

文章编号: 0454-6296 (2000) 02-0138-05

# 增效醚(PBO)对棉铃虫细胞色素 P450 的抑制作用及对拟除虫菊酯的增效作用

吴益东<sup>1</sup>, 杨亦桦<sup>1</sup>, 陈进<sup>1</sup>, 李爱玫<sup>1</sup>, 沈晋良<sup>1</sup>, 沈文飏<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学植物保护学系, 农业部农业病虫监测与治理重点开放实验室, 南京 210095;

2. 南京农业大学理学院, 南京 210095)

**摘要:** 在增效醚(PBO)对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 3龄幼虫处理后的不同时段, 细胞色素 P450 的含量受到不同程度的抑制: 在处理 1 h, 细胞色素 P450 的含量仅为对照的 43.9%, 至处理后 12 h, 细胞色素 P450 的含量下降到最低点, 仅为对照的 23.4%; 而处理后 18~24 h, 细胞色素 P450 被抑制的程度有所减弱, 其含量分别为对照的 85.8% 和 70.0%。生物测定结果表明, PBO 对所测定的 7 种拟除虫菊酯均有不同程度的增效作用, 对氰戊菊酯的增效比最高 (119.3), 对氯菊酯的增效比最低 (2.1)。由于细胞色素 P450 是拟除虫菊酯的重要解毒酶系, PBO 的处理可使棉铃虫细胞色素 P450 的含量大幅度下降, 使其对杀虫剂的解毒能力减弱, 从而对杀虫剂产生增效作用。

**关键词:** 棉铃虫; 细胞色素 P450; 增效醚; 抗药性

**中图分类号:** Q965.9      **文献标识码:** A

昆虫微粒体多功能氧化酶的抑制剂是杀虫剂代谢研究中受到较广泛重视的一个方面, 这不仅是因为氧化酶抑制剂是进行杀虫剂代谢研究的重要工具, 有助于更好地了解昆虫的解毒机制, 而且是因为这类抑制剂对杀虫剂有增效作用, 它又是克服抗性的办法之一<sup>[1]</sup>。增效醚 (piperonyl butoxide, 简称为 PBO) 属于亚甲基二氧苯基化合物 (简称为 MDP 类化合物), 它对多种结构类型的杀虫剂具有增效作用, 它常作为多功能氧化酶的专一性抑制剂而被广泛应用于生测和生化研究。Sun 和 Johnson (1960) 在家蝇体内代谢研究中首次发现 MDP 类化合物能够抑制杀虫剂的氧化代谢, 从而初步揭示了 MDP 类化合物对杀虫剂的增效机理<sup>[2]</sup>。

细胞色素 P450 是多功能氧化酶系的末端氧化酶, 在对杀虫剂的氧化代谢中起着中心作用, 害虫抗药性的产生往往与细胞色素 P450 的含量升高和活性增强有关。国内外大量研究表明细胞色素 P450 解毒活性增强是棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对拟除虫菊酯的重要抗性机理之一<sup>[3~6]</sup>, 这些研究均根据 PBO 对拟除虫菊酯的显著增效作用进行间接推断的。对于 PBO 对棉铃虫细胞色素 P450 的抑制作用和增效机理, 国内外未见报道。本文研究了 PBO 对棉铃虫细胞色素 P450 的抑制作用, 并测定了 PBO 对拟除虫菊酯杀虫剂的增效作用, 从生物测定和生化分析两方面对 PBO 的增效机制进行初步探索。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39770507) 及江苏省应用基础项目 (BJ97009) 的部分研究内容

收稿日期: 1998-04-16; 修订日期: 1998-11-02

## 1 材料和方法

### 1.1 供试昆虫

所采用的棉铃虫为1994年采自山东省聊城地区阳谷县的棉铃虫,以人工饲料喂养,并在室内用氰戊菊酯筛选过6代。棉铃虫室内饲养条件:温度 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,相对湿度60%~85%,光周期14 h:10 h(光照:黑暗)。

### 1.2 PBO对细胞色素P450抑制作用的研究

**1.2.1 取样:**选取发育整齐的3龄初幼虫(0~4时龄)若干头,将它们分成两部分,一部分用PBO处理( $8 \mu\text{g}/\text{头}$ ),另一部分作为对照。在PBO处理后1 h、4 h、8 h、12 h、18 h、24 h,分别取经PBO处理的及对照幼虫各150头,每50头为一个处理,重复3次,分别测定细胞色素P450的含量。

**1.2.2 微粒体制备:**在50头3龄幼虫整体中加入一定量的0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH7.6,含0.1 mol/L KCl),用玻璃匀浆器匀浆,在 $4^\circ\text{C}$  10 000 g下离心15 min,取出上清液并于 $4^\circ\text{C}$  100 000 g超速离心60 min,将沉淀的微粒体部分悬浮于适当体积的0.1 mol/L磷酸缓冲液中(pH7.6),使微粒体蛋白含量为 $1 \text{ mg}/\text{mL} \sim 2 \text{ mg}/\text{mL}$ ,以上所有操作均应在 $4^\circ\text{C}$ 以下进行。微粒体悬浮液蛋白质含量的测定用Bradford方法<sup>[7]</sup>。

**1.2.3 细胞色素P450含量的差光谱测定:**参考Omura和Sato方法<sup>[8]</sup>,用可全波长扫描的双光束分光光度计(Kontron UV810/820,瑞士产)记录差光谱。测定细胞色素P450含量时,用连二亚硫酸钠将样品杯和参比杯中的微粒体悬浮液还原,在样品杯中通入一氧化碳(CO)后,记录差光谱,根据波长在450~490 nm间的吸光度之差和摩尔吸光系数 $91 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1}$ 计算细胞色素P450的含量。

### 1.3 生物测定

将药剂溶解于丙酮并稀释成一系列浓度梯度,用微量毛细管点滴器(体积 $0.04 \mu\text{L}$ )将药液点滴在试虫的胸部背板上。试虫为体重8~10 mg的3龄幼虫,避免使用刚蜕皮或快要蜕皮的幼虫。每个浓度处理20~30头,重复3次,以丙酮处理为对照。处理后48 h检查死亡率,以锐器轻触虫体,无明显反应者为死亡。在测定PBO的增效作用时,将PBO以 $8 \mu\text{g}/\text{头}$ 的剂量对试虫预处理1 h后,再用药剂处理,然后计算增效比(SR)。

## 2 结果与分析

### 2.1 PBO对棉铃虫3龄幼虫细胞色素P450的抑制作用

选择3龄幼虫作为研究材料,研究了3龄幼虫不同时龄的细胞色素P450在PBO预处理和不处理条件下的变化动态。结果(图1)表明,在正常条件下棉铃虫细胞色素P450的含量是呈动态变化的,在12 h达到最高峰;在PBO处理后,细胞色素P450的含量一直处于比较低的水平,在18 h达最高峰。在PBO对3龄幼虫处理后的不同时段,细胞色素P450的含量受到不同程度的抑制:处理后1 h,细胞色素P450的含量仅为对照的43.9%;至处理后12 h,细胞色素P450的含量下降到最低点,仅为对照的23.4%;而处理后18~24 h,细胞

色素 P450 的含量分别为对照的 85.8% 和 70.0%。从 PBO 对细胞色素 P450 抑制的动力学来看, PBO 对细胞色素 P450 的抑制作用相当迅速, 处理后仅 1 h 就使其含量下降到一个较低的水平, PBO 的强烈抑制作用维持了约 12 h 左右。由于细胞色素 P450 是昆虫体内的重要解毒酶系, PBO 的处理可使棉铃虫细胞色素 P450 的含量大幅度下降, 使其对杀虫剂的解毒能力减弱, 从而对杀虫剂产生增效作用。

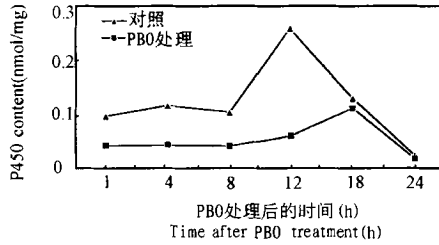


图 1 PBO 对棉铃虫 3 龄幼虫细胞色素 P450 的抑制作用

Fig.1 Inhibition of cytochrome P450 in the third instar larva of *Helicoverpa armigera* by piperonyl butoxide (PBO)

2.2 PBO 对 7 种拟除虫菊酯的增效作用

用山东阳谷棉铃虫抗性品系进行生物测定, 表 1 的结果表明, PBO 对所测定的 7 种拟除

表 1 PBO 对 7 种拟除虫菊酯的增效作用 (山东阳谷棉铃虫抗性品系)

Table 1 Synergism of PBO to seven pyrethroids in Yanggu resistant strain of *H. armigera*

药剂 Insecticide	毒力回归方程 Regression equation	LD <sub>50</sub> and 95% FL ( $\mu\text{g/Larva}$ )	增效比 Synergistic ratio
氰戊菊酯 Fenvalerate	$Y = 4.2047 + 1.6344X$	3.0662 (2.3772~3.8770)	119.3
Fenvalerate + PBO	$Y = 7.5172 + 1.5829X$	0.0257 (0.0148~0.0367)	
顺式氰戊菊酯 Esfenvalerate	$Y = 6.8816 + 1.9442X$	0.1077 (0.0852~0.1352)	4.3
Esfenvalerate + PBO	$Y = 8.2608 + 2.0426X$	0.0253 (0.0195~0.0318)	
功夫菊酯 Cyhalothrin	$Y = 9.2150 + 2.4704X$	0.0197 (0.0156~0.0248)	4.2
Cyhalothrin + PBO	$Y = 8.7705 + 1.6216X$	0.0047 (0.0034~0.0063)	
溴氰菊酯 Deltamethrin	$Y = 9.5000 + 2.6229X$	0.0192 (0.0154~0.0240)	4.8
Deltamethrin + PBO	$Y = 9.7913 + 1.9998X$	0.0040 (0.0026~0.0054)	
甲氰菊酯 Fenpropathrin	$Y = 4.7547 + 1.7847X$	1.3723 (0.9988~2.0049)	36.6
Fenpropathrin + PBO	$Y = 7.4881 + 1.7455X$	0.0375 (0.0224~0.0521)	
百树菊酯 Cyfluthrin	$Y = 6.5793 + 1.6796X$	0.1147 (0.0880~0.1520)	6.3
Cyfluthrin + PBO	$Y = 7.7067 + 1.5516X$	0.0180 (0.0091~0.0260)	
氯菊酯 Permethrin	$Y = 8.6800 + 3.5078X$	0.0893 (0.0659~0.1086)	2.1
Permethrin + PBO	$Y = 7.8220 + 2.0538X$	0.0423 (0.0324~0.0554)	

虫菊酯均有不同程度的增效作用, 其中, 对氰戊菊酯和甲氰菊酯的增效作用最为显著, 增效比分别为 119.3 和 36.6; 对氯菊酯的增效作用最低, 增效比仅为 2.1; 对其它 4 种拟除虫菊酯的增效作用中等, 增效比为 4.2~6.3。

### 3 讨论

关于 PBO 对杀虫剂的增效机制, 目前有两种学说, 第一种认为 PBO 本身就是细胞色素 P450 的底物, 它比杀虫剂更容易与细胞色素 P450 的活性部位结合, 因而使杀虫剂的解毒代谢受到竞争性抑制; 第二种则认为 PBO 与细胞色素 P450 相互作用形成稳定的复合体, 这种复合体不能与杀虫剂结合, 从而非竞争性地抑制了细胞色素 P450 对杀虫剂的解毒作用<sup>[1,9,10]</sup>。从本文的研究结果来看, PBO 与棉铃虫细胞色素 P450 之间存在相互作用, 可使细胞色素 P450 含量大幅度降低, 并能使拟除虫菊酯增效。

一般情况下, PBO 对于敏感品系的增效作用不明显, 而对具氧化代谢抗性机制的品系表现出显著的增效作用。从本文的结果来看, PBO 对不同拟除虫菊酯增效程度具有显著差异, 这表明细胞色素 P450 酶系对于不同结构的拟除虫菊酯的代谢能力具有明显差异, 改变拟除虫菊酯的结构可以成为克服氧化代谢抗性的有效途径之一。

### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] 施国涵. 微粒体多功能氧化酶在昆虫抗药性中的作用. 杀虫药剂与昆虫毒理进展, 1983 (2): 123~138
- [ 2 ] Sun Y P, Johnson E R. Synergistic antagonistic actions of insecticide-synergist combinations and their mode of action. J. Agric. Food Chem., 1960, 8: 261~266
- [ 3 ] 吴益东, 沈晋良, 尤子平. 棉铃虫对氰戊菊酯抗性和敏感品系的选育. 昆虫学报, 1994, 37 (2): 129~136
- [ 4 ] 吴益东, 沈晋良, 尤子平. 棉铃虫对氰戊菊酯抗性遗传分析. 昆虫学报, 1995, 38 (1): 20~24
- [ 5 ] Ahmad M, McCaffery A R. Elucidation of detoxication mechanisms involved in resistance to insecticides in the third instar larvae of field-selected strain of *Helicoverpa armigera* with the use of synergists. Pestic. Biochem. Physiol., 1991, 41: 41~52
- [ 6 ] Forrester N W, Cahill M, Layland J K. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. Bull. Entomol. Res., 1993, Sup. No. 1
- [ 7 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem., 1976, 72: 248~254
- [ 8 ] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem., 1964, 239 (7): 2 370~2 378
- [ 9 ] Casida J E. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. J. Agric. Food Chem., 1970, 18: 753~772
- [ 10 ] Agosin M. Role of microsomal oxidation in insecticide degradation. In: Kerkut G A, Guilbert L I eds. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol 12, Oxford: Pergamon Press. 1985, 696~700

## Inhibition of cytochrome P450 in *Helicoverpa armigera* (Hübner) by piperonyl butoxide (PBO) and its synergism to pyrethroids

WU Yi-dong<sup>1</sup>, YANG Yi-hua<sup>1</sup>, CHEN Jin<sup>1</sup>, LI Ai-mei<sup>1</sup>, SHEN Jin-liang<sup>1</sup>, SHEN Wen-biao<sup>2</sup>

(1. Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University; Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Disease and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095; 2. College of Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** Treatment *in vivo* with PBO caused apparent reduction of the cytochrome P450 level in third instar larva of *Helicoverpa armigera*. At 1 hour after PBO treatment, the content of cytochrome P450 was only 43.9% of that in the control. At 12 hours after PBO treatment, the content of cytochrome P450 decreased to 23.4% of the control. While 18 and 24 hours after treatment, the content of cytochrome P450 was 85.8% and 70.0% of the control respectively. The bioassay results indicated that PBO synergised 7 pyrethroids significantly, with the highest synergistic ratio (119.3) for fenvalerate and the lowest (2.1) for permethrin. Because the cytochrome P450 is an important detoxifying enzyme, the reduction of the cytochrome P450 level can impede the oxidative metabolism and cause obvious synergism to pyrethroids in *H. armigera*.

**Key words:** *Helicoverpa armigera* (Hübner); cytochrome P450; piperonyl butoxide; insecticide resistance