

瑞香狼毒超临界CO₂萃取物的杀螨毒力及机理初探

梁为¹, 马兰青², 卜春亚², 成军², 靳永胜², 王有年², 师光禄²

(¹北京林业大学, 北京 100083; ²北京农学院, 农业部都市农业(北方)重点开放实验室, 北京 102206)

摘要:为了测定瑞香狼毒超临界CO₂萃取物对朱砂叶螨的触杀毒力,并了解其作用机理,笔者采用玻片浸渍法测定瑞香狼毒超临界CO₂萃取物(SCE)对朱砂叶螨的触杀毒力,观察其对朱砂叶螨的致毒症状;结果表明:SCE对朱砂叶螨24 h的触杀LC₅₀值为2.411 mg/mL;中毒试螨表现出类似神经毒剂的致毒症状,如兴奋、痉挛等。随后测定了SCE对朱砂叶螨神经系统靶标酶(乙酰胆碱酯酶、单胺氧化酶、Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶)活性的影响。结果表明,SCE能够显著抑制试螨乙酰胆碱酯酶、单胺氧化酶、Na⁺-K⁺-ATP酶和Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶的活性;据此推测,SCE对朱砂叶螨可能具有神经毒性。

关键词:瑞香狼毒;超临界萃取物;朱砂叶螨;酶活性;神经毒性

中图分类号:S436.6

文献标志码:A

论文编号:2011-0098

Preliminary Study on Toxicity of Supercritical Extract of *Stellera chamaejasme* L. to *Tetranychus cinnabarinus* and its Acaricidal Mechanism

Liang Wei¹, Ma Lanqing², Bu Chunya², Cheng Jun², Jin Yongsheng², Wang Younian², Shi Guanglu²

(¹Beijing Forestry University, Beijing 100083; ²Key Laboratory of Urban Agriculture (North),

Ministry of Agriculture, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract: In order to study the toxicity and possible lethal mechanism of supercritical extract of *Stellera chamaejasme* L., the experiment was conducted. In this study, the contact toxicity of supercritical extract of *Stellera chamaejasme* L. (SCE) to *Tetranychus cinnabarinus* was tested using slide dip method, and dynamic toxicosis symptoms of SCE-exposed mites were also detailedly observed. The results showed that the contact toxicity LC₅₀ value of SCE to *T. cinnabarinus* was 2.411 mg/mL at 24th h post-treatment. Some typical neurotoxic symptoms such as excitement and convulsions were observed in SCE-exposed mites. Subsequently, the changes of activities of AChE, MAO, Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase after exposed to SCE were assayed. The experiment showed that SCE could significantly inhibit the activities of AChE, MAO, Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase. The results led us to believe that SCE may be a neurotoxin.

Key words: *Stellera chamaejasme* L.; supercritical extract; *Tetranychus cinnabarinus*; enzyme activity; neurotoxicity

0 引言

植物源杀螨剂是防治农业害螨的有效方法,具有高效和安全等优势^[1-3]。寻找具有杀螨活性的植物种类已成为当今研究热点之一^[3-4]。已报道的植物材料,多

受到资源数量和生物量的限制,难以形成生产规模。

瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)为传统中药材,属于生物入侵植物,在中国分布广、数量大,是重度退化草原的主要种群。目前,已发现瑞香狼毒提取物

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872029);北京市自然科学基金重点项目(6071001);北京市自然科学基金项目(6092007);北京市教委重点项目;北京市教委平台建设项目;北京市属高校人才强教深化计划资助项目(PHR20090516, PHR200906134)。

第一作者简介:梁为,男,1982年出生,北京人,在读博士,主要从事植物源农药研究。通信地址:102206北京市昌平区回龙观镇北农路7号北京农学院研究生实验楼A104, Tel: 010-80797308, E-mail: liang1wei@126.com。

通讯作者:王有年,男,1951年出生,北京人,教授,博士生导师,硕士,主要从事果品优质生态安全,发表研究论文100余篇,出版专著10余部。通信地址:102206北京市昌平区回龙观镇北农路7号北京农学院, Tel: 010-80799006, E-mail: wyn1951@126.com。

收稿日期:2010-12-07,修回日期:2011-01-23。

对农业害虫具有触杀毒性和杀卵毒性^[5-7],但有关瑞香狼毒超临界CO₂萃取物(SCE)杀螨毒性和机理的报道较少。因此,笔者通过研究SCE对朱砂叶螨(*Tetranychus cinnabarinus*)的触杀毒力和致毒症状,测定其对几种神经系统靶标酶活性的影响,以期为明确SCE杀螨机理提供参考。

1 材料与与方法

1.1 实验时间、地点

实验于2009年3月—9月在北京农学院农业部都市农业(北方)重点开放实验室内完成。

1.2 供试材料

采用江苏省南通市华安超临界萃取有限公司的HA221-50-06型超临界CO₂萃取设备,CO₂气体由北京亥普北分气体工业有限公司提供,纯度≥99.5%。将100 g狼毒干粉装入萃取釜,以无水乙醇为夹带剂。根据预实验结果,设定参数为:CO₂流量21 L/h,萃取压力30 MPa,萃取温度46°C,分离温度45°C、分离压力5.5 MPa。待各项参数达到要求时开泵,每20 min从分离釜收集萃取物,至不再有萃取出物流出为止^[8]。所得产物即为瑞香狼毒超临界CO₂萃取物(SCE)。

朱砂叶螨(*Tetranychus cinnabarinus*)由农业部都市农业(北方)重点开放实验室提供,为室内饲养的敏感品系。实验室内用芸豆幼苗饲养。饲养环境为温度(25±1)°C,相对湿度(60±10)%,光照L:D=18 h:6 h。

1.3 实验方法

1.3.1 触杀毒力测定 称取不同质量的SCE,加入100 μL吐温80,用去离子水定容至10 mL,超声波溶解,即为待测药液。待测药液设0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL共6个浓度,各浓度处理重复测定3次。将100 μL吐温80用去离子水定容至10 mL作为对照。

采用玻片浸渍法并稍作改进^[9]。将双面胶带粘贴于玻片一端,揭去上面的纸片,用零号毛笔挑取个体大小一致、颜色鲜艳的活泼雌成螨,将其背部粘在双面胶带上,不可粘住螨足、口器及须肢,保证螨足自由活动,每片粘30头。粘好的玻片在双目解剖镜下检查,剔除不活动、受伤和粘的不合格的螨,将供试螨浸入待测药液中轻轻摇动约5 s后取出,用吸水纸条小心吸去螨体周围的多余药液。在与1.2中同等的饲养条件下培养24 h后,在双目解剖镜下统计螨虫死亡率,用毛笔轻触螨体,以螨足不动者为死亡。按Abbot公式计算校正死亡率。

1.3.2 症状观察 采用叶蝶浸渍法^[10]。将洗净的平展的芸豆叶片置于水培养台上,每个叶片均挑入个体大小一致、颜色鲜艳的活泼雌成螨30头。待螨稳定后,夹

取叶片浸入待测药液中5 s,用吸水纸小心吸去多余药液。叶片边缘用湿棉条围住,以防螨体逃逸。每0.5 h观察1次成螨的活动及反应状况,24 h记录48次。待测药液浓度为3 mg/mL,以去离子水加1%体积吐温80溶液为对照。

1.3.3 酶液制备及测定 试螨采用1.3.1中的方法,用浓度为3 mg/mL的药液处理。取处于不同中毒阶段的雌成螨150头,加0.25 mL预冷生理盐水,冰浴匀浆,4°C下10000 r/min离心15 min,上清液作为酶源待测。

乙酰胆碱酯酶、单胺氧化酶、Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性均使用南京建成生物研究所的测试盒进行测定,重复3次。

1.3.4 酶源蛋白含量测定 采用考马斯亮蓝G-250法^[11]测定酶源蛋白含量。

1.3.5 数据处理 试验数据采用SPSS15.0统计分析软件分析。酶的比活力按下式计算。

酶的比活力[U/mg]=酶活力单位/酶源蛋白含量

酶活力单位[U]=(ΔOD×V)/(e×L)

式中:ΔOD为每分钟光吸收的变化值(OD/min);V为酶促反应体积(mL);e为产物的消光系数(1.36×10⁻¹⁰ L/(μmol·cm));L为比色杯的光程(cm)。

2 结果与分析

2.1 触杀毒力

采用玻片浸渍法测定SCE对朱砂叶螨的触杀毒力。结果表明,SCE对朱砂叶螨有明显的触杀毒性,其毒力回归方程为 $y=3.627x - 1.386$,24 h的LC₅₀值为2.411 mg/mL(95%置信限2.219~2.666 mg/mL),LC₉₀值为5.440 mg/mL(95%置信限4.520~7.131 mg/mL)。可见,SCE对朱砂叶螨的触杀毒性高于已报道的瑞香狼毒提取物^[2-4,7]。

2.2 致毒症状

观察发现,朱砂叶螨经SCE处理后30 min左右,试螨开始表现兴奋症状,四处爬动,并急剧产卵。1 h后大部分试螨运动减少,螨足高频颤抖,表现为强烈的痉挛症状。2~4 h后转为轻度痉挛,螨足大动作的屈伸。约5 h后,部分试螨躯体侧卧,螨足微颤,表现为麻痹症状。6 h后,大部分试螨死亡,死螨表皮皱缩,体色黯淡。对照组0~18 h间,试螨正常取食,步态平稳;18~24 h间,试螨正常爬动、取食,吐丝并在丝上产卵。

可见,经SCE处理后,朱砂叶螨表现的中毒症状与神经毒剂有相似之处,如兴奋、痉挛等。因此,针对神经系统靶标酶进行下一步研究。

2.3 对乙酰胆碱酯酶(AChE)活性的影响

乙酰胆碱酯酶(AChE)能够催化乙酰胆碱水解为

胆碱和乙酸,在神经冲动传递过程中起重要作用^[5]。测定不同中毒时期 SCE 对朱砂叶螨 AChE 活性的影响,结果表明:SCE 对朱砂叶螨 AChE 有明显地抑制作用。由表 1 可知,在兴奋期、痉挛期和麻痹期,AChE 活性均显著低于对照($P<0.05$,下同),并且不同中毒阶段间的 AChE 活性也达到显著差异。其中,AChE 活性在兴奋期降幅最大,为对照的 0.764 倍;痉挛期的 AChE 活性较兴奋期显著下降,为对照的 0.617 倍,较兴奋期下降 19.200%;麻痹期的 AChE 活性较痉挛期显著下降,为对照的 0.499 倍,较痉挛期下降 19.142%。可见,SCE 对朱砂叶螨 AChE 的抑制率随中毒程度的加深而增加。

表 1 朱砂叶螨 AChE 活性的变化

中毒阶段	酶比活力/(U/mg)	抑制率/%
对照	0.491±0.017 a	—
兴奋期	0.375±0.003 b	23.490
痉挛期	0.303±0.007 c	38.270
麻痹期	0.245±0.001 d	50.065

注:表中数字以(平均值±标准误)表示,数字后相同小写字母表示经 Duncan's 新复极差检验差异不显著($P_{0.05}$ 水平),酶源蛋白标准曲线 $y=0.004638-0.002552x$ ($R=0.9974$)。下同。

2.4 对单胺氧化酶(MAO)活性的影响

单胺氧化酶(MAO)可使儿茶胺类神经递质失活,造成神经传导阻断^[12]。SCE 对朱砂叶螨 MAO 活性影响见表 2。由表 2 可知,在兴奋期,MAO 活性为对照的 0.763 倍,但未达到显著差异;痉挛期的 MAO 活性与对照和兴奋期相比显著下降,为对照的 0.393 倍,较兴奋期下降 48.474%;麻痹期的 MAO 活性显著低于对照和兴奋期,分别为对照的 0.482 倍和兴奋期的 0.633 倍;麻痹期的 MAO 活性较痉挛期略有上升,但未达到显著差异,这可能是由于 SCE 激活了试螨体内保护酶系引起的。总体上,SCE 对朱砂叶螨的 MAO 活性有一定的抑制作用。

2.5 对 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性的影响

SCE 对朱砂叶螨 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性的影响见

表 2 朱砂叶螨 MAO 活性的变化

中毒阶段	酶比活力/(U/mg)	抑制率/%
对照	17.609±3.924 a	—
兴奋期	13.432±0.789 a	23.720
痉挛期	6.921±1.199 b	60.696
麻痹期	8.496±0.736 b	51.753

表 3。由表 3 可知,SCE 对试螨体内 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性有明显抑制作用。在兴奋期、痉挛期和麻痹期,Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性均显著低于对照,分别为对照的 0.416 倍、0.438 倍和 0.034 倍。随中毒程度的加深,Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性略有波动,但总体上为下降趋势。其中,痉挛期的 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性略有增加,较兴奋期增加 5.315%,但未达到显著差异;此后,麻痹期的酶活性又有所下降。但在兴奋期、痉挛期和麻痹期三者之间,Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性不存在显著差异。

表 3 朱砂叶螨 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性的变化

中毒阶段	酶比活力/(U/mg)	抑制率/%
对照	1.222±0.246 a	—
兴奋期	0.508±0.003 b	58.398
痉挛期	0.535±0.049 b	56.194
麻痹期	0.042±0.008 b	67.090

2.6 对 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响

SCE 对朱砂叶螨 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性影响见表 4。由表 4 可知,在兴奋期、痉挛期和麻痹期,SCE 对试螨体内 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性均有明显抑制作用,各阶段酶活性分别为对照的 0.709 倍、0.672 倍和 0.555 倍。随中毒程度的加深,Na⁺-K⁺-ATP 酶活性呈下降趋势。其中,兴奋期的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著低于对照,为对照活性的 0.709 倍;痉挛期的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性较兴奋期下降 5.226%,但未达到显著差异。麻痹期的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著低于痉挛期,比痉挛期活性下降 17.391%。

表 4 朱砂叶螨 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的变化

中毒阶段	酶比活力/(U/mg)	抑制率/%
对照	1.403±0.124 a	—
兴奋期	0.995±0.019 b	29.093
痉挛期	0.943±0.034 b	32.751
麻痹期	0.779±0.026 c	44.473

3 结论

研究表明,SCE 对乙酰胆碱酯酶、单胺氧化酶、Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶均具有显著地抑制效果。以上 4 种酶均属于重要的神经系统靶酶。SCE 通过抑制神经系统靶酶的活性,导致试螨体内神经递质的积累。因此,机体会迅速出现反应,使试螨表现出兴奋、痉挛和麻痹等中毒症状。据此推测,SCE 对朱砂叶螨可能具有神经毒性。

4 讨论

大多数杀螨剂是通过干扰神经系统来发挥致死作用。而且,中毒特征多表现为战栗、痉挛、麻痹或是其他行为上的改变。神经细胞间的化学信息传递主要依靠神经递质的合成与分解,如乙酰胆碱、伽马氨基丁酸、真硝铵等。Mark等^[13]已证明乙酰胆碱等神经递质是杀螨剂的靶标。本研究中,试螨中毒症状与神经毒剂有相似之处。因此,笔者对神经系统中4种重要的酶系进行测定。

研究表明,SCE对AChE的抑制率达到50.065%,与传统的AChE抑制剂相当^[14]。乙酰胆碱酯酶(AChE)长时间地被抑制,能够引起乙酰胆碱过度积累,造成神经突触传递阻断^[12]。而且,AChE活性随中毒程度的加深而显著下降。可以推测,AChE可能是SCE的主要靶标。

MAO、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶和Na⁺-K⁺-ATP酶活性也受到SCE的抑制。MAO活性下降能够导致儿茶胺类神经递质的积累,引起试螨体内神经传导的阻断,使试螨表现出兴奋、抽搐等症状^[12]。Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性降低,能够导致细胞内Ca²⁺滞留,引起各种谷氨酸盐及其他神经递质的释放,并产生大量自由基,使细胞形成不可逆转地功能退化^[15-16]。Na⁺-K⁺-ATP酶活性降低,能够导致细胞内Na⁺离子流受抑制,细胞吸水,继而肿胀坏死^[14]。以上3种酶能够被SCE抑制,但抑制程度与中毒程度间没有良好的伴随关系。这可能与SCE激活试螨体内解毒酶系,缓解了SCE的毒性有关^[5]。

可见,SCE的杀螨作用机理可能较为复杂,使朱砂叶螨死亡的原因可能不止一种,有待进一步研究。研究结果还有待于通过电生理试验和更为精确的酶学试验来进一步确证。由于SCE致死机理的复杂性,可以推测SCE引起害螨抗药性的机率较小。而且,在SCE的制备过程不需要有机溶剂参与,对环境 and 人员的影响小,具有进一步开发利用的潜力。

参考文献

- [1] 何林,赵志模,邓新平,等.朱砂叶螨对3种杀螨剂的抗性选育及抗性治理研究[J].中国农业科学,2003,36(4):403-408.
- [2] He L, Gao X W, Wang J J, et al. Genetic analysis of abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus*[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2009,95(3):147-151.
- [3] Wang YN, Wang HX, Shen ZJ, et al. Methyl Palmitate, an Acaricidal Compound Occurring in Green Walnut Husks[J]. Journal of Economic Entomology,2009,102(1):196-202.
- [4] Wang YN, Shi GL, Zhao LL, et al. Acaricidal activity of *Juglans regia* leaf extracts on *Tetranychus viennensis* and *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) [J]. Journal of Economic Entomology,2007,100(4):1298-1303.
- [5] 曹挥,刘素琪,赵莉茵,等.瑞香狼毒提取物对山楂叶螨的生物活性及酶活性影响[J].林业科学,2003,39(1):98-102.
- [6] Shi GL, Liu SQ, Cao H, et al. Acaricidal activities of extracts of *Stellera chamaejasme* against *Tetranychus viennensis* (Acari: Tetranychidae) [J]. Journal of Economic Entomology,2004,97(6):1912-1916.
- [7] 王伟,全宝胜,师光禄,等.瑞香狼毒粗提物对朱砂叶螨的生物活性[J].中国农学通报,2010,26(11):36-39.
- [8] 白雪娜,全宝胜,梁为,等.超临界CO₂流体萃取瑞香狼毒根部油脂工艺条件的优化[J].中国农学通报,2010,26(10):355-359.
- [9] Busvine J R. Recommended methods for measurement of resistance to pesticides. In: FAO. Plant Production and Protection[M]. Rome: FAO,1980:77-90.
- [10] 朱丽梅,倪钰萍,黄春霞,等.螨的综合测试方法的研究[J].南京农学报,2002,17(1):13-17.
- [11] 慕立义.植物化学保护[M].北京:中国农业出版社,1991.
- [12] 曹挥,王有年,刘素琪,等.地肤子提取物对山楂叶螨体内几种酶活性的影响[J].林业科学,2008,44(8):62-66.
- [13] Mark A, Roger G H. Biochemical and physiological targets for mitocides[J]. Pesticide Science,1994,40(2):85-101.
- [14] 张静,冯岗,马志卿,等.细辛醚对粘虫幼虫的毒力及几种重要酶系的影响[J].昆虫学报,2007,50(6):574-577.
- [15] Lees G J. Inhibitor of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology[J]. Brain Research Reviews,1991,16(3):283-300.
- [16] 赵善欢.昆虫毒理学原理[M].广州:广东科技出版社,1993.