

几种苯甲酸族化合物对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用

王 勤¹, 柯莉娜¹, 薛超彬², 贺 量¹, 罗万春², 陈清西^{1*}

(1. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与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)

摘要:以菜青虫五龄幼虫为材料, 分离提取多酚氧化酶, 研究对醛基苯甲酸(a)、对甲氧基苯甲酸(b)、对异丙基苯甲酸(c)、对环己基苯甲酸(d)、对氟苯甲酸(e)、对氯苯甲酸(f)和对溴苯甲酸(g)等苯甲酸族化合物, 对该酶催化 L-多巴(L-DOPA)氧化活力的影响. 测定(a)、(b)、(c)、(d)和(f)抑制作用的 IC_{50} 分别为 10.63、12.22、1.75、2.10 和 6.64 mmol/L, 而(e)和(g)则没有明显的抑制效果. 研究上述效应物的抑制作用动力学, 结果表明:(a)、(c)和(f)对酶的作用表现为竞争性抑制, 其抑制常数分别为 6.74、1.08 和 3.94 mmol/L; (b)和(d)对酶的抑制作用表现为非竞争性类型, 其抑制常数分别为 13.11 和 2.21 mmol/L.

关键词:菜青虫; 多酚氧化酶; 苯甲酸族化合物; 抑制作用; 动力学

中图分类号: Q 356.1

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)03-0428-04

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^[1]. 对于具有“外骨骼”的菜青虫, 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^[2,3]. 我们曾经报道了菜青虫多酚氧化酶的性质^[3]以及多种效应物对酶的影响^[4-6]. 作为系列研究, 实验中发现几种苯甲酸族化合物对菜青虫多酚氧化酶活力有较强的抑制作用. 本文的目的在于研究这些苯甲酸族化合物对该酶的抑制作用机理、作用动力学, 比较它们的抑制效应, 为开发以该酶为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.)的获得同参考文献[4]. L-多巴(L-DOPA)、对醛基苯甲酸、对甲氧基苯甲酸、对异丙基苯甲酸、对环己基苯甲酸、对氟苯甲酸、对氯苯甲酸、对溴苯甲酸及二甲亚砜(DMSO)为 Sigma 公司产品, 其它试剂均为国产分析纯或化学纯, 使用的蒸

馏水为玻璃重蒸水.

1.2 PPO 酶液的制备

酶液的制备以及蛋白浓度的测定均参照参考文献[4].

1.3 酶活力测定方法

PPO 活力测定参照参考文献[4].

2 实验结果

2.1 效应物对菜青虫 PPO 活力的影响

分别以对醛基苯甲酸(a)、对甲氧基苯甲酸(b)、对异丙基苯甲酸(c)、对环己基苯甲酸(d)、对氟苯甲酸(e)、对氯苯甲酸(f)和对溴苯甲酸(g) (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

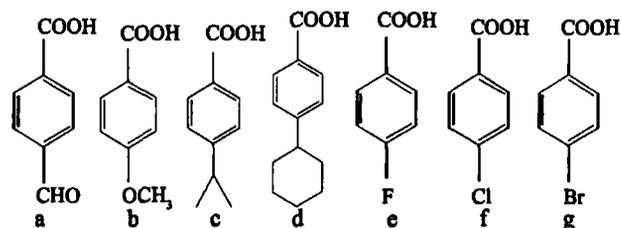


图 1 实验用的化合物的分子结构

a. 对醛基苯甲酸; b. 对甲氧基苯甲酸; c. 对异丙基苯甲酸; d. 对环己基苯甲酸; e. 对氟苯甲酸; f. 对氯苯甲酸; g. 对溴苯甲酸

Fig. 1 Chemical structures of terephthalaldehydic acid

收稿日期: 2005-04-21

基金项目: 留学回国人员科研启动经费, 福建省重点科技项目(2004N002), 国家自然科学基金(30570408)资助

作者简介: 王勤(1969-), 女, 讲师.

*通讯作者: chenqx@jingxian.xmu.edu.cn

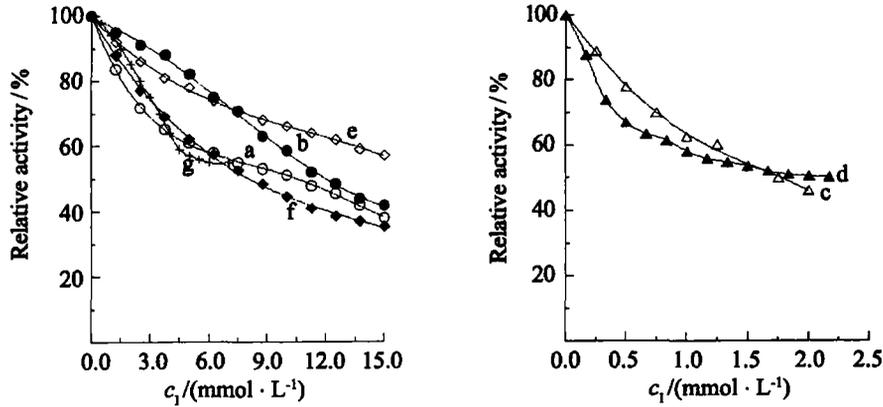


图 2 几种苯甲酸族化合物对菜青虫 PPO 活力的影响
a ~ g 所表示的化合物名称与图 1 的图注相同

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

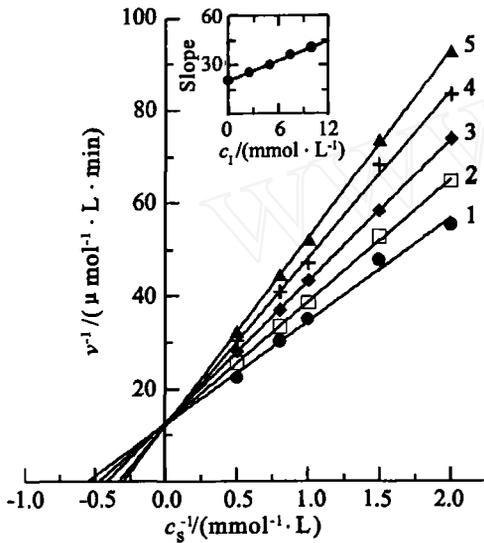


图 3 对醛基苯甲酸对菜青虫五龄虫 PPO 的抑制作用
直线 1 ~ 5 的抑制剂浓度分别为 0、2.5、5、7.5、10 mmol/L

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots for inhibition of terephthalaldehydic acid on the PPO from the fifth larva of *Pieris rapae* L.

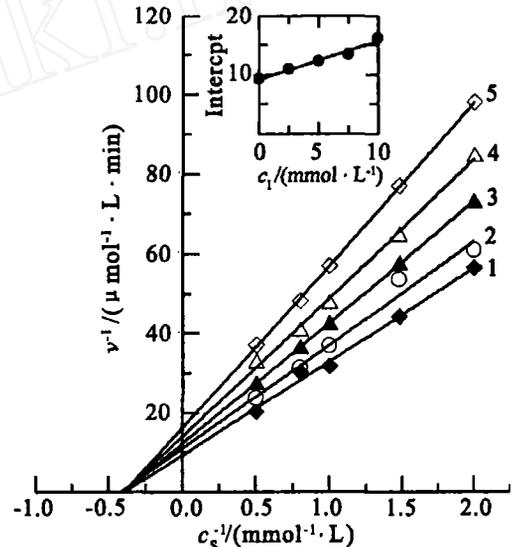


图 4 对甲氧基苯甲酸对菜青虫五龄虫 PPO 的抑制作用
直线 1 ~ 5 的抑制剂浓度分别为 0、2.5、5、7.5 和 10 mmol/L

Fig. 4 Lineweaver-Burk plots for inhibition of *p*-anisic acid on the PPO from the fifth larva of *Pieris rapae* L.

活力逐渐下降. 在 pH6.8 的 0.2 mol/L 磷酸缓冲液中, 37 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 10.63 (a)、12.22 (b)、1.75 (c)、2.10 (d) 和 6.64 (f) mmol/L, 对氟苯甲酸和对溴苯甲酸则没有明显的抑制效果. 测定的结果总结于表 1, 以供比较.

2.2 抑制剂 (a)、(c)、(f) 对菜青虫五龄幼虫 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幼虫 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一组双曲线, 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 (a) 对菜青虫五龄幼虫 PPO 抑制作用的 Lineweaver-Burk 双倒数作图, 得到一纵轴截距不变的直线, 其抑制类型为竞争性, K_m 值随着抑制剂 (a) 浓度的增大而增大, 最大反应速度 (V_{max}) 都没有改变. 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

表 1 几种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 some benzoic acid family compounds on the PPO from the 5th instar of *Pieris rapae* L.

化合物	$IC_{50}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑制类型	抑制常数/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	
			K_I	K_{IS}
对醛基苯甲酸(a)	10.63	竞争性	6.74	
对甲氧基苯甲酸(b)	12.22	非竞争性	13.11	13.11
对异丙基苯甲酸(c)	1.75	竞争性	1.08	
对环己基苯甲酸(d)	2.10	非竞争性	2.21	2.21
对氟苯甲酸(e)	#	a		
对氯苯甲酸(f)	6.64	竞争性	3.94	
对溴苯甲酸(g)	a			

抑制率未达到 IC_{50} , a 没测定.

(ES) 结合. 以不同浓度抑制剂(a)下测定的 K_m 对抑制剂(a)浓度作图(图 3 内插图)为一条直线,从直线的斜率可以求得抑制常数(K_I). 以相同的方法可以求得抑制剂(c)和(f)的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.

2.3 抑制剂(b)、(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

以相同的方法研究抑制剂(b)和(d)对菜青虫 PPO 抑制作用机理. 以(b)和(d)为效应物, Lineweaver-Burk 双倒数作图为一组横轴截距不变的直线,其抑制类型为非竞争性,即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_{max}). 图 4 为抑制剂(b)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,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(b)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($K_I = K_{IS}$). 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,测定结果列入于表 1,以供比较.

3 讨论

本文所报道的几种苯甲酸族化合物中(a)、(b)、(c)、(d)、(f)对菜青虫 PPO 均有抑制作用. 我们曾报道苯甲酸^[4]对菜青虫 PPO 的抑制作用类型是属于非竞争性抑制类型,从表 1 可见,苯甲酸在对位上被甲氧

基或环己基取代,对该酶的抑制作用机理保持不变,为非竞争性类型,它们与酶的结合位点是在酶活性中心以外的基团,可能是通过和氨基残基形成 Schiff 碱导致酶活力的下降. 苯甲酸在对位上被醛基、异丙基或氯离子取代,抑制作用机理变为竞争性类型,发生了质的变化,说明它与 PPO 的底物结构上具有一定的相似性. 对氟、对溴苯甲酸没有表现出明显的抑制效果,这种差异可能是由于苯甲酸对位上基团的分子大小及电子强度等的差异而造成的. 这几种化合物中对异丙基苯甲酸和对环己基苯甲酸的抑制强度比其它几种有很大的提高,抑制强度有的增强近 10 倍. 我们曾报道了对卤代苯甲酸族化合物对蘑菇酪氨酸酶的影响^[7],均表现出较强的抑制效果,且抑制作用机理为非竞争性类型,这种差异可能与不同物种来源酶的差异有关. 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,对氟基苯甲酸是镇咳药类的重要中间体. 作为农药的开发,对异丙基苯甲酸和对环己基苯甲酸具有较好的前景,但还需进一步探讨它们对植物的生长发育的影响和毒性实验.

昆虫酚氧化酶的特性及不同效应物对其影响已受到越来越多的关注^[3,8,9],其中高兴祥等对苯甲酸族化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶的影响也进行了较深入的研究^[10]. 本研究丰富了该研究领域的内容,由本文报道的研究结果结合同行的研究,可以为以酚氧化酶为靶标,以苯甲酸类化合物为模板设计研究开发新型害虫控制剂提供参考数据. 而对于两者间定量结构活性相关性(QSAR)的其它物化参数之间的关系,有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] Ashida M, Yamazaki H I. Biochemistry of the phenoloxidase system in insect: with special reference to its activation[M]//Molting and Metamorphosis. Tokyo: Japan Science Society Press, 1990: 239 - 261.
- [2] 王荫长. 昆虫生物化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 129 - 130.
- [3] 薛超彬, 陈清西, 王勤, 等. 菜青虫不同虫态及虫龄的多酚氧化酶性质比较[J]. 昆虫学报, 2004, 47: 305 - 309.
- [4] 柯莉娜, 薛超彬, 王勤, 等. 苯甲酸及其衍生物对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(6): 856 - 860.
- [5] 王勤, 柯莉娜, 薛超彬, 等. 有机溶剂对菜青虫多酚氧化酶活力的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(增刊): 36 - 39.
- [6] 薛超彬, 王勤, 柯莉娜, 等. 铜铁试剂对菜青虫多酚氧化酶的抑制作用[J]. 昆虫学报, 2005, 48: 290 - 294.
- [7] Wang Q, Shi Y, Song K K, et al. Inhibitory effects of 4-halobenzoic acids on the diphenolase and monophenolase activity of mushroom tyrosinase [J]. The Protein Journal, 2004, 23: 303 - 308.
- [8] 刘春英, 罗万春, 李方正, 等. 槐尺蠖多酚氧化酶的纯化及酶学特征[J]. 昆虫学报, 2004, 47: 184 - 188.
- [9] 高兴祥, 罗万春, 谢桂英, 等. 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[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12: 16 - 19.
- [10] 高兴祥, 罗万春, 于天丛, 等. 几种苯甲酸类化合物对甜菜夜蛾多酚氧化酶活性的影响[J]. 农药学学报, 2004, 6: 26 - 30.

Inhibitory Effects of Some Benzoic Acid Family Compounds on the Polyphenoloxidase from the 5th Instar of *Pieris rapae* L.

WANG Qin¹, KE Li-na¹, XUE Chao-bin²,
HE Liang¹, LUO Wan-chun², CHEN Qing-xi^{1*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, College of Plant Protection, Shandong Agriculture University, Tai an 271018, China)

Abstract: The polyphenoloxidase (PPO) is more responsible for enzymatic browning during the growth of the insects. It is also 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 σ -diphenol to the corresponding σ -quinone. In the present paper, the effects of some benzoic acid family compounds on the polyphenoloxidase from the 5th instar of *Pieris rapae* L. were studied. The results show that terephthalaldehydic acid, *p*-anisic acid, *p*-isopropylbenzoic acid, *p*-cyclohexylbenzoic acid and *p*-chlorobenzoic acid have potent inhibition on the enzyme for the oxidation of L-DOPA. The IC_{50} , the inhibitor concentrations leading to 50% activity lost, were estimated to be 10.63, 12.22, 1.75, 2.10 and 6.64 mmol/L, respectively. The inhibitory kinetics was studied and the results showed that terephthalaldehydic acid, *p*-isopropylbenzoic acid and *p*-chlorobenzoic acid were competitive inhibitors, while *p*-anisic acid and *p*-cyclohexylbenzoic acid were noncompetitive inhibitors. Their inhibition constants were determined and compared. Obviously, the inhibitory effects of *p*-isopropylbenzoic acid and *p*-cyclohexylbenzoic acid were higher than the other compounds, so they may have the bright prospect in the future as the biocide.

Key words: the 5th instar of *Pieris rapae* L.; polyphenoloxidase; benzoic acid family compounds; inhibition; kinetics