

· 研究论文 ·

松油烯-4-醇对淡色库蚊的熏蒸毒力及其 Na^+ , K^+ -ATP酶的抑制作用

马志卿, 栾正春, 张兴*

(陕西省生物农药工程技术研究中心/西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 为进一步探讨杀虫植物砂地柏 *Sabina vulgaris* Ant 精油中主要杀虫活性成分—松油烯-4-醇 (terpinen-4-ol) 对卫生害虫的生物活性, 测定了该物质对淡色库蚊 *Culex pipiens* Pallens 及其 Na^+ , K^+ -ATP酶活性的影响。结果表明: 松油烯-4-醇对淡色库蚊具有较强的熏蒸作用, 其 LC_{50} 值为 6.79 mg/L, 在 LC_{80} 剂量下其击倒中时 (KT_{50}) 为 6.92 min; 淡色库蚊 Na^+ , K^+ -ATP酶活性测定的最佳反应条件为 pH 值 7.42、温度 35.5°C、底物浓度 0.7 mmol/L; 离体和活体情况下, 松油烯-4-醇均可显著抑制淡色库蚊 Na^+ , K^+ -ATP酶的活性, 其 I_{50} 值为 32.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。 Na^+ , K^+ -ATP酶可能是松油烯-4-醇对淡色库蚊的杀虫作用靶标。

关键词: 松油烯-4-醇; 淡色库蚊; Na^+ , K^+ -ATP酶

中图分类号: Q969.44.S482.39

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2009)02-0230-05

Effects of Terpinen-4-ol on *Culex pipiens* Pallens and its Na^+ , K^+ -ATPase

MA Zhi-qing LUAN Zheng-chun ZHANG Xing*

(Shaanxi Research Center of Biopesticide Technology and Engineering/Biorational Pesticide Research & Development Center of Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100 Shaanxi Province, China)

Abstract The main insecticidal component was terpinen-4-ol in essential oil of *Sabina vulgaris* Ant. In order to study its biological activity against health pests, the effects of terpinen-4-ol on *Culex pipiens* Pallens and its Na^+ , K^+ -ATPase were carried out. The results showed that terpinen-4-ol had strong fumigation toxicity against *C. pipiens*. The values of LC_{50} and KT_{50} (under the concentration of LC_{80}) were 6.79 mg/L and 6.92 min, respectively. The optimum reaction conditions of Na^+ , K^+ -ATPase were obtained consisting of pH 7.42, reaction temperature 35.5°C and substrate concentration 0.7 mmol/L. Terpinen-4-ol could significantly inhibit the activity of Na^+ , K^+ -ATPase both in vitro and in vivo. In conclusion, Na^+ , K^+ -ATPase is possibly the insecticidal target of terpinen-4-ol against *C. pipiens*.

Key words terpinen-4-ol; *Culex pipiens* Pallens; Na^+ , K^+ -ATPase

从天然产物中寻找先导化合物是进行新药研究与开发的主要途径之一。松油烯-4-醇是存在于多种植物精油中的一种单萜类化合物^[1]。西北农林科技大学无公害农药研究服务中心从杀虫

植物砂地柏的精油中分离得到了该化合物。研究表明, 松油烯-4-醇对小菜蛾 *Plutella xylostella* L.、粘虫 *Mythimna separata* Walker、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hubner、玉米象 *Sitophilus zeamais*

收稿日期: 2008-11-20; 修回日期: 2009-03-18.

作者简介: 马志卿 (1975-), 男, 新疆台山人, 博士, 副教授, 主要从事农药毒理学和生物农药研究, E-mail: mzhqing2000@126.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 张兴 (1952-), 男, 博士, 教授, 研究方向为生物农药, 联系电话: 029-87093344; E-mail: zhixing1952@126.com
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600404).

Motschulsky 家蝇 *Musca domestica* 等多种昆虫均表现出强烈的熏蒸、忌避及触杀活性^[2], 且对粘虫、家蝇等昆虫的 Na^+ , K^+ -ATP酶具有明显的抑制作用^[3,4], 推测该酶可能为松油烯-4醇的作用靶标。为进一步明确 Na^+ , K^+ -ATP酶是否为松油烯-4醇的杀虫作用靶标, 笔者测定了松油烯-4醇对淡色库蚊及其 Na^+ , K^+ -ATP酶活力的影响, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

淡色库蚊 *Culex pipiens* Pallens 从中国科学院动物研究所引进未接触过任何杀虫剂的淡色库蚊敏感品系, 在室内 (T: $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, RH: 70%~80%, L/D: 12 h/12 h) 饲养, 试验时挑选个体大小一致的 3日龄未吸血成蚊供试。

1.2 供试药剂

97% 松油烯-4醇 (购自百灵威公司); Tris-ATP钠盐、考马斯亮蓝等均为美国 Sigma公司产品, 磷酸二氢钾、孔雀石绿、钼酸铵、吐温-20、柠檬酸钠等试剂均为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 熏蒸活性测定 采用三角瓶熏蒸法^[5,6]。每处理重复 3次, 每重复用试虫 15头, 以丙酮处理为对照, 4 h后检查结果, 统计死亡率, 并以 Abbott公式校正^[7], 以机率值分析法求毒力回归方程^[8], 并求出 4 h的致死中浓度 (LC_{50}) 及 95% 置信限。在毒力测定基础上, 以 LC_{80} 的剂量熏蒸处理试虫后, 每隔 1 min记录击倒试虫数, 以机率值分析法求出毒力曲线并计算击倒中时 (KT_{50})。

1.3.2 Na^+ , K^+ -ATP酶酶液制备方法 取 50头 3日龄未吸血成蚊, 加入冰冷的 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 冰浴匀浆, 并用缓冲液定容至 4.0 mL , 于 1200 g 下离心 10 min , 其上清液即为粗酶液^[9]。

1.3.3 Na^+ , K^+ -ATP酶活性测定的最佳反应条件筛选 Na^+ , K^+ -ATP酶活性测定参照冯北元等^[10]的方法进行。取 0.1 mL 酶液和 0.2 mL 反应介质 (含 0.175 mol/L NaCl, 0.0175 mol/L KCl, 0.007 mol/L MgCl₂, 0.002 mol/L ATP 的 Tris-HCl 缓冲液, 其中 ATP 在临实验前加入), 37°C 保温 20 min 后加水补至 2 mL , 再加入 2 mL 显色剂 ($V_{0.05\%}$ 孔雀石绿溶液 : $V_{4.2\%}$ 钼酸铵盐酸溶液 = 3:1 混合后, 每

100 mL 加入 4 mL 质量分数为 1.5% 的吐温-20), 摇匀后加入 0.4 mL 柠檬酸钠溶液, 于 660 nm 处测定 OD 值。以每 20 min 每 mg 蛋白的 ATP 酶分解 ATP 产生 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的数量作为 1 个 ATP 酶活力单位 [$1 \mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{pro})^{-1} \cdot 20 \text{ min}^{-1}$]。

蛋白含量测定参照考马斯亮蓝 G-250法^[11]。

为进一步明确淡色库蚊 Na^+ , K^+ -ATP酶活性测定的最佳条件, 分别测试了 pH、温度及底物浓度对酶活性的影响。测定方法同上。分别调整反应体系的 pH 为 7.05, 7.22, 7.40, 7.52, 7.63, 7.82 和 8.00, 在温浴时, 设立不同温度 (20.0 , 25.0 , 30.0 , 35.0 , 40.0 和 45.0°C) 处理; 在反应介质中调整底物浓度为 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.7 , 0.8 , 0.9 , 1.0 mmol/L , 测定 Na^+ , K^+ -ATP酶活性, 分析 pH、温度及底物浓度对 Na^+ , K^+ -ATP酶活力的影响, 确定最佳 pH 值、最佳反应温度, 并求出 Na^+ , K^+ -ATP酶的米氏常数 (K_m) 和最大反应速率 (V_{max})。进一步确定体系的最佳反应浓度。

1.3.4 松油烯-4醇对 Na^+ , K^+ -ATP酶的活体抑制 以 LC_{80} 剂量的松油烯-4醇熏蒸处理库蚊成虫, 分别于 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 h 各取 15 头试虫。酶液制备同 1.3.2 节, 并以已经建立的方法测定酶活性。

1.3.5 松油烯-4醇对 Na^+ , K^+ -ATP酶的离体抑制 取 15 头试虫, 酶液制备方法同 1.3.2 节, 将松油烯-4醇配制成所需梯度浓度, 与酶液在 37°C 下预保温 5 min 再加入 ATP, 测定酶活。

所有酶活性测定实验每处理均重复 3~5 次。

2 结果与分析

2.1 松油烯-4醇对淡色库蚊的熏蒸活性

松油烯-4醇对淡色库蚊具有较强的熏蒸活性 (见表 1), 其 4 h 的 LC_{50} 值为 6.79 mg/L , 以 LC_{80} 的剂量测得其 KT_{50} 值为 6.92 min 。

2.2 Na^+ , K^+ -ATP酶活性测定的最佳反应条件

2.2.1 pH 对 Na^+ , K^+ -ATP酶活力的影响 在保持反应体系的温度为 37°C 、底物浓度不变、反应时间为 20 min 的条件下, 不同 pH 值对 Na^+ , K^+ -ATP酶活力的影响见图 1。可见, pH 值对该酶活力的影响较大, 其中在 $\text{pH} = 7.42$ 时酶活力最高, 因此设定其为反应的最佳 pH 值。

表 1 松油烯-4醇对淡色库蚊的毒力

Table 1 Toxicity of terpinen-4-ol against *C. pipiens*

回归方程 LC-P	LC ₅₀ /(mg/L)	KT ₅₀ /min	95% 置信限 95% Fiducial limit	X ² Chi square
Y = -0.2718 + 6.0299x	6.79	-	6.313~7.288	1.55
Y = -0.3656 + 6.3847x	-	6.92	6.352~7.548	2.67

注: $X_{0.05}^2 = 7.815$ 。若所测方程 X^2 小于该值则方程符合实际, 否则不符合。Note: Equation fit the fact unless the " X^2 " is less than 7.815

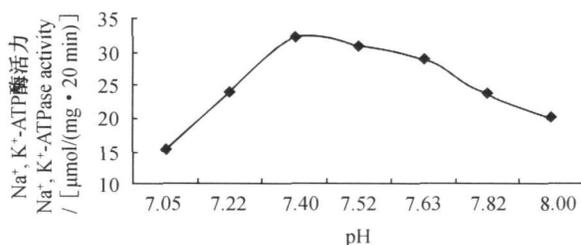
图 1 pH 对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响

Fig. 1 Effect of pH on Na⁺, K⁺-ATPase activity

2.2.2 温度对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响 在 pH 为 7.42 反应 20 min 的条件下, 不同温度对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响见表 2 可见在 20~45℃下, 酶活力随反应温度的升高呈现先升高后降低的现象, 最佳反应温度为 35.5℃。

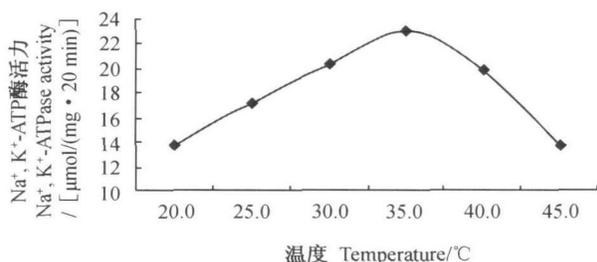
图 2 温度对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on Na⁺, K⁺-ATPase activity

2.2.3 底物浓度对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响

在 pH 7.42 反应温度为 35.5℃条件下, 不同 ATP 浓度对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响见图 3 结果表明: 在 ATP 浓度较低时, 随其浓度增加, 酶活力成线性增加; 当 ATP 浓度达到一定值时, 酶活力增加趋势变缓, 呈典型的米氏方程曲线。按 Lineweaver-Burk 作图法计算 Na⁺, K⁺-ATP 酶的 K_m 为 0.24 mmol/L, $V_{max} = 73.29 \mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot 20\text{min})$ 。故底物 ATP 浓度应大于 0.48 mmol/L, 但也不宜过高, 因在 ATP 过量时会抑制该酶的活性^[12]。经测定反应体系中最佳底物浓度为

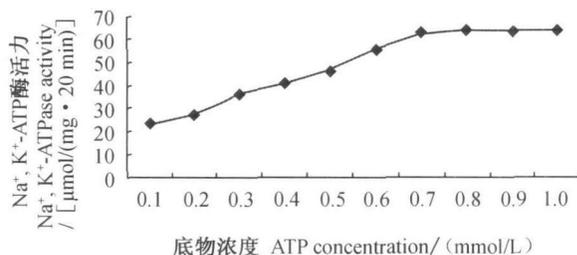
图 3 底物 ATP 浓度对 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响

Fig. 3 Effect of ATP concentration on Na⁺, K⁺-ATPase activity

0.7 mmol/L。

2.3 松油烯-4醇对 Na⁺, K⁺-ATP 酶的活体抑制

由表 2 可知, 松油烯-4醇对淡色库蚊体内 Na⁺, K⁺-ATP 酶具有显著的抑制作用: 以 LC₈₀ 剂量熏蒸处理 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 对该酶的抑制率分别是 20%、25%、40%、44%、52%。可见, 随着作用时间的延长, 松油烯-4醇对 Na⁺, K⁺-ATP 酶的抑制作用增强。

2.4 松油烯-4醇对 Na⁺, K⁺-ATP 酶的离体抑制

不同剂量松油烯-4醇对淡色库蚊 Na⁺, K⁺-ATP 酶活性的影响见表 3。结果表明, 随着松油烯-4醇剂量的增加, Na⁺, K⁺-ATP 酶比活力逐渐降低, 剂量与效应之间存在明显相关性。据表 3 结果计算出松油烯-4醇对淡色库蚊 Na⁺, K⁺-ATP 酶的抑制曲线方程为: $Y = 1.4529X + 1.8776$ ($r = 0.9964$), $I_{50} = 32.02 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

松油烯-4醇广泛存在于柏科、番荔枝科、唇形科、菊科、樟科等植物中, 原料易得, 也可人工合成^[1]。该化合物对人、畜及环境安全^[13, 14], 已有不少含松油烯-4醇的日用化学品问世, 如香水、香皂、牙膏、沐浴液等^[15]; 许多食用植物或食用香料的精油中均含有松油烯-4醇, 如肉桂、花椒、八角、姜、胡椒、柑桔等可食用香料中松油烯-4醇的含量均比较高。本研究表明, 松油烯-4醇对卫生害虫

表 2 松油烯-4醇对淡色库蚊 Na^+ , K^+ -ATP酶活性的影响(活体)Table 2 Effect of terpinen-4-ol on Na^+ , K^+ -ATPase activity in *C. pipiens* (in vivo)

处理时间 Treatment time /h	酶比活力 Specific activity / [$\mu\text{mol}/(\text{mg pro} \cdot 20 \text{ min})$]	抑制率 Inhibition rate (%)
CK	24.97 ± 0.49 a A	—
0.5	19.80 ± 0.36 b B	20.07
1.0	18.50 ± 0.50 c C	25.91
1.5	14.97 ± 0.46 d D	40.05
2.0	13.99 ± 0.35 e E	43.98
3.0	11.83 ± 0.55 f F	52.61

注: 表中数据为 3 次重复的平均值; 底物标准曲线为 $Y = 1.680x + 0.136$ ($r = 0.942$); 蛋白含量测定的标准曲线为: $Y = 0.005x + 0.016$ ($r = 0.995$); 酶比活力一栏中, 数据后面的小写(大写)字母相同表示在 $P = 0.05$ (0.01) 的水平上酶比活力差异不显著。表 3 同。

Note: Data are given as means \pm standard errors from 3 replication. The regression equation is $Y = 1.680x + 0.136$ ($r = 0.942$) and the regression equation of protein is $Y = 0.005x + 0.016$ ($r = 0.995$). Data in a column with the same small (capital) letters are not significantly different at $P_{0.05}$ ($P_{0.01}$). The same as Table 3.

表 3 松油烯-4醇对淡色库蚊 Na^+ , K^+ -ATP酶活性的影响(离体)Table 3 Effect of terpinen-4-ol on Na^+ , K^+ -ATPase activity in *C. pipiens* (in vitro)

处理剂量 Dose / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	酶比活力 Specific activity / [$\mu\text{mol}/(\text{mg pro} \cdot 20 \text{ min})$]	抑制率 Inhibition rate (%)
CK	40.21 ± 0.60 a A	—
6.23	34.11 ± 0.63 b B	15.16
10.38	30.07 ± 0.56 c C	25.21
14.53	27.81 ± 0.50 d D	30.83
20.76	23.90 ± 0.52 e E	40.55
24.91	22.81 ± 0.48 f F	43.27
29.01	21.57 ± 0.52 g G	46.34
33.21	18.77 ± 0.61 h H	53.32

淡色库蚊具有很好的熏蒸活性, 而前期研究发现其对家蝇 *M. domestica* 也具有较强的熏蒸作用^[3]。可见, 该化合物具备先导化合物的潜质, 也具备直接开发利用的条件, 因此对其进行深入研究有望开发出安全、高效的卫生害虫防治剂。

ATP酶是维持细胞膜两侧离子平衡与流动的动力, ATP酶活力受抑制或被激活均会引起细胞膜内外平衡和渗透压平衡被打破, 从而导致一系列的代谢紊乱。ATP酶的类型有 Na^+ , K^+ -ATP酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP酶、 H^+ -ATP酶等。 Na^+ , K^+ -ATP酶被显著抑制可导致试虫体内 Na^+ 离子流受到抑制, 水被吸收, Ca^{2+} 滞留, 引起各种谷氨酸盐及其他神经递质的释放, 于是机体迅速出现反应, 在很短的时间内表现出神经性的中毒症状, 故 Na^+ , K^+ -ATP酶抑制剂是神经毒剂^[16-17]。本研究发现, 松油烯-4醇对淡色库蚊熏蒸处理不同时间后, 能明显抑制 Na^+ , K^+ -ATP酶的活性, 结合前期研究结果: 松油烯-4醇对家蝇、粘虫 *M. separata*

的 Na^+ , K^+ -ATP酶均具有良好的抑制作用^[3, 4], 可以推测, Na^+ , K^+ -ATP酶可能是松油烯-4醇的作用靶标, 其杀虫机理可能与拟除虫菊酯类杀虫剂相似, 对此还需进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] CHEN Gen-qiang (陈根强). Studies on Insecticidal Activity of Terpinen-4-ol (砂地柏精油主成分松油烯-4醇杀虫作用研究 [D]. Yangling (杨凌): Northwest A & F Univ (西北农林科技大学), 2001.
- [2] CHEN Gen-qiang (陈根强), LI Guang-ze (李广泽), FENG Jun-tao (冯俊涛), et al. 松油烯-4醇对粘虫幼虫体壁结构的影响 [J]. J Northwest A & F Univ, Nat Sci Ed (西北农林科技大学学报, 自然科学版), 2003, 31(2): 67-70.
- [3] MA Zhi-qing (马志卿), ZHANG Xing (张兴). 松油烯-4醇对粘虫幼虫的生物活性 [J]. Acta Entomologica Sinica (昆虫学报), 2004, 47(3): 329-333.
- [4] MA Zhi-qing (马志卿), FENG Jun-tao (冯俊涛), ZHANG Xing (张兴). 松油烯-4醇对家蝇体内几种酶系的影响 [J]. Journal of Plant Protection (植物保护学报), 2004, 31: 284-

- 288.
- [5] JIANG Zhi-li(江志利), CHEN An-liang(陈安良), BAI Wei(白伟), et al. 六种植物精油对家蝇的熏蒸及触杀毒力测定 [J]. Chin J Pestic Sci(农药学报), 2002, 4(1): 85-88
- [6] LEE S. E. Fungicidal Toxicity of Volatile Natural Products from Korean Spices and Medicinal Plants towards the Rice Weevil *Sitophilus oryzae* (L.) [J]. Pest Management Science, 2001, 57(6): 548-553.
- [7] ABBOTT W. S. A Method of Computing the Effectiveness an Insecticide [J]. Journal of Economic Entomology, 1925, 18(2): 265-267.
- [8] FINNEY D. J. Probit Analysis [M]. London: Cambridge University Press, 1971.
- [9] FENG G. L., JACQUES R. M., CLARK J. M. Suppression of Pyrethroid-dependent Neurotransmitter Release from Synaptosomes of Knockdown-resistant House Flies under Pulsed-depolarization Condition During Continuous Perfusion [J]. Pesticide Biochemistry Physiology, 1992, 42(1): 64-77.
- [10] FENG Bei-yuan(冯北元), XU Mu-yu(徐慕禹). 大鼠脑突触体 Na^+ , K^+ ATP酶活力的微量测定方法 [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 1981, 8(2): 48-49.
- [11] BRADFORD M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing a Principle of Protein Dye Binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [12] QI Ming(祁鸣). Na^+ , K^+ -ATP酶的特性研究及其应用 [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展), 1986, (3): 22-26.
- [13] SOUTHWELL I. A., FREEMAN S., RUBEL D. Skin Irritancy of Tea Tree Oil [J]. Journal of Essential Oil Research, 1997, 9(1): 47-52.
- [14] HAYES A. J., LEACH D. N., MARKHAM J. L., et al. In vitro Cytotoxicity of Australian Tea Tree Oil to Human Cell Lines [J]. Journal of Essential Oil Research, 1997, 9(5): 575-582.
- [15] LEE Y. S. Antibacterial Makeup Beauty Soap Composition for Prevention and Treatment of Acne Republic Korea KR 9604499 B1 [P]. 1996-04-06
- [16] LENG Xin-fu(冷欣夫), TANG Zhen-hua(唐振华), WANG Yin-chang(王荫长). Molecular Toxicology of Insecticides and Insect Resistance(杀虫剂分子毒理学及昆虫抗药性) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1996
- [17] ZHAO Shan-huan(赵善欢). Insect Toxicology(昆虫毒理学) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1993

(Ed JIN SH)

• 会 讯 •

第一届国际作物保护科学大会

第一届国际作物保护科学大会将于 2009 年 9 月 28 日在上海光大会展中心召开, 大会主题为“农药科技与和谐社会”。主要内容包括:

1 作物保护: 全球农药市场发展趋势与预测; 全球农业作物病虫害发生发展趋势与治理技术新进展; 全球非农用农药市场发展情况; 中国农药市场情况。

2 新产品和新技术: 近两年全球农药新品种介绍 (BAYER /SYNGENTA /BASF/DOW 国内新品种开发); 中国专利过期产品开发情况; 新的农药应用技术。

3 环境科学与绿色化学合成: 无溶剂工艺技术的进展与趋势; 手性化合物合成研究。

4 环境毒理及其他: 农药新产品的环境评价极其发展对策; 环境友好型制剂的研究开发现状; 农药在环境中的行为评价 (土壤吸附、空气悬浮物中的吸附等); 表面活性剂对制剂应用的影响; 生物技术研究开发现状; 杂草的生物防治、微生物农药等; 农药生产过程中的节能减排与三废治理; 生物膜反应器在污水处理中的应用。

(敖聪聪 供稿)