草地贪夜蛾细胞株 Sf 9 生测杀虫剂毒力的方法探索*

李春娜[1**] 张伟琪[1] 任豆豆[1] 董兆克[1,2] 张志勇[1***]

（1. 农业应用新技术北京市重点实验室，北京农学院，北京 102206；2. 青岛农业大学植物医学学院，青岛 266109）

摘 要 **【目的】** 为适应杀虫剂新产品研发和害虫抗药性监测对快速生物测定的需要，本文探索细胞生测与试虫生测的关联情况。**【方法】** 分别测定草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢细胞株（Sf 9 细胞）和小菜蛾 *Plutella xyllostella* 敏感品系对不同类型的杀虫剂的毒力，并在此基础上进行了细胞活力抑制率与活体昆虫致死率的关联性分析。**【结果】** 3 种不同机理杀虫剂毒力在 2 种生测体系中均表现出阿维菌素>吡虫啉>高效氯氰菊酯的一致规律；同一类型（有机磷类）5 种杀虫剂毒力在 2 种生测体系中均表现出马拉硫磷>敌敌畏>辛硫磷>丙硫磷>敌百虫的一致规律；同一种类（5%阿维菌素）3 种剂型杀虫剂毒力在 2 种生测体系中均表现出了微乳剂>乳油>水乳剂的一致规律。细胞生测和试虫生测之间存在高度相关性，据此建立不同杀虫剂细胞 8 h 生测和试虫 48 h 生测剂量之间的线性回归方程。**【结论】** 建立了不同杀虫剂处理 Sf 9 细胞 8 h 与处理小菜蛾幼虫 48 h 的线性相关模型，可根据细胞生物测定结果反映试虫生物测定的结果，为今后新型农药的筛选、毒力测定等提供便利的条件。

关键词 Sf 9 细胞；小菜蛾；杀虫剂；生物测定；LC_{50}

Evaluating insecticide bioassay methods using the *Spodoptera frugiperda* cell line Sf 9

LI Chun-Na[1**] ZHANG Wei-Qi[1] REN Dou-Dou[1] DONG Zhao-Ke[1,2] ZHANG Zhi-Yong[1***]

(1. Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China; 2. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract **[Objectives]** To meet the need for rapid bioassay methods for pesticide development and pest resistance monitoring, we compared the results obtained from bioassays using insect cells vs whole insects. **[Methods]** The virulence of different pesticides to the *Spodoptera frugiperda* ovary cell line (Sf 9) and sensitive strains of *Plutella xylostella* was examined, and the correlation between the inhibition of the cell proliferation rate and insect mortality compared. **[Results]** Both bioassay systems ranked the virulence of the three different types of insecticides as avermectin > imidacloprid > beta-cypermethrin, and the virulence of the five insecticides in the same category (organophosphorus) as > dichlorvos > phoxim > propionate > trichlorfon. Both bioassay systems also ranked the virulence of three formulations of the same insecticide (5% avermectin) as micro-emulsionn > emulsifiable concentrate > emulsion. A linear regression model of the relationship between an 8 h cell bioassay and 48h insect bioassay was constructed. **[Conclusion]** The results of an 8 h cell bioassay were consistent with those of a 48 h insect bioassay. Cell bioassays provide a relatively quick way of testing new pesticides.

Key words Sf 9 cells; *Plutella xylostella*; insecticide; bioassay; LC_{50}

生物测定作为一种手段，广泛应用于农药的筛选、毒力测定与药效试验及抗药性检测等方面（任远航等，2016）。目前，国内外主要采用活体昆虫进行杀虫剂筛选和毒力测定，已形成一整套

*资助项目 Supported projects：国家重点研发计划课题（2017YFD0200307）；北京市科技创新服务能力建设-高精尖学科建设项目（PXM2019_014207_000032）

**第一作者 First author，E-mail：1170983971@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：zzy@bua.edu.cn

收稿日期 Received：2020-03-05；接受日期 Accepted：2020-07-13

比较规范并且标准化的经典方法（程东美等，2002）。由于活体昆虫生测准备需要花费大量时间，且试虫需常年于养虫室中饲养繁殖建立起敏感种群，这就要求环境条件十分严格（杨峰山等，2006）；另外活体昆虫生测往往存在供试虫体基数需求量大、虫龄大小不一、生理生态质量难以掌握、测定周期较长、劳动密集、其结果往往需要校正等问题，很难满足杀虫剂的高通量生物测定（周青春等，1996）。离体培养的细胞所处环境相同，遗传背景相似，能为杀虫剂的定量测试提供极大的方便，所测得的 LC_{50} 值稳定性比活体测试好，且具有准确、简便、快速、高效和灵敏等特点（张欣等，2011；胡珊和赵海珍，2012）。因此，利用细胞株系进行杀虫剂毒力测定一直受到关注。早期 Stipanovic 等（1990）测定了棉酚系列天然产物对烟芽夜蛾细胞系的毒力，结果与田间小区试验有良好的相关性。周青春等（1996）测定 7 种有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂对棉铃虫细胞系与棉铃虫生物测定 LD_{50} 值大小顺序完全一致。张志祥等（2000）对 19 种茼蒿素类似物进行了斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius 细胞系筛选，实验结果与以斜纹夜蛾、小菜蛾和小菜粉蝶 *Pieris rapae* Linnaeus 活体幼虫筛选的结果基本一致。

小菜蛾为全世界分布广泛、危害严重且容易产生抗药性的鳞翅目害虫（Talekar and Shelton，1993；Furlong，2013），长期以来，也一直作为一种杀虫剂生物测定的模式昆虫（FAO，1979）。细胞 Sf 9 是草地贪夜蛾卵巢细胞株，现在已经商品化生产，且培养条件及技术十分成熟，已广泛应用于昆虫毒理、昆虫病毒学的研究。本文通过比较不同类型、同一类型和不同剂型杀虫剂对 Sf 9 细胞和活体试虫小菜蛾触杀毒力，探索建立利用 Sf 9 细胞生物测定方法，以期为杀虫剂快速筛选、毒力测定等提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 供试细胞与昆虫

供试昆虫细胞为草地贪夜蛾卵巢组织 IPLB-Sf 21 细胞系的克隆株 Sf 9 细胞。由中国科学院动物研究所昆虫病毒研究组提供，Sf 9 细胞培养于 Sf-900™ II SFM 无蛋白昆虫细胞培养基（液体），培养基中添加 10%的胎牛血清于 27 ℃下培养，每 2-3 d 传代一次，收集处于对数生长期的细胞供测。

供试昆虫为本实验室长期饲养的小菜蛾敏感种群，2003 年建立至今，无农药环境饲养。养虫条件为 25 ℃、光周期为 14 L∶10 D。实验时挑选健康、活泼且虫体状况大小一致的 3 龄 1 d 试虫，饥饿 4 h 后供试。

1.2 供试杀虫剂及溶液的配置

供试杀虫剂：99%阿维菌素原药、98%高效氯氰菊酯原药、99%吡虫啉原药代表 3 种不同杀虫机理的 3 类杀虫剂；98.7%辛硫磷原油、99.4%马拉硫磷原油、99.2%敌百虫原药、99.1%敌敌畏原药、95.47%丙硫磷原油 5 种杀虫剂代表有机磷类杀虫剂；5%阿维菌素水乳剂、5%阿维菌素乳油、5%阿维菌素微乳剂代表同一杀虫剂不同剂型。所有供试杀虫剂均为市购。

溶剂母液：准确量取溶剂，加有机溶剂（丙酮）溶解，配置成母液，经 0.22 μm 有机溶剂针头过滤器过滤，细胞培养基（或无菌水）稀释成梯度杀虫剂药液备用（有机溶剂终含量≤1%）。

试样母液：准确量取样品，加有机溶剂（丙酮）溶解，配置成浓度为母液，经 0.22 μm 有机溶剂针头过滤器过滤，细胞培养基（或无菌水）稀释成梯度杀虫剂药液备用。（有机溶剂终含量≤1%）。

1.3 供试药剂对 Sf 9 细胞抑制率的影响

1.3.1 噻唑蓝比色法（MTT 法） 测定方法参考潘兴瑜等（1999）及赵嘉惠等（2007）。将所有药剂稀释成不同浓度梯度药液，取处于对数生长期的细胞，稀释至 1.0×10^4-1.2×10^5 个/mL，接种到 96 孔细胞培养板的第 3-10 列，每孔 100 μL，在 CO_2 培养箱中 28 ℃培养 24 h，使细胞贴壁良好后，将培养基全部吸出。96 孔板中留出一孔（G3）加入无细胞培养基 100 μL 用于调零，第 3 列加入含有丙酮的培养基作对照，边缘孔用 PBS 或者空白培养基填充，其它各列依次加入含

有不同浓度梯度的药液的培养基，每孔加液量均为 100 μL，并置 28 ℃的 CO_2 培养箱中培养 4 h。之后，从培养箱中取出，将 96 孔板培养基全部吸出，用 PBS 缓冲液清洗 2-3 次，每孔 100 μL。之后将 PBS 吸出，更换成含 0.5 mg/mL 噻唑蓝（MTT）的完全培养基 100 μL，继续培养 4 h 后，小心吸弃孔内上清液（保留培养板底部的甲瓒），每孔中加 150 μL 二甲基亚砜（DMSO）。待其充分溶解后置酶标仪上（λ= 490 nm）读数，每一浓度的 OD 值均为同一浓度孔值的平均值。全部实验重复 3 次。测算公式如下：

$$细胞抑制率=\left(1-\frac{OD处理-OD调零}{OD对照-OD调零}\right)\times 100\%,$$

$$相对毒力指数=\frac{标准药剂的等效剂量}{其他药剂的等效剂量}\times 100。$$

供试的 3 种不同类型杀虫剂均设置 7 个浓度进行测定。其中，阿维菌素、吡虫啉、高效氯氰菊酯的浓度为 10、20、40、60、80、120、160 μg/mL；供试的 3 种不同剂型杀虫剂均设置 6 个浓度进行测定。其中，5%阿维菌素微乳剂、乳油、水乳剂的浓度分别为 6.25、12.5、25、50、75、100、150 μg/mL。

1.3.2　Cell counting kit-8 法（CCK-8）　CCK-8 是 MTT 法的升级版，二者原理一致（张荷，2016；冯华龙等，2018）。将所有药剂稀释成不同浓度梯度药液；取处于对数生长期的细胞，稀释至 1.0×10^4-1.2×10^5 个/mL，接种到 96 孔细胞培养板的第 3-10 列，每孔 100 μL，置于 28 ℃的 CO_2 培养箱中培养 24 h，使细胞贴壁良好后，将培养基全部吸出。96 孔板中留出一孔（G3）加入无细胞培养基 100 μL 用于调零，第 3 列加入含有丙酮的培养基作对照，边缘孔用 PBS 或者空白培养基填充；其它各列依次加入含有不同浓度梯度的药液的培养基，每孔加液量均为 100 μL，置于 28 ℃的 CO_2 培养箱中培养 8 h。之后，从培养箱中取出，将 96 孔板培养基全部吸出，用 PBS 缓冲液清洗 2-3 次，每孔 100 μL 之后将 PBS 吸出，加入含有 10% CCK-8 的培养基，每孔 100 μL 继续培养 2.5 h，待其充分溶解后置酶标仪上（λ= 450 nm）读数，每一浓度的 OD 值均为同一浓度孔值的平均值。全部实验重复 3 次。测算公式如下：

$$细胞抑制率=\left(1-\frac{OD处理-OD调零}{OD对照-OD调零}\right)\times 100\%,$$

$$相对毒力指数=\frac{标准药剂的等效剂量}{其他药剂的等效剂量}\times 100。$$

供试的 5 种有机磷类杀虫剂均设置 7 个浓度进行测定。其中，马拉硫磷、敌敌畏、辛硫磷的浓度为 20、40、80、120、160、240、320 μg/mL；丙硫磷的浓度为 50、100、200、300、400、600、800 μg/mL；敌百虫的浓度为 125、250、500、1 000、1 500、2 000、3 000 μg/mL。

1.4　供试药剂对小菜蛾的毒力测定

小菜蛾的毒力测定采用叶片药膜法（郭磊等，2013）。根据预实验结果，确定要配制的杀虫药剂梯度数及浓度范围。选取个体大小一致、健康活跃的 3 龄初期小菜蛾幼虫，饥饿处理 4 h；用直径 1.5 cm 的打孔器取厚薄均匀的有机甘蓝叶片，将叶片在药液中浸泡 10 s，取出于阴凉通风处悬挂至叶片表面无残留液滴即可。然后将叶片与试虫依次放入干净的培养皿中，每个培养皿接入 15 头幼虫。每个浓度设置 3 个重复。接完试虫培养皿放入 25 ℃培养箱中饲养，观察 72 h 后记录小菜蛾幼虫的中毒死亡情况。用毛笔触碰试虫，试虫不动即为死亡（过程中即时更换滤纸和浸有药液的叶片）。计算公式如下：

$$小菜蛾死亡率=\frac{小菜蛾死亡数}{小菜蛾总数}\times 100\%,$$

$$小菜蛾校正死亡率=\frac{小菜蛾试验组死亡率-小菜蛾对照组死亡率}{1-小菜蛾对照组死亡率}\times 100\%,$$

$$相对毒力指数=\frac{标准药剂的等效剂量}{其他药剂的等效剂量}\times 100。$$

实验均设计 6 个处理。其中供试的不同类型杀虫剂中阿维菌素浓度为 5、10、20、40、60、80 μg/mL；吡虫啉、高效氯氰菊酯的浓度分别为 20、40、60、80、120、160 μg/mL；供试的有机磷 5 种杀虫剂中马拉硫磷的浓度分别为 2.5、5、10、20、40、60 μg/mL，敌敌畏、辛硫磷的浓度

为 5、10、20、40、60、80 μg/mL；丙硫磷的浓度为 10、20、40、80、120、160 μg/mL；敌百虫的浓度为 100、200、300、400、600、800 μg/mL。供试的同种杀虫剂 5%阿维菌素乳剂、乳油、水乳剂的浓度为 3.125、6.25、12.5、18.75、25、37.5 μg/mL。

1.5 数据处理与分析

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析，计算毒力回归方程、致死中浓度（LC_{50}）、相关系数（r）。以阿维菌素作为标准药剂，相对毒力指数为 100，计算吡虫啉、高效氯氰菊酯的相对毒力指数；以马拉硫磷作为标准药剂，相对毒力指数为 100，计算敌敌畏、辛硫磷、丙硫磷、敌百虫药剂的相对毒力指数；以 5%阿维菌素微乳剂作为标准药剂，相对毒力指数为 100，计算 5%阿维菌素乳油、水乳剂药剂的相对毒力指数。

采用 Sigmaplot 12.5 和 Adobe Illustrator CS4 软件进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 不同杀虫机理的 3 种杀虫剂的毒力反应

供试药剂对 Sf 9 细胞、小菜蛾毒力测定结果如表 1 所示。实验结果表明：利用 MTT 法测定 3 种不同类型杀虫剂 8 h 内能够有效抑制细胞增殖，细胞反应具有快速、高效和灵敏的优点。Sf 9 细胞对 3 种不同类型杀虫剂 8 h 的毒力大小与小菜蛾对 3 种不同类型杀虫剂 48 h 的毒力大小均表现出了阿维菌素>吡虫啉>高效氯氰菊酯的趋势。细胞生测结果中将阿维菌素作为标准药剂，相对毒力指数为 100，则吡虫啉、高效氯氰菊酯药剂的相对毒力指数分别为 65.77、44.26。试虫生测结果中将阿维菌素作为标准药剂，相对毒力指数为 100，则吡虫啉、高效氯氰菊酯药剂的相对毒力指数分别为 11.76、7.37；说明在供试药剂中，供试细胞和试虫均对阿维菌素敏感性最高，对高效氯氰菊酯敏感性相对较低。

表 1 不同杀虫机理的 3 种杀虫剂对 Sf 9 细胞和小菜蛾的毒力测定结果

Table 1 Results of virulence determination of three different insecticidal mechanisms of insecticides against Sf 9 cells and *Plutella xylostella*

供试材料 Test material	杀虫剂名称 Insecticide name	杀虫剂类型 Insecticide type	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数 Correlation coefficient	致死中浓度（μg/mL）LC_{50}	95%置信区间 (μg/mL) 95% confidence interval	相对毒力倍数 Relative toxicity index
Sf 9 细胞 *Spodoptera frugiperda*	阿维菌素 Avermectin	微生物源农药 Microbial pesticide	y=1.007 5x+3.520 1	0.972**	29.44	16.84-43.66	100
	吡虫啉 Imidacloprid	新烟碱类 Neonicotinoids	y=0.727 5x+3.799 0	0.957**	44.76	23.46-74.74	65.77
	高效氯氰菊酯 Beta cypermethrin	拟除虫菊酯类 Pyrethroid	y=0.908 5x+3.343 9	0.968**	66.51	43.76-112.29	44.26
小菜蛾 *Plutella xyllostella*	阿维菌素 Avermectin	微生物源农药 Microbial pesticide	y =0.974 8x+4.355 0	0.985**	4.59	2.98-6.14	100
	吡虫啉 Imidacloprid	新烟碱类 Neonicotinoids	y=1.315 9x+2.905 9	0.947**	39.02	9.41-71.10	11.76
	高效氯氰菊酯 Beta cypermethrin	拟除虫菊酯类 Pyrethroid	y=0.973 7x+3.252 9	0.995**	62.27	45.99-81.94	7.37

**代表相关系数在 0.01 水平下极显著。将阿维菌素作为标准药剂，相对毒力指数为 100。

** means that the correlation coefficient is extremely significant difference at the 0.01 level. Avermectin was used as the standard drug, and the relative toxicity index was 100.

2.2　同一类型（有机磷类）5 种杀虫剂的毒力反应

供试药剂对 Sf 9 细胞、小菜蛾毒力测定结果如表 2 所示。从表 2 可以看出，利用 CCK-8 法测定 5 种有机磷类杀虫剂 8 h 内能够有效抑制细胞增殖，细胞反应具有快速、高效和灵敏的优点。Sf 9 细胞对 5 种同一类型杀虫剂 8 h 的毒力大小与小菜蛾对 5 种同一类型杀虫剂 48 h 的毒力大小均表现出了马拉硫磷>敌敌畏>辛硫磷>丙硫磷>敌百虫的趋势。细胞生测结果中将马拉硫磷作为标准药剂，相对毒力指数为 100，则辛硫磷、敌敌畏、丙硫磷、敌百虫药剂的相对毒力指数分别为 87.36、41.95、21.15、5.16；试虫生测结果中将马拉硫磷作为标准药剂，相对毒力指数为 100，则辛硫磷、敌敌畏、丙硫磷、敌百虫药剂的相对毒力指数分别为 71.87、44.16、26.49、2.40；说明在供试药剂中，供试细胞和试虫均对马拉硫磷敏感性最高，对敌百虫酯敏感性相对较低。

表 2　5 种有机磷类杀虫剂对 Sf 9 细胞和小菜蛾的毒力测定结果

Table 2　Results of virulence determination of five species of the same type (organophosphorus) insecticide against Sf 9 cells and *Plutella xylostella*

供试材料 Test material	杀虫剂名称 Insecticide name	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数 Correlation coefficient	致死中浓度（μg/mL）LC_{50}	95%置信区间 (μg/mL) 95% confidence interval	相对毒力倍数 Relative toxicity index
Sf 9 细胞 *Spodoptera frugiperda*	马拉硫磷 Malathion	y=2.131 4x+0.316 5	0.992**	157.53	133.65-169.16	100
	敌敌畏 Dichlorovos	y=1.835 7x+0.858 6	0.970**	180.32	141.57-241.44	87.36
	辛硫磷 Phoxim	y=1.169 7x+1.988 4	0.989**	375.56	303.87-473.12	41.95
	丙硫磷 Prothiofos	y=1.664 2x+0.220 5	0.996**	744.65	645.63-857.22	21.15
	敌百虫 Trichlorfon	y=1.794 5x–1.253 3	0.976**	3 052.83	2 349.49-3 921.62	5.16
小菜蛾 *Plutella xyllostella*	马拉硫磷 Malathion	y=1.536 1x+3.163 3	0.978**	15.69	9.57-24.08	100
	敌敌畏 Dichlorovos	y=2.205 4x+2.046 8	0.989**	21.83	14.84-28.65	71.87
	辛硫磷 Phoxim	y=2.243 1x+1.521 8	0.978**	35.53	26.81-50.55	44.16
	丙硫磷 Prothiofos	y=1.788 1x+1.830 3	0.981**	59.24	42.56-90.18	26.49
	敌百虫 Trichlorfon	y=1.424 5x+0.979 1	0.978**	664.77	405.15-1 583.69	2.40

**代表相关系数在 0.01 水平下极显著。将马拉硫磷作为标准药剂，相对毒力指数为 100。

** means that the correlation coefficient is extremely significant difference at the 0.01 level. Malathion was used as the standard drug, and the relative toxicity index was 100.

2.3　同一种类（5%阿维菌素）3 种剂型杀虫剂的毒力反应

供试药剂对 Sf 9 细胞、小菜蛾毒力测定结果如表 3 所示。结果表明利用 MTT 法测定 3 种不同剂型杀虫剂 8 h 内能够有效抑制细胞增殖，细胞反应具有快速、高效和灵敏的优点。Sf 9 细胞对 3 种不同剂型杀虫剂 8 h 的毒力大小与小菜蛾对 3 种不同剂型杀虫剂 48 h 的毒力大小均表现出了 5%阿维菌素微乳剂>5%阿维菌素乳油>5%阿维菌素水乳剂的趋势。细胞生测结果中将 5%阿维菌素微乳剂作为标准药剂，相对毒力指数为 100，则 5%阿维菌素乳油、水乳剂的相对毒力指数分别为 31.25、25.55；试虫生测结果中将 5%阿维菌素微乳剂作为标准药剂，相对毒力指数为 100，则 5%阿维菌素乳油、水乳剂的相对毒力指数分别为 53.19、37.25；说明在供试药剂中，供试细胞和试虫均对 5%阿维菌素微乳剂敏感性最高，对 5%阿维菌素水乳剂敏感性相对较低。

2.4　不同杀虫剂细胞生测和试虫生测剂量关联分析

对不同杀虫剂细胞 8 h 生测和试虫 48 h 生测的剂量进行回归分析，其结果如图 1 所示。从

表 3 3 种不同剂型（5%阿维菌素）杀虫剂对 Sf 9 细胞和小菜蛾的毒力测定结果

Table 3 Results of virulence determination of three different dosage forms (5% avermectin) insecticide on Sf 9 cells and *Plutella xylostella*

供试材料 Test material	杀虫剂名称 Insecticide name	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数 Correlation coefficient	致死中浓度（μg/mL） LC_{50}	95%置信区间 (μg/mL) 95% confidence interval	相对毒力倍数 Relative toxicity index
Sf 9 细胞 *Spodoptera frugiperda*	微乳剂 Micro-emulsionn	y=7.702 3x–4.272 4	0.987**	15.99	15.46-16.52	100
	乳油 Emulsifiableconcen-trate	y=4.080 6x–1.973 6	0.975**	51.16	46.22-53.96	31.25
	水乳剂 Emulsion	y=2.665 9x+0.210 8	0.988**	62.58	57.44-68.24	25.55
小菜蛾 *Plutella xyllostella*	微乳剂 Micro-emulsionnn	y=1.371 0x+4.083 5	0.951**	4.66	0.57-8.23	100
	乳油 Emulsifiableconcen-trate	y=1.221 9x+3.848 2	0.906**	8.76	2.08-12.75	53.19
	水乳剂 Emulsion	y=2.497 6x+2.259 6	0.930**	12.51	1.12-17.46	37.25

**代表相关系数在 0.01 水平下极显著。将 5%阿维菌素微乳剂作为标准药剂，相对毒力指数为 100。

** means that the correlation coefficient is extremely significant difference at the 0.01 level. 5% avermectin micro-emulsionn was used as the standard drug, and the relative toxicity index was 100.

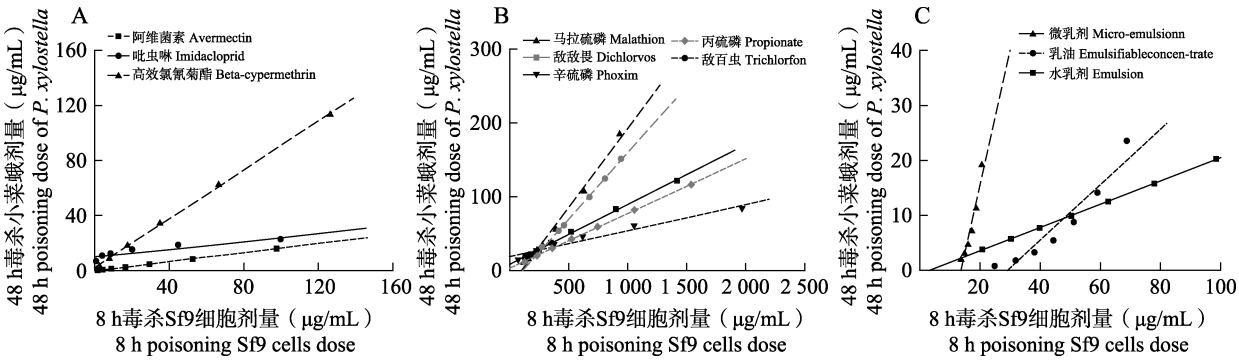

图 1 不同杀虫剂细胞生测和试虫生测剂量相关分析

Fig. 1 Correlation analysis of kinds of pesticides biopsy and test insects

A. 不同杀虫机理 3 种杀虫剂；B. 同一类型（有机磷类）5 种杀虫剂；C. 同一种类（5%阿维菌素）3 种杀虫剂。

A. Three different insecticidal mechanisms of insecticides; B. Five insecticides of the same category (organophosphorus); C. Three formulation for the same insecticide (5% avermectin).

图 1 中可以看出，不同的杀虫剂对 Sf 9 细胞 8 h 的剂量与对小菜蛾 48 h 的剂量具有良好的线性关系，在不同杀虫机理的杀虫剂中阿维菌素的回归方程为 y=0.162 7x–0.118 9，相关系数 r = 0.999；吡虫啉的回归方程为 y=0.142 7x+9.919，相关系数 r=0.922；高效氯氰菊酯的回归方程为 y=0.888 5x+1.990 3，相关系数 r=0.999。在同一类型（有机磷类）的杀虫剂中马拉硫磷的回归方程 y=0.2142x–21.438，相关系数 r=0.996；敌敌畏的回归方程为 y=0.081 2x+8.310 8，相关系数 r=0.998；辛硫磷的回归方程为 y=0.035 5x+18.865，相关系数 r=0.982；丙硫磷的回归方程为 y=0.074 2x+3.102 1，相关系数 r=0.999；敌百虫的回归方程为 y=0.179 2x–19.714，相关系数 r=0.999。同一种类不同剂型的杀虫剂中 5%阿维菌素微乳剂的回归方程为 y=2.451 8x–33.409，相关系数 r=0.966；5%阿维菌素乳油的回归方程为 y=0.505x–14.702，相关系数 r =0.955；5%阿维菌素水乳剂的回归方程为 y=0.211 7x–0.661 3，相关系数 r=0.999，说明供试细胞对供试杀虫剂 8 h 范围内的生测结果与试虫对供试杀虫剂 48 h 范围内的反映一致，二者有着良好的关联性。

3 结论与讨论

本研究中 Sf 9 细胞生测和小菜蛾试虫生测之间存在高度相关性：不同杀虫机理的 3 种杀虫剂毒力大小在 2 种生测体系中均表现出了阿维

菌素>吡虫啉>高效氯氰菊酯的规律；同一类型（有机磷类）5 种杀虫剂毒力大小均表现出了马拉硫磷>敌敌畏>辛硫磷>丙硫磷>敌百虫的规律；同一种类（5%阿维菌素）3 种不同剂型杀虫剂毒力大小均表现出了微乳剂>乳油>水乳剂的规律。研究结果表明，Sf 9 细胞 8 h 生测和小菜蛾 48 h 生测剂量之间有很好的相关反应，因此，能够利用 Sf 9 细胞 8 h 生测结果反应小菜蛾 48 h 的生测结果。

侯春梅等（2009）报道 MTT 法和 CCK-8 法在计算细胞抑制率方法的孵育时间上有差异，CCK-8 方法的孵育时间少于 MTT 法。本文中采用 2 种观测方法在相同孵育时间的条件下，采用 CCK-8 会更节省时间。离体、活体的生测体系所测杀虫剂毒力关联分析，已应用于相关的研究中（Stipanovic *et al.*，1990；周青春等，1996；张志祥等，2000）。毛黎娟等（2005）比较了杀虫剂对家蚕细胞和家蚕活体的毒力，两者毒力差异显著，通常认为，药剂对离体细胞的毒力总是比相应的活体高。本文对草地贪夜蛾细胞与小菜蛾活体进行毒力测定分析，所测的杀虫剂对两者毒力的大小趋势表现一致。说明细胞生测和活体生测关联度很高，并且证明用线性模型去预测一定范围的关系是可行的。

与活体测试相比，杀虫剂的离体毒力测试可在严格控制的实验条件下，简化对其的影响因素，可准确地探讨独立因子所起的作用，更直接地从细胞水平上反映毒力的差异（郑丙莲等，2000），在应对害虫抗性中的有机磷复配、新结构组合物快速测定中有积极意义（何利钦等，2015）。值得提出的是，细胞株系不同于活体昆虫，是利用抑制率替代死亡率进行生物测定的，在细胞层面上表现出的毒杀活性与活体试虫相比存在着不同的机理。杀虫剂种类繁多，生物细胞株开发利用也越来越广泛，利用细胞株进行杀虫剂的快速测定不失为一种重要的途径，但针对某一种特定杀虫剂还需要专门建立相关模型。

致谢：实验材料 Sf 9 细胞系得到中国科学院动物研究所昆虫病毒研究组秦启联老师和张寰老师的惠赠，实验过程中得到王进忠老师及寇弘儒、李成、孙艳超同学的帮助，在此一并致谢！

参考文献 (References)

Chen DM, Zhang ZX, Hu MY, Xu HH, 2002. Application of insect cells in insecticide research. *World Pestic*, 24(4): 28–30. [程东美, 张志祥, 胡美英, 徐汉虹, 2002. 昆虫细胞在杀虫剂研究上的应用. 世界农药, 24(4): 28–30.]

FAO, 1979. Bioassay method for the diamond-back moth. *FAO Plant Protection Bulletin*, 27 (2/21): 44–46.

Feng HL, He SH, Huang FQ, Lai JY, Sun ZT, Xu FG, Lan ZM, 2018. Quantitative study on cytotoxicity of methylene blue to human nucleus pulposus cells by cell counting-kit 8 assay. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 22(16): 2532–2536. [冯华龙, 何升华, 黄飞强, 赖居易, 孙志涛, 许福光, 蓝志明, 2018. CCK-8 法定量检测亚甲蓝对人髓核细胞的毒性. 中国组织工程研究, 22(16): 2532–2536.]

Furlong MJ, Wright J, Dosdall LM, 2013. Diamondback moth ecology and management: Problems, progress, and prospects. *Annual Review of Entomology*, 58: 517–541.

Guo L, Bian QL, Zhang HJ, Zhuang HJ, Gao XW, Liang P, 2013. Bioassay technique for *Plutella xylostella*: Leaf-dip method. *Chinese Journal of Applied Entomoogyl*, 50(2): 556–560. [郭磊, 边全乐, 张宏军, 张宏军, 高希武, 梁沛, 2013. 小菜蛾抗药性监测方法: 叶片药膜法. 应用昆虫学报, 50(2): 556–560.]

He LQ, Ren YH, Deng YJ, Jin H, Tao K, Hou TP, 2015. A comparative study on cytotoxicity against *Spodoptera frugiperda* (Sf 9) cells and bioactivity of the 26 furanone analogs. *Journal of Sichuan University* (*Natural Science Edition*), 52(2): 403–408. [何利钦, 任远航, 邓园杰, 金洪, 陶科, 侯太平, 2015. 26 种呋喃酮类似物对 Sf 9 细胞毒力测定与活体生物活性比较研究. 四川大学学报(自然科学版), 52(2): 403–408.]

Hou CM, Li XY, Ye WL, Cao XY, Xiao H, Li Y, 2009. Comparison of MTT method and CCK-8 method in detecting suspension cell proliferation. *Bulletin of The Academy of Military Medical Science*, 33(4): 400–400. [侯春梅, 李新颖, 叶伟亮, 曹曦元, 肖鹤, 黎燕, 2009. MTT 法和 CCK-8 法检测悬浮细胞增殖的比较. 军事医学科学院院刊, 33(4): 400–400.]

Hu S, Zhao HZ, 2012. The exploration of assay the effects of MTT method on synergic combination. *Guangdong Agriculture Science*, 39(18): 73–75. [胡珊, 赵海珍, 2012. MTT 法测定几种农药组合联合作用初探. 广东农业科学, 39(18): 73–75.]

Mao LJ, Wei FL, Zhu GN, 2005. Toxicity of several insecticides on silkworm cell line with MTT method. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 7(1): 45–48. [毛黎娟, 魏方林, 朱国念, 2005.

利用 MTT 法测定杀虫剂对家蚕细胞的毒力. 农药学学报, 7(1): 45–48.]

Pan XY, Fu JJ, Xue X, Sun W, 1999. Research on improvement of MTT colorimetric method. *Chinese Journal of Immunology*, 15(12): 559. [潘兴瑜, 付京晶, 薛欣, 孙伟, 1999. MTT 比色法改进的研究. 中国免疫学杂志, 15(12): 559.]

Ren YH, Deng YJ, Jin H, Tao K, Hou TP, 2016. A comparative study on cytotoxicity against RP-HzVNC-AW1(AW1) cells and bioactivity of the 15 pyrazoline analogs. *Journal of Sichuan University* (*Natural Science Edition*), 53(4): 909–913. [任远航, 邓园杰, 金洪, 陶科, 侯太平, 2016. 15 种吡唑啉类似物对 AW1 神经细胞毒力测定与活体生物活性比较研究. 四川大学学报(自然科学版), 53(4): 909–913.]

Stipanovic RD, Elissalde MH, Altman DW, Norman JO, 1990. Cell culture bioassay to evaluate allelochemical toxicity to *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(3): 737–741.

Talekar NS, Shelton AM, 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*, 38(1): 275–301.

Yang FS, Wu QJ, Xu BY, Zhan ZX, Huang YQ, 2006. Resistance selection of *Plutella xylostella* by Cry1Ac toxin and Bt formulation and biological fitness of the resistant populations. *Acta Entomologica Sinica*, 49(1): 64–69. [杨峰山, 吴青君, 徐宝云, 占志雄, 黄玉清, 2006. 小菜蛾对 Bt 毒素 Cry1Ac 和 Bt 制剂抗性的选育及其抗性种群的生物学适应性. 昆虫学报, 49(1): 64–69.]

Zhang H, 2016. Study on the toxicity and mechanism of fumonisin B1 on Sf 9 cells. Master dissertation. Guangzhou: South China Agricultural University. [张荷, 2016. 伏马菌素 B1 对 Sf 9 细胞毒性及作用机理研究. 硕士论文. 广州: 华南农业大学.]

Zhang X, Feng Y, Dian WF, Ma T, Liu R, Ma Y, 2011. Measurement and analysis of cytotoxicity of 5 insect cell lines induced by some pesticides. *Scientia Silvae Sinicae*, 47(4): 182–189, 195–196. [张欣, 冯颖, 丁伟峰, 马涛, 刘荣, 马艳. 常用农药对 5 种昆虫细胞系的毒力测定及分析. 林业科学, 47(4): 182–189, 195–196.]

Zhang ZX, Xu HH, Cheng DM, Wu YL, Fan JF, 2000. Screening derivatives of spiro enol ether and testing its toxicity on *Spodoptera litura* cell with MTT method. *Journal of South China Agricultural University*, 21(3): 29–32. [张志祥, 徐汉虹, 程东美, 吴毓林, 范俊发, 2000. 利用MTT法以茼蒿素类似物对昆虫细胞毒力筛选及测定. 华南农业大学学报, 21(3): 29–32.]

Zhao JH, Zhang HP, Wang CF, 2007. Discussion on MTT assay for detecting cell proliferation. *Journal of Shanxi Medical University*, 38(3): 262–263. [赵嘉惠, 张华屏, 王春芳, 2007. MTT 法在检测细胞增殖方面的探讨. 山西医科大学学报, 38(3): 262–263.]

Zheng BL, Yang H, Hong HZ, Peng JX, Zhou QC, 2000. Sensitivity research of eight insect cell lines to methomyl insecticide. *Biotechnology Information*, (5): 30–32, 42. [郑丙莲, 杨红, 洪华珠, 彭建新, 周青春, 2000. 八种昆虫离体细胞系对灭多威农药的敏感性研究. 生物技术通报, (5): 30–32, 42.]

Zhou QC, Wan SQ, Liu ZJ, Peng JX, Wang H, 1996. Evaluation of insecticidal cytotoxicity by mtt method. *Journal of Plant Protection*, 23(4): 343–348. [周青春, 万树青, 刘钊杰, 彭华珠, 彭建新, 汪虹, 1996. 利用 MTT 法测定杀虫剂对细胞的毒力. 植物保护学报, 23(4): 343–348.]