

2-十三烷酮和槲皮素诱导棉铃虫谷胱甘肽 S-转移酶组织特异性表达*

汤方梁 沛高希武**

中国农业大学昆虫系, 北京 100094

摘要 利用分光光度酶动力学和定量 PCR 的方法, 从蛋白质水平和基因水平上研究了棉铃虫幼虫谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的组织特异性表达和植物次生物质的诱导表达作用. 结果表明, 以 1-氯-2, 4-二硝基苯(CDNB)为底物检测到的棉铃虫幼虫不同组织 GST 的活性与其 GST mRNA 相对表达量的趋势是一致的. 酶动力学活性测定结果表明的棉铃虫各组织 GST 活性大小的顺序与定量 PCR 结果表明的各组织 GST mRNA 相对量大小的顺序都依次为: 脂肪体、中肠、头和体壁. 通过培养基混药法研究植物次生物质对棉铃虫幼虫 GST 的诱导表明, 2-十三烷酮和槲皮素对棉铃虫幼虫 GST 活性的诱导与其对 mRNA 表达量的影响是一致的. 2-十三烷酮对 GST 活性及其 GST mRNA 表达量的诱导作用比槲皮素强. 说明 mRNA 的转录量增加是植物次生物质诱导 GST 活性增加的主要机制. 该结果对于进一步研究植物次生物质诱导作用对棉铃虫对杀虫药剂敏感度的影响具有重要的意义.

关键词 棉铃虫 GST mRNA 组织特异性表达 植物次生物质 诱导表达

棉铃虫 (*Helicoverpa armigera* Hübner) 是一种重要的农业害虫, 谷胱甘肽 S-转移酶(GST)是生物体内重要的解毒酶系之一. 该酶系被认为主要与异源物质的解毒, 防止氧化伤害有关. GST 能够催化还原型的谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的巯基(-SH)接合到亲电的化合物上, 使其亲水性增加, 易于排除体外^[1-3]. 在昆虫中, GST 对杀虫药剂的解毒具有重要的作用. 在一些昆虫中已经发现, 具有抗药性的昆虫品系或种群具有比敏感品系高的 GST 活性^[4,5], 植物次生物质和杀虫药剂可以诱导其 GST 的活性增加^[2]. 昆虫的 GST 参与了多种植物次生物质的代谢, 例如异硫氰酸酯具有杀虫作用, 其在昆虫的化学防御中起重要作用. 但是异硫氰酸酯能够被某些昆虫体内的 GST 所代谢^[4], 这对于扩大植食性昆虫的寄主范围具有重要的意义, 例如南部灰翅夜蛾 (*Spodoptera eridania*)^[6], 草地贪夜

蛾 (*Spodoptera frugiperda*)^[5,7,8], 美洲棉铃虫 (*Heliothis zea*)^[8], 拟尺蠖 (*Trichoplusia ni*)^[5,8], 和黎豆夜蛾 (*Anticarsia gemmatalis*)^[5,8] 等. 我们以前的研究发现植物次生物质能够诱导棉铃虫体内 GST 活性增加, 但是关于植物次生物质诱导 GST 活性增加的分子机制还未见报道. 该项研究的目的是从 mRNA 的表达量来说明槲皮素、2-十三烷酮等植物次生物质诱导棉铃虫幼虫 GST 活性增加的机制.

1 材料与方法

1.1 棉铃虫

棉铃虫为室内饲养的敏感品系, 1996年7月采自河北邯郸, 在不接触任何药剂的条件下用人工饲料饲养. 光照: 黑暗=16:8, 温度 25±2℃, 相对湿度 75%.

2004-12-10 收稿, 2005-02-02 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划(批准号: G2000016207)和国家自然科学基金(批准号: 30170621, 30471153)资助项目

** 通讯作者, E-mail: gaoxiwu@263.net.cn

刚孵化出的棉铃虫幼虫分成3部分,一部分幼虫喂食人工饲料直到六龄,作为对照.另外两部分幼虫分别喂食含0.01%槲皮素和0.01%2-十三烷酮混合的人工饲料直到六龄.

1.2 试剂

1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、2-十三烷酮、溴化乙锭(EB)和还原型谷胱甘肽(GSH)为Sigma公司产品;苯甲基磺酰氟(PMSF)、1,2-二氯-4-硝基苯(DCNB)购自德国Merk公司;二硫苏糖醇(DTT)为美国Promega公司产品;牛血清白蛋白(BSA)购自北京同正生物公司;槲皮素购自北京化学试剂公司;TRIzol Reagent和cDNA合成试剂盒购自GibcoBRL公司.

1.3 酶液的制备

将六龄幼虫在冰浴上分别解剖中肠、脂肪体、头和体壁,中肠去除围食膜后在冰冷的1.15%KCl中漂洗.所取得的组织在研钵中研磨后,加入含1mmol/L EDTA的0.1mol/L的磷酸缓冲液(pH 7.4)(缓冲液用前加PMSF和DTT至终浓度为1mmol/L),10000g,4℃离心30min,上清液用滤纸抽滤.滤液于-85℃冰箱保存或直接用于测定.

1.4 GST活性和蛋白含量测定

参照Habig等的方法^[9]测定GST活性.每组样品测定至少重复3次.

参照Bradford的方法^[10]以牛血清白蛋白做标准曲线来进行蛋白含量的测定.

1.5 引物的设计和合成

在GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上查得棉铃虫GST(GenBank注册号:AF526170)和内标actin(GenBank注册号:X97614)的基因序列,用Primer 5.0软件设计了两对特异性引物用于PCR的扩增.

正向引物(GST):5'CTGTGCTAGAGGATGGGGA

反向引物(GST):5'AGCGATGTAGGTGGT-GCGA

正向引物(actin):5'CGCTGGTAGTAGA-CAATGGA

反向引物(actin):5'GCGTAACCCTCG-

TAGATG

以上引物由上海博亚生物技术有限公司合成.棉铃虫actin基因的RT-PCR引物基于其编码序列设计,预期产物406bp;棉铃虫GST基因产物289bp.

1.6 棉铃虫总RNA的提取、纯化和cDNA合成

取棉铃虫中肠、脂肪体、头部和体壁(约100mg)按照TRIzol Reagent试剂盒的说明提取总RNA.

按照GibcoBRL公司试剂盒的说明进行cDNA合成.

1.7 PCR反应

以cDNA为模板,加入10×PCR缓冲液2.5μL,10mmol/L dNTP 2μL,20μmol/L GST和actin正向和反相引物各1μL, *Taq* DNA聚合酶0.2μL(5U/μL),加水到25μL.扩增条件:95℃预变性5min;接着进行24个循环,循环条件为95℃30s,55℃30s,72℃30s;然后72℃保温10min.扩增完毕后,用2%琼脂糖凝胶电泳检测.

1.8 棉铃虫GST mRNA相对表达量

利用紫外成像仪(型号AlphaImager™)的程序来计算棉铃虫GST mRNA和内标actin mRNA的表达量.棉铃虫GST mRNA相对表达量是棉铃虫GST mRNA的表达量和内标actin mRNA的表达量的比值.每个实验重复3次.

1.9 统计分析

利用单因素方差分析(GraphPad InStat分析软件)对数据进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 植物次生物质诱导棉铃虫GST活性

棉铃虫不同组织中GST的活性具有显著差异(表1).对照组和2-十三烷酮诱导组棉铃虫幼虫,脂肪体GST的活性明显高于其他3个组织部位的GST活性($P < 0.05$).中肠GST的活性与头部的没有差异($P > 0.05$),但是都显著高于体壁GST的活性($P < 0.05$).槲皮素诱导组的棉铃虫,脂肪体GST的活性与中肠的没有显著的差异($P > 0.05$).

在对照组、槲皮素诱导组和 2-十三烷酮诱导组中,同一组织部位,以 CDNB 为底物时,对于脂肪体和头,2-十三烷酮对 GST 活性的诱导作用与槲皮素的诱导作用及其对照相互之间差异都是显著的($P < 0.05$).对于中肠,2-十三烷酮对 GST 的诱导作用与槲皮素的诱导作用之间没有显著的差异($P > 0.05$).对于体壁,槲皮素对 GST 的诱导作用和对照之间没有显著的差异($P > 0.05$).

表 1 棉铃虫各组织部位 GST 对 CDNB 的活性^{a)}

组织	比活力/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)		
	对照	槲皮素	2-十三烷酮
中肠	317.00±17.89 b B	475.82±21.89 a A	519.84±18.0 b A
脂肪体	385.39±14.00 a C	490.78±32.41 a B	632.57±22.98 a A
头	284.99±12.58 b C	357.76±18.10 b B	498.26±27.24 b A
体壁	240.28±0.98 c B	255.80±11.21 c B	302.31±16.08 c A

a) 表中同列数据后相同的小写字母(a, b, c...)表示各组织 GST 活性差异不显著($P > 0.05$);

同行数据后相同的大写字母(A, B, C...)表示植物次生物质对 GST 活性的影响不显著($P > 0.05$)

以 DCNB 为底物,棉铃虫不同组织部位 GST 的活性有显著差异(表 2).中肠 GST 的活性最高,其次是脂肪体、体壁和头.槲皮素和 2-十三烷酮处理后的棉铃虫,中肠和脂肪体 GST 的活性没有显著的差异($P > 0.05$),但是都显著高于头和体壁 GST 的活性($P < 0.05$);头部 GST 的活性与体壁的有显著的差异($P < 0.05$).

表 2 棉铃虫各组织部位 GST 对 DCNB 的活性^{a)}

组织	比活力/(nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)		
	对照	槲皮素	2-十三烷酮
中肠	126.36±11.24 a B	105.30±8.67 a B	166.99±11.00 a A
脂肪体	87.31±10.90 b B	114.08±14.24 a B	163.55±11.63 a A
头	20.07±0.20 d A	12.52±0.23 c C	16.23±2.15 c B
体壁	40.52±2.67 cd A	36.36±5.54 b A	44.59±1.90 b A

a) 表中同列数据后相同的小写字母(a, b, c...)表示各组织 GST 活性差异不显著($P > 0.05$);

同行数据后相同的大写字母(A, B, C...)表示植物次生物质对 GST 活性的影响不显著($P > 0.05$)

在中肠和脂肪体中,2-十三烷酮对 GST 活性的诱导作用最强,其次是槲皮素.2-十三烷酮对 GST 活性的诱导作用与槲皮素诱导组及其对照之间有显

著的差异($P < 0.05$),而槲皮素的诱导作用和对照之间没有显著的差异($P > 0.05$).

不同组织器官 GST 对底物的专一性是不同的.棉铃虫各组织部位以 CDNB 为底物时的 GST 活性要比以 DCNB 为底物时的活性高很多.例如,棉铃虫脂肪体以 CDNB 为底物时, GST 的比活力为 385.39 nmol·min⁻¹mg⁻¹,而以 DCNB 为底物时, GST 的比活力为 87.31 nmol·min⁻¹mg⁻¹.

2.2 植物次生物质诱导棉铃虫 GST mRNA 组织特异性表达

从棉铃虫的各个组织中都扩增出了 actin 和 GST 基因(图 1—6).对照、槲皮素和 2-十三烷酮诱导组棉铃虫各组织部位 GST mRNA 的表达是不同的.脂肪体 GST mRNA 的表达最强,其次是中肠,最后是头和体壁(图 1—3).槲皮素和 2-十三烷酮诱导组各组织部位的表达明显发生了变化.2-十三烷酮对 GST mRNA 的表达诱导作用比槲皮素强(图 4—6).



图 1 棉铃虫各组织 GST mRNA 表达
M, DNA 标志; 1, 中肠; 2, 脂肪体; 3, 头; 4, 体壁; 5, 阴性对照

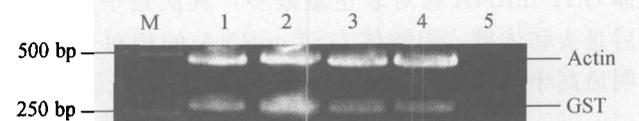


图 2 槲皮素诱导的棉铃虫各组织 GST mRNA 表达
M, DNA 标志; 1, 中肠; 2, 脂肪体; 3, 头; 4, 体壁; 5, 阴性对照

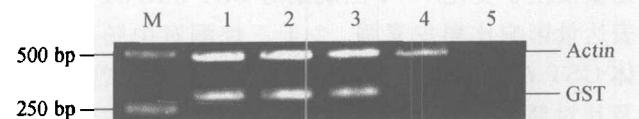


图 3 2-十三烷酮诱导的棉铃虫各组织 GST mRNA 表达
M, DNA 标志; 1, 中肠; 2, 脂肪体; 3, 头; 4, 体壁; 5, 阴性对照

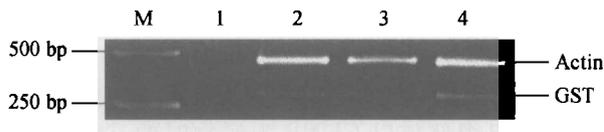


图4 棉铃虫中肠 GSTm RNA 表达

M, DNA 标志; 1, 阴性对照; 2, 中肠;
3, 槲皮素诱导的中肠; 4, 2-十三烷酮诱导的中肠

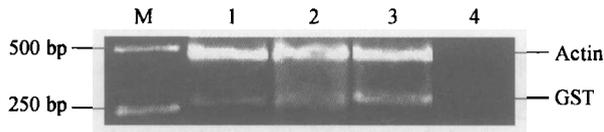


图5 棉铃虫脂肪体 GSTm RNA 表达

M, DNA 标志; 1, 脂肪体; 2, 槲皮素诱导的脂肪体;
3, 2-十三烷酮诱导的脂肪体; 4, 阴性对照

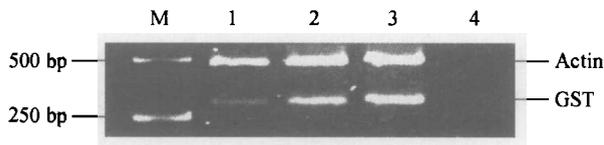


图6 棉铃虫头 GSTm RNA 表达

M, DNA 标志; 1, 头; 2, 槲皮素诱导的头;
3, 2-十三烷酮诱导的头; 4, 阴性对照

2.3 植物次生物质诱导棉铃虫 GST mRNA 的相对表达量

对照、槲皮素和 2-十三烷酮诱导的棉铃虫各组织部位 GST mRNA 的相对表达量差异较大. 脂肪体 GST mRNA 相对表达量最多, 其次是中肠, 最后是头和体壁. 脂肪体 GST mRNA 的相对表达量明显高于其他 3 个部位的 mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$). 而中肠 GST mRNA 的相对表达量与头部的差异不显著 ($P > 0.05$), 但是他们都高于体壁 GST mRNA 的相对表达量 ($P < 0.05$) (图 7).

槲皮素和 2-十三烷酮使得各组织部位的相对表达量发生了变化. 2-十三烷酮对 GST mRNA 的相对表达量影响比槲皮素强. 2-十三烷酮对中肠和脂肪体 GST mRNA 相对表达量的影响与槲皮素的影响及其对照有显著的差异 ($P < 0.05$), 而槲皮素的影响与对照之间没有显著的差异 ($P > 0.05$). 2-十三烷酮对头 GST mRNA 的相对表达量的影响与槲皮素对头 GST mRNA 的相对表达量的影响及其对照差异都是显著的 ($P < 0.05$) (图 8).

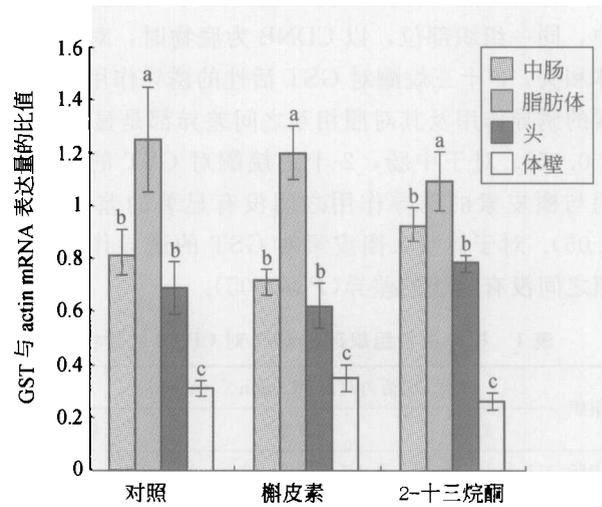


图7 棉铃虫各组织 GST mRNA 的相对表达量

相同的字母(a, b, c)表示棉铃虫各组织

GST mRNA 的相对表达量差异不显著 ($P > 0.05$)

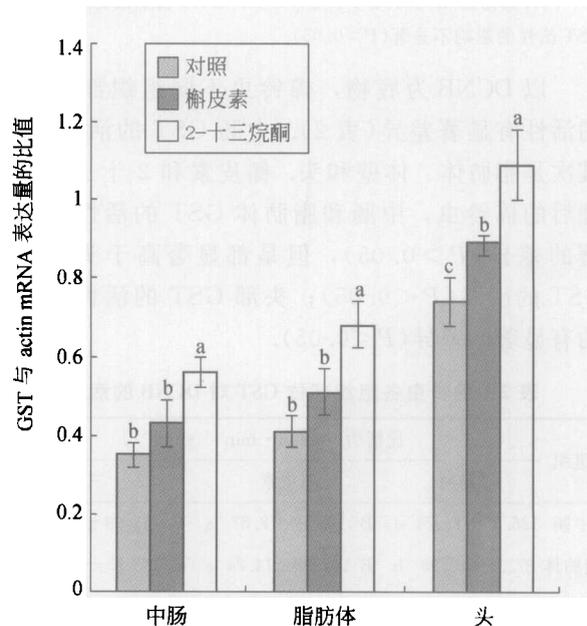


图8 植物次生物质对棉铃虫各组织 GST mRNA 相对表达量的诱导作用

相同的字母(a, b, c)表示植物次生物质对棉铃虫各组织 GST mRNA 的相对表达量的诱导作用差异不显著 ($P > 0.05$)

3 讨论

许多作者的研究结果证明植物次生物质对 GST 的活性具有诱导作用^[5, 7, 11]。当草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) 在欧洲萝卜上取食之后, GST 的活性要比取食人工饲料的幼虫高 39 倍^[11]。高希武等报道槲皮素能够改变棉铃虫体内羧酸酯酶(CarE)、谷胱甘肽 S-转移酶(GST)等解毒酶的活性, 及乙酰胆碱酯酶(AchE)对抑制剂的敏感度^[12]。GST 的活性能够被香豆素、吲哚、黄酮、花椒毒素和单萜所诱导^[13]。我们的研究发现植物次生物质槲皮素和 2-十三烷酮诱导棉铃虫幼虫 GST 活性增加与其 GST mRNA 的表达量增加是一致的。说明植物次生物质处理后 GST 活性增加不是基因突变而是表达量增加的结果。植物次生物质诱导 GST 的表达有利于昆虫对外源化合物的解毒导致其对杀虫药剂的抗性 or 耐性增加^[5, 7]。

槲皮素是一类黄酮类的植物次生物质, 普遍存在于棉花、番茄、洋葱和大蒜等多种植物中^[12]。2-十三烷酮是植物中重要的次生物质, 在香毛茛腺体中浓度很高, 在叶片中最高浓度可达 0.386%。2-十三烷酮是植物对许多害虫抗性的重要次生物质^[14]。槲皮素和 2-十三烷酮诱导棉铃虫幼虫 GST 活性和其 mRNA 的表达量是不同的, 说明不同结构的植物次生物质对棉铃虫体内 GST 活性的诱导也会有差异。

GST 的活性主要位于脂肪体和中肠。就棉铃虫而言, 脂肪体和中肠所得到的酶液 GST 的活性是很高的。说明棉铃虫和其他的鳞翅目害虫一样, 异源物质代谢的主要部位是脂肪体和中肠。人们一直认为 GST 在解毒异源物质方面有重要的作用。脂肪体和中肠是昆虫 GST 活性比较高的部位。许多的报道表明中肠具有较高的 GST 活性。Tate 等和 Snyder 等研究发现烟草天蛾(*Manduca sexta*)中肠中 GST 活性高于脂肪体中的^[15, 16]。但也有一些报道脂肪体中 GST 的活性高于中肠, 例如 Chien 和 Dauterman 发现美洲棉铃虫(*Helicoverpa zea*)脂肪体 GST 的活性高于中肠的^[17]。Lee 在香芹黑凤蝶 *Papilio polyxenes* 的中肠和脂肪体观察到 GST 的活性是一样的^[18]。绝大部分研究昆虫 GST 活性部位是根据 GST 对 GSH 和 CDNB (DCNB) 的催化

活性来确定的, 但是在没有酶存在的情况下, GST 和 CDNB (DCNB) 仍然能发生反应^[6]。所以, 我们的试验从传统的生化测定和定量 PCR 两方面表明: 在棉铃虫中, 脂肪体 GST 的活性要高于中肠。在哺乳动物中肝脏(相当于昆虫的脂肪体)含有较高的 GST, 其是主要的解毒部位^[19]。

本研究中所用的棉铃虫幼虫 GST 以 CDNB 为底物酶动力学活性测定结果与各组织 GST mRNA 相对表达量的趋势是一致的。以 CDNB 为底物酶动力学活性测定结果是脂肪体 GST 活性最高, 其次是中肠, 最后是头和体壁, 定量 PCR 的结果是脂肪体 GST mRNA 的相对表达量最高, 其次是中肠, 最后是头和体壁。表明我们所使用的 GST 基因所翻译的蛋白是以 CDNB 为底物的。

参 考 文 献

- 1 Listowsky I, Abramovitz M, Homma H, et al. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione S-transferase. *Drug Metab Rev*, 1988, 19: 305—318
- 2 Clark A G. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp Biochem Physiol*, 1989, 92B: 419—446
- 3 Rushmore T H, Pickett E B. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem*, 1993, 268 (16): 11475—11478
- 4 Wang J Y, McCommas S, Syvanen M. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly(*Musca domestica*). *Molecular and General Genetics*, 1991, 227: 260—266
- 5 Wadleigh R W, Yu S J. Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione transferase in three lepidopterous species. *Journal of Chemical Ecology*, 1988, 14: 1279—1288
- 6 Abdel-Aal Y A I, Roe R M. Conjugation of chlorodinitrobenzene with reduced glutathione in the absence and presence of glutathione transferase from larvae of the Southern armyworm *Spodoptera aridania*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1990, 36: 248—258
- 7 Yu S J. Host plant inductor of glutathione S-transferase in the fall armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1982, 18: 101—106
- 8 Yu S J. Purification and characterization of glutathione transferases from five phytophagous lepidoptera. *Pest Biol Physiol*, 1989, 35: 97—105
- 9 Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-transferases: On the first enzymatic step in mercapturic acid biosynthesis.

- J Biol Chem, 1974, 249: 7130—7139
- 10 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254
- 11 Yu S J. Interactions of allelochemicals with detoxification enzymes of insecticide-susceptible and resistant fall armyworms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1984, 22: 60—68
- 12 高希武, 董向丽, 赵颖, 等. 槲皮素对棉铃虫体内一些解毒酶系和靶标酶的诱导作用. *农药学报*, 1999, 1 (3): 56—60
- 13 Feng Q L, Davey K G, Pang A S D, et al. Developmental expression and stress induction of glutathione S-transferase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Journal of Insect Physiology*, 2001, 47: 1—10
- 14 于彩虹, 高希武, 郑炳宗. 2-十三烷酮对棉铃虫细胞色素 P450 的诱导作用. *昆虫学报*, 2002, 45 (1): 1—7
- 15 Tate L G, Nakat S S, Hodgson E. Comparison of detoxification activity in midgut and fat body during fifth instar development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Comp Biochem Physiol*, 1982, 72C: 75—81
- 16 Snyder M J, Walding J K, Feyerreisen R. Glutathione S-transferases from larval *Manduca sexta* midgut: Sequence of two cDNAs and enzyme induction. *Insect Biochem Molec Biol*, 1995, 25: 455—465
- 17 Chien C, Dauterman W C. Studies on glutathione S-transferase in *Helicoverpa (= Heliothis) zea*. *Insect Biochem*, 1991, 21: 857—864
- 18 Lee K. Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: Induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochem*, 1991, 21 (4): 353—361
- 19 Vos R M E, van Bladeren P J. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol Interactions*, 1990, 75: 241—265

分子化石揭示了距今约 250 Ma 二叠纪-三叠纪之交生物危机的多阶段性

Nature 杂志于 2005 年 3 月 24 日发表了我国地质大学(武汉)青年学者谢树成博士和殷鸿福院士等有关二叠纪—三叠纪界线(约 250 Ma)附近的分子化石的研究成果。

在国家自然科学基金的长期资助下, 该研究小组曾在将全球二叠纪—三叠纪界线层型剖面(“金钉子”)落户于我国浙江长兴煤山剖面方面做出了重要贡献, 并获得 2002 年度国家自然科学基金二等奖。但对于二叠纪—三叠纪界线附近发生的显生宙最大的生物灭绝事件, 其地质过程仍是国际关注的热点之一。长期以来, 有关对二叠纪—三叠纪界线生物集群灭绝的认识, 主要来自于地层中所保存下来的大化石和微体化石记录, 而且主要着重于海洋无脊椎动物, 这仅涉及到生态系统比较小的一部分。有关生态系统的初级生产者(特别是藻类、蓝细菌等)和分解者(菌类)的工作比较薄弱, 难以对当时整个生态系统的危机作出回答。

有关二叠纪—三叠纪界线附近生物危机的阶段性一直存在争议, 有人认为是单阶段, 有人则主张是多阶段的, 生物危机的阶段性直接制约着人们对引起生物灭绝的原因的认识。不管是哪个模式, 主要是从无脊椎动物得出的结论, 目前还缺少生态系统其他组成部分的证据。该研究以界线附近反应蓝细菌变化的 2-甲基藿烷为对象, 高分辨率的 2-甲基藿烷指数与海洋无脊椎动物灭绝率共同揭示了在显生宙全球最大生物灭绝期间至少存在两次生物危机。

该界线附近的钻探研究工作仍在继续进行, 更多的未知等待着科学家的探索。

(供稿: 刘羽 姚玉鹏)