

印楝素 A 诱导 Sf9 细胞凋亡的显微和超微形态变化

程杏安, 黄劲飞, 胡美英, 胡黎明, 张颜博

(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:利用倒置显微镜和透射电子显微镜技术观察印楝素 A 诱导草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 蛹卵巢 Sf9 细胞凋亡的显微和超微形态变化. 结果表明: $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 印楝素 A 对 Sf9 细胞具有显著的凋亡诱导作用, 从凋亡小体和贴壁细胞数量变化判断, 印楝素 A 处理 12 h, 细胞开始出现少量凋亡小体, 12 ~ 24 h 凋亡小体逐渐增多, 但贴壁细胞未见明显减少, 因此 24 h 之前 (0 ~ 24 h) 属于凋亡早期阶段; 24 ~ 36 h 凋亡小体大量出现, 贴壁细胞逐渐减少, 属于凋亡中期; 处理 36 h 以上, 凋亡小体和贴壁细胞急剧减少, 细胞凋亡进入晚期. 观察诱导 24 h 的细胞超微结构发现, 胞内的主要细胞器在数量或形态上发生了显著变化, 包括溶酶体数量显著增加, 线粒体内部嵴变模糊, 内质网从囊泡状变成线管状, 细胞核出现分页、皱缩以及区域性膨大等.

关键词:细胞凋亡; 凋亡小体; 印楝素 A; 超微结构; Sf9 细胞系

中图分类号: Q962; Q248

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)04-0052-07

Morphological Changes of Microstructure and Ultra-Structure of Apoptotic Sf9 Cells Induced by Azadirachtin A

CHENG Xing-an, HUANG Jin-fei, HU Mei-ying, HU Li-ming, ZHANG Yan-bo

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

Abstract: The morphological changes of microstructure and ultra-structure of apoptotic Sf9 cells isolated from ovary of pupa of *Spodoptera frugiperda*, induced by azadirachtin A were studied by using the techniques of transmission electron microscope and inverted phase microscope. The results showed that the significant apoptosis was induced by azadirachtin A at a mass concentration of $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. By identifying the number of apoptotic bodies and adherent cells, the early apoptotic stage of Sf9 cells appeared within 24 h due to appearance and increasing of apoptotic bodies, but the number of adherent cells was not decreased obviously after treated by azadirachtin A for 12 - 24 h; While the apoptotic bodies increased and adherent cells decreased regularly after treated for 24 - 36 h, which indicated that this period was the apoptosis mid stage; and then the late stage of the apoptosis after treated for more than 36 h because of sharply decrease of adherent cells and apoptotic bodies. The main organelles changing significantly in morphology or number were found after observing the ultra-structure of Sf9 cells induced for 24 h, including markedly increase of lysosomes, endoplasmic reticulum changing from vesicles to line pipe-like, nuclear pagination, crimped nuclear, partly swollen of nuclear membrane.

Key words: apoptosis; apoptotic bodies; azadirachtin A; ultra-structure; Sf9 cell line

印楝素 (Azadirachtin) 是从楝科 Meliaceae 植物印楝 *Azadirachta indica* 的种子、叶片或树皮中分离得到的四环三萜化合物, 对 200 多种昆虫具有拒食、忌避、生长发育调节等活性, 被认为是最适合商品化开

发的植物源杀虫剂^[1]. 长期以来印楝素对昆虫的作用机理成为研究者关注的重点之一, 目前研究者已在个体或组织水平对印楝素影响昆虫生化机制和干扰昆虫生长发育等方面开展了大量的研究, 认为印

收稿日期: 2010-02-26

作者简介: 程杏安 (1981—), 男, 博士研究生; 通信作者: 胡美英 (1954—), 女, 教授, E-mail: humy@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30871660); 教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金 (2004061)

楝素主要通过作用于昆虫脑、咽侧体、心侧体和前胸腺等靶标器官,干扰昆虫整个内分泌系统激素的合成与释放,同时影响不同组织器官中总蛋白含量和不同酶类的活性变化,最终干扰昆虫正常的生长发育过程^[2-7].在细胞水平上,研究者们开展了印楝素对离体昆虫细胞作用机理的相关研究. Remhold 等^[8]最早进行了印楝素对 Sf9 细胞的作用研究,指出印楝素通过抑制细胞增殖和蛋白合成导致细胞死亡. Salenzadeh 等^[9]研究表明印楝素在 $10^{-11} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内抑制 Sf9 细胞增殖活性具有浓度依赖性.有研究者进一步研究认为印楝素浓度与抑制 Sf9 细胞有丝分裂活性呈现正相关,其通过抑制 Sf9 细胞微管的聚合,使细胞周期停滞于 G2/M 期,不能进行正常分裂,最终抑制细胞增殖^[9-10].华南农业大学昆虫毒理实验室近年研究发现印楝素能够诱导昆虫离体细胞 SL-1 和 Sf9 凋亡^[11-12],这为阐明印楝素作用机理提供了新角度和新思路.国内外其他研究单位也进行了外界因素诱导昆虫细胞凋亡的机理研究^[13-16],然而目前有关昆虫离体细胞凋亡机理的研究总体上还较少,而且以往的研究多集中在分子水平或简单的形态学观察,有关昆虫细胞凋亡的超微结构变化仍缺乏系统全面的探究,很大程度限制了细胞凋亡分子机理研究的深度和全面性.透射电镜观察被认为是检测判断凋亡发生的最可靠的方法之一^[17],能够直观、形象地展现细胞凋亡过程的细胞学变化,对全面深入研究细胞凋亡的机理提供重要的引导作用.因此本研究运用透射电镜技术,结合普通显微观察,对印楝素诱导 Sf9 细胞凋亡的超微结构变化进行全面的观察,为从分子层面深入研究 Sf9 细胞以及其他昆虫离体细胞凋亡的信号转导机理提供依据和思路.

1 材料与方 法

1.1 供试材料、细胞培养和处理

供试昆虫细胞为草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞系(中山大学生物防治重点实验室惠赠),在华南农业大学昆虫毒理实验室用含 $\varphi = 10\%$ 胎牛血清的昆虫培养基置于 Heal Force CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司)27 ℃ 恒温常规贴壁培养.细胞培养基主要成分包括 Grace's 昆虫干粉培养基(Gibco 公司)、热灭活胎牛血清(Gibco 公司)、酵母提取物、蛋白胨、水解乳蛋白(Sigma 公司),细胞传代培养.供试药剂为印楝素 A(纯度 95%,Sigma 公司).根据王文祥^[18]研究工作,确定以 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的印楝素 A 处理供试细胞,对照以 φ 为 1% 的二甲基亚砷(DMSO)处理.

1.2 MTT 检测法

选用处于最佳生长状态的 Sf9 细胞,常规处理,

调密度到 $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中 27 ℃ 培养,试验分 2 组:试验组为正常培养,调零组只加培养基不接种细胞.设 0、12、24、48、72 和 96 h 6 个时间点,每时间点设 4 个重复,48 h 换一次培养基.到了时间点,每孔加 10 μL MTT [$5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,磷酸缓冲液(PBS)配制],27 ℃ 继续孵育 4 h,然后弃掉培养液,每孔加 150 μL DMSO,振荡 15 min,使结晶物充分融解,选择 490 nm 波长,用酶联免疫检测仪(Bio-RAD 公司)测定各孔光密度,记录结果: $D_{490 \text{ nm}} = D_{490 \text{ nm}}^{\text{试验组}} - D_{490 \text{ nm}}^{\text{调零组}}$.用 Excel 软件统计数据,绘制生长曲线图.检测 φ 为 1% 的 DMSO 对细胞活力的影响,试验方法与生长曲线测定方法一致,但试验分为正常培养组和 φ 为 1% 的 DMSO 处理组,设 0、12、36、48 和 72 h 5 个时间点.

1.3 倒置显微镜形态特征观察

取状态良好的 Sf9 细胞以 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 密度铺板于 35 mm 的细胞培养皿,待细胞进入增值旺期(24 h),吸出全部条件培养液并加入新鲜培养液,调整印楝素 A 到供试浓度,混匀后,分别在 0、6、12、24、30、36、48 和 60 h 用倒置显微镜(Olympus 公司)定点观察,拍片记录细胞形态变化,以 φ 为 0.3% 的 DMSO 处理作对照.

1.4 透射电子显微镜超微结构观察

用冷冻离心机 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 分别收集供试浓度印楝素诱导 24 h 的 Sf9 凋亡细胞和以 φ 为 0.3% 的 DMSO 处理的对照细胞约 1×10^6 个,以 pH 7.2、0.1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(PBS,下同)清洗后,不打散细胞块,以 φ 为 3% 的戊二醛 + w 为 1.5% 的多聚甲醛固定液(上述 PBS 配制)常温固定 2 h, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,弃上清液,用上述 PBS 漂洗, w 为 1% 的锇酸(上述 PBS 配制)固定 1 h 后,再用上述 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,然后依次以 φ 为 30%、50%、70%、80%、90% 和 100% 的乙醇脱水,每级 10 min, φ 为 100% 乙醇脱水 2 次.环氧丙烷过度 2 次,每次 30 min.以 $V(\text{环氧丙烷}):V(812\text{Resin 环氧树脂}) = 1:1$ 的混合物渗透 4 h,再用纯 812Resin 环氧树脂渗透 24 h,最后用新的纯 812Resin 环氧树脂包埋,胶囊用超薄切片机进行超薄切片后,醋酸双氧铀-硝酸铅双重染色.于 TECNAIG²12 分析型透射电子显微镜下观察并拍照进行分析.

2 结果与分析

2.1 MTT 法测定 Sf9 细胞生长曲线以及 φ 为 1% DMSO 对细胞活力的影响

由图 1 可知,Sf9 细胞在接种后 12 h 内,经历游离、贴壁、潜伏等阶段,进行着状态的调整,生长缓

慢,且没有显著的迟缓期,12 h后细胞逐渐从潜伏期进入对数生长期,24 h完成第1次倍增,全面进入对数生长阶段.所以12和24 h可分别作为随后试验的状态调整终点和倍增时间起点.药试试验中,选择铺板培养24 h作为加药起点时间.图2结果表明,两曲线的总体差异不显著,所以 $\varphi_{终}$ 为1%的DMSO对Sf9细胞生长活力没有显著影响,这与以往华南农业大学昆虫毒理实验室用其他方法检测的结果基本一致.进一步证实DMSO在 $\varphi_{终}$ 低于1%的情况下对Sf9生长活力没有显著影响,可作为供试药物印楝素A的溶剂.

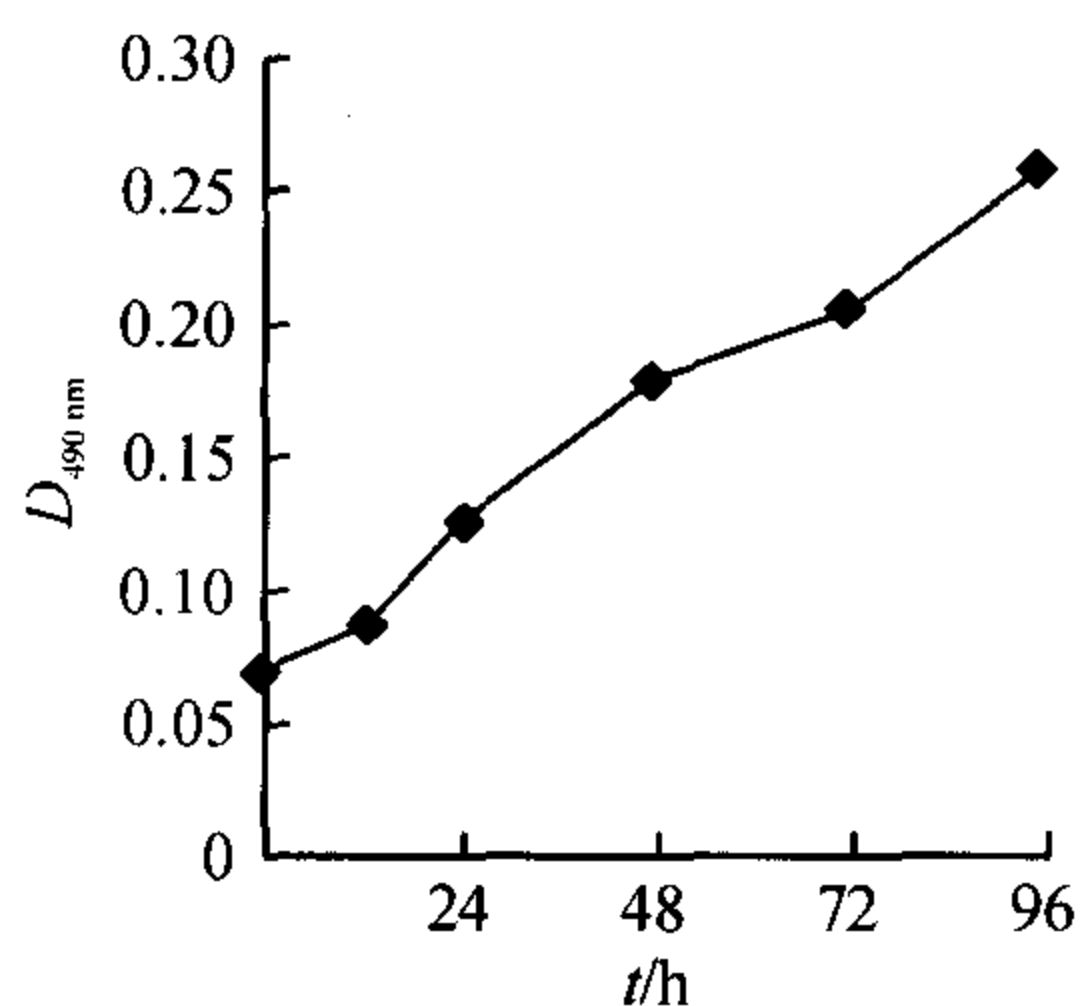


图1 MTT法测定Sf9细胞生长曲线

Fig. 1 Sf9 cell growth curve was quantiated by MTT assay

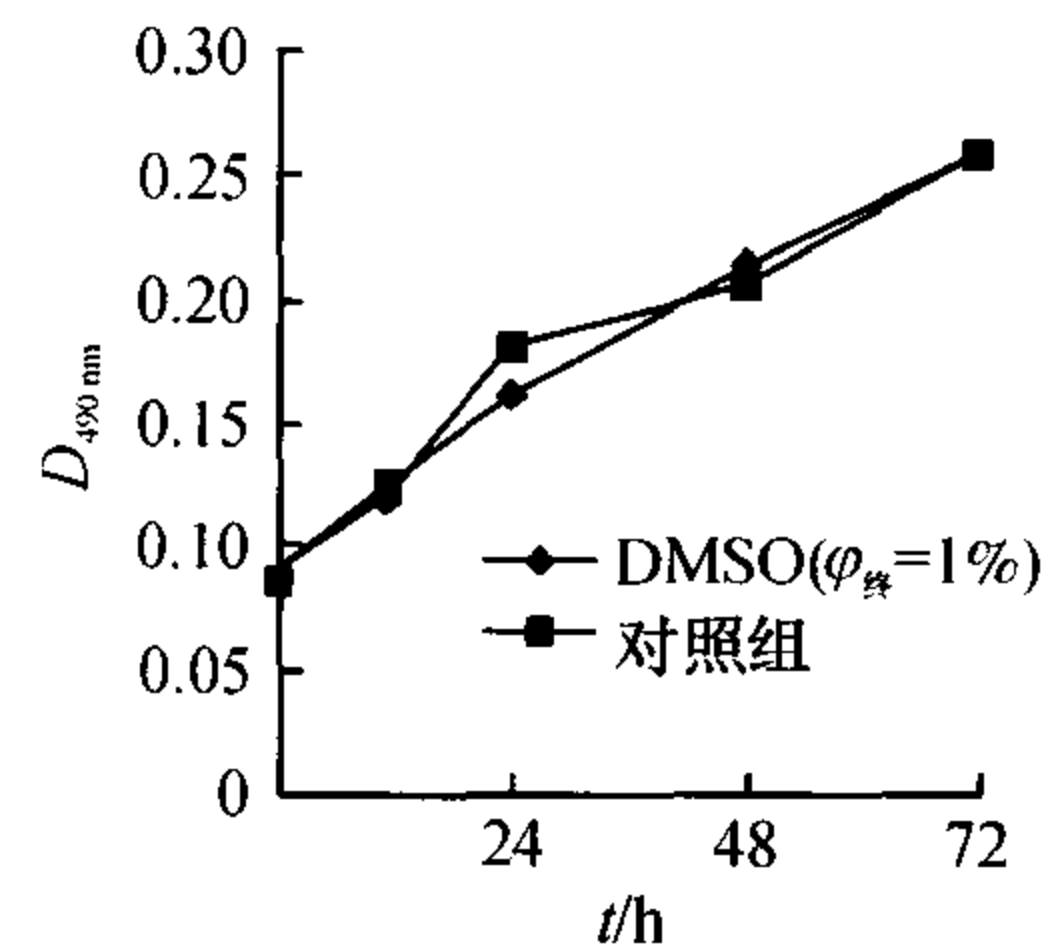
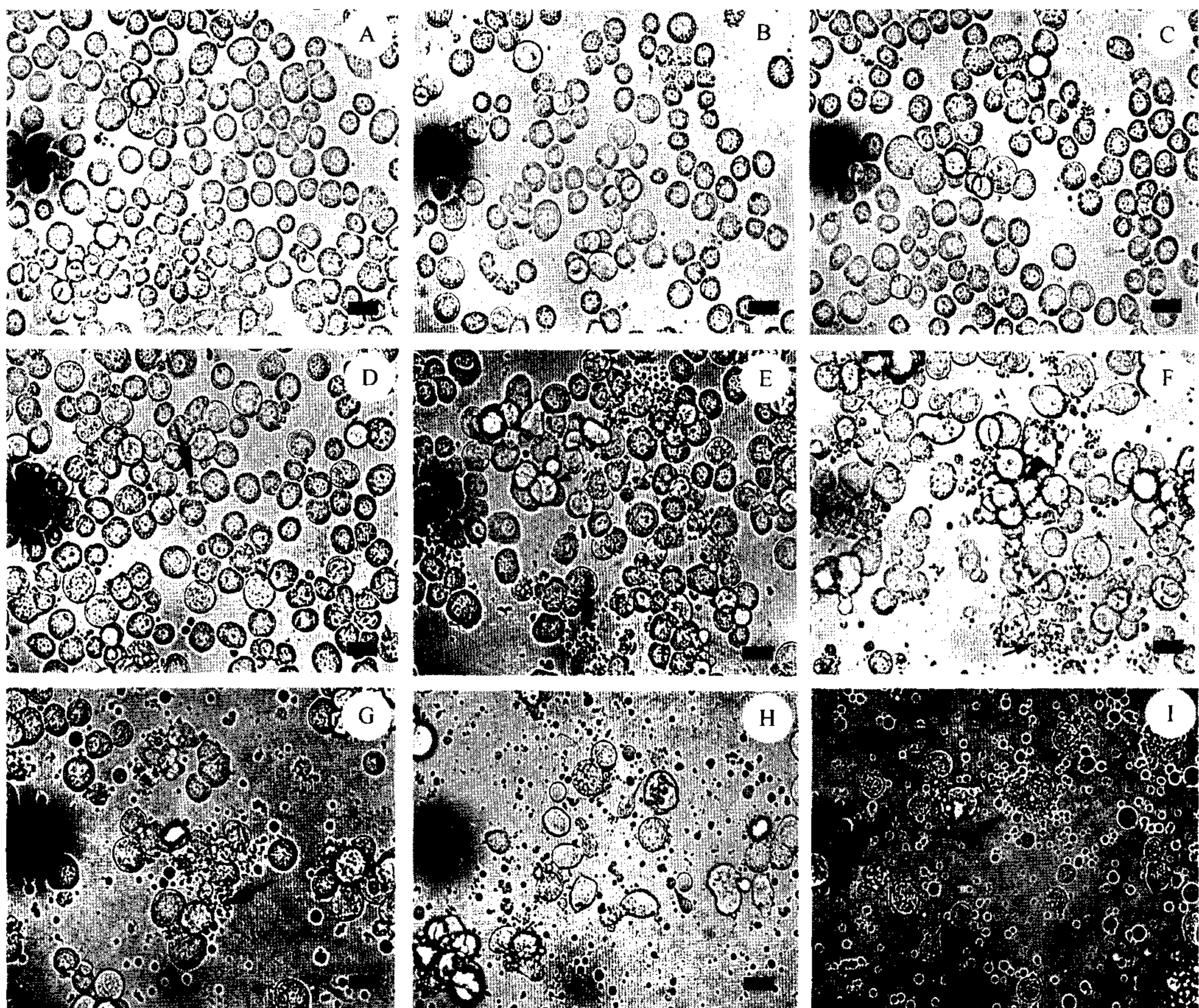


图2 MTT法测定DMSO处理对Sf9细胞生长活力的影响

Fig. 2 Effect of DMSO on the viability of Sf9 cells by MTT assay

2.2 印楝素A诱导Sf9细胞凋亡的显微特征观察

由图3可见,对照处理的Sf9细胞外部形态饱满,多以圆形为主,核区可见,细胞处于旺盛的增值状态(图3A).印楝素A处理0和6 h,Sf9细胞形态上与对照相比没有发生明显的变化,仍处于增值状态(图3B、3C),处理12 h,少数细胞周围出现颗粒状的凋亡小体,但贴壁细胞未见明显减少(图3D).处理24~30 h,细胞增值明显受到抑制,大量细胞周围出现聚集型的凋亡小体,部分细胞完全解体为颗粒状的凋亡小体,



A:对照,细胞饱满,核区可见;B和C:印楝素A分别处理0和6 h,细胞形态上与对照没有显著差异;D:印楝素A处理12 h,细胞周围开始出现少量凋亡小体(箭头所示);E和F:印楝素A分别处理24和30 h,凋亡小体大量出现(箭头所示);G和H:印楝素A分别处理36和48 h,凋亡小体和贴壁细胞急剧减少,部分细胞形成漂浮细胞团(箭头所示);I:印楝素A处理60 h,只有极少数贴壁细胞;标尺=20 μm .

图3 印楝素A诱导Sf9细胞凋亡的显微形态观察

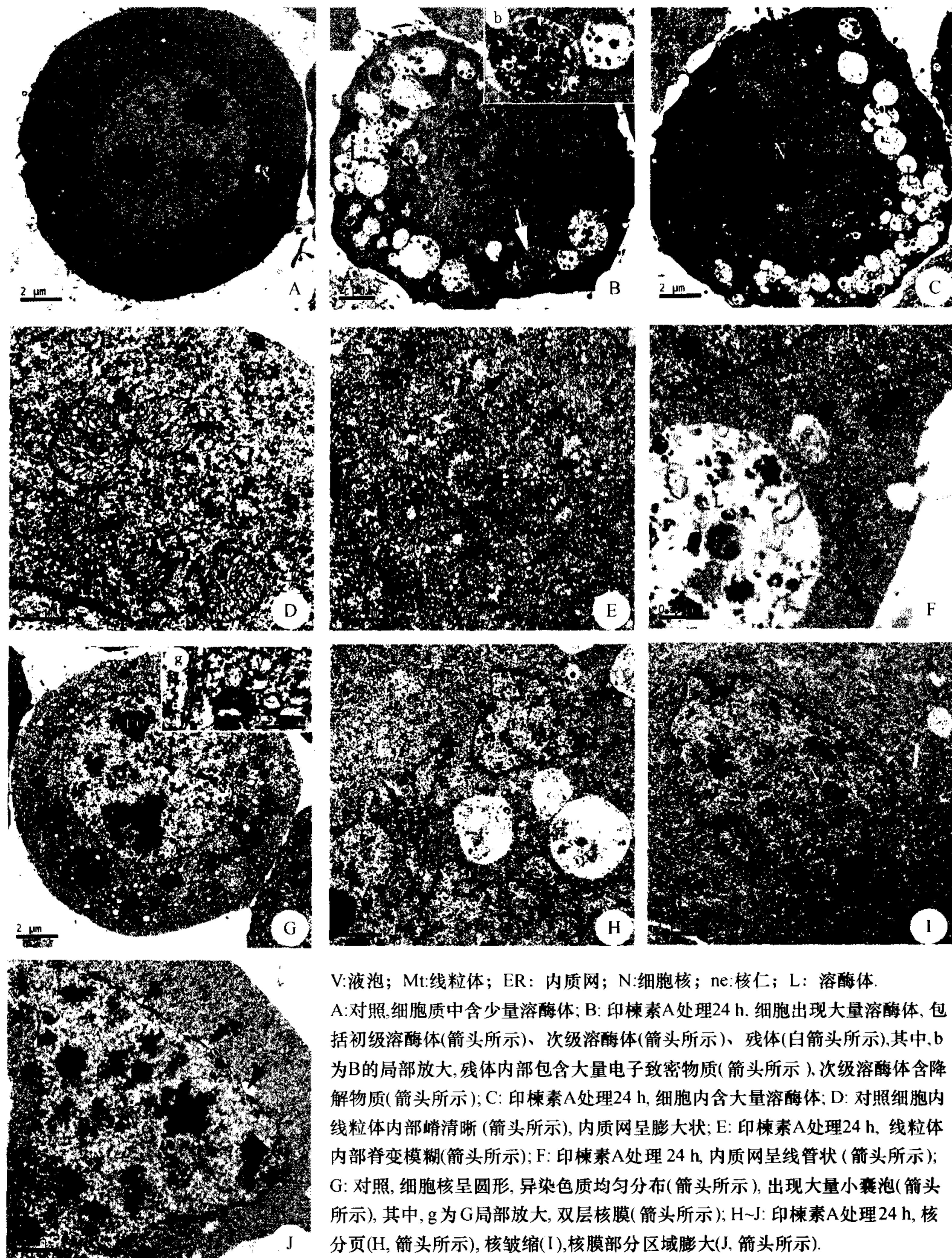
Fig. 3 Morphological observation of Sf9 cell in apoptosis induced by azadirachtin A

分散分布,培养液出现漂浮的死亡细胞或细胞团(图3E、3F),随处理时间的延长凋亡和漂浮死亡细胞逐渐增多,贴壁细胞逐渐减少.处理36~48 h,大量细胞随着凋亡程度加深,逐渐解体形成凋亡小体,分散分布于整个培养皿,导致贴壁细胞和细胞总数显著减少,同时部分凋亡小体被周围活细胞吞噬数量减少(图3G、3H).处理60 h,多数细胞已解体成凋亡小体并被活细胞吞噬,或形成漂浮的死亡细胞,只看到少数贴壁细胞(图3I).凋亡小体是凋亡细胞通过发芽、起泡等方式形成的一个球形突起,并在其根部狭窄而脱落形成一些大小不等、内含胞质、细胞器及核

碎片的小体,细胞大量形成凋亡小体,说明细胞已进入了凋亡的中期阶段,观察结果表明 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 印楝素 A 对 Sf9 细胞具有显著凋亡诱导作用,处理24~36 h 出现大量凋亡小体,贴壁细胞开始逐渐减少,漂浮死亡细胞逐渐增多,表现出凋亡的典型特征,属于凋亡中期,36~48 h 凋亡小体和贴壁细胞急剧减少,凋亡进入晚期.为了在超微结构观察中能观察到更丰富的异常现象,确定24 h 处理为超微结构观察的时间点.

2.3 印楝素 A 诱导 Sf9 细胞凋亡的超微结构观察

由图4可见,对照处理的细胞溶酶体数量少,多



V:液泡; Mt:线粒体; ER: 内质网; N:细胞核; ne:核仁; L: 溶酶体.

A:对照,细胞质中含少量溶酶体; B: 印楝素A处理24 h, 细胞出现大量溶酶体, 包括初级溶酶体(箭头所示)、次级溶酶体(箭头所示)、残体(白箭头所示),其中, b 为B的局部放大,残体内部包含大量电子致密物质(箭头所示),次级溶酶体含降解物质(箭头所示); C: 印楝素A处理24 h, 细胞内含大量溶酶体; D: 对照细胞内线粒体内部嵴清晰(箭头所示),内质网呈膨大状; E: 印楝素A处理24 h, 线粒体内部脊变模糊(箭头所示); F: 印楝素A处理24 h, 内质网呈线管状(箭头所示); G: 对照, 细胞核呈圆形, 异染色质均匀分布(箭头所示), 出现大量小囊泡(箭头所示), 其中, g 为G局部放大, 双层核膜(箭头所示); H-J: 印楝素A处理24 h, 核分页(H, 箭头所示), 核皱缩(I), 核膜部分区域膨大(J, 箭头所示).

图4 印楝素 A 诱导 Sf9 细胞凋亡的超微结构

Fig. 4 Ultra-structure of Sf9 cell in apoptosis induced by azadirachtin A

以残体出现,大小不一,以圆形或椭圆形为主,内含致密颗粒或网状、指纹状的膜性结构,基质电子密度高(图4A);印楝素A处理24 h,细胞出现大量溶酶体,形式多样,有初级溶酶体、次级溶酶体及残体等(图4B、4B-b、4C).对照处理细胞线粒体以紧密型为主,内部的嵴丰富,清晰,多为囊状和管状嵴,细胞处于活跃的代谢状态(图4D);经印楝素A 24 h处理后,细胞线粒体内部嵴明显变模糊(图4E).对照处理的细胞内质网丰富,以膨大的囊泡状为主,围绕在线粒体等细胞器周围(图4D);印楝素A处理24 h的细胞,内质网多呈线管状(图4F).对照处理的多数细胞核比较饱满,呈圆形,异染色质分布均匀,核膜的双层结构均匀,清晰,周围有大量内质网环绕,同时还有丰富的小囊泡,应为内质网、高尔基体等膜性细胞器形成的运输小泡(图4G、4G-g);印楝素A 24 h处理后,细胞核出现核分页现象,造成染色质丢失,有的细胞核皱缩,核膜部分区段出现膨胀(图4H、4I、4J).超微结构观察结果表明印楝素诱导 Sf9 细胞凋亡过程中胞内溶酶体、线粒体、内质网、细胞核等主要细胞器发生显著的数量或形态变化.

3 讨论

有关印楝素诱导昆虫离体细胞凋亡的形态学研究已有一些报道,钟国华等^[19]研究表明印楝素对斜纹夜蛾离体培养细胞系 SL-1 具有显著的细胞凋亡诱导作用,印楝素 $0.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理 SL-1 细胞 12 ~ 72 h,倒置显微镜观察可见大量细胞皱缩,体积变小,胞膜气泡化,与邻周细胞脱落,胞浆浓缩,胞膜突起,出现大量凋亡小体.根据凋亡小体变化判断,处理后 0 ~ 36 h 属细胞凋亡早期,36 ~ 60 h 出现大量凋亡小体属细胞凋亡中期,60 h 后正常形态细胞吞噬凋亡小体导致其数量减少,细胞凋亡进入晚期.本研究用 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 印楝素 A 处理 Sf9 细胞,同样表现出显著的细胞凋亡诱导作用,且形态变化与 SL-1 细胞凋亡有一定的相似性,都出现大量的凋亡小体,然而在诱导的时序性上,有不一致的地方. $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 印楝素 A 诱导 Sf9 细胞发生凋亡,0 ~ 24 h 凋亡小体开始出现并逐渐增加,贴壁细胞未见明显减少,属于凋亡早期.24 ~ 36 h 出现大量凋亡小体,贴壁细胞逐渐减少,表现出凋亡的典型特征,进入凋亡中期,36 h 后凋亡小体和贴壁细胞大量减少,进入凋亡晚期,凋亡时序性明显比 SL-1 细胞提前.

细胞凋亡是指细胞受到内外信号刺激时发生的

一种由细胞内部基因控制的主动性死亡行为,是细胞内在的机制.溶酶体含有降解各种生物大分子的酸性酶类,是细胞内部消化系统,降解细胞吞入的物质,供细胞代谢使用,同时溶酶体也是细胞内部的“清道夫”,能够清除吞入的有害异物,起防御作用,也能降解细胞内失去功能的生物大分子或细胞器,维持细胞内环境稳定.研究表明溶酶体在哺乳类细胞死亡过程中起着重要的作用,如溶酶体能够消化内吞的凋亡小体,然而越来越多的研究表明,在细胞凋亡过程中,溶酶体作用不仅限于消化内吞的凋亡小体,溶酶体膜通透化(LMP)释放蛋白水解酶入细胞质可引起一系列信号通路的改变,从而引发细胞凋亡或坏死,这种现象被称为“溶酶体途径的凋亡”^[20-22].溶酶体的破坏程度与细胞死亡模式之间存在量效关系,一定程度范围内释放溶酶体水解酶,可以触发细胞凋亡,全面的溶酶体破坏则导致细胞快速的坏死^[23-24].另外,研究表明溶酶体酶既能促进细胞的凋亡^[25-27],也能抑制细胞凋亡^[28],这与细胞类型、药物性质等因素有关.本研究对照细胞出现少量的溶酶体,是维持细胞内正常环境稳定所必需的.印楝素 A 诱导 Sf9 细胞 24 h 后,细胞内出现大量溶酶体,这主要由于细胞一方面受到药物诱导,内部出现代谢失衡,引起各类应激反应,细胞通过产生大量溶酶体来清除细胞内无用物质或异物,维持细胞内环境稳定,同时降低细胞内耗能负载,使物质再循环利用,以延缓细胞凋亡;另一方面当溶酶体持续作用到一定程度,释放胞内酸性蛋白酶,引起一系列无法逆转的凋亡信号通路,促进细胞死亡.本研究中 Sf9 细胞凋亡进入晚期后,凋亡小体显著减少,是活细胞通过胞内产生大量溶酶体消化吞噬的凋亡小体引起.

线粒体是包括昆虫在内的细胞能量加工厂,是 ATP 生成的主要细胞器,大量研究表明线粒体在凋亡发生过程中起着重要的调控作用^[29],在一些凋亡诱导物的刺激下,线粒体上的膜透过性转运孔开放,导致线粒体膜电位消失和促凋亡因子如细胞色素 C、AIF、procaspase-2, -3, -8, -9 等大量释放或激活,从而诱发细胞凋亡.本研究超微结构观察发现,印楝素诱导 24 h, Sf9 细胞线粒体内部结构变模糊,内膜凹陷形成的嵴无法辨认,说明诱导后线粒体膜已经受到破坏,这与前人在哺乳类细胞的研究结果相一致.线粒体也是胞内钙库之一,是调控胞内钙离子浓度的主要细胞器之一,线粒体膜受损伤,失去钙离子调控功能,导致胞内钙离子失衡,促进细胞凋亡.

内质网是一种重要的细胞器,对蛋白质翻译后的修饰、折叠和寡聚化而形成正确的构象有重要作用,还参与脂质代谢和类固醇激素的合成、钙的储存.细胞在某些因素作用下,内质网腔未折叠蛋白增多和钙平衡失调,可引起内质网应激反应活化,继而激活 caspase 蛋白家族,导致细胞凋亡,是死亡受体和线粒体信号通路以外的另一凋亡信号转导通路.本研究中 Sf9 细胞在印楝素诱导 24 h 后,胞内膨大,丰富的内质网转变成线管状,同时以内质网作为来源之一的运输小泡显著减少,推测印楝素诱导下,胞内内质网发生应激反应,内质网腔的钙离子出现排空,导致胞内钙离子失衡,成为引发细胞凋亡的原因之一.

Linton 等^[30]和 Akudugu 等^[31]研究认为核分裂很可能是印楝素对细胞的作用靶标.这就意味着三萜类化合物能够像秋水仙素、紫杉醇等植物提取物一样,通过干扰细胞分裂过程中纺锤体的形成而抑制细胞周期^[10].印楝素可能作为一种细胞周期抑制剂起作用,抑制微管蛋白聚合,最终导致细胞不能进行正常分裂增殖^[10],细胞周期长期停滞,会触发细胞凋亡.本研究印楝素处理 Sf9 细胞观察其超微结构变化,发现了细胞核分页、核皱缩、核膜区域性膨大等现象,是细胞正常分裂受到严重干扰的一种表现.

利用哺乳类动物细胞研究细胞凋亡已经发现了线粒体、内质网、溶酶体等细胞凋亡信号通路.推测昆虫细胞凋亡信号通路应该与哺乳类细胞的通路有很大的相似之处.本研究观察印楝素诱导 Sf9 细胞凋亡的超微结构变化发现线粒体、溶酶体、内质网和细胞核等主要细胞器发生了显著变化,说明这些细胞器的变化与 Sf9 细胞的各种凋亡信号通路的激活存在着直接或间接联系,因此本研究将为深入研究 Sf9 细胞凋亡以及其他昆虫离体细胞凋亡信号转导通路提供较好的指引.

致谢: 试验得到华南农业大学农学院刘向东教授、测试中心杨秉耀高级工程师、伦璇高级工程师、陆东雯老师和刘传荷老师的协助,中山大学生命科学学院秦湘静同学对论文进行了修改,在此一并致谢!

参考文献:

[1] RONG Xiao-dong, XU Han-hong, CHIU S F. Progressing on botanical insecticide-neem research [J]. Journal of Pesticide Science, 2000, 2: 9-14.
[2] HUANG Zhi-wei, SHI Ping, DAI Jian-qing, et al. Protein

metabolism in *spodoptera litura*(F.) is influenced by the botanical insecticide azadirachtin [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2004, 80: 85-93.

- [3] SHAFEEK A, JAYA P R P, REDDY G H, et al. Alterations in acetylcholinesterase and electrical activity in the nervous system of cockroach exposed to the neem derivative, azadirachtin [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004, 59: 205-208.
[4] NATHAN S S, KALAIVANI K, CHUNG P G. Effect of neem limonoids on lactate dehydrogenase (LDH) of the rice leaffolder, *cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (insecta: Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Chemosphere, 2006, 62: 1388-1393.
[5] MITCHELL M J, SMITH S L, JOHNSON S. Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1997, 35(1/2): 199-209.
[6] SAYAH F, IDAOMAR M, SORANZO L, et al. Endocrine and neuroendocrine effects of azadirachtin in adult females of the earwig *Labidura riparia* [J]. Tissue and Cell, 1998, 30(1): 86-94.
[7] MEDINA P, BUDIA F, DEL ESTAL P, et al. Influence of azadirachtin, a botanical insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) reproduction: Toxicity and ultrastructural approach [J]. Journal of Economic Entomology, 2004, 97(1): 43-50.
[8] REMHOLD H, ANNADURAI R S. Azadirachtin inhibits proliferation of sf-9 cells in monolayer culture [J]. Journal of Biosciences, 1993, 48(5/6): 495-499.
[9] SALENZADEH 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.
[10] SALENZADEH A, AKHKHA A, CUSHLEY W, et al. The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33: 681-689.
[11] 贾建文, 黄劲飞, 王文祥, 等. 不同杀虫成分对 Sf9 细胞凋亡的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(4): 29-35.
[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] 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.
[14] 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.
- [15] SAHDEV S, TANEJA T K, Mohan M, et al. Baculoviral p35 inhibits oxidant-induced activation of mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 307: 483-490.
- [16] LORETTA D, REED S D. The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells [J]. *Cell Biology*, 2002, 156: 1089-1098.
- [17] BAXA D M, LUO X, YOSHINMURA F K. Genistein induces apoptosis in T lymphoma cells via mitochondrial damage [J]. *Nutrition and Cancer*, 2005, 51(1): 93-101.
- [18] 王文祥. 印楝素、喜树碱诱导 Sf9 细胞凋亡研究 [D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2006.
- [19] 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.
- [20] CIRMAN T, ORRSIC K, MAZOVEC G D, et al. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(5): 3578-3587.
- [21] BOYA P, ANDREAU K, PONCET D, et al. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2003, 197(10): 1323-1334.
- [22] GUICCIARDI M E, BRONK S F, WEMEBURG N W, et al. cFLIPL prevents TRAIL-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the lysosomal pathway of apoptosis [J]. *American Journal of Physiology*, 2007, 292(5): 337-346.
- [23] BRUNK U T, DALEN H, ROBERG K, et al. Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 23: 616-626.
- [24] KAGEDAL K, ZHAO M, SVENSSON I, et al. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases [J]. *Biochemical Journal*, 2001, 359: 335-343.
- [25] SUTTON V R, WATERGOUSE N J, BROWNE K A, et al. Residual active granzyme B in cathepsin C-null lymphocytes is sufficient for perforin-dependent target cell apoptosis [J]. *Journal of Cell Biology*, 2007, 176(4): 425-433.
- [26] BOLAND B, CAMPBELL V. Abeta-mediated activation of the apoptotic cascade in cultured cortical neurones: A role for cathepsin-L [J]. *Neurobiology of Aging*, 2004, 25(1): 83-91.
- [27] YIN L, STEARNS R, GONZALEZ-FLECHA B. Lysosomal and mitochondrial pathways in H₂O₂-induced apoptosis of alveolar type II cells [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, 94(3): 433-445.
- [28] ZHU De-min, UCKUN F M. Cathepsin inhibition induces apoptotic death in human leukemia and lymphoma cells [J]. *Leukemia and Lymphoma*, 2000, 39(324): 343-354.
- [29] MASON K D, CARPINELLI M R, FLETECHER J I, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span [J]. *Cell*, 2007, 128(6): 1173-1186.
- [30] LINTON Y M, NISBET A J, MORDUE A J. The effects of azadirachtin on the testes of the desert locust, *Sch. gregaria* (Forsk.) [J]. *Journal of Insect Physiology*, 1997, 43, 1077-1084.
- [31] AKUDUGU J, GADE G, BOHM L. Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines [J]. *Life Science*, 2001, 68: 1153-1160.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 51 页)

- [5] 杨文. 葡萄糖介导的导向杀虫剂的分子构建 [D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2009.
- [6] RAMESH R, RAMAPANICKER Y, MEGHA R, et al. Base catalyzed cyclization of N-aryl and N-alkyl-O-propargyl carbamates to 4-alkylidene-2-oxazolidinones [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(37): 9153-9162.
- [7] ROMERO M, CAIGNARD D H, RENARD P, et al. Synthesis of tetracyclic dioxygenated isoquinolines and their cytotoxic activity [J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(49): 11020-11027.
- [8] RAMESH R, BHAT R G, CHANDRASEKARAN S. Highly selective deblocking of propargyl carbonates in the presence of propargyl carbamates with tetrathiomolybdate [J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2005, 70(3): 837-840.
- [9] RAMESH R, CHANDRASEKARAN S. But-2-ynylbisoxycarbonyl chloride: A novel C₂-symmetric reagent for the protection of amines and amino acids [J]. *Organic Letters*, 2005, 7(22): 4947-4950.

【责任编辑 李晓卉】