

棉铃虫促前胸腺激素的表达模式与发育调节

侯成林 徐卫华 *

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027; 中山大学生命科学学院, 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275. * 联系人, E-mail: xuweihua@mail.sysu.edu.cn)

摘要 利用免疫组织化学检测和酶联免疫吸附分析分别对滞育和非滞育类型的棉铃虫促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone, PTH)的合成与分泌模式进行了研究. 免疫组织化学结果表明, 定位在棉铃虫脑前背侧的两对 PTH 神经分泌细胞在滞育和非滞育六龄幼虫末期有相似的阳性反应细胞; 在蛹期阶段, 滞育和非滞育类型个体在化蛹后 4 d 开始出现明显的不同. 酶联免疫吸附分析测定了从六龄幼虫到蛹末期血淋巴中的 PTH 滴度变化, 滞育和非滞育类型的变化趋势在幼虫阶段相似, 蛹期则表现出明显的不同, 提示 PTH 的表达对调节棉铃虫蛹滞育起到关键作用.

关键词 促前胸腺激素 滴度变化 免疫组化 棉铃虫

促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone, PTH)是最重要的昆虫神经肽之一, 通过刺激昆虫前胸腺释放蜕皮激素调控昆虫的发育. PTH的研究最早始于舞毒蛾(*Limantria dispar*). 1922 年波兰学者Kopec通过结扎舞毒蛾的实验发现在昆虫脑里存在一种脑激素(brain hormone), 这种激素能够调节昆虫的蜕皮变态. 后来的研究证明, 脑激素是通过刺激前胸腺分泌蜕皮激素来控制昆虫的变态发育, 故被命名为促前胸腺激素. 1987 年, Kataoka 等人^[1]从家蚕(*Bombyx mori*)的头部分离和纯化得到 PTH, 并且测出近乎全长的氨基酸一级结构; 1990 年, Kawakami 等人^[2]用分子克隆的方法得到全长的家蚕 PTH 分子, 并证实了具有生物活性的 PTH 是同源二聚体结构. 随后, 相继在大蚕蛾科或天蛾科的柞蚕(*Antheraea pernyi*)^[3]、惜古比天蚕(*Hyalophora cecropia*)^[4]、烟草天蛾(*Manduca sexta*)^[5]、日本柞蚕(*Antheraea yamamai*) (GenBank 登录号: AY461435) 及蓖麻蚕(*Samia cynthia ricini*) (GenBank 登录号: L25668) 克隆到 PTH. 最近, PTH 分子在鳞翅目夜蛾科昆虫玉米夜蛾(*Helicoverpa zea*)^[6]、烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)^[7]、棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)^[8]和甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)^[9]中也得到鉴定.

为了度过恶劣环境, 昆虫在长期的进化过程中获得了一个特性——滞育, 即昆虫能够准确地预测不良环境的到来, 主动停滞发育, 避开不利环境而生存下来. 滞育是包括生理学、生物化学和内分泌学调

节在内的复杂应答反应. 根据滞育理论, 蛹滞育是由于化蛹后脑部的 PTH 合成和释放的减少而引起前胸腺停止合成和释放蜕皮激素, 使得昆虫在蛹期进入滞育^[10]. 棉铃虫属于蛹滞育昆虫, Wei 等人^[8]发现, 重组表达的棉铃虫 PTH 具有打破棉铃虫滞育的作用, 显示棉铃虫蛹滞育可能与 PTH 相关. 但是滞育和非滞育类型棉铃虫 PTH 的合成与分泌动态、血淋巴中的 PTH 滴度变化等未见报道, 所以棉铃虫蛹滞育发生与 PTH 的关系问题依然没有得到解决.

本研究利用酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和免疫组织化学检测调查了滞育和非滞育类型棉铃虫六龄幼虫和蛹血淋巴中的 PTH 滴度变化, 比较了滞育和非滞育类型棉铃虫脑 PTH 神经分泌细胞的发育变化模式.

1 材料和方法

() 昆虫. 棉铃虫品系由南京农业大学沈晋良教授提供, 本实验室人工饲料饲养. 滞育类型的幼虫个体从三龄幼虫开始在 20 °C, 10 h 光照 14 h 黑暗条件下饲养; 非滞育类型的幼虫在 22 °C, 14 h 光照 10 h 黑暗条件下饲养, 两种条件饲养的幼虫化蛹后置于 20 °C 条件下保护. 各个时期脑组织的解剖均在生理盐水中进行, 从六龄幼虫到蛹末期每天收集血淋巴, 然后加入微量苯基硫脲, 离心后取上清置于 -20 °C 保存.

() 免疫组织化学检测. 参照文献^[11]的方法,

将解剖好的组织在固定液中固定 4 h, PBS-T (2% Triton X-100/PBS)洗涤 3~4 h或过夜. 一抗用PBS-T稀释 2000倍, 反应 4~6 h, 然后用PBS-T溶液洗涤. 加入用PBS-T稀释 6000倍的HRP标记的羊抗兔IgG (Invitrogen公司), 反应 6 h, PBS-T洗涤. 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6)溶液中浸泡 30~60 min. 最后用DAB Stock Stain Kit(华美生物公司)显色, PBS中止反应, 用甘油封片. 阴性对照用免疫前血清代替一抗, 其他条件完全一致.

() ELISA 法. 棉铃虫血淋巴中 PTTH 滴度使用 ELISA 法测定. 每孔取 40 μ L 样品包被, 一抗为稀释 2000 倍的抗重组表达的 PTTH 多抗血清, 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG. ELISA 所用的标准品为重组表达的 PTTH 成熟肽.

2 结果

2.1 棉铃虫 PTTH 在脑组织中的表达

免疫组织化学检测结果显示, 非滞育型六龄末期(非滞育类型是六龄第 5 天, 滞育类型是六龄第 9 天)的幼虫有两对位于脑前背侧的免疫反应阳性细胞(图 1(a)), 与以前报道的棉铃虫蛹期的 PTTH 神经分泌细胞以及其他昆虫的 PTTH 神经分泌细胞位置一致, 表明这些免疫染色细胞就是棉铃虫 PTTH 合成、分泌的场所. 与之相比, 滞育型的脑组织 PTTH 神经分泌细胞染色要浅一些(图 1(b)), 而且两种类型均未看到明显的神经轴突被染色. 化蛹后早期(蛹 0 天)的滞育与非滞育蛹脑 PTTH 两对神经分泌细胞均清晰可见, 神经轴突也被染色, 两者没有明显差别(图 2(a)和(b)). 从蛹第 4 天起, 滞育与非滞育的 PTTH 合成与分泌出现明显差别, 非滞育的 PTTH 神经元清晰可见, 而且有可见的神经轴突(图 2(c)), 滞育型的 PTTH 神经元染色浅, 已经看不到神经轴突(图 2(d)); 蛹第 8, 12 和 16 天, 非滞育的 PTTH 神经元染色趋向更深, 神经轴突愈清楚, 显示出旺盛的合成与分泌(图 2(e), (g)和(i)); 相反, 滞育型的 PTTH 神经元染色更浅, 显示出 PTTH 合成与分泌的停止(图 2(f), (h)和(j)).

2.2 血淋巴 PTTH 的滴度变化

用 ELISA 法测定了六龄幼虫和蛹期血淋巴中 PTTH 的滴度变化动态. 由于幼虫饲养温度不同以及两种类型之间的固有发育差别, 滞育类型的六龄幼虫龄期达 11 d, 而非滞育类型的只有 7 d. 为了便于比较, 我们把滞育与非滞育类型的幼虫龄期时间换

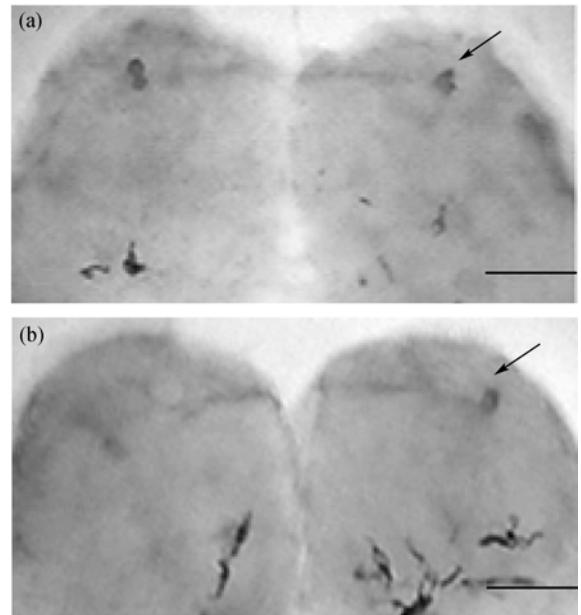


图 1 棉铃虫六龄幼虫 PTTH 的免疫组化
(a) 非滞育类型六龄第 5 天的脑; (b) 滞育类型六龄第 9 天的脑. 箭头所指为阳性细胞. 标尺示 20 μ m

算成百分数, 结果发现, 除了接近中期(40%时间)的一个点有差异外, 两种类型的 PTTH 的滴度变化趋势是比较相似的(图 3). 非滞育类型的 PTTH 从六龄初的较低水平逐渐上升, 到六龄后期(第 5 天)达到峰值并维持在较高水平; 滞育型的 PTTH 滴度变化在六龄中期(第 5 天)达到一个峰值, 之后略有波动, 但到幼虫末期, 一直维持高水平. 与幼虫期的情况相反, 蛹期血淋巴中 PTTH 的滴度在滞育和非滞育类型间表现出明显的不同: 非滞育型的蛹血淋巴的 PTTH 滴度虽然有上下波动, 但总体上一直维持在较高水平, 直到接近成虫羽化才逐渐下降(图 4); 滞育型的蛹从化蛹后 PTTH 滴度就急剧下降到低水平, 低水平的 PTTH 表达一直延续到蛹完全进入滞育(约化蛹后 10 d)以及滞育维持期(化蛹 11 d 以后).

3 讨论

PTTH 作为调节昆虫发育的重要神经肽被广泛研究, 已在多种鳞翅目昆虫成功克隆 [2~9]. 棉铃虫属于蛹滞育, 根据经典的蛹滞育理论, 蛹滞育是由于蛹期 PTTH 表达量下降而引起的 [10], 但是一直没有分子水平上的结果支持. 本研究以棉铃虫为材料, 用免疫组织化学方法调查了 PTTH 在滞育和非滞育类型脑组织中的表达, 用 ELISA 法测定了滞育和非滞育类型个体血淋巴中 PTTH 的滴度变化, 得到一些有益的启示.

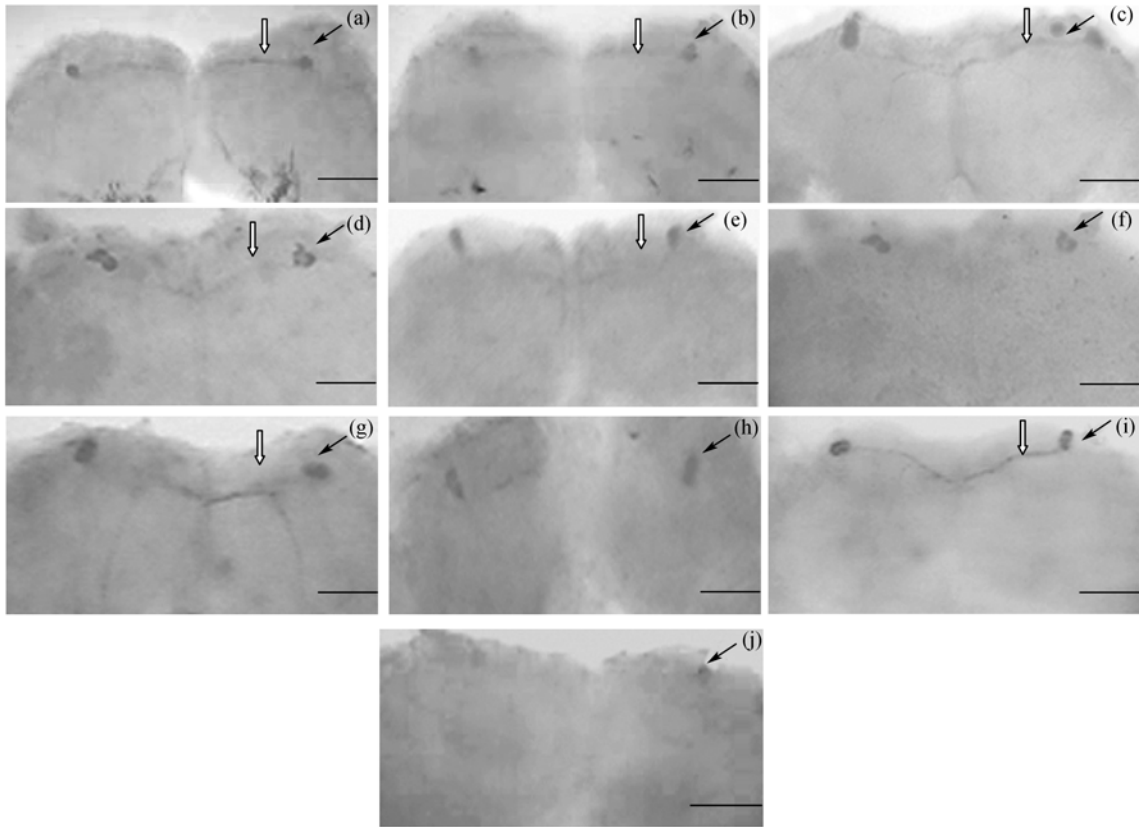


图 2 棉铃虫蛹脑 PTTH 的免疫组化

(a), (c), (e), (g)和(i)分别为非滞育类型蛹第 0, 4, 8, 12 和 16 天的脑;(b), (d), (f), (h)和(j)分别为滞育类型蛹第 0, 4, 8, 12 和 16 天的脑. 黑色箭头所示为阳性细胞, 白色箭头所示为运输 PTTH 的轴突. 标尺为 30 μm

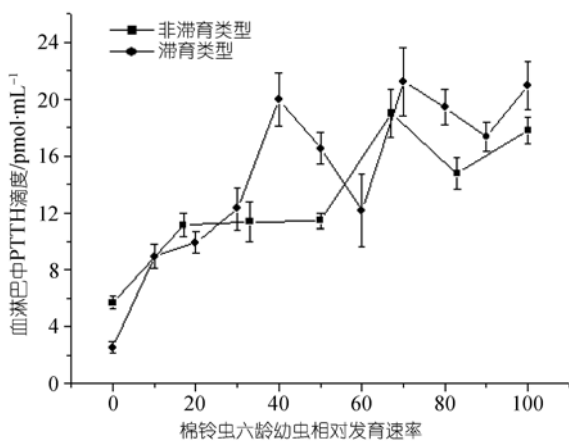


图 3 六龄幼虫血淋巴中 PTTH 的滴度变化

每 5 个六龄幼虫的血淋巴混匀后作为一个样本, 每个点为 3 个重复的平均值. 横坐标为幼虫六龄龄期时间经换算所得的百分数

免疫组织化学阳性细胞和神经轴突的染色深浅表示蛋白合成与分泌旺盛与否的重要标志. 例如, 利用免疫组化方法调查了滞育激素在家蚕和棉铃虫

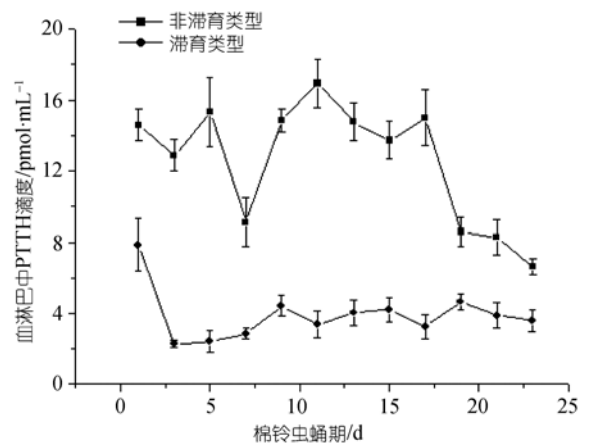


图 4 蛹血淋巴中 PTTH 的滴度变化

每 5 个蛹的血淋巴混匀后作为一个样本, 每个点为 3 个重复的平均值

滞育与非滞育类型间的表达, 发现神经元染色的深浅以及神经轴突的有无的确反映了滞育激素合成与分泌的数量变化 [11-13]. 所以本研究首先对PTTH在棉铃虫脑神经分泌细胞的合成与分泌进行了研究, 发

现滞育和非滞育类型六龄幼虫末期均有清楚的PTTH免疫阳性反应,但是两者之间没有明显差别。在蛹期,刚化蛹(蛹 0 d)的滞育与非滞育两种类型的免疫染色结果非常相似,神经轴突都可以看到。神经轴突的出现则代表蛋白的旺盛合成与分泌^[3],表明刚化蛹的滞育与非滞育两种类型个体均有高的PTTH表达。从蛹第4天开始,两种类型的免疫反应性出现明显差别,非滞育类型的PTTH神经分泌细胞不仅染色加深,而且神经轴突更趋清楚。相反,滞育类型的PTTH神经分泌细胞的染色第4天起趋浅,神经轴突消失,显示出蛋白合成处于低水平,说明滞育类型的个体在进入滞育的过程中PTTH表达下调。

Mizoguchi等人^[14]调查了家蚕幼虫到成虫期的血淋巴PTTH的滴度变化,发现PTTH与蜕皮激素在幼虫期和蛹期均保持基本同步的变化,但是也看到了不一致的地方。例如,终龄幼虫(五龄)的前半期有一定量的PTTH表达,蜕皮激素几乎没有;在五龄中期和末期各出现一个PTTH峰值,而蜕皮激素只是在龄末出现对应的峰值。根据这些结果,作者推测PTTH可能有其他未知的功能。本研究结果显示,滞育和非滞育类型的六龄幼虫PTTH滴度变化均由低逐渐升高,龄末期维持在较高水平。比较我们过去测定的棉铃虫六龄幼虫蜕皮激素滴度变化,无论是滞育还是非滞育类型都是从龄初开始较低,然后逐渐升高,龄末达到峰值^[15],显示出与血淋巴中的PTTH变化有平行相关,说明棉铃虫PTTH的主要功能就是通过调控蜕皮激素来参与棉铃虫幼虫的变态发育。在滞育类型的六龄幼虫中期(40%时间点),PTTH滴度出现一个峰值,显然不是在调节蜕皮变态。以前的研究证实,PTTH和生物钟基因*period* 细胞学定位在脑的同一区域,相邻很近,建议光周期通过*period*调节PTTH^[3]。所以我们推测,短日照可能通过*period*调节PTTH在滞育类型的六龄幼虫中期的表达,表达的PTTH可能直接或间接通过蜕皮激素改变一些基因的表达,为滞育做好生理学准备,比如提高一些代谢酶的活性、延长发育时间、积累营养物质等。

非滞育型棉铃虫的PTTH滴度在化蛹后维持在较高水平,直到接近成虫才逐渐下降。而非滞育蛹的蜕皮激素仅在蛹中期有一个较高的峰,蛹早期和后期均较低,与蔗扁蛾等其他鳞翅目昆虫的变化模式类似^[16]。分析其原因,PTTH有可能在蛹早期还参与了其他发育环节的调控,所以还维持着高的表达水平。

因为已经有许多报道认为,一种神经肽具有多种生理学功能^[17,18]。至于棉铃虫蛹早期的PTTH如何参与调节其他的发育过程则是今后的研究课题。相比之下,滞育型个体化蛹后滴度很快降至低水平,直到进入滞育维持期也一直保持低水平,这一结果与滞育蛹的蜕皮激素变化一致。结合免疫组织化学结果,两种类型的染色强度从蛹第4天开始出现明显差别,能够对应于两种类型蛹的血淋巴中PTTH和蜕皮激素的滴度变化模式,即滞育类型的PTTH神经分泌细胞的染色第4天起趋浅,神经轴突消失,是同期血淋巴中PTTH滴度处于低水平的直接原因。PTTH的表达下调,开始诱导棉铃虫的蛹进入滞育状态。

参 考 文 献

- 1 Kataoka H, Nagasawa H, Isogai I. Isolation and partial characterization of a prothoracicotrophic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric Biol Chem*, 1987, 51: 1067—1076
- 2 Kawakami A, Kataoka H, Oka T, et al. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotrophic hormone. *Science*, 1990, 247(4948): 1333—1335 [DOI](#)
- 3 Sauman I, Reppert S M. Molecular characterization of prothoracicotrophic hormone (PTTH) from the giant silkworm *Antheraea pernyi*: Developmental appearance of PTTH-expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain. *Dev Biol*, 1996, 178(2): 418—429 [DOI](#)
- 4 Sehna F, Hansen I, Scheller K. The cDNA-structure of the prothoracicotrophic hormone (PTTH) of the silkworm *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32(2): 233—237 [DOI](#)
- 5 Shionoya M, Matsubayashi H, Asahina M, et al. Molecular cloning of the prothoracicotrophic hormone from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33(8): 795—801 [DOI](#)
- 6 Xu W H, Rinehart J P, Denlinger D L. Structural characterization and expression analysis of prothoracicotrophic hormone in the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Peptides*, 2003, 24(9): 1319—1325 [DOI](#)
- 7 Xu W H, Denlinger D L. Molecular characterization of prothoracicotrophic hormone and diapause hormone in *Heliothis virescens* during diapause, and a new role for diapause hormone. *Insect Mol Biol*, 2003, 12(5): 509—516 [DOI](#)
- 8 Wei Z J, Zhang Q R, Kang L, et al. Molecular characterization and expression of prothoracicotrophic hormone during development and pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J Insect Physiol*, 2005, 51(6): 691—700 [DOI](#)
- 9 徐军, 苏建亚, 沈晋良, 等. 甜菜夜蛾促前胸腺激素 cDNA 的克隆和表达. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37(2): 171—177
- 10 Denlinger D L. Hormonal control of diapause. In: Kerkut G A, Gilbert L I, eds. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. New York: Pergamon Press, 1985. 353—411
- 11 Sun J S, Zhang T Y, Zhang Q R, et al. Effect of the brain and suboesophageal ganglion on pupal development in *Helicoverpa*

- armigera* through regulation of FXPRLamide neuropeptides. Regul Pept, 2003, 116(1-3): 163—171 [\[DOI\]](#)
- 12 孙久松, 陈复生, 徐卫华. 家蚕胚胎和幼虫时期滞育激素的组织学定位、表达和分泌路径. 科学通报, 2004, 49(12): 1151—1156
- 13 Sun J S, Zhang Q R, Zhang T Y, et al. Developmental expression of FXPRL amide neuropeptides in peptidergic neurosecretory cells of diapause- and nondiapause-destined individuals of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Gen Comp Endocrinol, 2005, 141(1): 48—57 [\[DOI\]](#)
- 14 Mizoguchi A, Dedos S G, Fugo H, et al. Basic pattern of fluctuation in hemolymph PTTH titers during larval-pupal and pupal-adult development of the silkworm, *Bombyx mori*. Gen Comp Endocrinol, 2002, 127(2): 181—189 [\[DOI\]](#)
- 15 Liu J, Shi G P, Zhang W Q, et al. Cathepsin L function in insect molting: Molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Insect Mol Biol, 2006, 15(6): 823—834 [\[DOI\]](#)
- 16 王方海, 张古忍, 温瑞贞, 等. 新入侵害虫蔗扁蛾蛹期蜕皮激素的定性定量分析. 科学通报, 2006, 51(8): 919—922
- 17 Gade G, Hoffmann K H, Spring G H. Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. Physiol Rev, 1997, 77(4): 963—1032
- 18 Nessel D R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: Multiple roles as neuromodulators and neurohormones. Prog Neurobiol, 2002, 68: 1—84 [\[DOI\]](#)