

大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫 消化生理和生长发育的影响

王琛柱 项秀芬 张书芳 钦俊德

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

摘要 本研究根据棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 幼虫中肠蛋白酶在离体条件下对蛋白酶抑制剂的反应,选择具有较强抑制作用的大豆胰蛋白酶抑制剂,以 0.21—4.2% (干重)的浓度配入幼虫人工饲料,测定了幼虫短期和长期取食这些饲料引起的中肠类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和总蛋白酶活力的变化和生长抑制效应。短期取食抑制剂的幼虫,中肠弱碱性类胰蛋白酶活力显著增高,在 4.2% 浓度下比对照高出 21%;强碱性类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和总蛋白酶活力显著降低,生长发育受到明显抑制。长期取食低浓度(0.84%)抑制剂的幼虫,弱碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活力显著增高,强碱性类胰蛋白酶活力显著降低、总蛋白酶活力变化不显著;长期取食高浓度(4.2%)抑制剂的幼虫,强碱性类胰蛋白酶和总蛋白酶活力显著降低,其它酶活力变化不显著。抑制剂随浓度的增高对幼虫生长的抑制作用加强,但浓度高于 0.84% 后,抑制强度的变化减小。据此作者认为,蛋白酶抑制剂对昆虫抗营养效应在于它对蛋白酶的激活和抑制作用,从而导致各种蛋白酶间的协调性破坏,昆虫消化过程受阻,影响生长发育。

关键词 大豆胰蛋白酶抑制剂,棉铃虫,蛋白酶

植物蛋白酶抑制剂是广泛存在于植物中的一种多肽或蛋白质,对动物(包括昆虫)蛋白酶的活性有抑制作用。已有的研究表明,蛋白酶抑制剂具有抗虫活性,能显著抑制幼虫的生长发育^[1,2],这种活性的强弱取决于它对昆虫作用的特异性和在植物体内的浓度^[3,4]。昆虫的取食为害可诱导植物体内某些蛋白酶抑制剂的大量合成^[5]。

植物蛋白酶抑制剂对动物(包括昆虫)的抗代谢作用机理目前尚不完全清楚。哺乳动物摄入胰蛋白酶抑制剂可引起胰腺增大,胰酶过量分泌,这个过程通过激素 缩胆囊肽(cholecystokinin)调控^[6]。Broadway 和 Duffey 对昆虫的研究表明美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 摄入胰蛋白酶抑制剂也可诱导中肠类胰蛋白酶的活力增高,认为蛋白酶抑制剂对昆虫的作用方式很可能象在哺乳动物中一样,其有害作用是由诱导产生过量消化酶而引起的^[1]。本研究根据棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫蛋白酶在离体条件下对抑制剂的反应,筛选出具有较强抑制作用的大豆胰蛋白酶抑制剂,然后将其掺入棉铃虫幼虫人工饲料,通过测定幼虫取食后的消化生理反应和对生长发育的影响,试图了解其对棉铃虫幼虫的抗生作用强度及作用方式。

1 材料与方 法

1.1 昆虫的饲养和中肠酶液的提取

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 在温度 27℃、相对湿度 75%、光照时数 14h 的条件下人工饲养。幼虫人工饲料根据 Bot^[7] 配制, 但原组分麦胚粉和酪蛋白分别由等量的麦芽粉和全脂奶粉代替。根据试验要求, 取一定龄期的幼虫在 0—4℃ 下解剖, 用预冷的 0.15 mol/L NaCl 溶液冲去体液, 截取中肠及其内含物, 冰冻贮存(-15℃), 测试前取出, 稍融后, 以 0.15mol/L NaCl 溶液在冰浴内匀浆。匀浆液用 Beckman-11 离心机在 11200×g、4℃ 条件下离心 15min, 取上清液作为测试用的中肠酶液。

1.2 抑制剂对中肠蛋白酶的离体作用

大豆胰蛋白酶抑制剂、Bowman-Birk 抑制剂、利马豆胰蛋白酶抑制剂和卵粘蛋白抑制剂均由 Sigma 提供。为明确不同蛋白酶抑制剂在离体条件下对幼虫蛋白酶作用的强弱, 抑制剂与幼虫中肠酶液在缓冲液中混合, 反应 10min 后加入蛋白酶的专性底物, 测定相应蛋白酶活力的变化。抑制剂在反应混合液内的浓度均为 5 μg/ml 或 10 μg/ml。中肠酶液从正常饲料上生长的 5 龄幼虫中提取。以不含抑制剂的作为对照, 重复 3 次。

1.3 蛋白酶抑制剂在活体条件下对幼虫消化生理和生长发育的影响

1.3.1 抑制剂对幼虫的短期效应 分别配制含大豆胰蛋白酶抑制剂 0.84% 和 4.2% (干重) 的棉铃虫幼虫人工饲料。以正常人工饲料作为对照饲料。配制时先用适量蒸馏水将抑制剂溶解, 当人工饲料冷却至 40℃ 时加入搅拌均匀, 冷凝。选择大小一致的棉铃虫 4 龄幼虫, 饥饿 10h 后称重, 放入盛有处理或对照饲料的 5cm 培养皿内, 每皿 1 头。每种饲料饲喂 10 头幼虫。取食前皿内饲料的放入量应大于幼虫 48h 内的最大消耗量, 各处理间应基本相等。48h 后, 取出幼虫, 称鲜重, 然后解剖, 提取中肠酶液, 测定蛋白酶活性, 设重复 3 次。根据幼虫试前鲜重(A)和试后鲜重(B), 计算幼虫相对生长率(RGR), 计算公式如下:

$$RGR = (B - A) / [((A + B) / 2) \times T]$$

式中, T 为取食天数。

1.3.2 抑制剂对幼虫的长期效应: 以 0、0.21%、0.84%、2.10% 和 4.2% (干重) 5 个浓度梯度, 配制含大豆胰蛋白酶抑制剂的系列人工饲料, 配制方法同前。以每一浓度的人工饲料为处理(浓度 0 作为对照), 饲养同日初孵大小一致的幼虫 25 头, 4 日后换一次饲料, 8 日称取幼虫体重, 然后解剖, 制备中肠酶液, 并测定蛋白酶活性, 重复 3 次。试验数据分析采用随机区组方差分析, 以 Duncan 的新复极差法检验差异显著性。

1.4 中肠蛋白酶活性测定

蛋白酶活力均在 30℃、最适 pH 下使用 UV-754 型紫外可见分光光度计测定, 方法参照 Campbell 等^[8]。各种蛋白酶底物均从 Sigma 购买。幼虫弱碱性类胰蛋白酶以 P-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)为底物, 在 pH8.50 的 Tris 缓冲液中测定。TAME 以 2mmol/L 溶于 0.15mol/L NaCl 溶液中, 取 0.5ml 加入 0.5ml 含中肠酶液的 0.2mol/L 缓冲液中。反应从始至终在 247nm 测光吸收值。幼虫强碱性类胰蛋白酶以 α -N-苯甲酰-DL-精氨酸-P-硝基苯胺 (BAPNA) 为底物, 在 pH10.50 的甘氨酸缓冲液中测定。

BAPNA 以 20mg/ml 溶于二甲基亚砜,取 40 μ l 加入含中肠酶液的 1.5ml 0.1mol/L 反应缓冲液中。反应 20min 后,加入 0.5ml 30% (V/V) 乙酸终止反应,以 405nm 测光吸收值。幼虫类胰凝乳蛋白酶活力测定以 N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯 (BTEE) 为底物,在 pH8.50 的 Tris 缓冲液中测定。BTEE 以 1mmol/L 溶于含 10% (V/V) 甲醇的 0.15 mol/L NaCl 溶液中,取该液 0.5ml 加入 0.5ml 含中肠液的反应缓冲液。反应自始至终以 256nm 测光吸收值。TAME、BAPNA 和 BTEE 的克分子消光值分别为 540、8800 和 964,用以计算相应水解底物的摩尔数。

幼虫中肠的总蛋白酶活性以氨苯磺胺偶氮酪蛋白为底物,在 pH10.50 的甘氨酸缓冲液中测定。偶氮酪蛋白以 20mg/ml 的浓度溶于 0.15mol/L NaCl 溶液。取该液 0.3ml 加入含中肠酶液的 0.3ml 0.2mol/L 缓冲液中反应。在 30 $^{\circ}$ C 反应 2h 后,加入 0.6ml 的 20% (W/V) 三氯乙酸终止反应。反应混合物在 11200 \times g, 4 $^{\circ}$ C 下离心 15min 后,取上清液,以 366nm 测光吸收值。反应混合物 1 个吸收单位的变化定义为 1 个偶氮酪蛋白单位。

1.5 蛋白质含量测定

以牛血清蛋白为标准蛋白,用 Bradford^[9] 的方法测定。

2 结果

2.1 抑制剂对幼虫中肠蛋白酶的离体作用

表 1 列出了 4 种天然蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫中肠蛋白酶类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活性的影响。对棉铃虫弱碱性和强碱性类胰蛋白酶以及类胰凝乳蛋白酶的抑制作用,以大豆胰蛋白酶抑制剂的作用最强, Bowman-Birk 抑制剂次之,利马豆胰蛋白酶抑制剂的作用较弱,而卵粘蛋白抑制剂对三种酶均无显著抑制作用。

表 1 在离体条件下大豆胰蛋白酶抑制剂 (SBTI)、Bowman-Birk 抑制剂 (SBI)、利马豆胰蛋白酶抑制剂 (LBTI) 和卵粘蛋白抑制剂 (OI) 对棉铃虫幼虫中肠弱碱性类胰蛋白酶、强碱性类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶活力的影响

蛋白酶抑制剂及其浓度	弱碱性类胰蛋白酶	强碱性类胰蛋白酶	类胰凝乳蛋白酶
SBTI 5 μ g	7.96 \pm 1.95	4.50 \pm 0.71	37.04 \pm 8.48
	10 μ g	7.21 \pm 1.72	2.19 \pm 0.28
SBI 5 μ g	17.04 \pm 5.16	4.02 \pm 0.29	24.24 \pm 9.46
	10 μ g	12.16 \pm 3.25	4.70 \pm 0.92
LBTI 5 μ g	35.37 \pm 1.95	36.47 \pm 5.30	60.61 \pm 6.94
	10 μ g	33.11 \pm 1.89	25.48 \pm 0.11
OI 5 μ g	101.59 \pm 2.75	97.54 \pm 3.73	89.39 \pm 11.44
	10 μ g	102.96 \pm 1.56	91.92 \pm 5.77

注: 数据为相对活力百分数及其标准差, 100% 活力为仅有酶与底物在缓冲液中反应测得的活力(对照), 数值小于 100 表示有抑制作用。

2.2 大豆胰蛋白酶抑制剂对幼虫的短期效应

幼虫短期取食不同浓度大豆胰蛋白酶抑制剂, 引起幼虫中肠蛋白酶的活力变化, 并影

响幼虫的生长发育, 结果见表 2。抑制剂使弱碱性类胰蛋白酶的活性显著增高, 在 4.2% 浓度下, 该酶活性比对照高 21%; 强碱性类胰蛋白酶, 类胰凝乳蛋白酶和总蛋白酶活力均显著降低, 在 4.2% 的浓度下, 比对照分别降低 41%、37% 和 34%; 抑制剂对幼虫生长有显著抑制作用, 但并不因浓度增加而成比例增加。

表 2 短期供食不同浓度大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫中肠蛋白酶活力和幼虫相对生长率的影响

抑制剂 %(干重)	弱碱性类胰蛋白酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{肠}$)	强碱性类胰蛋白酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{肠}$)	类胰凝乳蛋白酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{肠}$)	总蛋白酶 (酶单位 $\cdot\text{min}^{-1}/\text{肠}$)	RGR
0	8.8395 \pm 0.5609 b	0.7588 \pm 0.0762 a	1.1295 \pm 0.2880ab	0.5159 \pm 0.0305 a	0.5623 \pm 0.0205 a
0.84	9.5802 \pm 0.9864 ab	0.6254 \pm 0.0238 b	0.8760 \pm 0.2223 b	0.4701 \pm 0.0218ab	0.5183 \pm 0.0267 b
4.2	10.7161 \pm 1.5561 a	0.4456 \pm 0.0105 c	0.7607 \pm 0.0692 c	0.3391 \pm 0.0144 c	0.5126 \pm 0.0246 b

注: 数据为平均数 \pm 标准差, 处理间具有相同字母的为相互差异不显著 (Duncan 新复极差检验, $P < 0.05$)。

表 3 长期供食不同浓度大豆胰蛋白酶抑制剂对棉铃虫幼虫中肠蛋白酶活力和生长的影响

抑制剂 %(干重)	弱碱性类胰蛋白酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{肠}$)	强碱性类胰蛋白酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{肠}$)	类胰凝乳蛋白酶 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{肠}$)	总蛋白酶 (酶单位 $\cdot\text{min}^{-1}/\text{肠}$)	幼虫 8 日龄体重 (g)
0	2.6667 \pm 1.0184 b	0.2670 \pm 0.0318 a	0.1729 \pm 0.0599 b	0.1596 \pm 0.0243 a	0.1602 \pm 0.0234 a
0.21	3.0864 \pm 1.3049ab	0.2440 \pm 0.0548 a	0.1959 \pm 0.0998 b	0.1415 \pm 0.0438ab	0.1348 \pm 0.0275 b
0.84	4.2222 \pm 1.0291 a	0.1789 \pm 0.0386 b	0.5302 \pm 0.0200 a	0.1491 \pm 0.0206 a	0.1096 \pm 0.0141 c
2.10	2.8889 \pm 0.8543 b	0.1161 \pm 0.0217 b	0.2651 \pm 0.0399 b	0.0937 \pm 0.0108 c	0.1070 \pm 0.0156 c
4.20	2.2963 \pm 0.1960 b	0.1140 \pm 0.0223 b	0.2536 \pm 0.0199 b	0.0784 \pm 0.0060 c	0.0832 \pm 0.0123 d

注: 数据为平均数 \pm 标准差, 处理间具有相同字母的为相互差异不显著 (Duncan 新复极差检验, $P < 0.05$)。试虫为大小一致的同日初孵幼虫。

2.3 大豆胰蛋白酶抑制剂对幼虫的长期效应

幼虫长期取食不同浓度大豆胰蛋白酶抑制剂所引起的幼虫中肠蛋白酶活力变化以及对幼虫生长的影响见表 3。当抑制剂浓度为 0.84% 时, 弱碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶的活性显著高于对照, 但当抑制剂浓度增加到 2.10% 和 4.2% 时, 上述效应消失。强碱性类胰蛋白酶和总蛋白酶活力随抑制剂浓度的增大而降低, 对幼虫的生长抑制作用亦加强, 但浓度大于 0.84%, 生长抑制作用强度的变化很小。

3 讨论

大豆胰蛋白酶抑制剂在离体条件下对棉铃虫幼虫中肠的多种蛋白酶活性均有很强的抑制作用。当幼虫取食含有抑制剂的人工饲料后, 幼虫中肠蛋白酶活性有的降低, 有的增高, 结果使幼虫生长发育受到显著抑制, 但这种生长的抑制效应并非随着浓度的增加而成比例地递增, 在高浓度下幼虫仍能生长发育。可见, 棉铃虫对大豆胰蛋白酶抑制剂具有一定的忍耐力。

Broadway 和 Duffey^[2] 以 TAME 为底物测定了美洲棉铃虫和甜菜夜蛾长期取食 0.18% (湿重) 大豆胰蛋白酶抑制剂后中肠内类胰蛋白酶的变化, 发现该种酶活性显著增高, 由此推论蛋白酶抑制剂对昆虫的作用方式是由于诱导类胰蛋白酶的大量有害产生从

而造成一些重要营养物的缺乏所致。本研究证实了幼虫短期取食 0.84%—4.2% (相当于湿重的 0.19%—0.95%) 和长期取食 0.84% 的大豆胰蛋白酶抑制剂人工饲料可引起水解 TAME 的弱碱性类胰蛋白酶活性显著增加, 但长期取食抑制剂浓度高于 2.1% 的人工饲料, 弱碱性胰蛋白酶活性不一定增加; 幼虫长期和短期取食抑制剂后, 水解 BAPNA 的强碱性类胰蛋白酶活性显著降低。因此 Broadway 等的推论可能仅是蛋白酶抑制剂有害作用的一个方面。根据本试验结果, 蛋白酶抑制剂对昆虫的作用方式仍在于其能影响蛋白酶的活性, 这种作用并不局限于对一种蛋白酶, 而是对多种蛋白酶, 有的酶如强碱性类胰蛋白酶的活性降低, 而有的酶如弱碱性类胰蛋白酶活力反而增高, 其结果使正常消化过程中重要蛋白酶间的协调性破坏, 导致昆虫生长发育受阻。

要彻底了解蛋白酶抑制剂对昆虫的作用机理, 必需首先明确昆虫消化酶的合成和分泌的调控方式。昆虫消化酶的合成和分泌的调控方式目前尚不完全清楚, 但有两种见解: 一种是激素调控方式, 这种方式已在某些昆虫中得到证明^[10]; 另一种是刺激分泌方式, 昆虫食物中的一些物质或消化产物能刺激消化酶的产生^[11], 本研究在一定程度上也证实了这一点。两种方式并不一定相互排斥, Chapman^[12]认为昆虫消化酶活性短期的波动与刺激分泌方式有关, 而较长期的变化可能更主要地受激素调控。详细的机制尚待深入研究。

参 考 文 献

- 1 Broadway R M, Duffey S S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. J. Insect Physiol. 1986, **32**: 827—833.
- 2 Hilder V A, Gatehouse A M R, *et al.* A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature. 1987, **330**: 160—163.
- 3 Gatehouse A, Gatehouse J, *et al.* Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. J. Sci. Food Agric. 1979, **30**: 948—958.
- 4 Johnson R, Narvaez J, *et al.* Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, **86**: 9871—9875.
- 5 Green T R, Ryan C A. Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. Science. 1972, **175**: 776—777.
- 6 McLaughlin C L, Peikin S R, *et al.* Food intake response to modulation of secretion of cholecystokinin in Zucker rats. Am. J. Physiol. 1983, **244**: 676—685.
- 7 Bot J. Rearing *Heliothis armigera* (Hübner) and *Prodenia litura* F. on an artificial diet. S. Afr. J. Agri. Sci. 1966, **9**: 538—539.
- 8 Campbell F C, Houseman J G, *et al.* A preliminary characterization of alkaline digestive proteases in the posterior midgut of face fly *Musca autumnalis* De Greer. Can. J. Zool. 1987, **65**: 635—639.
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 1976, **72**: 248—254.
- 10 Downe A E R. Internal regulation of rate of digestion of blood meals in the mosquito *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 1975, **21**: 1835—1839.
- 11 Schneider F, Houseman J G, *et al.* Activity cycles and the regulation of digestive protease in the posterior midgut of *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). Insect Biochem. 1987, **17**: 859—862.
- 12 Chapman R F. Coordination of digestion. In: Kerkut, G. A., L. I. Gilbert (eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 4. Pergamon Press, Oxford. 1985, 213—240.

EFFECT OF SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR ON THE GROWTH AND DIGESTIVE PHYSIOLOGY OF *HELCOVERPA ARMIGERA* LARVAE

Wang Chenzhu Xiang Xiufen Zhang Shufang Qin Junde

(*Institute of Zoology, Academia Sinica Beijing 100080*)

Abstract Based on the *in vitro* effect on protease activity of larval midgut, soybean trypsin inhibitor (STI) was suggested as the potential resistant agent to cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. It was incorporated in the larval artificial diet at 0.84—4.2% (dry weight) to determine its acute and chronic effects on the growth and *in vivo* midgut protease activity of cotton bollworm. Ingestion of 4.2% STI in short term resulted in reduced larval growth rate, increased low alkaline trypsin-like enzyme activity, decreased high alkaline trypsin-like enzyme activity, decreased chymotrypsin-like enzyme activity, and decreased total proteolysis. When the larvae chronically ingested 0.84% STI, low alkaline trypsin-like and chymotrypsin-like enzyme activities were significantly elevated, high alkaline trypsin-like enzyme activity was markedly declined, and total proteolysis had no significant change. When the larvae chronically ingested 4.2% STI, high alkaline trypsin-like enzyme activity and total proteolysis were significantly decreased, but there was no significant elevation of low alkaline trypsin like and chymotrypsin-like enzyme activities. Retarding effect of STI on growth of the larvae was significant but not proportional to the dosage of STI. Thus, the mechanism of anti-nutritional action of proteinase inhibitor seems to be complicated, and pernicious hyperproduction of some protease may be only one aspect of the action. Influence of cooperative proteases activity may still be the basis in mode of action.

Key words Soybean trypsin inhibitor, *Helicoverpa armigera*, protease