

# 苯甲酸及其衍生物对菜青虫多酚氧化酶抑制作用

柯莉娜<sup>1</sup>, 薛超彬<sup>2</sup>, 王 勤<sup>1</sup>, 罗万春<sup>2</sup>, 陈清西<sup>1\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 山东农业大学 农药毒理与应用技术省级重点实验室, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 以菜青虫五龄虫为材料, 分离提取多酚氧化酶, 研究苯甲酸及其衍生物: *p*-羟基苯甲酸、*p*-氟基苯甲酸、*p*-环己基苯甲酸等对该酶催化 L-多巴(L-DOPA) 氧化活力的影响. 测定抑制作用的  $IC_{50}$  分别为 14.2、11.3、16.1 和 2.1 mmol/L. 研究了抑制剂作用的动力学, 结果表明: 苯甲酸和 *p*-环己基苯甲酸对酶的抑制作用表现为非竞争性类型, 其抑制常数分别为 14.25 和 2.21 mmol/L; *p*-羟基苯甲酸对酶的作用表现为竞争型抑制, 抑制常数  $K_I$  为 7.21 mmol/L; *p*-氟基苯甲酸对酶的作用表现为混合型抑制, 抑制常数  $K_I$  和  $K_{IS}$  分别为 14.31 和 27.34 mmol/L.

**关键词:** 菜青虫五龄虫; 多酚氧化酶; 苯甲酸及衍生物; 抑制作用

**中图分类号:** Q 356.1

**文献标识码:** A

菜青虫是菜粉蝶 (*Pieris rapae* L.) 的幼虫, 是菜粉蝶危害蔬菜的主要形态, 为世界性害虫, 在我国分布广泛. 它主要侵食十字花科植物的叶, 从而其伤口方便了软腐病菌侵入, 最后导致植物软腐病的发生, 严重影响了蔬菜的品质, 研究其多酚氧化酶性质, 其原因在于在菜青虫的多酚氧化酶是影响其不同虫态与虫龄的变化历程中的重要因素, 菜青虫的五龄虫在整个生命周期中具有最高的多酚氧化酶活性. 多酚氧化酶 (Polyphenoloxidase, 简称 PPO, EC. 1. 14. 18. 1) 广泛存在于生物体内, 是昆虫体内的一种重要酶类, 在昆虫的变态发育和免疫系统中起着重要的作用<sup>[1]</sup>, 除了参与酚类物质的氧化以外, 还与苯丙基类化合物的代谢、类黄酮和生物碱的合成有关<sup>[2]</sup>. 陈尚文等人的论文<sup>[3]</sup>中提到: 早在 1905 年 Dewitz 就提出昆虫的 PPO 与黑色素形成有关, 在蛹化时酶活性最

高. 而在 1978 年 Morris 也指出 PPO 与昆虫体内的酪氨酸代谢有关, 酪氨酸在昆虫蜕皮时的鞣化过程中起重要作用<sup>[4]</sup>. 1988 年长谷川金作在其书中也提到 PPO 催化完成“醌鞣化”作用可以促进昆虫表皮的硬化与黑化, 这个过程对于“外骨骼”的昆虫生命过程至关重要<sup>[5]</sup>. 因此, 在 1993 年我国著名昆虫毒理学家张宗炳指出: 探索新杀虫药剂的一条最有希望的途径是生物合理途径, 其中“原酪氨酸酶抑制剂”和“鞣化过程抑制剂”被列在第 1、2 位<sup>[6]</sup>. 所以设计适当的该酶的抑制剂作为杀虫剂具有广阔的应用前景, 使昆虫无法完成发育而停留在幼虫期或蛹期进而死亡. 本研究选择菜青虫五龄虫作为试验材料, 了解效应物对多酚氧化酶活力的影响变化, 进一步了解昆虫的抗药机理, 为开发以该酶的靶标新型杀虫剂提供理论依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

菜青虫 (*Pieris rapae* L.) 采自厦门市集美区后溪镇菜园, 至室内大量饲养, 以实验室培养的无农药甘蓝为食物进行繁殖, 3 代后收集五龄虫置冰箱冷冻保存备用. L-多巴(L-DOPA)、苯甲酸、*p*-羟基苯甲酸、*p*-氟基苯甲酸、*p*-环己烷苯甲酸及二甲亚砜(DMSO) 为 Sigma 化学公司产品, 其它试剂均为国产

收稿日期: 2003-08-28

基金项目: 博士后基金(2003033401), 福建省科技攻关课题(2004N002)资助

作者简介: 柯莉娜(1979-), 女, 硕士研究生.

\* Corresponding author, Tel/ Fax: 0592-2185251,

E-mail: chenqx@xmu.edu.cn

分析纯或化学纯,使用的蒸馏水为玻璃重蒸水。

## 1.2 PPO 酶液的制备

取冷冻保存的五龄虫按 5 倍体重的比例加入预冷的 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (pH 6.8), 在冰浴中匀浆,于冰箱 4 °C 下静置 30 min 抽提,4 °C 离心 (8 000 r/min) 30 min,获得上清液作为酶活力分析。蛋白浓度测定采用 Folin 酚法。

## 1.3 酶活力测定方法

PPO 活力测定参考文献 [7], 并按要求作适当的修改。在比色杯中先加入不同体积同一浓度的效应物 (溶于 DMSO 溶液) 和 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液以及 1 mmol/L L-DOPA 底物,共 1.97 mL, 然后加入 30  $\mu\text{L}$  粗酶液,立刻混匀,测活体系共 2.0 mL。于 Beckman DU650 分光光度计,37 °C 恒温下测定 475 nm 的光密度值随时间的增长直线,从直线的斜率求得酶活力,消光系数按  $3\,700\ (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  计算 [8]。DMSO 终浓度都为 3.33%,并在对照中排除其对酶的影响。酶活力单位 (U) 定义为在该条件下,每分钟产生 1  $\mu\text{mol/L}$  产物的酶量。效应物对酶的抑制作用的机理判断是通过 Lineweaver-Burk 双倒数作图,比较酶催化反应的动力学参数,包括表观米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度 ( $V_m$ ) 的变化来判断。

## 2 结果

### 2.1 效应物对菜青虫 PPO 活力的影响

分别以苯甲酸 (a), *p*-氰基苯甲酸 (b), *p*-羟基苯甲酸 (c) 和 *p*-环己基苯甲酸 (d) (分子结构式见图 1) 为效应物,探讨它们对菜青虫 PPO 催化 L-DOPA 氧化反应活力的影响。酶的剩余活力与效应物的浓度依赖关系结果见图 2,随着抑制剂浓度的增大,酶活

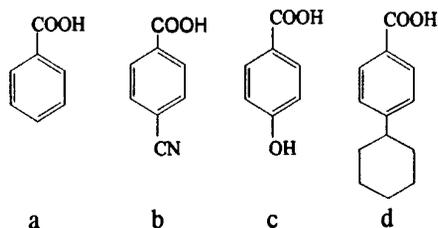


图 1 实验用的化合物的分子结构:

- a. 苯甲酸; b. *p*-氰基苯甲酸; c. *p*-羟基苯甲酸;  
d. *p*-环己基苯甲酸

Fig. 1 Chemical structures of Benzoic acid (a), *p*-cyanobenzoic acid (b), *p*-hydroxybenzoic acid (c) and *p*-cyclohexylbenzoic acid (d)

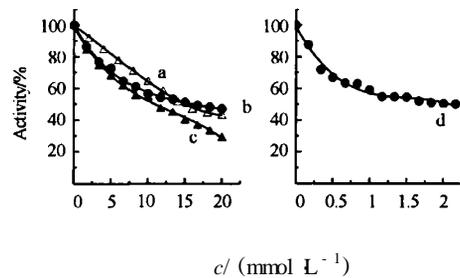


图 2 几种苯甲酸族化合物对菜青虫 PPO 活力的影响  
a. 苯甲酸; b. *p*-氰基苯甲酸; c. *p*-羟基苯甲酸;  
d. *p*-环己基苯甲酸

Fig. 2 Effects of some compounds of benzoic acid family on the activity of PPO from the 5<sup>th</sup> instar of *Pieris rapae* L.

力逐渐下降,在 pH 6.8 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液中,37 °C 条件下,导致酶活力下降一半所需的抑制剂浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 14.2、16.1、11.3、和 2.1 mmol/L。测定的结果总结于表 1 以供比较。

### 2.2 抑制剂 (c) 对菜青虫五龄虫 PPO 表现为竞争性抑制机理及抑制常数的测定

研究抑制剂对菜青虫五龄虫 PPO 抑制作用机理。在测活体系中,固定酶的浓度改变底物 L-DOPA 浓度,测定不同浓度抑制剂对酶活力的影响,以酶反应的初速度对底物浓度作图为 1 组双曲线,说明酶促反应遵循米氏 (Michaelis-Menten) 动力学方程。以 Lineweaver-Burk 双倒数作图,可以判断抑制剂的抑制类型。图 3 为抑制剂 (c) 对菜青虫五龄虫 PPO 抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图,得到 1 组纵轴截距不变的直线,说明这个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,其抑制机理表现为竞争性类型。底物与抑制剂同酶分子的结合是互相竞争的,抑制剂只能与游离酶 (E) 结合,而不能与酶-底物络合物 (ES) 结合。以不同浓度抑制剂 (c) 下测定的  $K_m$  对抑制剂 (c) 浓度作图 (图 3 内插图) 为 1 条直线,从直线的斜率可以求得抑制常数 ( $K_i$ )。测定结果列于表 1,以供比较。

### 2.3 抑制剂 (a)、(d) 对菜青虫 PPO 表现为非竞争性抑制机理及抑制常数的测定

研究抑制剂对菜青虫 PPO 的抑制作用机理。在测活体系中,固定加入的酶量,改变底物 L-DOPA 浓度,测定不同浓度抑制剂对酶的活力的影响,以酶反应的初速度对底物浓度作图为 1 组双曲线,说明酶促反应遵循米氏 (Michaelis-Menten) 动力学方程。以

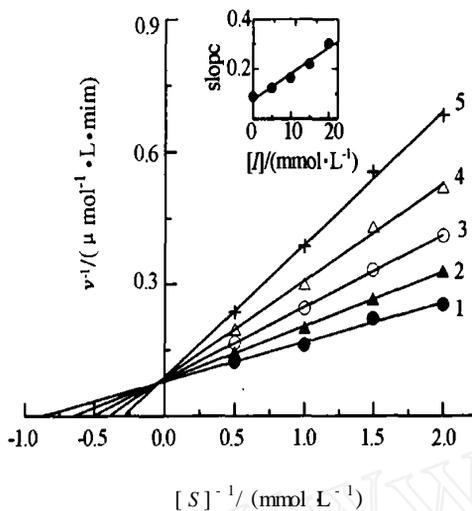


图3 *p*-羟基苯甲酸对菜青虫 PPO 的抑制作用  
直线 1~5 的抑制剂浓度分别为 0、5、10、15、20 mmol/L

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots for inhibition of *p*-hydroxybenzoic acid on the PPO from the the 5<sup>th</sup> instar of *Pieris rapae* L.

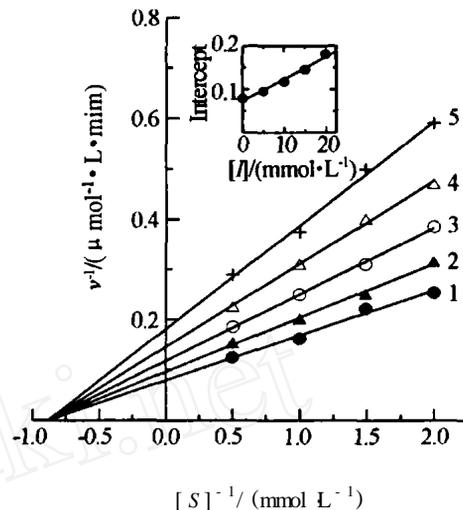


图4 苯甲酸对菜青虫 PPO 的抑制作用  
直线 1~5 的抑制剂浓度分别为 0、5、10、15 和 20 mmol/L

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots for inhibition of benzoic acid on the PPO from the 5<sup>th</sup> instar of *Pieris rapae* L.

Lineweaver-Burk 双倒数作图,可以判断抑制剂的抑制类型.以(a)和(d)为效应物, Lineweaver-Burk 双倒数作图为 1 组横轴截距不变的直线,说明这一组抑制剂不影响米氏常数 ( $K_m$ ),只影响最大反应速度 ( $V_m$ ),其抑制机理表现为非竞争性类型.图 4 为抑制剂(a)对菜青虫 PPO 抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图,  $K_m$  值不随着抑制剂浓度的增大而改变,而  $V_{max}$  随着抑制剂浓度增大而下降,说明抑制剂与酶分子的结合与底物分子与酶的结合是独立的,抑制剂不改变酶对底物的亲和力.这一组抑制剂可以同时与游离酶(E)和结合酶(ES)结合,且结合常数相同.以不同浓度抑制剂(a)下测定的  $1/V_m$  对抑制剂浓度作图(图4内插图)为一条直线,从直线的斜率可以求得抑制常数 ( $K_I = K_S$ ).相同的方法

可以求得抑制剂(d)的非竞争性抑制类型以及抑制常数,测定结果列于表 1,以供比较.

## 2.4 抑制剂(b)对菜青虫 PPO 表现为混合型竞争性抑制机理及抑制常数的测定

以相同的方法研究抑制剂(b)对菜青虫 PPO 抑制作用机理.以(b)为效应物, Lineweaver-Burk 双倒数作图得到相交在第 2 象限的 1 组直线,横轴截距和纵轴截距都因抑制剂(b)的浓度的变化而改变,即米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速度 ( $V_m$ ) 都随着抑制剂(b)浓度改变而改变,其抑制机理表现为混合型效应.2 次作图,以斜率(图 5. D)和纵轴截距(图 5. II)对抑制剂(b)浓度作图,分别可以求出抑制剂(b)对游离酶抑制常数 ( $K_I$ ) 和对酶-底物络合物抑制常数 ( $K_S$ ),测定结果列于表 1.

表 1 苯甲酸族化合物对菜青虫 PPO 抑制效应的比较

Tab. 1 Comparison of the inhibitory effects of benzoic acid family compounds on the PPO from the 5<sup>th</sup> instar of *Pieris rapae* L.

化合物	$IC_{50}/(\text{mmol L}^{-1})$	抑制类型	抑制常数/ $(\text{mmol L}^{-1})$	
			$K_I$	$K_{IS}$
苯甲酸	14.2	非竞争性	14.25	14.25
对氰基苯甲酸	16.1	混合型	14.31	27.34
对羟基苯甲酸	11.3	竞争性	7.21	
对环己基苯甲酸	2.1	非竞争性	2.21	2.21

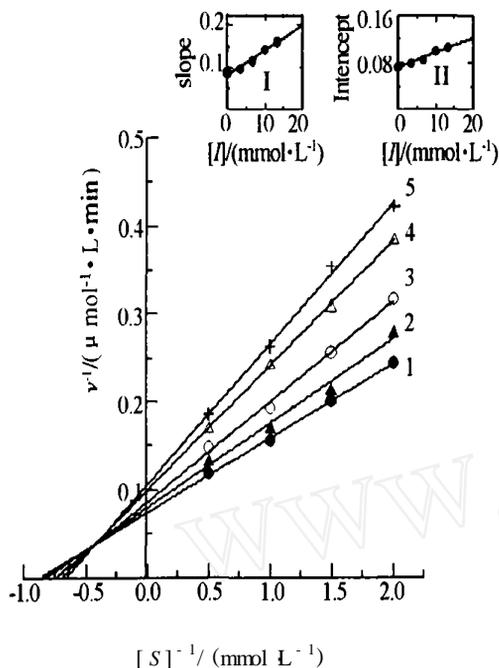


图 5 *p*-氰基苯甲酸对菜青虫 PPO 的抑制作用  
直线 1~5 的抑制剂浓度分别为 0、3、34、6、68、10、00 和 13.36 mmol/L

Fig. 5 Lineweaver-Burk plots for inhibition of *p*-cyanobenzoic acid on the PPO from the the 5<sup>th</sup> instar of *Pieris rapae* L.

### 3 讨论

多酚氧化酶(PPO)在昆虫体内以无活性的酚氧化酶原形式存在于血液和体壁内,在昆虫体液免疫中起着重要作用.根据分解底物的不同,昆虫体内的PPO可分为两种:漆酶型酚氧化酶(laccase-type phenoloxidase)和酪氨酸酶型酚氧化酶(tyrosinase-type phenoloxidase).其中漆酶型酚氧化酶在蜕皮、变态时的表皮层出现,与表皮层的着色和硬化等有关<sup>[9]</sup>.因此,抑制漆酶型酚氧化酶就可以使昆虫无法进一步生长发育直至死亡,从而达到灭虫目的.

本文选取的材料为菜青虫五龄虫,是经过实验室的种植的培养的甘蓝养殖3代后收集的,体内没有任何残余农药污染,保证了从所用的材料提取的PPO酶活力不被影响.采用直接抽提的菜青虫粗酶液检测酶活力,较好地反映了昆虫体内酶的性质,探讨抑制剂的抑制效率与机理具有非常明显的实践意义,即从效应物的角度直接研究杀虫剂的作用机理有直接的指导作用.苯甲酸及其衍生物对菜青虫PPO均有抑制作用.从表1可见,苯甲酸在对位上被环己基取代,对该酶的抑制作用机理保持不变,为非

竞争性类型,说明它与PPO的底物结构上具有一定的相似性.苯甲酸族的4种抑制剂中对羟基苯甲酸为竞争性抑制,对氰基苯甲酸为混合型抑制,其余均为非竞争性抑制.对羟基苯甲酸与赵熒等报道的对土豆酪氨酸酶的抑制作用机理一致.苯甲酸与刘晓丹等<sup>[10]</sup>报道的一致,与Christine<sup>[11]</sup>等1996年报道的相反,这可能与种间的该物质的差异有关.目前,苯甲酸与对羟基苯甲酸广泛应用于食品、化妆品和医药品的防腐剂和防霉剂中,其中对羟基苯甲酸还是农药中间体的原料,对氰基苯甲酸是镇咳药类的重要中间体.现在只是研究苯甲酸及其衍生物对菜青虫多酚氧化酶的作用机理,至于对植物的生长发育的影响还有待进一步研究.

### 参考文献:

- [1] Ashida M, Yamazaki H I. Biochemistry of the phenoloxidase system in insect: with special reference to its activation. Molting and Metamorphosis [M]. Tokyo: Japan Science Society Press, 1990. 239 - 261.
- [2] Auerbach V, Sheer D E. Forty bertz EEG in learning disabled and normal boys [J]. J. Learn Disabi, 1988, (3): 15 - 17.
- [3] 陈尚文, 杨振德. 马尾松毛虫和荔枝体内多酚氧化酶的初步研究 [J]. 广西科学, 1996, 3(2): 45 - 50.
- [4] Morris R. Biochemistry of Insects [M]. New York: Academic Press, 1978. 151 - 156.
- [5] 长谷川金, 著. 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.
- [6] 张宗炳, 冷欣夫. 杀虫药剂毒理及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1993.
- [7] Chen Q X, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin [J]. J. Agric. Food Chem., 2002, 50: 4 108 - 4 112.
- [8] Jimenez M, Chazarra S, Escribano J, et al. Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes [J]. J. Agric. Food Chem., 2001, 49(8): 4 060 - 4 063.
- [9] 鲁兴萌. 多酚氧化酶的研究进展 [J]. 中国蚕业, 2000, 82(2): 49 - 50.
- [10] 刘晓丹, 黄璜, 陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42(1): 102 - 106.
- [11] Christine R, Claude R, Frederic C. Inhibition of palmito (*A-canthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids [J]. Food Chemistry, 1997, 59(3): 355 - 360.

## Inhibitory Effects of Benzoic Acid and Its Derivants on the Polyphenoloxidase from the 5<sup>th</sup> Instar of *Pieris rapae* L.

KE Li-na<sup>1</sup>, XUE Chao-bin<sup>2</sup>, WANG Qin<sup>1</sup>,  
LUO Wan-chun<sup>2</sup>, CHEN Qing-xi<sup>1\*</sup>

- (1. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,  
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;  
2. Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique,  
Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China)

**Abstract :** The polyphenoloxidase (PPO) is more responsible for enzymatic browning during the growth of the insects. It also is involved in the defense reaction and has some certain relation with the immune condition of the insects. The polyphenoloxidase is a metalloenzyme oxidase which catalyzes two distinct reactions of melanin synthesis — the hydroxylation of a monophenol and the oxidation of  $\sigma$ -diphenol to the corresponding  $\sigma$ -quinone. A great number of benzoic acid family compounds can inhibit the enzyme activity for the oxidation of L-DOPA. In the present paper, partial characteristics and inhibitory kinetics of polyphenoloxidase (PPO) from the 5<sup>th</sup> instar of *Pieris rapae* L. were studied. The results show that benzoic acid, *p*-cyanobenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid and *p*-cyclohexylbenzoic acid were chosen as inhibitors of PPO for the oxidation of L-DOPA. The reactions of these inhibitors with the PPO are reversible with remaining enzyme activity. The  $IC_{50}$  (the inhibitor concentrations leading to 50 % activity lost) were estimated to be 14.2, 16.1, 11.3 and 2.1 mmol/L, respectively. The inhibitory mechanisms of *p*-hydroxybenzoic acid is competitive, *p*-cyanobenzoic acid belongs to be a mixed typed inhibitor while the others are noncompetitive inhibitors. Obviously, *p*-cyanobenzoic acid is the best inhibitor among the four compounds, so it may have the bright prospect in the future as the biocide.

**Key words :** the 5<sup>th</sup> instar of *Pieris rapae* L.; polyphenoloxidase; benzoic acid and its derivants; inhibitory mechanism