

棉铃虫幼虫中肠微粒体 P450 差光谱与 O-脱甲基酶的酶学特征及其可诱导性*

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* (Hübner) 幼虫中肠微粒体制备液的 CO 差光谱在 450 nm 有吸收峰, P450 含量为 (687 ± 11) pmol/mg。中肠 750 g 离心的上清液的 O-脱甲基酶活性在酶量相当 5 个中肠、反应时间 30 min 内与酶量和反应时间呈线性关系; 最适 pH 值在 7.8, 最适温度为 20~25°C。酶系对底物对-硝基苯甲醚的 O-脱甲基活性的 $K_m = 1.23$ mmol/L, $V_{max} = 2.54$ nmol 对-硝基酚 / (mg·min)。NADPH 为酶活的重要因子, 离体测定时, O-脱甲基酶在无外来 NADPH 的活性仅为加 0.25 mmol/L NADPH 的 16%。在反应体系中加入 1.5% BSA 明显促进产物的生成。P450 的专一性抑制剂 PBO 浓度达到 1 mmol/L 时, 可抑制酶 90% 的活性。棉铃虫取食含 0.25% 苯巴比妥钠的食物 72 h 后, O-脱甲基酶活性是对照组的 1.73 倍。

关键词 P450, O-脱甲基酶, 诱导作用, 苯巴比妥, 棉铃虫

细胞色素 P450 酶系 (又称多功能氧化酶, MFO) 在昆虫中的作用关系到昆虫生存和繁衍, 它不仅对许多外源性物质如杀虫剂、植物次生物质有代谢作用, 还参与具有重要生理功能的激素及脂肪酸等的代谢调控^[1]。P450 酶系代谢解毒作用的增强是大多数重要害虫产生抗药性的机制。自 MFO 及其生理功能发现以来, 该酶系一直是昆虫毒理学研究的一个重要目标。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 是世界性害虫, 为害多种作物, 具有极大的经济学和生态学重要性^[2~4]。棉铃虫因抗性问题导致防治工作的失败, 已造成了严重的经济损失。近年来, 棉铃虫抗性机制的研究得到广泛的开展, 在昆虫抗药性中起主要作用的 P450 成为众多研究的目标。但大多研究者往往停留在证明 P450 酶系在杀虫剂抗药性中的作用^[2~4], 对酶系本身的生物化学特征未作进一步的分析。本研究的目的在于揭示棉铃虫中肠 P450 酶系的一些基本的生物化学特征, 也为研究棉铃虫对外源物质的代谢确立优化的离体测定条件。

1 材料与方法

1.1 试剂

NADPH 和 NADH 为 BM 产品, 增效醚 (PBO) 由 BDH 公司提供, 牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Sigma 公司, 对-硝基苯甲醚 (pNA) 经重结晶 (熔点为 54~55.5°C), 其它试剂为国产分析纯。

* 国家自然科学基金资助项目 (39670491)
1998-03-11 收稿, 1998-10-28 收修改稿

1.2 试虫

为实验室种群, 饲养环境为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照昼:夜为 14:10。以黄豆粉、麦胚、酵母粉为主要成分的人工饲料喂养。诱导试验: 将刚脱皮的 6 龄幼虫, 供以含 0.25% 苯巴比妥钠的新鲜人工饲料, 72 h 用作试验。

1.3 酶制备

取 6 龄 3 日龄的棉铃虫幼虫 (体重平均 400 mg 左右), 在 1.15% 的 KCl 溶液中解剖, 取中肠, 去除内含物。清洗干净的中肠用玻璃匀浆器以 3 头/mL~5 头/mL 在相同介质中匀浆。匀浆液经 750 g 离心, 上清液过滤后为酶源。

1.4 O-脱甲基酶活性测定

以对-硝基苯甲醚为底物, 参考 Hansen & Hodgson^[5], Shang & Soderlund^[6] 等方法。反应体系的总体积为 2 mL, 含 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液, pH=7.8, 0.25 mmol/L NADPH 及 1 mL 酶液。以 *p*NA (溶于 30 μL 乙醇) 起始反应, 在 25 $^\circ\text{C}$ 振荡温育 30 min 后, 加 1 mL 1.0 mol/L 的 HCl 溶液终止。在反应混和液中加入 5 mL 的三氯甲烷提取反应产物对-硝基酚, 离心分层。取 3 mL 的三氯甲烷提取液, 加入 3 mL 的 0.5 mol/L NaOH 溶液反萃取。NaOH 萃取液在 400 nm 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。用每分钟每毫克蛋白产生的对-硝基酚的摩尔数来表示酶的活性。

1.5 微粒体的制备

参照 Yu^[7] 的方法。

1.6 P450 含量的测定

按 Omura & Sato^[8] 方法。

1.7 蛋白含量测定

采用 Bradford^[9] 方法, 以 BSA 为标准。

1.8 数据处理

试验采取平行设计, 结果为 2~3 次试验的平均值。

2 结果与分析

2.1 棉铃虫 P450 酶系的基本特征

图 1 为中肠微粒体的 CO 差光谱特征图, 可以看到在 450 nm 处有明显的吸收峰。经计算, 微粒体制备液的 P450 含量为 (687 ± 11) pmol/mg。从图 2 可以看出, NADPH 为 O-脱甲基酶活性的重要因子, 不加 NADPH, 酶活性大幅 (84%) 下降, 且 NADPH 的作用不能被另一电子供体 NADH 替代。P450 的专一性抑制剂 (PBO) 可以有效地抑制酶系活性, 在 PBO 浓度为 1 mmol/L 时, 酶系活性仅为对照的 10%, 这些表现是 P450 酶系的典型特征。

2.2 中肠 P450 O-脱甲基酶活性测定的优化条件

预实验结果表明,用 1.15% 的 KCl 溶液为介质,经 750 g 10 min, 10 000 g 15 min, 100 000 g 1 h 的离心程序制备的微粒体虽然 O-脱甲基酶的比活力有所增加,但总活力损失较多。经 3 次离心,微粒体酶的总活力仅为中肠匀浆液的 10% 左右,而去除了大的组织碎片的 750g 离心上清液,

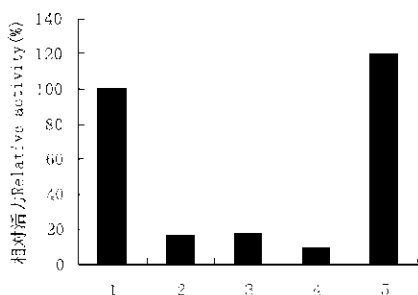


图2 不同离体条件下 O-脱甲基酶的活性

Fig.2 The O-demethylase activities of different incubation components

1. 标准反应体系 Standard (see text);
2. 不加 NADPH (-NADPH);
3. 用 NADH(1 mmol/L)代替 NADPH (-NADPH+NADH(1 mmol/L));
4. 添加 1 mmol/L PBO(+PBO(1 mmol/L));
5. 添加 1.5% BSA(+1.5% BSA)

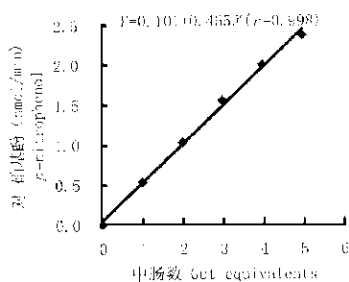


图3 酶系活性与酶量的关系

Fig.3 Effect of enzyme level on the rate of *p*-nitroanisole O-demethylation by cotton bollworm gut 750 g supernatant preparations

Assays were performed at 25°C and pH 7.8 for 30 min

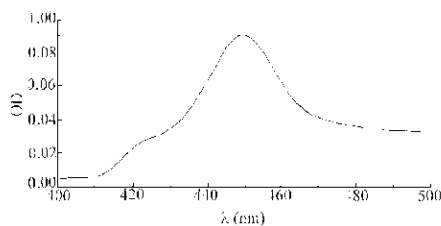


图1 棉铃虫 6 龄幼虫中肠微粒体 CO-差光谱

Fig.1 The CO-difference spectrum of microsomes from 6th instar larvae of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*

可保持 90% 的总活力。为兼顾比活力和总活力,我们以 750 g 离心上清液为酶源,进行酶系 O-脱甲基活性的测定。

2.2.1 酶活的线性范围:图 3 和图 4 显示,酶量达到相当 5 个中肠,反应时间在 30 min 内,产物的形成与酶量和反应时间呈线性关系。

2.2.2 最优 pH 值:以 0.1 mol/L 的磷酸钠缓冲液,当 pH=7.8 时,O-脱甲基酶表现出最大活性(图 5)。

2.2.3 最适温度:在 20~25°C 间为酶的最适温度范围高于或低于此温度范围,酶活性迅速降低(图 6)。

2.3 O-甲基活性酶动力学常数

在 0~2.0 mmol/L 范围内,随底物浓度的

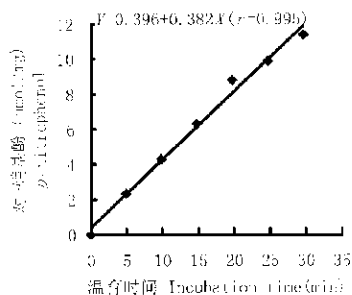


图4 酶系活性与反应时间的关系

Fig.4 Time course of *p*-nitroanisole O-demethylation by cotton bollworm gut 750 g supernatant preparations Assays were conducted at 25°C and pH 7.8 using 2.5 gut equivalents per incubation

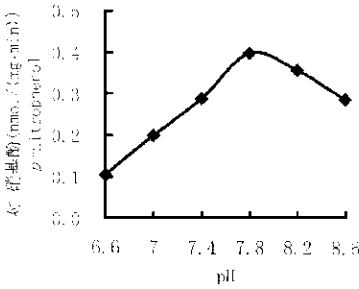


图5 pH对酶系活性的影响

Fig.5 Effect of incubation pH on the rate of *p*-nitroanisole O-demethylation by cotton bollworm gut 750g supernatant preparations Assays were performed using 2.5 gut equivalents per incubation at 25°C for 30 min

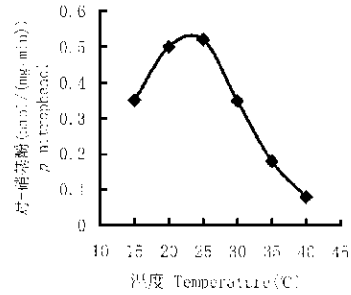


图6 温度对酶系活性的影响

Fig.6 Effect of incubation temperature on the rate of *p*-nitroanisole O-demethylation by cotton bollworm gut 750 g supernatant preparations Assays were performed using 2.5 gut equivalents per incubation for 20 min at pH 7.8

增加, 酶系活性增大。经双倒数变换, 由 Lineweaver-Burk 方程, 计算得出该酶的 $K_m = 1.23$ mmol/L, $V_{max} = 2.54$ nmol / (mg·min) 的 *p*NP (图7)。

2.4 NADPH 的作用

NADPH和分子氧被认为是 MFO 酶具有催化活性的必要条件。棉铃虫中肠匀浆后经 750 g离心上清液在不加外来 NADPH 时仍表现出一定的 O-脱甲基酶活性, 表明制备液中内源性还原力或其它不依赖 NADPH 的 O-脱甲基酶的存在。酶系活性随反应体系中 NADPH 含量的增加而增高, 在 0~0.25 mmol/L 间升幅很大, 至 0.5 mmol/L 几乎达到饱和 (图8)。

2.5 BSA 对酶系活性的影响

在反应体系中加入 1.5% 的牛血清白蛋白 (BSA), 可以促进 O-脱甲基活性, 处理组为对

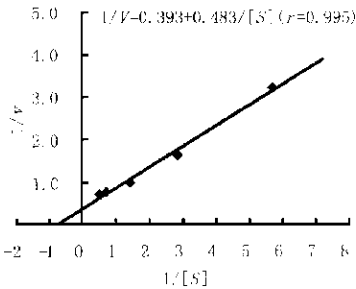


图7 O-脱甲基酶活性的 Lineweaver-Burk 图

Fig.7 The Lineweaver-Burk plots of demethylase activity vs substrate concentration

Assays were performed using 2.5 gut equivalents, 750 g supernatant preparations at 25°C, pH 7.8 for 30min. S: substrate added (mmol/L); v, *p*-nitrophenol formed (nmoles / (min·mg))

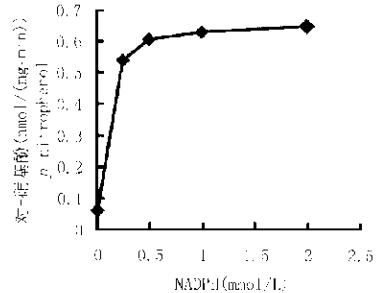


图8 NADPH 浓度与酶系活性

Fig.8 Effect of NADPH concentration on the rate of *p*-nitroanisole demethylation by cotton bollworm 750 g supernatant preparations

Assays were performed using 2.5 gut equivalents at 25°C, pH 7.8 for 30 min

照的 1.2 倍 (图 2)。

2.6 苯巴比妥 (PB) 对棉铃虫 P450 O-脱甲基活性的诱导作用

棉铃虫在取食含 0.25% 的苯巴比妥钠的食物后 72 h 后, 其中肠 O-脱甲基酶活性显著增加, 为对照组的 1.73 倍。

3 讨论

昆虫 P450 酶系催化的反应类型很多, O-脱甲基是常见的一种。以对-硝基苯甲醚为底物测定 P450 的 O-脱甲基酶活性因方法简便而被广泛应用。Hansen & Hodgson^[5], Shang & Soderlund^[6]分别对家蝇 *Musca domestica* L. 成虫和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* (F.) 幼虫 O-脱甲基酶活性的最优测定条件做了比较详细的研究。家蝇微粒体最优 pH 值在 7.8~8.1^[5], 烟芽夜蛾在 pH 值为 7.8 时活性最大^[6], 这与本研究的结果一致。MFO 酶系对不同底物代谢的最适 pH 值可能因底物种类和研究对象的不同而有所差别, 但多数要求偏碱性环境。棉铃虫幼虫中肠 O-脱甲基酶活性在 20~25℃ 时有最大活性, 这与烟芽夜蛾 (25℃) 相近而不同于家蝇 (30~33℃)。与烟芽夜蛾相比, 棉铃虫 O-脱甲基酶有较宽的适温范围。许多研究结果显示, 不同生物及同种生物的不同组织, 酶活性测定的最优条件可能不同, 而同一组织来源的酶液催化不同类型底物具最大活性所要求的条件可能相近^[6]。本研究确立酶活测定的优化条件, 可能适合于以其它物质为底物的反应。

加入 1.5% BSA 于反应体系中加强了 O-脱甲基酶活性, 表明酶液中可能存在可以与 BSA 相互作用的成分。BSA 最初被认为起捕获酶制备液中的内源性抑制剂的作用, 现在发现, BSA 的作用机制要复杂得多, 除作为一般性抑制剂的结合物外, 还可能改变 P450 与底物的结合^[10], 或改变微粒体酶的构型^[11]。BSA 对棉铃虫 O-脱甲基酶的激活机制待进一步研究。

可诱导性是 P450 酶系的重要特征^[11]。昆虫也如同哺乳动物一样, 普遍存在 P450 的诱导现象, 已知的诱导剂包括药物、杀虫剂、植物次生性物质、昆虫激素等许多结构不同的物质^[11]。PB 可以诱导增加 P450 含量及某些 P450 同工酶活性已在家蝇^[12]、黑丽蝇 *Phormia regina* Meiga^[13]等昆虫中发现。本研究首次证明 PB 可以诱导棉铃虫中肠 P450 O-脱甲基活性。关于诱导作用的机制, 目前还不清楚。近年来, 特异 P450 基因的获得, 为阐明诱导的分子机制打下了基础^[14]。

参 考 文 献 (References)

- 1 Feyereisen R. Cytochrome P450 in Insect. In: Schenkman J B *et al.* (eds). Cytochrome P450. Springer: Berlin. 1993, 311~324
- 2 张友军, 张文吉, 韩熹来等. 棉铃虫抗药性的生理生化机制研究. 昆虫学报, 1997, 40 (3): 247~253
- 3 Leonova I N, Slynko N M. Comparative study of insecticide susceptibility and activities of detoxification enzymes in larvae and adults of cotton bollworm, *Heliothis armigera*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1996, 32: 157~172
- 4 Tan W, Guo Y. Effects of host plant on susceptibility to deltamethrin and detoxication enzyme of *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 1996, 89 (1): 11~14
- 5 Hansen L G, Hodgson E. Biochemical characteristics of insect microsomes: N- and O- demethylation. Biochem. Pharmacol., 1971, 20: 1 569~1 678

- 6 Shang C, 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
- 7 Yu S J. Induction of microsomal oxidase by host plants in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1982, 17: 59~67
- 8 Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its homoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239: 2 370~2 378
- 9 Bradford M M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248~252
- 10 Kulkari A P, Hodgson E. Metabolism of insecticides by mixed function oxidase systems. *Pharmacol. Ther.*, 1980, 8: 379~475
- 11 Schonbröd R D, Terriere L C. Inhibition of housefly microsomal epoxidase by the eye pigment, xanthommatin. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1971, 1: 409~417
- 12 Lee S S T, Scott J G. Tissue distribution of microsomal cytochrome P450 monooxygenases and their inducibility by phenobarbital in house fly, *Musca domestica* L. *Insect Biochem. Molec., Biol.*, 1992, 22: 699~711
- 13 Vincent D R, Moldenke A F, Farnsworth D E *et al.* Cytochrome P450 in insects. 7. Age dependency and phenobarbital induction of cytochrome P-450, P-450 reductase and monooxygenase activities in the black blow fly (*Phormia regina* Meiga). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1985, 23: 72~179
- 14 Liu N, Scott J G. Phenobarbital induction of CYP6D1 is due to a transacting factor on autosome 2 in houseflies, *Musca domestica*. *Insect Molecular Biology*, 1997, 6 (1): 77~81

O-DEMETHYLASE ACTIVITY OF COTTON BOLLWORM (*HELICOVERPA ARMIGERA*) LARVAE: OPTIMAL ASSAY CONDITIONS AND INDUCIBILITY BY PHENOBARBITAL

Qiu Xinghui Leng Xinfu

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Integrated Management
of Pest Insects and Rodents, Beijing 100080)

Abstract CO-difference spectrum of midgut microsome preparation with P450 content of (687 ± 11) pmol/mgPr. showed absorbance peak at 450nm. O-demethylase of *p*-nitroanisile (*p*NA) was maximally active at pH 7.8 and temperature 20~25°C. Activity was linear with respect to time for up to 30min, and with respect to enzyme level for up to 5 tissue equivalents/ incubation with 750g supernatant as enzyme source. K_m and V_{max} of O-demethylation of *p*NA estimated were 1.23mmol/L and 2.54nmol *p*-nitrophenol formed/mgPr/min. respectively. NADPH was one of the requirements for the O-demethylation of *p*NA, the activity without external NADPH is 16% as that of with 0.25mmol/L NADPH. 1.5% BSA added in the incubation mixture enhanced (1.2 folds) the production of *p*-nitrophenol. PBO (1 mmol/L) strikingly (90%) inhibited O-demethylation. 1.73 folds induction of O-demethylase activity was observed by dietary 0.25% PB.

Key words P450 monooxygenase, O-demethylase activity, induction, phenobarbital, *Helicoverpa armigera*