

# 保幼激素类似物及蜕皮甾类对亚洲玉米螟幼虫 酚氧化酶活性的影响

冯从经<sup>1</sup>, 戴华国<sup>2</sup>, 符文俊<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200025; 2. 南京农业大学农业部病虫害监测与治理重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:** 分别用 1  $\mu\text{g}/\text{头}$ 、0.1  $\mu\text{g}/\text{头}$  和 0.01  $\mu\text{g}/\text{头}$  浓度的保幼激素类似物 methoprene(蒙五一五)体外处理亚洲玉米螟 5 龄幼虫, 测定幼虫体壁组织、血清和血细胞溶离物中酚氧化酶的活性。结果表明: 1  $\mu\text{g}/\text{头}$  methoprene 处理组和 0.1  $\mu\text{g}/\text{头}$  处理组幼虫体壁组织中酚氧化酶活性与对照组相比有显著提高 ( $P < 0.01$ ), 血清和血细胞溶离物中酚氧化酶活性也显著上升 ( $P < 0.01$ )。将含有 20-羟基蜕皮酮的人工饲料饲喂亚洲玉米螟 5 龄幼虫, 处理组幼虫体壁组织的酚氧化酶活性下降 ( $P < 0.05$ ), 血清和血细胞溶离物中的酚氧化酶活性均低于对照组 ( $P < 0.01$ )。这些结果表明 methoprene 可以诱导亚洲玉米螟 5 龄幼虫体内酚氧化酶活性的上升, 而 20-羟基蜕皮酮则抑制了酚氧化酶的活性。

**关键词:** 亚洲玉米螟; 保幼激素类似物; 20-羟基蜕皮酮; 酚氧化酶

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)05-0562-05

## Effect of juvenile hormone analogue and ecdysteroids on the activity of phenoloxidase in larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae)

FENG Cong-Jing<sup>1</sup>, DAI Hua-Guo<sup>2</sup>, FU Wen-Jun<sup>1\*</sup> (1. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Disease and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The effect of juvenile hormone analogue (JHA), methoprene, and 20-hydroxyecdysone (20-E) on the activity of phenoloxidase in 5th instar larvae of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* was investigated. The activities of phenoloxidase in integument, hemolymph and hemocyte lysate of the treated *O. furnacalis* larvae were determined. The results showed that when larvae were treated with 1  $\mu\text{g}$  methoprene and 0.1  $\mu\text{g}$  methoprene, the activity of phenoloxidase in integument of the larvae was higher than that of the control group ( $P < 0.01$ ), and the activities of phenoloxidase in hemolymph and hemocyte lysate also increased significantly ( $P < 0.01$ ). When larvae were reared with the artificial diet supplemented with 20-hydroxyecdysone, the activity of phenoloxidase in the integument of the larvae was lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ), and the activities of phenoloxidase in hemolymph and hemocyte lysate decreased significantly ( $P < 0.01$ ). These results suggest that methoprene stimulates the activity of phenoloxidase, while 20-hydroxyecdysone, in contrast, inhibits the activity of phenoloxidase in *O. furnacalis* larvae.

**Key words:** *Ostrinia furnacalis*; juvenile hormone analogue; 20-hydroxyecdysone; phenoloxidase

昆虫体内的酚氧化酶 (phenoloxidase) 在表皮的骨化及对外源物的免疫防御过程中均起着十分重要的作用。酚氧化酶通常以酚氧化酶原 (prophenoloxidase) 的形式存在, 酚氧化酶催化酪氨酸的羟化反应, 产生多巴, 再将多巴氧化为醌, 醌直

接参与表皮的骨化和鞣化, 并作为合成黑色素的前体。通常昆虫表皮硬化是由激素调控的, 国内外研究集中在激素对鳞翅目幼虫酚氧化酶合成的控制以及表皮的黑化上, 认为保幼激素、蜕皮激素和神经内分泌因子在这些过程中起重要的作用 (Curtis *et*

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39930030)

作者简介: 冯从经, 男, 1974 年 10 月生, 昆虫生理生化博士, Tel.: 021-65643958; E-mail: fengcj1@hotmail.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 021-63366768; E-mail: fuwenjun@public6.sta.net.cn

收稿日期 Received: 2003-09-25; 接受日期 Accepted: 2004-12-01

al., 1984; Hiruma et al., 1984; Grossmiklaus-Burgin, 1989; 杜育哲等, 2002)。近年来, 已有直接证据证明昆虫蜕皮激素能与体壁上皮细胞的核受体结合, 诱导表皮蛋白的合成 (Gäde et al., 1997)。在自然或实验室条件下, 寄生蜂能保持一定程度的成功寄生比例, 其内分泌调节在抵抗寄主的免疫防御过程中也具有不可忽视的作用。但到目前为止, 对这些激素如何调控昆虫体内酚氧化酶的活力仅有零星报道, 本研究采用保幼激素类似物 (juvenile hormone analogue, JHA) methoprene (蒙五一五) 体外处理方法来探讨激素对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 幼虫体内酚氧化酶的调控方式。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

亚洲玉米螟幼虫在室内 ( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度  $> 90\%$ , 14L:10D 光周期条件下依周大荣等 (1980) 方法采用半人工饲料饲养, 根据头壳宽度来鉴别其龄期。

### 1.2 保幼激素类似物对幼虫的体外处理

先取 JHA 原液 (methoprene, 纯度 66%, 购自上海农药研究所)  $5 \mu\text{L}$ , 加入  $45 \mu\text{L}$  丙酮混匀, 标为 JHA1; 再取 JHA1 液  $5 \mu\text{L}$ , 加入  $45 \mu\text{L}$  丙酮, 混匀, 标为 JHA2。然后分别取 JHA、JHA1 和 JHA2 液  $1.5 \mu\text{L}$  点滴在刚进入 5 龄的亚洲玉米螟幼虫腹部节间膜上 (其中 methoprene 的量约为每头  $1 \mu\text{g}$ 、 $0.1 \mu\text{g}$  和  $0.01 \mu\text{g}$ ), 取不同浓度点滴后 1~8 天的幼虫, 每浓度每日龄各处理幼虫 30 头, 将血清、体壁组织和血细胞溶离物制样后测定酚氧化酶活性。每实验设 6 个重复, 另设丙酮处理组和未处理组为对照。

### 1.3 20-羟基蜕皮酮体外处理

取  $5 \text{ mg}$  20-羟基蜕皮酮 (纯度 90%, 购自上海有机化学研究所), 加入  $50 \mu\text{L}$  乙醇, 充分溶解; 再加入  $450 \mu\text{L}$  重蒸水, 得到  $500 \mu\text{L}$  的 20-羟基蜕皮酮液。将其加入  $49.5 \text{ g}$  饲料中充分搅拌混匀, 让刚进入 5 龄的亚洲玉米螟幼虫取食 2 天后, 再换成正常饲料, 继续饲养。取处理后 1~8 天的幼虫, 每日龄各处理幼虫 30 头, 将血清、体壁组织和血细胞溶离物制样后测定酚氧化酶活性。

### 1.4 血清及血细胞溶离物制备

取不同浓度处理的不同日龄的 5 龄亚洲玉米螟幼虫各 30 头, 剪破腹足将流出的血淋巴转移到含有少量的二甲胍酸钠 (CAC) 缓冲液 ( $10 \text{ mmol/L}$  二甲

胍酸钠,  $100 \text{ mmol/L}$  氯化钙,  $\text{pH } 6.5$ ) 的 Eppendorf 管中, 稀释后的血淋巴在  $4^{\circ}\text{C}$  下  $800 \times g$  离心  $10 \text{ min}$ , 转移上清液作为血清置低温冰箱保存, 分析前融冻。将血细胞沉淀用 CAC 缓冲液洗 2 次,  $4^{\circ}\text{C}$  下  $800 \times g$  离心  $10 \text{ min}$ , 在细胞沉淀中加入  $500 \mu\text{L}$  CAC 缓冲液, 冰浴下匀浆, 匀浆液  $4^{\circ}\text{C}$  下  $10\ 000 \times g$  离心  $10 \text{ min}$ , 上清液作为血细胞溶离物置低温冰箱备用。

### 1.5 体壁组织提取液制备

取不同处理的不同日龄的 5 龄亚洲玉米螟幼虫各 30 头, 在解剖镜下小心剪下亚洲玉米螟幼虫第 3 至第 6 腹节的体壁组织, 轻轻转移到滤纸上吸去水分, 冰浴匀浆,  $4^{\circ}\text{C}$  下  $10\ 000 \times g$  离心  $10 \text{ min}$ , 取上清液置低温冰箱保存, 分析前融冻。

### 1.6 酚氧化酶活性测定

参照 Jiang 等 (1997) 方法, 取  $50 \mu\text{L}$  粗酶液及  $40 \mu\text{L}$   $0.1 \text{ mol/L}$  氯代十六烷基吡啶 (CPC) 于比色杯中混匀,  $30^{\circ}\text{C}$  下温育  $10 \text{ min}$ , 再加入  $50 \mu\text{L}$   $0.02 \text{ mol/L}$  L-DOPA 作为底物继续温育  $1 \text{ min}$  后, 加入 CAC 缓冲液至总体积  $3.0 \text{ mL}$ 。在上海第三分析仪器厂生产的 752W 紫外可见分光光度计上测定  $490 \text{ nm}$  处  $1 \text{ min}$  内吸光值的增大值。每毫克蛋白每分钟吸光值增大  $0.001$  设定为 1 个酶单位, 实验重复 6 次, 计算酚氧化酶活性。

### 1.7 蛋白质浓度测定

采用 Bradford (1976) 的方法。

### 1.8 数据处理

数据采用 SPSS10.0 软件进行方差分析、 $t$  测验等统计分析。数值采用平均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD)。

## 2 结果与分析

### 2.1 保幼激素类似物对亚洲玉米螟幼虫体壁组织、血清和血细胞溶离物中酚氧化酶活性的影响

不同浓度的保幼激素类似物体表处理亚洲玉米螟 5 龄幼虫后, 其体壁组织中的酚氧化酶活性测定结果见图 1(A)。与对照组相比,  $1 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组和  $0.1 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组酚氧化酶的活性均有提高, 不同浓度处理组间差异显著 ( $P < 0.01$ )。酚氧化酶活性随处理浓度升高而升高, 表明保幼激素类似物可以提高亚洲玉米螟 5 龄幼虫体壁组织中酚氧化酶的活性。研究中还发现随着处理后亚洲玉米螟幼虫的发育, 酚氧化酶的活性呈上升趋势。以  $1 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组为例, 在处理 1 天时, 酚氧化酶活性为  $23.3 \pm 2.4$

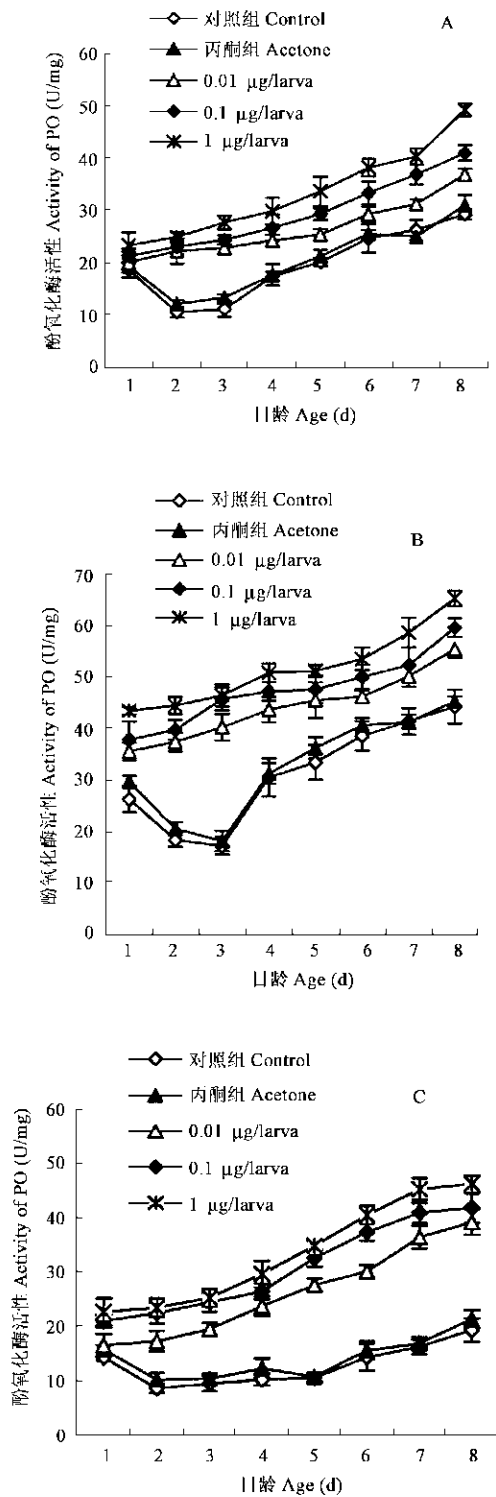


图1 保幼激素类似物对不同日龄玉米螟幼虫体壁组织 (A)、血清(B)和血细胞溶离物(C)酚氧化酶活性的影响

Fig. 1 Influence of JHA on the activity of phenoloxidase (PO) in integument (A), hemolymph (B) and hemocyte lysate (C) in *O. furnacalis* 5th instar larvae in different day-age

U/mg, 至8天时酚氧化酶的活性上升为  $49.3 \pm 1.2$  U/mg, 是1天时的2.1倍。说明保幼激素类似物对

于临近化蛹的体壁组织中酚氧化酶的活性诱导能力增强, 此时酚氧化酶活性升高有利于体壁组织的鞣化和硬化。

由图1(B)可知, 经保幼激素类似物处理的亚洲玉米螟幼虫其血清中的酚氧化酶活性也显著上升。其中以  $1 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组的酚氧化酶活性最高,  $0.1 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组酚氧化酶的活性次之,  $0.01 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组酚氧化酶的活性最低。此结果说明保幼激素类似物可以明显提高血清中酚氧化酶的活性。

处理组亚洲玉米螟血细胞溶离物中酚氧化酶活性测定结果见图1(C)。可以看出, 处理组的酚氧化酶活性明显高于对照组及丙酮处理组的。 $1 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组的活性与  $0.1 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组的酚氧化酶活性无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 而  $1 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组与  $0.01 \mu\text{g}/\text{头}$  处理组的酚氧化酶活性差异显著 ( $P < 0.01$ )。随着处理后亚洲玉米螟幼虫的发育, 血细胞溶离物中的酚氧化酶活性明显升高。

## 2.2 蜕皮激素类似物饲喂幼虫对体壁组织、血清和血细胞溶离物中酚氧化酶活性的影响

给亚洲玉米螟幼虫饲喂含有20-羟基蜕皮酮的人工饲料后发现处理组的体壁组织中酚氧化酶的活性明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图2: A)。处理组2天的酚氧化酶活性为  $10.7 \pm 1.9$  U/mg, 与对照组的  $10.7 \pm 1.7$  U/mg 相近; 处理组8天的酚氧化酶活性仅为  $4.4 \pm 0.4$  U/mg, 而此时对照组高达  $29.4 \pm 1.1$  U/mg, 说明20-羟基蜕皮酮可以抑制玉米螟幼虫体壁组织中酚氧化酶的活性。实验中发现饲喂20-羟基蜕皮酮的5龄亚洲玉米螟幼虫发育历期比对照组缩短1天, 幼虫体重及个体大小也相应变小, 这些生理现象可能与酚氧化酶活性的下降密切相关。

由图2(B)可知, 用20-羟基蜕皮酮处理的亚洲玉米螟幼虫血清中酚氧化酶的活性也被明显抑制 ( $P < 0.01$ ), 20-羟基蜕皮酮可能通过抑制酚氧化酶原激活系统中其他步骤而影响血清中酚氧化酶的活性。

由图2(C)结果可以看出, 处理组血细胞溶离物中酚氧化酶的活性也低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 20-羟基蜕皮酮可能直接控制了酶原的合成或激活。

## 3 讨论

经外源激素处理后, 幼虫体内的激素平衡失调, 导致昆虫的生理生化过程产生了复杂变化, 并由此影响到酚氧化酶的合成和酚氧化酶原激活系统的诸

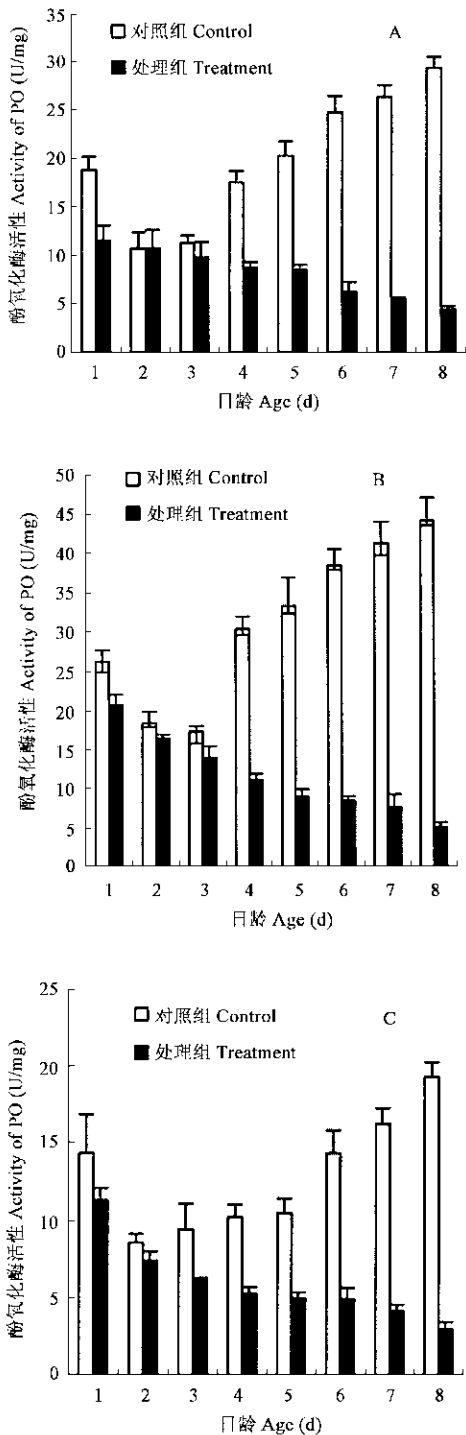


图2 20-羟基蜕皮酮对不同日龄玉米螟幼虫体壁组织(A)、血清(B)和血细胞溶离物(C)酚氧化酶活性的影响

Fig. 2 Influence of 20-hydroxyecdysone on the activity of phenoloxidase (PO) in integument (A), hemolymph (B) and hemocyte lysate (C) in *O. furnacalis* 5th instar larvae in different day-age

多步骤,从而对昆虫的发育产生影响。我们的实验结果证明采用保幼激素类似物 methoprene 体外处理亚洲玉米螟 5 龄幼虫可以诱导其体壁组织、血清和

血细胞中酚氧化酶的活性上升。由此可以看出,保幼激素类似物对酚氧化酶的活性有诱导或激活作用,也可能对酚氧化酶原激活系统中的有关步骤有激活作用,从而促进了酚氧化酶的活性。Figueiredo 等(1996)对意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 的研究也获得类似的结果。Hiruma 等(1984)发现采用 20-羟基蜕皮酮体外或体内处理都可以抑制酚氧化酶的活性,实验结果也证明了这种观点。综合上述研究结果,可认为昆虫发育期酚氧化酶的活力可以通过保幼激素和蜕皮激素的协同作用进行调节。Ahmed 等(1999)研究证明冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* PPO1 (*Ag PPO1*) 基因对 20-羟基蜕皮酮有反应,并发现 *Ag PPO1* 基因启动子区包含一个蜕皮激素反应元件 (ecdysteroid response element, EcRE), EcRE 可以功能性地同冈比亚按蚊内源性的异源二聚体 EcR/USP (ecdysteroid receptor/ultraspiracle protein) 结合。Gilbert 等(2000)的研究还表明保幼激素也可以与专一性受体 USP 结合,然后与蜕皮激素受体组成异源二聚体,从而决定昆虫的发育性状。此外还发现保幼激素类似物对其表皮色素沉积和硬化有明显影响,Bitondi 等(1998)用保幼激素类似物 pyriproxyfen 对意大利蜜蜂的蛹进行体外处理后发现意大利蜜蜂蛹的发育受阻,但在 5 龄幼虫期、蛹期和白蛹期(无色素沉积期)可诱导酚氧化酶活性上升,从而诱导黑色素的产生。在果蝇中也有遗传学证据表明酚氧化酶在蛹表皮形成的整个过程中起重要作用 (Pentz *et al.*, 1986)。

20-羟基蜕皮酮是节肢动物体内的主要蜕皮甾类激素,它在很大程度上控制着昆虫的蜕皮、变态和生殖。有研究报道烟草天蛾 *Manduca sexta* 幼虫在头壳裂开阶段保幼激素滴度下降,在特定的条件下酚氧化酶原可以与新生成的表皮相结合;而在蜕皮激素滴度下降时酚氧化酶原则变为有活性的酚氧化酶,导致黑色素的合成 (Riddiford, 1994)。Riddiford (1994)认为在蜕皮激素峰到来之前而头壳裂开时用外源保幼激素处理能抑制酚氧化酶原的合成和黑化。已有许多证据表明酚氧化酶是由血细胞产生的 (Schmitt *et al.*, 1977; Lanz *et al.*, 1993), Hiruma 等(1985)发现激素调控着颗粒细胞中酚氧化酶的合成, Ahmed 等(1999)也发现 20-羟基蜕皮酮可以调控酚氧化酶原基因在冈比亚按蚊中的表达,但尚不清楚 20-羟基蜕皮酮是在转录水平上还是在翻译水平上影响酚氧化酶的活性。昆虫激素调控酚氧化酶活性的机理尚不清楚,保幼激素和蜕皮激素是如何

协同作用于酚氧化酶原的激活系统有待进一步深入研究。

### 参考文献 (References)

- Ahmed A, Martín D, Manetti AG, Han SJ, Lee WJ, Mathiopoulos KD, Müller HM, Kafatos FC, Raikhel A, Brey PT, 1999. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (26): 14 795 - 14 800.
- Bitondi MMG, Mora IM, Simões ZLP, Figueiredo VLC, 1998. The *Apis mellifera* pupal melanization program is affected by treatment with a juvenile hormone analogue. *J. Insect Physiol.*, 44: 499 - 507.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72: 248 - 254.
- Curtis AT, Hori M, Green JM, Wolfgang WJ, Hiruma K, Riddiford LM, 1984. Ecdysteroid regulation of the onset of cuticular melanization in allatectomized and black mutant *Manduca sexta* larvae. *J. Insect Physiol.*, 30: 597 - 606.
- Du YZ, Guo SY, Wang XL, Liu AX, Wang QM, Huang RQ, 2002. The effects of a new type of nonsteroidal ecdysteroid agonist on cuticle formation in larvae of the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Acta Entomologica Sinica*, 45(6): 748 - 752. [杜育哲, 郭世宜, 王秀玲, 刘安西, 汪清民, 黄润秋, 2002. 新型非甾醇蜕皮激素类杀虫剂对棉铃虫幼虫蜕皮的影响. 昆虫学报, 45(6): 748 - 752]
- Figueiredo VLC, Paulino-Simoes ZL, Bitondi MMG, 1996. Developmental pattern of esterase in *Apis mellifera* honey bees. I. Stage-development changes of esterase isozymes in Africanized worker. *Apidologie*, 27: 47 - 54.
- Gäde G, Hoffmann KH, Spring JH, 1997. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiol. Review*, 77: 963 - 1 032.
- Gilbert LI, Granger NA, Roe RM, 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 617 - 644.
- Grossniklaus-Burgin C, 1989. Ecdysone metabolism in the host-parasitoid system *Trichoplusia ni*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 11: 79 - 92.
- Hiruma K, Matsumoto S, Isogai A, Susuki A, 1984. Control of ommochrome synthesis by both juvenile hormone and melanization hormone in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. *Journal of Comparative Physiology*, 154: 13 - 21.
- Hiruma K, Riddiford LM, Hopkins TL, Morgan TD, 1985. Role of dopa decarboxylase and phenoloxidase in the melanization of the tobacco hornworm and their control by 20-hydroxyecdysone. *Journal of Comparative Physiology B*, 155: 659 - 669.
- Jiang HB, Wang Y, Korochkina SE, Benes H, Kanost MR, 1997. Molecular cloning of cDNA for two pro-phenol oxidase subunits from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 693 - 699.
- Lanz H, Tsutsumi V, Arechiga H, 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 389 - 397.
- Pentz ES, Black BC, Wright TRF, 1986. A diphenol oxidase gene is part of a cluster of genes involved in catecholamine metabolism and sclerotization in *Drosophila*. I. identification of the biochemical defect in *Dox-A2*[1(2)37Bf] mutants. *Genetics*, 112: 823 - 841.
- Riddiford LM, 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in Insect Physiology*, 24: 213 - 274.
- Schmitt AR, Rowley AF, Ratcliffe NA, 1977. The role of *Galleria mellonella* hemocytes in melanin formation. *J. Invert. Pathol.*, 29: 232 - 234.
- Zhou DR, Ju ZL, Liu BL, Wang YY, 1980. Studies on the mass rearing of corn borer: I. Development of a satisfactory artificial diet for larval growth. *Acta Phytophyl. Sin.*, 7: 113 - 122. [周大荣, 剧正理, 刘宝兰, 王玉英, 1980. 玉米螟人工大量繁殖研究: I. 一种半人工饲料及其改进. 植物保护学报, 7(2): 113 - 122]

(责任编辑: 黄玲巧)