应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2018, 55(3): 464–473. DOI: 10.7679/j.issn.2095–1353.2018.059

斑蝥素类衍生物对粘虫胃毒活性及解毒酶系的影响*

席 娜** 孙 红 孙文博 郑胜礼 张雅林***

（西北农林科技大学植物保护学院，植保资源与病虫害治理教育部重点实验室，杨凌 712100）

摘 要 **【目的】** 筛选斑蝥素衍生物，寻找高效、低毒、低残留的新型化合物研发杀虫剂。**【方法】** 采用生物测定和酶活性测定方法，对 100 种斑蝥素类衍生物进行筛选，采用叶碟饲喂法测定其对粘虫 3 龄幼虫的胃毒活性；测定亚致死剂量下试虫体内解毒酶系的活性变化。**【结果】** 通过生物测定发现斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#的杀虫活性优于去甲斑蝥素，Ⅰ-7#与斑蝥素对粘虫的胃毒 LC_{50} 值相近，其 LC_{50} 分别为 49.818 μg/mL 和 43.677 μg/mL。酶活性测定结果表明：斑蝥素、斑蝥素衍生物去甲斑蝥素、Ⅰ-7#和Ⅳ-13#对粘虫解毒酶系酶比活力均有不同程度的影响，其中对细胞色素 P450 酶比活力有明显的抑制活性，对羧酸酯酶比活力有不同程度的激活作用，而对谷胱甘肽 *S*-转移酶比活力大体表现出先激活后抑制的活性。**【结论】** 斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#对鳞翅目害虫有较强杀虫活性,具有作为生物源农药加以开发利用的价值。

关键词 斑蝥素衍生物，粘虫，生物测定，解毒酶

The effect of cantharidin derivatives on the stomach poison activity to *Mythimna separata* and its detoxification enzyme system

XI Na** SUN Hong SUN Wen-Bo ZHENG Sheng-Li ZHANG Ya-Lin***

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

Abstract **[Objectives]** Screening from cantharidin derivatives to find high efficient, low toxic and residual chemicals for R&D of new pesticides. **[Methods]** Using bioassay and enzymatic determination methods to test 100 cantharidin derivatives. Stomach poison activity to the 3rd-instar larvae of *Mythimna separata* was tested by using leaf disc feeding method and their activity of the detoxification enzyme system was determined by sublethal dose. **[Results]** Bioassay results suggested that the effects of the derivatives Ⅰ-7# and Ⅳ-13# were better than norcantharidin; the stomach poison LC_{50} of Ⅰ-7# was similar to cantharidin and their LC_{50} were 49.818 and 43.677,μg/mL respectively. The results of enzyme activity assay elucidated that cantharidin and its derivatives norcantharidin, Ⅰ-7# and Ⅳ-13# influenced detoxifying enzyme system of *M. separata* in different degrees. Among them, the specific activity of cytochrome P450 (P450) significantly reduced while carboxylesterase (CarE) is activated in different degrees by the cantharidin derivatives, and the specific activity of glutathione *S*-transferase (GST) generally showed activation at first and then inhibition. **[Conclusion]** Cantharidin derivatives Ⅰ-7# and Ⅳ-13# have strong insecticidal activity against lepidopteran pests and are of value for development and utilization as biopesticides.

Key words cantharidin derivatives, *Mythimna separata*, bioassay, detoxification enzyme

近些年来，随着化学农药不断施用，有害生物抗药性逐代累积，许多化学农药对抗性昆虫的杀虫效率下降（李凡海和王桂清，2014；殷邵鑫等，2016）。生物源农药因具有资源来源广泛、

*资助项目 Supported projects：国家公益性行业（农业）科研专项（200903052）和陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项（2007ZDKG-14）

**第一作者 First author，E-mail：531512495@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yalinzh@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received：2018-03-19，接受日期 Accepted：2018-04-16

易降解、低残留等优点，能有效防治病、虫、害等，成为新农药研发热点（张雅林等，2003；冯健雄和张雅林，2007；杨峻等，2014）。相较于微生物源农药和植物源农药，动物源农药研究尚不深入（马志卿和张兴，2000；张兴等，2015）。

斑蝥素(Cantharidin，CTD)是存在于鞘翅目(Coleoptera)芫菁科（Meloidae）昆虫体内的倍半萜类化合物，对芫菁的天敌起防御作用（Mahmood *et al.*，2007）。斑蝥素对鞘翅目、膜翅目、双翅目、鳞翅目、半翅目的昆虫均有不同程度的毒杀作用（李晓飞等，2007；刘瑞瑞等，2010）。然而由于斑蝥素生物合成途径尚未明确，人工合成途径复杂，芫菁的大规模饲养尚未能实现，同时合成斑蝥素高昂的成本以及强烈的毒副作用制约着斑蝥素作为农药的施用（Grieco *et al.*，1990；殷幼平和靳贵晓，2010)。因此选择与斑蝥素具有相似理化性质的替代物成为解决该问题的一个重要途径。

近年来许多研究者合成了多种斑蝥素衍生物，如去甲斑蝥素、羟基斑蝥胺和斑蝥酸钠等，其毒副作用均小于斑蝥素（黄兰和游文玮，2009）。去甲斑蝥素（Norcantharidin，NCTD）由于人工合成途径简单，且与斑蝥素有相似的毒杀效果，具有广泛的应用前景（曾文南和卢懿，2006；陈勇等，2009)。研究表明，去甲斑蝥素可制备成微乳、脂质体、纳米粒等剂型，对人胃癌 SGC-7901 细胞有抑制作用，在抗肿瘤药物研发上有很大的发展前景（牛砚涛等，2013)。另一方面，其与毒死蜱混配后，对小菜蛾 *Plutella xylostella* L.的防治有明显的增效作用（张奇峰等，2014；石铖等，2016)，并且对苹果树腐烂病菌、苹果轮纹病菌、白菜黑斑病菌、黄瓜菌核病菌的菌丝生长有明显的抑制作用（曹微丹等，2008)。部分研究者还通过酰化反应等对化合物进行取代和结构的多重修饰，以期寻找具有高效杀虫活性的新型斑蝥素类化合物（张雅林等，2013；黄文盈等，2015）。

粘虫 *Mythimna separata* 是我国主要农业害虫，具有危害范围广、数量大、暴食期和群聚性等特点（姜玉英等，2014）。目前，拟除虫菊酯类和有机磷类化学杀虫剂对粘虫的毒杀效果较好，但由于害虫抗药性累积和环境污染问题日益严重，寻找替代物进行粘虫的防治已迫在眉睫（张云惠等，2012）。杀虫剂毒杀害虫时，昆虫的解毒酶系参与生物体内的许多氧化还原反应，对农药在昆虫体内的代谢发挥着极其重要的作用（邱星辉和冷欣夫，2002；汪英英和胡兆农，2016）。因此，本研究以斑蝥素类衍生物去甲斑蝥素为先导化合物修饰合成的一批衍生物为筛选样品，通过生物活性测定方法明确其对粘虫的毒杀作用，以寻找具有高效、低毒和易得的斑蝥素类杀虫剂。同时，通过对昆虫解毒酶系细胞色素 P450（Cytochromep450，P450)、谷胱甘肽 *S*-转移酶（Glutathione *S*-transferase，GST）和羧酸酯酶（Carboxylesterase，CarE）的酶比活力测定，明确昆虫对斑蝥素类衍生物的解毒活性，为进一步探究斑蝥素类衍生物的杀虫机理和解决害虫抗性问题提供依据。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

粘虫 *Mythimna separata*（Walker)：由西北农林科技大学昆虫博物馆提供，为室内自然条件下经过长期累代饲养，未接触任何杀虫剂的敏感种群。

1.2　实验仪器

RADWAG AS.X2 双量程半微量天平（波兰瑞德威)，ZPQ-280B 人工气候箱（黑龙江东拓仪器有限公司)，Infinite M200 PRO 型酶标仪（Tecan，瑞士)，Sorrval biofuge stratos 大型冷冻离心机（Thermol scientific)，HB 120-S 金属浴加热器（美国 Scilogex 公司)，微量移液枪（Eppendorf)。

1.3　供试试剂

斑蝥素：纯度≥95%，西北农林科技大学昆虫博物馆植保资源利用实验室提取。将斑蝥素纯品溶于丙酮水溶液（水：丙酮=1：1)，制成 500 μg/mL 的母液（含 0.5%吐温-80)。

斑蝥素类衍生物：西北农林科技大学昆虫博物馆植保资源利用实验室合成。将衍生物分别溶于丙酮水溶液（水：丙酮=1：1），初筛浓度定为 500 μg/mL，根据初筛结果设定复筛实验的药液浓度（含 0.5% 吐温-80）。

其它试剂：BCA 蛋白定量试剂盒购自西安赫特生物公司，还原型辅酶Ⅱ（NADPH）购自美国 Roche 公司，SDS 购自美国 Amresco 公司，还原型谷胱甘肽（Glutathione，GSH）购自上海 Sigma-Aldrich 公司，Tris、对硝基苯甲醚和 1-氯-2，4 二硝基苯（CDNB）购自北京索莱宝公司，乙酸-1-奈酯（α-NA）和固蓝 B 盐购自上海阿拉丁公司，丙酮、吐温-80 为分析纯试剂，购自天津博迪化工有限公司。

1.4 供试斑蝥素类衍生物

供试斑蝥素类衍生物及其化学结构式见图 1。

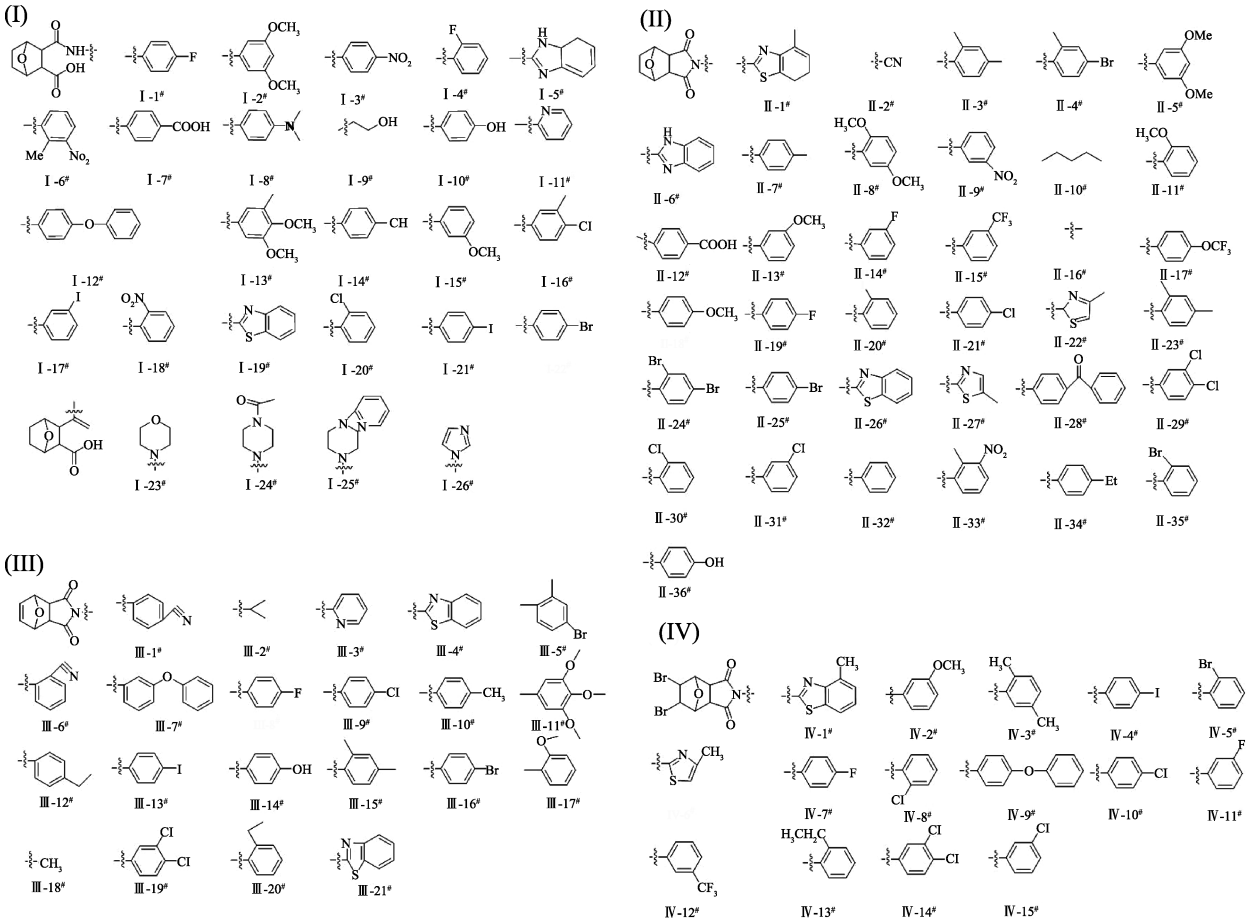

图 1 斑蝥素类衍生物编号及其化学结构式

Fig. 1 Numbers and chemical structural formulas of cantharidin derivatives

Ⅰ为开环类斑蝥素衍生物，Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ为闭环类斑蝥素衍生物。

Ⅰ: Ring-opened cantharidin derivatives, Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ: Ring-closed cantharidin derivatives.

1.5 试验设计与方法

1.5.1 生物测定方法 室内生物活性测定采用叶碟饲喂法（张兴和赵善欢，1983）。试验前挑选大小一致且健康的粘虫 3 龄幼虫，饥饿 4-5 h 后供试，用打孔器打取大小一致的新鲜玉米叶碟，药剂浸渍叶碟 3-5 s 后取出，放置于吸水纸上并自然晾干；将同一药剂浓度处理的 10 片叶碟放入培养皿中，然后加入已饥饿处理的试虫 10 头；放入人工气候箱中（温度（25±1）℃，

相对湿度 60% ± 5%，16∶8 的光周期），记录 48 h 后试虫死亡情况，计算死亡率。以丙酮作对照，初筛药剂浓度为 500 μg/mL，每处理重复 3 次。根据初筛结果设定复筛实验的药液浓度。

1.5.2　酶源制备　药剂处理饥饿 12 h 的粘虫 3 龄幼虫，用丙酮作对照。分别在饲喂 6、12、24、36 和 48 h 后取处理及相应的对照试虫，并挑选健康且大小一致的处理及对照试虫 3 头，置于加有 1 mL 预冷缓冲液的研磨器内，冰浴中匀浆，冷冻离心（14 000 r/min，4 ℃，30 min）后,取上清液，保存于 - 20 ℃，作为酶源备用。P450、GST 和 CarE 对应的缓冲液分别为 100 mmol·L^{-1} pH7.8 磷酸钠、50 mmol·L^{-1} pH7.2 磷酸钠和 25 mmol·L^{-1}/1 mmol·L^{-1}，pH7.0 Tris-HCl/$CaCl_2$（含 1 mmol·L^{-1} 二硫苏糖醇）,每处理重复 3 次。按 BCA 法测定总蛋白浓度。

1.5.3　酶比活力测定

1.5.3.1　细胞色素 P450　细胞色素 P450 酶比活性测定（Yang *et al.*，2004）。反应体系包括：180 μL 2 mmol·L^{-1} 磷酸钠-对硝基苯甲醚、10 μL 9.6 mmol·L^{-1} NADPH 和 10 μL 酶源。30 ℃反应 2 h 后，将 200 μL 反应液加至酶标板，405 nm 处测定吸光值。以缓冲液代替酶源、不添加 NADPH 作为空白对照，每处理重复 3 次。以对硝基苯酚作标准曲线,酶比活力单位为：pmol/mg pro/min。

1.5.3.2　谷胱甘肽 *S*-转移酶　谷胱甘肽 *S*-转移酶比活性测定（Rodriguez *et al.*，2011）。反应体系包括：186 μL 50 m mol·L^{-1} pH7.2 磷酸钠缓冲液、2 μL 0.1 mmol·L^{-1} GSH、10 μL 30 mmol·L^{-1} CDNB 和 2 μL 酶源。混匀后立即将 200 μL 反应液加至酶标板，340 nm 处测定吸光值 $A_{340}t_0$ 和 1 min 后吸光值 $A_{340}t_1$。以缓冲液代替酶源作空白对照，每处理重复 3 次。根据消光系数和 1 min 内吸光值的变化（$A_{340}t_1$-$A_{340}t_0$）计算不同样本的酶比活力。按以下公式计算 GST 的活力单位（nmol/mg pro/min）。

$$\text{GST 活力单位(U/mg)}=\frac{\Delta A}{\min}\times\frac{10^6 V_{总}}{\varepsilon d V_{样}}$$

式中 ΔA_{340}：每分钟吸收的变化值；$V_{总}$：酶促反应的总体积（μL）；10^6：摩尔分子换算成非摩尔分子；ε：产物的消光系数（9.6 mmol·L^{-1}/cm）；$V_{样}$：所用样品体积（μL）。

1.5.3.3　羧酸酯酶　羧酸酯酶比活性测定（Rodriguez *et al.*，2011）。反应体系包括：190 μL 25 mmol·L^{-1}/1mmol·L^{-1} pH7.0 Tris-HCl/$CaCl_2$（含 1 mmol·L^{-1} 二硫苏糖醇）、5 μL 0.1 mmol·L^{-1} α-NA 和 5 μL 酶源。混匀后于 25 ℃反应 10 min，加入 25 μL 0.42% SDS 和 25 μL 0.2% 固蓝 B 盐，在黑暗条件下室温终止反应并显色。30 min 后将 200 μL 反应液加至酶标板，600 nm 处测定吸光值。以缓冲液代替酶源作空白对照，每处理重复 3 次。以 α-萘酚作标准曲线，酶比活力单位为：nmol/mg pro/min。

1.6　数据统计分析

毒力测定结果采用卡方检验（χ^2）进行分析（P<0.05），采用 SPSS 软件计算试虫死亡率、LC_{50} 及其 95%置信限。LC_{50} 的 95%置信区间相交的斑蝥素衍生物表明活性差异不显著(Springate and Colvin，2012)。酶比活力测定结果采用单因素方差分析法（ANOVA），P<0.05 为差异显著性水平。

死亡率按照公式（1）计算：

$$P_1 = M/N \times 100 \qquad (1)$$

式中：P_1 为试虫死亡率，M 为死亡虫数，N 为供试虫数。

对照组死亡率<5%，处理组的死亡率无需校正；对照组死亡率为 5%-20%时，则处理组采用 Abbott 公式校正（刘霞等，2009），计算校正死亡率；对照组死亡率超过 20%时，则该组试验作废并重做。

校正死亡率按照公式（2）计算：

$$P_2 = (P_1 - P_0)/(1 - P_0) \times 100 \qquad (2)$$

注：P_2 为校正死亡率；P_1 为处理组死亡率；P_0 为对照组死亡率。

酶活性的抑制率按公式（3）计算：

$$\text{抑制率}=\frac{\text{对照组酶比活力}-\text{处理组酶比活力}}{\text{对照组酶比活力}} \qquad (3)$$

2 结果与分析

2.1 斑蝥素衍生物对粘虫 3 龄幼虫胃毒活性测定结果

采用浸叶法初步测试了 500 μg/mL 浓度下 98 种斑蝥素类衍生物对粘虫 3 龄幼虫的胃毒活性（表 1）。由表 1 可知，2 种斑蝥素类衍生物在 500 μg/mL 浓度下对粘虫 3 龄幼虫表现出较强的胃毒活性（死亡率在 80%-100%），即衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#，而其余 96 种斑蝥素类衍生物在相同浓度下表现出较低的胃毒活性或不具有胃毒活性。开环衍生物Ⅰ-7#对试虫的死亡率均为 100%，其余开环衍生物均未表现出较强的胃毒活性；Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ类闭环衍生物中，只有Ⅳ-13#的胃毒活性最高，48 h 试虫的死亡率为 82.76%，其余衍生物均未表现出明显的胃毒活性。

表 1 斑蝥素衍生物对粘虫 3 龄幼虫 48 h 的胃毒活性

Table 1 Stomach poison activity of cantharidin derivatives against 3rd-instar larvae of *Mythimna separata* at 48 h

斑蝥素衍生物 Cantharidin derivatives	死亡率（%） Mortality	斑蝥素衍生物 Cantharidin derivatives	死亡率（%） Mortality	斑蝥素衍生物 Cantharidin derivatives	死亡率（%） Mortality	斑蝥素衍生物 Cantharidin derivatives	死亡率（%） Mortality
CTD	100.00±0.00	Ⅰ-24#	0.00±0.00	Ⅱ-23#	0.00±0.00	Ⅲ-12#	6.83±0.16
NCTD	22.14±0.52	Ⅰ-25#	14.29±0.35	Ⅱ-24#	10.34±0.46	Ⅲ-13#	3.33±0.00
Ⅰ-1#	8.05±0.05	Ⅰ-26#	0.00±0.00	Ⅱ-25#	16.67±0.15	Ⅲ-14#	3.33±0.00
Ⅰ-2#	8.04±0.05	Ⅱ-1#	3.45±0.26	Ⅱ-26#	16.67±0.09	Ⅲ-15#	0.00±0.00
Ⅰ-3#	3.41±0.10	Ⅱ-2#	0.00±0.00	Ⅱ-27#	3.45±0.04	Ⅲ-16#	10.00±0.2
Ⅰ-4#	0.00±0.00	Ⅱ-3#	0.00±0.00	Ⅱ-28#	3.33±0.00	Ⅲ-17#	6.82±0.08
Ⅰ-5#	8.05±0.05	Ⅱ-4#	3.37±0.23	Ⅱ-29#	3.45±0.00	Ⅲ-18#	3.49±0.04
Ⅰ-6#	3.74±0.39	Ⅱ-5#	0.00±0.00	Ⅱ-30#	8.32±0.01	Ⅲ-19#	3.45±0.07
Ⅰ-7#	100.00±0.00	Ⅱ-6#	0.00±0.00	Ⅱ-31#	0.00±0.00	Ⅲ-20#	3.45±0.04
Ⅰ-8#	11.46±0.44	Ⅱ-7#	3.61±0.19	Ⅱ-32#	6.90±0.00	Ⅲ-21#	3.57±0.05
Ⅰ-9#	10.37±0.07	Ⅱ-8#	3.50±0.18	Ⅱ-33#	0.00±0.00	Ⅳ-1#	3.45±0.00
Ⅰ-10#	7.69±0.10	Ⅱ-9#	12.42±0.06	Ⅱ-34#	0.00±0.00	Ⅳ-2#	3.37±0.04
Ⅰ-11#	6.90±0.01	Ⅱ-10#	3.59±0.06	Ⅱ-35#	3.53±0.04	Ⅳ-3#	10.00±0.00
Ⅰ-12#	0.00±0.00	Ⅱ-11#	6.67±0.00	Ⅱ-36#	0.00±0.00	Ⅳ-4#	7.14±0.00
Ⅰ-13#	0.00±0.00	Ⅱ-12#	13.79±0.00	Ⅲ-1#	10.00±0.00	Ⅳ-5#	3.73±0.20
Ⅰ-14#	0.00±0.00	Ⅱ-13#	16.67±0.96	Ⅲ-2#	3.70±0.08	Ⅳ-6#	0.00±0.00
Ⅰ-15#	0.00±0.00	Ⅱ-14#	3.33±0.04	Ⅲ-3#	0.00±0.00	Ⅳ-7#	14.20±0.12
Ⅰ-16#	14.60±0.35	Ⅱ-15#	3.41±0.04	Ⅲ-4#	3.45±0.04	Ⅳ-8#	0.00±0.00
Ⅰ-17#	0.00±0.00	Ⅱ-16#	6.98±0.08	Ⅲ-5#	0.00±0.00	Ⅳ-9#	10.30±0.28
Ⅰ-18#	17.86±0.23	Ⅱ-17#	5.79±1.23	Ⅲ-6#	3.37±0.04	Ⅳ-10#	3.37±0.04
Ⅰ-19#	0.00±0.00	Ⅱ-18#	2.26±1.13	Ⅲ-7#	0.00±0.00	Ⅳ-11#	6.67±0.07
Ⅰ-20#	13.33±0.11	Ⅱ-19#	6.67±0.16	Ⅲ-8#	0.00±0.00	Ⅳ-12#	7.43±0.05
Ⅰ-21#	10.00±0.00	Ⅱ-20#	7.14±0.06	Ⅲ-9#	0.00±0.00	Ⅳ-13#	82.76±0.2
Ⅰ-22#	0.00±0.00	Ⅱ-21#	0.00±0.00	Ⅲ-10#	3.71±0.13	Ⅳ-14#	7.14±0.08
Ⅰ-23#	0.00±0.00	Ⅱ-22#	0.00±0.00	Ⅲ-11#	3.85±0.12	Ⅳ-15#	6.90±0.06

2.2　2 种斑蝥素衍生物对粘虫 3 龄幼虫的 LC_{50} 结果分析

表 2 为不同斑蝥素衍生物处理粘虫 3 龄幼虫 48 h 后的胃毒活性。由表 2 可知，4 种杀虫剂的 χ^2 值都很小，表明本研究数据符合指定数据分布类型，即结果符合概率单位模型。其中，斑蝥素与斑蝥素衍生物Ⅰ-7#对粘虫的胃毒活性显著高于其他 2 种斑蝥素衍生物，但两组的活性无显著性差异（P>0.05）。去甲斑蝥素对粘虫的 LC_{50} 约是斑蝥素的 42 倍，而Ⅳ-13#对粘虫的 LC_{50} 约是斑蝥素的 10 倍。

表 2　斑蝥素衍生物对粘虫 3 龄幼虫 48 h 的胃毒活性

Table 2　Stomach poison activity of cantharidin derivatives against 3rd-instar larvae of *Mythimna separata* at 48 h

斑蝥素衍生物 Cantharidin derivatives	毒力回归方程 LC-P equation	r	χ^2	LC_{50}（95%置信区间） LC_{50}(95% CI) (μg/mL)
CTD	y=－12.263+7.476x	0.97	4.106	43.677(38.014-48.000)
NCTD	y=－19.848+6.085x	0.96	1.132	1 828.093(1 596.689-2 028.248)
Ⅰ-7#	y=－9.385+5.529x	0.97	3.634	49.818(36.743-58.301)
Ⅳ-13#	y=－11.742+4.431x	0.97	4.770	446.672(319.269-525.063)

2.3　不同斑蝥素衍生物对粘虫 3 龄幼虫细胞色素 P450 酶比活性的影响

用斑蝥素、去甲斑蝥素、斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#亚致死剂量浓度分别为 20、900、25、200 μg/mL 处理粘虫 3 龄幼虫后，不同时间点 P450 酶比活性变化的柱状图，结果见图 2。由图 2 可知，斑蝥素、去甲斑蝥素、斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#处理粘虫 3 龄幼虫，6 h 后 P450 酶比活力较对照组显著下降，且下降比率随持续中毒时间的延长而上升。由此可知，4 种不同药剂处理粘虫后，对 P450 酶活性有显著的抑制作用。

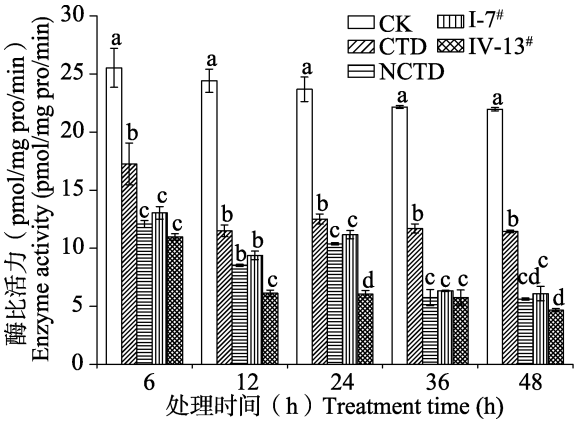

图 2　斑蝥素衍生物处理粘虫 3 龄幼虫在不同时间点细胞色素 P450 酶比活力

Fig. 2　P450 specific activity of the 3rd-instar larvae of *Mythimna separata* after treatment with different cantharidin derivatives for different times

柱上标有不同小写字母表示显著性差异程度，同一时间段相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著（Tukey's 多重比较法，P<0.05）。下图同。

Histograms with lowercase letters indicate significantly different，the same letters of the same time period indicate that no significant difference at the 0.05 level (Tukey's multiple range test, P<0.05). The same below.

2.4　不同斑蝥素衍生物对粘虫 3 龄幼虫羧酸酯酶比活性的影响

用斑蝥素、去甲斑蝥素、斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#亚致死剂量浓度分别为 20、900、25、200 μg/mL 处理粘虫 3 龄幼虫后,不同时间点 CarE 酶比活性变化的柱状图，结果见图 3。粘虫取食斑蝥素、去甲斑蝥素和斑蝥素衍生物Ⅳ-13#处理过的叶片，在 6、12 和 24 h 时，处理组和对照组不存在显著性差异（P>0.05），但在 36 h 和 48 h 时 CarE 酶比活力显著性增加。其中，粘虫取食斑蝥素衍生物Ⅰ-7#处理的叶片 6 h 时，CarE 酶比活力显著性降低（P<0.05），处理组 12、24 和 36 h 时 CarE 酶比活力和对照组间并无显著性差异，但在处理 48 h 时 CarE 酶比活力有明显的增加。由此可知，4 种不同药剂处理粘虫后，CarE 的酶比活力相较于对照组明显上升，且上升比率随中毒时间的延长而上升，即对 CarE 酶比活性均有不同程度的激活作用。

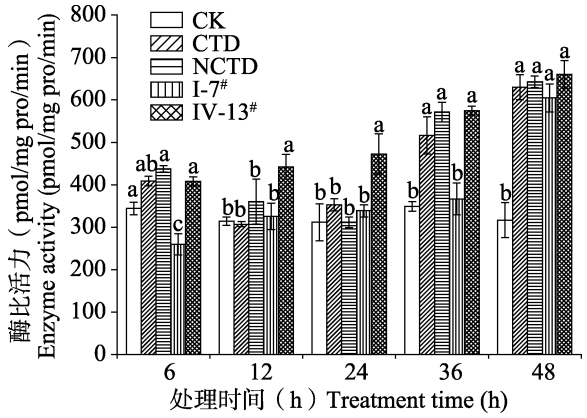

图 3 斑蝥素衍生物处理粘虫 3 龄幼虫在不同时间点羧酸酯酶比活力

Fig. 3 CarE specific activity of the 3rd-instar larvae of *Mythimna separata* after treatment with different cantharidin derivatives for different times

2.5 不同斑蝥素衍生物对粘虫 3 龄幼虫谷胱甘肽 *S*-转移酶比活性的影响

用斑蝥素、去甲斑蝥素、斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#亚致死剂量浓度分别为 20、900、25、200 μg/mL 处理粘虫 3 龄幼虫后，不同时间点 GST 酶比活性变化的柱状图，结果见图 4。粘虫取食斑蝥素处理叶片，6 h 后 GST 酶比活力均有显著的增加（$P<0.05$）；粘虫取食斑蝥素衍生物去甲斑蝥素和Ⅳ-13#处理的叶片，6 h 和 12 h 时 GST 酶比活力显著性增加，但在 24 h 后处理组 GST 酶活性与对照组相比有明显的降低；粘虫取食斑蝥素衍生物Ⅰ-7#处理叶片 36 h 和 48 h，GST 酶比活性显著降低，在 6 h 到 24 h 时 GST 酶比活力有不同程度的降低，但是无显著性差异（$P<0.05$）。由此可知，4 种不同化合物处理粘虫后，GST 酶比活力相较于对照组的变化比率随着中毒时间的延长大体表现出先上升后下降的总体趋势。

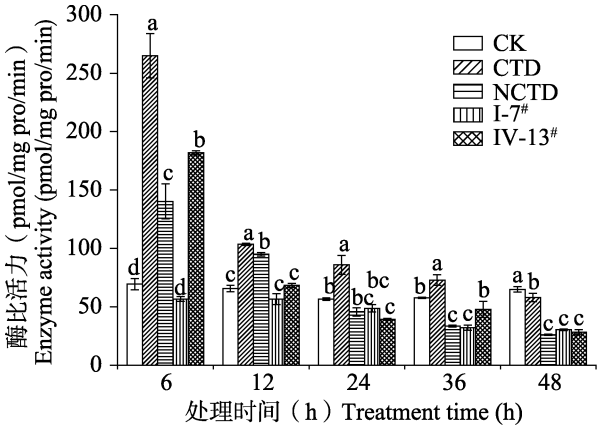

图 4 斑蝥素类衍生物处理粘虫 3 龄幼虫在不同时间点谷胱甘肽 *S*-转移酶比活力

Fig. 4 GST specific activity of 3rd-instar larvae of *Mythimna separata* after treatment with different cantharidin derivatives for different times

3 讨论

化学杀虫剂的大面积施用，不仅对生态环境造成严重影响，而且使得有害生物抗药性日益严重（张丽阳和刘承兰，2016）。因此，生物源农药逐步成为新农药研发热点，斑蝥素作为动物源农药，在农业害虫的防治中有广泛的应用前景，然而由于合成复杂，成本高以及毒副作用强等因素，限制其在农业生产中的大面积施用（李秋荣等，2008）。本研究测定了 100 种斑蝥素衍生物对粘虫 3 龄幼虫的胃毒活性，发现大部分斑蝥素衍生物的杀虫活性较低。药剂毒力相关方程和致死中浓度结果表明，斑蝥素对粘虫 3 龄幼虫的胃毒活性最高，斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#杀虫活性优于其母体斑蝥素衍生物去甲斑蝥素，但是斑蝥素与斑蝥素衍生物Ⅰ-7#对粘虫的胃毒活性无显著性差异（$P>0.05$）。去甲斑蝥素对粘虫的 LC_{50} 约是斑蝥素的 42 倍，而Ⅳ-13#对粘虫的 LC_{50} 约是斑蝥素的 10 倍。去甲斑蝥素在浓度为 500 μg/mL 时对粘虫幼虫的胃毒活性较差；然而，研究斑蝥素衍生物的构效关系发现，当给去甲斑蝥素的骨架中引入苯环并且苯环的对位有羧基时，即斑蝥素衍生物Ⅰ-7#，它的胃毒活性有大幅度的提升。而Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ类闭环斑蝥素衍生物中，只有斑蝥素衍生物Ⅳ-13#的杀虫活性最高。斑蝥素衍生物Ⅳ-13#的前体化合物为邻位溴代去甲斑蝥素，当给其骨架中引入邻位苯乙基时，它的胃毒活性优于去甲斑蝥素。通过对 4 种斑蝥素衍生物胃毒活性的系统研究，初步确定斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#在生物源农药的研究中具有很好的开发利用价值，为后续研究以及设计出生物活性更优的斑蝥素衍生物提供了依据。

昆虫对杀虫剂产生抗性的主要原因之一是与杀虫剂代谢相关的解毒酶的解毒能力的增强，昆虫的解毒酶是一类异质酶系，会对杀虫剂进行降解或清除，引起昆虫体内不同酶活性的降低或增加（Yang *et al.*，2016）。本研究测定了粘虫 3 龄幼虫在斑蝥素、去甲斑蝥素、斑蝥素衍生物Ⅰ-7# 和Ⅳ-13#处理后不同时间点 P450、CarE、GST 酶比活性变化。结果表明，斑蝥素及其衍生物处理粘虫 6 h 后 P450 酶比活力均有不同程度的降低；斑蝥素、去甲斑蝥素和斑蝥素衍生物Ⅳ-13#处理粘虫 36 h 和 48 h 时，CarE 酶比活力显著性增加，6 h 和 12 h 时 GST 酶比活力显著性增加，但在 24 h 后 GST 酶比活力显著性降低。其中，斑蝥素衍生物Ⅰ-7#处理粘虫，48 h 时 CarE 酶比活力有明显的提升，而在其他时间点 CarE 酶比活力变化不显著，6 h 后 GST 酶比活力有不同程度的降低，但在 48 h 时 GST 酶比活力均有显著性的降低（$P<0.05$）。由此可知，斑蝥素及其衍生物处理粘虫后，对 P450 酶比活力均有显著的抑制作用，对 CarE 酶比活力有不同程度的激活作用，而对 GST 酶比活力表现出先激活后抑制的变化趋势。

细胞色素 P450 参与解毒或有害物质的活化，决定药物或杀虫剂的代谢、抗性、选择性和适应性过程（Schuler，1996；Werck-Reichhart *et al.*，2000；Schuler and Berenbaum，2013）。羧酸酯酶与害虫的抗药性密切相关，羧酸酯酶可以水解含羧基的化学杀虫剂，能将化学杀虫剂降解为低毒化合物（Wheelock *et al.*，2005；Gao *et al.*，2006；He *et al.*，2011）。通过斑蝥素、去甲斑蝥素、斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#处理粘虫 3 龄幼虫后 P450、CarE、GST 酶比活力变化趋势可知，4 种斑蝥素衍生物对解毒酶系的酶比活力表现出激活或抑制作用。斑蝥素衍生物Ⅰ-7#对 CarE 和 GST 酶比活力的变化趋势与其他 3 种斑蝥素衍生物不同，尤以具有相似杀虫活性的斑蝥素相比，斑蝥素衍生物Ⅰ-7#在 48 h 显著表现出与斑蝥素具有相似的酶比活性，这可能与其化学结构的不同有关。孙文博等（2013）研究表明，斑蝥素衍生物Ⅰ-7#对小菜蛾的杀虫活性优于母体斑蝥素衍生物去甲斑蝥素。因此，斑蝥素衍生物Ⅰ-7#在新农药的研发上具有很大的应用前景。而斑蝥素衍生物Ⅳ-13#对粘虫的胃毒活性不及斑蝥素衍生物 I-7#，但是其胃毒活性远优于去甲斑蝥素。故而，本研究筛选的斑蝥素衍生物Ⅰ-7#和Ⅳ-13#有望作为候选生物源农药在鳞翅目害虫的防治上加以利用，为开发新型高效、低毒、低残留的农药提供科学依据。

参考文献 (References)

Cao WD, Zhang ZY, Yang BD, Zhang MZ, Zhang SL, 2008. Inhibition of cantharidin and demethylcantharidin to seven phytopathogenic fungi. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35(1): 63–68. [曹微丹, 张志勇, 杨宝东, 张民照, 孙淑玲, 2008. 斑蝥素及去甲斑蝥素对七种植物病原真菌的抑制作用. 植物保护学报, 35(1): 63–68.]

Chen Y, Yang BD, Zhang ZY, Fan JY, Li MQ, Song W, Zhang ZQ, 2009. Comparison of the insecticidal function between cantharidin and norcantharidin on *Plutella xylostella*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25(9): 202–206. [陈勇, 杨宝东, 张志勇, 范敬毅, 李明全, 宋薇, 张自启, 2009. 去甲斑蝥素与斑蝥素对菜蛾幼虫毒杀作用的比较. 中国农学通报, 25(9): 202–206.]

Feng JX, Zhang YL, 2007. 1.0% cantharidin EC to non-target organisms. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 16(5): 275–278. [冯建雄, 张雅林, 2007. 1. 0 %斑蝥素乳油对重要非靶标生物的安全性评价. 西北农业学报, 16(5): 275–278.]

Gao JR, Yoon KS, Frisbie RK, Coles GC, Clark JM, 2006. Esterase-mediated malathion resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(1): 28–37.

Grieco PA, Nunes JJ, Gaul MD, 1990. Dramatic rate accelerations of diels-alder reactions in 5-M lithium perchlorate diethy l-ether the cantharidin problem reexamined. *Journal of the American Chemical Society*, 112(11): 4595–4596.

He HG, Jiang HB, Zhao ZM, Wang JJ, 2011. Effects of a sublethal concentration of avermectin on the development and reproduc-tion of citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). *International Journal of Acarology*, 37(1): 1–9.

Huang L, You WW, 2009. Research progress of cantharidin and its derivatives. *Guangdong Chemical Industry*, 36(9): 246–248. [黄兰, 游文玮, 2009. 斑蝥素及其衍生物的研究进展. 广东化工,

36(9): 246–248.]

Huang WY, Deng LP, Wang W, 2015. Synthesis of novel chromone-containing isoxazoles norcantharidin derivatives. *Journal of Shaoxing Universty*, 35(7): 6–13. [黄文盈, 邓莉平, 王玮, 2015. 新型含色酮异噁唑类去甲斑蝥素衍生物的合成. 绍兴文理学院学报, 35(7): 6–13.]

Jiang XF, Zhang L, Cheng YX, Luo LZ, 2014. Current status and trends in research on the oriental armyworm, *Mythimna separate* (Walker) in China. *Chinese Jourrrnnnal Applied Entomology*, 51(6): 1444–1449. [江幸福, 张蕾, 程云霞, 罗礼智, 2014. 我国粘虫发生危害新特点及趋势分析. 应用昆虫学报, 51(6): 1444–1449.]

Jiang YY, Li CG, Zeng J, Liu J, 2014. Population dynamics of the armyworm in China: a review of the past 60 years'research. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(4): 890–898. [姜玉英, 李春广, 曾娟, 刘杰, 2014. 2014 我国粘虫发生概况: 60 年回顾. 应用昆虫学报, 51(4): 890–898.]

Li FH, Wang GQ, 2014. Application status and counter measures of biogenic pesticide in China. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 242(8): 58–60. [李凡海, 王桂清, 2014. 我国生物源农药应用现状及对策探讨. 农业科技与装备, 242(8): 58–60.]

Li QR, Zhang YL, Liu LL, Wei YP, Li XT, 2008. Study on rearing *Epicauta chinesis* Laporte in laboratory. *Journal of Environmental Entomology*, 30(2): 159–166. [李秋荣, 张雅林, 刘林丽, 魏永平, 李晓婷, 2008. 中华豆芫菁的室内人工养殖研究. 环境昆虫学报, 30(2): 159–166.]

Li XF, Chen XS, Wang XM, Hou XH, 2007. Contents and existing forms of cantharidin in Meloidae (Coleoptera). *Acta Entomologica Sinica*, 50(7): 750–754. [李晓飞, 陈祥盛, 王雪梅, 侯晓晖, 2007. 芫菁体内斑蝥素的含量及存在形式. 昆虫学报, 50(7): 750–754.]

Liu RR, Ma Y, Ma ZQ, Zhang YL, 2011. Bioactivity of cantharidin against eleven pests. *Journal of Northwest A&F University* (*Nat. Sci. Ed.*), 38(11): 181–185. [刘瑞瑞, 马燕, 马志卿, 张雅林, 2010. 斑蝥素对 11 种害虫的杀虫活性. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 38(11): 181–185.]

Liu X, Lu YG, Yan DP, 2009. Application of EXCEL in calculating of toxicity for pesticide bioassay. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25(19): 206–208. [刘霞, 路永贵, 闫当萍, 2009. EXCEL 在农药毒力测定中的应用. 中国农学通报, 25(19): 206–208.]

Ma ZQ, Zhang X, 2000. The effect of plant source insecticidal substances. *Plant Protection*, 26(2): 37–39. [马志卿, 张兴, 2000. 植物源杀虫物质的作用特点. 植物保护, 26(2): 37–39.]

Mahmood RN, Konrad D, Wilhelm B, Gerd G, Steffan D, 2007. Intraspecific transfer of cantharidin within selected members of the family Meloidae (Insecta: Coelentera). *Journal of Insect Physiology*, 53(9): 889–890.

Niu YT, Wu DX, Dong WN, Tang X, Cai CF, 2013. Research progress of the new preparation of norcantharidin. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 48(9): 663–667. [牛砚涛, 武冬雪, 董文娜, 唐星, 蔡翠芳, 2013. 去甲斑蝥素新型制剂研究进展. 中国药学杂志, 48(9): 663–667.]

Qiu XH, Leng XF, 2002. The role of cytochrome P450 in plant-insect interactions. *Entomological Knowledge*, 39(1): 5–8. [邱星辉, 冷欣夫, 2002. 细胞色素 P450 在植物与昆虫相互关系中的作用. 昆虫知识, 39(1): 5–8.]

Rodriguez MA, Marques T, Bosch D, Avilla J, 2011. Assessment of insecticide resistance in eggs and neonate larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2): 151–159.

Schuler MA, 1996. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiology*, 112(4): 1411–1419.

Schuler MA, Berenbaum MR, 2013. Structure and function of cytochrome P450S in Insect adaptation to natural and synthetic toxins: insights gained from molecular modeling. *Journal of Chemical Ecology*, 39(9): 1232–1245.

Shi C, Zhang YX, Li M, Liu Y, Han X, Hao L, Wang Q, Cao LJ, Guo QH, 2016. Norcantharidin induces apoptosis in human gastric cancer cells SGC-7901. *China Cancer*, 25(12): 999–1003. [石铖, 张一昕, 李猛, 刘宇, 韩雪, 郝蕾, 王茜, 曹丽静, 郭秋红, 2016. 去甲斑蝥素诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的机制研究. 中国肿瘤, 25(12): 999–1003.]

Springate S, Colvin J, 2012. Pyrethroid insecticide resistance in British populations of the cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella*. *Pest Management Science*, 68(2): 260–267.

Sun WB, Liu ZY, Zhang YL, 2013. Synthesis and insecticidal activity of amides derivatives of norcantharidin. *Journal of Northwest A&F University* (*Nat. Sci. Ed.*), 41(7): 79–84. [孙文博, 刘中一, 张雅林, 2013. 去甲斑蝥素酰胺类衍生物的合成及杀虫活性. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 41(7): 79–84.]

Wang YY, Hu ZN, 2016. The effect of *Periploca sepium* P and E on intestinal 3 detoxification enzymes in the *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* (Rottemberg). *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 25(6): 939–944. [汪英英, 胡兆农, 2016. 杠柳新苷 P 和 E 对粘虫和小地老虎中肠 3 种解毒酶的影响. 西北农业学报, 25(6): 939–944.]

Werck-Reichhart D, Hehn A, Didierjean L, 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science*, 5(3): 116–123.

Wheelock CE, Shan G, Ottea J, 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30(2): 75–83.

Yang XQ, Yang XQ, Zhang YL, Wang XQ , Dong H, Gao P, Jia LY, 2016. Characterization of multiple heat-shock protein transcripts from *Cydia pomonella*: Their response to extreme temperature and insecticide exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemitry*, 64(21): 4288–4298.

Yang Y, Wu Y, Chen S, Devine GJ, Denholm I, Jewess P, Moores GD, 2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa armigera* from Asia. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(8): 763–773.

Yang J, Lin RH, Yuan SK, Zhao XJ, Cao Y, Xia W, 2014. Survey and analysis of current situation of biologically derived pesticides industry in China. *Chinese Journal of Biological Control*, 30(4): 441–445. [杨峻, 林荣华, 袁善奎, 赵肖静, 曹艳, 夏文, 2014. 我国生物源农药产业现状调研及分析. 中国生物防治学报, 30(4): 441–445.]

Yin SX, Zhang CN, Zhang YL, Li XC, 2006. Resistance status of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) to nine insecticides in Shanxi. *Journal of Northwest A&F University* (*Nat. Sci. Ed.*), 44(1): 102–110. [殷邵鑫, 张春泥, 张雅林, 李显春, 2016. 陕西小菜蛾对 9 种杀虫剂的抗药性检测. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 44(1): 102–110.]

Yin YP, Jin GX, 2010. Biosynthesis, transferand biological function of cantharidin in blister beetles (Coleoptera: Meloidae). *Acta Entomologica Sinic*, 53(11): 1305–1313. [殷幼平, 靳贵晓, 2010. 芫菁体内斑蝥素的合成、转移和生物学功能. 昆虫学报, 53(11): 1305–1313.]

Zeng WN, Lu Y, 2006. Advance on the synthesis and activities of cantharidin and its derivatives. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 26(5): 579–591. [曾文南, 卢懿, 2006. 斑蝥素及其衍生物的合成与活性研究进展. 有机化学, 26(5): 579–591.]

Zhang LY, Liu CL, 2016. Research progress on mechanism of insect resistance to insecticides and its management. *Journal of Environmental Entomology*, 38(3): 640–647. [张丽阳, 刘承兰, 2016, 昆虫抗药性机制及抗性治理研究进展. 环境昆虫学报, 38(3): 640–647.]

Zhang QF, Yan J, Zhang ZY, Yang BD, Wang JZ, Sun SL, 2014. Studies on synergism of norcantharidin insecticidal activities. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 30(25): 292–295. [张奇峰, 闫静, 张志勇, 杨宝东, 王进忠, 孙淑玲, 2014. 去甲斑蝥素杀虫活性增效研究. 中国农学通报, 30(25): 292–295.]

Zhang X, Zhao SH, 1983. The rejection and avoidance of several pests by Meliaceae plants. *Journal of South China Agricultural College*, 4(3): 1–7. [张兴, 赵善欢, 1983. 楝科植物对几种害虫的拒食和忌避作用. 华南农学院学报, 4(3): 1–7.]

Zhang X, Ma ZQ, Feng JT, Wu H, Han LR, 2015. Review on research and development of botanical pesticides. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(5): 685–698. [张兴, 马志卿, 冯俊涛, 吴华, 韩立荣, 2015. 植物源农药研究进展. 中国生物防治学报, 31(5): 685–698.]

Zhang YL, Zhou Y, Zhang ZY, 2003. Effect of cantharidin on the midgut of the orient armyworm (*Mythimna separata*) and diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Acta Entomologica Sinica*, 46(3): 272–276. [张雅林, 周越, 张志勇, 2003. 斑蝥素对粘虫和小菜蛾幼虫中肠组织的影响. 昆虫学报, 46(3): 272–276.]

Zhang YH, Zhang Z, Jiang YY, Zeng J, Gao YB, Cheng DF, 2012. Preliminary analysis of the outbreak of the third-generation armyworm *Mythimna separata* in China in 2012. *Plant Protection*, 38(5): 1–8. [张云慧, 张智, 姜玉英, 曾娟, 高月波, 程登发, 2012. 2012 年三代黏虫大发生原因初步分析. 植物保护, 38(5): 1–8.]