

植物精油对鱼藤酮和辣椒碱在斜纹夜蛾 离体培养细胞系 SL-1 中活性的影响

温好菊¹, 宋香宁¹, 张志祥¹, 程东美², 张清鹏¹

(1 天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642;

2 仲恺农业工程学院 植物保护系, 广东 广州 510225)

摘要:应用流式细胞术研究了 24 种常用植物精油对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 离体培养细胞系 (SL-1) 细胞膜通透性的影响, 采用 MTT 法研究精油对 2 种植物源农药鱼藤酮和辣椒碱的细胞活性的影响. 试验结果表明: 与对照相比, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芸香油处理 SL-1 细胞 24 h 后, 细胞内荧光染料碘化丙啶 (PI) 的荧光强度增加了 53.04%, 其次是松节油和当归油, 细胞内 PI 荧光强度分别增加了 34.23% 和 33.67%; 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 广藿香油、松节油、芸香油、当归油、香茅油、生姜油处理 SL-1 细胞后, 细胞内 PI 荧光强度增加率超过 40%. 鱼藤酮和辣椒碱对 SL-1 细胞的抑制中浓度 (IC_{50}) 分别为 34.97 和 35.92 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而与 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芸香油联用时 IC_{50} 分别为 12.69 和 13.26 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 松节油联用的 IC_{50} 分别为 14.56 和 11.392 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 均小于鱼藤酮和辣椒碱单剂量, 芸香油、松节油能够显著提高鱼藤酮和辣椒碱对 SL-1 细胞的细胞活性.

关键词:植物精油; 斜纹夜蛾离体培养细胞系; 细胞膜通透性; 鱼藤酮; 辣椒碱; 离体细胞活性

中图分类号: Q965.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)04-0453-07

Effects of Essential Oil on the Cytotoxicity of Rotenone and Capsaicin Against *Spodoptera litura* Cultured Cell Line SL-1 *in Vitro*

WEN Hao-ju¹, SONG Xiang-ning¹, ZHANG Zhi-xiang¹, CHENG Dong-mei², ZHANG Qing-peng¹

(1 Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, College of

Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Plant Protection Department, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Flow cytometry (FCM) was used to analysis the destruction of essential oils on membrane integrity of *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1. The cytotoxicity of rotenone and capsaicin alone or in combination with essential oils against SL-1 cells were studied by MTT method. Flow cytometric analysis showed that the intra-cellular fluorescence intensity of accumulation in the membrane impermeable nucleic acid stain propidium iodide (PI) was promoted by 53.04% after 24 h treatment with 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of rue oil, followed by 34.23% and 33.67% after treatment with angelica oil and turpentine oil, respectively. After being treated with 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of patchouli oil, turpentine oil, rue oil, angelica oil, citronella oil, and ginger oil, the increase rates of the accumulation of PI were all higher than 40%. The values of median inhibitory concentration (IC_{50}) for rotenone and capsaicin against SL-1 cells for 24 h were 34.97 and 35.92 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. When combined with 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of rue oil, the values of IC_{50} were decreased to 12.69 and 13.26 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the other values were 14.56 and 11.392 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ when combined with 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of turpentine oil, which were all lower than those

收稿日期: 2012-01-04

作者简介: 温好菊 (1987—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 张志祥 (1974—), 男, 副教授, 博士, E-mail: zdsys@scau.edu.cn

基金项目: 农业部植保财政项目

treated with rotenone and capsaicin only. All these results indicated that rue oil and turpentine oil could obviously enhance the cytotoxicity with rotenone and capsaicin.

Key words: essential oil; *Spodoptera litura* cell line; membrane permeability; rotenone; capsaicin; cytotoxicity

植物精油是一类植物源次生代谢物质,通过蒸馏、浸提、压榨等方法从含精油的植物中分离提取得来的油状液体物质^[1],组成成分多为醇类、醛类、萜烯类化合物,其挥发性高,渗透性强,对水溶性和脂溶性药物均有强促渗活性.因此,在医药上被用作药物的透皮吸收促进剂,如:肉桂油、丁香油、桉叶油、薄荷油、苍术油、广藿香油等^[2-4].王庆伟等^[5]以预处理的体外兔皮肤作为渗透屏障,Franz扩散池进行体外渗透试验,研究结果表明 φ 为1%的当归油能够促进脂溶性药物尼莫地平透皮吸收,与对照相比,尼莫地平吸收速率提高3.25倍.此外, φ 为2%的丁香油对5-氟尿嘧啶促透效果优于高效的化学促透剂氮酮^[6].

渗透剂是具有促进有效组分渗透到靶体内部或增强药剂透过处理表面进入生物体内部能力的助剂,本身不具毒性,能与多种杀虫剂配合使用,提高农药在害虫表面的渗透能力,充分发挥杀虫剂的生物活性,降低农药用量,对作物和天敌安全.植物精油在农业病虫害的综合治理方面得到较为广泛应用,据统计全球已商品化精油类农药年产量在45 000 t左右,销售额700万美元^[7],植物精油本身对多种农业害虫和储粮害虫具有触杀、拒食、驱避、产卵、趋避作用和生长抑制活性^[8].除了精油本身具有良好的生物活性外,已有研究证明精油对杀虫剂具有明显的增效作用,土荆芥精油能够增加小菜蛾和家蝇对氟虫腈的敏感性^[9];侧柏精油和松针精油增加氟虫腈透皮吸收量,从而提高药效^[10];肉豆蔻醚是氨基甲酸酯类农药的有效增效剂,细辛醚能够增加烟碱的杀虫活性^[11];黄樟油的主要成分黄樟油素的衍生物,是除虫菊素类杀虫剂的增效剂,可以提高杀虫剂药效10~15倍.渗透剂作为一种农药增效剂,在提高农药的药效、降低农药施用量、减少其对生态环境的污染和对人体的毒害方面有着十分显著的作用,但是有关植物精油作为天然促透剂应用于农药领域的报道较少.

利用离体昆虫细胞代替活体进行毒力测定是一种直接反映化合物毒性作用的检测方法,本研究以斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 离体培养细胞系(SL-1 细

胞)为供试细胞,应用流式细胞术研究了24种植物精油对SL-1细胞细胞膜电位和细胞膜通透性的影响,从中筛选出5种对SL-1细胞细胞膜通透性影响显著的植物精油,研究其对鱼藤酮和辣椒碱细胞活性的影响,为植物精油在增加杀虫剂渗透性、提高药效方面的应用提供参考.

1 材料与方法

1.1 试验材料

SL-1细胞系:斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞系,引自华中师范大学,华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室传代培养.培养基为添加质量比为8%新生胎牛血清的Grace's昆虫细胞培养基,27℃恒温培养.

1.2 供试药剂及仪器

97%辣椒碱(Capsaicin),河南倍特生物科技有限公司;96.8%鱼藤酮(Rotenone),广州市益农生化有限公司;植物精油,江西省吉水康神天然药用油提炼厂,种类及来源见表1;供试药品用二甲基亚砜(DMSO)溶解,配成母液,处理细胞前用培养基稀释,保持DMSO最终体积分数为0.5%;5 mg·mL⁻¹3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,美国Sigma-Aldrich公司)溶液:称取50.0 mg MTT,加10 mL磷酸缓冲液(PBS),待完全溶解后,0.22 μm滤膜过滤,置4℃冰箱中待用;Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol [DiBAC₄(3),美国Invitroge公司]工作液:准确称取DiBAC₄(3)1 mg,加入无水乙醇1 mL,配成1 mg·mL⁻¹母液,-20℃条件冻存,使用前取0.25 mL母液加入PBS至50 mL,使其质量浓度为5 μg·mL⁻¹;碘化丙啉(PI)试剂盒,美国Becton Dickinson公司;H80-2型低速离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;FACSCalibur流式细胞仪,美国Becton Dickinson公司;Plus酶标仪,美国Bio-RAD公司生产.

1.3 DiBAC₄(3)染色检测SL-1细胞膜电位的变化
参考文献[12]方法,取对数生长期SL-1细胞以1.0×10⁵/mL密度接种于培养皿(直径60 mm)内,培养24 h后弃去培养基,分别加入100 μg·mL⁻¹植

物精油处理 SL-1 细胞,以 φ 为 0.5% DMSO 培养基为对照. 药物处理 24 h 后收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤、离心 2 次,调整细胞密度为 1.0×10^6 /mL, DiBAC₄(3) 染色,27 °C 避光孵育 30 min,流式细胞仪 FL1 通道检测荧光强度,每处理设 3 次重复,以 φ 为 70% 的乙醇处理 1 h 作为阳性对照.

表 1 供试植物精油名录

Tab. 1 List of essential oils: common name

通用名	英文通用名	科名	属名	植物拉丁学名
广藿香油	Patchouli oil	唇形科	刺蕊草属	<i>Pogostemon cablin</i>
柠檬油	Lemon oil	芸香科	柑橘属	<i>Citrus limon</i>
月见草油	Evening primrose oil	柳叶菜科	月见草属	<i>Oenothera biennis</i>
松节油	Turpentine oil	松科	松属	<i>Pinus massoniana</i>
青蒿油	Artemisia oil	菊科	蒿属	<i>Artemisia annua</i>
桉叶油	Eucalyptus oil	桃金娘科	桉属	<i>Eucalyptus globulus</i>
菖蒲油	Calamus oil	天南星科	菖蒲属	<i>Acorus calamus</i>
杏仁油	Almond oil	蔷薇科	杏属	<i>Armeniaca vulgaris</i>
艾叶油	Mugwort oil	菊科	蒿属	<i>Artemisia argyi</i>
芸香油	Rue oil	芸香科	芸香属	<i>Ruta graveolens</i>
樟脑油	Camphor oil	樟科	樟属	<i>Cinnamomum camphora</i>
薰衣草油	Lavender oil	唇形科	薰衣草属	<i>Lavandula latifolia</i>
山苍子油	Litsea cubeba oil	樟科	木姜子属	<i>Litsea cubeba</i>
当归油	Angelica oil	伞形科	当归属	<i>Angelica sinensis</i>
留兰香油	Spearmint oil	唇形科	薄荷属	<i>Mentha spicata</i>
连翘油	Forsythia oil	木犀科	连翘属	<i>Forsythia suspensa</i>
茶树油	Tea-tree oil	桃金娘科	白千层属	<i>Melaleuca ahemifolia</i>
薄荷油	Pennyroyal oil	唇形科	薄荷属	<i>Mentha haplocalyx</i>
八角茴香油	Aniseed oil	八角科	八角属	<i>Illicium verum</i>
香茅油	Citronella oil	禾本科	香茅属	<i>Cymbopogon nardus</i>
生姜油	Ginger oil	姜科	姜属	<i>Zingiber officinale</i>
荆芥油	Chenopodium oil	藜科	藜属	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
冬青油	Wintergreen oil	冬青科	冬青属	<i>Ilex chinensis</i>
丁香油	Clove oil	木犀科	丁香属	<i>Syringa oblata</i>

1.4 PI 单染检测 SL-1 细胞细胞膜通透性变化

参考文献[13]方法,取对数生长期 SL-1 细胞以 1.0×10^5 mL⁻¹ 密度接种于培养皿(直径 60 mm)内,培养 24 h 后弃去培养基,分别加入 50 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 植物精油处理 SL-1 细胞,以 φ 为 0.5% DMSO 培养基为对照. 孵育 24 h 后收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗涤细胞 2 次,调整细胞密度为 1.0×10^6 mL⁻¹, PI 染色,27 °C 避光孵育 15 min,流式细胞仪 FL2 通道检测细胞内 PI 荧

光强度,每处理设 3 次重复,以 φ 为 70% 乙醇处理 1 h 作为阳性对照.

1.5 细胞毒力测定

采用 MTT 法测定植物精油对鱼藤酮和辣椒碱的细胞毒性的影响^[14-16]. 于 96 孔板加入 100 μL 对数生长期的 SL-1 细胞细胞悬浮液(细胞密度约为 1.0×10^5 mL⁻¹),待细胞贴壁后进行药剂处理. 鱼藤酮和辣椒碱母液用无血清 Grace's 昆虫细胞培养基稀释成 5 个浓度梯度,将药液分别与预先配制好的广藿香油、松节油、芸香油、当归油、香茅油溶液等比混合,使精油在各浓度药液中的质量浓度分别为 50 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,以相同用量的植物精油 DMSO 溶液为对照. 每处理 5 次重复,待药剂处理 20 h 后,每孔加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 10 μL ,继续培养 4 h. 弃去上清液,再向每孔加入 100 μL DMSO,室温孵育 30 min,用酶标仪检测 570 nm 处的光密度. 根据光密度计算细胞的毒力,以单独的精油处理为对照,计算药剂 + 精油处理的校正死亡率和抑制中浓度(IC₅₀).

1.6 数据处理

毒力回归、方差分析均采用 SAS 数据软件分析,用邓肯氏新复极差法(Duncan's multiple range test, DMRT)进行差异显著性分析.

2 结果与分析

2.1 24 种植物精油处理对 SL-1 细胞膜电位的影响

DiBAC₄(3) 是一种膜电位敏感的亲脂性阴离子荧光染料,根据其在细胞内外的重新分布可以判断细胞膜电位的变化. 当 DiBAC₄(3) 进入细胞内减少时,荧光强度降低,表明细胞膜电位负值增加,细胞膜出现超极化,反之细胞膜去极化. 从表 2 中可以看出, φ 为 70% 乙醇处理后,细胞膜通透性增加,细胞膜电位瓦解,DiBAC₄(3) 的平均荧光强度(MIF) 值增加,与对照相比 MIF 值增加 23.80%,杏仁油、薰衣草油同样引起细胞膜电位去极化,MIF 值分别增加 21.97% 和 13.60%. 其余处理均导致细胞内 DiBAC₄(3) 的荧光强度降低,表明精油处理后引起细胞膜电位超极化,广藿香油、月见草油、松节油、芸香油、山苍子油、当归油、香茅油和生姜油 8 种植物精油处理后 MIF 值显著下降,与对照相比 MIF 值下降了 20% 以上,其中广藿香油、月见草油、松节油、芸香油、山苍子油处理后,MIF 下降率分别为:64.96%、41.44%、56.79%、41.99%、41.22%,显著高于其他处理. 柠檬油、留兰香油、樟脑油和茶树油处理后,细胞膜电位变化不显著.

表2 植物精油对SL-1细胞膜电位的影响¹⁾

Tab.2 Effects of commercial essential oils on membrane potential of SL-1 cells

供试精油	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$		供试精油	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	MIF	MIF 下降率/%		MIF	MIF 下降率/%
广藿香油	34.25 \pm 2.03i	64.96	当归油	66.16 \pm 4.69f	32.32
柠檬油	92.55 \pm 2.27bc	5.32	留兰香油	90.09 \pm 0.23bcd	7.84
月见草油	57.24 \pm 0.98g	41.44	连翘油	81.05 \pm 1.76de	17.08
松节油	42.24 \pm 2.93h	56.79	茶树油	92.19 \pm 0.35bc	5.69
青蒿油	85.46 \pm 2.32cd	12.57	薄荷油	84.72 \pm 0.26cde	13.33
桉叶油	83.75 \pm 3.39cde	14.32	八角茴香油	83.11 \pm 1.57cd	14.97
菖蒲油	81.63 \pm 1.44de	16.49	香茅油	70.56 \pm 0.29f	27.81
杏仁油	119.23 \pm 7.34a	-21.97	生姜油	75.60 \pm 1.52ef	22.66
艾叶油	84.53 \pm 1.41cde	13.52	荆芥油	86.77 \pm 0.57cd	11.23
芸香油	56.70 \pm 5.15g	41.99	冬青油	87.32 \pm 0.44bcd	10.67
樟脑油	89.37 \pm 2.58bcd	8.57	丁香油	86.00 \pm 0.56cd	12.02
薰衣草油	111.04 \pm 6.00b	-13.60	70%乙醇	125.04 \pm 1.40a	-23.80
山苍子油	57.46 \pm 3.82g	41.22	对照	97.75 \pm 1.12b	

1)表中同列数据(平均值士标准误)后凡具有一个相同小写字母者,表示在5%水平差异不显著(DMRT法)。

2.2 植物精油处理对SL-1细胞膜通透性的影响

PI为大分子荧光染料,不能透过正常细胞的细胞膜,但是当细胞膜受损或细胞死亡时,PI可以自由通过细胞膜与细胞内核膜结合,荧光强度显著增强,细胞内平均荧光强度(MIF)的大小可以反映细胞膜通透性的变化.研究了50和100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 植物精油处理SL-1细胞后,细胞膜对荧光染料PI通透性变化,结果见表3. φ 为70%乙醇处理后,细胞膜完整性完全破坏,PI可以自由进入细胞内与DNA、RNA结合,与空白对照相比,MIF值增加91.76%,50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 精油处理SL-1细胞24h后,与对照相比精油处理细胞内PI的MIF值明显增加.芸香油处理SL-1细胞后,对细胞膜结构完整性影响最显著,细胞内MIF值增强了53.04%,但低于阳性对照,其次是松节油和当归油,分别为:34.23%和33.67%.100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 精油处理后,细胞膜对PI的通透性均增加,细胞内PI的MIF值增加超过40%的处理有:广藿香油、松节油、芸香油、当归油、香茅油和生姜油.其中100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 芸香油、广藿香油和松节油处理后,SL-1细胞膜通透性变化最显著,细胞膜对PI的通透率分别增强了83.38%、58.41%和58.25%,芸香油处理后细胞内MIF值与 φ 为70%乙醇处理差异不显著.

2.3 植物精油对鱼藤酮、辣椒碱的细胞活性的影响

综合比较24种植物精油对细胞膜电位和细胞膜完整性的影响,其中广藿香油、芸香油、香茅油、当

归油、松节油5种植物精油能够显著增加细胞膜的通透性.以鱼藤酮和辣椒碱为模式药物,采用MTT法研究植物精油对鱼藤酮、辣椒碱的细胞活性的影响.

2.3.1 植物精油对鱼藤酮的细胞活性的影响 鱼藤酮及鱼藤酮与植物精油联用对SL-1细胞的增殖抑制活性见表4,鱼藤酮处理SL-1细胞24h后,IC₅₀为34.97 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,当鱼藤酮系列质量浓度溶液中分别含有50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的松节油、芸香油、香茅油时对鱼藤酮的细胞活性影响显著(IC₅₀95%置信区间没有交叉),达到相同的抑制率混剂中鱼藤酮的用量仅为14.03、18.02、26.86 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,鱼藤酮单剂与混剂的IC₅₀比值分别为2.49、1.30、1.94,低质量浓度广藿香油、当归油对鱼藤酮的细胞活性影响不显著(IC₅₀95%置信区间有交叉).当植物精油增加至100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,广藿香油、松节油、芸香油、当归油和香茅油与鱼藤酮联用的IC₅₀分别为25.42、14.56、12.69、21.72、23.41 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,均小于鱼藤酮单剂,鱼藤酮单剂与混剂的IC₅₀比值分别为1.38、2.76、1.49、1.61、2.40,这表明5种精油在100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,显著增加了鱼藤酮对SL-1细胞的细胞活性(IC₅₀95%置信区间没有交叉).

2.3.2 植物精油对辣椒碱细胞活性的影响 广藿香油、芸香油、香茅油、当归油、松节油5种植物精油与辣椒碱联用时对SL-1细胞的增殖抑制作用结果见表5.辣椒碱单剂处理SL-1细胞24h后,IC₅₀为

表3 植物精油处理对 SL-1 细胞质膜通透性的影响¹⁾

Tab.3 Effects of commercial essential oils on membrane integrity of SL-1 cells

供试精油	$t_{处理}/h$	50 $\mu g/mL$		100 $\mu g/mL$	
		MIF	MIF 升高率/%	MIF	MIF 升高率/%
广藿香油	24	113.34 ± 1.02def ¹⁾	22.73	154.95 ± 0.62b	58.41
柠檬油	24	104.14 ± 0.32ghij	12.77	112.96 ± 0.19ij	15.49
月见草油	24	118.07 ± 0.19bcd	27.85	131.52 ± 0.53def	34.38
松节油	24	123.96 ± 0.48c	34.23	154.79 ± 0.13b	58.25
青蒿油	24	102.53 ± 0.38ghijk	11.03	132.44 ± 0.36def	35.40
桉叶油	24	92.79 ± 0.31lm	0.47	103.09 ± 0.38kl	5.40
菖蒲油	24	120.33 ± 0.72cd	30.30	125.42 ± 1.30fg	28.13
杏仁油	24	102.68 ± 0.87hijk	11.18	110.56 ± 0.36ijk	13.03
艾叶油	24	115.09 ± 0.58cde	24.62	127.25 ± 0.54efg	30.10
芸香油	24	141.33 ± 0.93b	53.04	179.37 ± 0.52a	83.38
樟脑油	24	87.10 ± 0.31m	-5.68	110.82 ± 0.34ijk	13.30
薰衣草油	24	98.36 ± 1.19ijk	6.50	106.49 ± 0.19jkl	8.87
山苍子油	24	107.69 ± 0.20efgh	24.04	135.12 ± 0.34de	38.14
当归油	24	123.44 ± 0.42c	33.67	137.80 ± 1.44d	40.88
留兰香油	24	109.86 ± 0.25efg	18.96	101.69 ± 0.47l	3.96
连翘油	24	107.09 ± 0.27fghi	15.96	123.58 ± 0.27fg	26.34
茶树油	24	115.65 ± 0.55cde	25.23	131.03 ± 0.44def	33.96
薄荷油	24	85.05 ± 0.16m	-7.91	127.32 ± 0.70efg	30.16
八角茴香油	24	97.91 ± 0.35kl	6.02	134.87 ± 0.76e	37.89
香茅油	24	103.19 ± 0.22ghijk	11.74	147.29 ± 0.35c	50.58
生姜油	24	113.27 ± 0.65def	22.65	146.08 ± 0.61c	49.34
荆芥油	24	110.36 ± 0.20efgh	19.51	115.62 ± 0.07hi	18.21
冬青油	24	105.16 ± 0.10ghij	13.87	84.05 ± 0.09m	-3.85
丁香油	24	97.62 ± 0.12jk	5.70	123.65 ± 0.12gh	26.42
75%乙醇	24	177.09 ± 1.47a	91.76	180.65 ± 0.82a	84.68
对照	24	92.35 ± 1.00m		97.82 ± 0.42lm	

1) 表中同列数据(平均值±标准误)后凡具有一个相同小写字母者,表示在5%水平差异不显著(DMRT法)。

表4 鱼藤酮及鱼藤酮与植物精油联用对 SL-1 细胞的增殖抑制活性

Tab.4 Inhibition of rotenone and the combination with essential oils on the proliferation of SL-1 cells

精油	$\rho/(\mu g \cdot mL^{-1})$	毒力回归方程 ¹⁾	IC ₅₀ /	95% 置信限/	相关系数 <i>R</i>
			($\mu g \cdot mL^{-1}$)	($\mu g \cdot mL^{-1}$)	
无	0	$y = 1.1544 + 2.4912x$	34.97	33.58 ~ 36.41	0.9852
广藿香油	50	$y = 2.2746 + 1.7649x$	35.01	31.99 ~ 38.32	0.9737
	100	$y = 2.5750 + 1.7257x$	25.42	24.16 ~ 26.75	0.9843
松节油	50	$y = 2.8431 + 1.7176x$	18.02	16.69 ~ 19.47	0.9831
	100	$y = 3.4106 + 1.3665x$	14.56	13.63 ~ 15.56	0.9638
芸香油	50	$y = 2.9542 + 1.7834x$	14.03	13.29 ~ 14.82	0.9740
	100	$y = 3.5028 + 1.3567x$	12.69	11.42 ~ 14.11	0.9639
当归油	50	$y = 1.8445 + 2.0936x$	32.15	29.84 ~ 34.64	0.9938
	100	$y = 1.9946 + 2.2481x$	21.72	20.61 ~ 22.89	0.9907
香茅油	50	$y = 3.0431 + 1.3693x$	26.86	24.51 ~ 29.44	0.9602
	100	$y = 2.6466 + 1.7184x$	23.41	21.86 ~ 25.08	0.9876

1) x 为剂量的对数, y 为死亡几率。

35.92 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,当辣椒碱系列浓度溶液中分别含有 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的广藿香油、芸香油、松节油时,IC₅₀分别为 28.91、28.08、19.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,均显著低于辣椒碱单剂,低浓度香茅油和当归油对辣椒碱的细胞活性影响不显著. 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上述 5 种植物精油与辣椒碱联用后 IC₅₀ 分别为: 14.56、13.26、

33.86、24.10、11.39 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,均低于辣椒碱单剂,其中广藿香油、芸香油、松节油在 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时能够显著提高辣椒碱的细胞活性 (IC₅₀95% 置信区间没有交叉),其 IC₅₀ 分别为: 14.56、13.26 和 11.39 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,辣椒碱单剂与混剂的 IC₅₀ 比值分别为 2.47、2.71、3.15.

表5 辣椒碱及辣椒碱与植物精油联用对 SL-1 细胞的增殖抑制活性

Tab.5 Inhibition of Capsaicin and the combination with essential oils on the proliferation of SL-1 cells

精油	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	毒力回归方程 ¹⁾	IC ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	95% 置信限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关系数 R
无	0	$y = 0.3171 + 3.0108x$	35.92	34.66 ~ 37.23	0.9889
广藿香油	50	$y = 1.0603 + 2.6965x$	28.91	27.78 ~ 30.08	0.9887
	100	$y = 2.4949 + 2.1537x$	14.56	13.83 ~ 15.33	0.9840
松节油	50	$y = 1.5299 + 2.6852x$	19.60	18.86 ~ 20.37	0.9793
	100	$y = 3.2335 + 1.6717x$	11.39	10.70 ~ 12.13	0.9901
芸香油	50	$y = 1.6106 + 2.3401x$	28.08	26.90 ~ 29.24	0.9872
	100	$y = 3.3827 + 1.4408x$	13.26	12.42 ~ 14.16	0.9831
当归油	50	$y = 2.8403 + 1.4250x$	32.77	30.59 ~ 35.11	0.9766
	100	$y = 1.5630 + 2.4868x$	24.10	23.14 ~ 25.10	0.9766
香茅油	50	$y = 0.0208 + 3.2035x$	35.83	34.57 ~ 37.14	0.9820
	100	$y = 0.6410 + 2.8497x$	33.86	32.59 ~ 35.18	0.9907

1) x 为剂量的对数, y 为死亡几率.

3 讨论

植物精油作为中药渗透促进剂在医药上应用广泛.此外,植物精油杀菌作用机理的研究表明:精油能够破坏细菌细胞质膜磷酸双分子结构^[17],破坏膜蛋白,导致胞内成分渗出、消耗分子主动运输力^[18],最终起到杀菌的作用.植物精油对表皮细胞和质膜都具有良好的增透作用,精油作为渗透剂应用于杀虫剂助剂方面,使其很快在虫体内达到有效剂量并尽快到达作用靶标,从而引起害虫中毒死亡^[19].由于精油本身低毒甚至无毒,所以精油与杀虫剂混用有利于降低农药毒性,对作物和天敌安全.本文以离体培养的 SL-1 细胞为研究对象,初步研究了 24 种植物精油对 SL-1 细胞膜的影响.研究结果表明:100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的广藿香油、月见草油、松节油、芸香油、山苍子油、当归油、香茅油和生姜油 8 种植物精油处理致使 SL-1 细胞的细胞膜电位超极化,这与大多数研究相反,这可能与所用的荧光染料和精油浓度有关.本研究所用 DiBAC₄(3) 为脂溶性的阴离子型慢反应荧光探针,在膜电势的作用下能自由通过正常细胞质膜,但是 DiBAC₄(3) 本身没有荧光,必须与细胞质中蛋白结合后才能够发荧光^[20].因此,DiBAC₄(3) 荧光强度的变化不仅与细胞膜电位有关,还与细胞质

中可结合的蛋白质的量有关,本试验中大多数精油处理后 DiBAC₄(3) 荧光强度降低,可能是精油处理的浓度过高或时间过长,抑制了有关蛋白质的合成,具体原因有待进一步研究.为了进一步证明精油对细胞膜通透性的影响,利用荧光染料 PI 的膜不通透性,来分析精油对细胞膜通透性的影响.低剂量精油处理后,与对照相比,大部分精油处理后细胞内荧光强度增加,其中芸香油能够显著增加细胞内 PI 的荧光强度,其次是当归油、松节油.当精油质量浓度增至 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,广藿香油、松节油、芸香油、当归油、香茅油、生姜油处理 SL-1 细胞后,细胞内荧光强度增值超过 40%.说明植物精油处理后能够破坏细胞膜完整性,导致细胞膜的选择通透性消失,大分子荧光染料 PI 可自由进入细胞,精油对细胞膜通透性的影响与精油质量浓度成正相关.

鱼藤酮和辣椒碱是目前已经商品化应用的植物源杀虫剂,两者对害虫都具有良好的触杀活性,然而内吸性较差,能否更多地穿透害虫表皮将影响药剂对害虫的毒力^[21-22],本试验从 24 种植物精油中筛选出广藿香油、松节油、芸香油、当归油和香茅油 5 种植物精油分别与鱼藤酮、辣椒碱联用,评价精油对 2 种植物源农药的细胞活性的影响.研究结果表明,100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的广藿香油、松节油、芸香油、当归油、

香茅油 5 种植物精油分别与鱼藤酮和辣椒碱联用后, IC_{50} 均低于鱼藤酮和辣椒碱单用, 表明供试 5 种植物精油均能在一定程度提高 2 种植物源农药对 SL-1 细胞的细胞活性; $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的松节油、芸香油对鱼藤酮和辣椒碱的细胞活性影响显著, $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的松节油和芸香油与鱼藤酮联用, 达到 50% 的抑制率时混剂中鱼藤酮的用量仅为鱼藤酮单独使用时的 52% 和 40%; 松节油和芸香油同样能够提高辣椒碱的细胞活性, 达到 50% 的抑制率时混剂中辣椒碱的用量仅为辣椒碱单独使用时的 55% 和 78%。

杀虫剂的药效一方面取决于有效成分的毒性大小, 另一方面则取决于穿透生物体表和细胞膜, 到达作用位点的难易程度。本研究表明, 松节油、芸香油能够破坏细胞膜的完整性, 增加通透性, 并对鱼藤酮和辣椒碱的细胞活性均有显著提高。因此推论, 芸香油、松节油应用于杀虫剂的助剂中, 有利于提高农药防治效果, 减少农药用量, 对降低农药残留和保护环境具有重要的意义。但是关于芸香油、松节油对鱼藤酮和辣椒碱的增效活性, 有待进一步活虫试验验证。

参考文献:

[1] 黄素青, 梁炳泉, 苏兆雄, 等. 植物精油的生物活性及其在有害生物控制上的应用[J]. 农药, 2010, 49(6): 397-402.

[2] 高春华, 郭伟英, 张亚秋, 等. 丁香油和高良姜油对阿魏酸透皮吸收的促进作用[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(9): 844-846.

[3] PATHAN I B, MALLIKARJUNA S C, GUPTA V R M. Comparison of the effect of essential oils on the permeation of diclofenac diethylamine through various barriers [J]. Acta Pharm Sci, 2008, 50(3): 219-228.

[4] WILLIAMS A C, BARRY B W, Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement [J]. Pharm Res, 1991, 8(1): 17-24.

[5] 王庆伟, 张京, 刘雪英, 等. 当归挥发油对尼莫地平透皮吸收的影响[J]. 医药导报, 2010, 29(11): 1397-1400.

[6] 陈艳芬, 王同任, 王晖, 等. 主成分分析法对促透剂促透效果的评价[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(7): 788-793.

[7] TRIPATHI A K, UPADHYAY S, BHUIYAN M, et al. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management [J]. J Pharmacog Phytoth, 2009, 1(5): 52-63.

[8] BARBARA A, GERHARD B. Biological properties of essential oils: An updated review [J]. Flavour Frag J,

2010, 25(6): 407-426.

- [9] 孙红霞, 魏辉, 赵建伟, 等. 土荆芥精油预处理后小菜蛾幼虫对氟虫腈敏感度的变化[J]. 华东昆虫学报, 2008, 17(1): 9-13.
- [10] 吴玮, 孙红霞, 魏辉, 等. 五种植物精油对氟虫腈的增效与渗透促进作用[J]. 华东昆虫学报, 2008, 17(4): 259-265.
- [11] 李春生, 刘怀, 邓新平. 5 种增效剂与 3 种杀虫剂对甜菜夜蛾的增效作用[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(3): 450-453.
- [12] WICKENS H J, PINNEY R J, MASON D J, GANT V A. Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in *Escherichia coli* following ciprofloxacin exposure [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(3): 682-687.
- [13] BOUHDID S, ABRINIL J, ZHIRI A, et al. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *O-riganum compactum* essential oil [J]. J Appl Microbiol, 2009, 106(5): 1558-1568.
- [14] 童松, 徐汉虹, 张志祥. 辣椒碱对斜纹夜蛾细胞增殖及凋亡的影响[J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 466-470.
- [15] 崔江虎, 吴萍, 魏孝义, 等. 番荔枝内酯化合物布拉它辛对斜纹夜蛾的杀虫活性及对 SL 细胞的致凋亡作用[J]. 昆虫学报, 2010, 53(4): 391-395.
- [16] 成家壮, 韦小燕, 黄玉梅. 硫与三环唑混配对抑制稻瘟病菌的协同增效作用[J]. 农药学报, 2000, 2(2): 35-40.
- [17] CARSON C F, MEE B J, RILEY T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46(6): 1914-1920.
- [18] BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review [J]. Int J Food Microbiol, 2004, 94(3): 223-53.
- [19] 石伟山, 顾中言, 徐德进, 等. 3 种助剂对高效氯氰菊酯的增效作用[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(6): 820-825.
- [20] KLAPPERSTUCK T, GLANZ D, KLAPPERSTUCK M, et al. Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry [J]. Cytometry A, 2009, 79(12): 593-608.
- [21] 孔学, 王加宁, 陈贯虹, 等. 辣椒碱在农药领域的应用研究进展[J]. 农药, 2011, 50(4): 244-257.
- [22] 张庭英, 徐汉虹, 王长宏. 鱼藤酮的应用现状及存在问题[J]. 农药, 2005, 44(8): 352-355.