

不同杀虫成分对 Sf9 细胞凋亡的影响

贾建文, 黄劲飞, 王文祥, 胡美英, 钟国华

(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:通过倒置显微形态观察凋亡小体、DNA 琼脂糖凝胶电泳确证的模型,研究了8种代表性杀虫成分对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 离体培养细胞系 Sf9 的凋亡诱导效果,以探讨不同杀虫成分对昆虫细胞凋亡的影响。结果表明,印楝素 0.15 ~ 1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后 72 h 内、喜树碱 0.35 ~ 3.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后 36 h, Sf9 细胞产生大量典型凋亡小体,处理时间延长或剂量加大则以造成细胞坏死为主;DNA 电泳产生典型的 DNA Ladder,表明印楝素和喜树碱对 Sf9 具有明显的细胞凋亡诱导作用。印楝素 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导处理 Sf9 细胞凋亡高峰期处理 24 ~ 48 h,喜树碱 0.35 ~ 3.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导处理 Sf9 细胞凋亡高峰期处理 12 h。苦参碱、氟铃脲、毒死蜱、灭多威、氯氰菊酯以 0.1 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及昆虫蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone)以 0.048 ~ 4.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后 72 h 内对 Sf9 均无明显的细胞凋亡诱导作用。杀虫剂对昆虫细胞凋亡诱导效应随供试化合物、细胞种类、处理剂量、处理时间而异。

关键词:细胞凋亡;草地贪夜蛾细胞系 Sf9;印楝素;喜树碱

中图分类号:S482.7

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)04-0029-07

Effects of Different Insecticidal Components on Induction of Apoptosis in *Spodoptera frugiperda* Cultured Cell Line Sf9

JIA Jian-wen, HUANG Jin-fei, WANG Wen-xiang, HU Mei-ying, ZHONG Guo-hua

(Lab of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The induction of apoptosis of eight typical insecticidal components, including azadirachtin, in *Spodoptera frugiperda* cultured cell lines Sf9 were determined in this paper to investigate the specificity of apoptosis induction by insecticides through the research model of inverted phase contrast microscope assay and DNA agarose gel electrophoresis. The results were shown that the typical morphological characteristics of apoptosis appeared, including a lot of apoptotic bodies, treated in 72 h with azadirachtin at a mass concentration of 0.15 - 1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 36 h with camptothecin at 0.35 - 3.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The necrosis would become a dominant role after the treatment prolonged or the concentration increased. The typical DNA Ladder was got by agarose gel electrophoresis, which showed that azadirachtin and camptothecin possessed distinct apoptosis induction and the induction peak time was 24 - 48 h or 12 h after treatment with at a mass concentration of 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of azadirachtin or 0.35 - 3.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of camptothecin, respectively. However, the same changes could not appear in Sf9 cells within 72 h treated at a mass concentration of 0.1 - 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of matrine, hexaflumuron, chlorpyrifos, methomyl or cypermethrin, and 0.048 - 4.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of 20-hydroxyecdysone, respectively. It was suggested that the apoptosis induction by insecticide would be specific and the induction effectiveness depend on the kind of test chemicals, cell line, treated dose and time.

Key words: apoptosis; *Spodoptera frugiperda* cultured cell lines Sf9; azadirachtin; camptothecin

细胞凋亡 (Apoptosis) 是多细胞生物在机体生长发育、细胞分化和病理状态中基因调控的细胞主动性死亡的过程和状态,是细胞的基本生命现象,其发生对机体维持稳态和组织器官正常生理功能至关重要

收稿日期:2009-02-15

作者简介:贾建文(1983—),男,硕士研究生;通讯作者:钟国华(1973—),男,副教授,博士,E-mail:guohuazhong@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30500335);教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金(2004061)

要^[1-2]. 研究细胞凋亡作用及其机制对于揭示生命活动规律、寻找新型作用机制的活性化合物等都具有重要的科学理论意义和实践指导价值^[3-5]. 近年来有关杀虫化合物对昆虫细胞凋亡诱导作用的文献报道渐多. 戴璇颖等^[6]采用荧光染色、单细胞凝胶电泳、流式细胞仪等技术研究认为, 莠去津 0.062 5 ~ 0.500 0 mmol/L 浓度处理家蚕卵巢培养细胞(BmN)后 24 h 可诱导产生明显的细胞凋亡, 且有明显的时间-剂量效应. 方心葵等^[7]报道氰戊菊酯(Fenvalerate)以 25 $\mu\text{mol/L}$ 处理粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 离体细胞(Tn)时, 细胞死亡与凋亡数明显高于对照. Sf9 是从草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 卵巢中分离而建立的离体培养昆虫细胞系, 是深入研究活性物质作用机制、建立新型高效快速筛选体系的理想实验材料. Rahioui 等^[8]报道了豌豆蛋白 PA1b 对 Sf9 的细胞毒性, 并且观察到可能有细胞凋亡诱导作用. 印楝素是植物源杀虫成分的典型代表之一, 1996 年 Cohen 等^[9]即已注意到印楝素处理对 Sf9 细胞的作用与常规的毒杀作用不同, 处理后 30 min 即可观察到细胞质膜(Plasma membranes)显著的出泡特征, 实际上这是诱导凋亡的特征之一, 但当时作者从未从凋亡诱导角度去研究. Salehzadeh 等^[10]测定结果表明, 印楝素处理后 96 h 对 Sf9 抑制增殖有效中浓度(EC_{50})为 1.5×10^{-10} mol/L, 以 5×10^{-6} mol/L 处理 Sf9 细胞 2 h 后细胞有丝分裂指数达到最大值, 处理后 20 h 处于 G₂/M 期细胞达 90%, 与紫杉醇(Taxol)处理结果差异不显著^[11]. 但目前文献绝大多数是报道某单一活性化合物对昆虫细胞凋亡的诱导作用, 对于杀虫剂成分诱导细胞凋亡是否具有特异性、选择性了解不多. 本文选择了植物源、昆虫生长发育调节成分和商品化杀虫剂共 8 种代表性杀虫活性化合物, 通过直观、快速的形态学和 DNA 电泳检测研究对 Sf9 细胞凋亡的影响, 旨在为筛选昆虫细胞凋亡诱导剂提供参考.

1 材料与方 法

1.1 供试细胞及培养

供试昆虫细胞为草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞系, 由华南农业大学昆虫毒理研究室采用常规方法培养供试. 细胞培养基为 Grace's 昆虫干粉培养基(Gibco 公司), 热灭活胎牛血清(FBS, Gibco 公司). 主要生化试剂包括苜蓿蓝、RNase A、溴化乙锭(EB, Sigma 公司), Triton X-100、DMSO、EDTA (Amresco 公司), 琼脂糖(西班牙 Biowest 公司), Tris (Roche 公司), HEPES (MDBio 公司)等. 其他未特别注明均为分析纯试剂和常规耗材. 细胞继代培养、冻存复苏按常规方法进行.

1.2 供试化合物

供试化合物 8 种, 包括 3 种植物源成分, 即印楝素 A (Azadirachtin, $w = 99.00\%$, 购于 Sigma 公司)、喜树碱(Camptothecin, $w = 99.64\%$, 购于四川镡全天然产物有限公司)、苦参碱(Matrine, $w \geq 98\%$, 由西安中鑫生物技术有限公司惠赠), 2 种昆虫生长发育调节成分, 即 20-羟基蜕皮酮(20-Hydroxyecdysone, 以下简称 20-E, $w = 95.00\%$, 购于 Sigma 公司)和氟铃脲(Hexaflumuron, $w = 96.4\%$, 广西贵港市恒泰化工有限公司提供), 以及 3 种化学杀虫剂, 即毒死蜱(Chlorpyrifos, $w = 96.3\%$, 广东立威化工有限公司提供)、灭多威(Methomyl, $w = 95.00\%$, 江苏江阴龙灯化工厂惠赠)和氯氰菊酯(Cypermethrin, $w = 92.20\%$, 广州车陂化工厂惠赠).

1.3 倒置显微形态特征检测

一般认为, 形态学变化是判断凋亡的基础和最直接依据^[2]. 细胞凋亡晚期时, 通过倒置相差显微镜可清晰观察到凋亡小体, 此即细胞凋亡典型形态学特征, 是初步判断凋亡与否的最常用最直观依据. 本文以此作为供试化合物对 Sf9 是否具有细胞凋亡诱导作用的初筛依据. 将供试化合物溶于 DMSO 中制备 1 000 倍终浓度的贮存液, 取 10 μL 溶于 990 μL $\varphi = 10\%$ 的 FBS 昆虫细胞完全培养液中即为 10 倍终浓度的工作液. 对照(CK)为 $\varphi = 1\%$ 的 DMSO 溶液. 将正常生长的 Sf9 细胞吹打均匀后加入适量新鲜培养液, 计数并平均分瓶培养, 使每细胞瓶内细胞数量为 $0.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^4/\text{mL}$. 培养细胞生长至 70% ~ 80% 汇合时, 吸出全部条件培养液并加入新鲜培养液, 24 h 后细胞处于对数生长期时, 在条件培养液中加入供试化合物药剂的 10 倍终浓度工作液. 混匀后在倒置显微镜(Olympus 公司, 目镜 10 \times 物镜 20)下观察记录处理后 24、48、72 h 的细胞形态特征变化(喜树碱在经过预实验后确定观察其 0、12、24 和 36 h 的细胞形态特征变化为宜)^[12-13].

1.4 DNA 片段化琼脂糖凝胶电泳检测

经过倒置显微形态特征观察, 初筛得到可诱导凋亡小体出现的化合物. 采用纯化试剂盒分别提取初步判断具有诱导凋亡活性的物质处理的细胞基因组 DNA, 1.5 g/L 的琼脂糖凝胶 90 V 恒压电泳, 70 min, 加入终质量浓度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 EB 染色 30 min, 紫外灯下检测电泳条带, 凝胶成像系统扫描记录成像结果. 将正常 Sf9 细胞突然置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 高热环境中 30 min, 并按照相同方法进行琼脂糖凝胶电泳检测, 与诱导凋亡细胞的 DNA 电泳进行比较.

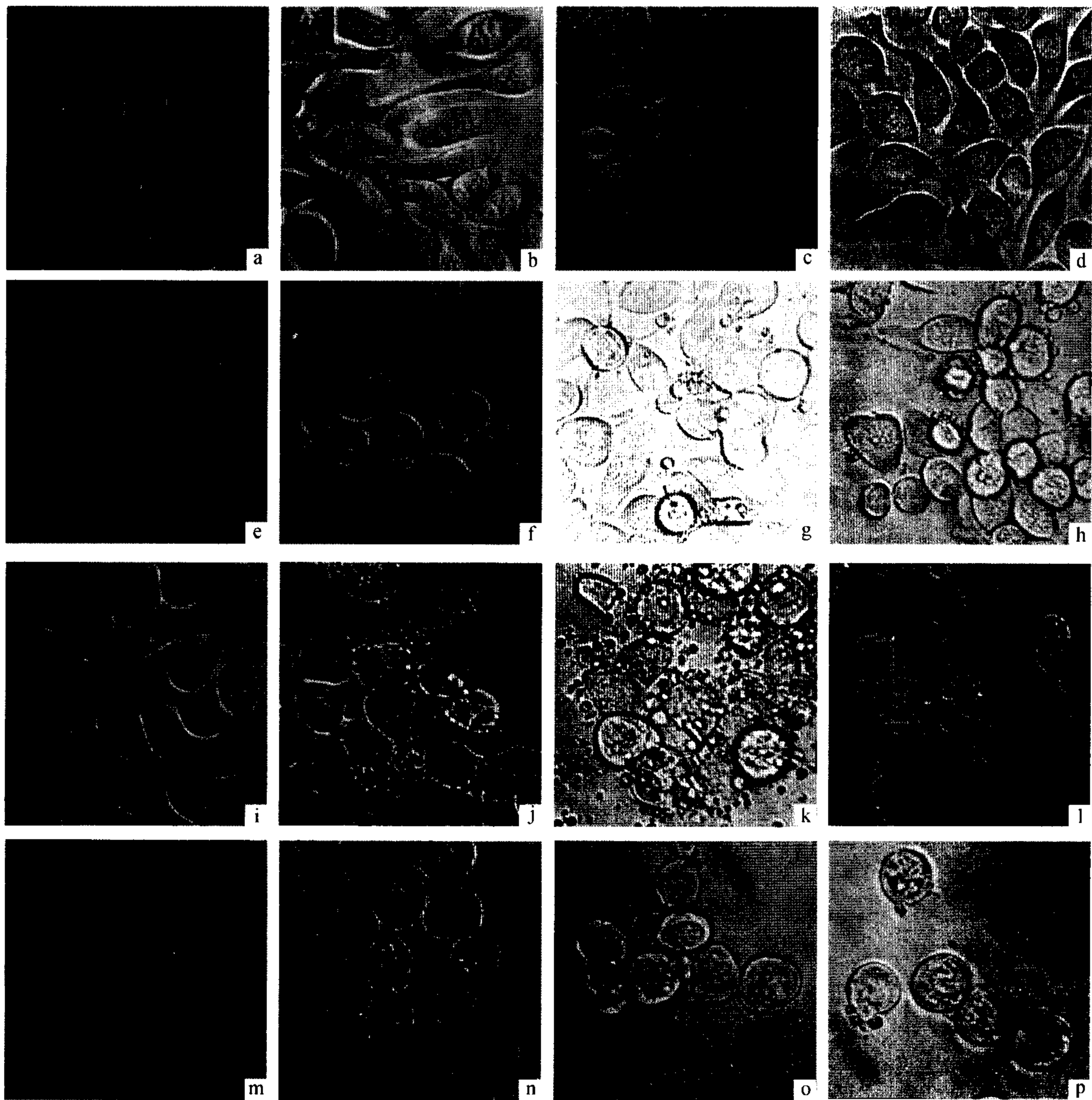
2 结果与分析

2.1 印楝素诱导 Sf9 细胞倒置显微形态特征

印楝素 0.15、1.50 和 15.00 $\mu\text{g/mL}$ 诱导 Sf9 不

同时间的倒置相差显微镜(Inverted phase contrast microscope, IPCM)形态特征见图 1. 空白对照(CK)细胞以终浓度 $\varphi = 1.0\%$ 的 DMSO 处理后 0 ~ 72 h 在倒置显微镜下观察,细胞呈梭形贴壁生长,细胞核均匀居于细胞质中央,细胞界限清晰,增殖正常(图 1a ~ d). 印楝素 $0.15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后 24 h 可观察到细胞核偏移,细胞没有出现皱缩和出泡现象,凋亡小体数量与对照相比并无明显变化(图 1f). 48 和 72 h 细胞发生明显皱缩,细胞间隙略有增大,细胞核偏移,细胞内可见空泡结构,完整轮廓细胞均贴壁且飘浮细胞较少,凋亡小体数量略多于 CK(图 1g, h). 印楝素质量浓度提高至 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$, 处理后 24 h 可观察到细胞皱缩、核边集和细胞内出泡等细胞凋亡部分典型形态特征,凋亡小体多数聚集或开始扩散并位于培养液底部,极个别细胞飘浮(图 1j); 48 h 观察除存在 24 h 结果特征外,凋亡小体数量显著增多并在培

养液中广泛分布,在培养液中完整轮廓细胞与凋亡小体几乎均匀分布(图 1k); 在 72 h 凋亡小体数量有所减少,并零散聚集在完整轮廓细胞周围(图 1l). 如果印楝素质量浓度进一步提高到 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$, 处理后诱导 24 h 大量细胞不再贴壁,细胞核出现偏移,细胞内有空泡结构,细胞皱缩且细胞间隙明显增大,培养液中只存在极少凋亡小体(图 1n); 48 h 可观察到大部分细胞聚集成团并飘浮在培养液表面,飘浮细胞皱缩并呈现细胞核偏移现象,贴壁细胞多零散分布,细胞核也明显边集,只有极少凋亡小体存在(图 1o); 72 h 细胞全部飘浮并聚集成多个细胞团,其形态特征与 48 h 结果相似,贴壁细胞几乎完全消失,凋亡小体数量无明显变化(图 1p). 对以上各浓度印楝素诱导 Sf9 细胞的 72 h 贴壁和飘浮细胞进行苔盼蓝染色,结果表明贴壁和飘浮细胞均对苔盼蓝拒染,即细胞膜完整,只有极少数贴壁和飘浮细胞被染色.



a ~ d, e ~ h, i ~ l 和 m ~ p 分别为对照、 0.15 、 1.50 和 $15.00 \mu\text{g}/\text{mL}$ 印楝素诱导结果,每行从左至右分别为 0、24、48 和 72 h 结果;除 o 和 p 为飘浮细胞外,其他均为贴壁细胞

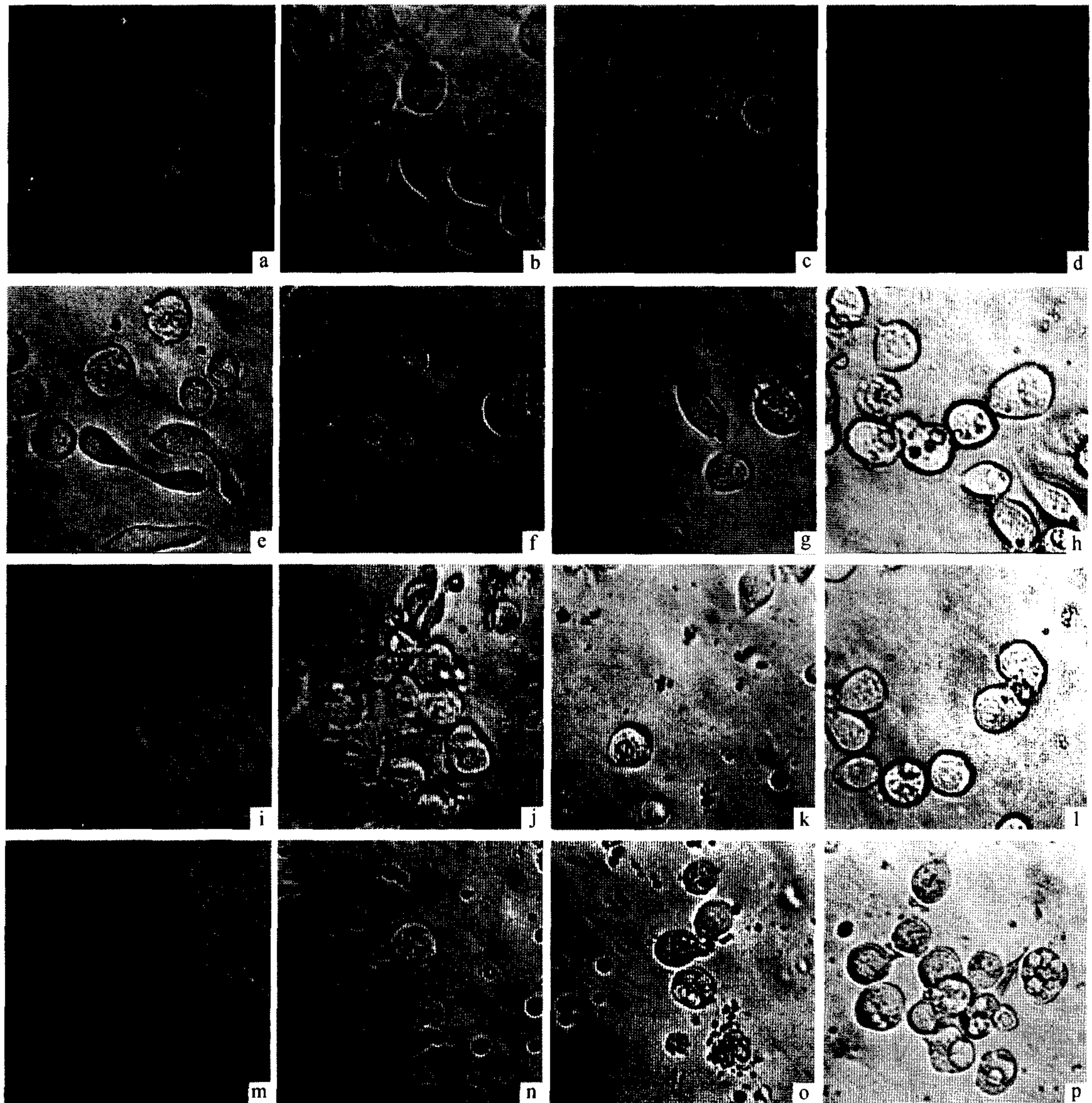
图 1 印楝素诱导 Sf9 细胞凋亡的倒置显微形态特征变化

Fig. 1 Morphological changes in Sf9 cells apoptosis induced by azadirachtin observed by inverted phase contrast microscope

2.2 喜树碱诱导 Sf9 细胞倒置显微形态特征

不同浓度喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡的形态特征见图 2. 喜树碱质量浓度 $0.035 \mu\text{g/mL}$ 处理 12 和 24 h 后, Sf9 细胞形态未发生明显变化, 细胞形态结构与 CK(图 2a~d) 相比无明显区别(图 2f,g), 36 h 细胞核发生明显偏移, 部分细胞有出泡现象和较少凋亡小体, 细胞发生皱缩但正常贴壁(图 2h). 将喜树碱质量浓度提高至 $0.35 \mu\text{g/mL}$ 处理 12 h 后即可观察到细胞裂解为凋亡小体现象, 多数凋亡小体成团聚集或开始扩散, 凋亡小体多分布在培养液底部, 未裂解为凋亡小体的少量完整轮廓细胞也出现细胞皱缩、细胞核偏移、出泡或细胞核消失现象(图 2j); 24 h 凋亡小体数量有所减少, 凋亡小体多数零散分布在正常轮廓细胞周围, 但也有部分凋亡小体扩散分

布在培养液中(图 2k); 诱导 36 h 培养液中凋亡小体数量明显减少, 细胞皱缩, 部分细胞内部出现大小不一的空泡, 少量细胞飘浮(图 2l). 如果进一步提高质量浓度到 $3.5 \mu\text{g/mL}$, 则处理 12 h 即可见培养液底部、中部半悬浮或在表面飘浮的大量凋亡小体, 大量完整轮廓细胞飘浮在培养液表面并成团聚集(图 2n); 24 h 凋亡小体数量明显减少, 贴壁完整轮廓细胞有出泡现象且数量较少, 大量细胞飘浮在培养液表面(图 2o); 36 h 仅见少量凋亡小体, 贴壁细胞明显减少, 能够贴壁的细胞多有出泡现象, 多数细胞飘浮聚集成团(图 2p). 对以上各浓度喜树碱处理 36 h 的 Sf9 细胞进行苔盼蓝染色, 与印楝素诱导 Sf9 细胞的 72 h 结果类似, 多数贴壁和飘浮细胞均对苔盼蓝拒染, 只有极少数贴壁和飘浮细胞被染色.



a~d、e~h、i~l 和 m~p 分别为对照、 0.035 、 0.350 和 $3.500 \mu\text{g/mL}$ 喜树碱诱导结果, 每行从左至右分别为 0、12、24 和 36 h 结果

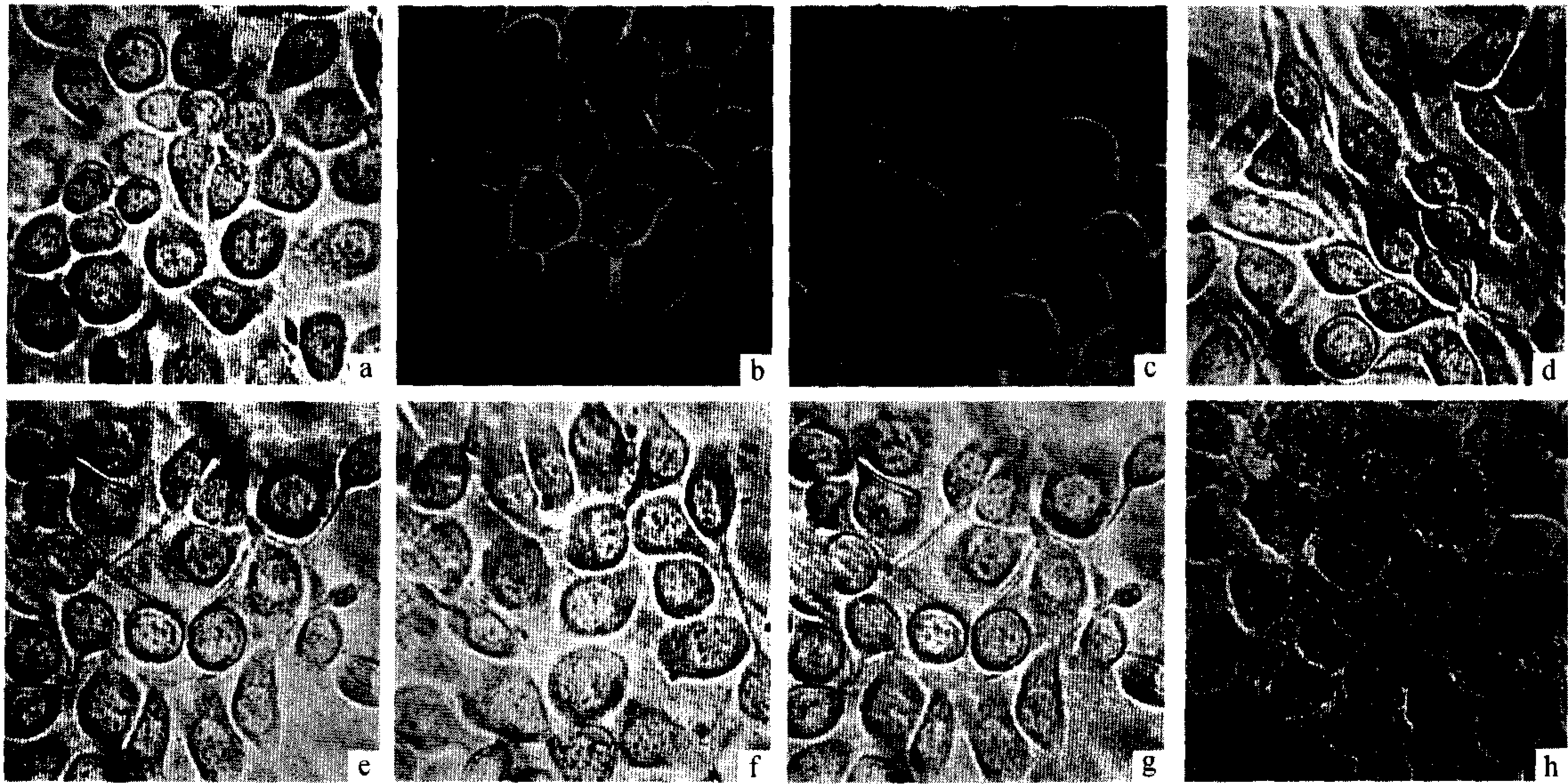
图 2 喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡的倒置显微形态特征变化

Fig. 2 Morphological changes in Sf9 cells apoptosis induced by camptothecin observed by inverted phase contrast microscope

2.3 苦参碱、毒死蜱、灭多威、氯氰菊酯、氟铃脲、20-E对 Sf9 细胞凋亡的诱导效果

植物源成分苦参碱、有机磷杀虫剂毒死蜱、氨基甲酸酯类杀虫剂灭多威、拟除虫菊酯类杀虫剂氯氰菊酯、昆虫生长发育剂氟铃脲分别以 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理以及蜕皮激素类似物 20-E 以

0.048、0.480、4.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后 24、48、72 h 在倒置显微镜下观察 Sf9 细胞形态变化. 结果表明, 上述化合物 3 种质量浓度在连续 72 h 内均无明显的典型凋亡形态和凋亡小体出现, 各处理均与 CK 形态差异不明显. 图 3 示 CK 和各化合物中间浓度处理后 48 h 以及高热致死的细胞倒置显微形态, 从图 3 中可发



a ~ g 分别为空白对照和 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苦参碱、毒死蜱、灭多威、氯氰菊酯、氟铃脲及 0.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 20-E 诱导处理 48 h 的 Sf9 细胞; h 为 55 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 致死的 Sf9 细胞

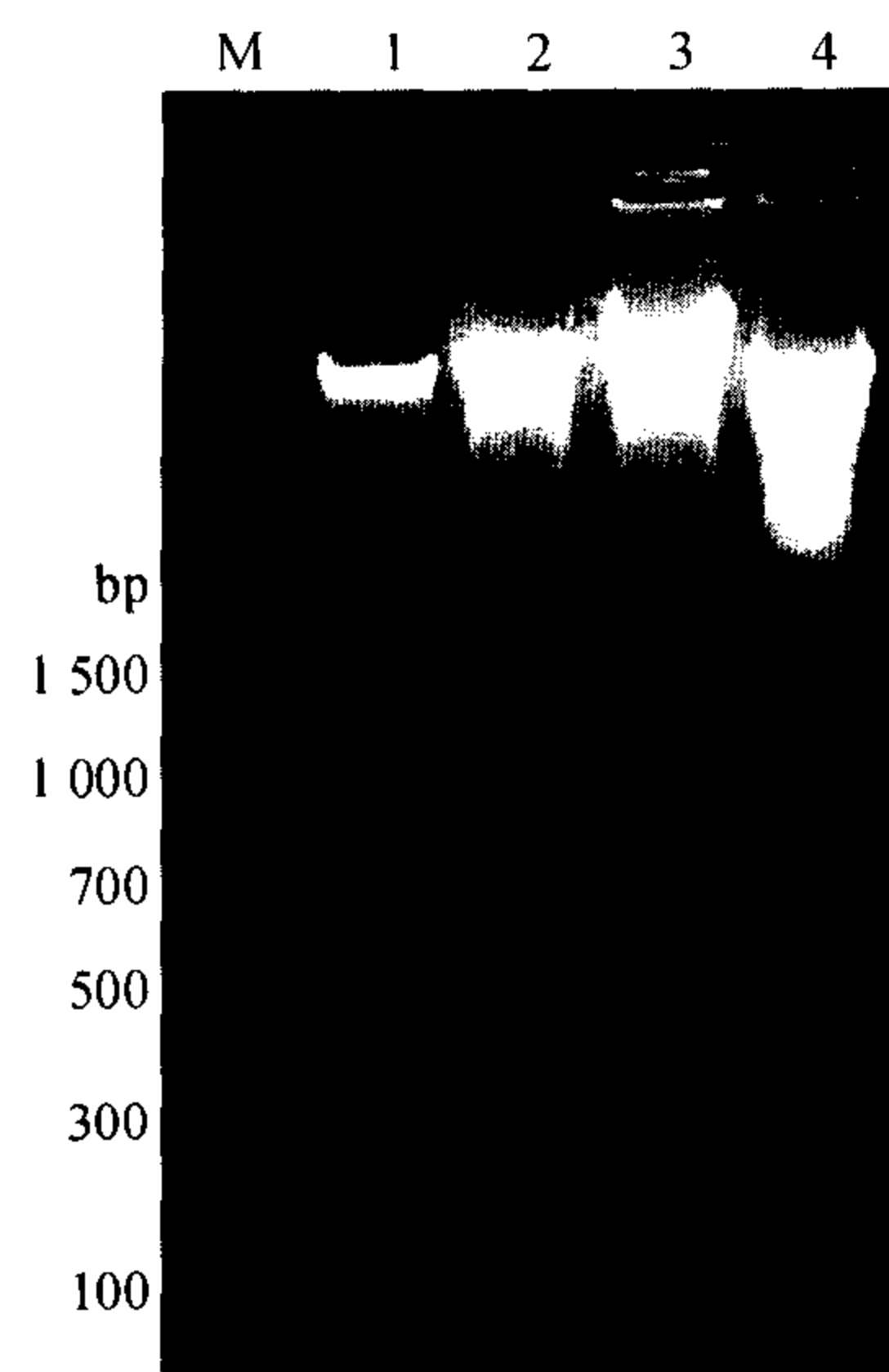
图 3 苦参碱、毒死蜱、灭多威、氯氰菊酯、氟铃脲及 20-E 处理对 Sf9 细胞倒置显微形态特征的影响

Fig. 3 Effects of treatment with matrine, chlorpyrifos, methomyl, cypermethrin, hexaflumuron and 20-E on morphological changes of Sf9 cells observed by inverted phase contrast microscope

现细胞核及细胞外部形态等形态特征与 CK 相比均无显著差异, 无凋亡小体等细胞凋亡典型形态特征, 各处理 Sf9 细胞正常贴壁且均对苔盼蓝拒染, 这表明苦参碱、毒死蜱、灭多威、氯氰菊酯、氟铃脲、20-E 等在供试浓度和时间条件下对 Sf9 细胞没有显著凋亡诱导作用. 55 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 的 Sf9 细胞基本全部出现细胞肿胀、细胞膜和核膜界限模糊的细胞坏死症状(图 3h).

2.4 DNA 电泳检测结果

DNA 琼脂糖凝胶电泳结果(图 4)表明, CK 细胞 DNA 保持完整, 55 $^{\circ}\text{C}$ 高热坏死处理 15 min 的 Sf9 细胞 DNA 呈现弥散条带, DNA 为随机无选择性断裂, 且核苷酸片段大于 1 500 bp. 印楝素 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导处理 39 h 和喜树碱 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导处理 15 h 后, Sf9 细胞 DNA 电泳呈现典型 DNA 片段化, DNA 断裂为间隔 180 ~ 200 bp 的规则条带, 与高热坏死 Sf9 细胞在生物化学特征上存在着明显区别. DNA 片段化分析再次证明印楝素和喜树碱在供试浓度和时间条件下对 Sf9 细胞系具有显著的细胞凋亡诱导作用, 而不是坏死作用.



M: 100bp Ladder marker; 1: CK; 2: 印楝素 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导处理 39 h; 3: 喜树碱 0.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导处理 15 h; 4: 55 $^{\circ}\text{C}$ 高热坏死处理 15 min

图 4 印楝素和喜树碱诱导处理后 Sf9 细胞 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of Sf9 cells genomic DNA after treatment with azadirachtin and camptothecin

3 讨论与结论

本文应用倒置显微形态观察凋亡小体,结合DNA琼脂糖凝胶电泳确证的研究模型,直观快速判断供试化合物是否具有明显的昆虫细胞凋亡诱导效果,明确了印楝素0.15~1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后72 h内、喜树碱0.35~3.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后36 h对Sf9具有明显的细胞凋亡诱导作用,而其余6种供试化合物,包括植物源成分苦参碱、昆虫生长发育调节成分氟铃脲、有机磷杀虫剂毒死蜱、氨基甲酸酯类杀虫剂灭多威、拟除虫菊酯杀虫剂氯氰菊酯以0.1~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及昆虫蜕皮激素20-E以0.048~4.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后72 h内对Sf9均无明显的细胞凋亡诱导作用。

近年来,国内外关于外源物质调节、干扰昆虫细胞凋亡和固有生理规律的研究报道渐多^[14-15],这些研究结果为寻找害虫控制新技术,研究开发害虫防治新药剂提供了参考。根据本文研究结果,结合国内外相关文献,我们认为,杀虫成分对昆虫细胞凋亡的诱导效应,主要取决于供试化合物、细胞种类、化合物剂量和处理时间4个方面。

首先,不同杀虫成分对昆虫细胞凋亡的诱导效应不同,只有特定的化合物才有凋亡诱导效应。在倒置显微形态观察中,只有印楝素和喜树碱诱导处理Sf9细胞后,产生凋亡小体等凋亡典型症状,与课题组此前的研究报告结果^[12-13]相一致,而其他类型的供试化合物均未表现出明显的凋亡诱导作用。由于正常离体培养细胞中也存在比例较低的细胞凋亡,所以进一步进行DNA电泳检测,结果产生典型的DNA ladder,说明化合物处理中观察到的大量凋亡小体是诱导处理的结果;坏死细胞呈现为“血抹布”状^[16],证实印楝素和喜树碱诱导Sf9产生细胞凋亡,而非细胞坏死。这也说明,如果希望筛选得到更多可特异性诱导昆虫细胞凋亡的化合物,为创制新型生物合理杀虫剂提供新靶标、新机制,需要我们建立更加完善的昆虫细胞凋亡筛选体系。

其次,同种化合物对不同细胞系的凋亡诱导效应可能不同。印楝素1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理Tn卵细胞系Hi-5 1 d后,可观察到凋亡小体^[17],文献[12-13,18]报道和本文研究结果证实印楝素也能对Sf9产生显著的细胞凋亡作用,说明印楝素可能对多种细胞系都具有细胞凋亡诱导作用。同样为植物源杀虫剂的苦参碱则不同,文献[19-20]报道可诱导横纹肌肉瘤

细胞、白血病细胞K562等细胞凋亡,但本文结果证实其对Sf9细胞没有明显的细胞凋亡诱导作用。国内外大量文献报道认为拟除虫菊酯类杀虫剂可能对大鼠神经细胞凋亡具有诱导作用^[21-22],但本文中氯氰菊酯处理后同样未观察到细胞凋亡作用。所以,不是所有植物源成分都能产生昆虫细胞凋亡诱导作用,能诱导哺乳动物和肿瘤细胞凋亡的化合物也可能不具有昆虫细胞凋亡诱导作用,这可能是由于昆虫细胞有区别于哺乳动物和肿瘤细胞,或者相同物质对不同动物细胞的作用机制不同所致。这些结果也从侧面说明筛选特异性昆虫细胞凋亡诱导剂作为害虫防治新途径的可能性,同时也说明必须做大量基础的筛选研究,才可能得到对昆虫高效对非靶标生物安全的凋亡诱导剂。

第三,相同化合物不同处理剂量可能产生不同的昆虫细胞凋亡效应,具有剂量的特殊性。印楝素0.15和1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理Sf9细胞均呈现细胞凋亡典型形态特征,但以15.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理Sf9细胞72 h贴壁细胞全部飘浮,细胞结构完整,可能由于高浓度印楝素引起培养液渗透压过高而致使细胞坏死。而喜树碱以0.035 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后,Sf9细胞36 h内无明显的凋亡形态特征,以0.35和3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理均呈现细胞凋亡典型形态特征,可能诱导Sf9细胞发生细胞凋亡。所以,某种化合物即使能够诱导产生昆虫细胞凋亡,也需要以合适的剂量处理,剂量过低可能不产生凋亡现象,剂量过高则可引致细胞坏死。掌握合适的剂量对于建立合适的研究体系尤其重要。

最后,不同化合物或不同剂量诱导昆虫细胞凋亡所需的时间不同,处理后一定时间才能观察到明显的细胞凋亡特征。本文中苦参碱、20-E、氟铃脲、毒死蜱、灭多威和氯氰菊酯处理72 h仍没有出现细胞凋亡典型形态特征,且与CK细胞形态特征差异不明显,印楝素和喜树碱虽然能诱导产生典型的细胞凋亡症状,但典型症状出现的时间差异也很大。印楝素0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理后72 h内凋亡小体数量增加不显著;质量浓度提高至1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,处理后24 h即可观察到凋亡小体显著增加,48 h达到高峰期;而到72 h时凋亡小体数量有所减少。喜树碱0.035 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理36 h内,无明显大量凋亡小体出现,将质量浓度提高至0.35、3.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,处理后12 h即可观察到大量凋亡小体,24和36 h凋亡小体数量逐渐减少,坏死细胞比例大幅提高。这些结果说明,在今后相关研究中要注

意掌握合适的处理时间,必要时应适当增加时间观察点,至于诱导细胞凋亡的时序性及其机制则需要根据不同化合物的特点进行深入研究.

参考文献:

- [1] WHITE K, GREYER M E, ABRAMS J M, et al. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila* [J]. *Science*, 1994, 264:677-683.
- [2] 彭黎明,王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:1-9,153-218.
- [3] COLGATE E C, MIRANDA C L, STEVENS J F, et al. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappa B activation in prostate epithelial cells [J]. *Cancer Letters*, 2007, 246 (1/2): 201-209.
- [4] LANDIS-PIWOWAR K R, MILACIC V, CHEN D, et al. The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers [J]. *Drug Resistance Updates*, 2006, 9(6):263-273.
- [5] ZHANG Han-zhong, KASIBHATLA S, WANG Y, et al. Discovery, characterization and SAR of gambogic acid as a potent apoptosis inducer by a HTS assay [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004, 12(2):309-317.
- [6] 戴璇颖,徐世清,陈息林,等. 环境激素阿特拉津对家蚕卵巢培养细胞(BmN)凋亡的影响[J]. *蚕业科学*, 2006, 32(4):495-499.
- [7] 方心葵,王朝霞,陆敏,等. 氰戊菊酯对 *Trichoplusia ni* 细胞活力的影响[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2006, 34(4):101-110.
- [8] RAHIOUI I, LAUGIER C, BALMAND S, et al. Toxicity, binding and internalization of the pea-A1b entomotoxin in Sf9 cells [J]. *Biochimie*, 2007, 89(12):1539-1543.
- [9] COHEN E, QUISTAD G B, CASIDA J E. Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide [J]. *Life Sciences*, 1996, 58(13):1075-1081.
- [10] SALEHZADEH A, JABBAR A, JENNENS L, et al. The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells [J]. *Pest Management Science*, 2002, 58:268-276.
- [11] SALEHZADEH A, AKHKHA A, CUSHLEY W, et al. The antimetabolic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells [J]. *Insect Biochem Mol Boil*, 2003, 33:681-689.
- [12] 钟国华,水克娟,黄劲飞,等. 植物源物质诱导的斜纹夜蛾细胞凋亡[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(4):449-453.
- [13] 钟国华,水克娟,吕朝军,等. 印楝素对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(6):618-627.
- [14] FRENCH-CONSTANT R H, DOWLING A, WATERFIELD N R. Insecticidal toxins from *Photobacterium* bacteria and their potential use in agriculture [J]. *Toxicon*, 2007, 49(4):436-451.
- [15] COOPER D M, PIO F, THI E P, et al. Characterization of *Aedes Dredd*: A novel initiator caspase from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* [J]. *Insect Biochem Mol Boil*, 2007, 37(6):559-569.
- [16] KANDUC D, MITTELMAN A, SERPICO R, et al. Cell death: apoptosis versus necrosis (review) [J]. *International Journal of Oncology*, 2002, 21:165-170.
- [17] 李文欧,徐汉虹,张志祥,等. 印楝素 A 对粉纹夜蛾 Hi-5 细胞的毒性机理 [J]. *昆虫学报*, 2008, 51(8):824-829.
- [18] ANURADHA A, ANNADURAI R S, SHASHIDHARA L S. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid azadirachtin A [J]. *Insect Biochem Mol Boil*, 2007, 37(6):627-634.
- [19] 马玲娣,张彦,文世宏,等. 苦参碱对小鼠 H22 细胞抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(2):178-182.
- [20] 赵军艳,姚树坤,殷飞. 苦参碱对肝癌细胞增殖凋亡及 stat3、stat5 基因的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(2):225-228.
- [21] 李涛,石年,吴又桐,等. Bcl-2 在溴氰菊酯诱导神经细胞凋亡机制中的作用 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2004, 16(5):279-285.
- [22] WU Ai-guo, LI Long, LIU Yu-gu. Deltamethrin induces apoptosis cell death in cultured cerebral neurons [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 187(1):50-57.

【责任编辑 李晓卉】