

桑天牛成虫血淋巴凝结抑制剂的筛选

金凤^{1,2}, 嵇保中¹, 唐进根¹

(1. 南京林业大学 林学院, 江苏 南京 210037; 2. 金陵科技学院 园艺学院, 江苏 南京 210038)

摘要: 选用柠檬酸钠等 8 种药剂进行了对桑天牛 *Apriona germari* 成虫血淋巴凝结的抑制试验。冷藏血淋巴溶解时按 $V(\text{血淋巴}):V(\text{抑制剂}):V(\text{苯基硫脲})=1:1:1$ 和 $1:2:2$ 的用量加入抑制剂, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置 2 min 和 6 h, 各药剂抑制血淋巴凝结结果为: 按 $V(\text{血淋巴}):V(\text{抑制剂}):V(\text{苯基硫脲})=1:2:2$ 的用量加入质量分数为 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸钠, 凝结抑制效果最好, 柠檬酸-磷酸二氢钠溶液、草酸钾、秋水仙碱、任氏液、磷酸缓冲液也有一定的抑制作用, 而噻孢霉素和硫酸新霉素的抑制作用很小。按 $1:2:2$ 的用量加入 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸钠, 可更有效抑制冷藏血淋巴解冻时的凝结。新鲜血淋巴采集时按 $V(\text{血淋巴}):V(\text{抑制剂}):V(\text{苯基硫脲})=1:2:2$ 的用量加入抑制剂, 6 h 后观察表明: $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸钠的凝结抑制效果最好; 任氏液、磷酸缓冲液、柠檬酸-磷酸氢钠缓冲液处理的血淋巴, 有少量沉淀; 其余 4 种药剂处理的血淋巴均有大量沉淀和凝块产生。用柠檬酸钠处理桑天牛成虫血淋巴, 可有效抑制其血淋巴的凝结。表 7 参 14

关键词: 森林保护学; 桑天牛; 血淋巴; 抑制剂; 凝结

中图分类号: S763 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2016)05-0855-07

Hemolymph coagulation inhibitor screening for use on *Apriona germari*

JIN Feng^{1,2}, JI Baozhong¹, TANG Jingen¹

(1. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. College of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, Jiangsu, China)

Abstract: Adding suitable agglutination inhibitor has helpful for long-term preservation of hemolymph and for physiological and biochemical research of hemolymph. Hemolymph agglutination inhibition tests on adult *Apriona germari* were conducted using sodium citrate and seven other drugs. During dissolving of cold storage hemolymph, mixtures (by volume) of hemolymph, inhibitor and phenylthiourea were made and then placed at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inhibition effects of every inhibitor mixture (citric acid-sodium, dihydrogen phosphate buffer, potassium oxalate, colchicine, Ringer solution, and a phosphate-buffered saline (PBS) buffer), were determined after being applied for 2 min and for 6 h. Through the naked eye observation and microscopic examination, the shape and quantity of sediment and the blood cells were intact to evaluate the effect of anticoagulation. Results showed that the inhibition effect of 1% sodium citrate in the mixture of hemolymph, sodium citrate, and phenylthiourea ($1:2:2$ by volume) was best. Using citric acid-sodium, dihydrogen phosphate buffer, potassium oxalate, colchicine, Ringer solution, and a phosphate-buffered saline (PBS) buffer as inhibitors, hemagglutination in these mixtures was also inhibited. Inhibition of Cefotaxime and Sulfate Neomycin were very small. After collection and being placed for 6 h, of all inhibitors the inhibition effect of 1% sodium citrate was best. A small amount of precipitate was found in mixtures of Ringer solution, PBS buffer, citric acid-sodium, and dihydrogen phosphate when used as inhibitors. Much precipitate and hemolymph coagulation were found in the oth-

收稿日期: 2015-07-21; 修回日期: 2015-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271086, 30471399); 江苏省教育厅高校自然科学研究面上项目(12KJD180002)

作者简介: 金凤, 副教授, 博士, 从事昆虫生理和植物病虫草害防治等研究。E-mail: 624373065@qq.com。通信作者: 嵇保中, 教授, 博士, 从事昆虫生理生化等研究。E-mail: jbz9885@njfu.edu.cn

er four inhibitors' mixtures. Therefore, by using sodium citrate as a hemolymph inhibitor for adult *Apriona germari*, hemagglutination could be effectively inhibited. [Ch, 7 tab. 14 ref.]

Key words: forest protection; *Apriona germari*; hemolymph; inhibitor; coagulation

血淋巴是昆虫循环和免疫系统的重要组成。血淋巴的大量采集和冷冻保存是昆虫生理生化研究的常用方法,以解决某一虫态活动时间较短,而分析测试又需经常进行的矛盾。昆虫种类繁多。种类不同往往其血淋巴的功能也有所差异。在一些昆虫血淋巴内存在凝集素或包囊血细胞(或凝结血细胞),可引起血淋巴凝结^[1-3]。血淋巴凝结是昆虫细胞免疫的组成部分,但此作用却妨碍了对血淋巴生理、生化特性及其他功能的研究。使用凝结抑制剂是解决该类问题的主要方法。目前,有关人类、兽类和鼠类抗凝血剂的研究报道较多,但针对昆虫血淋巴凝结抑制剂的研究少见报道^[4-7]。向离体血淋巴中添加柠檬酸、柠檬酸钠、草酸钾或使用大量任氏液、PBS液对离体血淋巴进行稀释,在不同昆虫血淋巴中起到抗凝结作用^[8-11]。采集桑天牛 *Apriona germari* 成虫血淋巴离体观察,发现血淋巴凝结而形成大的结块。因此,根据前人的研究资料^[12],选取8种药剂进行了不同条件下桑天牛成虫血淋巴抗凝结试验,为桑天牛血淋巴生理生化功能的深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料和药剂

1.1.1 供试材料 虫源:7月和8月采集桑天牛成虫,在实验室内室温下笼中人工饲养,用水插构树 *Broussonetia papyrifera* 枝条供其补充营养。冷藏血淋巴:采用后翅基血窦采血法^[13],将血淋巴采入预冷过的1 mL压盖离心管中,立即置于-25℃冰箱中冷冻保存,备用。

1.1.2 供试药品 柠檬酸钠、柠檬酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、草酸钾、苯基硫脲、氯化钠、氯化钙、氯化钾、氯化镁、碳酸氢钠、葡萄糖等药剂均为市购分析纯。噻孢霉素(cefotaxime):上海纯优生物科技有限公司;硫酸新霉素(neomycin sulfate):苏州鑫发生物科技有限公司;秋水仙碱:西安同生生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 抑制剂配制 共配制8种供试抑制剂,分别为10 g·kg⁻¹柠檬酸钠,10⁻⁴ mol·L⁻¹噻孢子霉素,10⁻⁴ mol·L⁻¹硫酸新霉素,0.2 mol·L⁻¹柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液(pH 7.0),10⁻⁴ mol·L⁻¹秋水仙碱,2 g·kg⁻¹草酸钾和任氏液(Ringer-Tyrode氏盐溶液:氯化钠0.700 g,氯化钙0.020 g,磷酸氢二钠0.020 g,氯化钾0.020 g,氯化镁0.020 g,碳酸氢钠0.012 g,葡萄糖0.800 g,蒸馏水100 mL),0.2 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(PBS, pH 7.0),10⁻³ mol·L⁻¹苯基硫脲。对照为蒸馏水。

1.2.2 冷藏血淋巴的溶解 从冰箱中取冷冻血淋巴,立即按V(血淋巴):V[抑制剂(或蒸馏水)]:V(苯基硫脲)=1:1:1和1:2:2的比例,加入各药液,缓慢振荡使血淋巴溶解并与药液混匀,4℃下静置2 min,观察管中是否有凝结、黑化现象出现,摇匀后取样涂片于显微镜下观察是否有完整血细胞、血细胞碎片、颗粒状沉淀、血凝块存在等,每种混合液均查涂片3张。4℃下静置6 h后,再次观察,所查内容同前。重复1次。

1.2.3 新鲜血淋巴凝结抑制试验 在上述试验基础上,按V(血淋巴):V[抑制剂(或蒸馏水)]:V(苯基硫脲)=1:2:2的用量,用20 μL定量毛细吸管分别吸取各抑制剂20 μL放入1 mL压盖离心管中,各加入基硫脲苯20 μL·管⁻¹后,放入4℃冰箱中预冷。取桑天牛成虫,用昆虫针刺破后翅基血窦,用定量毛细吸管吸取10 μL血淋巴分放于各管中,摇匀,4℃下静置2 min后,观察,镜检,其观察内容和镜检方法及内容与1.2.2所述相同。于4℃冰箱中放置6 h后,再次观察。重复1次。

1.3 判定标准

通过肉眼检查和显微镜镜检观察血淋巴凝结结果,判定标准见表1。

表 1 桑天牛血淋巴凝结程度的判断标准

Table 1 Hemolymph coagulation degree judgement standard

肉眼检查						显微镜镜检					
凝结物	标准	颗粒状沉淀	标准	上清液	标准	血细胞	标准	颗粒状沉淀	标准	其他	标准
无	-	无	-	清, 透明	-	卵形、梭形、圆形细胞可见 2 种以上, 数量多	-	无	-	无	-
管底及壁上附一圈胶状凝结物	+	极少量	+	较清透明	+	卵形、梭形、圆形细胞可见 1 种, 数量多	+	极少量, 极细小粒状, 分散	+	细胞碎片, 少量; 未见块状凝结	+
胶状凝结成块	++	少量	++	混浊	++	卵形、梭形、圆形细胞可见 1 种, 数量少	++	大量, 粒状, 分散	++	细胞碎片, 少量; 块状凝结, 少量	++
凝结成块, 黑化	+++	大量	+++	混浊黑化	+++	无	+++	大量, 粒状, 集中分布	+++	块状凝结, 大量	+++

2 结果与分析

2.1 冷藏血淋巴的凝结抑制试验

冷冻血淋巴溶解时按 $V(\text{血淋巴}):V[\text{抑制剂(或蒸馏水)}]:V(\text{苯基硫脲})=1:1:1$ 和 $1:2:2$ 的用量加入抑制剂后, 充分混匀, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中静置 2 min 和 6 h 后, 分别观察, 2 次重复的综合结果记录于表 1~5 中。

在所试药剂中, $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸钠对冷藏血淋巴解冻时凝结抑制效果最好, 在 2 种用量下均可使冷冻血淋巴完全解冻而不形成较大凝块, 仅在其管底有极少量沉淀。镜检发现细胞碎片若干, 有极少量颗粒状沉淀, 是所试药剂中颗粒状沉淀最少的。在 $1:1:1$ 的处理中, 初查时发现棱柱状晶体存在, 6 h 后再查时, 有血凝块出现, 而在 $1:2:2$ 的处理中未见上述情况出现。这表明: 按 $1:2:2$ 的用量加入 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸钠, 可有效抑制冷藏血淋巴解冻时的凝结。

表 2 静置 2 min 后冷藏血淋巴中各抑制剂的凝结抑制结果 [$V(\text{血淋巴}):V(\text{抑制剂}):V(\text{苯基硫脲})=1:1:1$]

Table 2 Inhibitory effect of clotting inhibitor to cold hemolymph treated 2 min [$V(\text{hemolymph}):V(\text{inhibitor}):V(\text{phenyl thiourea})=1:1:1$]

药剂	肉眼检查			镜检		
	凝结物	颗粒状沉淀	上清液	血细胞	颗粒状沉淀	其他
$10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 柠檬酸钠	-	+	-	+	+	+
$10^{-1}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 塞孢霉素	+	+++	+	+++	++	+++
$10^{-1}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸新霉素	+	+++	+	+++	+++	+++
pH 7.0 柠檬酸-磷酸氢钠缓冲液	-	+++	++	+++	+++	++
$10^{-1}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙碱	-	+++	+	+++	+++	+++
任氏液	-	+++	+	++	+++	+++
$0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0 磷酸缓冲液	-	+++	+	++	+++	+
$2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 草酸钾	-	+++	++	+++	+++	++
蒸馏水	++	++	++	+++	+++	+++

说明: 表中的“-” “+” “++” “+++” 所代表意义详见表 1。

塞孢霉素、硫酸新霉素 2 种用量的处理中, 均于管底和管壁形成附着性胶状凝结, 其上部液体初查时较清, 6 h 后再查时, 混浊, 镜检除发现有大量颗粒状沉淀外, 还有由血细胞组成的大型块状凝结物, 与对照组凝结现象相似, 表明这 2 种药剂对桑天牛成虫血淋巴凝结的抑制作用极小。

静置 2 min 后, 柠檬酸-磷酸二氢钠溶液、草酸钾、秋水仙碱、任氏液、磷酸缓冲液等处理的血淋巴中, 均未出现与对照相似的附着性胶状凝结, 但均有沉淀出现。柠檬酸-磷酸二氢钠、草酸钾处理的血淋巴明显混浊, 其他均较清。镜下观察, 此 2 种药剂处理的血淋巴中均充满颗粒状沉淀, 同时存在着

表3 静置6 h后冷藏血淋巴中各抑制剂的凝结抑制结果[V(血淋巴):V(抑制剂):V(苯基硫脲)=1:1:1]

Table 3 Inhibitory effect of clotting inhibitor to cold hemolymph treated 6 h[V(hemolymph): V(inhibitor): V(phenyl thiourea)=1:1:1]

药剂	肉眼检查			镜检		
	凝结物	颗粒状沉淀	上清液	血细胞	颗粒状沉淀	其他
10 g·kg ⁻¹ 柠檬酸钠	+	++	+	++	+	++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 塞孢霉素	++	+++	+++	+++	+++	+++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 硫酸新霉素	++	+++	++	+++	+++	+++
pH 7.0 柠檬酸-磷酸氢钠缓冲液	++	+++	++	+++	+++	+++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 秋水仙碱	++	+++	+++	+++	+++	+++
任氏液	++	+++	+	+++	+++	+++
0.2 mol·L ⁻¹ , pH 7.0 磷酸缓冲液	++	+++	+	+++	+++	+++
2 g·kg ⁻¹ 草酸钾	++	+++	++	+++	+++	+++
蒸馏水	+++	+++	++	+++	+++	+++

说明: 表中的“-” “+” “++” “+++” 所代表意义详见表1。

表4 静置2 min后冷藏血淋巴中各抑制剂的凝结抑制结果[V(血淋巴):V(抑制剂):V(苯基硫脲)=1:2:2]

Table 4 Inhibitory effect of clotting inhibitor to cold hemolymph treated 2 min[V(hemolymph): V(inhibitor): V(phenyl thiourea)=1:2:2]

药剂	肉眼检查			镜检		
	凝结物	颗粒状沉淀	上清液	血细胞	颗粒状沉淀	其他
10 g·kg ⁻¹ 柠檬酸钠	-	+	-	+	+	+
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 塞孢霉素	+	+++	+	++	+++	++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 硫酸新霉素	+	+++	+	++	+++	++
pH 7.0 柠檬酸-磷酸氢钠缓冲液	-	+++	++	+++	+++	++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 秋水仙碱	-	+++	+	+++	+++	++
任氏液	-	+++	+	+	+++	++
0.2 mol·L ⁻¹ , pH 7.0 磷酸缓冲液	-	+++	+	+	+++	++
2 g·kg ⁻¹ 草酸钾	-	+++	++	+++	+++	++
蒸馏水	++	++	++	+++	+++	+++

说明: 表中的“-” “+” “++” “+++” 所代表意义详见表1。

数量不等的血细胞碎片及凝块。静置6 h后, 上述5种药剂的1:1:1处理中, 除磷酸缓冲液处理外, 均出现血淋巴凝块。在柠檬酸-磷酸氢钠溶液、草酸钾的处理中还发现了结晶体, 而1:2:2用量的处理中, 均未见凝块出现。这些情况表明: 此5种药剂均对桑天牛血淋巴有一定的抗凝作用, 在1:2:2的用量下可有效抑制大凝块的形成。

在V(血淋巴):V(抑制剂):V(苯基硫脲)=1:2:2的试验中, 柠檬酸钠(10 g·kg⁻¹), 任氏液、磷酸缓冲液、硫酸新霉素、塞孢霉素等的处理血淋巴中, 均查到有完整的血细胞贴附于玻片上, 有的呈卵圆形、有的呈梭形, 而对照及其他处理中均未见。这说明用这几种药剂溶解血淋巴, 其中有部分较稳定的血细胞可完整保存。

2.2 新鲜血淋巴凝结抑制试验

选用8种抑制剂按V(血淋巴):V(抑制剂):V(苯基硫脲)=1:2:2的用量, 处理新采的血淋巴, 4℃分别静置2 min后和6 h后综合观察结果为(表6和表7): 蒸馏水稀释的血淋巴, 2 min后观察即出现大量沉淀、混浊; 6 h后, 沉淀更多, 有凝块形成。所试抑制剂中2 min后观察: 10 g·kg⁻¹ 柠檬酸钠处理的血淋巴无沉淀产生, 有大量卵圆形和不规则状的血细胞存在; 任氏液、磷酸缓冲液处理的血淋巴液清澈均匀, 有极少量沉淀, 完整血细胞数量也较多, 同时有由血细胞形成的凝结物, 其血细胞形状清晰可辨。柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液处理的血淋巴, 液体较清, 有少量沉淀, 发现少量完整血细胞和少量颗粒状沉淀; 其余4种抑制剂处理的血淋巴均有大量沉淀产生, 除塞孢霉素的血淋巴液较清外, 其他均混浊; 除草酸钾处理外, 均有少数完整细胞存在, 且这4种处理的血淋巴中均有大量颗粒状沉淀, 有少量凝结物出现, 或为颗粒组成的团块状, 或为膜状凝结。因此, 10 g·kg⁻¹ 柠檬酸钠是8种抑制剂中凝结抑制效果最好的, 6 h后的观察, 更加说明了这一点: 10 g·kg⁻¹ 柠檬酸钠处理的血淋巴中仅出现极少量沉

表 5 静置 6 h 后冷藏血淋巴中各抑制剂的凝结抑制结果 [$V(\text{血淋巴}):V(\text{抑制剂}):V(\text{苯基硫脲})=1:2:2$]Table 5 Inhibitory effect of clotting inhibitor to cold hemolymph treated 6 h [$V(\text{hemolymph}):V(\text{inhibitor}):V(\text{phenyl thiourea})=1:2:2$]

药剂	肉眼检查			镜检		
	凝结物	颗粒状沉淀	上清液	血细胞	颗粒状沉淀	其他
10 g·kg ⁻¹ 柠檬酸钠	+	++	-	+	+	+
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 塞孢霉素	++	+++	++	++	++	+++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 硫酸新霉素	++	+++	++	++	++	+++
pH 7.0 柠檬酸-磷酸氢钠缓冲液	-	+++	+	+++	++	++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 秋水仙碱	-	+++	+	+++	++	++
任氏液	-	+++	+	+	++	++
0.2 mol·L ⁻¹ , pH 7.0 磷酸缓冲液	-	+++	+	+	++	++
2 g·kg ⁻¹ 草酸钾	-	+++	++	+++	++	+++
蒸馏水	+++	++	++	+++	++	+++

说明：表中的“-” “+” “++” “+++” 所代表意义详见表 1。

表 6 静置 2 min 后新鲜血淋巴中各抑制剂的凝结抑制结果 [$V(\text{血淋巴}):V(\text{抑制剂}):V(\text{苯基硫脲})=1:2:2$]Table 6 Inhibitory effect of clotting inhibitor to fresh hemolymph treated 2 min [$V(\text{hemolymph}):V(\text{inhibitor}):V(\text{phenyl thiourea})=1:2:2$]

药剂	肉眼检查			镜检		
	凝结物	颗粒状沉淀	上清液	血细胞	颗粒状沉淀	其他
10 g·kg ⁻¹ 柠檬酸钠	-	-	-	+	-	-
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 塞孢霉素	-	++	+	++	++	++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 硫酸新霉素	-	++	++	++	+++	++
pH 7.0 柠檬酸-磷酸氢钠缓冲液	-	++	+	++	+	++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 秋水仙碱	-	+++	++	++	++	+
任氏液	-	-	-	+	-	++
0.2 mol·L ⁻¹ , pH 7.0 磷酸缓冲液	-	+	-	+	-	+
2 g·kg ⁻¹ 草酸钾	-	++	++	+++	+++	+
蒸馏水	+	+++	++	++	+++	+++

说明：表中的“-” “+” “++” “+++” 所代表意义详见表 1。

表 7 处理 6 h 后新鲜血淋巴中各抑制剂的凝结抑制结果 [$V(\text{血淋巴}):V(\text{抑制剂}):V(\text{苯基硫脲})=1:2:2$]Table 7 Inhibitory effect of clotting inhibitor to fresh hemolymph treated 6 h [$V(\text{hemolymph}):V(\text{inhibitor}):V(\text{phenyl thiourea})=1:2:2$]

药剂	肉眼检查			镜检		
	凝结物	颗粒状沉淀	上清液	血细胞	颗粒状沉淀	其他
10 g·kg ⁻¹ 柠檬酸钠	-	+	-	+	-	+
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 塞孢霉素	-	+++	++	++	+++	+++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 硫酸新霉素	-	+++	++	++	+++	+++
pH 7.0 柠檬酸-磷酸氢钠缓冲液	-	+++	++	+++	+++	+++
10 ⁻¹ mol·L ⁻¹ 秋水仙碱	-	+++	++	+++	+++	+++
任氏液	-	+++	+	+	+++	++
0.2 mol·L ⁻¹ , pH 7.0 磷酸缓冲液	-	+++	+	+	+++	++
2 g·kg ⁻¹ 草酸钾	-	+++	++	+++	+++	+++
蒸馏水	++	+++	++	+++	+++	+++

说明：表中的“-” “+” “++” “+++” 所代表意义详见表 1。

淀，可见大量卵圆形血细胞和少量细胞碎片；其他处理均有大量沉淀产生，镜检中可见大量凝结物形成。以上说明，10 g·kg⁻¹ 柠檬酸钠按 $V(\text{血淋巴}):V(\text{抑制剂}):V(\text{苯基硫脲})=1:2:2$ 的用量处理桑天生成虫新鲜血淋巴，可有效抑制血淋巴的凝结。

3 讨论

昆虫离体血淋巴的凝结抑制方法主要有化学方法和物理方法两大类。化学方法即是通过向血淋巴中

加入化学试剂或用有机酸蒸气对成虫进行熏蒸来阻止离体血淋巴的凝结。物理方法包括对昆虫虫体进行加热、冰冻和用射线处理等^[8-11]。昆虫生化研究,采用常规的采血、低温冷藏方法基本上能满足实验要求。而对昆虫血细胞和血淋巴蛋白质组分的分离,有必要防止血淋巴的凝集作用。物理方法以及对昆虫成虫的化学熏蒸会导致成虫虫体有较大损害或死亡,不利于实验过程中对昆虫的连续采血,因此,选择加入化学试剂来达到抑制血淋巴凝结的目的。

柠檬酸钠、柠檬酸、草酸钾等化学试剂加入血淋巴,或使用任氏液、磷酸缓冲液等稀释血淋巴,在不同昆虫中起到抗凝结作用^[8-9]。如将血淋巴采集加入预先冰浴的基本组成为 $0.098\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠, $0.18\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, $0.041\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸的缓冲液中,可有效抑制血淋巴的凝结^[14]。本研究结果表明:定量的柠檬酸钠可有效抑制桑天牛血淋巴的凝结。

不同昆虫离体血淋巴凝血现象可分成4种类型^[9]。类型Ⅰ:一种脆弱透明血细胞对环境发生适应性结构变化,在保持细胞形状的基础上,向周围血淋巴蛋白质中剧烈释放细胞内颗粒状物质。血淋巴蛋白质围绕在这些颗粒物周围形成云雾状沉淀,开始凝结,随后,颗粒物与凝结岛(即血细胞)间的血淋巴进一步形成颗粒状纤维,形成区域性岛状凝结。类型Ⅱ:脆弱透明血细胞接触到基物时,立即向外伸出直的线状延伸物,其中运载细胞质颗粒物,并附着于固体颗粒、物理性干扰(如气泡等)和其他的血细胞上。这种延伸形成网状,凝结以透明弹性膜的方式展开。类型Ⅲ:透明细胞像类型Ⅰ中一样形成网状;血淋巴凝结:类型Ⅱ和类型Ⅰ中2种凝结方式均存在。类型Ⅳ:在上述3种类型中脆弱透明血细胞,不因环境影响而发生变化。镜检中发现这些细胞内部及周围血淋巴蛋白质中均无变化。

经过观察,桑天牛成虫血淋巴的凝血可归属于类型Ⅰ,与沟胫天牛亚科Lamiinae和锯天牛亚科Prioninae多数昆虫离体血淋巴凝血现象主要属于类型Ⅰ的结果相一致。柠檬酸钠可能有效抑制血淋巴凝血现象为类型Ⅰ的昆虫血淋巴的凝结。

在血淋巴凝结抑制试验中,用 $V(\text{柠檬酸钠}):V(\text{草酸钾}):V(\text{柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液})=1:1:1$ 处理中,均发现了柱状晶体的出现。许多报道都已表明,这3种物质可移走脊椎动物血液中钙离子达到抑制凝结的目的^[9]。因此,初步认为此3种药剂是与血淋巴中的钙离子结合,通过移走血淋巴中的钙离子,起到阻止血淋巴凝结的作用。而这3种药剂与血淋巴中钙离子结合反应的速度,可能决定了它们抑制凝结效果的好坏。反应慢的,不能将血淋巴中的钙离子立即结合掉,使多数细胞释放出的凝集素得以传递、表达,抑制作用失败。由此推论:桑天牛成虫血淋巴凝结过程可能为成虫血淋巴中的血细胞,在环境变化影响下,释放出大量可激发血淋巴蛋白质凝结的物质,这些物质与钙离子结合后引起凝血反应来起到止血或防御作用。任氏液、磷酸缓冲液的处理,十分接近昆虫血淋巴中无机离子的组成,又对血淋巴进行了稀释,延长了钙离子到达作用部位的时间,在短时间内起到一定的抑制作用。其他3种药剂可能对钙离子不起什么作用,因此其抑制凝作用极小。

试验过程中,冷藏血淋巴的凝结反应主要是发生于冷冻前,还是发生于溶解后,或者在采血和储藏过程中都有凝结情况发生?这有待研究,以便为昆虫血淋巴的采集、储存提供依据。此外,血细胞释放物质组成及作用机制,血淋巴凝结物的组成成分以及凝结反应的基本生化过程等,都有待于进一步深入研究探讨。

4 参考文献

- [1] THEOPOLD U, LI D, FABBRI M, *et al.* The coagulation of insect hemolymph [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59**(2): 363 - 372.
- [2] KANOST M R, JIANG Haobo, YU Xiaoqiang. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta* [J]. *Immunol Rev*, 2004, **198**(1): 97 - 105.
- [3] 吴姗, 凌尔军. 昆虫细胞免疫反应中的吞噬集结和包裹作用[J]. 昆虫学报, 2009, **52**(7): 791 - 798.
WU Shan, LING Erjun. Phagocytosis, nodulation and encapsulation in cellular immune responses in insects [J]. *Acta Entanol Sin*, 2009, **52**(7): 791 - 798.
- [4] WIEGAND C, LEVIN D, GILLESPIE J P, *et al.* Monoclonal antibody M13 identifies a plasmatocyt membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2000, **45**(3): 95 - 108.

- [5] 宁媛媛, 尤民生, 王成树. 昆虫免疫识别与病原物免疫逃避机理研究进展[J]. 昆虫学报, 2009, **52**(5): 567 – 575.
NING Yuanyuan, YOU Minsheng, WANG Chengshu. Advances in the mechanisms of insect immune recognition and pathogen immune escape [J]. *Acta Entomol Sin*, 2009, **52**(5): 567 – 575.
- [6] 王坤杰, 栾尼娜, 宋玉民. 稀土与半胱氨酸、枸橼酸钠三元配合物的合成和抗凝血作用研究[J]. 化学学报, 2009, **67**(10): 1042 – 1046.
WANG Kunjie, LUAN Nina, SONG Yumin. Synthesis and anticoagulant action of rare earth ternary complexes with cysteine and citrate [J]. *Acta Chim Sin*, 2009, **67**(10): 1042 – 1046.
- [7] 严慧, 沈敏. 抗凝血杀鼠药的分析研究进展[J]. 复旦学报: 医学版, 2011, **38**(4): 361 – 366.
YAN Hui, SHEN Min. Advancement in analysis of anticoagulant rodenticides [J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2011, **38**(4): 361 – 366.
- [8] ROCKSTEIN M. *The Physiology of Insecta* [M]. New York: Academic Press, 1974: 315 – 349.
- [9] GUPTA A P. *Insect Hemocytes: Development, Forms, Functions and Techniques* [M]. New York: Cambridge University Press, 1979: 191 – 203.
- [10] RODRIGUEZ-DOMINGUEZ H, SOTO-BÚA M, IGLESIAS-BLANCO R, *et al.* Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro [J]. *Aquaculture*, 2006, **254**(1): 563 – 570.
- [11] XUE Qinggang, RENAULT T, CHILMONCZYK S. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-population in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph [J]. *Fish Shellf Immunol*, 2001, **11**(7): 557 – 567.
- [12] KOIZUMI N, IMAMIRA M, KADOTANI T, *et al.* The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains [J]. *FEBS Lett*, 1999, **443**(2): 139 – 143.
- [13] 嵇保中, 钱范俊, 严敖金. 云斑天牛研究方法的改进[J]. 森林病虫通讯, 1996(1): 45 – 46.
JI Baozhong, QIAN Fanjun, YAN Aojin. Some improvement on research methods of *Batocera horsfieldi* (Hope) [J]. *For Pest Disease*, 1996(1): 45 – 46.
- [14] WANG Chutao, CAO Yueqing, WANG Zhongkang, *et al.* Differentially-expressed glycoproteins in *Locusta migratoria* hemolymph infected with *Metarhizium anisopliae* [J]. *J Invertebr Pathol*, 2007, **96**(3): 230 – 236.