理斜纹夜蛾 SL 细胞不同时间后的形态特征变化。处理 6~72 h 后,对照组的 SL 细胞伸展状态和长势良好,细胞呈梭形或纺锤形贴壁生长,细胞核均匀居于细胞质中央,细胞界限清晰(图 3: A~E);而处理组的 SL 细胞皱缩变圆变小,细胞核固缩或碎裂,细胞膜受损并有空泡现象,部分细胞脱落漂浮于培养基中(图 3: F~T)。125 $\mu\text{g/mL}$ 苦瓜叶正丁醇萃取物处理 24、48 和 72 h 后,细胞皱缩变圆和有明显的空泡现象(图 3: F~J),细胞变形率分别为 32.48%、48.93%和 58.70%。随着苦瓜叶正丁醇萃取物处理浓度的增加,变形细胞出现的

表 2 苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾 SL 细胞增殖的抑制作用

Table 2 Comparison of growth inhibition effect by n-butyl alcohol extracts of *Momordica charantia* leaves on SL cells

处理时间 Treatment time (h)	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Correlation coefficient	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
24	$y=0.0094+2.2106x$	0.9584	180.9577a
48	$y=0.2189+2.1731x$	0.9723	158.5363b
72	$y=0.3263+2.2368x$	0.9600	122.8735c

* 资助项目: 国家自然科学基金项目 (31171849); 华南农业大学资源环境学院科技创新项目

**E-mail: huanhuan446688@126.com

***通讯作者, E-mail: gzhbling@scau.edu.cn

收稿日期: 2013-04-19, 接受日期: 2013-10-10

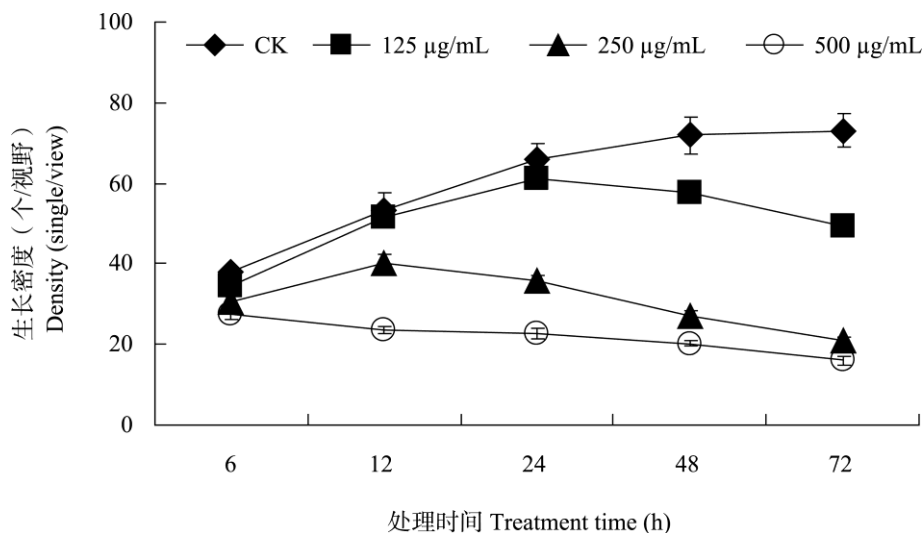


图 2 苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞生长密度的影响

Fig. 2 Effect of n-butyl alcohol extracts of *Momordica charantia* leaves on the density of SL cells

时间明显提前,细胞变形率迅速增加。250 µg/mL 处理 6 h 和 12 h 后,细胞变形率分别达 58.51% 和 65.35%,细胞核发生明显地偏移(图 3: K~L); 处理 24、48 和 72 h 后,可见细胞膜受损破裂、核消失和出泡现象(图 3: M~O),细胞变形率分别达到 83.22%、90.33%和 96.26%。500 µg/mL 处理 6 h 就可看见大量细胞严重皱缩并漂浮于培养基中(图 3: P),细胞形变率高达 80.91%,处理 12~72 h 后,观察到大量小颗粒和细胞碎片散布在培养基中(图 3: Q~T),此时细胞几乎全部变形坏死。这些结果表明,苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞有很强的毒杀活性。

2.6 苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾 SL 细胞吸收葡萄糖能力的影响

经计算,葡萄糖含量的标准曲线的回归方程为: $y = 0.1079x - 0.0134$ ($R^2=0.9956$)。由表 3 可知,对照组培养基中葡萄糖含量随着 SL 细胞培养时间的延长明显降低,表明 SL 细胞由于正常的分裂增殖和新陈代谢等生命活动从培养基中吸收了一定量的葡萄糖。用 125 µg/mL 苦瓜叶正丁醇萃取物处理的培养基中葡萄糖含量在处理 1 d 时与对照差异不显著,在处理 2~5 d 后培养基中葡萄糖含量虽然也随着 SL 细胞培养时间

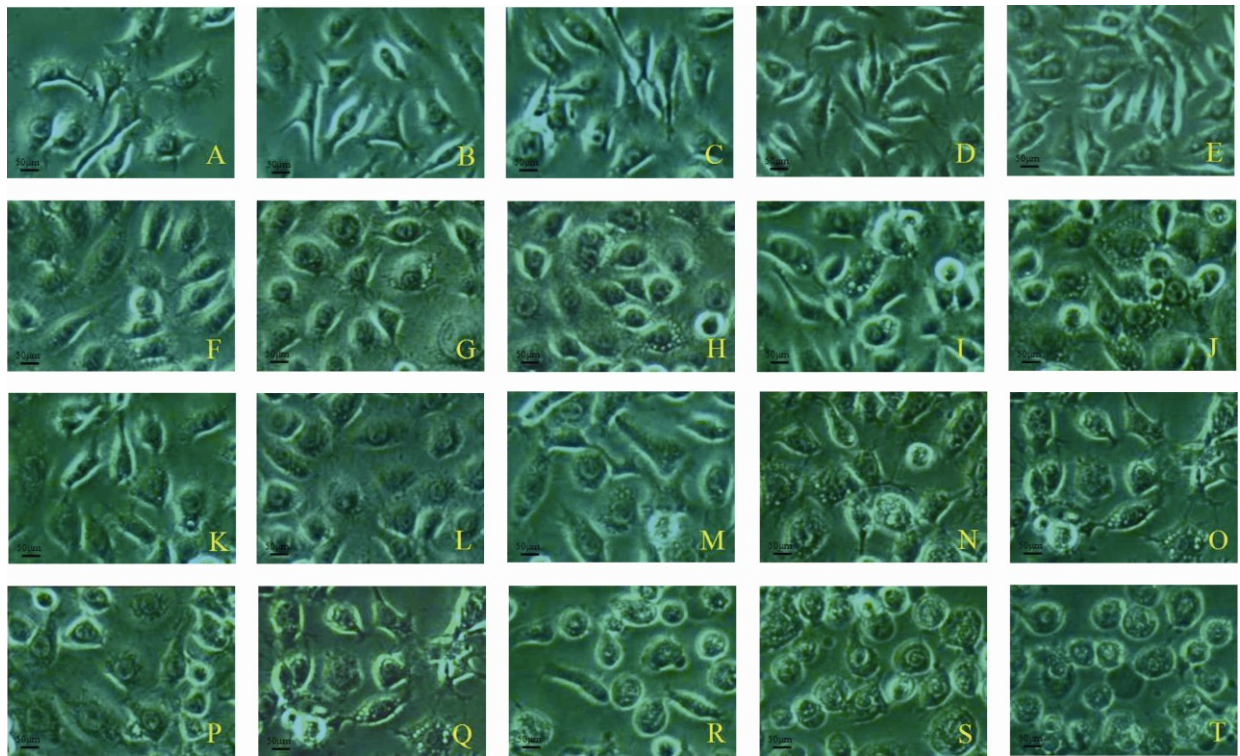


图 3 苦瓜叶正丁醇萃取物处理 SL 细胞后形态特征变化 (10×25)
Fig. 3 Morphological changes of SL cells after treatment with n-butyl alcohol extracts of *Momordica charantia* leaves (10×25)

A-E :对照组 Control cells ;F-J :125 µg/mL 苦瓜叶正丁醇萃取物处理 6、12、24、48 和 72 h Cells treated with 125 µg/mL n-butyl alcohol extracts of *M. charantia* leaves for 6、12、24、48 and 72 h ;K-O :250 µg/mL 苦瓜叶正丁醇萃取物处理 6、12、24、48 和 72 h Cells treated with 250 µg/mL n-butyl alcohol extracts of *M. charantia* leaves for 6、12、24、48 and 72 h ; P-T :500 µg/mL 苦瓜叶正丁醇萃取物处理 6、12、24、48 和 72 h Cells treated with 500 µg/mL n-butyl alcohol extracts of *M. charantia* leaves for 6、12、24、48 and 72 h.

表 3 苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞葡萄糖吸收能力的影响
Table 3 Effect of n-butyl alcohol extracts of *Momordica charantia* leaves on glucose absorbing of SL cells

药剂浓度 (µg/mL) Drug concentration	培养基中葡萄糖含量 Glucose content in the medium (mg)				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
CK	11.66±0.95	9.53±0.58	8.52±0.87	7.66±0.40	6.96±0.83
125	10.57±0.61	10.26±0.81*	9.71±0.94*	9.15±0.86*	8.86±0.80*

注：表中数据为平均数±标准误，*表示不同处理时间的数据与对照相比在 0.05 水平差异性显著 (*t*-检验，*P*<0.05)。
The data in the table are mean±SE. * indicates significant difference between the data after different treatment time and the

* 资助项目：国家自然科学基金项目 (31171849)；华南农业大学资源环境学院科技创新项目

**E-mail: huanhuan446688@126.com

***通讯作者，E-mail: gzhbling@scau.edu.cn

收稿日期：2013-04-19，接受日期：2013-10-10

control at the 0.05 level (*t*-test, $P < 0.05$).

的延长有所下降,但均明显地高于对照 ($P < 0.05$),说明苦瓜叶正丁醇萃取物对 SL 细胞葡萄糖吸收能力有明显的抑制作用。

3 讨 论

本研究结果表明,苦瓜叶正丁醇萃取物对亚洲玉米螟幼虫的生长发育及存活率均有明显的抑制作用,对其雌成虫的产卵量也有显著的抑制作用,这与骆颖等(2012a)的研究结果一致。骆颖等(2012b)报道,苦瓜叶乙酸乙酯萃取物对斜纹夜蛾幼虫生长发育的影响机制之一是其抑制了斜纹夜蛾幼虫中肠内蛋白酶和淀粉酶的活性。

本研究用 MTT 法测定苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾 SL 细胞的毒力结果表明,苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾 SL 细胞的增殖有明显的抑制作用,能显著减少 SL 细胞的生长密度。MTT 法是利用活细胞线粒体呼吸链中琥珀酸脱氢酶对 Teterzolium (简称 MTT) 的还原作用来评价不同处理细胞中琥珀酸脱氢酶活性及细胞存活能力的一种方法(周青春等,1998)。昆虫细胞是构成昆虫活体的基本单位,是昆虫进行物质代谢与能量交换的重要场所,细胞的生长状态会直接影响到昆虫的生命活动(彩万志,2001)。线粒体是细胞内氧化磷酸化和形成 ATP 的主要场所,为细胞提供各种功能活动所需的能量。苦瓜叶正丁醇萃取物能够抑制 SL 细胞线粒体呼吸链中琥珀酸脱氢酶的活性,使细胞内物质代谢及其能量产生受阻。用苦瓜叶正丁醇萃取物处理斜纹夜蛾 SL 细胞后,出现细胞膜皱缩、细胞变圆、细胞核偏移或消失以及空泡和胞质外泄等细胞形态结构和骨架结构破坏等现象。细胞形态学的变化

是判断细胞凋亡的有力证据,也是表现细胞长势和生命力的重要指标,同时能直观的反应出化合物的生物活性(冯红林等,2011;余倩,2011)。微管和微丝是支撑细胞骨架、维持细胞形态结构的主要成分,一旦细胞骨架功能受到抑制,必定会对细胞的正常生长和新陈代谢造成极大地影响(李文欧等,2008)。苦瓜叶正丁醇萃取物对斜纹夜蛾 SL 细胞形态和结构的破坏严重影响了 SL 细胞对葡萄糖的吸收。正是上述原因,SL 细胞数量的逐渐减少严重影响了卵巢管的发育和卵母细胞的形成(李有志等,2009),从而导致斜纹夜蛾和亚洲玉米螟生殖力显著降低(骆颖等,2012a)。

目前,从苦瓜叶提取物中分离到的杀虫活性成分主要是一类葫芦烷型四环三萜类化合物,如 momordicin I、momordicin II、momordicin IV 等(Yasui *et al.*, 1998; Mekuria *et al.*, 2005; 凌冰等,2008,2009;向亚林等,2009;任立云等,2010)。我们已从苦瓜叶正丁醇萃取物中分离得到 momordicin I 和 momordicin II 等化合物,有关这些化合物对昆虫离体细胞的作用机理尚未见报道,本研究为进一步了解和揭示这些活性物质的作用机制奠定了基础。

致谢:本研究得到张清鹏硕士生和卢梦玲硕士生的热情关心和帮助,特此致谢。

参考文献 (References)

- Chandravadana MV, Nidiry ESJ, Venkateshwarlu G, 1997. Antifungal activity of momordicines from *Momordica charantia*. *Fitoterapia*, 68(4): 383–384.
- Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Nishio K, Yamamoto H, Tasaka K, Mimura A, 2007. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing

- flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer Letters*, 245: 269–274.
- Mekuria DB, Kashiwagi T, Tebayashi S, Kim CS, 2005. Cucurbitane triterpenoid oviposition deterrent from *Momordica charantia* to the leafminer, *Liriomyza trifolii*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 69(9): 1706–1710.
- Nathan SS, Sehoon K, 2006. Effects of *Melia azedarach* L. extract on the teak defoliator *Hyblaea puera* Cramer (Lepidoptera: Hyblaeidae). *Crop Protection*, 25(3): 287–291.
- Yasui H, Kato A, Yazawa M, 1998. Antifeedants to armyworms, *Spodoptera litura* and *Pseudaletia separata*, from bitter gourd leaves, *Momordica charantia*. *Journal Chemical Ecology*, 24(5): 803–813.
- 彩万志, 庞雄飞, 梁广文, 2001. 普通昆虫学. 北京: 中国农业大学出版社. 124–126. [CAI WZ, PANG XF, LIANG GW, 2001. Basic Entomology. Beijing: China Agricultural University Press. 124–126.]
- 陈宏, 刘映红, 邓新平, 赵志模, 1996. 苦瓜叶片提取液对家蚕和菜青虫取食、生长和存活的影响. 西南农业学报, 3(9): 68–71. [CHEN H, LIU YH, DENG XP, ZHAO ZM, 1996. Effects of the extracts of balsam pear leaves on feeding, growth and survival of larvae of *Bombyx mori* and *Piers rapae*. *Southwest China Journal of Agriculture Scientia*, 3(9): 68–71.]
- 陈宏, 靳阳, 董华, 彭永康, 1999. 不同浓度苦瓜叶片提取液对小菜蛾幼虫行为及存活的影响. 华北农学报, 14(4): 117–121. [CHENG H, JIN Y, DONG H, PENG YK, 1999. Effects of Extracts of Balsam Pear Leaves on Life and Behavior of *Plutella xylostella* L. *Acta Agriculturae Boreali Sinica*, 14(4): 117–121.]
- 程东美, 张志祥, 胡美英, 2007. 闹羊花素III对斜纹夜蛾细胞系的活性及作用机理. 昆虫学报, 50(10): 1022–1026. [CHENG DM, ZHANG ZX, HU MY, 2007. Bioactivity of rhodojaponin-III on *Spodoptera litura* cells and its mechanism. *Acta Entomologica Sinica*, 50(10): 1022–1026.]
- 冯红林, 孙红岩, 李克斌, 席景会, 尹姣, 曹雅忠, 2011. 昆虫飞行肌细胞凋亡的分子生物学研究进展. 应用昆虫学报, 48(3): 701–709. [FENG HL, SUN HY, LI KB, XI JH, YIN J, CAO YZ, 2011. Progress of molecular biology researches in insect flight muscle cell apoptosis. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(3): 701–709.]
- 冯书亮, 1987. 一种玉米螟生物测定的新方法. 昆虫知识, (3): 189. [FENG SL, 1987. A new method of corn borer bioassay. *Kunchong Zhishi*, (3): 189.]
- 黄素青, 张志祥, 徐汉虹, 童松, 2010. Interruptin B 对小菜蛾和亚洲玉米螟幼虫的拒食活性及对斜纹夜蛾卵巢细胞的毒力. 昆虫学报, 53(10): 1104–1110. [HUANG SQ, ZHANG ZX, XU HH, TONG S, 2010. Antifeedant activity of Interruptin B against *Plutella xylostella* and *Ostrinia furnacalis* and cytotoxicity against *Spodoptera litura* ovary cells. *Acta Entomologica Sinica*, 53(10): 1104–1110.]
- 李娜, 宋德寿, 张志祥, 徐汉虹, 2010. 氯丙炔菊酯及其衍生物对斜纹夜蛾的细胞毒力. 植物保护学报, 37(1): 49–54. [LI N, SONG DS, ZHANG ZX, XU HH, 2010. Cytotoxicity of lvbqingquejuzhi and its derivative to *Spodoptera litura* cells, *Acta Phytophylacica Sinica*, 37(1): 49–54.]
- 李绍勤, 邓望喜, 张求东, 2001. 苦瓜叶片提取液对美洲斑潜蝇杀虫作用与生长发育的影响. 华中农业大学学报, 20(6): 539–543. [LI SQ, DENG XW, ZHANG QD, 2001. The killing action and growth influence of *Momordica charantia* extracts on *Liriomyza sativae*. *Journal of Huazhong Agriculture University*, 20(6): 539–543.]
- 李文欧, 徐汉虹, 张志祥, 廖绍裕, 2008. 印楝素 A 对粉纹夜蛾 Hi-5 细胞的毒性机理. 昆虫学报, 51(8): 824–829. [LI WO, XU HH, ZHANG ZX, LIAO SY, 2008. Mechanism of cell toxicity of azadirachtin A to *Trichoplusia ni* Hübner Hi-5 cells. *Acta Entomologica Sinica*, 51(8): 824–829.]
- 李有志, 杨海君, 徐汉虹, 刘仲华, 高必达, 张瑞峰, 周志成, 2009. 12a-羟基鱼藤酮对斜纹夜蛾生殖力的影响及其作用机理. 昆虫学报, 52(3): 267–273. [LI YZ, YANG HJ, XU HH, LIU ZH, GAO BD, ZHANG RF, ZHOU ZC, 2009. Effect of 12a-hydroxyrotenone on the fecundity of *Prodenia litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) and its mechanisms, *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 267–273.]
- 凌冰, 王国才, 轧霁, 张茂新, 梁广文, 2008. 苦瓜叶提取物对小菜蛾的拒食活性及有效成分研究. 中国农业科学, 41(10): 3116–3122. [LING B, WANG GC, YA J, ZHANG MX, LIANG GW, 2008. Studies on antifeeding activity and active ingredients against *Plutella xylostella* from *Momordica charantia* leaves. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(10): 3116–3122.]
- 凌冰, 向亚林, 王国才, 陈少华, 张茂新, 2009. 苦瓜叶提取物对美洲斑潜蝇取食和产卵行为的抑制作用. 应用生态学报, 20(4): 836–842. [LING B, XIANG YL, WANG GC, CHENG SH, ZHANG MX, 2009. Antifeedant and antioviposition activities of *Momordica charantia* leaf ethanol extract against *Liriom sativae*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 20(4): 836–842.]
- 骆颖, 凌冰, 谢杰锋, 张茂新, 2012a. 苦瓜叶乙酸乙酯提取物对斜纹夜蛾实验种群的抑制作用. 生态学报, 32 (13) : 4173–4180. [LUO Y, LING B, XIE JF, ZHANG MX, 2012a. Inhibition effects of ethyl acetate extracts of *Momordica charantia* leaves on the experimental population of *Spodoptera*

- litura*. *Acta Ecologica Sinica*, 32 (13) : 4173–4180.]
- 骆颖, 张茂新, 凌冰, 2012b. 苦瓜叶乙酸乙酯萃取物对斜纹夜蛾消化酶活性的影响. *环境昆虫学报*, 34(3): 289–294. [LOU Y, ZHANG MX, LING B, 2012b. Effects of ethyl acetate extracts of *Momordica charantia* leaves on digestive enzymes of *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal of Environmental Entomology*, 34(3): 289–294.]
- 向亚林, 凌冰, 王国才, 罗集丰, 张茂新, 2009. 苦瓜茎叶中葫芦烷三萜化合物对小菜蛾幼虫的拒食作用. *华南农业大学学报*, 30(3): 13–17. [XIANG YL, LING B, WANG GC, LUO JF, ZHANG MX, 2009. Antifeeding activity of cucurbitane triterpenoid from *Momordica charantia* leaves to *Plutella xylostella*. *Journal of South China Agriculture University*, 30(3): 13–17.]
- 杨舒媚, 郑维娜, 王玉焱, 凌冰, 2010. 苦瓜叶提取物对黄曲条跳甲成虫的拒食作用. *中国生物防治*, 26: 34–39. [YANG SM, ZHENG WN, WANG YY, LING B, 2010. Antifeeding activity of extract from *Momordica charantia* leaves against *Phyllotreta striolata* adults. *Chinese Journal of Biological Control*, 26: 34–39.]
- 游灵, 田生荣, 刘伟, 魏洪义, 王广利, 2012. 苯甲酰胺类杀虫剂对亚洲玉米螟生长发育和繁殖的效用. *应用昆虫学报*, 49(6): 1565–1571. [YOU L, TIAN SR, LIU W, WEI HY, WANG GL, 2012. Effects of benzoylphenylurea insecticides on development and reproduction of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(6): 1565–1571.]
- 余倩, 2011. 斜纹夜蛾核多角体病毒诱导甜菜夜蛾细胞凋亡的研究. *中山大学学报 (自然科学版)*, 50(4): 79–83. [YU Q, 2011. Apoptosis of se301 cells induced by *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 50(4): 79–83.]
- 张国洲, 王亚维, 徐汉虹, 2000. β -谷甾醇等化合物对昆虫整体糖原含量的影响. *青海大学学报 (自然科学版)*, 15(5): 7–9. [ZHANG GZ, WANG YW, XU HH, 2000. Affection of β -sitosterol etal on the content of glycogen of the insect. *Journal of Qinghai University*, 15(5): 7–9.]
- 周大荣, 何康来, 文丽萍, 1995. 玉米螟综合防治技术. 北京: 金盾出版社. 102–104. [ZHOU DR, HE KL, WEN LP, 1995. Corn borer comprehensive prevention and control technology. Beijing: Jindun Press. 102–104.]
- 周青春, 洪华珠, 罗勤, 万树青, 汪虹, 彭建新, 1998. 测定昆虫细胞存活或死亡的 MTT 方法的改进. *昆虫知识*, 35(3): 165–167. [ZHOU QC, HONG ZH, LUO Q, WAN SQ, WANG H, PENG JX, 1998. Improvement of MTT method for determing the viability of insect cell. *Entomological Knowledge*, 35(3): 165–167.]