

• 研究简报 •

虫螨腈对斜纹夜蛾细胞的毒力及 对线粒体膜电位的影响

张前锋, 王玉健, 徐汉虹*

(天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广州 510642)

摘要:以 MTT 法测定了虫螨腈等杀虫剂对斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*, SL) 细胞的毒力, 并用流式细胞仪测定了虫螨腈对 SL 细胞线粒体膜电位的影响。结果表明: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氟虫腈、醚脲、虫螨腈处理 SL 细胞 24 h 后, 对细胞增殖的抑制率依次为 14.57%、22.91%、52.53%; 虫螨腈对 SL 细胞 24 和 48 h 的 IC_{50} 值分别为 57.56 和 2.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虫螨腈处理细胞 24 h 后, 与对照相比, SL 细胞线粒体膜电位分别降低 46.87%、57.17%、73.31%, 其下降值与药剂浓度呈正相关。

关键词: 斜纹夜蛾细胞系; 虫螨腈; 细胞毒力; 线粒体膜电位

中图分类号: S481.8 S482.3 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2008)02-0243-04

Effect of Chlorfenapyr on Mitochondrial Membrane Potential and its Cytotoxicity against *Spodoptera litura* Cells

ZHANG Qian-feng WANG Yu-jian XU Han-hong*

(Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract The cytotoxicity of chlorfenapyr and some other insecticides against *Spodoptera litura* (SL) cells were evaluated by MTT method and the mitochondrial membrane potential was detected by flow cytometry. The results showed that the viability of SL cells treated by fipronil, diafenthiuron and chlorfenapyr in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 24 h is 14.57%, 22.91%, 52.53%, respectively. The IC_{50} values of chlorfenapyr at 24 h and 48 h after treatment were 57.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 2.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Compared with the control, mitochondrial membrane potential of SL cells treated by chlorfenapyr in 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ decreased 46.87%, 57.17% and 73.31% for 24 h and the decrease of mitochondrial membrane potential is positively related to the concentration of chlorfenapyr.

Key words *Spodoptera litura* cells; chlorfenapyr; cytotoxicity; mitochondrial membrane potential

1915年德国 Benedict 最早进行了昆虫细胞的离体培养^[1], 1996 年 Shih 成功地从斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* (以下简称 SL) 蛹的卵巢建立了

SL 细胞系, 并进行了核型多角体病毒的研究^[2]。据报道已建立起来的昆虫细胞系超过 500 个^[3]。Sonoda 等^[4]研究了不同结构的杀虫剂对甘蓝夜

收稿日期: 2007-12-18; 修回日期: 2008-05-13.
作者简介: 张前锋 (1984-), 男, 山西阳城人, 硕士研究生, E-mail playog@163.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 徐汉虹 (1961-), 男, 教授, 博士, 主要从事农药学及昆虫学研究. 联系电话: 020-85285127; E-mail hxx@scau.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金 (30671386) 资助.
©1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

蛾 *Mamestra brassicae* (L.) 细胞热休克蛋白表达的影响, 结果发现仅有虫螨腈明显诱导了其热休克蛋白的表达, 说明虫螨腈可引起甘蓝夜蛾细胞窘迫 (cellular distress) 或损伤。但有关虫螨腈对 SL 细胞的毒力及对线粒体膜电位的影响如何, 国内外仍鲜见报道。笔者采用 MTT 法测定了几种杀虫剂对 SL 细胞增殖的影响, 并通过分析虫螨腈处理后的细胞形态变化及流式细胞仪检测结果, 初步探讨了虫螨腈的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系

SL 细胞系: 斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 卵巢细胞, 培养温度为 27℃。

1.2 药剂

95% 虫螨腈 (chlorfenapyr) 原粉: 德国巴斯夫股份有限公司; 95% 氟虫腈 (fipronil) 原粉: 拜耳作物科学公司; 90% 丁醚脲 (diafenthiuron) 原粉: 江苏绿利来股份有限公司。

1.5 虫螨腈对 SL 细胞线粒体膜电位 (MMP) 的影响测定^[8]

以含 1% DM SO 的培养基为对照, 虫螨腈浓度分别为 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以各浓度药液分别处理细胞 24 h 后收集细胞, 用 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的罗丹明 123 在 37℃ 染色 30 min, 以 PBS 磷酸盐缓冲液洗细胞 3 次, 用流式细胞仪检测线粒体膜电位。每个样品重复 3 次。结果采用 CellQuest 软件进行分析。

1.6 数据统计分析

实验数据通过 DPS2000 分析整理, 应用新复极差多重比较法 (DMRT) 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 虫螨腈对 SL 细胞形态的影响

生长状态良好的 SL 细胞, 贴壁或半贴壁, 呈不规则的梭形、纺锤形, 细胞透亮 (图 1A)。用浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的虫螨腈处理细胞 24 h 之后, 在显微镜下观察到细胞膜开始收缩, 细胞贴壁状态变差, 多数细胞变为圆形, 梭形细胞数量减少, 着色加深, 细胞

1.3 仪器及试剂

BD-RAD 680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); BD FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

98% 的 3-(4, 5-二甲基-2-噻唑)-2, 5-二苯基溴化四唑 (四甲基偶氮唑盐, MTT) 及 90% 的罗丹明 123 (Rhodamine 123) (美国 Sigma-Aldrich 公司产品); 99.9% 的二甲基亚砜 (DMSO); Grace' 培养基 (Invitrogen 公司)。

1.4 MTT 比色法测定药剂对细胞增殖的抑制率^[5-7]

用 DMSO 将各药剂配成母液, 先用培养基将母液稀释 100 倍, 再用含 1% (体积分数, 下同) DMSO 的培养基分别配成试验所需浓度, 以含 1% DMSO 的培养基为对照。初筛时各药剂浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 虫螨腈 IC_{50} 测定中浓度设置分别为 10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每浓度 4 次重复。各组细胞经药剂处理后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL , 继续培养 4 h 后倒出培养液, 每孔加入 100 μL DMSO, 用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度值。整个过程需避光进行。按以下公式计算细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率} = \left(1 - \frac{\text{受试组 OD}_{490}}{\text{对照组 OD}_{490}}\right) \times 100\%$$

碎片增多, 部分细胞体积膨大 (图 1B)。用流式细胞仪检测时也发现在侧向角值较大区域的细胞数量增多, 表明细胞的颗粒度增加。

2.2 MTT 法实验结果

药剂对 SL 细胞增殖的抑制率测定结果见表 1。

2.3 虫螨腈对 SL 细胞增殖的抑制活性

进一步测定了虫螨腈处理 SL 细胞 24 和 48 h 后对细胞增殖的抑制活性, 结果表明, 虫螨腈对 SL 细胞的 24 和 48 h IC_{50} 值分别为 57.56 和 260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (见表 2)。

2.4 流式细胞仪检测结果

虫螨腈处理 SL 细胞后, 用流式细胞仪进行检测, 处理及对照 SL 细胞的线粒体膜电位 (MMP) 变化结果如图 2 所示。经罗丹明 123 染色 (此荧光染料可在线粒体膜内、外形成与膜电位相关的重新分布) 后, 对照组细胞平均荧光强度值为 96.77 ± 0.26 , 而用 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 虫螨腈处理 24 h 后的 SL 细胞的线粒体膜电位持续降低, 平均荧光强度值分别为 51.41 ± 0.52 , $41.44 \pm$

0.44、25.83±0.07,与对照相比,MMP分别降低46.87%、57.17%、73.31%,差异极显著($P<0.01$)。表明虫螨腈降低了细胞的MMP水平,并且随药剂浓度的增加其作用更加明显。

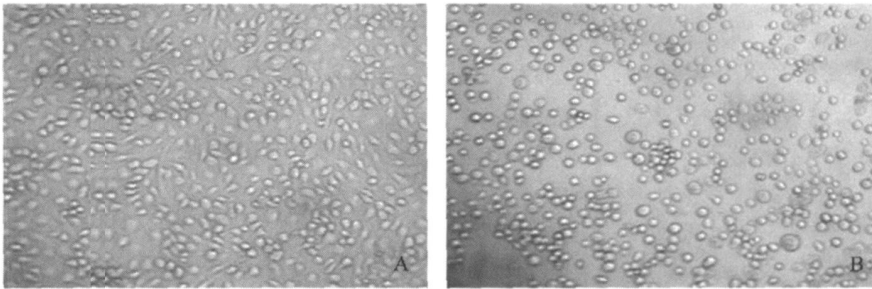


图 1 正常 SL 细胞 (A)及 20 µg/mL 虫螨腈处理 24 h 后的 SL 细胞 (B) (×100)
Fig 1 Normal SL cells(A) and SL cells(B) treated by chlorfenapyr in 20 µg/mL for 24 h (×100)

表 1 三种杀虫剂处理 24 h 后对 SL 细胞增殖的抑制率

Table 1 The proliferation inhibition rate of *S. litura* cells after treatment by 3 insecticides for 24 h

处理 Treatment	浓度 Conc. /(µg/mL)	增殖抑制率 Proliferation inhibition rate(%)
氟虫腈 fipronil	100	14.57±1.30 c
丁醚脲 diafenathion	100	22.91±2.58 b
虫螨腈 chlorfenapyr	100	52.53±2.53 a

注:表中同列数据(平均值±标准误差)后字母相同者,表示在 5% 水平上差异不显著(DMRT)。
Notes The data(mean±SE) within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (DMRT, $P=0.05$).

表 2 虫螨腈对 SL 细胞的 IC₅₀ 值

Table 2 The IC₅₀ values of chlorfenapyr against *S. litura* cells

处理时间 /h Treatment time	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	IC ₅₀ (95% 置信限, 95% CI) /(µg/mL)
24	$Y = 4.2343 + 0.4350x$	0.9947	57.56(34.89~94.98)
48	$Y = 4.8126 + 0.4513x$	0.9773	2.60(0.93~7.25)

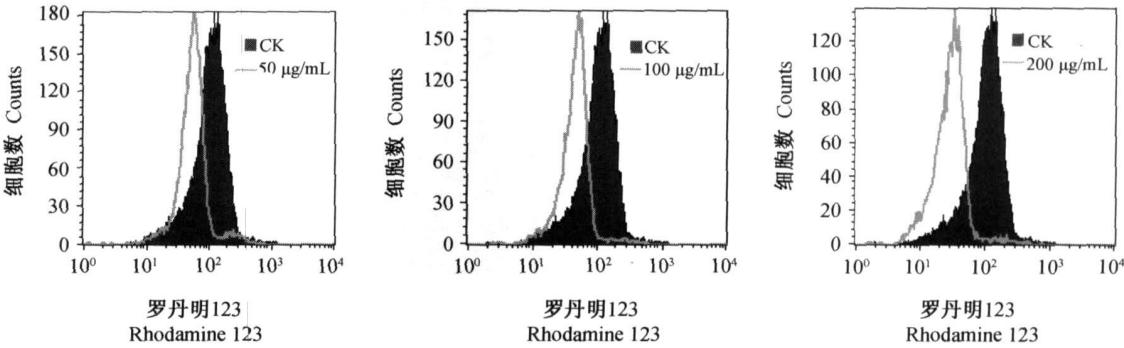


图 2 50、100、200 µg/mL 虫螨腈处理 SL 细胞 24 h 与对照组 SL 细胞罗丹明 123 的荧光强度值叠加图
Fig 2 Rhodamine 123 fluorescent overlays of normal SL cells and that treated by chlorfenapyr at 50、100、200 µg/mL for 24 h

3 讨论

体外培养技术从 19 世纪 50 年代前后开始就成为药物筛选、细胞毒性和活性检测中极为重要的手段。本实验发现 SL 细胞对虫螨腈敏感,对氟虫腈和丁醚脲不敏感。通过对 SL 细胞进行罗丹明 123 荧光染色,应用流式细胞仪检测其荧光强度,结果表明虫螨腈降低了 SL 细胞的 MMP 水平,并且随药剂浓度的增加,线粒体膜电位继续降低,呈正相关性。

Shigeru 研究认为,虫螨腈可以明显降低草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) 细胞中 ATP 的浓度^[9]。Black 等研究表明,虫螨腈作用于虫体细胞内的线粒体,会破坏氧化磷酸化 ADP 转变成 ATP 的生理过程^[10]。在 ATP 合成中, H^+ 浓度梯度和线粒体跨膜电位共同构成了质子动力势,质子动力势推动 H^+ 通过 ATP 合成酶装置合成 ATP。线粒体膜电位的降低可引起 ATP 合成的减少,继而危及细胞的存活^[11]。本研究发现,虫螨腈降低了 SL 细胞的 MMP 水平,由此推测经虫螨腈处理后 SL 细胞的 ATP 浓度降低,线粒体膜电位的下降可能是虫螨腈作用于 SL 细胞的机制之一。很多研究表明,线粒体膜电位的改变与细胞凋亡有很密切的关系^[12],有关虫螨腈与细胞凋亡的关系还有待进一步研究。

致谢: 本论文在完成过程中得到了实验室张志祥副教授、研究生廖绍裕、李文欧等的帮助。

参考文献:

- [1] LI Wen-qing (李文青), XIAO Cheng-zu (肖成祖). 昆虫细胞的大规模培养 [J]. *Biotechnology* (生物技术), 1995, 5 (1): 5-8
- [2] SHIH C J, LIN RW, WANG C H. Establishment of a Cell Line from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and Replication of S. litura Nuclear Polyhedrosis Virus in vitro [J]. *J Invertebr Pathol*, 1997, 69 (1): 1-6.

- [3] LYNN D E, GOODMAN C, CAPUTO G. Techniques for The Development of New Insect Cell Lines [C] // Proc 2005 Annual Meet Soc In Vitro Biology, 2005
- [4] SONODA S, TSUMUKI H. Induction of Heat Shock Protein Genes by Chlorfenapyr in Cultured Cells of the Cabbage Armyworm, *Manestra brassicae* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 89 (3): 185-189.
- [5] MOSMANN T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65 (1-2): 55-63.
- [6] STIPANOVIC R D, ELISSALDE M H, ALTMAN D W, et al. Cell Culture Assay to Evaluate Allelochemical Toxicity to *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1990, 83 (3): 737-741
- [7] ZHOU Qing-chun (周青春), HONG Hua-zhu (洪华珠), LUO Qin (罗勤), et al. 测定昆虫细胞存活或死亡的 MTT 方法的改进 [J]. *Entomological Knowledge* (昆虫知识), 1998, 35 (3): 163-167.
- [8] WANG Yu-jian (王玉健). Studies on Membrane Perforation of *Spodoptera litura* Cell Induced by Photosensitizers (光活化物质致斜纹夜蛾 SL 细胞穿孔的机理) [D]. Guangzhou (广州): South China Agricultural University (华南农业大学), 2007
- [9] SHIGERU S. Effects of Pyridalyl on ATP Concentrations in Cultured Sf9 cells [J]. *J Pestic Sci*, 2005, 30 (4): 403-405.
- [10] BLACK B C, HOLLINGWORTH R M, AHAMMAD SAHIB K I et al. Insecticidal Action and Mitochondrial Uncoupling Activity of A c-303, 630 and Related Halogenated Pyrroles [J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1994, 50 (2): 115-128.
- [11] NIE W, ZHANG Y X, ZHOU J H. Correlation between Mitochondrial Membrane Potential and Neurotoxic Effect of Corticosterone on Primary Cultured Hippocampal Cells [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2001, 53 (6): 469-472.
- [12] SCARLETT J L, SHEARD P W, HUGHES G. Changes in Mitochondrial Membrane Potential during Staurosporine-induced Apoptosis in Jurkat Cells [J]. *FEBS Letters*, 2000, 475 (3): 267-272.

(Ed TANG J)