

# 生、制首乌正己烷提取物对维甲酸致小鼠骨质疏松的防治作用

吴晓青<sup>1</sup>,陈晓珍<sup>2\*</sup>,刘睿颖<sup>1</sup>,任瑶瑶<sup>1</sup>,蒋合众<sup>1</sup>,谭睿<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>西南交通大学生命科学与工程学院,成都 610031;<sup>2</sup>中国科学院成都生物研究所,成都 610041

**摘要:**研究生、制首乌正己烷提取物对维甲酸致小鼠骨质疏松的防治作用,并探讨其主要作用机制。采用维甲酸( $105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )致小鼠骨质疏松模型,生首乌正己烷提取物高、低剂量组  $48, 24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,清蒸制首乌正己烷提取物高、低剂量组  $48, 24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,黑豆制何首乌正己烷提取物高、低剂量组  $48, 24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,灌胃给药,2 周后以比色法测定血清钙、磷含量和碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)活性,竞争放射免疫法测定血清中骨钙素(BGP)和雌二醇(E2)含量,取股骨进行骨组织形态学观察。结果表明:维甲酸可引起高转换型骨质疏松,与模型组比较,生、制首乌各剂量组可显著升高 s-E2 的水平( $P < 0.05$ ),降低 s-ALP、s-TRAP 和 s-BGP 的水平( $P < 0.05, P < 0.01$ );生、制首乌各组与模型组比较,骨组织形态均有不同程度的改善,骨小梁数明显增加。从以上结果可知,生、制首乌正己烷提取物对维甲酸致小鼠骨质疏松有明显的治疗作用,其机制可能与减缓雌激素水平降低,抑制骨高转换有关。

**关键词:**生首乌;制首乌;维甲酸;抗骨质疏松

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.12.022

## Anti-Osteoporosis Effects Induced by Retinoic Acid in Mice of Hexane Extract from Raw and Processed *Polygonum multiflorum*

WU Xiao-qing<sup>1</sup>, CHEN Xiao-zhen<sup>2\*</sup>, LIU Rui-ying<sup>1</sup>, REN Yao-yao<sup>1</sup>, JIANG He-zhong<sup>1</sup>, TAN Rui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of life science and Engineering, Southwest Jiao Tong University, Chengdu 610031, China;

<sup>2</sup>Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, 610041, China

**Abstract:** We investigated the anti-osteoporosis effect and the possible mechanism of PM-HE (Hexane extract from Raw and Processed *Polygonum multiflorum*) in animal model. Kunming mice were randomly divided into 9 groups: Control group (normal saline), model group, nilestriol group ( $2 \text{ mg/kg}$ ), PM-HE groups ( $48, 24 \text{ mg/kg}$ ). The mice osteoporosis was induced by given retinoic acid intragastrically. After oral administration for 14 days, the features of bones and biochemicals in serum were determined to evaluate the anti-osteoporosis effects of PM-HE. The results showed: PM-HE can induce high conversion of osteoporosis. The levels of ALP, TRAP and BGP in the PM-HE groups were lower than those in the model group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), whereas the E2 level was higher than that of the model group ( $P < 0.05$ ). PM-HE can prevent the loss bone in the experimental mice. The mechanism may be the inhibition of estrogen decrease and the high bone turnover.

**Key words:** raw *Polygonum multiflorum* Thunb.; processed *Polygonum multiflorum*; retinoic acid; anti-osteoporosis

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根,是著名的生熟异治中药,有生首乌和制首乌之分。生品性平,味甘、苦;归心、肝、大肠经;制品性变温、味转甘,归肝、肾经。功善

补益精血,固肾乌须。骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种以骨量减少,骨脆性增加以及骨折危险性增高为特征的骨代谢性疾病。原发性 OP 是绝经后老年妇女的一种常见病、多发病,随着世界人口老龄化的发展,老年性 OP 发病率也呈上升趋势,WHO 已将其列为三大老年性疾病之一。

目前临床上用于治疗 OP 的药物主要有钙剂、雌激素、维生素 D、降钙素类、双磷酸盐类等,虽然临床上具有一定的疗效,但不良反应较多。中药治疗

收稿日期:2017-12-29 接受日期:2018-07-09

基金项目:四川省中医药管理局科研项目(2016C050);四川省重点研发项目(2017SZ0075);国家自然科学基金(21402187)

\* 通信作者 Tel: 86-28-87634667; E-mail: tanrui@home.swjtu.edu.cn, chenxz@cib.ac.cn

骨质疏松症日益受到青睐,但其肝毒性也已引起重视。有些疗效确切、临床用药广、关注度高的知名中药如壮骨关节丸、仙灵骨葆胶囊(《2012 版中国国家基本药物目录》在列唯一补肾壮骨中成药)等有肝脏不良反应,且均已在《药品不良反应信息通报》公开,这对临床安全、合理用药带来极大挑战。前期我们发现,制首乌无毒<sup>[2]</sup>。已有研究报道,制何首乌含药血清能促进成骨细胞增殖<sup>[1]</sup>,大黄素能促进骨髓基质干细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)向成骨细胞方向分化,抑制 BMSCs 向脂肪细胞方向分化<sup>[3]</sup>。二苯乙烯苷能促进 BMSCs 碱性磷酸酶表达,刺激骨钙素分泌,上调 Colla1 和 Runx2 mRNA 的表达,增加 Wnt 信号通路核心蛋白( $\beta$ -catenin) mRNA 和蛋白的表达<sup>[4]</sup>。生、制首乌正己烷提取物对维甲酸诱发的骨质疏松是否有作用,未见报道。本实验通过检测骨代谢相关生化指标、骨密度、骨显微结构等探讨生、制首乌正己烷提取物对维甲酸致小鼠骨质疏松症的药效作用,为生、制首乌正己烷提取物的进一步开发利用和临床应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验药物

#### 1.1.1 生、制首乌正己烷提取物的制备

称取生或制首乌粉末 100 g,加入 500 mL 无水乙醇,超声波振荡提取 1 h,过滤,重复提取二次,合并提取液,减压回收溶剂至干,加入 150 mL 蒸馏水悬浮,用正己烷 200 mL  $\times$  3 萃取,合并萃取液,减压浓缩至干,浸膏用作抗骨质疏松药效学实验。

#### 1.1.2 药物

生、制首乌正己烷提取物。用 0.5% 羧甲基纤维素水溶液制成混悬,备用;尼尔雌醇片,北京四环制药有限公司生产;维甲酸(retinoic acid, RA),重庆华邦生化制药有限公司产品。

### 1.2 实验动物

昆明系小鼠,雌雄各半,开始试验体重 32 ~ 34 g,购于四川省医学实验动物中心 SCXK[川] 2008-14,每天接受 12 h 光照/12 h 黑暗,光照周期为 8:00 ~ 20:00,实验室温度  $20 \pm 2$  °C,湿度 60%,动物可以自行摄取标准饲料和清洁用水,动物实验遵守国际实验动物伦理学要求。小鼠适性饲养一周后进行实验。

### 1.3 分组及给药方案

取昆明种小鼠,SPF 级,180 只随机分组为正常

对照组、模型组(维甲酸  $105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),阳性对照组(尼尔雌醇  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),生首乌正己烷提取物高、低剂量组  $48$ 、 $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,清蒸制首乌正己烷提取物高、低剂量组  $48$ 、 $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,黑豆制何首乌正己烷提取物高、低剂量组  $48$ 、 $24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,每组 20 只,除正常对照组于每日上午灌胃生理盐水外,其它各组均于每日上午灌服维甲酸  $105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,连续灌胃 14 d,在造模的同时,阳性对照组及生、制首乌各剂量组给予不同浓度的受试药,给药期间隔天称量体重以调整给药量,停药次日,小鼠摘眼球取血,取股骨。

### 1.4 血清生化及相关激素检测

血清钙,ALP,TRAP 检测均按照试剂说明书进行,血清 BGP,E2 的含量用放免法测定。

### 1.5 骨组织形态计量学检测

取股骨用 10% 的福尔马林固定。常规石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜观察骨组织形态。

### 1.6 统计学方法

实验结果均以  $\bar{x} \pm S$  表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行处理,用 One-Way ANOVA 进行分析。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对血液生化指标的影响

与正常组比较,模型组血钙水平下降,用药后血清钙水平升高,生首乌各剂量组与模型组比较无显著性差异,制首乌各剂量组显著升高( $P < 0.05$ )。模型组 s-ALP,s-TRAP 显著升高( $P < 0.05$ ),生、制首乌各剂量组与模型组相比明显降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )(见表 1)。

### 2.2 对骨代谢相关激素水平的影响

模型组小鼠 s-BGP 水平显著高于正常组( $P < 0.05$ )。生、制首乌各剂量组能降低 s-BGP 水平,但与模型组比较无统计学差异。与正常组比较,模型组 s-E2 水平下降,生、制首乌各剂量组使体内 s-E2 显著上升( $P < 0.05$ )(见表 2)。

### 2.3 病理学形态观察

从常规病理切片来看,正常组骨皮质完整,较厚,骨髓腔内容物多,骨小梁大小粗细均匀,骨髓数量较多;模型组皮质变薄,骨小梁数量减少较为稀疏,细少,骨髓数量减少。各治疗组与模型组比较,骨组织形态均有不同程度的改善,其中豆制首乌高、低剂量组骨皮质显著增厚,骨髓生长较活跃,骨小梁

表1 生、制首乌对血液生化指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )Table 1 Effect of Raw and Processed *Polygoni Multiflori* on Blood Biochemical Indexes( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别 Group	剂量 Doses (g · kg <sup>-1</sup> )	碱性磷酸酶 s-ALP (U · L <sup>-1</sup> )	抗酒石酸酸性磷酸酶 s-TRAP (U · L <sup>-1</sup> )	血清钙 s-Ca (mmol · L <sup>-1</sup> )
正常组 Control	-	28.921 ± 5.776	2.511 ± 0.880	2.411 ± 0.681
模型组 Model	0.105	43.608 ± 7.815 <sup>3)</sup>	3.819 ± 0.825 <sup>3)</sup>	2.211 ± 0.138 <sup>3)</sup>
尼尔雌醇组 Nilestriol	0.002	33.748 ± 7.582 <sup>2)</sup>	2.659 ± 0.675 <sup>1)</sup>	2.158 ± 0.263
生首乌高剂量组 RPM-H	0.047	28.811 ± 9.854 <sup>2)</sup>	3.177 ± 0.870 <sup>1)</sup>	2.226 ± 0.218
生首乌低剂量组 RPM-L	0.024	28.235 ± 9.638 <sup>2)</sup>	2.610 ± 0.891 <sup>1)</sup>	2.240 ± 0.205
制首乌高剂量组-q PPM-Hq 0.047		28.128 ± 8.925 <sup>2)</sup>	1.914 ± 0.489 <sup>2)</sup>	2.611 ± 0.260 <sup>1)</sup>
制首乌低剂量组-q PPM-Lq 0.028		28.149 ± 9.135 <sup>2)</sup>	2.538 ± 0.876 <sup>1)</sup>	2.713 ± 0.282 <sup>1)</sup>
制首乌高剂量组-d PPM-Hd 0.027		27.928 ± 8.914 <sup>2)</sup>	1.782 ± 0.570 <sup>2)</sup>	2.958 ± 0.363 <sup>2)</sup>
制首乌低剂量组-d PPM-Ld 0.013		27.858 ± 8.635 <sup>2)</sup>	1.650 ± 0.490 <sup>2)</sup>	2.615 ± 0.236 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ,

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; Compared with control group, <sup>3)</sup>  $P < 0.01$

表2 生、制首乌对骨代谢相关激素水平的影响( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )Table 2 Effects of raw and Processed *Polygoni multiflori* on hormones related to bone metabolism( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

组别 Group	剂量 Doses (g · kg <sup>-1</sup> )	骨钙素 s-BGP (μg · L <sup>-1</sup> )	雌二醇 s-E <sub>2</sub> (μg · L <sup>-1</sup> )
正常组 Control	-	12.589 ± 5.312	13.023 ± 4.096
模型组 Model	0.105	30.608 ± 7.816 <sup>3)</sup>	9.268 ± 1.079 <sup>3)</sup>
尼尔雌醇组 Nilestriol	0.002	18.748 ± 7.082	15.820 ± 5.753 <sup>1)</sup>
生首乌高剂量组 RPM-H	0.047	20.811 ± 5.853	12.177 ± 3.701 <sup>1)</sup>
生首乌低剂量组 RPM-L	0.024	19.235 ± 5.238	12.110 ± 3.618 <sup>1)</sup>
制首乌高剂量组-q PPM-Hq	0.047	19.128 ± 5.925	13.014 ± 4.021 <sup>1)</sup>
制首乌低剂量组-q PPM-Lq	0.028	20.149 ± 5.935	13.038 ± 4.076 <sup>1)</sup>
制首乌高剂量组-d PPM-Hd	0.027	19.928 ± 5.314	18.782 ± 6.105 <sup>2)</sup>
制首乌低剂量组-d PPM-Ld	0.013	21.859 ± 5.635	14.550 ± 4.911 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; Compared with control group, <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ .

较为粗大,相互连接,排列整齐;阳性药组与模型组比较,骨皮质亦有增厚,骨小梁数量多且连接良好。

## 2.4 骨组织静态计量学观察

骨组织静态计量学指标观察表明,模型组小鼠发生了骨质疏松改变,表现在骨小梁数量及形态变化,骨小梁数量比正常组减少约 50%,MTPT(平均骨小梁宽度)明显变窄( $P < 0.01$ ),MBCT(平均骨皮质厚度)明显变薄( $P < 0.01$ )。经各给药组治疗后,与模型组比较,上述指标都出现了明显改善,骨小梁数明显增加(见表 3)。

## 3 讨论

维甲酸是维生素 A 的衍生物,临床上主要用于

肿瘤的化疗和皮肤病的治疗,大剂量服用会引发骨密度降低和骨形态结构的改变,进而造成骨质疏松。该反应与雌激素缺乏引起的骨质疏松极为相似,因此常被用作小鼠急性骨质疏松的造模方法<sup>[5]</sup>。骨代谢指标具有创伤小、快速灵敏的特点,对评价骨的状态有重要意义。血清碱性磷酸酶(s-ALP)可以部份反映成骨细胞的活性;抗酒石酸酸性磷酸酶(s-TRAP)是反应骨吸收的特征性酶<sup>[6]</sup>。本实验中,模型组小鼠 s-ALP, s-TRAP 显著升高( $P < 0.05$ ),生、制首乌各剂量组与模型组相比明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),结果表明维甲酸可造成高转换型骨质疏松。生、制首乌正己烷提取物可显著降低小鼠血清 ALP 和 TRAP 的水平,提示生、制首乌正己烷提取物

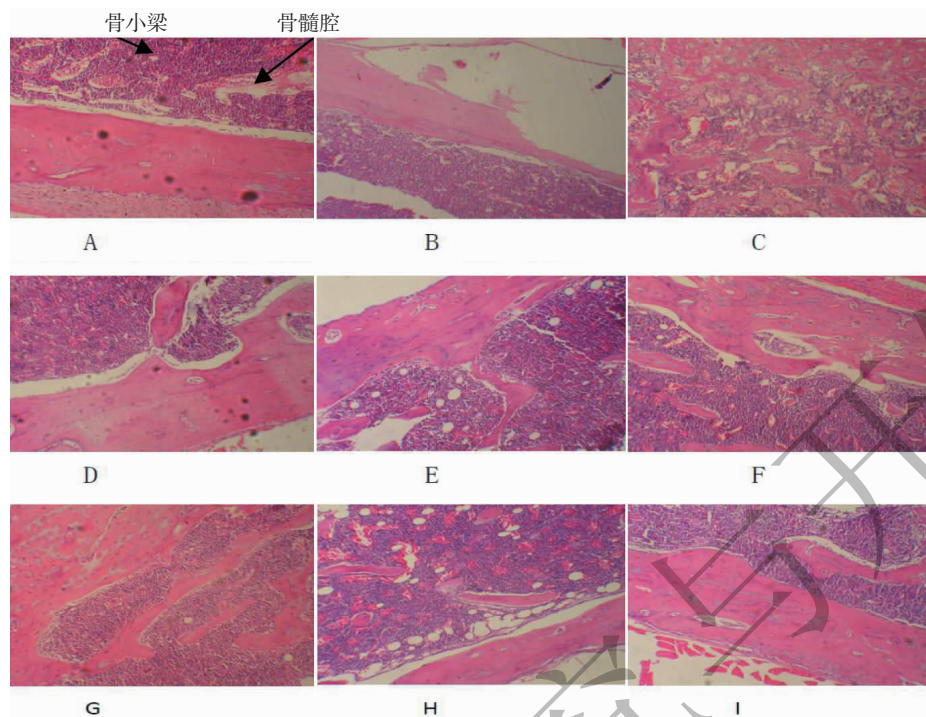


图1 骨组织病理切片

Fig. 1 Bone tissue biopsy

注:A 正常组;B 模型组;C 阳性组;D 生首乌高剂量组;E 生首乌中剂量组;F 清蒸制高剂量组;  
G 清蒸制中剂量组;H 黑豆制高剂量组;I 黑豆制中剂量组

Note: A Normal group; B Model group; C Positive group; D Raw radix polygoni multiflori high dose group; E Raw radix polygoni multiflori middle dose group; F Steaming raw radix polygoni multiflori high dose group; G Steaming raw radix polygoni multiflori high dose group; H Black soya bean high dose group; I Black soya bean middle dose group

表3 生、制首乌对骨组织静态计量学指标的影响( $\bar{x} \pm s, n=20$ )Table 3 Effects of raw and Processed *Polygoni Multiflori* Recipe on Static Metrology Indexes of Bone Tissues( $\bar{x} \pm s, n=20$ )

组别 Group	剂量 Dose ( $g \cdot kg^{-1}$ )	骨小梁数 Number	平均骨小梁宽度 MTPT ( $\mu m$ )	平均骨皮质厚度 MBCT ( $\mu m$ )
正常组 Control	-	8.40 ± 1.265	4.44 ± 0.816	23.00 ± 2.000
模型组 Model	0.105	3.70 ± 0.675 <sup>3)</sup>	2.20 ± 0.422 <sup>3)</sup>	16.50 ± 1.179 <sup>3)</sup>
尼尔雌醇组 Nilestriol	0.002	8.10 ± 0.876 <sup>2)</sup>	4.00 ± 0.667 <sup>2)</sup>	22.30 ± 1.767 <sup>2)</sup>
生高组 RPM-H	0.047	8.20 ± 1.033 <sup>2)</sup>	4.50 ± 0.707 <sup>2)</sup>	23.20 ± 2.201 <sup>2)</sup>
生低组 RPM-L	0.024	8.50 ± 1.434 <sup>2)</sup>	4.10 ± 1.197 <sup>2)</sup>	21.50 ± 2.415 <sup>2)</sup>
制高组-q PPM-Hq	0.047	5.40 ± 0.966 <sup>1)</sup>	3.90 ± 0.738 <sup>2)</sup>	19.20 ± 2.201 <sup>1)</sup>
制低组-q PPM-Lq	0.028	5.60 ± 1.506 <sup>2)</sup>	5.00 ± 0.943 <sup>2)</sup>	21.50 ± 2.121 <sup>2)</sup>
制高组-d PPM-Hd	0.027	8.50 ± 0.707 <sup>2)</sup>	3.80 ± 0.789 <sup>2)</sup>	22.50 ± 1.901 <sup>2)</sup>
制低组-d PPM-Ld	0.013	6.50 ± 1.434 <sup>2)</sup>	3.80 ± 0.632 <sup>2)</sup>	19.70 ± 2.001 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; Compared with control group, <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ .

可抑制骨吸,减小骨丢失。BGP 是成骨细胞合成和分泌的一种非胶原蛋白,是反应骨更新情况的一项特异性指标<sup>[7]</sup>。生、制首乌各剂量组能降低 s-BGP

水平,但与模型组比较无统计学差异。从实验所得数据可以看出,模型组小鼠发生了骨质疏松改变,骨小梁数量及形态变化,骨小梁数量比正常组减少约

50%,这一现象与临床上骨质疏松样症状相符<sup>[8,9]</sup>,经各给药组治疗后,上述指标都出现了明显改善。

中医理论认为“肝肾同源,乙癸同源,精血同源”骨骼的生长发育和修复有依赖于精血的营养滋润,肝肾亏虚则精血无源,无以生精养骨,髓枯筋痰,发为骨痿。发生骨质疏松症的主要原因是年老体弱、肾气不足、肾阳虚和肾阴虚、筋骨失养、经络不通、气血瘀阻,属本虚标实之疾。制首乌,补肝肾,药用价值极高。制首乌正己烷提取物能升高维甲酸所致骨质疏松症小鼠的骨密度,同时能有效改善骨小梁微结构退化的现象,有效抑制维甲酸所致骨质疏松症小鼠的高骨转换状态,增加钙吸收率,降低骨吸收,能有效地预防和治疗骨质疏松症,生、制首乌提取物对维甲酸致小鼠骨质疏松的治疗作用,其机制可能与减缓雌激素水平降低,抑制骨高转换有关,但制首乌临床使用毒性远小于生首乌,因此可作为治疗骨质疏松的有效药物之一。

#### 参考文献

- 1 Wu YL(吴有莲),Yang BY(杨璧宇),Gao JL(高建林),*et al.* Effects and mechanism of drug serum of prepared radix polygoni multiflori on rat osteoblast *in vitro* [J]. *Chin Med Mat*(中材),2011,34:1562-1565.
- 2 Wu XQ,Chen XZ,Huang QC,*et al.* Toxicity of raw and processed roots of *Polygonum multiflorum* [J]. *Fitoterapia*,2012,83(3):469-475.
- 3 Liu YY(刘钮瑜),Cui L(崔燎),Wu T(吴铁),*et al.* Effects of emodin on the proliferation and differentiation of

osteoblast isolated from neonatal rat calvarium *in vitro* [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报),2005,21:235-240.

- 4 Huang LF(黄连芳),Hao T(昊铁),Xie H(谢华),*et al.* Preventive and therapeutic effect of radix polygoni multiflori decoction on the loss of bone in ovariectomized rats [J]. *Chin J Gerontology*(中国老年学杂志),2005,25:709-713.
- 5 Chen WS(陈文双),Zhang XM(张雪梅),Lu JQ(卢家琪),*et al.* Preventive effect of Yupingfeng water extract on retinoic acid-induced osteoporosis in rats [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm*(广东医学院学报),2016,34:13-18.
- 6 Cheng M(程敏),Liu XY(刘雪英),Deng YT(邓雅婷),*et al.* Pharmacodynamics of Herba Ecliptae on retinoic acid induced osteoporosis in rats [J]. *Chin J Osteopor*(中国骨质疏松杂志),2016,22:1318-1322.
- 7 Li YQ(李银清),Zhao Y(赵雨),Sun XD(孙晓笛),*et al.* The therapeutic effects of sika deer velvet collagen hydrolysate on osteoporosis in rats by retinoic acid [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2010,35:759-762.
- 8 Zhang WY(张文勇),Shen XJ(沈秀娟),Xu WT(徐闻涛),*et al.* Effect and mechanism of traditional Chinese medicine and their active constituents in postmenopausal osteoporosis [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2012,37:1693-1699.
- 9 Zhou YM(周延萌),Song LQ(宋立群),Ma XQ(马晓茜),*et al.* Preventive effect of trifolium pratense isoflavones on retinoic acid induced osteoporosis in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报),2010,26:1658-1661.

(上接第2206页)

- 19 Yu R,Kaas Q,Craik DJ. Delineation of the unbinding pathway of alpha-conotoxin Iml from the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor [J]. *J Phys Chem B*,2012,116:6097-105.
- 20 Gorman K,Hewitt F,Denholm I,*et al.* New developments in insecticide resistance in the glasshouse whitefly (*Trialleurodes*

vaporariorum) and the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) in the UK [J]. *Pest Manag Sci*,2002,58:123-130.

- 21 Lee SJ,Tomizawa M,Casida JE. Nereistoxin and cartap neurotoxicity attributable to direct block of the insect nicotinic receptor/channel [J]. *J Agric Food Chem*,2003,51:2646-2652.