

# 表皮穿透和 GABA<sub>A</sub> 受体不敏感性在小菜蛾对阿维菌素抗性中的作用

吴青君<sup>1</sup>, 张文吉<sup>2</sup>, 张友军<sup>1</sup>, 徐宝云<sup>1</sup>, 朱国仁<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 中国农业大学应用化学系, 北京 100094)

**摘要:** 用氚标记阿维菌素点滴处理阿维菌素敏感 (ABM-S) 和抗性 (ABM-R) 种群小菜蛾幼虫, 结果显示, 在 5 ~ 360 min 内的 7 个不同处理时间, ABM-R 种群的平均表皮穿透量比 ABM-S 种群少 1.5 倍, 处理 24 h 后, ABM-R 种群仍有 45.9% 的 <sup>3</sup>H-阿维菌素滞留于体表, 而 ABM-S 种群却有 98.4% 的药剂穿透表皮。放射配体结合分析表明, GABA<sub>A</sub> 受体结合性质的改变是小菜蛾对阿维菌素的另一抗性机制, ABM-S 种群 ( $K_d = 10.9368 \pm 0.4374$  nmol/L) 和 ABM-R 种群 ( $K_d = 9.8328 \pm 0.3933$  nmol/L) 的受体亲和力无显著差异, 但抗性种群的最大结合量 ( $B_{max} = 71.2842 \pm 4.9910$  fmol/mg 蛋白) 比敏感种群 ( $B_{max} = 112.0255 \pm 7.8418$  fmol/mg 蛋白) 降低 63.6%, 即抗性是受体数目的减少而非结构上的改变。

**关键词:** 小菜蛾; 阿维菌素; 抗药性; 表皮穿透作用; GABA<sub>A</sub> 受体

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2002) 03-0336-05

## Cuticular penetration and desensitivy of GABA<sub>A</sub> receptor in abamectin resistant *Plutella xylostella* L.

WU Qing-Jun<sup>1</sup>, ZHANG Wen-Ji<sup>2</sup>, ZHANG You-Jun<sup>1</sup>, XU Bao-Yun<sup>1</sup>, ZHU Guo-Ren<sup>1</sup> (1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** The dynamics of topically applied <sup>3</sup>H-abamectin to the fourth instar larvae was compared between the ABM-S and ABM-R strains. The results showed that during the period of 5 to 360 minutes, the number of <sup>3</sup>H-abamectin penetrated the cuticular of ABM-R strain was 1.5-fold reduction to that of ABM-S strain. Treatment after 24h, the extraneous <sup>3</sup>H-abamectin still remained 45.9% in the ABM-R strain. While in the ABM-S strain, there was 98.4% of the <sup>3</sup>H-abamectin penetrated the cuticular. Radioligand binding assay indicated that the change of GABA<sub>A</sub> receptor binding was also involved in abamectin resistance. Scatchard assay showed that there was no significant difference or receptor affinity between the ABM-S strain ( $K_d = 10.9368 \pm 0.4374$  nmol/L), and the ABM-R strain ( $K_d = 9.8328 \pm 0.3933$  nmol/L). However, the maximum number of GABA<sub>A</sub> receptor was decreased 63.6% in the ABM-R strain ( $B_{max} = 71.2842 \pm 4.9910$  fmol/mg protein) compared with the ABM-S strain ( $B_{max} = 112.0255 \pm 7.8418$  fmol/mg protein). Therefore, the change of GABA<sub>A</sub> receptor binding was caused by the reduction of receptor number, not the change of its molecular structure.

**Key words:** *Plutella xylostella*; abamectin; resistance; cuticular penetration; GABA<sub>A</sub> receptor

阿维菌素是大环内酯类生物源农药, 主要作用于  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 门控的氯离子通道, 即 GABA<sub>A</sub> 受体, 它具有高效、安全、环境相容性好等特点, 是目前防治抗性小菜蛾的首选药剂之一。但据报道, 马来西亚的田间小菜蛾种群已对阿维菌

素产生 17 ~ 195 倍抗性 (Iqbal *et al.*, 1996), 增效剂试验表明抗性与 2 ~ 3 种解毒酶系有关 (Iqbal and Wright, 1997)。我国虽未有田间小菜蛾对阿维菌素产生明显抗性的报道, 但利用室内敏感种群进行抗性风险评估, 对敏感和抗性种群的生物适合度、交

互抗性谱、抗性生理生化机制及遗传特性等已进行了研究(李腾武等, 2000a, 2000b; 吴青君等, 2000, 2001), 但未涉及表皮穿透和靶标抗性机理。表皮穿透作用是杀虫剂一项重要的药理动力学性质, 穿透作用降低也是昆虫抗性的重要防御机制之一。小菜蛾对阿维菌素的抗性是多种因素综合作用的结果, 除代谢抗性外, 可能还有其他的因素参与抗性。Iqbal 等(1996)的研究显示, 用高剂量药剂处理小菜蛾幼虫, 结果阿维菌素抗性幼虫对其内寄生蜂具有明显的保护作用, 这表明小菜蛾对阿维菌素的抗性可能与表皮穿透作用降低有关。

放射配体结合分析技术是研究膜受体的主要手段之一, 它是建立在放射性标记配体和受体间的理化结合反应, 通过反应给出一定量靶组织或靶细胞中能配体结合的受体数。同时通过多点测量, 经数据处理给出受体的亲和力, 因此可以定量定性地对受体分子的结合特性作出综合评价。作用于 GABA<sub>A</sub> 受体的杀虫剂还包括因环境问题而已淘汰使用的多氯环烷烃类化合物, 在已报道的 500 多种抗性害虫中, 该类杀虫剂的抗性种群占 60% 以上(Georghiou, 1986)。大量的实验证实, 环戊烯类杀虫剂的主导抗性机制是神经系统敏感性的降低, 即配体对 GABA 受体的识别特性发生了改变。阿维菌素在小菜蛾及其他顽固性害虫的防治和抗性治理中发挥着重要的作用, 其作用位点是否因抗性而发生改变目前尚未见相关报道。

本实验用同位素标记的阿维菌素对昆虫表皮的穿透作用和阿维菌素的作用位点——GABA<sub>A</sub> 受体进行了分析研究, 并对其抗性治理进行了讨论。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试昆虫

相对敏感种群 (ABM-S): 1990 年采自深圳市田间, 于室内连续饲养至今, 未接触任何药剂。抗性种群 (ABM-R): 用 1.8% 害极灭乳油 (abamectin) (有效成分为阿维菌素, 美国默沙东农药公司) 对 ABM-S 种群小菜蛾汰选而得。用药 19 次后, 与相对敏感种群相比, 抗性指数为 452.9。

### 1.2 供试药剂和试剂

阿维菌素 (AVMB1) 由中国农业大学应用化学系王道全教授提供, 纯度为 96%。<sup>3</sup>H-阿维菌素由中国农业科学院原子能研究所制备, 利用放电爆射法不定位氚标记阿维菌素, 比活度为 19.57 Ci/

mmol, 放化纯度大于 95%。2, 5-二苯基噁唑 [2, 5-Diphenyloxazole (PPO)], Fisher 公司; 1, 4-二-(5-苯基) 噁唑基-苯 [1, 4-Bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene (POPOP)], BDH 公司; 曲拉通 X-100 (Triton X-100), Farco 公司; Hepes 生物缓冲剂 [4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸], Sigma 公司; 聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, Sigma) 公司; 玻璃纤维滤纸 (GF/B), Whatman 公司。

闪烁液的配制: 700 mL 二甲苯 + 5.0 mg PPO + 0.5 mg POPOP + 300 mL Triton X-100。

### 1.3 表皮穿透作用的测定

取大小一致的小菜蛾 4 龄幼虫 (48 h), 放入  $\phi 25 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$  的称量瓶中, 记录编号。以乙醚轻度麻醉后, 用 Burkard 自动点滴仪将 0.2  $\mu\text{L}$  的<sup>3</sup>H-阿维菌素点滴于虫体胸部背面, 其受药量为 0.8 ng/头, 此剂量下幼虫不表现任何中毒症状。每组处理 5 头, 重复 4 次, 试验共进行 4 次。分别于处理后 1/30、1/12、1/4、1/2、1、2、4、6 和 24 h, 用 2 mL 丙酮分 4 次振荡冲洗虫体, 将冲洗液合并转入洁净闪烁瓶中, 加 10 mL 闪烁液。

经丙酮冲洗后的虫体需消化, 以确定穿透表皮的放射量及引入虫体的总放射量。具体方法是在装有丙酮冲洗后虫体的称量瓶中加入 0.5 mL 高氯酸和 0.5 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 盖上瓶盖后编号, 用封口膜将瓶口封闭严密, 然后在 70~80℃ 水浴中消化至虫体呈透明状 (约 8 h), 在室温下逐渐使其冷却。将消化液转移至洁净闪烁瓶中, 用 10 mL 闪烁液分 5 次仔细冲洗称量瓶盖及其内壁, 将闪烁液的总体积补充至 15 mL。

在室温下暗化至少 16 h 后, 于 FJ-2101 型双道液体闪烁计数器上计数。猝灭校正曲线采用道比法。

### 1.4 受体结合实验

采用放射配体结合分析法, 参照 Konno 和 Scott 的方法 (1991)。

1.4.1 受体膜制备: 取 ABM-S 和 ABM-R 种群小菜蛾 4 龄幼虫 (48 h), 用 50 mmol/L pH 7.4 的 Hepes 缓冲液冰浴匀浆, 在 0~4℃ 先用 1 000  $\times g$  离心 5 min, 弃下层沉淀, 上清液再在 69 000  $\times g$  离心 40 min, 弃上清液, 沉淀部分用 Hepes 缓冲液悬浮。蛋白质浓度测定采用考马斯亮蓝染色法 (Bradford, 1976), 使蛋白质含量约 1.0 mg/mL。

1.4.2 结合饱和和实验: 取膜制备液 1.0 mL, 与不同浓度的<sup>3</sup>H-阿维菌素 (终浓度为 1.1561~23.1214 nmol/L) 在 22℃ 下孵育 45 min (总结合管), 非特

异结合管中加入终浓度为 3.16  $\mu\text{mol/L}$  未标记的阿维菌素, 每浓度重复 4 次。反应液通过 Whatman GF/B 玻璃纤维滤膜快速过滤 (滤膜先用 0.15% 的聚乙烯亚胺和 0.5% 的 Triton X-100 浸泡), 再用 15 mL ( $3 \times 5$  mL) 冰冷的 HEPES 缓冲液 (含 0.25% 的 Triton X-100) 冲洗滤膜。滤膜置于 80 $^{\circ}\text{C}$  烘箱中烘 30 min 后置于 10 mL 闪烁液中, 避光稳定至少 16 h 后, 用液体闪烁计数器测定滤膜上的放射量。

**1.4.3 计算和作图:** 结合量 ( $B$ ) (单位: fmol/mg 蛋白) 的计算公式为:

$$B = \frac{\text{特异结合 (cpm)}}{\text{效率 (\%)}} \times \frac{\ln Ci}{2.22 \times 10^3 \text{ dpm}} \times \frac{1}{\text{比放射性 (Ci/mmol)}} \times \frac{1}{\text{mg 蛋白}}$$

特异结合 = 总结合 - 非特异结合

以标记配体的浓度为横坐标,  $B$  为纵坐标作饱和曲线。以  $B$  为横坐标,  $B/F$  为纵坐标, 即得 Scatchard 图, 求出平衡解离常数 ( $K_d$ ) 和受体的最大结合量 ( $B_{\text{max}}$ )。F 为反应后反应体系中游离的配基浓度, 多以 nmol/L 表示。经反复测试, 反应体系中未被结合的游离标记配基数与原所加入标记配基的终浓度相差无几, 故计算时未作校正。所加入标记配基的总放射量测定方法为: 将各所需标记配基量直接加到闪烁液中, 然后作放射性测量。

## 2 结果与分析

### 2.1 穿透作用

用 $^3\text{H}$ -阿维菌素处理后, 不同时间内 ABM-S 和 ABM-R 种群幼虫体表残留的药剂相对百分率如图 1 所示。可以看出,  $^3\text{H}$ -阿维菌素对 ABM-S 和 ABM-R 种群小菜蛾幼虫体表残留的 $^3\text{H}$ -阿维菌素均随处理时间的增加而逐渐降低。在最初 2 min,  $^3\text{H}$ -阿维菌素对 ABM-S 和 ABM-R 种群的穿透无显著差异, 穿透率分别达 20.1% 和 18.2%, 表现较强较快的穿透特性。而随处理时间的延长,  $^3\text{H}$ -阿维菌素的穿透量增加较为平缓, 6 h 后 ABM-S 和 ABM-R 种群的穿透量分别为 60.0% 和 44.8%。在 5 ~ 360 min 内的 7 个不同处理时间, 穿透作用表现出明显的种群差异, ABM-R 种群的平均穿透量比 ABM-S 种群少 1.5 倍。处理 24 h 后, ABM-R 种群仍有 45.9% 的标记阿维菌素滞留于体表, 而 ABM-S 种群则有 98.4% 的药剂透过表皮, 仅剩余 1.6%。这说明 ABM-R 种群表皮穿透作用的降低可能是主要的抗

性机制之一。

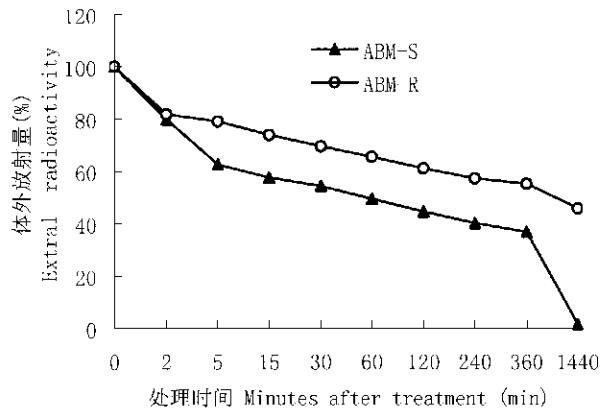


图 1 点滴 $^3\text{H}$ -阿维菌素对敏感和抗性种群小菜蛾的穿透作用

Fig. 1 Penetration of  $^3\text{H}$ -abamectin topically applied to the ABM-S and ABM-R strains of *P. xylostella*

### 2.2 受体结合

$^3\text{H}$ -阿维菌素对 ABM-S 和 ABM-R 种群小菜蛾生物膜  $\text{GABA}_A$  受体的结合饱和曲线见图 2。可以看出, 在相同的 $^3\text{H}$ -阿维菌素浓度下, ABM-R 种群的结合量普遍低于 ABM-S 种群, 而且随标记药剂浓度的提高差异性增大。ABM-S 种群的饱和和特异结合是 ABM-R 种群的 1.56 倍。因此, ABM-R 种群的  $\text{GABA}_A$  受体结合因抗性而发生了改变, 可能是亲和力的降低或受体数目的减少。

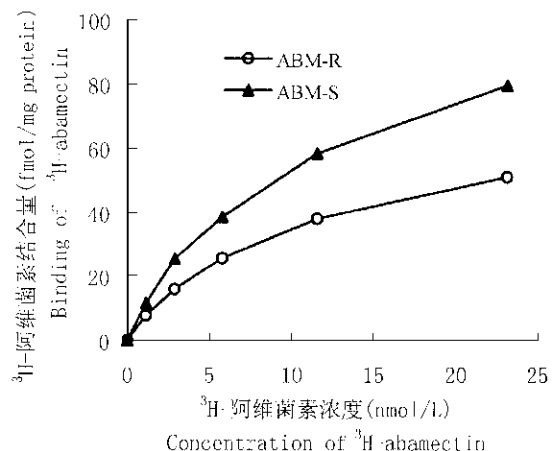


图 2  $^3\text{H}$ -阿维菌素对 ABM-S 和 ABM-R 小菜蛾种群生物膜  $\text{GABA}_A$  受体的特异结合比较

Fig. 2 Comparison of specific binding of  $^3\text{H}$ -abamectin to  $\text{GABA}_A$  receptor of the ABM-S and ABM-R strains of *P. xylostella*

对上述数据作 Scatchard 分析 (图 3: A, B), 结果两种群均得出一直线, 表明对于敏感和抗性种群小菜蛾, <sup>3</sup>H-阿维菌素对 GABA<sub>A</sub> 受体上仅有唯一的结合位点。ABM-S ( $K_d = 10.9368 \pm 0.4374$  nmol/L) 和 ABM-R 种群 ( $K_d = 9.8328 \pm 0.3933$  nmol/L) 的平衡解离常数无显著差异, 而最大结合量却有明

显的种群差异, ABM-S 种群的  $B_{max}$  ( $112.0255 \pm 7.8418$  fmol/mg 蛋白) 是 ABM-R 种群 ( $71.2842 \pm 4.9910$  fmol/mg 蛋白) 的 1.57 倍, 表明 ABM-R 种群神经膜制备液每 mg 蛋白所含的受体数目比 ABM-S 种群明显减少, 阿维菌素结合位点数量的降低可能是 ABM-R 种群的又一抗性机制。

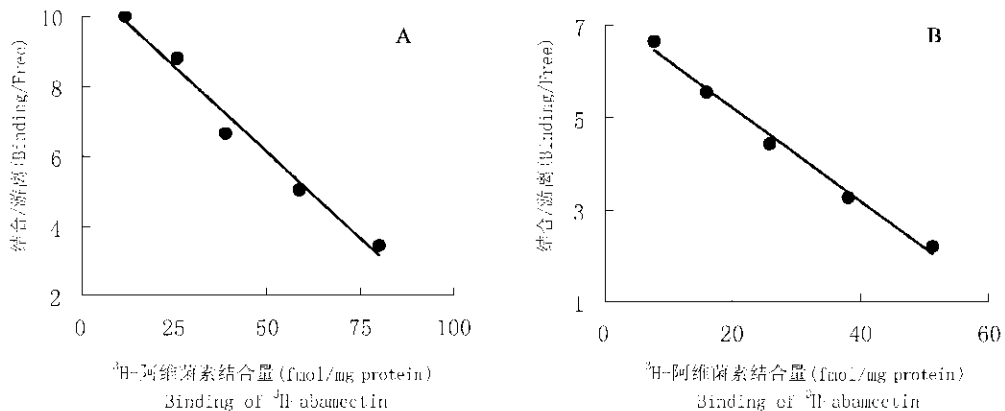


图 3 ABM-S (A) 和 ABM-R (B) 种群 <sup>3</sup>H-阿维菌素与神经膜粗制备液的 Scatchard 分析图

Fig. 3 Scatchard analysis of <sup>3</sup>H-abamectin binding to crude neural membrane preparation of the strains ABM-S (A) and ABM-R (B)

### 3 讨论

表皮穿透降低可以延缓杀虫剂到达靶标部位的时间, 在这一段时期内抗性昆虫有更多的机会来降解这些化合物, 若抗性昆虫的解毒代谢作用增强, 则能够到达作用位点的剂量将更低。对此抗性机制, 最有效的办法是筛选合适的能增加药剂穿透或渗透作用的助剂以缩短药剂进入靶标位点的时间。Anderson 等 (1986) 报道阿维菌素 B1 与一种乳化油混合使用对亚热带粘虫 *Spodoptera eridania* 幼虫的毒力效果要高于其单独使用的效果, Scott 等 (1991) 也发现该乳化剂能够提高阿维菌素穿透抗性昆虫表皮。Abro 等 (1988) 将乳化红花油 (emulsified safflower oil) 和 Sunspray 6E oil 分别与阿维菌素 B1 混合点滴处理抗性小菜蛾, 结果两种油剂能够使 AVMB1 的毒力提高 4~6 倍。AVMs 是有着广泛生物潜力和巨大商业前景的一类药剂, 为了促进阿维菌素在害虫防治中的使用, 延长其使用年限, 有必要对乳化油的增效本质进行深入的研究, 这样也有助于找出有效的克抗办法。小菜蛾的初孵幼虫具有潜叶危害的特性, 与药剂接触机会少而难以防治。而添加乳化油亦能增加 AVMB1 的内吸性

(Abro, 1989)。因此, 对以刺吸危害和潜叶危害的害虫防治中, 乳化油将大有作为。

目前关于靶标不敏感性抗性机制存在多种假说, 其中比较肯定的是两种, 即靶标位点与药剂亲和力的降低和结合位点的数目减少。GABA<sub>A</sub> 受体结合性质的改变是本实验中小菜蛾对阿维菌素的另一抗性机制, Scatchard 图表明敏感和抗性小菜蛾的受体亲和力无明显差异, 但抗性种群的受体数目比敏感种群降低 63.6%, 说明抗性是受体数量的变化而非结构上的改变。Konno 等 (1991) 的研究结果显示, 阿维菌素敏感 ( $K_d = 0.72 \pm 0.2$  nmol/L) 和抗性家蝇 ( $K_d = 0.74 \pm 0.03$  nmol/L) 与受体的亲和力无种群差异, 但抗性家蝇的最大结合位点数目却比敏感种群减低 1.5 倍。Hatano 等 (1993) 在对阿维菌素抗性家蝇的研究中也得到类似结果。对环戊烯类杀虫剂抗性的早期研究中, Tanaka (1987) 报道, 与敏感种群相比, [<sup>3</sup>H]  $\alpha$ -二氢苦毒宁对抗性德国小蠊 *Blattella germanica* 的脑匀浆液的结合位点密度下降 90%, 并伴随亲和力增加 10 倍, 即抗性是受体量变和质变综合作用的结果。

### 参 考 文 献 (References)

Abro G H, Dybas R A, Green A S J, Wright D J, 1988. Toxicity of aver-

- mectin B1 against a susceptible laboratory and an insecticide-resistant strain of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 81: 1 575 – 1 580.
- Abro G H, Dybas R A, Green A S J, Wright D J, 1989. Translaminar and residual activity of avermectin B1 against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.*, 82: 385 – 388.
- Anderson T E, Babu J R, Dybas R A, Mehta H, 1986. Avermectin B1: ingestion and contact toxicity against *Spodoptera eridania* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) and potentiation by oil and piperonyl butoxide. *J. Econ. Entomol.*, 79: 197 – 201
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 255 – 260.
- Georghiou G P, 1986. The magnitude of the resistance problem. In: National Academy of Sciences ed. *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*. Washington D C: National Academy Press. 14 – 43.
- Hatano R, Scott J G, 1993. Characterization of [<sup>3</sup>H] abamectin binding in susceptible and abamectin resistant strains of house fly. *J. Pestic. Sci.*, 18: 281 – 284.
- Iqbal M, Wright D J, 1996. Host resistance to insecticides can confer protection to endolaval parasitoids. *Bull. Entomol. Res.*, 86: 721 – 723.
- Iqbal M, Wright D J, 1997. Evaluation of resistance, cross-resistance and synergism of abamectin and teflubenzuron in a multi-resistant field population of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull. Entomol. Res.*, 87: 481 – 486.
- Iqbal M, Verkerk R H J, Furlong M J, Ong P C, Rahman S A, Wright D J, 1996. Evidence for resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kustaki* HD-1 and subsp. *aizawai* and abamectin in field populations of diamondback moth from Malaysia. *Pestic. Sci.*, 48: 89 – 97.
- Koano Y, Scott J G, 1991. Biochemistry and genetics of abamectin resistant in the housefly. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 41: 21 – 28.
- Li T W, Gao X W, Zheng B Z, Liang P, 2000a. Study on genetics of avermectins resistance and population fitness in *Plutella xylostella*. *Acta Entomol. Sin.*, 43 (3): 255 – 263. [李腾武, 高希武, 郑炳宗, 梁沛, 2000. 小菜蛾对阿维菌素的抗性遗传方式和相对适合度研究. 昆虫学报, 43 (3): 255 – 263]
- Li T W, Gao X W, Zheng B Z, Xu X L, 2000b. Study on resistance by avermectins and its effect on activities of detoxification enzymes in *Plutella xylostella* (L.). *Acta Entomol. Sin.*, 43 (Suppl.): 38 – 43. [李腾武, 高希武, 郑炳宗, 许向丽, 2000. 阿维菌素对小菜蛾的抗性选育及其对解毒酶活性的影响. 昆虫学报, 43 (增刊): 38 – 43]
- Scott J G, Roush R T, Liu N, 1991. Selection of high-level abamectin resistance from field-collected house flies, *Musca domestica*. *Experientia.*, 47: 288 – 291.
- Tanaka K, 1987. Mode of action of insecticidal compounds acting at inhibitory synapses. *J. Pestic. Sci.*, 12: 549 – 560.
- Wu Q J, Zhang W J, Zhang Y J, Xu B Y, Zhu G R, 2000. Biotic fitness of abamectin susceptible and resistant strains of *Plutella xylostella* L. *Chinese J. Pestic. Sci.* 2 (1): 36 – 40. [吴青君, 张文吉, 张友军, 徐宝云, 朱国仁, 2000. 阿维菌素抗性和敏感种群小菜蛾的生物适合度. 农药学学报, 2 (1): 36 – 40]
- Wu Q J, Zhang W J, Zhang Y J, Xu B Y, Zhu G R, 2001. The role of detoxification in abamectin-resistant *Plutella xylostella*. *Chinese J. Pestic. Sci.*, 3 (3): 23 – 28. [吴青君, 张文吉, 张友军, 徐宝云, 朱国仁, 2001. 解毒酶系在小菜蛾对阿维菌素抗性中的作用. 农药学学报, 3 (3): 23 – 28]