

# 种生物碱对斜纹夜蛾离体培养细胞的作用方式

黄劲飞 贾建文 罗建军 翁群芳 钟国华\*\*

华南农业大学昆虫毒理研究室, 广州 510642

**摘要** 通过倒置显微镜观察斜纹夜蛾细胞凋亡小体,采用 MTT 法测定细胞增殖抑制作用,并使用流式细胞仪检测细胞周期时相,研究了骆驼蓬碱、喜树碱、蓖麻碱、苦参碱、博落回碱和烟碱对斜纹夜蛾离体培养细胞系 SL-1 的作用方式和细胞毒理。结果表明:骆驼蓬碱 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和喜树碱 0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、1.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$  处理后 48~60 h,斜纹夜蛾离体培养细胞系 SL-1 表现出明显的细胞凋亡诱导作用,处理后 12~48 h,明显抑制 SL-1 细胞增殖,流式细胞仪检测显示细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期;博落回碱和蓖麻碱 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对 SL-1 具有细胞增殖抑制作用,以 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理具有细胞周期时相阻滞作用,同样使细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期,但无明显的细胞凋亡诱导作用;烟碱和苦参碱在 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对 SL-1 具有细胞增殖抑制作用。

**关键词** 生物碱;斜纹夜蛾;细胞

**中图分类号** Q 962; S 482.3<sup>+</sup>9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0031-06

植物生物碱是植物与昆虫协同进化过程中形成的一大类具有防御功能的次生代谢物质,目前从植物中分离出的生物碱有 5 000~6 000 种,是寻找农业和医药活性物质的重要资源<sup>[1-6]</sup>。骆驼蓬碱对埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、家蝇(*Musca domestica*)、灰翅夜蛾(*Spodoptera littoralis*)、印度谷螟(*Plodia interpunctella*)、松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)、菜青虫(*Pieris rapae*)、斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)均表现出较强的毒杀、拒食、忌避和抑制生长作用;苦参碱已有多个商品化杀虫剂品种面世,可明显抑制小菜蛾(*Plutella xylostella*)乙酰胆碱酯酶活性,造成神经兴奋传导受阻;蓖麻碱对斜纹夜蛾、小菜蛾、菜青虫等均有不同程度的毒杀活性;博落回碱除具有杀虫作用外,还具有明显的杀螨、抑菌和杀螺作用。另外,植物源生物碱中还含有对多种恶性肿瘤具抑制作用的化合物,如喜树碱、苦参碱等。深入研究它们的活性和作用方式,可为寻找新型作用靶标提供重要参考模型。

笔者选择骆驼蓬碱、苦参碱、蓖麻碱、博落回碱、烟碱、喜树碱等 6 种植物源生物碱,比较了它们对斜纹夜蛾离体培养细胞系 SL-1 的细胞凋亡诱导、细胞增殖抑制和细胞周期干扰作用的差异,旨在为研究植物源生物碱对昆虫细胞的毒理作用和建立农药活

性物质的离体筛选体系提供科学依据。

## 材料与方法

### 供试材料

昆虫细胞系:供试细胞系为斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*) SL-1 细胞系,由笔者所在课题组采用常规方法培养获得。细胞培养所用培养基为 Grace's 昆虫干粉培养基(Gibco 公司产品)和热灭活胎牛血清(FBS, Gibco 公司产品)。

化合物:骆驼蓬碱(harmaline, 99%)购于 Sigma 公司;喜树碱(camptothecin, 99.64%)购于四川锦全天然产物有限公司;蓖麻碱(ricinine, 99%)由广州大学郑诚教授提供;苦参碱(matrine, 98%)由西安中鑫生物技术有限公司惠赠;烟碱(nicotine, 90%)由陕西天则生物技术有限责任公司惠赠;博落回碱(macleay cordata, 90%)由笔者所在实验室分离提纯。

氮蓝四唑盐(MTT)溶液:250 mg MTT 溶于 5 mL 磷酸缓冲液(PBS),0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌,4℃保存,2 周内使用。碘化丙啶(PI)染色液由 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI, 0.1% Triton X-100, 0.1 mmol/L EDTA, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase A 组配供试。

主要仪器:Plus 酶标仪,美国 Bio-RELD 公司产

收稿日期:2009-03-02;修回日期:2009-06-30

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

\*\*通讯作者。E-mail: guohuazhong@scau.edu.cn; guohuazhong@tom.com

黄劲飞,男,华南农业大学资源环境学院硕士研究生。研究方向:天然源农药。E-mail: huangjingfei1983@yahoo.com.cn

品; FACS-Calibr 流式细胞仪, 美国 Becton-Dickinson 公司产品; 倒置显微镜, Olympus 公司产品。

#### 细胞凋亡小体的检测

形态学变化是判断细胞凋亡最直接的依据, 其中凋亡小体的出现为初步判断凋亡与否的核心和典型生物标记物<sup>[7]</sup>。在预试验基础上, 为了更好地观察到典型的凋亡症状, 确定喜树碱供试质量浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  和 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 其它 5 种生物碱供试质量浓度为 5.0  $\mu\text{g/mL}$  和 20.0  $\mu\text{g/mL}$ 。

将上述 6 种供试生物碱适量溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中制备 1 000 倍终浓度的贮存液, 取 10  $\mu\text{L}$  溶于 990  $\mu\text{L}$  含 10% 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 1% DMSO 溶液。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下观察 (目镜 10  $\times$  物镜 20) 72 h, 记录细胞形态学变化, 以凋亡小体诱导效果作为主要衡量指标, 初步判断供试生物碱对 SL-1 细胞凋亡的诱导效果。

#### 细胞增殖抑制的测定

细胞增殖抑制作用测定采用 MTT 法<sup>[8-9]</sup>。药剂处理浓度同本文“1.2”。于 96 孔培养板中加 100  $\mu\text{L}$  处于对数生长期的 SL-1 细胞 (细胞数约 1.0  $\times 10^4$  个/mL), 待细胞贴壁后加药处理, 对照加含有 1% DMSO 的细胞培养液, 每个处理设 4 个重复, 分别于处理后 12 h、24 h、36 h、48 h 采用 MTT 法, 在 Plus 酶标仪于 490 nm 波长处测定吸收光值, 测定 6 种化合物对 SL-1 细胞增殖的抑制作用。

#### 细胞周期阻滞的测定

根据凋亡抑制的效果测定, 喜树碱处理终浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 其余 5 种化合物处理终浓度为 20.0  $\mu\text{g/mL}$ 。每个处理设 3 个重复。参照文献<sup>[10]</sup>的方法, 取以各种化合物分别诱导 12 h、24 h、36 h、48 h 的 SL-1 细胞 2  $\times 10^6$  个/mL, 离心后弃上清液, 用预冷的 10% PBS 悬浮细胞, 振荡同时加入预冷的乙醇固定。过夜后离心弃上清液, PBS 清洗后加入 PI 染液, 常温避光孵育 30 min 后, 直接使用 FACS-Calibr 流式细胞仪测定细胞周期时相分布并收集数据。

#### 数据处理

细胞凋亡诱导采用形态学方法观察记录, 细胞周期全部数据经 FACS-Calibr 流式细胞仪和

CellQuest 软件获取, 获得的数据用 CellQuest 软件和 ModFit TMV310 软件分析; 方差分析采用 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。

## 结果与分析

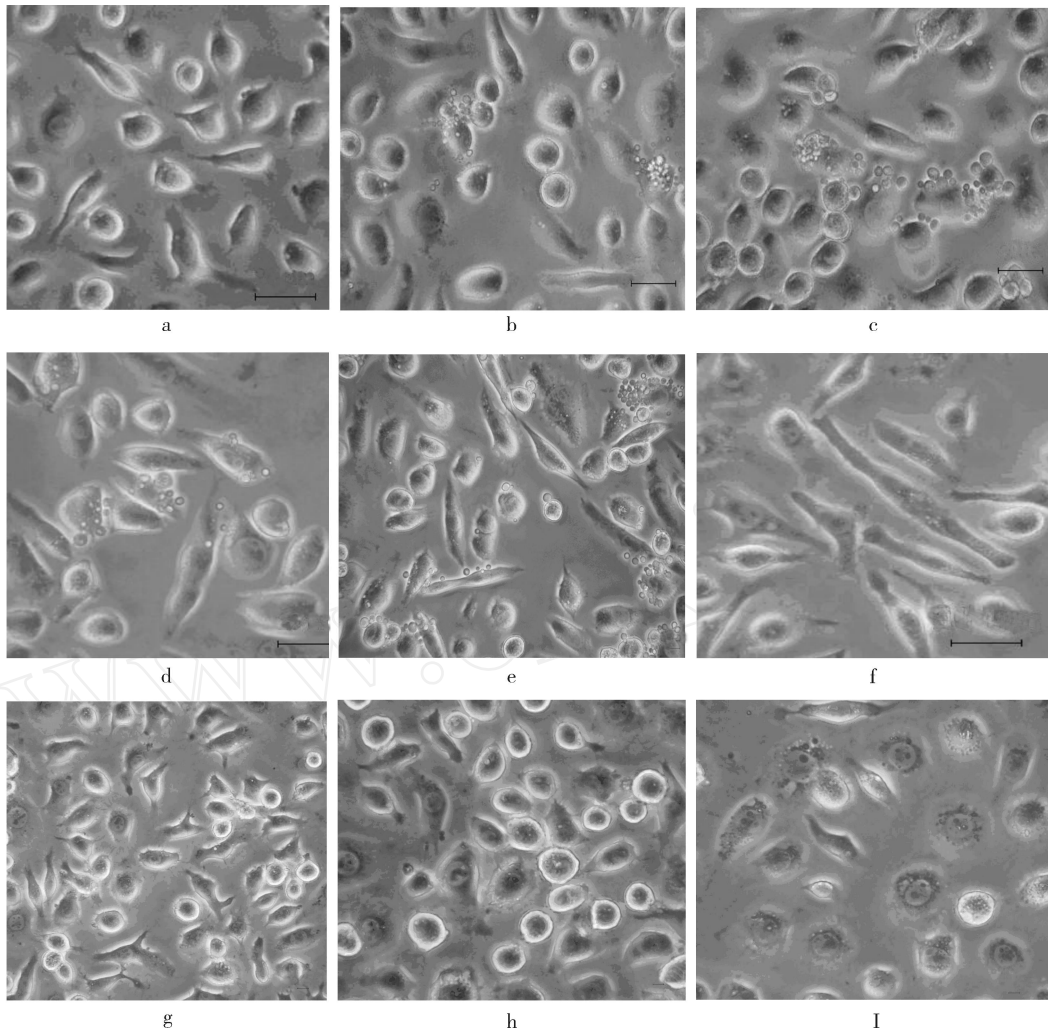
### 生物碱对 SL-1 细胞凋亡的诱导作用

根据倒置显微镜形态观察, 骆驼蓬碱 5.0  $\mu\text{g/mL}$  处理后 12 ~ 48 h, SL-1 细胞形态未发生明显变化, 与 CK 无明显区别 (图 1-b); 处理后 60 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; 当质量浓度提高到 20.0  $\mu\text{g/mL}$  时, 处理后 48 h 即可观察到细胞皱缩、细胞核偏移、出泡或细胞核消失现象, 明显可见凋亡小体, 凋亡小体多数分散在正常形态细胞周围, 但也有部分凋亡小体扩散分布在培养液中 (图 1-c); 处理后 60 h 与 48 h 效果差异不明显。喜树碱 0.5  $\mu\text{mol/L}$  处理 SL-1 后 12 ~ 48 h, 细胞形态同样未发生明显变化, 与 CK (图 1-a) 无明显区别, 至 60 h 出现明显凋亡小体 (图 1-d); 质量浓度提高到 1.0  $\mu\text{mol/L}$  处理 24 h 即可观察到细胞皱缩、细胞核偏移、出泡或核膜界限模糊现象, 48 h 后可见明显大量凋亡小体 (图 1-e), 初步认为骆驼蓬碱和喜树碱能诱导 SL-1 细胞凋亡。

蓖麻碱、苦参碱、博落回碱、烟碱在质量浓度为 5.0  $\mu\text{g/mL}$  和 20.0  $\mu\text{g/mL}$  处理至 72 h 均未见明显的凋亡小体等细胞凋亡典型特征, 故可初步判断质量浓度为 5.0 ~ 20.0  $\mu\text{g/mL}$  时对 SL-1 无细胞凋亡诱导作用。但在倒置显微镜下, 这些生物碱处理后不仅无明显增殖, 且均与 CK 细胞有一定的密度差异或形态差异, 如烟碱处理细胞密度明显降低, 蓖麻碱处理细胞形态拉长, 苦参碱和博落回碱处理细胞有进一步浓缩趋势, 漂浮细胞数量增加明显。这说明 4 种生物碱可能是通过其它途径发挥细胞毒杀作用。

### 生物碱对 SL-1 细胞增殖的抑制作用

为进一步研究供试生物碱对 SL-1 的细胞毒理机制, 测定了其对 SL-1 的细胞增殖抑制作用。结果表明, 供试 6 种生物碱对 SL-1 均有一定的细胞增殖抑制作用 (表 1), 其中喜树碱 1.0  $\mu\text{mol/L}$  和烟碱 20.0  $\mu\text{g/mL}$  处理 48 h 后的细胞增殖抑制率分别为 30.72% 和 26.04%, DMRT 法统计分析表明均显著高于其它处理的抑制率。骆驼蓬碱、苦参碱、蓖麻碱和博落回碱在供试质量浓度为 5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、20.0



a. 对照 Control (CK); b. 骆驼蓬碱 Harmaline 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  60 h; c. 骆驼蓬碱 Harmaline 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  60 h;  
 d. 喜树碱 Camptothecin 0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  60 h; e. 喜树碱 Camptothecin 1.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$  60 h;  
 f. 蓖麻碱 Ricinine 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  72 h; g. 苦参碱 Matrine 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  72 h;  
 h. 博落回碱 Macleay cordata 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  72 h; i. 烟碱 Nicotine 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  72 h.

图 1 倒置显微镜观察骆驼蓬碱等 6 种植物源生物碱对 SL-1 的细胞凋亡诱导作用 (10  $\times$ 20)

Fig. 1 SL-1 cells apoptosis induced by 6 tested botanical alkaloids including harmaline, observed by inverted phase contrast microscope (10  $\times$ 20)

$\mu\text{g}/\text{mL}$  的最高抑制率均为 15% ~ 19%, 统计分析表明差异不显著。各处理的抑制高峰略有差异, 喜树碱、骆驼蓬碱、苦参碱和烟碱抑制效果均与浓度和时间呈正相关, 高浓度的抑制效果高于低浓度, 处理后 48 h 达到抑制高峰期, 而博落回碱和蓖麻碱则在处理后 36 h 达到最高抑制率。

#### 生物碱对 - 细胞周期的阻滞作用

骆驼蓬碱等 6 种供试植物源生物碱处理后 12 h、24 h、36 h、48 h 对 SL-1 细胞周期时相分布的影响见图 2。

根据流式细胞仪测定结果, 可将供试 6 种生物碱分成 3 类: 第 1 类是喜树碱, 以 1.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$  处理

的 G0/ G1 期细胞比例极少在 0.25% 以下, 随着处理时间延长, S 期细胞比例由 48.58% 不断下降到 12.58%, G2/ M 期细胞比例由 51.17% 激增到 87.12%; 第 2 类是博落回碱、骆驼蓬碱和蓖麻碱, 3 种化合物以 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理后 12 ~ 48 h, G0/ G1 期细胞比例一直低于 CK (博落回碱处理为 3% ~ 13%, 骆驼蓬碱和蓖麻碱处理为 5% ~ 8%), S 期细胞比例则在处理后 12 h 起一直保持 26% ~ 40% (除骆驼蓬碱处理后 12 h 的比例为 47.62%), 但 G2/ M 期细胞比例则为 51% ~ 70% (除骆驼蓬碱处理后 12 h G2/ M 期细胞比例为 46% 外), 均显著高于 CK

表 1 骆驼蓬碱等 6 种植物源生物碱处理对 SL-1 细胞增殖的抑制作用<sup>1)</sup>

Table 1 Inhibition of SL-1 cells proliferation induced by 6 tested botanical alkaloids including harmaline investigated by MTT

化合物及浓度 Chemicals and concentration	增殖抑制率 Inhibition rate of cell proliferation/ %			
	12 h	24 h	36 h	48 h
低浓度处理 Treated with low concentration				
喜树碱 Camptothecin (0.5 μmol/L)	4.50 ±0.78 b	5.02 ±0.41 b	12.34 ±0.59 b	27.30 ±0.08 a
骆驼蓬碱 Harmaline(5.0 μg/ mL)	1.79 ±0.32 cd	3.86 ±0.26 b	10.83 ±0.10 c	6.51 ±0.72 d
蓖麻碱 Ricinine(5.0 μg/ mL)	0.76 ±0.11 e	3.00 ±0.30 b	11.85 ±0.39 bc	7.86 ±0.55 d
苦参碱 Matrine(5.0 μg/ mL)	2.95 ±0.33 c	3.86 ±0.16 b	8.46 ±0.38 cd	12.08 ±0.63 c
烟碱 Nicotine(5.0 μg/ mL)	7.18 ±0.25 a	14.75 ±0.52 a	16.61 ±0.16 a	18.54 ±0.18 b
博落回碱 Macleay cordata(5.0 μg/ mL)	1.16 ±0.35 d	3.65 ±0.20 b	6.05 ±0.13 d	15.74 ±0.44 bc
CK	0.65 ±0.05	0.68 ±0.08	0.72 ±0.05	0.75 ±0.01
高浓度处理 Treated with high concentration				
喜树碱 Camptothecin(1.0 μmol/L)	7.38 ±0.97 ab	12.21 ±0.08 bc	18.90 ±0.13 b	30.72 ±0.35 a
骆驼蓬碱 Harmaline (20.0 μg/ mL)	8.65 ±0.76 a	13.37 ±1.10b	15.08 ±0.87 bc	10.43 ±0.66 e
蓖麻碱 Ricinine(20.0 μg/ mL)	6.30 ±0.34 c	5.46 ±1.00 d	16.16 ±0.22 bc	12.95 ±0.77 d
苦参碱 Matrine(20.0 μg/ mL)	7.02 ±0.11 b	7.76 ±0.13 d	12.29 ±0.79 c	16.87 ±0.90 cd
烟碱 Nicotine(20.0 μg/ mL)	8.53 ±0.39 a	17.00 ±0.56 a	24.21 ±0.19 a	26.04 ±0.06 b
博落回碱 Macleay cordata(20.0 μg/ mL)	3.23 ±0.63 c	10.47 ±0.92 c	16.62 ±0.35 bc	19.24 ±0.15 c
CK	0.67 ±0.03	0.71 ±0.04	0.73 ±0.04	0.76 ±0.05

1)表中数据为 4 个重复的平均值,CK 结果为平均 OD 值; 同列数据后标有相同字母者表示在 5 %水平差异不显著 (DMRT 法)。  
The data in the table is mean values of four replicates and in CK is the mean of the OD values; Means within a column in low or high concentration group followed by a common letter are not significantly different at P=0.05 (DMRT).

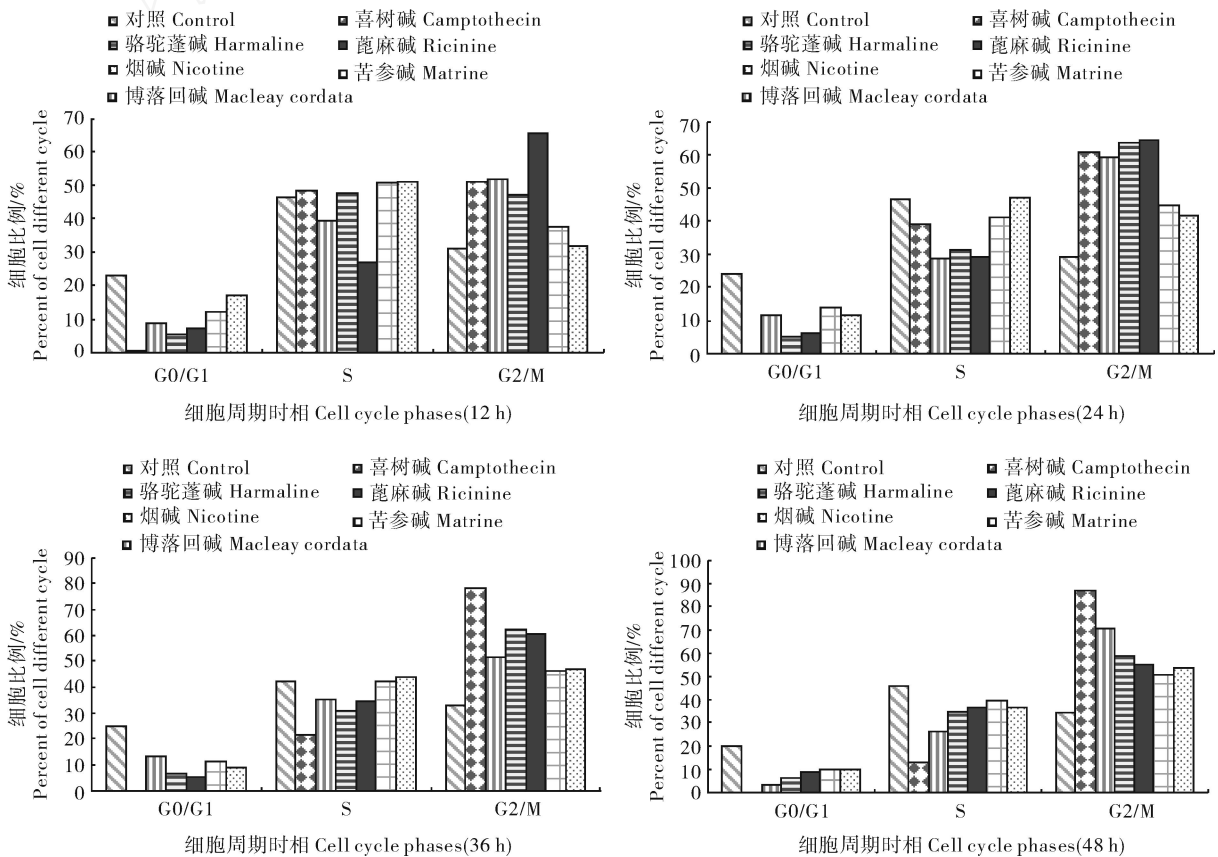


图 2 骆驼蓬碱等 6 种植物源生物碱对 SL-1 的细胞周期时相的阻滞作用  
Fig. 2 SL-1 cell cycles phases arrest induced by 6 tested botanical alkaloids including harmaline investigated by flow cytometric

细胞 G2/M 期 29% ~ 34% 的比例;第 3 类是苦参碱和烟碱,同样都以 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  处理 12 ~ 48 h, G0/G1 期细胞比例一直保持在 9% ~ 17%, S 期细胞比例稳定在 36% ~ 50%, 而 G2/M 期细胞的比例则显著低于其它 4 种生物碱处理,与 CK 差异不显著或较为接近。结果表明,供试的喜树碱、博落回碱、骆驼蓬碱、蓖麻碱均可显著影响 SL-1 细胞周期时相分布,集中表现为 G0/G1 期细胞比例下降, G2/M 期细胞比例上升,而 S 期细胞变化相对较小。

## 讨 论

近年来国内外关于各种内源和外源物质对昆虫细胞活性的研究渐多<sup>[10-14]</sup>,但植物源生物碱对昆虫的细胞活性和毒理的研究较少。笔者研究了骆驼蓬碱、喜树碱等 6 种植物源生物碱对 SL-1 的细胞凋亡诱导、细胞增殖抑制和细胞周期时相阻滞作用,初步认为骆驼蓬碱和喜树碱对昆虫细胞 SL-1 能够抑制细胞增殖,具有细胞凋亡诱导作用,使细胞阻滞于 G2/M 期;博落回碱和蓖麻碱对 SL-1 具有细胞增殖抑制作用和细胞周期时相阻滞作用,同样使细胞阻滞于 G2/M 期;烟碱和苦参碱对 SL-1 具有细胞增殖抑制作用。这些结果为研究植物源生物碱对昆虫活性的多样性及其杀虫作用的细胞毒理提供了有益参考,亦为今后根据不同作用方式建立筛选模型提供了参考依据。

不同生物碱对昆虫的细胞凋亡诱导作用及其机理不同。喜树碱是传统的抗癌药物,作为一种拓扑异构酶 (topoisomerase) 的抑制剂,可通过诱导多种恶性肿瘤细胞凋亡而具有较好疗效<sup>[3-6]</sup>。本试验结果证实,喜树碱只需要 0.5 ~ 1.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$  (即 0.175 ~ 0.350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 即可诱导 SL-1 表现出明显的细胞凋亡诱导作用。这些结果与以前的研究报道完全一致<sup>[15-16]</sup>。当然,在本试验中喜树碱更多是起到参比药剂的作用。与之相比,骆驼蓬碱需要 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  才明显有诱导细胞的凋亡效应。尽管两者都可产生细胞凋亡诱导作用,同时亦有细胞增殖抑制作用,但通过比较细胞周期时相可知,两者对细胞周期时相的阻滞作用差异很大。喜树碱对癌细胞的细胞周期时相的阻滞作用不同文献的报道结论不同,主要包括阻滞于 G0/G1 期<sup>[5-6]</sup> 或阻滞于 G2/M 期 2 种结论,或者说是因剂量高低而产生 2 种性质不同的作用<sup>[17]</sup>。本试验结果则说明喜树碱作用于 SL-1 时, G0/G1 期、S 期比例下降,

G2/M 期的累积。骆驼蓬碱虽然也是降低 G0/G1 期、S 期细胞比例,显著增加了 G2/M 期细胞比例,但仔细分析两者的阻滞作用,仍然存在差异,即 1.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$  喜树碱是随着处理时间延长渐进地提高 G2/M 期细胞比例,而 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  骆驼蓬碱(包括博落回碱和蓖麻碱)则是处理后 12 h 即达到 G2/M 期细胞含量的高峰,直至处理后 48 h 内虽然略有变动,但变化远不如喜树碱处理。这是由于剂量的差异,或者是由于两者的凋亡信号转导通路的差异,或者是对周期蛋白作用差异所致或者是其他原因,仍有待今后进一步深入研究,而且骆驼蓬碱分子结构相当简单,进一步改造的余地很大,也许有希望作为昆虫细胞凋亡诱导化合物而深入研究。

苦参碱和烟碱对昆虫细胞的作用方式令人深感兴趣。近年来医学研究发现,苦参碱具有一定的诱导肿瘤细胞分化和抑制端粒酶活性的作用,能抑制多种癌细胞增殖,引起癌细胞发生 G0/G1 期或 S 期阻滞<sup>[18-19]</sup>。而烟碱作为传统的植物源杀虫剂,主要作用于烟碱型乙酰胆碱受体,干扰昆虫神经系统的刺激传导,引起神经通路阻塞,导致昆虫急性中毒死亡。

本试验结果表明,烟碱和苦参碱均对 SL-1 细胞具有较好增殖抑制作用,尤其是烟碱的增殖抑制效果仅次于喜树碱,但均无细胞凋亡诱导效果,对周期时相的阻滞作用亦不是很明显。对于烟碱,或许可以从其作用机理上推测其对昆虫细胞的主要作用是急性致死作用(这也与其处理后细胞死亡率较高的现象相符),但苦参碱对细胞凋亡诱导、细胞周期时相的阻滞作用结果与文献报道不符,其原因仍有待于深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 周琳. 植物生物碱的杀虫作用及应用[J]. 河南林业科技, 2007, 27(1): 32-36.
- [2] 翁群芳, 钟国华, 丘麒, 等. 28 种植物提取物对松材线虫的毒杀作用[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(5): 459-464.
- [3] 程东美, 张志祥, 胡美英, 闹羊花素- 对斜纹夜蛾幼虫的作用方式及血糖含量的影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(3): 306-309.
- [4] 延静, 谢令德, 杨长举, 等. 水菖蒲提取物对 4 种储粮害虫的生物活性[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(5): 515-517.
- [5] 钟冰, 任建中, 慈爱萍. 拓扑异构酶抑制剂作用机制及临床应用[J]. 山东医药, 2005, 45(20): 47-48.
- [6] 江颖娟, 曾耀英, 肇静娴, 等. 喜树碱对小鼠 T 淋巴细胞活化、增殖以及细胞周期的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24

- (6):1178-1182.
- [7] 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.
- [8] 程东美,张志祥,胡美英. 闹羊花素-对斜纹夜蛾细胞系的活性及作用机理[J]. 昆虫学报,2007,50(10):1022-1026.
- [9] 郑露,朱海,郭爱珍,等. 西加毒素细胞毒性检测方法的建立[J]. 华中农业大学学报,2007,26(4):502-506.
- [10] LERY X, CHARPENTIER G, BELLONCIK S. DNA content analysis of insect cell lines by flow cytometry[J]. Cytotechnology,1999,29:103-113.
- [11] LUO K J, PANG Y. Spodoptera litura multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis[J]. Journal of Insect Physiology, 2006,52(8):795-806.
- [12] FFRENCH-CONSTANT R H, DOWLING A, WATERFIELD N R. Insecticidal toxins from *Photorhabdus bacteria* and their potential use in agriculture[J]. Toxicon,2007,49(4):436-445.
- [13] LIU L J, PENG J X, LIU K Y, et al. Influence of cytochrome c on apoptosis induced by *Anagrapha (Syngrapha) falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus in insect *Spodoptera litura* cells[J]. Cell Biology International,2007,31(9):996-1001.
- [14] ZHONG G H, HU M Y, WEI X Y, et al. Grayanane diterpenoids from the flowers of *Rhododendron molle* with cytotoxic activity against a *Spodoptera frugiperda* cell line[J]. Journal of Natural Products,2005,68(6):924-926.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] ZHOU Y, GWADRY F G, REINHOLD W C, et al. Transcriptional regulation of mitotic genes by camptothecin-induced DNA damage: microarray analysis of dose- and time-dependent effects[J]. Cancer Res,2002,62(6):1688-1695.
- [18] 何松,左国庆,张燕,等. 苦参碱对肝癌细胞 Hep G2 端粒酶活性调控的体外研究[J]. 重庆医学,2008,37(3):291-292,295.
- [19] 范临夏,陶晓南,蔡曦光,等. 苦参碱诱导 A549 细胞凋亡的机制研究[J]. 第四军医大学学报,2007,28(15):1359-1362.

## Modes of Action of Six Different Botanical Alkaloids against *Spodoptera litura* Cultured Cell Line SL-1

HUANG Jin-fei JIA Jian-wen LUO Jian-jun WENG Qun-fang ZHONG Guo-hua

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

**Abstract** In order to determine and contrast the mode of action and cell toxicity mechanism of six botanical alkaloids (namely, harmaline, camptothecin, ricinine, matrine, macleay cordata and nicotine) against insect cell line, the apoptotic bodies, the inhibition of cell proliferation and the cell cycle phases were investigated by inverted phase contrast microscope, MTT test, and flow cytometry, respectively. The results showed that obvious apoptotic bodies appeared in *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1 after 48~60 h treatments with harmaline at concentrations of 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  or camptothecin at concentrations of 0.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  and 1.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . 12~48 h after the same treatments, it showed obvious inhibition of cell proliferation and G2/M arrest of SL-1. It also showed that similar inhibitive effect on cell proliferation and G2/M arrest on SL-1 cell line after the treatments with macleay cordata alkaloid and ricinine at the concentrations of 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively, but no obvious apoptosis induction. The only significant SL-1 cell line proliferation inhibition was got after the treatment with nicotine and matrine at the concentrations of 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 20.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . These results provided some valuable information to the investigation of the diversity of activities of botanical alkaloids against insect pests and their cell toxicity mechanism.

**Key words** botanical alkaloids; *Spodoptera litura*; cell

(责任编辑:陈红叶)