

长管蚜激脂激素提取物生物活性的研究

吴振廷

R.E. Isaac

(安徽农学院,合肥 230036)

(利兹大学,英国)

摘要 激脂激素和高血糖激素已在某些昆虫种类中发现,但是到目前为止还未涉及到同翅目昆虫。本研究,从同翅目昆虫长管蚜 *Macrosiphum* sp. 体内分离了激脂激素提取物,并进行了生物活性测定。结果证明,这种提取物具有很高的生物活性,注射 20 毫克蚜虫重的提取物,能使试虫沙漠蝗与美洲蜚蠊体液中脂肪含量和糖含量分别增加 131.03% 和 60.43%。试验结果还展示出长管蚜激脂激素提取物激脂效应要比高血糖效应高得多,它们的生物活性能被内肽酶 24:11, 焦谷氨酰胺基肽酶和沸水浴抑制或破坏。

关键词 长管蚜虫 沙漠蝗 美洲蜚蠊 激脂激素

激脂激素 (Adipokinetic hormone, AKH) 是昆虫心侧体分泌的一类同族肽激素,这类激素不仅能调控昆虫体内脂肪的转运和利用,对碳水化合物代谢也起重要作用 (Orchard, 1987)。近年来,有关激脂激素研究很多,据报道已从 10 种昆虫中分离出 12 种激脂激素,并确定了它们氨基酸的组成和排列顺序 (Kealey 等, 1989)。Gäde (1990) 列举了很多昆虫心侧体提取物具有激脂激素生物活性,这些昆虫主要属直翅目、蜚蠊目,其次属鞘翅目和鳞翅目。

同翅目昆虫蚜虫类比上述各目昆虫有较为特殊的生活习性、营养要求和代谢方式。研究蚜虫类激脂激素及其生理作用对开拓新的防治对策,研究杀虫新农药有重要意义。作者从长管蚜 (*Macrosiphum* sp.) 体内分离了激脂激素提取物,并进行了生物活性的研究,现将结果报道如下。

材料和方法

(一) 材料收集 在英国利兹大学实验植物园内,从戟科植物 (*Euphorbia palustris*) 寄主上收集长管蚜 (*Macrosiphum* sp.) 活虫,称重后速冻,在 -20°C 条件下保存备用。

(二) 激脂激素初提物的分离 提取参照 Gäde (1984) 的方法进行。将蚜虫放进研磨器,加适量 0.1% 乙酸、甲醇、水溶液 (简称 MHA) 在冰中研磨 10—15 分钟,然后离心 (2200 转/分) 2.0 分钟。移去上清液,将残渣再次研磨和离心分离。上清液合并利用旋转蒸发器干燥,再加入 0.10% 三氟乙酸 (简称 TFA) 溶解,溶液通过分离容器 (SEP-PAK C_{18} Cartridge) 分离,利用 60% 乙腈 TFA 溶液洗脱,定量分装在微形离心管内,利用旋转蒸汽干燥器干燥,冷冻保存在 -20°C 条件下,测定时用里查氏生理盐水 (Ringer's Solution) 溶解。

(三) 生物活性测定 长管蚜激脂激素提取物的生物活性测定参照 Goldsworthy 等 (1972) 和 Stone 等 (1980) 的方法。

1. 激脂作用的测定 群体饲养沙漠蝗 (*Schistocerca gregaria*)。养虫室温度 30℃, 光照 14 小时。选用羽化后 15 天雄性蝗虫为试虫, 供试个体分别吸取 4 微升体液, 放入试管中并立即注射 10 微升不同浓度的激脂激素提取物溶液, 对照组注射等量的生理盐水。注射后的试虫放回养虫笼, 90 分钟后, 吸取等量的体液用如下方法测定注射前后沙漠蝗体液脂肪含量变化。

将盛有体液样本试管中分别加入 1.5 毫升 0.02% 萘酚硫酸溶液充分混合, 放进沸水中加热 10 分钟后, 立即取出放入冰中冷却 5 分钟。另取试管, 每管中移入 2.5 毫升总脂综合试剂 II, 分别精确地移入 0.10 毫升上述处理后的溶液, 充分混合, 静置 30 分钟, 用 SP1800 紫外分光光度计测定光密度, 波长为 530nm。以总脂综合试剂 I 为标样, 用同样方法制作标准曲线, 求出样本体液脂肪含量。

2. 高血糖作用的测定 以美洲蜚蠊 (*Periplaneta americana*) 为试虫, 测定时, 取羽化后 10 天的雄性个体, 每个虫收取体液 4 微升, 并立即注射 10 微升不同浓度的激脂激素提取物溶液, 对照处理注射等量的昆虫生理盐水。将注射后的试虫放回养虫盒中, 60 分钟后, 再吸取等量体液, 用萘酚方法测定注射前后血糖含量变化。

将盛有体液样本的试管分别加入 1.5 毫升 0.02% 萘酚硫酸溶液, 充分混合后, 在沸水中加热 10 分钟, 立即放入冰中冷却 5 分钟后, 利用 SP1800 紫外分光光度计测定光密度, 波长为 585nm。同时利用海藻糖为标样, 制作标准曲线, 求出各处理体液含糖量。

3. 提取物活性抑制的测定 在盛有 50 微升提取物溶液的微形离心管中, 加入 5 微升生物制剂内肽酶 24:11 (endopeptidase 24:11) 或焦谷氨酰胺基肽酶溶液 (pyroglutamyl aminopeptidase) 放进水浴恒温箱内在 37℃ 条件下持续 3 小时后, 测定提取物生物活性变化。

另取提取物移入离心管, 放入沸水中加热 2 分钟, 立即在冰中冷却, 测定提取物的热稳定性。

结 果

(一) 激脂效应 从长管蚜体内提取的激脂激素提取物对试虫沙漠蝗有很强的激脂效应 (表 1), 注射 5 毫克蚜虫重的提取物, 使沙漠蝗体液脂肪含量由 15.79 微克/微升上升到 22.94 微克/微升, 相当于注射前的 162.58%, 10 毫克蚜虫重的提取物使沙漠蝗体液脂肪含量由 15.08 微克/微升上升到 31.92 微克/微升, 相当于注射前体液脂肪含量的 226.98%。

(二) 高血糖效应 激脂激素提取物在美洲蜚蠊体内的高血糖效应见表 2。

从表 2 可以看出, 提取物对试虫美洲蜚蠊体液含糖量增加有显著的生理效应, 注射前后试虫体液内血糖含量变化很大。例如注射相当 40 毫克蚜虫重的初提物溶液, 试虫体液含糖量由 17.08 微克/微升, 上升到 31.25 微克/微升, 相当于注射前的 180.69%。

以上结果表明, 长管蚜激脂激素提取物能激活靶组织向体液中释放脂肪和糖。随着提取物注射量的增加, 体液中脂肪和糖含量随之升高。但是, 提取物注射量增加到较高剂

表 1 激脂激素提取物激脂效应

| 注射剂量* (mg/头) | 体液脂肪含量 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | | 体液脂肪 增加 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) |
|-----------------|--------------------------------------|-------------------|--|
| | 注射前 | 注射后 | |
| 0 | 17.00 \pm 4.36 | 18.00 \pm 6.29 | 1.00 \pm 1.95 |
| 5 | 15.79 \pm 9.53 | 22.94 \pm 11.46 | 7.15 \pm 3.60 |
| 10 | 15.08 \pm 5.13 | 31.92 \pm 4.91 | 16.92 \pm 3.68 |
| 20 | 15.69 \pm 5.27 | 34.88 \pm 9.93 | 19.19 \pm 8.38 |
| 40 | 14.54 \pm 3.62 | 34.83 \pm 11.45 | 20.29 \pm 8.71 |

* 提取物剂量以蚜虫重量计算,各处理虫数为 5 头以上沙漠蝗雄虫。

表 2 激脂激素提取物高血糖效应

| 注射剂量* (mg/头) | 体液含糖量 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | | 体液含糖量增加 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) |
|-----------------|-------------------------------------|------------------|--|
| | 注射前 | 注射后 | |
| 0 | 17.95 \pm 3.50 | 22.11 \pm 6.50 | 4.17 \pm 3.42 |
| 10 | 24.45 \pm 2.04 | 33.67 \pm 4.41 | 9.22 \pm 4.86 |
| 20 | 21.04 \pm 3.69 | 32.83 \pm 4.04 | 11.79 \pm 6.24 |
| 40 | 17.08 \pm 3.80 | 31.25 \pm 9.31 | 14.17 \pm 5.59 |
| 60 | 17.59 \pm 0.68 | 33.17 \pm 4.72 | 15.58 \pm 4.53 |

* 注射剂量以蚜虫重量计算,各处理虫数为 5 头以上美洲蜚蠊雄虫。

量后,体液中脂肪和糖含量的上升趋于减弱,构成了剂量反应曲线(图 1)。

从图中可以看出,提取物激脂效应显著高于高血糖效应,例如同样注射 10 毫克蚜虫重的初提物,体液中脂肪含量增加比率为 126.35%,含糖量增加 38.30%;注射 20 毫克蚜虫重的初提物,体液中脂肪和糖含量分别增加 131.0% 和 60.43%。

(三) 酶和高温活性抑制作用 长管蚜激脂激素提取物经内肽酶 24:11 和焦谷氨酰胺基肽酶分解或沸水浴之后,注入沙漠蝗体内,测定不同处理对提取物活性抑制作用,注射剂量相同,每头雌虫注射 20 毫克蚜虫重的提取物溶液,结果见表 3。

从表中可以看出,内肽酶 24:11 和焦谷氨酰胺基肽酶能够水解长管蚜激脂激素提取物,降低其生物活性,其中内肽酶 24:11 破坏初提物生物活性作用最大,提取物未经处理,注射试虫以后,体液脂肪含量增加 19.19 微克/微升,经内肽酶 24:11 处理以后,注入试虫体腔内,体液中脂肪含量仅增加 11.63 微克/微升。实验结果还显示,沸水浴能抑制提取物活性,说明长管蚜激脂激素提取物具有热稳定性较低的特性。

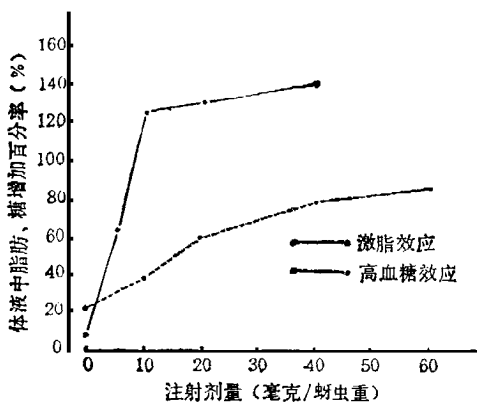


图 1 激脂激素提取物生物活性反应曲线

表 3 酶和高温对提取物活性抑制作用

| 处 理 | 剂量* (mg/头) | 体液脂肪含量 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | | 体液脂肪增加 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) |
|---------------|---------------|--------------------------------------|------------------|---|
| | | 注射前 | 注射后 | |
| 生理盐水 | 0 | 17.00 \pm 4.36 | 18.00 \pm 6.29 | 1.00 \pm 1.95 |
| 初提物 | 20 | 15.69 \pm 5.27 | 34.88 \pm 9.93 | 19.19 \pm 8.38 |
| 提取物+内肽酶 24:11 | 20 | 11.50 \pm 1.85 | 23.13 \pm 6.28 | 11.63 \pm 5.39 |
| 提取物+焦谷氨酰胺基肽酶 | 20 | 17.63 \pm 2.45 | 33.42 \pm 3.19 | 15.58 \pm 5.00 |
| 提取物沸水浴 | 20 | 13.15 \pm 4.34 | 25.73 \pm 5.80 | 12.58 \pm 5.11 |

* 每头试虫注射 10 微升相当 20 毫克蚜虫重提取物生理盐水溶液, 每处理注射 5 头以上沙漠蝗雄虫。

讨 论

(一) 昆虫激脂激素和高血糖激素的研究报道很多, 大多数是利用生物测定的方法发现这类激素, 研究其提取物的生物活性和生理作用 (Gäde 1990)。本研究报道了蚜虫体内存在活性很高的激脂激素类肽激素。

(二) 激脂激素和高血糖激素是同族肽激素, 激脂激素同样具有高血糖生理效应, 能提高昆虫体液含糖量 (Orchard, 1987), 而同种昆虫又可能具有一种以上的肽激素 (Loughton 等, 1981), 目前作者正在进行纯化所分离的激脂激素提取物, 以确定长管蚜体内肽激素组分和性质。

(三) 激脂激素类肽激素是昆虫的生理调节激素, 在研究中发现, 试虫不同的生命阶段和生理状态, 对外源激素反应有很大的差别, 同时激脂效应和高血糖效应有相互制约作用, 因此激脂激素的性质和作用需要深入研究, 调控机制有待进一步阐明。

参 考 文 献

- Gäde, G. et al. 1984 Single step purification of locust adipokinetic hormones I and II by reversed-phase high-performance liquid chromatograph, and amino acid composition the hormone II. Hopper-Seyler's Z. Physiolchem. Bd. 365 S. 393—398.
- Gäde, G. 1990 The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family: structure, interrelationships and functions. *J. Insect Physiol.* 36(1): 1—12.
- Goldsworthy, G. J. et al. 1972 Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology.* 18: 545—51.
- Keeley, L. L. et al. 1989 Insect neuroendocrinology: its past, its present; future opportunities. in "Insect Neurochemistry and Neurophysiology". edited by A. B. Borkovec and E. P. Masler.
- Loughton, B. G. et al. 1981 The nature of the hyperglycaemic factor from the glandular lobe of the corpus cardiacum of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 27: 383—5.
- Orchard, I. 1987 Adipokinetic hormones—an update. *J. Insect Physiol.* 33(7): 451—63.
- Stone, J. V. et al. 1980 Adipokinetic hormone. in "Neurohormonal Techniques in Insect" (edited by T. A. Miller). 31—80.

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ADIPOKINETIC HORMONE EXTRACT FROM AN APHID, *MACROSIPHUM* SP.

WU ZHEN-TING

(*Anhui Agricultural College, Hefei 230036*)

R. E. ISAAC

(*University of Leeds, England*)

Adipokinetic and hyperglycemic hormones have been discovered in several insects, but no approach has been made to homopterans. In this study, crude extract of adipokinetic hormone was isolated from an aphid, *Macrosiphum* sp., and its biological activities were tested. Injection of the crude extract equivalent to 20 mg aphids into *Schistocerca gregaria* and *Periplaneta americana* caused increases of lipid and sugar levels in haemolymph by 131.03% and 60.43%, respectively. The results showed that the extract had a much higher adipokinetic activity than hyperglycemic effect. The activities could be suppressed by treatment with endopeptidase, pyroglutamyl aminopeptidase or high temperature.

Key words *Macrosiphum* sp.—*Schistocerca gregaria*—*Periplaneta americana*—
adipokinetic hormone