

棉铃虫幼虫加单氧酶活性的组织分布

邱星辉, 冷欣夫

(中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100080)

摘要:棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)6 龄幼虫不同组织的加单氧酶活性的测定结果显示,对-硝基苯甲醚 O-脱甲基酶主要分布于外来物质的入口部位,以中肠和脂肪体的活性较高,在前肠、后肠和马氏管等组织中有相对较低的活性,而在体壁和精巢中未检测到 O-脱甲基作用。体壁表现一定的艾氏剂环氧化作用,但其活性不及中肠的 10%,内源性抑制剂被证明并非体壁低加单氧酶活性的主要原因。不同组织生物量的差异及其动态变化,使不同组织在外源物质代谢中的相对重要性发生改变。

关键词:棉铃虫;加单氧酶活性;组织分布

The tissue distribution of monooxygenase activities of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*

QIU Xing-Hui, LENG Xin-Fu (Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Integrated Management of PEST Insects and Rodents, Beijing 100080, China)

Abstract: The demethylation of *p*-nitroanisole in various tissues of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, was examined. The highest activity of demethylase was found in midgut and fat body. Relatively low activities were expressed in foregut, Malpighian tubules and hind gut. No detectable demethylation existed in testis and integument tissues. Low aldrin epoxidation was detected in integument relative to midgut, and the potential endogenous inhibitor was proved not to be the cause for low *p*-nitroanisole demethylase and aldrin epoxidase activities in integument. The difference and dynamics of tissue biomass were the factors which resulted in the changes in total monooxygenase activities of specific tissue. The midgut and fatbody might play an important role in the xenobiotics metabolism.

Key words: tissue distribution; monooxygenase; *Helicoverpa armigera*

文章编号:1000-0933(2000)02-0299-05 中图分类号:Q14 文献标识码:A

生物体在自然界中与环境不断进行物质交换,接触各种不同的物质,其中有些物质对生物体是有害的,为了生存,生物体必须具备一定的适应能力,包括行为的、生理的、生化的等。通过体内的解毒酶来催化完成的代谢解毒作用是生物主要而常见的一种适应机制。解毒酶的种类很多,其中 P450 酶系的作用最为重要^[1]。

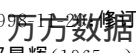
细胞色素 P450 酶系是广泛存在于各种生物的代谢酶系,它的主要成分是细胞色素 P450 和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶。由于 P450 种类的多样性,使生物体对许多结构不同的化学物质具有代谢作用,表现为 O-脱甲基、环氧化、羟基化等多种反应类型^[2]。昆虫中存在 P450 在 60 年代有所报道,P450 酶系因其在昆虫抗药性及昆虫对寄主植物适应性中的作用而受到重视,至今有关昆虫 P450 酶系的研究已深入到分子水平^[3]。

昆虫的不同组织具有不同的生理功能,担负着为生存繁衍的不同作用。在昆虫中起重要作用的 P450 酶系的分布规律是昆虫生物学的一个重要方面,成为 P450 研究的一个基本内容。P450 酶系在亚热带粘虫

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 39670491)

收稿日期:1999-11-22 修回日期:1999-10-14

作者简介:邱星辉(1965~),男,副研究员。



(*Spodoptera eridania*)^[4]、蝗虫(*Melanoplus sanguinipes*)^[5]、家蝇(*Musca domestica*)^[6]等几十种昆虫中的分布已得到阐明。棉铃虫是重要的经济害虫,对其重要的解毒酶系——P450 酶系的了解是理解棉铃虫对环境的适应性及认识杀虫剂抗性形成和发展的基础。以往对棉铃虫 P450 酶系活性的研究报道通常是有关中肠的结果^[7],在此本文试图更细致地了解 P450 酶系在棉铃虫不同组织的分布规律,考察不同组织的相对重要性。

1 材料与方法

1.1 试验

牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma 公司,NADPH, NADH(>98%)为 B.M 产品,Aldrin, Dieldrin (>99%)为 RIEDEL-DEHAENAGSEELZE-HANNOVER 生产,对-硝基苯甲醚(*p*NA)经重结晶(熔点为 54~55.5℃),其它试剂为国产分析纯。

1.2 试虫

为实验室种群,饲养环境为 25±1℃,光照昼:夜为 14:10,幼虫以黄豆粉、麦胚、干酵母为主要原料的人工饲料喂养。

1.3 酶制备

用整齐的 6 龄 3 日龄的棉铃虫幼虫(体重平均 400mg 左右),在 1.15%的 KCl 溶液中解剖,取不同组织。先去除肠组织中的内含物。清洗干净的组织用玻璃匀浆器在相同介质(1.15%的 KCl 溶液)中匀浆。匀浆液经 750g 离心,上清液过滤后为酶源。每次制备用虫数在 50 头左右。

1.4 O-脱甲基酶活性测定

以对-硝基苯甲醚为底物,参考 Hansen 和 Hodgson^[8],Shang 和 Soderlund^[9]等方法。反应体系的总体积为 2ml,含 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液,pH=7.8,0.25mmol/L NADPH 及 1ml 酶液。以 *p*NA 启动反应,在 25℃振荡温育 30min 后,加 1ml 1.0mol/L 的 HCl 溶液终止。在反应混和液中加入 5ml 的三氯甲烷提取反应产物对-硝基酚,离心分层。取 3ml 的三氯甲烷提取液,加入 3ml 的 0.5mol/L NaOH 溶液反萃取。NaOH 萃取液在 400nm 比色分析。以不同浓度的对硝基酚(*p*NP)作标准曲线来定量反应产物。

1.5 艾氏剂环氧化酶活性测定

参考 Lee 和 Scott^[5]方法,1ml 反应体系中包括 0.1ml 酶液,0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 pH=7.8,0.36mmol/L NADPH,用 5μl 艾试剂(4mg/ml,乙醇液)启动反应,在 25℃反应 10~15min 后,用 2ml 的冷石油醚(60~90℃)终止反应并提取产物狄氏剂,石油醚相经无水硫酸钠脱水后,用于气相色谱分析。色谱条件:ECD 检测器,30m×0.53mm 毛细管柱,固定相为 BPX-50,膜厚 0.5μm。进样口温度 250℃。柱温 230℃,检测器温度 300℃。柱流量 3.03ml/min,该条件样品保留时间为 6.3min,最小检出量为 1.0ng/ml。

1.6 蛋白含量测定

Bradford^[10]方法,以 BSA 为标准。

1.7 结果统计

除文中注明外,本文结果为 2 次独立实验的平均值,每次实验的酶系活性测定设 3 重复。

2 结果与分析

2.1 不同组织的比活力

O-脱甲基酶的比活力(图 1)在中肠最高,不同组织比活力的顺序为中肠>脂肪体>前肠>马氏管>后肠,在体壁和精巢未检测到 P450 O-脱甲基活性。

2.2 不同组织的总活力

考虑到不同组织的生物量不同,单用比活力(单位蛋白的产物量)往往夸大生物量小的组织而低估生物量大的组织的作用,在此引入总活力(单位组织的产物量)这一指标来在评价生物体不同组织的相对重要性。同样是 6 龄 3 日龄幼虫,不同组织总活力的排序与比活力不同,呈脂肪体>中肠>前肠>后肠>马氏管的格局。

2.3 O-脱甲基酶活性的日龄动态

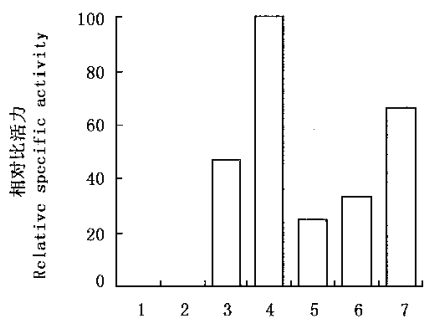


图 1 棉铃虫幼虫不同组织中 O-脱甲基酶的相对比活力(对-硝基苯酚/mg 蛋白)

Fig. 1 The relative activity (*p*-nitrophenol formed/mg Pr.) of *p*-nitroaniline demethylase in various tissues of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*.

1. 体壁 integument, 2. 精巢 testis, 3. 前肠 foregut, 4. 中肠 midgut, 5. 后肠 hindgut, 6. 马氏管 Malpighian tubules, 7. 脂肪体 fatbody

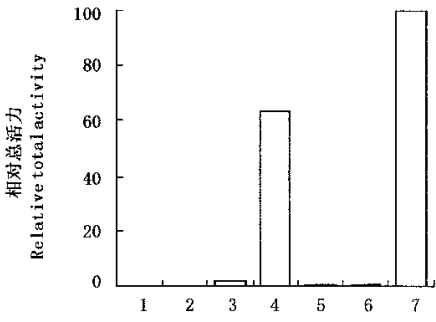


图 2 棉铃虫幼虫不同组织的 O-脱甲基酶的相对总活力(对硝基苯酚/组织)

Fig. 2 The relative activity (*p*-nitrophenol formed/tissue) of *p*-nitroaniline demethylase in various tissues of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*.

1. 体壁 integument, 2. 精巢 testis, 3. 前肠 foregut, 4. 中肠 midgut, 5. 后肠 hindgut, 6. 马氏管 Malpighian tubules, 7. 脂肪体 fatbody

在研究过程中注意到,不同组织 O-脱甲基活性不是固定不变的,随虫体的生长表现出动态的变化。比较中肠和脂肪体的总活力,随日龄的增加,中肠和脂肪体 O-脱甲基酶的总活力都呈增加趋势。因脂肪体生物量的增幅较中肠大,棉铃虫 6 龄幼虫在 3 日龄后脂肪体的 O-脱甲基酶的总活力超出中肠。生物量变化的不均衡,导致不同组织的相对重要性的动态变化。

2.4 关于体壁的加单氧酶活性

体壁构成棉铃虫的大部分,对昆虫的保护至关重要。在体壁中没有检测到 P450 O-脱甲基活性,经以艾氏剂为底物,用气相色谱法测定体壁酶制备液加单氧酶活性发现,体壁表现出一定的艾氏剂环氧化作用,但与中肠相比较其活性要低得多,无论总活力还是比活力都不及中肠的 10%(图 4)。

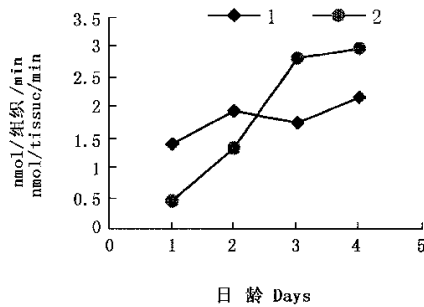


图 3 棉铃虫中肠和脂肪体组织 O-脱甲基酶活性的日龄动态(nmol/tissue/min)

Fig. 3 Age variation of pNA demethylation in midgut and fatbody tissues from 6th instar larvae of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*

1. 中肠 midgut, 2. 脂肪体 Fatbody

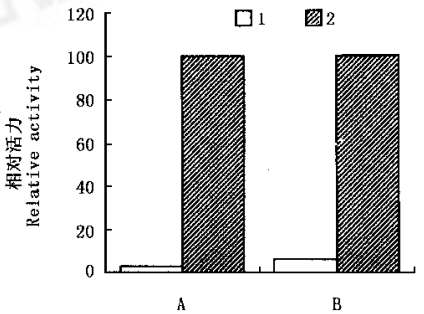


图 4 体壁与中肠艾氏剂环氧化酶相对活性

Fig. 4 The relative activities of Aldrin epoxylases in integument and midgut of *Helicoverpa armigera*.

A: 狄氏剂/毫克蛋白 Dieldrin/mg Pr., B: 狄氏剂/组织 Dieldrin/tissue

1. 体壁 Integument, 2. 中肠 Midgut

体壁表现的低活性有两种可能,一是本身活性低,二是因内源性抑制剂的抑制^[11]。通过下表所示结果不难看出,虽然(体壁+中肠)活性要比中肠低,体壁制备液的加入对中肠 O-脱甲基酶活性的抑制作用不显著,艾氏剂环氧化活性仍保持 80%。因此即使体壁有内源性抑制剂的存在,也不可能成为其加单氧酶低活性的全部原因。

3 讨论

昆虫 P450 酶系的组织分布因昆虫种类不同而不同,现难以得出一般性的结论。通常认为 P450 酶系主要分布于生物体的外来物质的入口部位以及物质代谢的重要场所,在昆虫中以中肠、脂肪体和马氏管为高^[4~5]。鳞翅目幼虫的肠组织通常具有最高的活性^[5~8],如亚热带粘虫,美洲棉铃虫(*Heliothis zae*)等。有些种类如粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)脂肪体活性高。马氏管组织在不同的种类的昆虫中差别较大,如小地老虎(*Agrotis ypsilon*)活性很高而粉纹夜蛾马氏管的活性很低^[12~14]。在棉铃虫多种组织中检测到 O-脱甲基酶活性,在外来物质的入口部位的肠组织和脂肪体组织中活性最高,作为代谢场所的马氏管也表现一定的活性,而在主要起物理屏障作用的体壁和担当生殖功能的精巢中未检测出 O-脱甲基活性。这充分表现了棉铃虫加单氧酶分布的多样性和选择性,体现出“需要而存在”的进化策略。

表 1 体壁(A)、体壁+中肠(A+B)、中肠(B)制备液的单氧酶活性(3 次实验的平均数(标准误))
Table 1 The activities of monooxygenases of integument(A), integument+midgut(A+B) and midgut(B)preparation
(mean (SE) of three experiments)

酶活性*	A	A+B	B
pNA O-脱甲基活性 pNA O-demethylation	0	0.694(0.029)	0.909(0.161)
艾氏剂环氧化活性 Aldrin epoxylation	1.14(0.04)	30.12(2.68)	36.48(0.82)

* nmol 对硝基酚或 ng 狄氏剂/min/反应,nmol *p*-nitrophenol or ng dieldrin/min/incubation

值得指出的是,不同组织在生物体中某种功能的相对大小,不能只根据其比活力的高低来评价,因为昆虫不同组织的生物量可能相差甚远。同时还要意识到昆虫在生长发育过程中,其生物量可能发生较大的变化,如初脱皮幼虫几乎没有脂肪体,而老熟幼虫,脂肪体充满整个虫体腹腔,生物量的改变使脂肪体表现出总活力的大幅日龄变动,因此评判某组织的重要性时要有动态的观点。

棉铃虫 P450 酶系的组织分布,还有从酶系成分和 mRNA 含量方面的研究报道。吴益东^[15]等比较了棉铃虫 6 龄幼虫不同组织微粒体中细胞色素 P450 和 b5 的含量,发现该两成分在中肠>脂肪体>体壁,表现与本研究结果相似的结果。Ranasinghe^[16]等检测了 P450 mRNA 的组织分布,发现 CYP6B2mRNA^[17]含量在脂肪体>体壁>前肠>中肠。mRNA 含量表现出与酶系组成和酶系活性测定结果不同的组织分布格局,这种差异反映出测定不同的指标可能得出不同的结论。考虑到 mRNA 到 P450 蛋白的表达需要经历一系列的分子过程,因此 mRNA 的量并不一定与其编码产物 P450 蛋白的量和酶系活性成线性正相关,因为不同的组织,基因表达调控的机制可能并不一致,而酶活性测定的结果是酶量与反应条件的综合体现,且反映的可能不止一种而是一类具有相同底物的多种 P450 蛋白的作用的总结果。

通过比较不同组织的加单氧酶活性,就棉铃虫而言,无论从总活力,还是比活力来看,中肠和脂肪体都占绝对优势,显示该两组织在棉铃虫物质代谢中的重要性。

参考文献

[1] Brattsten L B. Metabolic defenses against plant allelicchemicals. In: Rosenthal, GA and Janzen, D eds. *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. 2ndE, Vol 2: *evolutionary and ecological process*. Academic Press Inc. 1992. 219~242

[2] 邱星辉,冷欣夫. 细胞色素 P450 的多样性. 生命的化学,1997,17(6):13~16.

[3] Feyerherm F. Cytochrome P450 in Insect. In: Schenkman JB, et al, eds. *Cytochrome p450*. Berlin; Springer, 1993. 311~324.

- [4] Krieger R I and Wilkinson C F. Microsomal mixed-function oxidase in insects I. Localization and properties of an enzyme system affecting aldrin epoxidation in larvae of the southern armyworm (*Prodenia eridania*). *Biochem Pharmacol*, 1969, **18**:1403~1415.
- [5] Feng R and Isman M B. Tissue distribution and developmental changes in detoxication enzyme activities in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Acrididea). *Pestic Biochem. Physiol.* 1994, **48**:48~55.
- [6] Lee S S T and Scott J G. Tissue distribution of microsomal cytochrome P450 monooxygenases and their inducibility by phenobarbital in housefly, *Musca domestica* L. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 1992, **22**:699~711.
- [7] 张友军,张文吉,韩嘉来,等. 棉铃虫抗药性的生理生化机制研究. *昆虫学报*,1997, **40**(3):247~253.
- [8] Hansen L G and Hodgson E. Biochemical characteristics of insect microsomes; N-and O-demethylation. *Biochem. Pharmacol*, 1971, **20**:1569~1572.
- [9] Shang C and Soderlund D M. Monooxygenase activity of tobacco budworm (*Heliothis virescens* F.) larvae; Tissue distribution and optimal assay conditions for the gut activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 1984, **79B**:407~411.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*,1976, **72**:248~252.
- [11] Hodgson E. Microsomal mono-oxygenases. In: Kerkut GA and Gilbert, LI eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Oxford, England; Pergamon press, 1985. 225~321.
- [12] Gil D L, Rose H H, Yang R S H, *et al.* Enzyme induction by phenobarbital in the Madagascar cockroach, *Gromphadorhina portentosa*. *Comp. Biochem Physiol.* , 1974, 47B: 657~662.
- [13] Krieger RI, Wilkinson CF, Hicks L J, *et al.* Aldrin epoxidation, dihydroisodrin hydroxylation and p-chloro-N-methylaniline demethylation in six species of saturniid larvae. *J. Econ Entomol.* , 1976, **69**:1~5.
- [14] Brattsten L B, Price S L, Gunderson C A. Microsomal oxidases in midgut and fatbody tissues of abroadly herbivorous insect larvae, *Spedoptera eridania* Cramer (Noctuidae). *Comp Biochem Physiol.* , 1980, **66C**:231~237.
- [15] 吴益东,沈晋良,陈 进,等. 棉铃虫 6 龄幼虫微粒体细胞色素 P450 和细胞色素 b5 的测定及组织分布, *农业生物技术学报*,1997,**5**(3):297~301.
- [16] Ranasinghe C, Headlam M, Hobbs A A. Induction of the mRNA for CYP6B2, a pyrethroid inducible cytochrome P450, in *Helicoverpa armigera* (Hubner) by dietary monoterpenes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* , 1997, **34**:99~109.
- [17] Wang X P and Hobbs A A. Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for pyrethroid inducible cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* , 1995, **25**:1001~1009.