

# 细胞色素 P450 酶系与苦皮藤素 V 对昆虫选择毒性的关系研究<sup>\*</sup>

吕 敏, 刘惠霞, 吴文君

(西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨陵 712100)

**[摘 要]** 研究了细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性与苦皮藤素 V 对粘虫 (*Mythimna separata*) 和小地老虎 (*Agrotis ypsilon*) 选择毒性的关系。结果表明, 对照组小地老虎中肠细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性均显著高于粘虫。苦皮藤素 V 处理后, 小地老虎和粘虫中肠细胞色素 P450 含量均显著高于对照, 粘虫中毒抽搐期及失水期中肠细胞色素 P450 含量分别比对照升高 1.46 和 2.26 倍, NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性分别比对照升高 1.26 和 2.56 倍; 处理组小地老虎中肠细胞色素 P450 含量比对照升高 0.39 倍, NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性略高于对照。由此认为, 中肠细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性与苦皮藤素 V 对粘虫和小地老虎产生选择毒杀活性有着重要的关系。并且苦皮藤素 V 对细胞色素 P450 酶系具有一定的诱导作用, 但对不同昆虫以及同一种昆虫中 P450 酶系的不同组分诱导作用不同。

**[关键词]** 苦皮藤素 V; 细胞色素 P450; NADPH-细胞色素 P450 还原酶; 选择毒性

**[中图分类号]** Q965.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2003)03-0035-04

细胞色素 P450 (Cyt P450, 简称 P450) 是广泛分布于动物、植物及微生物等不同生物体内的一种重要的代谢酶系, 在昆虫的生长、发育、取食、对寄主植物的适应性、对杀虫剂的抗性以及对植物毒素的耐受力等方面起着重要的作用<sup>[1~3]</sup>。细胞色素 P450 酶系的主要组分包括两种细胞色素 (细胞色素 P450 和细胞色素 b<sub>5</sub>)、两种黄素蛋白 (NADPH-细胞色素 P450 还原酶和 NADH-细胞色素 b<sub>5</sub> 还原酶) 以及磷脂等, 其中细胞色素 P450 和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶起中心作用。

苦皮藤素 V 是从杀虫植物苦皮藤中提取分离的一种对昆虫有毒杀活性的化合物<sup>[4]</sup>, 已有的组织学观察表明<sup>[5]</sup>: 苦皮藤素 V 主要作用于昆虫中肠肠壁细胞的质膜和内膜系统, 引起肠壁穿孔, 试虫体液大量流失致死。毒理学研究表明<sup>[6]</sup>, 苦皮藤素 V 对不同昆虫具选择毒性, 对粘虫 (*Mythimna separata*)、菜青虫 (*Pieris rapae*)、槐尺蠖 (*Cen iothisa cinerearia*) 等具有显著的毒杀活性; 而对另一些昆虫如小地老虎 (*Agrotis ypsilon*)、甘蓝夜蛾 (*B arathra brassicae*)、八字地老虎 (*Agrotis cnigrum*)、银纹夜

蛾 (*Plusia agnata*)、黄地老虎 (*Agrotis segetum*) 等无选择毒性或选择毒性不明显。生化分析结果表明<sup>[6~8]</sup>, 昆虫中肠羧酸酯酶活性及酯酶同工酶的差异是苦皮藤素 V 对昆虫选择毒性的重要机制之一。但苦皮藤素 V 对昆虫的选择毒性与昆虫体内重要的解毒酶系——细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性的关系尚未见研究报道, 本文拟对此进行研究, 以进一步揭示苦皮藤素 V 对昆虫的选择毒性机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试药剂

苦皮藤素 V, 纯度 90% 以上, 配成浓度为 5% 的丙酮溶液。

### 1.2 供试昆虫

粘虫 (*Mythimna separata*) 与小地老虎 (*Agrotis ypsilon*) 均为室内饲养。

### 1.3 试验方法

1.3.1 试虫处理 (夹毒叶片饲喂法) 挑选 6 龄蛻皮后第 2 天生长整齐一致、发育正常的粘虫幼虫 (体

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2003-01-13

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30130130)

[作者简介] 吕 敏 (1978-), 女, 陕西杨陵人, 在读硕士, 主要从事昆虫生理生化和毒理学研究。

[通讯作者] 刘惠霞 (1945-), 女, 陕西西安人, 教授, 主要从事昆虫生理生化和毒理学研究。

重平均 100 mg 左右), 分别置于培养皿中, 一皿一头。饥饿 24 h 后, 随机分成处理和对照两组, 用 1  $\mu\text{L}$  的玻璃毛细管点滴器在 0.5 cm  $\times$  0.5 cm 的小麦叶片上点涂 1  $\mu\text{L}$  5% 的苦皮藤素 V 丙酮溶液, 待丙酮挥发后, 将小麦叶片放入培养皿中, 每头试虫给 1 张处理叶片, 即为处理组; 对照组试虫饲喂点涂 1  $\mu\text{L}$  丙酮的叶片。4 h 后分别取出现抽搐及失水症状的粘虫及对照粘虫, 制备酶液<sup>[9]</sup>, 对照及处理各设 3 个重复。

挑选 6 龄小地老虎幼虫(体重平均 850 mg 左右), 饥饿 24 h 后, 随机分成处理和对照两组, 分别饲以点涂 1  $\mu\text{L}$  5% 苦皮藤素 V (处理组) 和 1  $\mu\text{L}$  丙酮(对照组)的甘蓝叶片, 与粘虫同时处理, 由于苦皮藤素 V 对小地老虎不表现明显的选择毒性, 因此 4 h 后, 与出现抽搐及失水症状的粘虫同时制备酶液, 对照及处理各设 3 个重复。

**1.3.2 酶液制备** 将试虫于冰盘上解剖, 取中肠, 去掉内容物, 在 0.15 mol/L KCl 溶液中漂洗几秒钟, 用吸水纸吸干, 加入匀浆缓冲液(HB: 0.1 mol/L pH 7.5 的磷酸钠缓冲液中含 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PM SF, 1 mmol/L PTU, 巯基乙醇和 100 mL/L 甘油)。用玻璃匀浆器冰浴匀浆, 在 4  $^{\circ}\text{C}$ , 10 000 g 离心 20 min, 上清液用 3 层滤纸过滤后即为微粒体粗酶液。粘虫中肠酶液浓度相当于每毫升缓冲液 5 个中肠, 小地老虎中肠酶液浓度相当于每毫升缓冲液 2 个中肠。

**1.3.3 细胞色素 P450 含量测定** 将粗酶液一分为二, 加入参比杯和样品杯中, 分别加入约 2 mg 的连二亚硫酸钠, 室温下放置 3 min 后, 在样品杯中用注射器通入  $\text{CO}$ , 用双光束 UV-Vis 分光光度计在 400~500 nm 处连续扫描, 记录  $\text{CO}$  差光谱。根据波长在 450~490 nm 的吸光值差 OD (450-490)、毫摩尔消光系数 91 L/(cm  $\cdot$  mmol) 及酶液的蛋白质含量计算细胞色素 P450 含量<sup>[10]</sup>。

**1.3.4 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性测定** 取 1.5 mL 0.1 mol/L pH 7.8 磷酸钠缓冲液, 加入 50  $\mu\text{L}$  5 mg/mL 细胞色素 C, 0.5 mL 微粒体粗酶液及 50  $\mu\text{L}$  1.5 mg/mL NADPH, 室温下连续 3 min 记录 550 nm 光吸收 OD (550) 变化值, 以毫摩尔消光系数 21.1 L/(cm  $\cdot$  mmol) 及酶液的蛋白质含量计算细胞色素 C 被还原的量<sup>[11]</sup>。

**1.3.5 蛋白质含量测定** 采用改良的 Bradford

法<sup>[12]</sup>, 以牛血清白蛋白(BSA)作标准曲线测定酶液的蛋白质含量。

## 2 结果与分析

由表 1, 2 可见, 对照组小地老虎和粘虫中肠 P450 含量分别为 73.59 和 14.98 nmol/g, NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性分别为 12.61 和 9.77 nmol/(mg  $\cdot$  min), 小地老虎幼虫中肠 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性均显著高于粘虫, 其中小地老虎 P450 含量比粘虫升高 3.91 倍, NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性比粘虫增加 0.29 倍。苦皮藤素 V 处理后, 无论是小地老虎还是粘虫, 中肠 P450 含量都显著高于对照, 其中小地老虎 P450 含量为 102.38 nmol/g, 粘虫中毒抽搐期和失水期 P450 含量分别为 36.86 和 48.87 nmol/g, 处理组小地老虎 P450 含量分别比粘虫中毒抽搐期和失水期升高 1.78 和 1.09 倍; 处理组粘虫中毒抽搐期和失水期 P450 含量分别比对照升高 1.46 和 2.26 倍, NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性分别为 22.10 和 34.76 nmol/(mg  $\cdot$  min), 分别比对照升高 1.26 和 2.56 倍。而小地老虎中肠 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性与对照无显著差异, 并且仅为粘虫中毒抽搐期和失水期的 66% 和 39%。

对照组小地老虎中肠 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性均高于粘虫, 表明细胞色素 P450 酶系作为重要的解毒酶系可能在苦皮藤素 V 对粘虫和小地老虎选择毒性方面起着重要的作用, 当苦皮藤素 V 通过摄食进入中肠后, 可被 P450 酶系代谢降解而降低或丧失毒性。由于小地老虎幼虫中肠 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性均显著高于粘虫, 因此试虫摄食苦皮藤素 V 后粘虫表现明显的中毒症状而小地老虎并不出现中毒症状。苦皮藤素 V 处理后, 处理组小地老虎及粘虫中毒抽搐期、失水期中肠细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性均高于对照, 且处理组小地老虎中肠细胞色素 P450 含量高于粘虫中毒抽搐期和失水期, 表明苦皮藤素 V 对细胞色素 P450 酶系具有一定的诱导作用; 处理组小地老虎中肠 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性低于粘虫中毒抽搐期和失水期, 表明苦皮藤素 V 对不同昆虫以及同一种昆虫中细胞色素 P450 酶系的不同组分诱导作用不同。

表 1 苦皮藤素 V 对小地老虎细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性的影响

Table 1 Effects of Celangulin V on cytochrome P450 content and NADPH-cytochrome P450 reductase activity of *Agrotis ypsilon*

| 处理<br>Treatment                      | 细胞色素 P450<br>Cyt-P450                       |                            |                                        | NADPH-细胞色素 P450 还原酶<br>NADPH-Cyt P450 reductase                   |                            |                                        |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|
|                                      | 含量/<br>(nmol · g <sup>-1</sup> )<br>Content | 升高倍数<br>Increasing<br>time | 差异显著性<br>Significance<br>of difference | 活性/<br>(nmol · mg <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )<br>Activity | 升高倍数<br>Increasing<br>time | 差异显著性<br>Significance<br>of difference |
| 对照 Control                           | 73.59 ± 4.71                                |                            | a                                      | 12.61 ± 0.10                                                      |                            | a                                      |
| 苦皮藤素 V 处理<br>Treated by celangulin V | 102.38 ± 6.42                               | 0.39                       | b                                      | 14.06 ± 0.03                                                      | 0.11                       | a                                      |

注: 表中数据为 3 次结果的平均值 ± 标准误, 经 *t* 检验,  $P < 0.05$ 。  
Note: All values are means of three replicates (±SE), by *t* test,  $P < 0.05$ 。

表 2 苦皮藤素 V 对粘虫细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性的影响

Table 2 Effects of Celangulin V on cytochrome P450 content and NADPH-cytochrome P450 reductase activity of *Mythimna separata*

| 处理<br>Treatment                           | 细胞色素 P450<br>Cyt-P450                       |                            |                                        | NADPH-细胞色素 P450 还原酶<br>NADPH-Cyt P450 reductase                   |                            |                                        |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------|
|                                           | 含量/<br>(nmol · g <sup>-1</sup> )<br>Content | 升高倍数<br>Increasing<br>time | 差异显著性<br>Significance<br>of difference | 活性/<br>(nmol · mg <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> )<br>Activity | 升高倍数<br>Increasing<br>time | 差异显著性<br>Significance<br>of difference |
| 对照 Control                                | 14.98 ± 3.13                                |                            | a                                      | 9.77 ± 0.58                                                       |                            | a                                      |
| 抽搐期<br>The period of convulsion           | 36.86 ± 3.48                                | 1.46                       | b                                      | 22.10 ± 2.05                                                      | 1.26                       | b                                      |
| 失水期<br>The period of losing<br>body fluid | 48.87 ± 7.20                                | 2.26                       | c                                      | 34.76 ± 1.22                                                      | 2.56                       | c                                      |

注: 表中数据为 3 次结果的平均值 ± 标准误, 经 Duncan 新复极差法检验,  $P < 0.05$ 。  
Note: All values are means of three replicates (±SE), by SSR-test,  $P < 0.05$ 。

3 讨 论

酯酶、多功能氧化酶(细胞色素 P450)及谷胱甘肽 S-转移酶是生物体内重要的三大解毒酶系<sup>[13]</sup>。细胞色素 P450 酶系是一类极其重要的代谢酶系, 参与生物体内源化合物(如激素、脂肪酸)的合成与代谢及外源化合物(如药物、杀虫剂和植物毒素)的分解与合成代谢作用。细胞色素 P450 酶系对杀虫剂及植物毒素的代谢作用是大多数昆虫产生抗药性和对寄主植物适应性的主要机制, 并且细胞色素 P450 基因表达存在品系差异<sup>[14]</sup>。已有的研究结果指出<sup>[8]</sup>, 酯酶活性和酯酶同工酶的差异是苦皮藤素 V 对粘虫和小地老虎幼虫选择毒性的机制之一。本研究表明, 对照组小地老虎幼虫中肠细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性均显著高于粘虫, 因此认为细胞色素 P450 酶系作为重要的解毒酶系也可能参与昆虫对苦皮藤素 V 的代谢, 使其在小地老虎体内被迅速降解, 从而到达靶标的量难以达到有效剂量; 而在粘虫幼虫体内苦皮藤素 V 降解速度相对较慢, 最终导致苦皮藤素 V 在两种试虫之间的选择毒杀作用。由此可见, 苦皮藤素 V 对小地老虎和粘虫幼虫的选择毒性可能是酯酶和细胞

色素 P450 酶系共同作用的结果, 但谷胱甘肽 S-转移酶与苦皮藤素 V 对昆虫选择毒性的关系尚需进一步研究。

基因表达的可诱导性是细胞色素 P450 的一个重要特征, 诱导加强或补充了昆虫的解毒能力<sup>[15]</sup>。昆虫中已知的细胞色素 P450 诱导剂包括植物次生物质、杀虫剂、除草剂、昆虫激素及其类似物、环境毒剂和药物(如苯巴比妥)等<sup>[15]</sup>。本研究发现, 经苦皮藤素 V 处理后, 小地老虎和粘虫幼虫中肠细胞色素 P450 含量和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性显著高于对照, 表明苦皮藤素 V 可能作为诱导剂, 诱导粘虫和小地老虎体内细胞色素 P450 的基因表达, 从而导致细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性的升高。处理后小地老虎中肠细胞色素 P450 含量和 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性均高于粘虫, 表明苦皮藤素 V 对细胞色素 P450 的诱导作用与其对昆虫的选择毒性也有一定的关系。由于小地老虎本身的 P450 含量就比较高, 因此, 苦皮藤素 V 对粘虫表现出更高的诱导作用。本文仅对苦皮藤素 V 作用前后粘虫和小地老虎体内的细胞色素 P450 含量及 NADPH-细胞色素 P450 还原酶活性作了研究, 至于苦皮藤素 V 对其他

## 昆虫的选择毒性与昆虫体内 P450 酶系的关系尚待 进一步的研究

## [参考文献]

- [1] Feyereisen R. Insect P450 enzymes[J]. *Ann Rev Entomol*, 1999, 44: 507- 533
- [2] Schuler M. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interaction[J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 1411- 1419
- [3] Scott J G, Liu N, Wen Z. Insect cytochrome P450, diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, 121C: 147- 155
- [4] 吴文君, 李绍白, 朱靖博, 等. 新化合物苦皮藤素 V 的分离与结构鉴定[J]. *西北农业大学学报*, 1994, 22(4): 116- 117
- [5] 刘惠霞, 董育新, 吴文君. 苦皮藤素 V 对东方粘虫中肠细胞及其消化酶活性的影响[J]. *昆虫学报*, 1998, 41(3): 261- 264
- [6] 刘惠霞, 王启坤, 吴文君, 等. 苦皮藤麻醉成分对昆虫的选择毒性及其机制的初步研究[J]. *西北农业学报*, 1993, 2(2): 31- 36
- [7] 刘惠霞, 吴文君, 姬志勤, 等. 苦皮藤毒素成分对昆虫的选择毒性作用及其机制研究[J]. *西北农业学报*, 1998, 7(2): 41- 44
- [8] 刘惠霞, 杨从军, 吴 昊, 等. 苦皮藤素 V 对昆虫选择毒性的进一步研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2002, 30(2): 83- 86
- [9] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988
- [10] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsome I. Evidence for its heme-protein nature[J]. *J Biol Chem*, 1964, 239: 2370- 2378
- [11] Feng R, Houseman J G, Downe A E R. Effect of phenobarbital and naphthalene on some of the components of the electron transport system and the hydroxylation activity of housefly microsomes[J]. *Biochemistry*, 1973, 42: 203- 210
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analyt Biochem*, 1976, 72: 248- 254
- [13] 吴文君. 农药学原理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000
- [14] 邱星辉, 冷欣夫. 昆虫细胞色素 P450 基因的表达与调控及 P450 介导抗性的分子机制[J]. *农药学报*, 1999, 1: 14- 17
- [15] 邱星辉, 冷欣夫. 昆虫细胞色素 P450 研究: P450 酶系的可诱导性[J]. *昆虫知识*, 1999, 36(1): 48- 53

## Studies on the relationship of cytochrome P450 and selective toxicity of Celangulin V against insect

L U M in, L IU Hui-xia, W U Wen-jun

(Institute of Pesticide, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** This paper discussed the relationship of cytochrome P450 content and NADPH-cytochrome P450 reductase activity with the selective toxicity of celangulin V against *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon*. In normal groups, the cytochrome P450 content and the NADPH-cytochrome P450 reductase activity of *A. ypsilon* were significantly higher than that of *M. separata*. After treated with celangulin V, the content of P450 of *A. ypsilon* and *M. separata* were significantly higher than that of control; P450 content of *M. separata* increased 1.46 and 2.26 fold respectively in the period of convulsion and the period of losing body fluid, and NADPH-cytochrome P450 reductase activity increased 1.26 and 2.56 fold respectively than that of normal P450 content of *A. ypsilon* treated with celangulin V increased 0.39 fold and NADPH-cytochrome P450 reductase activity increased slightly. These results indicated the content of cytochrome P450 and the activity of NADPH-cytochrome P450 reductase have important relationship with the selective toxicity of Celangulin V against *Mythimna separata* and *Agrotis ypsilon* larvae, meanwhile, celangulin V has certain inductive function to insect cytochrome P450, but the inductive function is varied to different insects and different composition of cytochrome P450 of an insect.

**Key words:** Celangulin V; cytochrome P450; NADPH-cytochrome P450 reductase; selective toxicity