

昆虫生长调节剂对东亚飞蝗表皮 和脑神经分泌细胞的影响(Ⅰ)

王贵强^① 严毓骅 彭景榎 张 龙 周海鹰
(植物科技学院)

摘 要 通过光学显微镜及电子显微镜观察,综合分析了昆虫生长调节剂卡死克对东亚飞蝗表皮与脑的显微及亚显微形态结构的影响。结果表明,处理后的若虫表皮由于真皮细胞结构被破坏导致内表皮变薄、板层结构消失,而且真皮细胞层与内表皮层分离,细胞质内小泡变大而分布不均,核染色质凝结成为小颗粒且分布不匀。脑神经分泌细胞受药物影响数量明显减少,结构松散,胞间空泡变大,引起轴突变形。经透射电子显微镜检查发现,脑神经分泌细胞的轴突与胞体分离并膨大变形。线粒体结构发生改变,膜与内嵴消失。另外,轴浆运输中的神经分泌颗粒明显减少。

关键词 东亚飞蝗;卡死克;真皮细胞;脑神经分泌细胞

中图分类号 Q965; Q965.8; Q965.9

Effects of Cascade on Structures of Cuticle and Cerebral Neurosecretory Cells in Oriental Migratory Locust

Wang Guiqiang Yan Yuhua Peng Jinggen Zhang Long Zhou Haiying
(College of Plant Science and Technology)

Abstract The effects of cascade, one of the acylcarbamide-insect growth regulators, on the structures of cuticle and cerebral neurosecretory cells in oriental migratory locust (OML) *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) were detected under optical-and electron-microscopes. The results showed that the epiderma of treated nymph was destroyed, the endocuticula turned obviously thinner and separated from epiderma. There were larger and unevenly distributed bullules in cytoplasm of epiderma, which nuclear chromatin aggregated, granulated and unevenly distributed. The number of cerebral neurosecretory cells, in which more larger vacuoles scattered and with aberrant and amplificate axon separated to cell body, in OML treated with cascade decreased significantly. The membrane and inner carinulae in deformed mitochondria were absent. In addition, the neurosecretory particles in transportation of axoplasm decreased markedly.

Key words oriental migratory locust; cascade; epiderma cuticle; cerebral neurosecretory cell

收稿日期: 1996-01-08

①王贵强,黑龙江密山市黑龙江八一农垦大学,158308

昆虫生长调节剂(IGRs)的品种较多,但以灭幼脲类制剂目前研究应用较为深入^[1]。关于灭幼脲类的毒理机制问题,多数人所接受的是 Post 等^[2]提出的理论,即灭幼脲的毒杀作用是由于抑制了昆虫几丁质合成酶,从而阻断了几丁质的最后合成步骤。Soltani 等^[3]根据灭幼脲中毒昆虫所表现的症状推测,该类药剂除能抑制几丁质沉积以外,还可能存在其他机制。王贵强等^[4]通过灭幼脲类新产品卡死克对东亚飞蝗脑神经分泌细胞电生理活性测定研究表明,卡死克对脑神经分泌细胞自发性放电强度、放电频率具有明显的抑制作用。神经分泌细胞的活动强弱决定其分泌激素量的多少。卡死克抑制了脑神经分泌细胞活性,结果必将使其分泌物减少,进而扰乱其虫体内部激素平衡,导致蜕皮过程受阻而死亡。但是,灭幼脲类能否损伤破坏脑神经分泌细胞的形态结构,目前尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 显微结构观察

取新鲜麦叶剪成 10 cm 长的碎片后,放入稀释浓度为 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的卡死克药液中浸泡 5 s,取出晾干备用。将 $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度卡死克浸叶饲喂 24 h 的 4 龄若虫在 28°C 温度条件下饲养 4 d,而后解剖取出脑,并剪取第 2~3 腹节背部表皮。之后,将新鲜脑及表皮不经脱水,在冰冻切片机上直接用冷冻包埋液(美国产, Tissue-TEK)包埋并进行切片。冰冻切片机为德国产 Leica 2700-Frigocut 恒冷式切片机。切片厚度为 $8\sim 10 \mu\text{m}$,组织切片直接粘贴在涂有粘片剂的载玻片上,用苏木精-伊红(HE)染色法染色,加拿大树胶封片,晾干后待观察。用相差显微镜、微分干涉显微镜、荧光显微镜(Olympus-BH-R 系列)观察并拍照。

1.2 亚显微形态结构观察

卡死克($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)浸叶饲喂处理过的 4 龄若虫饲养 4 d 后,解剖取出蝗脑。再把第 2~3 腹节背部表皮剪下并切成 $1\sim 3 \text{ mm}$ 的小块。将完整的蝗虫脑及切好的小块表皮用戊二醛及锇酸固定,梯度酒精脱水,复染法染色,环氧树脂包埋,经超薄切片,用透射电子显微镜观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 表皮显微形态结构观察

光学显微镜下观察未处理的正常若虫,其体壁层次结构清楚,由内向外是基底膜、真皮细胞层和表皮层。其中基底膜最薄,真皮细胞层为单层细胞组成,表皮层由内向外还可分为内表、外表皮和上表皮层。其中内表皮层最厚,在显微镜下可见清晰的板层结构(图 1)。

卡死克处理的试虫表皮结构受到明显的破坏。在表皮组织学切片镜下观察可见到的病变主要表现。①内表皮厚度明显变薄。内表皮是在蜕皮间期中形成的,其厚度随蜕皮后日龄的增长而加厚。而处理组的若虫,其内表皮厚度明显比正常组显薄,这可能与表皮成分含量测定中几丁质受到强烈抑制的结果具有一定的相关性。②内表皮出现厚薄不匀,在多个部位发生断裂,板层结构模糊不清。③内表皮与真皮细胞分离。正常组其内表皮与真皮细胞是紧密相连的。而在处理组中,有些部位的内表皮与真皮细胞分离,二者之间形成较大的空隙(图 2)。上述观察结果与龚国玑等^[5]用灭幼脲处理黄粉甲(*Tenebrio molitor*)幼虫后的表皮病变的观察结果相同。

2.2 表皮亚显微形态结构观察

在透射电镜下观察分析,①正常组的外表皮着色深,内表皮几丁质结构致密,在真皮细胞与内表皮接触部位可见大量的微绒毛;②真皮细胞的细胞质内分布大量的粗糙型内质网,“小泡”较小且分布均匀,核染色质也呈均匀分布;③细胞间隙清晰可辨(图3)。然而,处理组的表皮因受药剂影响,结构与正常组的差异明显。其表现:表皮层很薄,结构松散;细胞质内“小泡”大而分布不均;核染色质凝结成小颗粒且分布不均匀(图4)。

表皮层源于真皮细胞的分泌产物,真皮细胞的结构被破坏,分泌活动则受抑或分泌量减少,因此表皮层厚度明显变薄。核染色质是细胞核内重要的遗传物质,有细胞分裂和传递遗传信息的功能。但由于卡死克对细胞核的破坏,使细胞增殖及遗传信息传递的功能发生障碍,因而无法形成新的表皮。既然皮细胞本身受到损害理应几丁质前体物(尿苷磷酸乙酰氨基葡萄糖-UDPAG)的产生和分泌亦随之受阻。如果UDPAG的产生及分泌受阻,则IGRs对几丁质合成的干扰作用就应发生在几丁质聚合反应之前。这同Post等提出的灭幼脲抑制几丁质合成酶从而干扰几丁质的学说不相符合。然而,表皮成分分析中发现,处理组若虫表皮中几丁质含量减少而粗蛋白含量增加,说明UDPAG与几丁质酶接触过程受阻而未能聚合成几丁质^[6]。因此,IGRs究竟如何作用与影响皮细胞,还有待进一步研究。

2.3 蝗脑神经分泌细胞的显微形态结构观察

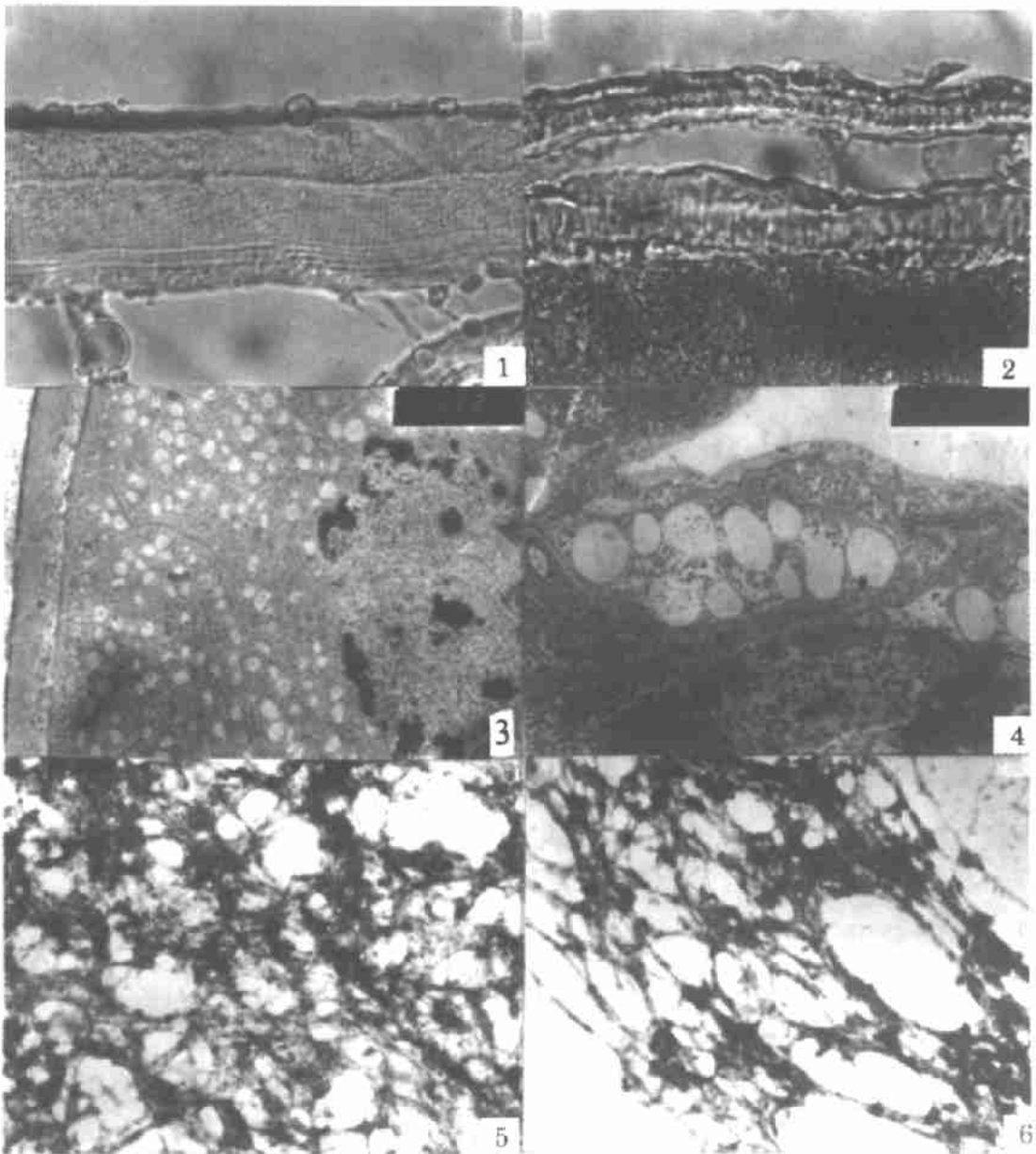
昆虫的脑是其神经系统中结构最为复杂的部分(图7)。从外形看,脑分为前脑、中脑和后脑3部分。前脑在脑的最前端,发达的两前脑叶构成前脑的主体。前脑叶外侧为膨大的视叶。前脑叶的内部结构复杂,包括球状细胞群、脑体(亦称神经纤维体)及神经接索。脑体由密集的神经纤维群和神经纤维球组成,其中包括脑桥体、中心体、蕈体和腹体。脑桥体位于前脑背部中央,脑中多处发出的神经纤维都进入脑桥体,成为联系中枢。中心体在脑桥体下方,呈卵圆形,也是重要的联系中枢。蕈体位于脑桥体两侧,左右各一,形似蕈,是一个复杂的协调和联系中枢。腹体在前脑后部两侧,左右各一,以横向的神经接索相连。腹体有神经纤维同脑桥体、中心体、蕈体等相连,变为联系中枢。前脑叶是一切活动及生长发育的控制协调中枢,脑间部具有成组的神经分泌细胞,其神经轴突向后伸入心侧体,具有分泌、贮存和释放作用。中脑在前脑的后方,为两个膨大的中脑叶。后脑位于中脑后部,分为左右两叶。

在光学显微镜下对前脑叶脑间部的神经分泌细胞的观察结果,处理组的细胞结构明显受到损伤,与正常组的细胞结构(图5)比较,清晰可辨其细胞数量减少,结构松散,胞间空泡大,轴突拉长等特点(图6)。为此,有必要对脑神经分泌细胞的亚显微形态进行深入细致的观察分析。

2.4 蝗脑神经分泌细胞的亚显微形态结构观察

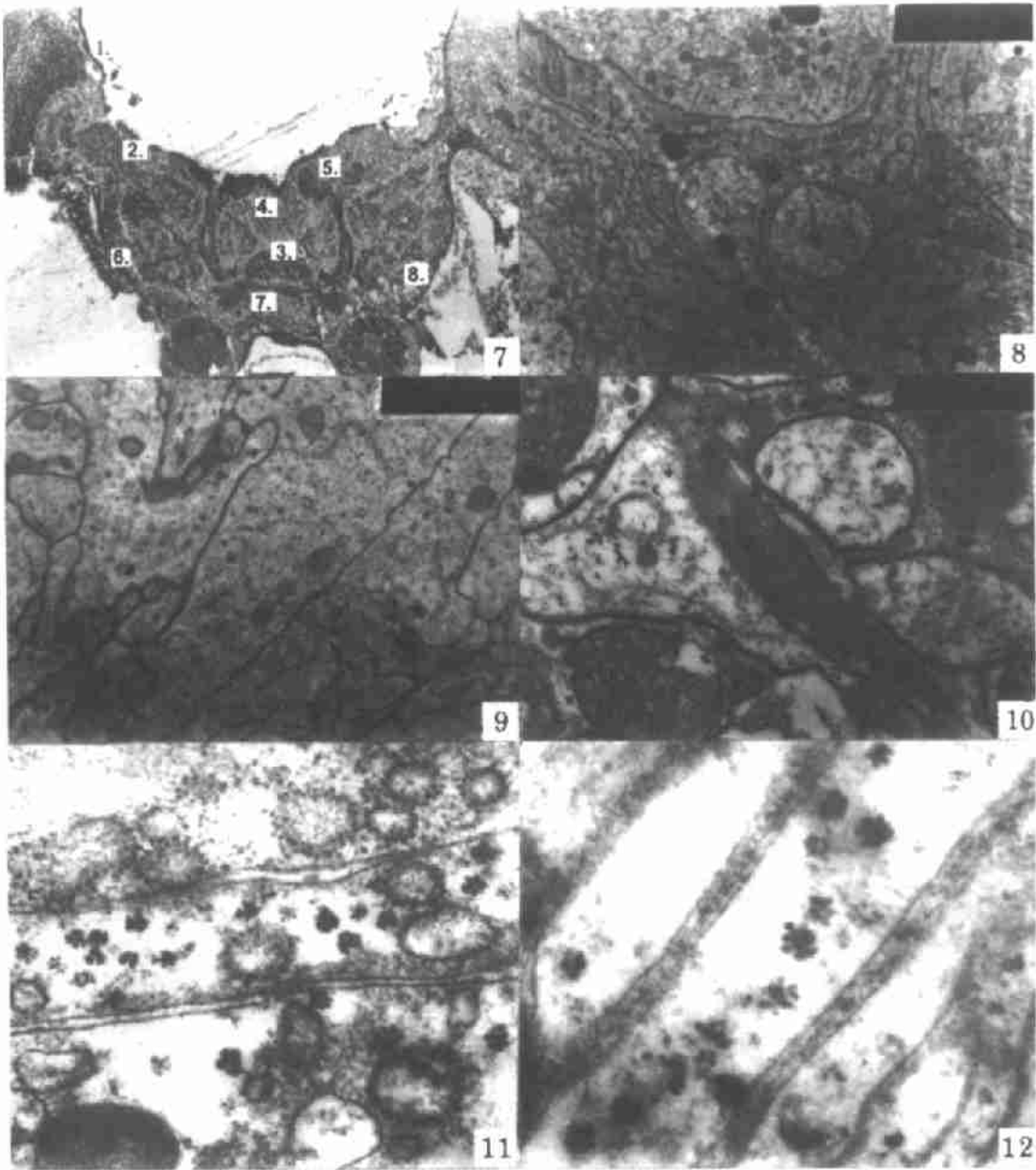
脑神经分泌细胞自发电活动记录证实,卡死克对细胞电活动强度、频率有明显的抑制作用^[4],可是除此抑制作用外药剂能否对细胞形态结构也产生影响,进一步探讨则有必要借助电子显微镜技术深入观察。

在透射电镜下,可以观察到神经分泌细胞的胞体及线粒体、内质网、溶酶体、神经分泌颗粒等细胞内含物(图8)。通过对正常组与处理组试虫切片观察比较分析中发现,卡死克对神经分泌细胞的损伤破坏表现在,第一,轴突与胞体分离或膨大成为小突起(图9)。轴突是神经细胞内的运输线,轴突运输不仅对神经细胞维持生长,而且对神经细胞完成其生理功能的



图版说明

1. 正常组飞蝗 4 龄若虫 4 日龄的表皮显微形态结构($\times 300$)
2. 处理组飞蝗 4 龄若虫 6 日龄的表皮显微形态结构($\times 300$)
3. 飞蝗 4 龄若虫表皮细胞亚显微形态结构($\times 6000$)
4. 飞蝗 4 龄若虫处理后 4 d 表皮细胞亚显微形态结构($\times 6000$)
5. 飞蝗 4 龄若虫处理后 4 d 脑神经分泌细胞显微形态结构($\times 350$)
6. 飞蝗 4 龄若虫正常脑神经分泌细胞显微形态结构($\times 350$)



7. 东亚飞蝗脑显微形态结构(×7 500)

①视叶 ②视神经道 ③中心体 ④脑桥体 ⑤罩体 ⑥前脑叶 ⑦中脑神经接索 ⑧腹体

8. 飞蝗 4 龄若虫脑神经分泌细胞及细胞器(×7 500)

9. 飞蝗 4 龄若虫脑神经分泌细胞受药后轴突变形(×12 000)

10. 飞蝗 4 龄若虫脑神经分泌细胞受药后线粒体变形(×30 000)

11. 飞蝗 4 龄若虫脑神经分泌细胞轴浆运输中各类细胞器及分泌颗粒(×6 500)

12. 飞蝗 4 龄若虫脑神经分泌细胞受药后轴浆运输中各类细胞器及分泌颗粒(×16 500)

能力,都起着重要的作用。处理后的轴突结构变异,无疑使轴突运输受阻。

第二,线粒体结构变形、膜消失(图10)。正常的线粒体是圆形,卵圆形或杆状的物体。线粒体含有分解脂肪酸的酶,也含有参与分解糖(包括蛋白质代谢中产生的糖组分的分解)的酶,表明它们参与细胞内的代谢活动。它的作用是释放贮存在食物中的代谢物的能量,将这种能量转变为细胞便于利用的形式。线粒体结构的变异,无疑将使这一功能发生障碍。

第三,神经分泌颗粒减少。在电子显微镜下观察,见到合成的神经分泌颗粒出现在粗糙型内质网周围(图11)。内质网的功能之一是合成分泌物并送至高尔基器进行分包。神经分泌产物的轴浆运输理论目前已完全为人们所接受,即神经分泌物质是在胞体内产生,被运输到轴突末梢,并从那里被释放出去。在图12的图片上,可以清晰见到处理组轴浆中被运输的神经分泌颗粒及细胞器数量明显比正常组的要少。

昆虫脑神经分泌细胞可产生多种激素,这些激素分别执行着不同的生理功能。其中脑激素与鞣化激素对昆虫蜕皮变态及外表皮的鞣化和内表皮的沉积起着至关重要的作用。实验证明:卡死克处理后飞蝗脑神经分泌细胞的电活动明显减弱。而亚显微形态观察处理组的神经分泌细胞产生的神经分泌颗粒也明显减少。上述实验结果有可能用来解释药剂的毒理机制,即由于体内脑激素与鞣化激素的失衡,导致正常生理代谢过程受到破坏并引起若虫蜕皮受阻,表皮变薄,失去弹性及容易破损等异常生理现象。

4 结论

- 1) 通过细胞显微及亚显微形态结构观察发现,东亚飞蝗中毒个体表皮的真皮细胞结构变异,核内染色质异常。
- 2) 中毒个体的脑神经分泌细胞发生变异,其轴突与胞体分离,线粒体变形,神经分泌颗粒减少。
- 3) 卡死克对真皮细胞及脑神经分泌细胞均有直接毒害作用,这不仅使表皮生成受阻,而且引起体内激素水平失衡影响正常的生理代谢过程,造成体被破坏得更快、更有效。

参 考 文 献

- 1 冷欣夫. 昆虫生长调节剂的研究进展. 昆虫知识, 1994, 31(1): 48~51
- 2 Post L C, Mulder R. Insecticidal properties and mode of action of 1-(2,6-dihalogenbenzoyl)-3-phenylureas. In: Kohnl G K ed. Mechanism of Pesticide Action. Symposium Series No. 2. American Chemical Society, Washington, D. C. 1974, 136~143
- 3 Soltani N, et al. Effects of diflubenzuron on the pupa-adult development of *Tenebrio molitor*: Growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density and DNA synthesis. Pestic Biochem Physiol, 21: 256~260
- 4 王贵强, 严毓华, 彭景樵. 昆虫生长调节剂对东亚飞蝗脑神经分泌细胞影响的研究(I). 黑龙江八一农垦大学学报, 1995, 8(2): 1~6
- 5 龚国玘等. 灭幼脉对小地老虎、粘虫及黄粉甲幼虫内部器官和组织的作用及毒理. 昆虫学报, 1988, 31(14): 358~363
- 6 王贵强. IGRs对蝗虫作用机制及在治蝗配套新技术中的协调. [博士论文]. 北京农业大学, 1995