

芹菜素等 3 种生物源化合物 对甜菜夜蛾酚氧化酶的抑制作用

高兴祥, 罗万春^①, 谢桂英, 薛超彬

(山东农业大学植保学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 用芹菜素(apigenin)和曲酸(kojic acid)浸渍处理甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* Hubner)5龄幼虫, 试虫体重日增长值明显降低, 而用香草酸(vanillic acid)浸渍处理后的幼虫体重与对照相比无明显差别。体外抑制实验表明, 芹菜素、香草酸和曲酸对试虫酚氧化酶活性抑制的 I_{50} 分别为 77.66、724.50 和 82.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 体内抑制实验表明, 当用上述 3 种化合物(1 000 $\mu\text{g}/\text{mg}$)处理幼虫 48 h 后, 酚氧化酶活力抑制率分别达到 40.05%、8.44% 和 42.29%。

关键词: 芹菜素; 曲酸; 香草酸; 酚氧化酶抑制剂

中图分类号: S432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)03-0016-04

Effects of apigenin, vanillic acid and kojic acid on the phenoloxidase activity in *Spodoptera exigua* Hubner GAO Xing-xiang, LUO Wan-chun^①, XIE Gui-ying, XUE Chao-bin (Department of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(3): 16-19

Abstract: Effects of three natural compounds (apigenin, kojic acid and vanillic acid) on the phenoloxidase activity in *Spodoptera exigua* Hubner were studied. The results showed that the growth of the larvae of the tested insect reduced sharply when it was treated by apigenin and kojic acid but it does not difference significantly by vanillic acid compared with the controlled experiment. The I_{50} *in vitro* on larvae phenoloxidase activity with apigenin, vanillic acid and kojic acid were 77.66, 724.50 and 82.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. The inhibiting rate *in vivo* corresponding on phenoloxidase were 40.05%, 8.44% and 42.29% respectively with the three compounds (1 000 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

Key words: apigenin; kojic acid; vanillic acid; phenoloxidase inhibitors

酚氧化酶(phenoloxidase, 简称 PO; 对于哺乳动物称为酪氨酸酶)广泛存在于动物、植物、昆虫、真菌和细菌体内, 其在昆虫的正常发育过程中具有重要的生理功能^[1,2]。昆虫一生中要经历几次蜕皮, 新生的表皮柔软、色淡, 必须经过黑化和硬化过程才能够坚硬成熟, 而酚氧化酶正是这一过程中的关键性酶, 它起的所谓“醌鞣化(quinone tanning)”在昆虫的生命过程中具有重要作用^[1,3]。

芹菜素为三羟基黄酮类化合物, 广泛存在于各种蔬菜中; 曲酸是某些微生物生长过程中经糖代谢产生的 1 种弱酸性黄酮类化合物; 香草酸广泛存在于许多药用植物中, 它们对人畜无毒副作用。这 3 种化合物对酚氧化酶均表现出一定的抑制作用。当今, 农药的发展正面临着关键时刻, 环境友好和可持续发展概念越来越受到重视和深入人心, 探索研究对具有“外骨骼”的昆虫酚氧化酶抑制剂, 可为开发

一类全新的无公害昆虫控制剂提供理论基础和实践参考。1993 年著名昆虫毒理学家张宗炳和冷欣夫在总结了国内外昆虫毒理学的研究成果后指出, 原酪氨酸酶抑制剂和鞣化过程抑制剂是探索新杀虫化合物的最有希望的途径之一^[4]。本文以这一理论为基础, 研究了 3 种生物源化合物对甜菜夜蛾幼虫生长的影响及其对酚氧化酶的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫及化合物

甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* Hubner)幼虫在山东

收稿日期: 2003-01-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270887)

作者简介: 高兴祥(1977-), 男, 山东沂水人, 硕士研究生, 主要从事昆虫毒理学及环境友好农药的研究。

^① 通讯作者

农业大学农药毒理与应用技术省级重点实验室养虫室内由人工饲料饲养^[5]。

芹菜素(apigenin)、香草酸(vanillic acid)和曲酸(kojic acid)的纯度均为99%,购自Sigma公司。将一定量的化合物用少量丙酮溶解后,用蒸馏水定容,配制成10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液备用。

1.2 化合物对甜菜夜蛾幼虫处理

每一处理组选用10头5龄初幼虫,采用浸渍法处理,用蒸馏水将化合物母液稀释至2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以蒸馏水作对照。于处理前和处理后24和48 h分别称量虫重。以单头幼虫的平均体重的变化来比较化合物对幼虫体重增长的影响。

1.3 生物活性测定

选用甜菜夜蛾3龄幼虫,将化合物母液稀释成系列浓度采用浸叶法进行,即用3种化合物溶液浸渍菜叶,当幼虫取食带毒叶片1 d后,更换新鲜叶片继续饲喂,调查试虫取食浸叶后第1、2及第3天的死亡率。

1.4 幼虫酚氧化酶活力测定

1.4.1 酶液制备 将甜菜夜蛾幼虫经磷酸缓冲液清洗后整体置于预冷的匀浆器中,按10 mL/g体重加入0.02 mol/L的磷酸缓冲液(pH 6.0),冰浴下匀浆,6 000 r/min、0℃离心30 min,上清液即为待测酶液。

1.4.2 酶活力测定 将1.5 mL邻苯二酚,加入1.4 mL磷酸缓冲液,在30℃恒温水浴中稳定30 min后,加入0.1 mL酶液,在UV-2201型紫外分光光度计上测定420 nm处吸光度值。将吸光度值每分钟增加0.001所需的酶量定义为1个酶活力单位。

1.4.3 蛋白质含量测定 按照Bradford(1976)的考马斯亮蓝G-250染色法测定^[6]。

1.4.4 对酶活力的影响实验 体内实验与体外实验均选用5龄幼虫。体内测定时将用各化合物浸渍后的试虫重新放入饲料中正常饲养,48 h后测定各处理组幼虫的酶活力;体外实验先将缓冲液、底物与不同剂量的化合物混匀后在30℃水浴中稳定30 min,然后加入酶液测定。

2 结果与分析

2.1 3种化合物对甜菜夜蛾幼虫体重的影响

芹菜素、曲酸和香草酸处理的甜菜夜蛾5龄幼

虫体重增长趋势见图1。由图1可以看出:与对照相比,用芹菜素和曲酸浸渍处理的幼虫体重日增长值明显降低,特别是浸虫后第1次称量时(处理后24 h),用芹菜素浸渍处理的幼虫单头平均体重由48.62 mg仅增加到53.04 mg,曲酸处理者由51.30 mg增长到55.20 mg,与对照相比体重几乎没有增长;对照处理者由药前的50.0 mg增加到86.72 mg(处理后24 h);用香草酸浸渍处理的幼虫体重增长与对照处理无明显差别,甚至在浸渍后24小时体重增长趋势还稍高于对照。

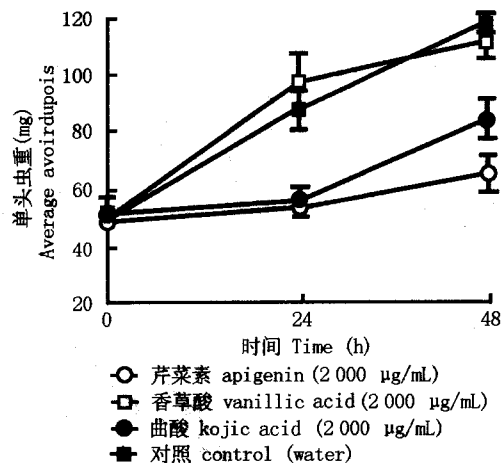


图1 3种化合物处理的5龄甜菜夜蛾幼虫体重增长曲线
Fig. 1 The growth curve of 5th instar larvae of *Spodoptera exigua* Hubner in apigenin, vanillic acid and kojic acid

2.2 生物测定结果

3种化合物对甜菜夜蛾幼虫毒杀效果的测定结果如表1。

由表1可以看出:供试的3种化合物对甜菜夜蛾3龄幼虫的“毒杀”效果均不高。相比较而言,以芹菜素的生物活性较高,但在5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量下,药后3 d的死亡率也仅为33.33%,2 500、1 250和625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量下的死亡率分别为26.67%、20.00%和6.67%。香草酸和曲酸的4种供试剂量对幼虫的死亡率均低于15%。

2.3 3种化合物对酚氧化酶活力的影响

2.3.1 体外抑制 芹菜素和曲酸对甜菜夜蛾5龄幼虫酚氧化酶活力的体外抑制结果见图2。芹菜素和曲酸能强烈抑制甜菜夜蛾酚氧化酶的活力,当前者剂量为66.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,酶活力被抑制30.77%;当剂量为80.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,其抑制率为50.00%。当曲酸剂量为66.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,酶活力被抑制

表1 芹菜素等3种生物源化合物对甜菜夜蛾幼虫的毒杀效果(3龄幼虫)

Table 1 Efficacy of the three compounds on *Spodoptera exigua* Hubner larvae (3rd-instar)

化合物 Compounds	浓度 Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	死亡率 Mortality (%)		
		1 d	2 d	3 d
芹菜素 apigenin	5 000	26.67	33.33	33.33
	2 500	20.00	20.00	26.67
	1 250	6.67	20.00	20.00
	625	0.00	6.67	6.67
香草酸 vanillic acid	5 000	0.00	13.33	13.33
	2 500	0.00	6.67	13.33
	1 250	0.00	6.67	6.67
	625	0.00	0.00	0.00
曲酸 kojic acid	5 000	13.33	13.33	13.33
	2 500	13.33	13.33	13.33
	1 250	6.67	6.67	13.33
	625	6.67	6.67	6.67
对照 control	-	0.00	0.00	0.00

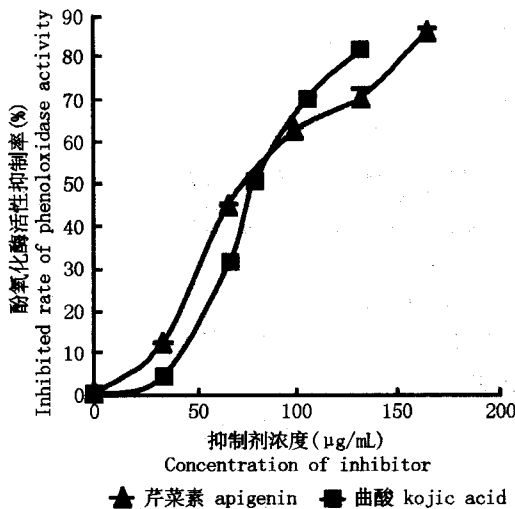


图2 芹菜素和曲酸对甜菜夜蛾幼虫酚氧化酶的体外抑制结果

Fig. 2 Inhibited rate of phenoloxidase activity of *Spodoptera exigua* Hubner larvae by apigenin and kojic acid *in vitro*

表2 3种化合物对甜菜夜蛾幼虫酚氧化酶的体内抑制结果

Table 2 Inhibited rate of three compounds to phenoloxidase activity on *Spodoptera exigua* Hubner larvae *in vivo*

化合物 Compounds	酶活力 Activity [$\Delta\text{OD}/(\text{mg}\cdot\text{min})(\text{protein})$]	抑制率 Inhibited rate (%)
芹菜素 apigenin (1 000 $\mu\text{g/mL}$)	0.203 1	40.05
香草酸 vanillic acid (1 000 $\mu\text{g/mL}$)	0.310 2	8.44
曲酸 kojic acid (1 000 $\mu\text{g/mL}$)	0.195 5	42.29
对照 control	0.338 8	0.00

44.41%；剂量为100 $\mu\text{g/mL}$ 时，其抑制率上升为51.55%。经测定，芹菜素和曲酸对甜菜夜蛾酚氧化酶活性抑制的 I_{50} 分别为77.66和82.70 $\mu\text{g/mL}$ 。

香草酸体外抑制甜菜夜蛾酚氧化酶活力结果见图3。结果显示，与前2种化合物相比，香草酸对酚氧化酶的抑制能力较弱，当其剂量为500 $\mu\text{g/mL}$ 时，酶活力被抑制19.22%；剂量为666.67 $\mu\text{g/mL}$ 时，酶活力为对照的50.00%。香草酸对甜菜夜蛾酚氧化酶活性抑制的 I_{50} 为724.50 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 体内抑制 3种化合物对甜菜夜蛾幼虫酚氧化酶体内抑制实验结果见表2。用芹菜素与曲酸处理试虫48 h后，虫体酚氧化酶的活力明显降低。芹菜素处理组与对照相比，其抑制率为40.05%；曲酸处理降低42.29%；而用香草酸处理试虫48 h后，酶活力虽然比对照有所降低，但差别不大，仅降低8.44%。

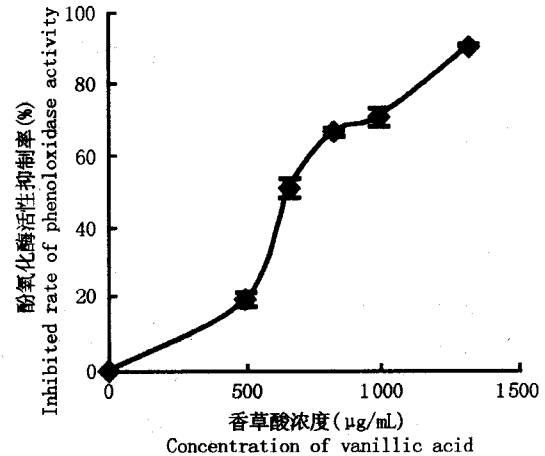


图3 香草酸对甜菜夜蛾酚氧化酶的体外抑制结果

Fig. 3 Inhibited rate of phenoloxidase activity of *Spodoptera exigua* Hubner larvae by vanillic acid *in vitro*

3 讨 论

从20世纪60年代开始，国外即开始了对酚氧化酶抑制剂的研究，譬如在化妆品行业和医药界，由于酚氧化酶与黑色素的合成及在皮肤等处沉着有关，而酚氧化酶抑制剂干扰了黑色素的合成过程，故可作为美容品和医药用途使用^[7,8]。酚氧化酶是昆虫生长过程中的重要酶之一^[9]，对其进行研究可以为

寻找新型的杀(抑)虫剂提供理论基础。芹菜素和曲酸属于在大多数绿色植物中均存在的黄酮类化合物。黄酮类化合物的生理作用很久以来就受到人们的关注,早在上个世纪30年代就发现了黄酮类化合物具有维生素C样的活性。Pratt等人研究了黄酮类化合物的抗氧化性质^[10,11],认为黄酮是作为一级抗氧化剂而起作用的,它们具有显著的抗氧化性能。20世纪80年代以来,对黄酮类化合物的研究逐渐转向其清除自由基的能力、抗衰老及对老年病的防治功效等方面^[12-14]。黄酮类化合物是优良的活性氧清除剂和脂质抗氧化剂^[15]。本研究中采用的芹菜素属三羟基黄酮类,曲酸是某些微生物生长过程中经糖代谢产生的一种弱酸性黄酮类化合物,它们对人畜无毒副作用^[16-19],且具有酪氨酸酶抑制能力、抑菌能力、抗氧化能力和金属离子螯合能力。曲酸还具有很多用途,如可用作食品添加剂、美容化妆品填充剂、蔬菜水果的保鲜剂和无公害杀虫剂等。

本实验表明,芹菜素和曲酸虽然对甜菜夜蛾幼虫的直接“杀死”活性不高,但无论从体内还是体外实验来看,这2种化合物均能强烈抑制酚氧化酶的活力,也能明显抑制幼虫的生长发育。这些研究结果指明了一个很好的研究前景,从芹菜素和曲酸能强烈抑制甜菜夜蛾体内酚氧化酶活力的意义出发,同时又由于这2种化合物属于生物源化合物,对人、畜无毒害作用,可以以此类化合物为模板合成系列化合物进行研究,以期发现对该虫酚氧化酶具有更高活性的化合物作为“昆虫生命活动干扰剂”进行开发,寻找对环境友好的具有新型作用机制的害虫控制剂。另外,对于甜菜夜蛾不同生育期甚至相同龄期(龄初或龄末等)的酚氧化酶变化规律应深化和细化研究,因为这些研究结果都直接关系到对该酶抑制剂的认知。

参考文献:

[1] Ashida M, Kinoshita K, Braey P T. Studies on phenoloxidase activation in mosquito *Aedes aegypti* L. [J]. Eur J Biochem, 1990, 188: 507 -

- 515.
- [2] Li J, Christensen B M. Involvement of L-tyrosine and phenol oxidase in the tanning of *Aedes aegypti* eggs [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1993, 23: 739 - 748.
- [3] 长谷川金作. 昆虫变态的生理化学 [M]. 张义成 陆明贤译. 北京: 农业出版社, 1988.
- [4] 张宗炳, 冷欣夫. 杀虫药剂毒力及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1993. 331 - 337.
- [5] 慕卫, 吴孔明, 梁革梅, 等. 首蓓夜蛾人工饲养技术 [J]. 农药学报. 2002, 3(4): 93 - 96.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248 - 254.
- [7] 宁岭, 魏少敏, 王纪文, 等. 美白化妆品添加剂效能的实验研究 [J]. 日用化学工业, 2000, 3: 12 - 13.
- [8] 王白强, 曾晓军. 酪氨酸酶活性的抑制研究及皮肤美白化妆品的研制 [J]. 福建轻纺, 2002, 7: 1 - 6.
- [9] Kubo I, Kinoshita H. 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde: A potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants [J]. Plant Medica, 1999, 65: 19 - 22.
- [10] Dan E P. Water soluble antioxidants activity in soybeans [J]. J Food Sci, 1972, 37: 322 - 323.
- [11] Dan E P. Water soluble scavenging activity of flavonoids [J]. Phytochemistry, 1987, 26: 2489 - 2491.
- [12] Dan E P. Lipid antioxidants in plant tissue [J]. J Food Sci, 1965, 30: 737 - 741.
- [13] 句海松, 李小洁, 赵保路, 等. 沙棘总黄酮对活性氧自由基的清除作用 [J]. 中国药理学通讯, 1990, 6(2): 97 - 101.
- [14] 刘诗平, 陈尚猛, 朱卫东, 等. 槲皮素及其衍生物的生物活性研究进展 [J]. 中草药, 1991, 22(4): 182 - 184.
- [15] 梁克军. 黄酮化合物的代谢 [J]. 中草药通讯, 1976, (3): 39 - 43.
- [16] 陈陶声. 有机酸发酵生产技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1987. 232 - 236.
- [17] 孙微, 陶文沂. 曲酸在食品添加剂中的应用 [J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(1): 69 - 72.
- [18] Wei C I, Huang T S, Fernando S Y, et al. Mutagenicity studies of kojic acid [J]. Toxicol Letters, 1995, 59: 213 - 220.
- [19] Niwa Y, Akamasu H. Kojic acid scavenges free radical while potentiating leukocyte function including free radical generation [J]. Inflammation, 1991, 15(4): 303 - 315.