

牛耳枫提取物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用

刘伟¹, 肖婷², 杜磊¹, 薛超彬¹, 杨帆¹, 罗万春¹

(¹山东农业大学植物保护学院/农药毒理与应用技术省级重点实验室, 山东泰安 271018; ²江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏句容 212400)

摘要:【目的】筛选对甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 酚氧化酶具有高抑制活性的化合物, 寻找新型害虫控制剂的线索。【方法】以牛耳枫 (*Daphniphyllum calycinum* Benth.) 提取物 Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 为抑制剂, 采用酶标仪微量法研究了其对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制活性及抑制类型。【结果】Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制中浓度 (IC₅₀) 分别为 2.439 mmol·L⁻¹ 和 0.879 mmol·L⁻¹, 2 种化合物均为典型的可逆竞争型抑制剂, 抑制常数 (K_i) 分别为 2.051 mmol·L⁻¹ 和 1.269 mmol·L⁻¹。【结论】2 种生物碱对甜菜夜蛾酚氧化酶具有较好的抑制活性, 可以以这 2 种化合物或其类似物为模板指导酶抑制剂的分子设计, 是寻找新型害虫控制剂的重要途径。

关键词: 牛耳枫; 甜菜夜蛾; 酚氧化酶; 抑制动力学

Inhibitory Effects of Two Compounds Extracted from *Daphniphyllum calycinum* on Phenoloxidase of *Spodoptera exigua*

LIU Wei¹, XIAO Ting², DU Lei¹, XUE Chao-bin¹, YANG Fan¹, LUO Wan-chun¹

(¹College of Plant Protection, Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong; ²Institute of Zhenjiang Agricultural Sciences Jiangsu Hill Region, Jurong 212400, Jiangsu)

Abstract: 【Objective】 The article studies phenoloxidase inhibitors against insect and finds the clues on new target for pest control. 【Method】 The effects of deoxycalyciphylline B and Methyl homosecodaphniphyllate extracted from *Daphniphyllum calycinum*. on phenoloxidase (PO) of *Spodoptera exigua* (Hübner) were investigated adopting the microtitration assay. 【Result】 The results indicated that the two compounds showed different inhibitory effects on the PO and the inhibitor concentrations leading to 50% (IC₅₀) activity lost were estimated to be 2.439 mmol·L⁻¹ for deoxycalyciphylline B and 0.879 mmol·L⁻¹ for methyl homosecodaphniphyllate, respectively. The two compounds were also found to be reversible competitive inhibitors and the K_i values were determined to be 2.051 mmol·L⁻¹ and 1.269 mmol·L⁻¹, respectively. 【Conclusion】 Two alkaloids have better inhibitory activities on the PO. The two compounds or their analogues can be used as the templates to guide the molecular design of enzyme inhibitors. These are important ways looking for new pest control agents.

Key words: *Daphniphyllum calycinum*; *Spodoptera exigua*; phenoloxidase; inhibitory kinetics

0 引言

【研究意义】虎皮楠科 (*Daphniphyllaceae*) 系被子植物金缕梅纲 (*Hamamelidopsida*), 仅有交让木属 (*Daphniphyllum*) 1 属, 约 30 种, 主要分布于亚洲东南部, 中国有 10 种, 主要分布于长江以南的四川、云

南、贵州、广西、广东等省区。虎皮楠科植物的主要化学特征是含有次生代谢物质生物碱类, 其多变的骨架和复杂的多环结构吸引了天然产物化学家对其深入的研究^[1-2]。从 20 世纪 60 年代对交让木开始进行生物碱成分研究至今, 研究人员共从 12 种虎皮楠科植物中分离鉴定出 13 种骨架类型的生物碱 128 个, 其中仅有

收稿日期: 2009-01-04; 接受日期: 2009-03-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571237)、教育部博士学科点专项科研基金 (20070434006)

作者简介: 刘伟 (1983—), 女, 山东威海人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫毒理学及天然产物农药。E-mail: Liuwei_wb@163.com。通信作者罗万春 (1951—), 男, 河北定州人, 教授, 博士, 研究方向为昆虫毒理学及天然产物农药。Tel: 0538-8242983; E-mail: wcluo@sdau.edu.cn

少数生物碱对鼠淋巴瘤细胞株 L1210 表现出强的抑制活性, 而其它大多数的虎皮楠生物碱的生物活性测试令人失望。虎皮楠科植物牛耳枫 (*Daphniphyllum calycinum*)、交让木 (*Daphniphyllum macropodum*) 和虎皮楠 (*Daphniphyllum oldhamii*) 在中国传统医药中有一定药用价值, 其药性辛、苦、凉, 多有清热解毒、活血散瘀、祛风止痛、治疮疖肿毒等功效, 牛耳枫子还有止痢的功效^[3], 而对其农药活性的研究却未见报道。为了综合开发药用植物资源, 寻找新的植物源杀虫剂, 本文以从牛耳枫中分离提取到两种化合物^[4], 并对其中 2 个化合物进行了报道, 测定了它们对甜菜夜蛾酚氧化酶活性的影响试验。酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 对昆虫体壁形成过程中的硬化和黑化具有关键作用, 它并具有重要的免疫功能, 是昆虫体内起主要免疫作用的氧化还原酶^[5], 是发展环境友好害虫控制剂的潜在靶标。中国著名昆虫毒理学家张宗炳和冷欣夫先生早在 1993 年就曾经指出: “探索新杀虫药剂的一条最有希望的途径是生物合理设计途径, 其中酪氨酸酶 (即酚氧化酶) 抑制剂名列前茅^[6]”。【前人研究进展】酚氧化酶自 20 世纪 60 年代以来一直备受关注, 美国加州 Berkeley 大学的 Kubo 等^[7]研究了苯甲醛类、黄酮类等天然化合物对蘑菇酚氧化酶的抑制活性及作用机理, 发现其中大部分物质能与酚氧化酶中铜离子进行螯合而产生抑制作用。自本世纪以来, 山东农业大学罗万春教授领导的课题组分离并初步纯化了菜青虫、小菜蛾和甜菜夜蛾酚氧化酶, 研究了槲皮素、曲酸、苯甲醛类、苯甲酸类及苯甲醛缩氨基硫脲类等化合物及其类似物对该酶的抑制活性, 研究了其中高活性化合物对该酶的抑制机理并开展了化合物结构与活性相关性 (QSAR) 研究^[8-15]。厦门大学陈清西教授带领的课题组研究了 4-己基间苯二酚、4-十二烷基间苯二酚、*p*-烷氧基苯甲酸、3,5-二羟基苯甲酸、3,5-二羟基-1,2-二苯乙烯等许多化合物对蘑菇酚氧化酶的抑制作用和抑制动力学^[16-19]。【本研究切入点】迄今未见对牛耳枫提取物农药活性的研究报道, 本研究旨在发现酚氧化酶新型抑制剂, 为以该酶为靶标的“环境友好害虫控制剂”的研究奠定理论基础。【拟解决的关键问题】本文采用酶标仪微量法进行研究, 拟探索出 2 种生物碱化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制活性及抑制类型, 并求出抑制常数。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

试验材料:

甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* (Hübner)) 5 龄幼虫, 在温度为 (25±1) °C, 相对湿度 60%~70%, 光周期为 14L: 10D 的养虫室内以新鲜人工饲料饲养^[20]。

主要仪器和试剂:

CR22 高速冷冻离心机(日本日立公司); Multiskan MK3 酶标仪 (Thermo Electron Corporation)。L-多巴为 Sigma 公司产品, 二甲基亚砜 (DMSO)、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硫酸铵等均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酶液制备 挑取甜菜夜蛾 5 龄幼虫 4 g, 按 5 ml·g⁻¹ 加入 0.2 mol·L⁻¹ 的磷酸缓冲液 (pH 6.5), 置于预冷的匀浆器中, 冰浴中匀浆, 于 8 000 r/min (4°C) 离心 30 min, 去除液表面脂类和色素, 取上清液作为粗酶源。加入硫酸铵使其饱和度为 40%, 并在冰浴下静置 20 min, 于 8 000 r/min (4°C) 离心 30 min。收集沉淀, 并将其溶解在少量体积的磷酸缓冲液 (pH 6.5) 中, 然后在 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 6.5) 中透析, 其间多次更换透析液, 直至无 SO₄²⁻ 检出, 得酶液, 备用。

1.2.2 酶活性测定 采用酶标仪微量法^[21], 在 200 μl 的测活体系中, 包含终浓度为 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH 6.5), 1 mmol·L⁻¹ L-DOPA, 37°C 温浴 30 min, 加入 10 μl 酶液, 于 Multiskan MK3 酶标仪振荡 5 s, 测定 475 nm 波长下 120 s 光密度随时间变化的增长曲线, 每 20 s 记录一个吸光度值, 得一条直线, 从直线的斜率可求得该酶剩余活力, 消光系数按 3 700 (mol·L⁻¹)⁻¹·cm⁻¹ 计算^[22]。

1.2.3 化合物对酶活力的影响测定 将化合物溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 以 L-DOPA 为底物, 将不同浓度的化合物与底物溶液混匀, 采用上述方法测定 475 nm 波长下酶活力, 方法同 1.2.2。酶活力单位 (U) 定义为在该条件下, 每分钟产生 1 mmol·L⁻¹ 产物的酶量。与对照酶活力相比, 得出相对剩余活力。测定效应物浓度与酶剩余相对活力的关系, 由系列数据计算求出各化合物的 IC₅₀。

1.2.4 化合物对酚氧化酶的抑制效应的测定 参照王树栋等^[8]方法。在测活体系中, 固定底物 L-DOPA 的浓度, 改变加入的酶液量, 测定不同抑制剂浓度下酶活力随底物浓度变化的规律, 以加入酶液量对相对酶活力作图, 从而判断化合物的抑制效应。

1.2.5 化合物对酚氧化酶的抑制类型及抑制常数的测定 参照王树栋等^[8]方法, 略有改进。在测活体系

中, 固定酶液浓度, 改变 L-DOPA 的浓度, 测定不同抑制剂浓度下酶活力随底物浓度变化的规律, 以酶反应的初速度对底物浓度作图为一组双曲线, 此结果说明酶促反应遵循米氏动力学方程。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 比较抑制剂对表观米氏常数 (K_m) 和最大反应速度 (V_m) 的影响, 根据 K_m 和 V_m 值的变化规律判定抑制类型, 并求其抑制常数。

2 结果与分析

2.1 化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶活力的影响

酶的相对剩余活力与 2 种化合物的浓度关系见图 1。结果表明: 以 L-DOPA 为底物, 随着化合物浓度的增大, 酶相对剩余活力逐渐降低, 根据表 1 的回归方程计算得出, 化合物 Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 对该酶抑制中浓度 (IC_{50}) 分别为 2.439 和 0.879 $mmol \cdot L^{-1}$ 。

2.2 化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制效应

酚氧化酶经抑制剂作用后的剩余活力与加入酶液量之间的关系, 结果见图 2 和图 3, 酶活力对酶液量作图得到一组通过原点的直线, 随着抑制剂浓度的增

表 1 Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 的回归方程

Table 1 The regression equations of deoxycalyciphylline and methyl homosecodaphniphyllate

化合物 Compounds	回归方程 (LD-P line $y=a+bx$)	相关系数 R
Deoxycalyciphylline B	$y=4.2005+2.0646x$	0.977
Methylhomosecodaphniphyllate	$y=5.1016+1.8084x$	0.978

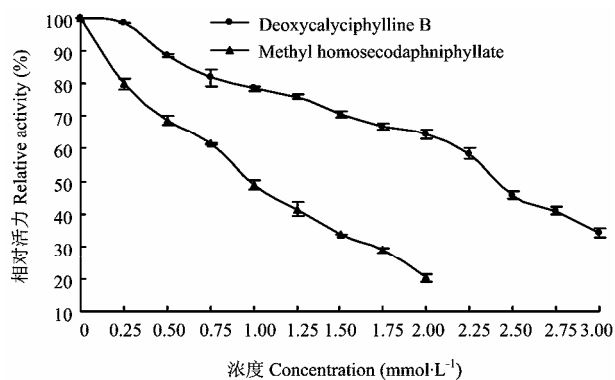
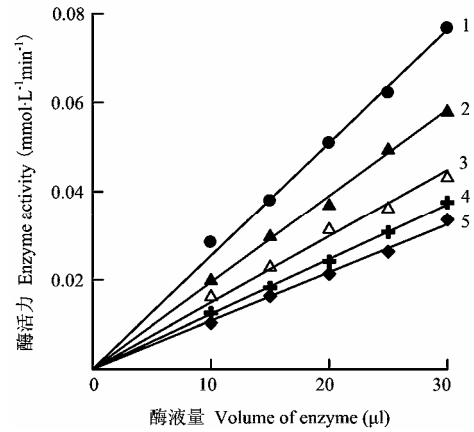


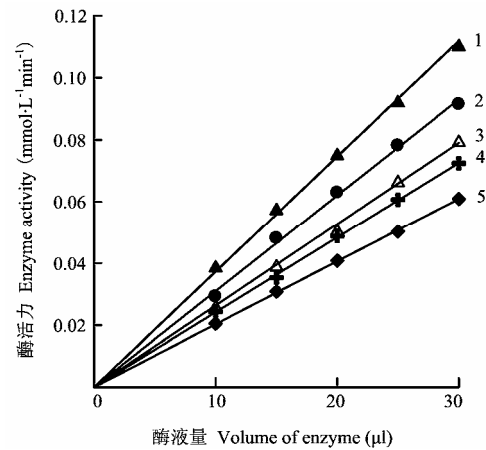
图 1 Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 对酚氧化酶活力的影响

Fig. 1 Effects of deoxycalyciphylline B and methyl homosecodaphniphyllate on phenoloxidase



直线 1~5 指 Deoxycalyciphylline B 的浓度分别为: 0, 0.5, 1, 1.5, 2 $mmol \cdot L^{-1}$
Concentrations of deoxycalyciphylline B for lines 1-5 was 0, 0.5, 1, 1.5, 2 $mmol \cdot L^{-1}$, respectively

图 2 在 Deoxycalyciphylline B 存在下酶活力与酶量的关系
Fig. 2 The effect of concentration of PO on its activity for the catalysis of L-DOPA at different concentrations of deoxycalyciphylline B



直线 1~5 指 Methyl homosecodaphniphyllate 的浓度分别为: 0, 0.5, 1, 1.5, 2 $mmol \cdot L^{-1}$
Concentrations of methyl homosecodaphniphyllate for lines 1-5 was 0, 0.5, 1, 1.5, 2 $mmol \cdot L^{-1}$, respectively

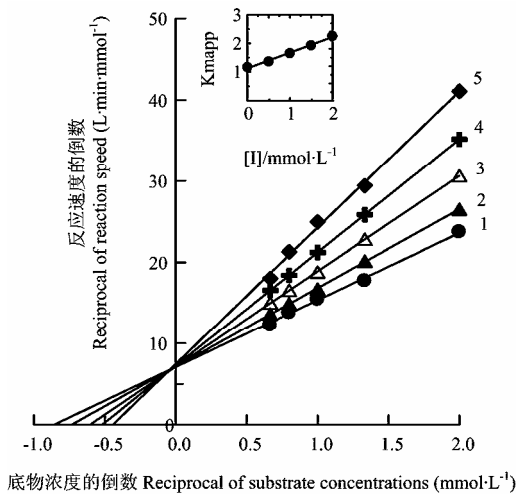
图 3 在 Methyl homosecodaphniphyllate 存在下酶活力与酶量的关系

Fig. 3 The effect of concentration of PO on its activity for the catalysis of L-DOPA at different concentrations of methyl homosecodaphniphyllate

大, 直线的斜率降低。此结果表明, Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 抑制酚氧化酶活力的反应均为可逆性抑制。

2.3 化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制类型和抑制常数

Deoxycalciphylline B 和 Methyl homosecodaphni-phyllate 对酚氧化酶抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数图, 如图 4 和图 5 所示, 各得到一纵轴截距不变的直线, 测定的数据表明这 2 种抑制剂不改变酶促反应的最大反应速度 (V_{max}), 只影响米氏常数 (K_m), K_m 值随着抑制剂浓度的增大而增大 (表 2 和表 3), 其抑制机理均表现为竞争性抑制。以不同浓度 Deoxycalciphylline B 和 Methyl homosecodaphni-phyllate 对酶抑制作用下测定的 K_m 分别对 Deoxycalciphylline B 和 Methyl homosecodaphni-phyllate 浓度作图 (图 4 和图 5 内插图) 为一条直线, 根据直线



直线 1~5 的抑制剂浓度分别为 0, 0.5, 1, 1.5, 2 mmol·L⁻¹
Concentrations of deoxycalciphylline B for curves 1-5 was 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mmol·L⁻¹, respectively

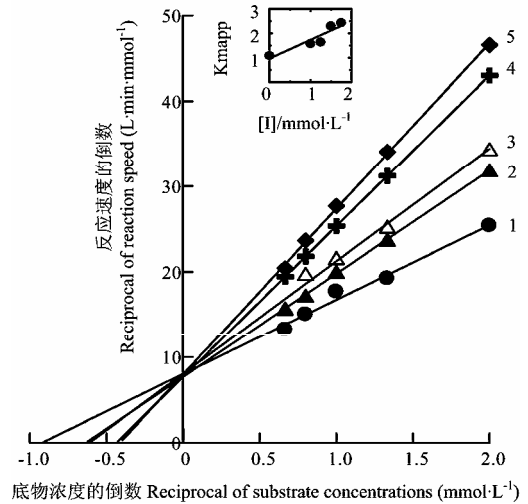
图 4 Deoxycalciphylline B 对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots for inhibition of deoxycalciphylline B on PO activity

表 2 不同浓度的 Deoxycalciphylline B 作用下 PO 的 V_{max} 和 K_m

Table 2 V_{max} and K_m of PO at different concentrations of deoxycalciphylline B

浓度 Concentration (mmol·L ⁻¹)	K_m	V_{max}
0	1.166	0.141
0.5	1.361	0.140
1	1.650	0.140
1.5	1.927	0.138
2	2.252	0.134



直线 1~5 的抑制剂浓度分别为 0, 1, 1.25, 1.5, 1.75 mmol·L⁻¹
Concentrations of methyl homosecodaphni-phyllate for curves 1-5 was 0, 1, 1.25, 1.5 and 1.75 mmol·L⁻¹, respectively

图 5 Methyl homosecodaphni-phyllate 对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for inhibition of methyl homosecodaphni-phyllate on PO activity

表 3 不同浓度的 Methyl homosecodaphni-phyllate 作用下 PO 的 V_{max} 和 K_m

Table 3 V_{max} and K_m of PO at different concentrations of methyl homosecodaphni-phyllate

浓度 Concentration (mmol·L ⁻¹)	K_m	V_{max}
0	1.088	0.125
1	1.576	0.130
1.25	1.638	0.124
1.5	2.299	0.130
1.75	2.431	0.125

的斜率可以求得抑制常数 (K_I), 其 K_I 依次为 2.051 mmol·L⁻¹ 和 1.269 mmol·L⁻¹。

3 讨论

酚氧化酶具有单酚酶活性和二酚酶活性, 本文以 L-多巴为底物, 采用酶标仪微量法研究了 Deoxycalciphylline B 和 Methyl homosecodaphni-phyllate 对甜菜夜蛾酚氧化酶的影响, 测定的酶活力为二酚酶活力。从结果可以看出, Methyl homosecodaphni-phyllate 对酚氧化酶的抑制活性较高。Deoxycalciphylline B 和 Methyl homosecodaphni-phyllate 对甜菜夜蛾酚氧化

酶二酚酶的抑制作用表现为可逆竞争性抑制作用,表明 2 种化合物和游离酶结合,与底物竞争酶的活性位点,从而导致酶的活性丧失。

酚氧化酶是结构复杂的多亚基的含铜氧化还原酶,每一个亚基含 2 个金属铜离子,2 个金属铜离子分别与蛋白质分子中 2 个平展的组氨酸和一个弱的直立组氨酸配体结合,另有一个内源桥基将 2 个铜离子联系在一起,构成酚氧化酶催化氧化反应活性中心^[23]。Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 是否与甜菜夜蛾酚氧化酶中的铜离子螯合而产生抑制作用还有待进一步研究。

虎皮楠科植物所含生物碱结构多变且具有复杂的多环骨架,对其进行的毒理学研究目前仅限于医学领域的很少报道,如 Kobayashi 小组对虎皮楠生物碱进行了肿瘤细胞毒活性测试,发现其中只有少数化合物对鼠淋巴瘤细胞株 L1210 显示出强的抑制活性^[24]。迄今为止,对该科植物生物碱的研究均未涉及杀虫活性。本文研究了虎皮楠生物碱 Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 对甜菜夜蛾的抑制作用,目的是将昆虫酚氧化酶作为研究新型害虫控制剂的“靶标”,寻求能高效抑制该酶的化合物,以这些化合物或其类似物为骨架结构,用定量结构活性相关(QSAR)技术研究抑制剂的主要理化参数与酚氧化酶活性的关系^[25],可以指导酶抑制剂的分子设计,是寻找新型害虫控制剂的重要途径。

4 结 论

本研究明确了 Deoxycalyciphylline B 和 Methyl homosecodaphniphyllate 2 种生物碱对甜菜夜蛾酚氧化酶具有较好的抑制活性,IC₅₀ 分别为 2.439 mmol·L⁻¹ 和 0.879 mmol·L⁻¹。2 化合物均为典型的可逆性竞争型抑制剂,抑制常数(K_I)依次为 2.051 mmol·L⁻¹ 和 1.269 mmol·L⁻¹。本研究报道了 2 个新效应物对甜菜夜蛾酚氧化酶的作用活性与抑制机理信息,会对该类化合物的进一步阐述具有指导意义,用于指导开发“昆虫生命活动干扰剂”。

References

- [1] Fan C Q, Yin S, Xue J J, Yue J M. Novel alkaloids, paxdaphnines A and B with unprecedented skeletons from the seeds of *Daphniphyllum paxianum*. *Tetrahedron*, 2007, 63(1): 115-119.
- [2] Saito S, Kubota T, Kobayashi J. Calyciphylline G, a novel alkaloid with an unprecedented fused-hexacyclic skeleton from *Daphniphyllum calycinum*. *Tetrahedron Letters*, 2007, 48(32): 5693-5695.
- [3] 李振宇, 郭跃伟. 虎皮楠生物碱研究进展. *有机化学*, 2007, 27(5): 565-575.
- Li Z Y, Guo Y W. Progress in the study of *Daphniphyllum* alkaloids. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2007, 27(5): 565-575. (in Chinese)
- [4] Zhan Z J, Zhang C R, Yue J M. Caldaphnidines A-F, six new *Daphniphyllum* alkaloids from *Daphniphyllum calycinum*. *Tetrahedron*, 2005, 61(46): 11038-11045.
- [5] 罗克斯坦 M. 昆虫生物化学. 北京: 科学出版社, 1988: 151-153.
- Lokstan M. *Insect Biochemistry*. Beijing: Science Press, 1988: 151-153. (in Chinese)
- [6] 张宗炳, 冷欣夫. 杀虫药剂毒力及应用. 北京: 化学工业出版社, 1993: 331-337.
- Zhang Z B, Leng X F. *Pesticide Toxicology and Application*. Beijing: Chemical Industry Press, 1993: 331-337. (in Chinese)
- [7] Li W, Kubo I. QSAR and kinetics of the inhibition of benzaldehyde derivatives against *Sacrophaga neobelliaria* phenoloxidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2004, 12: 701-713.
- [8] Wang S D, Luo W C, Gao X X, Ding Q. Inhibitory Effects of kojic Acid on Phenoloxidase of Diamondback Moth *Plutella xylostella*. *Agricultural Sciences in China*, 2004, 3(12): 923-930.
- [9] Xiao T, Xie X Y, Xue C B, Luo W C, Jiang L, Cao S. Inhibitory effects of Schiff analogs of salicylidene aniline on phenoloxidase from *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 91: 39-44.
- [10] Wang S D, Luo W C, Xu S J, Ding Q. Inhibitory effects of 4-dodecylresorcinol on the phenoloxidase of the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2005, 82(1): 52-58.
- [11] 高兴祥, 罗万春, 于天丛, 王树栋, 丁琦, 赵淑英. 几种苯甲酸类化合物对甜菜夜蛾多酚氧化酶活性的影响. *农药学报*, 2004, 6(1): 26-30.
- Gao X X, Luo W C, YU T C, Wang S D, Ding Q, Zhao S Y. The effects of benzoic acid compound series on PPO of *Spodoptera exigua* Hübner. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2004, 6(1): 26-30. (in Chinese)
- [12] Xue C B, Luo W C, Ding Q, Liu S Z, Gao X X. Quantitative structure-activity relationship studies of mushroom tyrosinase inhibitors. *Computer-Aided Molecular Design*, 2008, 22: 299-309.
- [13] 薛超彬, 王勤, 柯莉娜, 陈清西, 罗万春. 铜试剂对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用. *昆虫学报*, 2005, 48(2): 290-294.

- Xue C B, Wang Q, Ke L N, Chen Q X, Luo W C. Inhibitory effect of cupferron on the activity of polyphenoloxidase from *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). *Acta Entomologica Sinica*, 2005, 48(2): 290-294. (in Chinese)
- [14] 高兴祥, 罗万春, 谢桂英, 薛超彬, 丁琦. 甜菜夜蛾多酚氧化酶的特性及其对曲酸等抑制剂的反应. *中国农业科学*, 2004, 37(5): 687-691.
- Gao X X, Luo W C, Xie G Y, Xue C B, Ding Q. Characteristics and kinetics of inhibition of Polyphenol Oxidase from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(5): 687-691. (in Chinese)
- [15] 刘春英, 罗万春, 李方正, 王晓云. 槐尺蠖多酚氧化酶的纯化及酶学特征. *昆虫学报*, 2004, 47(2): 184-188.
- Liu C Y, Luo W C, Li F Z, Wang X Y. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Semiothisa cinerearia* Bremer et Grey (Lepidoptera: Geometridae). *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47(2): 184-188. (in Chinese)
- [16] Chen Q X, Ke L N, Song K K, Huang H, Liu X D. Inhibitory effects of hexylresorcinol and dodecylresorcinol on Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase. *The Protein Journal*, 2004, 23: 135-141.
- [17] Chen Q X, Song K K, Qiu L, Liu X D, Huang H, Guo H Y. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids. *Food Chemistry*, 2005, 91: 269-274.
- [18] Qiu L, Chen Q X, Wang Q, Huang H, Song K K. Irreversibly inhibitory kinetics of 3, 5-dihydroxyphenyl decanoate on mushroom (*Agaricus isporus*) tyrosinase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005, 13, 6206-6211.
- [19] Song K K, Huang H, Han P, Zhang C L, Shi Y, Chen Q X. Inhibitory effects of *cis*- and *trans*-isomers of 3, 5-dihydroxystilbene on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 342: 1147-1151.
- [20] 慕卫, 吴孔明, 梁革梅, 张文吉. 苜蓿夜蛾人工饲养技术. *农药学报*, 2002, 3(4): 93-96.
- Mu W, Wu K M, Liang G M, Zhang W J. Study on artificial rearing technique for *Heliothis virescens* (H. fnagel). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2002, 3(4): 93-96. (in Chinese)
- [21] 肖婷, 刘守柱, 薛超彬, 罗万春. 紫外分光光度计法与酶标仪微量法测定酚氧化酶蛋白含量及活性的比较. *昆虫知识*, 2008, 45(2): 306-309.
- Xiao T, Liu S Z, Xue C B, Luo W C. The comparison of colorimetry and microtitration assay in protein content and PO activity test. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45(2): 306-309. (in Chinese)
- [22] Jiménez M, Chazarra S, Escribano J, Cabanes J, García-Carmona F. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(8): 4060-4063.
- [23] Siegbahn P E. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by *o-o* bond cleavage. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2003, (8): 567-576.
- [24] Morita H, Takatsu H, Shen Y C, Kobayashi J. Daphniglaucin C, a novel tetracyclic alkaloid from *Daphniphyllum glaucescens*. *Tetrahedron Letters*, 2004, 45: 901-904.
- [25] Xue C B, Zhang L, Luo W C, Xie X Y, Jiang L, Xiao T. 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2007, 15: 2006-2015.

(责任编辑 毕京翠, 李莉)