

环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠消化酶和羧酸酯酶活性的影响

周琼^{1,*}, 魏美才², 欧晓明³

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081; 2. 中南林业科技大学昆虫系统与进化生物学实验室, 长沙 410004; 3. 湖南化工研究院国家农药创制工程技术研究中心, 长沙 410007)

摘要:【目的】探明苍耳 *Xanthium sibiricum* 活性物质——环氧苍耳素 I 对菜青虫的作用机理。【方法】采用饲喂法处理 4 龄菜青虫 *Pieris rapae*, 测试从苍耳中分离提纯的环氧苍耳素 I (为倍半萜内酯类物质) 对菜青虫中肠蛋白酶、淀粉酶和羧酸酯酶活性的影响。【结果】环氧苍耳素 I 对蛋白酶活性的抑制最强, 处理后 12, 24 和 48 h, 菜青虫中肠蛋白酶抑制率分别为 20.95%, 29.38% 和 50.06%; 其次为淀粉酶, 抑制率分别为 11.89%, 39.01% 和 31.92%。同时, 中肠羧酸酯酶活性在处理 12 h 与对照之间无显著变化, 24 h 时活性被显著抑制, 而 48 h 时活性却明显高于对照。【结论】环氧苍耳素 I 对昆虫中肠消化酶活性的抑制, 可能是引起昆虫表现取食抑制和生长发育不良的重要原因之一。

关键词: 菜青虫; 苍耳; 环氧苍耳素 I; 中肠; 消化酶; 羧酸酯酶; 酶活性

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2011)06-0729-05

Effect of epoxyxanthatin I from *Xanthium sibiricum* (Asteraceae) on the activity of midgut digestive enzymes and carboxylesterase in *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) larvae

ZHOU Qiong^{1,*}, WEI Mei-Cai², OU Xiao-Ming³ (1. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. Laboratory of Insect Systematics and Evolutionary Biology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 3. National Engineering and Technology Research Center for Agrochemicals, Hunan Academy of Chemical Industry, Changsha 410007, China)

Abstract: 【Aim】 This study aims to reveal the mechanism of epoxyxanthatin I (sesquiterpe lactone from *Xanthium sibiricum*) on *Pieris rapae* larvae. 【Methods】 The activity of midgut protease, amylase and carboxylesterase in *P. rapae* larvae were investigated by feeding to 4th larvae of *P. rapae*. 【Results】 Epoxyxanthatin I showed the most obvious inhibition on midgut protease, whose activities were inhibited 20.95%, 29.38% and 50.06% at 12 h, 24 h and 48 h after treatment respectively, while it showed the less obvious inhibition on midgut amylase, whose activities were inhibited 11.89%, 39.01% and 31.92%, respectively. Meanwhile, no significant differences in carboxylesterase activity were detected between the controls and the epoxyxanthatin I treated samples at 12 h after treatment, while the activity was obviously inhibited at 24 h after treatment and significantly increased at 48 h after treatment compared with that of the control. 【Conclusion】 The results suggest that the inhibition effect of epoxyxanthatin I on midgut digestive enzymes of insects may be one of the causes to inhibit feeding and growth of insects.

Key words: *Pieris rapae*; *Xanthium sibiricum*; epoxyxanthatin I; midgut; digestive enzyme; carboxylesterase; enzyme activity

倍半萜内酯 (sesquiterpene lactones) 是菊科 (Compositae 或 Asteraceae) 植物的特征性成分, 也

是苍耳属 *Xanthium* 植物的重要次生物质 (McMillan *et al.*, 1975; Ahmed *et al.*, 1990; Adekenov, 1995;

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970421); 湖南省自然科学基金重点项目(06JJ20099); 湖南省教育厅重点科研项目(10A077); 湖南师范大学生物学及中药分析教育部重点实验室开放基金(KLCBTCMR2009-12)

作者简介: 周琼, 女, 1965年生, 湖南宁乡人, 博士, 教授, 主要从事植物源昆虫行为调控剂和化学生态学研究, E-mail: zhoujoan@hunnu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhoujoan@hunnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-09-09; 接受日期 Accepted: 2011-01-31

Mahmoud, 1998), 苍耳倍半萜内酯中主要含愈创木烷型和裂愈创木烷型内酯化合物(张晓琦等, 2001), 具有多种生物活性, 包括抑制昆虫生长发育(Kawazu *et al.*, 1979), 抗原虫和病毒(Lavault *et al.*, 2005), 抗菌(Sato *et al.*, 1997), 驱避贝类(Harada *et al.*, 1985) 以及细胞毒性等作用(Roussakis *et al.*, 1994)。

对苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. ex Widder 活性次生物质的系统研究表明, 苍耳叶的乙酸乙酯萃取物中分离的多个组分中, 以倍半萜内酯类化合物(主要成分为: 4β , 5β -epoxyxanthatin- 1α , 4α -endoperoxide, 简称环氧苍耳素 I) 活性最高, 具有对多种害虫的拒食、生长发育抑制和产卵忌避等活性(周琼等, 2007, 2009), 且活性高于博落回生物碱(周琼等, 2008)。本文报道了环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠消化酶和酯酶活性的影响, 为研究苍耳对菜青虫的取食抑制和生长发育抑制机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

环氧苍耳素 I (4β , 5β -epoxyxanthatin- 1α , 4α -endoperoxide, 分子式 $C_{15}H_{18}O_5$): 新鲜苍耳采自湖南省湘潭市郊, 经提取、萃取、不同极性溶剂梯度硅胶柱层析和重结晶获得(周琼等, 2009), 目标化合物含量在 95% 以上, 其结构经 LC-MS、GC-MS 和元素分析仪表征。以 0.1 g/mL 甲醇液冰箱(8℃)保存, 测试前临时稀释。

小白菜 *Brassica chinensis* L. 播种在盛有营养土的塑料花盆中, 置于 500 mm × 500 mm × 500 mm 的铝合金养虫笼中, 在室外自然光和自然温湿度条件下栽培, 整个生长期不施用任何农药, 待长出 5~6 片以上真叶时供试。

菜青虫 *Pieris rapae* L. 采自湖南省长沙市未施农药的自种蔬菜地, 在室内(25℃, 70%~80% RH, 12L:12D)用自种的小白菜进行续代饲养。

1.2 方法

1.2.1 试虫的处理: 将环氧苍耳素 I 样品液用蒸馏水稀释至 0.005 g/mL, 浸渍叶片 3 s, 适当自然晾干后饲喂健康且大小一致的已饥饿 3 h 的 4 龄菜青虫, 分别取处理后 12, 24 和 48 h 存活的幼虫供试, 对照试虫以相应浓度的甲醇蒸馏水溶液浸渍叶片饲喂。

1.2.2 中肠酶液制备: 取存活的 4 龄菜青虫, 将试

虫剪头去尾, 在 0~4℃ 下迅速解剖, 用 0.15 mol/L NaCl 溶液冲去体液, 用镊子抽取中肠, 除去内含物, 在 0.15 mol/L NaCl 冰浴中匀浆至无明显组织块, 定容至 1 mL/虫, 匀浆液在 11 200 rpm, 4℃ 下离心 15 min, 取上清液作为测试中肠酶液。用 PBS 稀释 5~20 倍进行酶活性测定。以上操作均在冰盘中进行。每处理 10 头菜青虫, 重复 3 次。

1.2.3 中肠蛋白质总量测定: 采用考马斯亮蓝法(Bradford, 1976), 标准蛋白为牛血清清蛋白。取稀释 5 倍的待测酶液 0.5 mL, 加蛋白质试剂 2.5 mL, 摇匀, 30℃ 水浴 5 min, 测定 OD₅₉₅ 值。以 0.5 mL 蒸馏水加蛋白质试剂 2.5 mL 调零。每处理 3 次重复, 每个数值测 3 次。对照标准曲线, 求出蛋白质含量。

1.2.4 中肠蛋白酶比活力测定: 采用福林法(须凤高, 1999), 标准曲线用酪氨酸制作。取酶液 1 mL, 加入 2% 酪蛋白液 1 mL, 保温 15 min, 加入 2 mL 的 0.4 mol/L 三氯乙酸中止反应。反应混合物水浴 20 min, 在 11 200 rpm, 4℃ 下离心 15 min 后, 取上清液 1 mL, 加入 0.4 mol/L 碳酸钠 5 mL 和福林试剂 1 mL, 摇匀, 37℃ 水浴温育 20 min 后, 在 660 nm 处测 OD 值。每处理 3 次重复, 每个数值测 3 次。计算蛋白酶的比活力, 单位为 $\mu\text{g}/\text{mg pro}\cdot\text{min}$ 。

1.2.5 中肠淀粉酶比活力的测定: 采用二硝基水杨酸法(施特尔马赫, 1992), 标准曲线用麦芽糖制作。取酶液 1 mL, 加入 pH 5.6 的柠檬酸缓冲液 1 mL, 40℃ 下保温 15 min, 加入预热的 1% 淀粉溶液 2 mL, 40℃ 下反应 5 min 后, 立即加入 0.4 mol/L NaOH 溶液 4 mL(空白对照测定于保温前加入); 取 2 mL 反应液, 加 3, 5-二硝基水杨酸试剂 2 mL, 沸水中煮沸 5 min, 冷却后用蒸馏水稀释至 25 mL, 用分光光度计测定其 OD₅₄₀。每处理 3 次重复, 每个数值测 3 次。计算淀粉酶的比活力, 单位为 $\text{mg}/\text{mg pro}\cdot\text{min}$ 。

1.2.6 中肠羧酸酯酶比活力测定: 参照陈长琨(1993)方法, 以反应生成 α -萘酚的量作为羧酸酯酶比活力单位。在试管中加入待测酶液 1 mL 和 0.1 mL 毒扁豆碱(0.5 mg/mL), 摇匀, 静止 20 min 后(此时完全可以抑制 AChE 活性), 加入 5 mL 的 0.3 mmol/L α -醋酸萘酯作反应底物, 摇匀, 反应 15 min, 加入 1 mL 显色剂, 在 30℃ 水浴温育 30 min, 测 OD₆₀₀ 值。每处理 3 次重复, 每个数值测 3 次。根据标准曲线方程, 求转化生成的 α -萘酚量, 计算比活力, 以 $\mu\text{mol } \alpha\text{-萘酚}/\text{mg pro}\cdot\text{min}$ 表示。

1.3 数据处理方法

酶活性抑制率(%) =

$$\frac{\text{对照组酶的比活力} - \text{处理组酶的比活力}}{\text{对照组酶的比活力}} \times 100。$$

采用 SPSS 11.0 软件包的成对数据 *T*-检验和 EXCEL 软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠蛋白质含量的影响

环氧苍耳素 I 处理菜青虫后 12, 24 和 48 h, 菜青虫中肠蛋白质含量测定结果见图 1, 可以看出, 处理后不同时间菜青虫的中肠蛋白质含量均高于对照组, 但仅 24 h 时两者之间达到差异显著水平($P < 0.05$), 其余差异不显著。

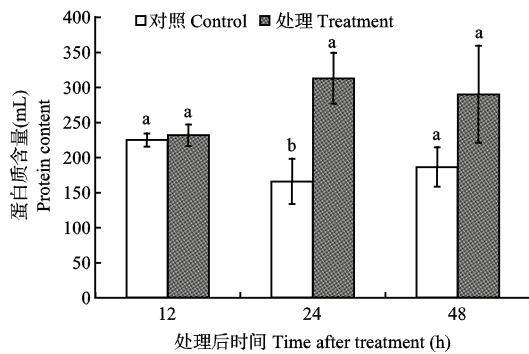


图 1 环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠蛋白质含量的影响

Fig. 1 Effect of epoxyxanthatin I on the content of midgut protein of *Pieris rapae* larvae

并列柱形图上不同小写字母表示相应数据经成对样本的 *T*-检验, 在 0.05 水平差异显著; 下同。Different lowercase letters in a pair histograms indicated that the two means are significantly different at the 0.05 level by paired-samples *T*-test. The same below.

2.2 环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠蛋白酶比活力的影响

环氧苍耳素 I 处理菜青虫后, 其中肠蛋白酶活性测定结果见图 2, 可以看出, 处理后 12, 24 和 48 h 菜青虫中肠蛋白酶活性均明显低于对照, 且两者之间差异显著($P < 0.05$), 蛋白酶活性抑制率分别为 20.95%, 29.38% 和 50.06%, 随处理时间的延长, 对蛋白酶活性的抑制作用更强。

2.3 环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠淀粉酶比活力的影响

菜青虫中肠淀粉酶活性测定结果见图 3, 可以看出, 环氧苍耳素 I 处理后 12, 24 和 48h, 菜青虫中肠淀粉酶活性均明显低于对照, 且与对照之间差

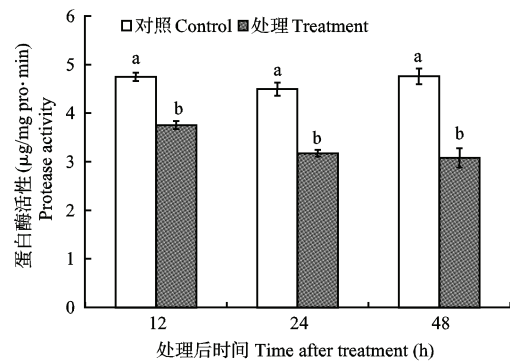


图 2 环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠蛋白酶活性的影响

Fig. 2 Effect of epoxyxanthatin I on the midgut protease activity of *Pieris rapae* larvae

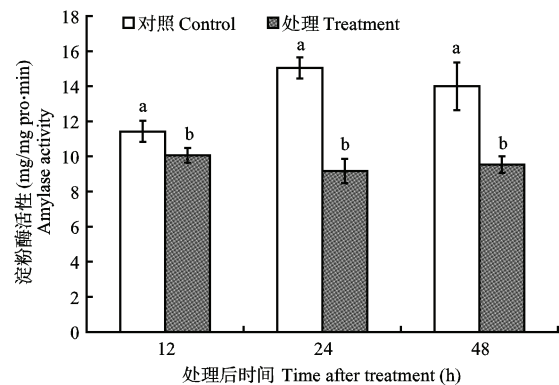


图 3 环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠淀粉酶活性的影响

Fig. 3 Effect of epoxyxanthatin I on the midgut amylase activity of *Pieris rapae* larvae

异显著($P < 0.05$), 淀粉酶活性抑制率分别为 11.89%, 39.01% 和 31.92%。

2.4 环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠羧酸酯酶比活力的影响

环氧苍耳素 I 处理后 12, 24 和 48 h, 菜青虫中肠羧酸酯酶活性测定结果见图 4, 可以看出, 处理后 12 h, 菜青虫中肠羧酸酯酶活性变化不大, 与对照之间差异不显著($P > 0.05$); 24 h 时, 处理组菜青虫的中肠羧酸酯酶活性明显降低($P < 0.05$), 活性抑制率为 9.83%; 但 48 h 时, 酯酶活性回升, 且明显高于对照, 两者之间差异显著($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

倍半萜(sesquiterpenes)是由异戊二烯单位构成的链状或环状聚合物, 是分子中含有 15 个碳原子的萜类化合物, 可用(C_5H_8)₃表示, 按结构分为无环型、单环型、双环型、三环型和四环型等, 主要存在于菊科、唇形科、樟科、豆科、桃金娘科、芸香

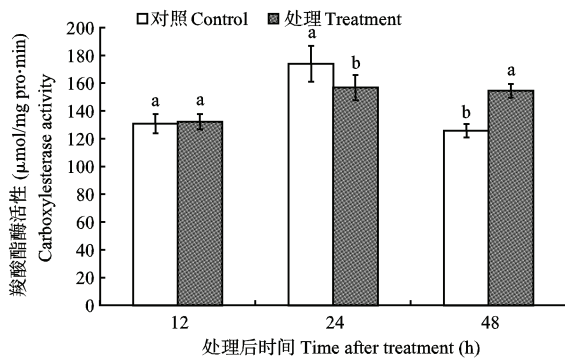


图4 环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠羧酸酯酶活性的影响

Fig. 4 Effect of epoxyxanthatin I on the midgut carboxylesterase activity of *Pieris rapae* larvae

科和檀香科等植物中,是植物精油的主要成分之一,倍半萜内酯是结构官能团为内酯的倍半萜(徐汉虹,2001),含有的 α 、 β -不饱和- γ 内酯结构片段是其生物活性的一个主要功能团(Rodriguez,1976;徐任生,2004),许多植物的倍半萜内酯成分都具有对昆虫的拒食、产卵忌避、生长发育抑制、毒杀活性以及杀软体动物活性:Gören等(1996)从土耳其菊科菊蒿属植物 *Tanacetum praeteritum* 的花中分离一种倍半萜内酯化合物 8- α -angeloyloxycostunolide,对棉贪夜蛾 *Spodoptera littoralis* 低龄幼虫具有拒食活性,对 BCI, HT, LU-1, COL-2, KB, P338, A431 和 LNCaP 等离子体培养细胞系具有毒杀活性;Adekenov(1995)从菊科植物的蓍属 *Achillea*、艾属 *Artemisia*、矢车菊属 *Centaurea*、旋覆花属 *Inula*、黄鹌菜属 *Crepis*、屋根草 *Crepis tectorum* 和大花红人菊 *Gaillardia grandiflora* 中分离出 14 种新的倍半萜内酯及其类似物,对昆虫均有拒食和生长发育抑制作用;从菊科高山同母兰 *Homogyne alpina* 分离出来的蜂斗菜内酯(bakkenolide)对鞘翅目储粮害虫具有强烈的拒食活性,对疆夜蛾 *Peridroma saucia* 的低龄幼虫表现出强烈的生长发育抑制活性(Nawrot *et al.*, 1991)。

昆虫对食物的消化和有效利用程度影响着自身的生长发育(Slansky and Scriber, 1985),抑制肠道蛋白酶和淀粉酶等的活性,可降低许多鳞翅目昆虫肠道综合生理功能的效率(Timmins and Reynolds, 1992; Terra and Ferreira, 1994)。昆虫蛋白酶活性的抑制与植物对昆虫的抗性有关(Broadway *et al.*, 1986),昆虫取食了含蛋白酶抑制剂的食料后,由于消化功能受阻,表现为生长发育不良(王琛柱, 1992)。 α -淀粉酶是昆虫消化系统中重要的消化

酶,它将昆虫体内的淀粉、糖原和多糖衍生物水解成为可溶性双糖麦芽糖及单糖葡萄糖和果糖等,参与体内的能量代谢。抑制淀粉酶的活性,则能够降低昆虫体内糖类的同化作用,从而抑制昆虫的生长发育(Ishimoto, 1999)。

本研究表明,苍耳倍半萜内酯类物质——环氧苍耳素 I 对菜青虫中肠消化酶(包括蛋白酶、淀粉酶)活力有明显的抑制作用,处理后 24 h 对两种消化酶活性的抑制率可以高达 30% 左右。环氧苍耳素 I 对昆虫中肠消化酶活性的抑制,使得食物的营养转换不足,影响昆虫的生活力,可能是造成已报道(周琼等,2009)研究中昆虫产生取食抑制(或拒食)、生长发育抑制以至幼虫存活率和蛹羽化率降低的重要原因之一。同时,菜青虫取食含环氧苍耳素 I 的食物后,中肠蛋白质含量增加,可能与消化酶活性受抑制的同时食物刺激昆虫中肠促进消化酶的合成和分泌有关。

酯酶是属于 α/β 水解酶系,能够代谢酯类物质的一类酶的总称,分布于昆虫的各个组织中,具有广泛的多态性(曹传旺等,2009),羧酸酯酶(CarE)为昆虫体内重要的解毒代谢酶,参与各种外源毒物的代谢,以起到解毒作用(马志卿等,2007),并且解毒酶活性可被诱导增加,CarE 具有微弱或中等程度的诱导性,不同的次生物质可以使亚热带粘虫 *Spodoptera eridania* 幼虫 CarE 的活性提高 35% ~ 114% (Yu and Hsu, 1985)。非寄主有毒植物次生物质往往能抑制酯酶活性(高希武等,1998)。而取食环氧苍耳素 I 处理的食料后,菜青虫中肠羧酸酯酶的活性表现为先抑制后升高,可能是环氧苍耳素 I 作为一种外源物,进入昆虫体内后,抑制了羧酸酯酶活性,导致昆虫对其难以代谢,同时也抑制了昆虫的正常代谢,随之,由于解毒功能的需要,部分羧酸酯酶被诱导而导致活性增强。

参考文献 (References)

- Adekenov SM, 1995. Sesquiterpene lactones from plants of the family Asteraceae in the Kazakhstan flora and their biological activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 31(1): 21–25.
- Ahmed AA, Jakupovic J, Bohlmann F, Regaila HA, Ahmed AM, 1990. Sesquiterpene lactones from *Xanthium pungens*. *Phytochemistry*, 29(7): 2211–2215.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 7(72): 248–254.
- Broadway RM, Duffey SS, Pearce G, Ryan CA, 1986. Plant proteinase inhibitors: a defence against herbivorous insects? *Entomologia*

- Experimentalis et Applicata*, 32: 33–38.
- Cao CW, Shi XY, Jiang H, Liang P, Gao XW, 2009. Application of α -cyanoesters as fluorescent substrates for examining metabolic activity of carboxylesterases in cotton aphid, *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) resistant to pesticides. *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 261–266. [曹传旺, 史雪岩, 姜辉, 梁沛, 高希武, 2009. 运用 α -氰代酯荧光底物检测抗性棉蚜羧酸酯酶代谢活性. 昆虫学报, 52(3): 261–266]
- Chen CK, 1993. Experiment of Insect Physiology and Biochemistry. China Agriculture Press, Beijing. [陈长琨, 1993. 昆虫生理生化实验. 北京: 中国农业出版社]
- Gao XW, Zhao Y, Wang X, Dong XL, Zheng BZ, 1998. Induction of carboxylesterase in *Helicoverpa armigera* by insecticide and plant allelochemicals. *Acta Entomologica Sinica*, 41(S1): 5–11. [高希武, 赵颖, 王旭, 董向丽, 郑炳宗, 1998. 杀虫药剂和植物次生性物质对棉铃虫羧酸酯酶的诱导作用. 昆虫学报, 41(S1): 5–11]
- Gören N, Woerdenbag HJ, Bozok-Johansson C, 1996. Cytotoxic and antibacterial activities of sesquiterpene lactones isolated from *Tanacetum praeteritum* subsp. *praeteritum*. *Planta Medica*, 62(5): 419–422.
- Harada A, Sakata K, Ina H, Ina K, 1985. Isolation and identification of xanthatin as an anti-attaching repellent against blue mussel. *Agricultural Biology and Chemistry*, 49(6): 1887–1888.
- Ishimoto M, Yamada T, Kaga A, 1999. Insecticidal activity of an α -amylase inhibitor-like protein resembling a putative precursor of α -amylase inhibitor in the common bean, *Phaseolus vulgaris* L. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1432(1): 104–112.
- Kawazu K, Nakajima S, Ariwa M, 1979. Xanthumin and 8-epi-xanthantin as insect development inhibitors from *Xanthium canadense* Mill. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 35(10): 1294–1295.
- Lavault M, Landreau A, Larcher G, Bouchara JP, Pagniez F, Le Pape P, Richomme P, 2005. Anti-leishmanial and antifungal activities of xanthanolides isolated from *Xanthium macrocarpum*. *Fitoterapia*, 76: 363–366.
- Ma ZQ, Li GZ, Feng JT, Zhang X, 2007. Effects of deoxypodophyllotoxin on metabolizing enzymes in *Mythimna separata* Walker. *Acta Entomologica Sinica*, 50(2): 186–190. [马志卿, 李广泽, 冯俊涛, 张兴, 2007. 脱氧鬼臼毒素对粘虫几种代谢酶系的影响. 昆虫学报, 50(2): 186–190]
- Mahmoud AA, 1998. Xanthanolides and xanthane epoxide derivatives from *Xanthium strumarium*. *Planta Medica*, 64(8): 724–727.
- McMillan C, Chavez PI, Mabry TJ, 1975. Sesquiterpene lactones of *Xanthium strumarium* in a texas population and in experimental hybrids. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3(3): 137–141.
- Nawrot J, Koul O, Isman MB, Harmatha J, 1991. Naturally occurring antifeedants: effects on two polyphagous lepidopterans. *Journal of Applied Entomology*, 112(1–5): 194–201.
- Rodriguez E, Towers GHN, Mitchell JC, 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15(11): 1573–1580.
- Roussakis C, Chinou I, Vayas C, Harvala C, Verbist JF, 1994. Cytotoxic activity of xanthatin and the crude extracts of *Xanthium strumarium*. *Planta Medica*, 60(5): 473–474.
- Sato Y, Oketani H, Yamada T, Singyouchi K, Ohtsubo T, Kihara M, Shibata H, Higuti T, 1997. A xanthanolide with potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(10): 1042–1044.
- Slansky FJ, Scriber JM, 1985. Food consumption and utilization. In: Kerkut GA, Gilbert LI eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford. 87–163.
- Stellmach B, Mitarb U, von Gottschick W (Translated by Qian JY), 1992. Bestimmungsmethoden Enzyme für Pharmazie, Lebensmittelchemie, Technik, Biochemie, Biologie, Medizin. China Light Industry Press, Beijing. 8. [施特马赫 B 著(钱嘉渊译), 1992. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社. 8]
- Terra WR, Ferreira C, 1994. Insect digestive enzymes; properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109(1): 1–62.
- Timmins WA, Reynolds SE, 1992. Azadirachtin inhibits secretion of trypsin in midgut of *Manduca sexta* caterpillars; reduced growth due to impaired protein digestion. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 63(1): 47–54.
- Wang CZ, 1992. Research of plant protein inhibitors in pest control. *World Agriculture*, (12): 28–29. [王琛柱, 1992. 害虫防治中植物蛋白酶抑制剂的研究. 世界农业, (12): 28–29]
- Xu FG, 1999. Industry Standard of Domestic Trade of the People's Republic of China SB/T 10317-1999. Measurement of Proteinase Activity. China Standard Press, Beijing. [须凤高, 1999. 中华人民共和国国内贸易行业标准: 蛋白酶活力测定法 SB/T 10317-1999. 北京: 中国标准出版社]
- Xu HH, 2001. Insecticidal Plants and Botanical insecticides. China Agriculture Press, Beijing. 228. [徐汉虹, 2001. 杀虫植物与植物性杀虫剂. 北京: 中国农业出版社. 228]
- Xu RS, 2004. Natural Product Chemistry. 2nd ed. Science Press, Beijing. [徐任生, 2004. 天然产物化学(第二版). 北京: 科学出版社]
- Yu SJ, Hsu EL, 1985. Induction of hydrolases by allelochemicals and host plants in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Environmental Entomology*, 14(4): 512–515.
- Zhang XQ, Ye WC, Zhao SX, 2001. Progress in studies on sesquiterpene lactones from *Xanthium* L. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 32(10): 951–953. [张晓琦, 叶文才, 赵守训, 2001. 苍耳属中倍半萜内酯的研究进展. 中草药, 32(10): 951–953]
- Zhou Q, Wei MC, Liu BR, Yan YC, Wang WX, 2007. Antifeedant and deterrent activity of different extracts from *Xanthium sibiricum* Patrín against insect pests. *Plant Protection*, 33(6): 81–85. [周琼, 魏美才, 刘炳荣, 晏毓晨, 王问学, 2007. 苍耳不同分离物对害虫的拒食和忌避活性. 植物保护, 33(6): 81–85]
- Zhou Q, Wei MC, Ou XM, Xiao W, 2008. Comparative activity of sesquiterpene lactones from *Xanthium sibiricum* and alkaloids from *Macleaya cordata* against insect pests. *Plant protection*, 34(3): 78–82. [周琼, 魏美才, 欧晓明, 肖炜, 2008. 苍耳倍半萜内酯和博落回生物碱对 3 种蔬菜害虫的活性比较. 植物保护, 34(3): 78–82]
- Zhou Q, Wei MC, Ou XM, Zhong YH, Wang WX, 2009. Antifeedant and deterrent effect of active fractions in *Xanthium sibiricum* leaf against insect pests and its chemical component. *Journal of Plant Resources and Environment*, 18(1): 74–79. [周琼, 魏美才, 欧晓明, 钟义海, 王问学, 2009. 苍耳叶活性组分对害虫的拒食和忌避作用及其化学成分. 植物资源与环境学报, 18(1): 74–79]