

文章编号: 1001-411X(2000)03-0029-04

利用 MTT 法以茛菪素类似物对昆虫 细胞毒力筛选及测定

张志祥¹, 徐汉虹¹, 程东美¹, 吴毓林², 范俊发²

(¹ 华南农业大学昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642;

² 中国科学院上海有机化学研究所生命有机化学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要: 用 MTT 法对 19 种茛菪素类似物进行了离体细胞筛选, 并对 20 号化合物和鱼藤酮进行了细胞毒力测定. 结果表明, 20 号化合物对斜纹夜蛾细胞的毒杀效果最好, 在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理细胞 20 h 细胞的死亡率达到 45.52%; 20 号化合物、鱼藤酮细胞毒力测定的 LC_{50} 分别为 109.58 和 $168.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

关键词: MTT 法; 斜纹夜蛾细胞系; 茛菪素类似物; 毒力测定

中图分类号: Q965.9

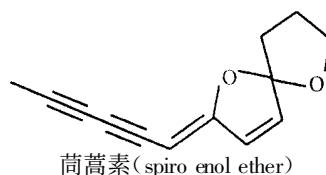
文献标识码: A

随着昆虫细胞培养技术的发展, 利用昆虫细胞检测生物活性物质的方法也逐步发展起来, 早在 60、70 年代, 曾有用哺乳动物细胞和昆虫细胞来检测多种有机磷和有机氯农药的毒力^[1~4], 1983 年, Mosmann^[3] 结合微孔培养法, 利用细胞对一种水溶性唑盐的还原作用, 建立了一种快速、灵敏的比色分析法, 来鉴别细胞的死活. 经过以后的改进, 特别是 Alley 的研究, 逐渐成熟, 称为 Microculture Tetrazolium Assay, 简称 MTT 法. Stipanovic 等^[6] 首次采用 MTT 法测定了棉酚系列天然产物对美洲菸夜蛾、(*Heliothis virescens*) 细胞的毒力, 其结果与活体毒力测定、田间小区试验有良好的相关性. Altman^[7] 比较系统地研究了有机溶剂对美洲菸夜蛾细胞的影响. 周青春等^[8~10] 用改进的 MTT 法检测了几种有机溶剂杀虫剂对菜粉蝶细胞系和棉铃虫细胞系的毒力, 其结果与传统的生测方法具有很好的相关性.

MTT 法原理^[5]: 活体细胞内线粒体呼吸链上的脱氢酶(如: 琥珀酸脱氢酶等), 能将黄色的 MTT(溴化[3-(4,5-二甲基噻唑-2-)-2,5-二苯基]四氮唑)还原成蓝紫色的甲臍(Formazan), 且甲臍生成量与活细胞数量、细胞的种类和作用时间等相关, 当细胞种类和作用时间一定时, 则甲臍生成量与细胞数量呈直线相关, 通过比色法测定甲臍的量, 就可测知活细胞的数量. 该方法与同位素掺入法所得结果无显著差异. 以哺乳动物细胞和昆虫细胞为研究对象, 均证明蓝紫色结晶物的生成量与活细胞的数量呈线性关系^[10~12].

茛菪素(spiro enol ether)是从蔬菜茛菪(*Chrysanthemum coronarium*)提取出的具有拒食活性的成分, 对家蚕(*Bombyx mori* L.)^[13]、菜粉蝶(*Pieris rapae* L.) 幼虫和小菜蛾(*Plutella xylostella* L.) 等昆虫具有明显的拒食活性和一定的毒杀活性. 1966 年, Bohlmann 等人由 1,3-戊二炔和 2-羟基四氢呋喃出发, 利用光化学方法, 合成了茛菪素及其类似物, 但是茛菪素的最终产率只有 2%. 1994 年, 中国科学院上海有机化学所以糠醛为起始原料, 设计并成功地开发了一种简便通用且具有很高产率的合成茛菪素的方法^[14].

茛菪素的结构式如下:



茛菪素(spiro enol ether)结构简单, 易人工合成, 对人畜无毒, 对环境安全, 为探索活性更高的化合物, 中国科学院上海有机化学所以茛菪素为模板, 合成了一系列的类似化合物.

本文用 MTT 法对 19 种茛菪素类似物进行了离体筛选, 并对其中一种茛菪素类似物和鱼藤酮进行了细胞毒力测定.

1 材料与方法

1.1 药剂、试剂及试验设备

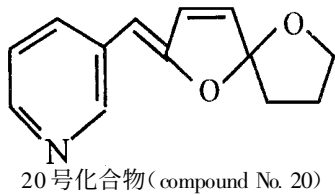
19 种茛菪素类似物: 中国科学院上海有机化学

收稿日期: 1999-09-20

作者简介: 张志祥(1974-), 男, 昆虫毒理研究室硕士研究生.

基金项目: 国家重点科技项目(攻关)计划资助项目(96-A02-03-01)

所化学合成并提供. 其中 20 号化合物的结构式如下:



鱼藤酮 Rotenone: 广东德庆西江植保化工厂生产.

MTT: 化学名称为溴化[3-(4,5-二甲基噁唑-2-)-2,5-二苯基]四氮唑, Sigma 公司生产. 十二烷基磺酸钠 (SDS), Serva 公司生产. TC-100-MK 培养基: HyClone 公司生产. 异丙醇、丙酮、盐酸等均为广州试剂厂生产的分析纯试剂.

DG-3022 型酶联免疫检测仪: 国营华东电子管厂生产. LRH250A 生化培养箱: 广东省医疗器械厂. Olympus 倒置显微镜: 日本 Olympus 公司生产.

1.2 药剂及试剂的配制

药剂: 用丙酮将茛蒿素类似物配成 $10\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 在超净工作台上, 用 TC-100-MK 培养基将母液和作对照用的丙酮稀释到试验所需浓度, 将配好的药剂无菌过滤, 置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用.

$5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 母液: 称取 50.0 mg MTT, 加入 10 mL 无血清 TC-100-MK 培养基, 待完全溶解后, 将配好的试剂无菌过滤, 置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用.

溶剂 A: 称取 3 g SDS 溶于 100 mL 异丙醇, 用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 调 pH 值至 4.5 , 置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用.

1.3 供试细胞系及培养

供试细胞系是华中师范大学昆虫所提供的斜纹夜蛾细胞系, 简称 SL 细胞, 培养基为 TC-100-MK 加 $\varphi=10\%$ 胎牛血清, 培养温度为 $(25\pm1)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 细胞以圆形为主, 约 $5\sim7\text{ d}$ 传代 1 次.

1.4 MTT 细胞生物测定

参见 Mosmann 方法^[3]、Stipanovic 方法^[6]和周青春方法^[8,9]. 各化合物各浓度均设 6 个重复, 每个浓度用 96 孔细胞培养板的 1 列. 在 96 孔细胞培养板的各孔 (除第 1、2、12 列以外) 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液 (细胞处于对数生长期, 细胞量约为 $3.0\times10^5\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$), 在第 1、2、12 列加入不含细胞的培养基 (第 1、12 列用于保湿, 第 2 列用于调零), 在生化培养箱 $[(25\pm1)\text{ }^{\circ}\text{C}]$ 中培养 12 h , 使活细胞充分贴壁, 将 96 孔细胞培养板翻转过来, 轻敲或轻晃数次, 将细胞液及培养基尽量倒出, 在第 1、2、12 列的各个孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 不含细胞的 TC-100-MK 培养基, 在其他各列的各个孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 配好的丙酮试剂或药剂, 加完后, 继续在生化培养箱 $[(27\pm1)\text{ }^{\circ}\text{C}]$ 培养 20 h , 在培养结束前向各个孔内加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ MTT 母液, 然后继续在生化培养箱 $[(27\pm1)\text{ }^{\circ}\text{C}]$ 培养 4 h . 培养结束后, 将细胞培养板翻过来, 轻敲或轻晃, 弃去上清液, 再向每孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 溶剂 A, 在室温下放置 0.5 h , 其间轻敲细胞培养板数次, 待甲臞完全溶解后, 置酶联免疫检测仪上, 在 570 nm 的波长下读取各孔的 D 值, 舍去各列靠边的两孔的 D 值, 并以 D 值算出细胞死亡率, 换算公式如下:

细胞死亡率(%)= $\left[1-\frac{\text{试样 } D_{570\text{nm}} \text{ 平均值}}{\text{对照 } D_{570\text{nm}} \text{ 平均值}}\right]\times 100$

将浓度转化为对数, 查出死亡率的机率值, 用 Casiofx-3900 计算器进行毒力回归计算, 并用 DMRT 法对计算结果进行差异显著性检验.

2 结果与分析

21 种茛蒿素类似物对 SL 细胞的毒力筛选结果见表 1. 结果表明, 3 号、7 号、8 号、15 号、20 号 5 种茛蒿素类似物和鱼藤酮对 SL 细胞的毒杀效果较好, 处

表 1 茛蒿素类似物对 SL 细胞毒力筛选结果¹⁾ (广州, 19990507)

Tab. 1 Toxical screening of derivate of SEE analogues to <i>Spodoptera litura</i> cell						(Guangzhou)		
药剂	$D_{570\text{nm}}$ 平均值	SL 细胞死亡率	药剂	$D_{570\text{nm}}$ 平均值	SL 细胞死亡率	药剂	$D_{570\text{nm}}$ 平均值	SL 细胞死亡率
compounds	ave. of $D_{570\text{nm}}$	mortality of SL cell/ %	compounds	ave. of $D_{570\text{nm}}$	mortality of SL cell/ %	compounds	ave. of $D_{570\text{nm}}$	mortality of SL cell/ %
CK	0.140 cd		8 号	0.109 i	21.63	15 号	0.115 gh	19.67
1 号	0.122 ef	12.43	CK	0.144 bc		16 号	0.126 e	12.54
2 号	0.118 fg	15.29	9 号	0.145 bc	—1.16	对照	0.143 bc	
3 号	0.111 hi	20.19	10 号	0.137 d	4.53	19 号	0.174 a	—21.30
4 号	0.123 ef	12.19	11 号	0.144 bc	—0.47	20 号	0.078 l	45.52
5 号	0.124 ef	11.23	12 号	0.149 b	—3.48	21 号	0.119 fg	16.76
6 号	0.118 fg	15.53	13 号	0.147 b	—2.67	鱼藤酮	0.094 k	34.69
7 号	0.103 j	25.93	14 号	0.137 d	4.88			

1) 各化合物的浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 对照为含 $\varphi=1\%$ 丙酮的 TC-100-MK 培养基; 表中数据 后字母相同者, 表示经方差分析 (DMRT) 在 5% 水平上差异不显著; 表中同一个对照 后的数据为从同一块细胞培养板上得出的结果

理后 20 h 的死亡率分别为 20.19%、25.93%、21.63%、45.52%和 34.69%，在所有供试化合物中，20 号化合物对 SL 细胞毒杀效果最好，并且明显优于鱼藤酮，3 号、7 号和 8 号和 15 号化合物的毒杀效果显著高于另 14 种茛蒿素类似物，但方差分析的结果表明，毒杀作用明显低于鱼藤酮；19 号化合物处理 20 h 后，SL 的细胞死亡率为负数（-21.30%），并且 D_{570nm} 值与对照有显著差异，结果表明该化合物对 SL 细胞的生长具有促进作用；9 号、11 号、12 号和 13 号化合物的 D_{570nm} 值与对照无明显的差异，这 4 种化合物对 SL 细胞的毒杀效果或促进其生长作用均不明显；其他各种化合物对 SL 细胞具有一定的毒杀效果，但均明显差于鱼藤酮。

以相同浓度 ($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 SL 细胞时，20 号化合物的毒杀作用强于鱼藤酮。为了进一步研究茛蒿素类似物对离体培养细胞的活性，测定了 21 种化合物中活性最高的 20 号化合物对 SL 细胞的毒力，结果见表 2。

从表 2 可以看出，20 号化合物与鱼藤酮均对 SL 细胞具有较强的毒杀效果，处理 20 h 后，二者对 SL 细胞致死中浓度分别为 109.58 和 $168.97\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，且二者致死中浓度的 95% 置信区间分别为 $96.92 \sim 122.24$ 、 $153.74 \sim 184.20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，2 个区间没有重合部分，表明两个化合物对斜纹夜蛾细胞的毒杀作用差异显著，这与表 1 的方差分析结果相同，进一步证实 20 号化合物的毒杀效果明显优于鱼藤酮。

表 2 茛蒿素类似物对 SL 细胞毒力测定结果 (广州, 19990507)

Tab. 2 Toxicity of derivate of SEE analogues to *Spodoptera litura* cell (Guangzhou)

药剂名称 compounds	毒力回归方程 toxicity regress equation	LC_{50} (95% 置信区间 95% limits distance) / $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	相关系数 coefficient correlation
20 号	$Y=2.6163+1.1686X$	$109.58(96.92\sim122.24)$	0.9992
鱼藤酮	$Y=1.5964+1.5278X$	$168.97(153.74\sim184.20)$	0.9846

3 讨论

目前，国内外在杀虫剂筛选和毒力测定中，主要采用活体昆虫进行杀虫活性的测定，在长期的研究过程中，活体生物测定早已形成一整套比较规范并且标准化的经典方法。然而活体生物测定也有一定的局限性，它要求饲养大量生理条件一致的昆虫、测定周期较长、劳动量大、所需操作人员多，用药量大，并且昆虫在不同的季节、温度、地区，其抗药性差别较大，在不同的季节、不同的地区或用不同品系的昆虫所做出的试验结果难以相互比较。在植物性农药的筛选中其局限性尤其突出。从植物中提取纯品是一个艰难漫长的过程，并且在不知其活性以前，提取量极少，纯品更是宝贵，很难达到活体测定的需求量。

与传统生物测定方法相比，MTT 法具有快捷、灵敏、试验条件易于控制以及劳动量小、用药量少等优点。MTT 法供试生物量大，每个重复的细胞量均数以万计，因此其灵敏度较高。与活体生物相比，细胞的敏感性更高，达到相同的死亡率，MTT 法所需的剂量低得多，在植物性杀虫剂的研究中，这一点显得尤为重要。活性化合物在植物中的含量一般较低，在用植物抽提物处理活体生物时，有时可能会漏掉一些活性高而含量低的化合物，而 MTT 法却检测出低浓度

的活性化合物。其用药量少的特点对植物性杀虫剂和大量化学药剂的筛选具有重大的意义。

细胞毒力测定得出 2 个毒力回归方程的相关系数分别为 0.9992 和 0.9846，这说明试验结果具有较好的相关性，2 个毒力回归方程的 b 值分别为 1.1686 和 1.5278，2 个值比较接近，并且都比较大，这说明细胞具有较好的均质性，对化合物的抗性和敏感性均比较一致。这一点比常规生测优越。

MTT 法相对于传统的生物测定方法来说，具有一些不可比拟的优点，但是绝不能认为 MTT 法可以取代传统生测方法，有些化合物作用于细胞中并不存在的组织并且具有很强的杀虫活性，但是对细胞的毒杀效果不佳，如拟除虫菊酯类化合物作用于神经的轴突，而试验所用的细胞并没有这个结构。MTT 法与触杀毒力测定、拒食活性测定和胃毒活性测定等测定方法一样，是生物测定的一个方面。

茛蒿素是从蔬菜茛蒿中提取出的化合物，在与自然界长期进化协调发展过程中，自然界早已对其形成了完善的降解机制，不会有残留问题，更可贵的是，茛蒿是人们长期食用的蔬菜，这足以证明茛蒿素对人类是安全的。茛蒿素及其类似物的结构式比较简单，可以人工合成，容易实现规模化生产，因而探讨茛蒿素类似物结构与活性的关系具有重大的意义。

1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本文已证明 20 号化合物对 SL 细胞系具有较好的毒杀效果,但其活体生物测定仍有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] WATERHOUSE D F. Some aspects of Australian entomological research[M]. London: Proc VII Int Congr Ent. 1965. 46—50.
- [2] GABLIKS J. Responses of several organophosphorus in mouse cell cultures[J]. Proc Soc Expl Biol Med. 1967, (125): 1 002—1 005.
- [3] MITSUHASHI J, GRACE T D WATERHOUSE D F. Effects of insecticide on culture of insect cells[J]. Entomol Exp Appl. 1970 (13): 327—341.
- [4] MITSUHASHI J, Grace T D, WATERHOUSE D F. Studies on the effects of rotenone on the growth of insect cells cultured in vitro[J]. Entomol Exp Appl. 1970 (13): 467.
- [5] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. J Immunol Methods. 1983. 65: 56—63.
- [6] STIPANOVIC R D, ELISSALDE M H, ALTMAN D W, et al. Cell culture bioassay to evaluate allelochemical toxicity to *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. J Econ. Entomol., 1989. 83: 737—741.
- [7] ALTMAN D W, ELISSALDE M H, STIPANOVIC R D, et al. *Heliothis virescens* cell growth organic solvent[J]. Vitro Cell Dev Biol. 1989. 25: 331—33.
- [8] 周青春, 汪虹, 洪华珠, 等. 农药生物测定新方法的研究: I 几种有机溶剂对中国棉铃虫(*Heliothis armiger*)细胞生长的影响[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 1997, 31(1): 92—95.
- [9] 周青春, 杨红, 汪虹, 等. 农药生物测定新方法的研究: II 杀虫剂细胞生测体系的建立及改进[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 1997, 31(4): 456—458.
- [10] 周青春, 彭建新, 洪华珠, 等. 利用中国棉铃虫细胞测定有机磷杀虫剂毒力的研究[J]. 佚名. 植物保护研究进展[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995. 490—495.
- [11] GREEN L M, READ J L, WARE C F. A colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines[J]. J Immunol Meth. 1984. 70: 257—268.
- [12] HANSEN M B, ROSS C, BERG K. A sensitive antiviral neutralization bioassay for measuring antibodies to interferons[J]. J Immunol Meth. 1990. 127: 241—248.
- [13] MASAHIRO T, KAZUHIRI C. Novel Plant Growth Inhibitors and Insect Antifeedant from *Chrysanthemum coronarium*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1984. 48(5): 1 367—1 369.
- [14] 高阳, 吴文连. 茛菪素等螺环缩酮烯醇醚化合物的合成[J]. 合成化学. 1997, 5(增刊): 391.

Screening Derivatives of Spiro Enol Ether and Testing Its Toxicity on *Spodoptera litura* Cell with MTT Method

ZHANG Zhi-xiang¹, XU Han-hong¹, CHENG Dong-mei¹, WU Yu-lin², FAN Jun-fa²

(1 Lab. Insect Toxicity, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China;

2 State Key Lab. of Bio-organic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy, Shanghai 200032 China)

Abstract: In this paper 19 kinds of derivatives of spiro enol ether were screened with cell line of *Spodoptera litura* and the toxicity of compound No. 20 and rotenone on *Spodoptera litura* cell were determined by MTT method. The result showed that the activity of compound No. 20 was the highest. When treated with $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of compound No. 20 for 2 hours, the mortality of *S. litura* cell was 45.52%. and LC_{50} of compound No. 20 and rotenone were $109.58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $168.97 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively.

Key words: MTT method; *Spodoptera litura* cell line; derivatives of spiro enol ether

【责任编辑 周志红】