

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2017.03.040

瑞香狼毒对东亚飞蝗作用机理的初步研究

陈琼, 高甜甜, 李波, 查艳梅, 陶科, 金洪, 侯太平

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 利用硅胶柱分离瑞香狼毒乙酸乙酯萃取物得到 I、II、III 段粗分物, 并测定对东亚飞蝗毒杀活性最高的 I 段粗分物对东亚飞蝗的致死性及其体内 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 、乙酰胆碱酯酶的抑制活性。研究表明: 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗具有较强的毒杀作用, 在药物浓度为 10mg/mL、72h 对东亚飞蝗的校正死亡率为 92.50%; 同时, 毒杀作用具有浓度和时间依赖性; 而且瑞香狼毒乙酸乙酯萃取物 I 段粗分物对上述 3 种酶均有一定的抑制作用, 且对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的抑制作用最强, 在药物浓度为 5mg/mL、96h 对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的抑制率为 40.38%; 分析发现瑞香狼毒活性成分对东亚飞蝗的毒杀作用与对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的抑制作用之间具有显著相关性, 据此推测, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 可能是瑞香狼毒活性成分的主要作用靶标之一。

关键词: 瑞香狼毒; 东亚飞蝗; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$; $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号: S43 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)03-0665-05

Studies on the mechanism of *Stellera chamaejasme* L. to *Locusta migratoria manilensis* (Meyen)

CHEN Qiong, GAO Tian-Tian, LI Bo, ZHA Yan-Mei, TAO Ke, JING Hong, HOU Tai-Ping

(Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment, Ministry of Education,

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Using silica gel column to separate the ethyl acetate extract of *Stellera chamaejasme* L. we can get I, II, III sections. The activities of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ and acetylcholinesterase of insects were determined *in vivo*. The results showed that I section from *S. chamaejasme* L. had the strongest poison effect on *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). Under the concentration of 10 mg/mL, the corrected mortality was 92.50% in 72 hour. And the poison effect there was persistence. The I section from *S. chamaejasme* L. also had certain inhibition on activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 、acetylcholinesterase. The inhibition rate of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ was the highest among the three kinds of enzymes. There was a well correlation between the toxic action of the active ingredients from *S. chamaejasme* L. to *L. migratoria manilensis* (Meyen) and the inhibition on activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in *L. migratoria manilensis* (Meyen). $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ is likely the target of the active ingredients from *S. chamaejasme* L. against *L. migratoria manilensis* (Meyen).

Keywords: *S. chamaejasme* L.; *L. migratoria manilensis* (Meyen); $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$; $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$; acetylcholinesterase

收稿日期: 2016-03-16

基金项目: 国家自然科学基金(31272068); 四川省应用基础研究项目(2014JY0063)

作者简介: 陈琼(1990-), 女, 硕士研究生. E-mail: 1210128124@qq.com

通讯作者: 侯太平. E-mail: houtplab@scu.edu.cn

1 引言

众所周知,蝗灾与水灾、旱灾一直是人类历史上最具危害的三大自然灾害.而在我国,蝗灾危害中最为严重的是飞蝗(*Locusta migratoria Linnaeus*),如东亚飞蝗[*Locusta migratoria manilensis* (Meyen)]^[1].东亚飞蝗,属直翅目(Orthoptera)、蝗科(Acrididae).其寄主为禾本科植物,例如水稻、麦类、红草等^[2].以往我国一直使用单一的化学农药灭蝗,致使蝗虫产生了一定的抗药性,给农业生产带来巨大挑战.近年来,从植物中筛选提取新的灭蝗活性物质,并在此基础上研制不易产生抗药性且低毒易降解的生物农药,已成为研究的热点^[3].

瑞香狼毒(*Stellera chamaejasme* L.)全草有毒,以其根部毒性最大^[4].瑞香狼毒长期与草原牧草竞争空间,营养及水资源,严重影响草场利用及牧草的品质与繁衍,造成草原大面积退化^[5].每年早春,因牛羊误食瑞香狼毒而中毒死亡的事件也时有发生.高嫚璐等^[3]发现瑞香狼毒石油醚萃取物对东亚飞蝗具有较强的触杀活性.观察用药后的蝗虫可发现,虫体出现麻痹,四肢抽搐,弹跳能力逐渐丧失等中毒症状.据此推测瑞香狼毒活性成分可能主要作用于东亚飞蝗的神经系统.因此,本研究采用活性跟踪法,利用硅胶柱分离瑞香狼毒乙酸乙酯萃取物得到活性最强的 I 段粗分物,同时研究了 I 段粗分物对东亚飞蝗体内的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 和乙酰胆碱酯酶的抑制活性.研究结果有利于将瑞香狼毒开发成新型的植物源灭蝗剂.

2 材料与方法

2.1 材料

供试植物:瑞香狼毒(*S. chamaejasme* L.)采自四川省若尔盖草原,将采集的瑞香狼毒根部洗净、充分晾干、粉碎.

供试昆虫:东亚飞蝗三龄若虫[*L. migratoria manilensis* (Meyen)]购于云南省昆明市蝗虫养殖基地.饲养温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 50%,喂食新鲜黑麦草.

实验试剂:ATP 酶试剂盒、乙酰胆碱酯酶试剂盒购于南京建成生物工程研究所.

2.2 方法

2.2.1 瑞香狼毒活性成分的分离

2.2.1.1 浸提与萃取

称取一定量的瑞香狼毒根粉,按重量(g):体积(mL)=1:10的比例加入95%乙醇,50℃水浴搅拌浸提12h,抽滤,反复浸提3次,合并滤液并减压浓缩,得到瑞香狼毒乙醇提取物.乙醇提取物经乙酸乙酯萃取.

2.2.1.2 柱层析 填充硅胶 H 作固定相,干法拌样、湿法装柱,加洗脱剂顺序为:V(石油醚:乙酸乙酯)=4:1→V(石油醚:乙酸乙酯)=1:2→乙醇,用三角瓶收集各段溶液,经薄层层析硅胶板检测,合并极性相似的部分,减压浓缩得到 I、II、III 段粗分物.

2.2.2 各段萃取物对东亚飞蝗的毒力测定

①药品配制 以瑞香狼毒的乙酸乙酯萃取物、I、II、III 段粗分物为样品,分别以样品(g):二甲亚砜(DMSO)(mL):Tween-80(mL)=1:2:2的比例充分混匀,作为处理液,备用.对照组中含有等量的 DMSO 和 Tween-80.

②生物活性测定^[6] 将瑞香狼毒的乙酸乙酯萃取物、I、II、III 段粗分物处理液用双蒸水梯度稀释为 10mg/mL 浓度;

将 I 段粗分物处理液用双蒸水梯度稀释为 40 mg/mL、20 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL、2.50 mg/mL、1.25 mg/mL 浓度.

采用浸虫浸草法研究杀虫活性.将已饥饿处理 24h 的 3 龄东亚飞蝗若虫浸入不同的药液中,1s 后迅速取出,放入饲养笼中,每笼放入 20 只,重复 3 组.再将新鲜的黑麦草浸入相应浓度的药液中,3s 后取出置于通风橱内,沥干后放入饲养笼内.连续观察 96h 内的发病及死亡情况.根据 Abbott's 公式计算其死亡率和校正死亡率.

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡虫数}}{\text{供试总虫数}} \times 100$$

$$\text{校正死亡率}(\%) =$$

$$\frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100$$

2.2.3 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性测定 将 I 段粗分物处理液用双蒸水稀释为 10mg/mL、5mg/mL、2.50mg/mL.采用浸虫浸草法处理 3 龄东亚飞蝗若虫.

分别取 5 头药物处理后的若虫的头部,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入冰冷的 0.86%生理盐水,冰浴匀浆,2500r/min、4℃离心 20min,上清液即为粗酶液^[7].酶活力测定用微量 ATPase 测定试剂盒测试.以每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量

为一个 ATP 酶活力单位. 试验重复 3 次. 蛋白质含量测定参照考马斯亮蓝 G-250 法^[8].

2.2.4 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗 Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase 的活性测定 将 I 段粗分物处理液用双蒸水稀释为 10mg/mL、5mg/mL、2.50mg/mL. 采用浸虫浸草法处理 3 龄东亚飞蝗若虫. 制备粗酶液. Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase 活力测定参照微量 ATPase 测定试剂盒说明书, 试验重复 3 次. 蛋白质含量测定参照考马斯亮蓝 G-250 法.

2.2.5 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗乙酰胆碱酯酶的活性测定 将 I 段粗分物处理液用双蒸水稀释为 10mg/mL、5mg/mL、2.50mg/mL. 采用浸虫浸草法处理 3 龄东亚飞蝗若虫. 制备粗酶液. 酶活力测定用乙酰胆碱酯酶(A-CHE)测定试剂盒测试. 以每毫克组织蛋白在 37℃ 保温 6min, 水解 1 μ mol 基质为一个酶活力单位. 试验重复 3 次. 蛋白质含量测定参照考马斯亮蓝 G-250 法.

2.2.6 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗的毒力作用与 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 活性的关系 分析瑞香狼毒 I 段粗分物在 5mg/mL、96h 内对 3 龄东亚飞蝗若虫的校正死亡率与其在同等条件下对 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 的抑制率之间的对应关系.

2.2.7 数据处理 采用 DPS7.05 版软件求出 LC_{50} 及 95% 置信区间; 用 SPSS19.0 版软件对实验数据进行统计及显著性分析.

3 实验结果与分析

3.1 各段萃取物对东亚飞蝗的毒力测定

测定结果如表 1、表 2 和表 3 所示. 由表 1 可知 I 段粗分物对东亚飞蝗的毒杀作用最强. 由表 2 和表 3 可知 I 段粗分物对东亚飞蝗的毒杀作用随着药品浓度的升高、时间的延长而增强. 以其浓度对数为自变量(X), 死亡率的机率值为因变量(Y) 作毒力回归, 24h、48h、72h、96h 的 LC_{50} 分别为 21.36mg/mL、7.34mg/mL、3.63mg/mL、2.85mg/mL.

表 1 各段萃取物对东亚飞蝗的毒力测定(10mg/mL)
Tab. 1 Toxicity determination of each extract from *S. chamaejasme* L. against *L. migratoria manilensis* (Meyen) (10mg/mL)

组分	校正死亡率(%)			
	24h	48h	72h	96h
I	9.74	71.00	92.50	97.10
II	7.69	8.90	5.00	2.86
III	0	2.80	3.12	10.70
乙酸乙酯萃取物	2.10	11.60	16.60	31.90

表 2 I 段粗分物对东亚飞蝗的毒力测定
Tab. 2 Toxicity determination of I section from *S. chamaejasme* L. against *L. migratoria manilensis* (Meyen)

浓度(mg/mL)	校正死亡率(%)			
	24h	48h	72h	96h
40	71.42	100	100	100
20	53.57	80.84	95.24	100
10	32.14	67.86	80.77	88.00
5	3.57	23.53	57.69	67.99
2.50	7.14	21.43	34.60	43.99
1.25	3.57	7.14	19.23	24.00

表 3 I 段粗分物对东亚飞蝗的 LC_{50}
Tab. 3 The LC_{50} of I section from *S. chamaejasme* L. against *L. migratoria manilensis* (Meyen)

时间	毒力回归方程	LC_{50} (95%置信区间) (mg/mL)	相关系数 (R)
24h	$Y=2.7477+1.6939x$	21.36(11.60~39.32)	0.9334
48h	$Y=3.2945+1.9700x$	7.34(5.47~9.85)	0.9709
72h	$Y=-2.4992+2.1067x$	3.63(3.24~4.07)	0.9952
96h	$Y=4.0552+2.0804x$	2.85(2.68~3.02)	0.9985

3.2 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗的 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 活性的影响

I 段粗分物对东亚飞蝗 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 活性的影响如表 4 所示. 由表可知, 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗的 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 有明显的抑制作用, 且随着药物浓度的升高, $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 的酶活力显著减小, 表现出剂量/效应关系; I 段粗分物对 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 的抑制率随着时间的延长而逐渐升高, 表现出时间/效应关系. 当用药物处理东亚飞蝗时, 试虫体内的 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 活性在短时间内出现了先降低后升高的现象, 陈根强^[9]认为这种现象的出现可能与昆虫自身的一种主动防御机制有关, 药物初作用于蝗虫时, 使得蝗虫体内的 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 的活性迅速下降, 但在虫体自身防御的作用下, $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 的活性得到一定的恢复, 随着药物大量的进入虫体, $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 的活性再次出现下降. 中、高浓度条件下, 瑞香狼毒萃取物 I 段粗分物对东亚飞蝗 $Na^{+}-K^{+}$ -ATPase 的抑制率, 明显高于 Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase 和乙酰胆碱酯酶(表 5、表 6).

3.3 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗的 Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase 活性的影响

I 段粗分物对东亚飞蝗 Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase 活性的影响见表 5. 由表 5 可知, 经不同浓度的 I 段粗分物处理后的 3 龄东亚飞蝗的 Ca^{2+}/Mg^{2+} -

ATPase 的酶活力总体变化趋势为:在药物作用的短时间内,酶活力无明显变化;随着作用时间的延长,酶活力先逐渐降低,再出现一定程度的升高,最

后趋于稳定。当药物浓度为 5mg/mL,作用时间为 96h 时, I 段粗分子对 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 的抑制率有最大值,为 24.49%。

表 4 I 段粗分子对东亚飞蝗 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响

Tab. 4 Inhibition activity of I section from *S. chamaejasme* L. on Na^+/K^+ -ATPase in *L. migratoria* manilensis (Meyen)

时间(h)	酶活力($\mu\text{mol}/\text{pi}/\text{mgprot}/\text{hour}$)			抑制率(%)		
	10mg/mL	5mg/mL	2.50mg/mL	10mg/mL	5mg/mL	2.50mg/mL
CK	1.093±0.0017	1.093±0.0017	1.093±0.0017	—	—	—
12	0.534±0.0012 ^a	0.831±0.0047 ^b	1.007±0.0036 ^c	51.11±0.1097 ^a	23.94±0.4349 ^b	7.87±0.3301 ^c
24	0.764±0.0055 ^a	0.882±0.0035 ^b	0.956±0.0023 ^c	30.13±0.5057 ^a	19.27±0.3208 ^b	12.51±0.2136 ^c
48	0.713±0.0100 ^a	0.789±0.0108 ^b	0.889±0.0046 ^c	34.77±0.9150 ^a	27.78±0.9857 ^b	18.67±0.4179 ^c
72	0.654±0.0023 ^a	0.681±0.0012 ^b	1.016±0.0017 ^c	40.19±0.2136 ^a	37.73±0.1097 ^b	7.04±0.1617 ^c
96	0.631±0.0047 ^a	0.652±0.0031 ^b	0.890±0.0017 ^c	42.24±0.4349 ^a	40.38±0.2804 ^b	18.57±0.1559 ^c

注:表中数据为 3 次酶活力平均值±标准差;同一行数据后标不相同小写字母者,表示经 LSD(L)和 Dunnett's T3(3)两两比较分析,其在 $P_{0.05}$ 水平上差异显著($P<0.05$).

表 5 I 段粗分子对东亚飞蝗 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性的影响

Tab. 5 Inhibition activity of I section from *S. chamaejasme* L. on $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in *L. migratoria* manilensis (Meyen)

时间(h)	酶活力($\mu\text{mol}/\text{pi}/\text{mgprot}/\text{hour}$)			抑制率(%)		
	10mg/mL	5mg/mL	2.50mg/mL	10mg/mL	5mg/mL	2.50mg/mL
CK	1.251±0.0055	1.251±0.0055	1.251±0.0055	—	—	—
12	1.242±0.0056 ^a	1.253±0.0047 ^a	1.201±0.0042 ^b	0.72±0.4454 ^a	-0.19±0.3781 ^a	4.03±0.3331 ^b
24	1.015±0.0110 ^a	1.203±0.0159 ^b	1.241±0.0052 ^c	18.86±0.8750 ^a	3.81±1.2758 ^b	0.80±0.4157 ^c
48	0.975±0.0068 ^a	1.084±0.0065 ^b	1.135±0.0035 ^c	22.09±0.5445 ^a	13.32±0.5205 ^b	9.27±0.2771 ^c
72	1.050±0.0070 ^a	0.982±0.0051 ^b	1.222±0.0035 ^c	16.07±0.5600 ^a	21.53±0.4105 ^b	2.35±0.2810 ^c
96	0.973±0.0042 ^a	0.945±0.0085 ^b	1.216±0.0108 ^c	22.25±0.3331 ^a	24.49±0.6804 ^b	2.77±0.8629 ^c

注:表中数据为 3 次酶活力平均值±标准差;同一行数据后标不相同小写字母者,表示经 LSD(L)和 Dunnett's T3(3)两两比较分析,其在 $P_{0.05}$ 水平上差异显著($P<0.05$).

3.4 瑞香狼毒 I 段粗分子对东亚飞蝗的乙酰胆碱酯酶活性的影响

I 段粗分子对东亚飞蝗体内乙酰胆碱酯酶活性的影响如表 6 所示。由表 6 可知,当作用时间达到 48h 后,乙酰胆碱酯酶的酶比活力与瑞香狼毒 I 段粗分子的浓度之间无显著相关性。当用 10mg/

mL 的瑞香狼毒 I 段粗分子处理 3 龄东亚飞蝗若虫时, I 段粗分子在 12h 时使乙酰胆碱酯酶的活性迅速下降,此时抑制率为 35.50%;然后在 24h 时酶活抑制率为 10.45%,即酶活性出现一定的恢复;之后 I 段粗分子对乙酰胆碱酯酶的抑制率基本趋于平衡。

表 6 I 段粗分子对东亚飞蝗乙酰胆碱酯酶活性的影响

Tab. 6 Inhibition activity of I section from *S. chamaejasme* L. on acetylcholinesterase in *L. migratoria* manilensis (Meyen)

时间(h)	酶活力($\mu\text{mol}/\text{pi}/\text{mg prot}/\text{h}$)			抑制率(%)		
	10mg/mL	5mg/mL	2.50mg/mL	10mg/mL	5mg/mL	2.50mg/mL
CK	0.037±0.0042	0.037±0.0042	0.037±0.0042	—	—	—
12	0.024±0.0007 ^a	0.030±0.0010 ^b	0.038±0.0018 ^c	35.50±1.8630 ^a	18.83±2.8322 ^b	-2.70±4.8506 ^c
24	0.034±0.0022 ^a	0.041±0.0017 ^b	0.030±0.0009 ^a	10.45±3.8379 ^a	11.53±4.6150 ^a	18.92±2.5087 ^a
36	0.026±0.0006 ^a	0.029±0.0002 ^b	0.032±0.0008 ^c	29.37±1.7242 ^a	22.34±0.4762 ^b	13.60±2.0790 ^c
48	0.025±0.0003 ^a	0.027±0.0022 ^a	0.026±0.0012 ^a	33.33±0.9033 ^a	26.40±5.8439 ^a	30.00±3.2269 ^a
72	0.026±0.0002 ^a	0.030±0.0022 ^a	0.028±0.0011 ^a	29.46±0.6235 ^a	18.29±5.9419 ^a	23.33±2.8954 ^a

注:表中数据为 3 次酶活力平均值±标准差;同一行数据后标不相同小写字母者,表示经 LSD(L)和 Dunnett's T3(3)两两比较分析,其在 $P_{0.05}$ 水平上差异显著($P<0.05$).

3.5 瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗的毒力作用与 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的关系

以 I 段粗分物对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的抑制率为自变量,以其对东亚飞蝗的校正死亡率为应变量,得线性方程为: $Y = -58.053 + 3.076X$, 相关系数 $R^2 = 0.9911$. 可见,瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗的毒力作用与其对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的抑制作用之间存在显著的正相关性. 据此推测, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 可能是瑞香狼毒对东亚飞蝗的主要作用靶标之一.

表 7 I 段粗分物对东亚飞蝗的毒力作用与 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的对应关系

Tab. 7 Relation between toxicity function of I section from *S. chamaejasme* L. against *L. migratoria manilensis* (Meyen) and inhibition activity of I section against $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in *L. migratoria manilensis* (Meyen)

	24h	48h	72h	96h
酶活抑制率	19.27	27.78	37.73	40.38
校正死亡率	3.57	23.53	57.69	67.99

4 讨论

研究表明,瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗具有较强的毒杀作用. 根据东亚飞蝗的中毒症状推测,瑞香狼毒活性成分可能主要作用于东亚飞蝗的神经系统. 已有研究证实,杀虫药剂多作用于昆虫神经系统,尤其是虫体神经膜上的各种 ATPase,如拟除虫菊酯类杀虫剂的靶标酶是 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ^[10]. 在生物体的各类细胞质膜上广泛分布有 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$,以可兴奋细胞质膜上含量最为丰富^[11]. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 可水解 ATP 的高能磷酸键以释放自由能,维持膜内外电位的稳定,确保正常的神经冲动的传导. 当 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性受到药物抑制时,膜内 Na^+ 不能及时被泵出,使得膜电位异常,神经膜持续兴奋,神经系统功能紊乱,最终引起虫体死亡^[12-13]. 同样钙离子对神经系统也至关重要,需通过 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换泵、 Ca-ATPase 和 Ca 泵来调节膜内外的钙离子平衡. 当相应的 ATPase 功能异常时,轴突的运输功能,神经递质的释放及神经质膜的稳定性都会受到影响,进而使虫体表现出异常行为^[14,15]. 生物神经传导中的另一种关键酶——乙酰胆碱酯酶,可降解神经传导过程中的乙酰胆碱,终止神经递质对突触后膜的兴奋刺激,保证生物体内神经信号的正常传导^[16,17].

通过研究瑞香狼毒活性成分对东亚飞蝗体内的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 、乙酰胆碱酯酶活性的影响表明,从瑞香狼毒根中分离得到的 I 段粗分物可显著抑制 3 龄东亚飞蝗若虫头部的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性,且这种抑制效果具有时间和

浓度依赖性;I 段粗分物对 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 、乙酰胆碱酯酶也有一定程度的抑制作用,但其抑制率在 5mg/mL 和 10mg/mL 的药物浓度下均低于对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的抑制率. 进一步分析发现瑞香狼毒 I 段粗分物对东亚飞蝗的校正死亡率与对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的抑制率之间存在显著相关性. 综上所述, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 可能是瑞香狼毒对东亚飞蝗的主要作用靶标. 至于瑞香狼毒对东亚飞蝗 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的作用机制,仍需进一步研究.

参考文献:

- [1] 陈永林. 蝗虫与蝗灾[J]. 生物学通报, 1991, 11: 9.
- [2] 曹怀明. 东亚飞蝗的发生与综合防治[J]. 农技服务, 2011, 28(4): 467.
- [3] 高嫚璐, 吴朗, 陈龙, 等. 瑞香狼毒活性成分对东亚飞蝗的生物活性和病理学研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2013, 50(4): 876.
- [4] 张庆荣, 夏光成. 有毒中草药彩色图鉴[M]. 天津: 天津科学翻译出版社, 1994.
- [5] 张国洲, 陈于年, 王亚维, 等. 瑞香科杀虫植物——瑞香狼毒[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 2000, 34(3): 327.
- [6] 张宗炳. 杀虫药剂的毒力测定[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [7] 孙鹏, 彭士朋, 尹飞, 等. 盐度对条石鲷幼鱼 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 酶活力的影响[J]. 水产科学, 2010, 34(8): 1205.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dyebinding [J]. Analytical Biochem, 1976, 72: 249.
- [9] 陈根强. 松油烯-4-醇杀虫作用研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [10] 罗万春. 现代杀虫剂生理毒理学研究进展[J]. 世界农业, 2001, 23(5): 18.
- [11] 李宏. ATPase 的研究进展[J]. 生物学杂志, 1996, 1: 9.
- [12] 王伯扬. 神经电生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1982.
- [13] 何运转, 李梅, 冯国蕾, 等. 拟除虫菊酯对家蝇 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 抑制作用的研究[J]. 昆虫学报, 1999, 42(1): 22.
- [14] 冷欣夫, 唐振华, 王荫长. 杀虫药剂分子毒理学及昆虫抗药性[M]. 中国农业出版社, 1996.
- [15] Mortonsi A. The Enzymes of Biological Membranes [M]. New York: Plenum Press, 1976.
- [16] 张明, 李盾, 陈仪本, 等. 乙酰胆碱酯酶分子生物学研究进展[J]. 农药, 2006, 45(1): 8.
- [17] Duysen E G, Stribley J A, Fry D L, et al. Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 137(1): 43.