

家蚕血淋巴体外黑化观察及相关黑色素合成催化酶基因

李田¹, 张亮¹, 申琦¹, 赵威¹, 李黎¹, 吕银¹, 蒋贵兵², 闫登峰¹, 肖俊杰¹, 陈萍¹

1 西南大学 生物技术学院, 重庆 400716

2 重庆市蚕业管理总站, 重庆 400716

李田, 张亮, 申琦, 等. 家蚕血淋巴体外黑化观察及相关黑色素合成催化酶基因. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1093-1103.

Li T, Zhang L, Shen Q, et al. *In vitro* observation of haemolymph melanization and melanin-related biosynthesis enzyme genes in silkworm, *Bombyx mori*. Chin J Biotech, 2016, 32(8): 1093-1103.

摘要: 观察不同生长期家蚕幼虫血淋巴在体外的黑化速度和对大肠杆菌生长的影响结果显示, 随食桑生长幼虫血淋巴的黑化速度逐渐变快, 对大肠杆菌生长的抑制作用逐渐增强。RT-PCR 实验显示, 黑色素合成催化酶 BmTan、BmPo-1、BmYellow-f 和 BmDdc 等的基因在家蚕 5 L 3 d 血淋巴中表达量高, BmBlack、BmYellow 和 BmPah 等的基因也有明显表达。qPCR 分析显示, 黑化病蚕中 *Bmtan*、*Bmddc*、*Bmyellow*、*Bmebony* 和 *Bmblack*, 尤其 *Bmddc* 表达发生了显著上调。与对照相比, Ddc 酶的抑制剂能显著抑制脂多糖对血淋巴的诱导黑化作用。用大肠杆菌注射家蚕幼虫, 血淋巴中多巴和多巴胺的含量明显上升。这些表明家蚕幼虫血淋巴黑化与防御免疫有关, *Bmddc* 很可能在幼虫血淋巴的免疫黑化中发挥作用。

关键词: 家蚕血淋巴, 黑化反应, 黑色素合成催化酶, 免疫应答

Received: November 25, 2015; **Accepted:** February 17, 2016

Supported by: Natural Science Foundation of Chongqing (No. 2013jjB80004), Graduate Student Innovative Research Projects of Chongqing (No. CYS14048), National Special Fund for Silk Development of Chongqing in 2015.

Corresponding author: Ping Chen. Tel/Fax: +86-23-68250084; E-mail: chenping1918@swu.edu.cn

重庆市自然科学基金重点项目 (No. 2013jjB80004), 重庆市研究生科研创新项目 (No. CYS14048), 重庆市 2015 国家茧丝绸发展专项资金资助。

网络出版时间: 2016-03-07

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160307.1410.004.html>

In vitro observation of haemolymph melanization and melanin-related biosynthesis enzyme genes in silkworm, *Bombyx mori*

Tian Li¹, Liang Zhang¹, Qi Shen¹, Wei Zhao¹, Li Li¹, Yin Lü¹, Guibing Jiang², Dengfeng Yan¹, Junjie Xiao¹, and Ping Chen¹

¹ College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China

² Sericulture Management Station of Chongqing, Chongqing 400716, China

Abstract: The observation statistics suggested that the haemolymph melanization speed of larvae became fast and the growth inhibition of *Escherichia coli* was strong as the quantities of feeding on mulberry leaves increased. The RT-PCR result showed that the mRNA expressions of melanin biosynthesis enzyme BmTan, BmPo-1, BmYellow-f and BmDdc were high in the haemolymph of 5 L 3 d larvae. The qPCR analysis showed *Bmtan*, *Bmddc*, *Bmyellow*, *Bmbony* and *Bmblack*, especially *Bmddc* expression were significantly higher in black disease larvae than in normal larvae. Compared with control, Ddc inhibitors drastically inhibited the lipopolysaccharide-induced haemolymph melanization. In addition, the content of Dopa and Dopamine markedly rose after *E. coli* injection. These indicated that haemolymph melanization was linked to immune defenses and *Bmddc* may play a role in melanization response of haemolymph immune in silkworm.

Keywords: haemolymph of *Bombyx mori*, melanization, melanin biosynthesis enzyme, immune response

昆虫是地球上最庞大的生物种群，分布于除深海外的各种自然环境中^[1]，具有极强的环境适应能力和防御免疫能力。昆虫为开放式血液循环，所有组织器官浸浴在血淋巴中，当外源物攻破昆虫体壁这个物理屏障后，首先面对的是血淋巴，血淋巴是昆虫免疫防卫的重要组织。昆虫免疫防卫中常有黑化现象。黑色素形成过程中产生的自由氧 (ROI)、自由氮 (RNI) 以及醌类等多种有毒分子物质，对核酸、蛋白质和细胞膜等有破坏作用^[2-3]。在昆虫体内被黑化的细菌置于固体培养基上几乎不会生长^[4]，注入烟草天蛾 *Manduca sexta* 体内的荧光微球体被血淋巴黑化包裹^[5]，用含大肠杆菌 *Escherichia coli* 或金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 的钨丝针刺黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 胸部，伤口处的细菌被黑化^[6]。埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中

发现的免疫黑化蛋白酶 (Immune melanization proteases, IMP-1 和 IMP-2) 可以通过调控血淋巴黑化来抑制病原物生长^[7]。这些表明，黑化反应不仅是昆虫免疫应答的一个伴随现象，而且是昆虫进行免疫防卫的一种手段。

家蚕 *Bombyx mori* 是重要的经济昆虫，也是研究鳞翅目的模式昆虫，有关家蚕的免疫防御机制受到高度关注。在免疫黑化方面，许平震等^[8]克隆鉴定出家蚕 14 个模式识别受体编码基因，其中包括 10 个肽聚糖识别蛋白 (PGRP) 基因和 4 个 β -葡聚糖识别蛋白 (β GRP) 基因。赵萍等^[9]从家蚕基因组上共鉴定了 143 个家蚕丝氨酸蛋白酶基因，80 种丝氨酸蛋白酶抑制剂基因。最近徐曼等^[10]认为 *Bmlz* 基因能够通过诱导酚氧化酶原的表达增强血淋巴黑化作用。这些研究多集中于黑色素合成上游酚氧化酶原级联

反应及调控过程。对于黑色素合成下游相关催化酶基因的研究,在所有昆虫中果蝇 *Drosophila* 研究的最为清楚^[11]。2011年于红松等^[12]通过生物信息学方法从家蚕基因组中搜索到与果蝇同源的9个黑色素合成途径相关基因并进行了鉴定与分析。有研究证明家蚕黑色素代谢途径上催化酶酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, Th)、*N*-β-丙酰多巴胺合成酶 (*N*-β-alanyldopamine synthetase, Ebony)、*N*-β-丙酰多巴胺水解酶 (*N*-β-alanyldopamine hydrolase, Tan)、芳香烷基 *N*-乙酰转移酶 (Arylalkylamine-*N*-acetyl transferase, Dat)、苯丙氨酸羟化酶 (Phenylalanine hydroxylase, Pah) 和鸟苷三磷酸环化水解酶 (Guanosine triphosphate cyclohydrolase, GTPCH I) 等编码基因的表达与体壁斑纹黑色素的形成及沉积相关^[13-18]。本研究调查了不同生长期家蚕幼虫血淋巴的黑化能力及其免疫防卫能力,分析了黑色素合成催化酶基因及其编码产物与家蚕血淋巴免疫的关系,为进一步全面揭示家蚕免疫防御机制提供更多的信息和基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试家蚕品种大造 (由本实验室保存),幼虫常规条件下用桑叶饲养。大肠杆菌为本实验室保存菌种,实验中使用的大肠杆菌为过夜活化的新鲜菌液 (OD_{600} 约为 0.8)。

1.2 总 RNA 的提取、cDNA 合成及引物设计

参照 Trizol (Invitrogen 公司) 试剂盒说明书提取总 RNA。将组织用液氮研磨后加入 Trizol,室温放置 5 min 充分裂解后 12 000 r/min 离心

5 min,取上清并加入 200 μL 氯仿振荡混匀,放置 10 min 后 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上层水相并加入 500 μL 异丙醇混匀,室温放置 15 min 后 12 000 r/min 离心 10 min 弃上清, RNA 沉淀用 75%乙醇洗涤 2 次,室温晾干后用 DEPC 水溶解 RNA 沉淀,利用微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度。利用 M-MLV 反转录酶 (Promega 公司),合成 cDNA 第一链^[19]。基于家蚕基因组数据库设计引物,引物序列见表 1,实验用引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 RT-PCR 分析

PCR 反应条件:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 40 s,54 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 50 s,33 个循环;72 °C 延伸 10 min,12 °C 保存。对 PCR 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色观察。

1.4 荧光定量 PCR 检测

利用家蚕转录起始因子 4A 基因 (BGIBMGA003186) 作为内参。荧光定量 PCR 反应仪器为 ABI7500Fast,反应体系为 20 μL,热启动程序为 95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。其中每个模板进行 3 次重复实验,将获得的数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因相对表达分析。

1.5 HPLC 测定多巴和多巴胺含量

多巴、多巴胺样品制备:收集家蚕血淋巴并加入等体积盐酸缓冲液。在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min 后取上清液煮沸 10 min,冷却后加入等体积氯仿并颠倒混匀,4 °C、10 000 r/min 离心 15 min,取上清液过滤 (0.22 μm 滤膜) 后作为上机样品。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Genes	Primer sequences in semiquantitative RT-PCR (5'-3')	Primer sequences in the qPCR (5'-3')
<i>pah</i>	AGTGTTCACAGC	ATCCCATCACAGAA
	ACCCAG	TACCAG
	TTGTCCATAGCGT	TGTCCATAGCGTTT
<i>ddc</i>	TTAGCAG	AGCAG
	GCTAAAATCACTA	GAACAAGCACCGC
	CAGCCAGAC	AACAACC
<i>Po-1s</i>	GTTTATACGGCGT	TAGCGGGATACGAG
	AATAGTTCTT	TTAGCG
	CCGTCAAGCCAGG	
<i>ebony</i>	GAGG	
	TCACGGACATATT	
	CTCGATAGCTT	
<i>yellow</i>	TGAGGGATGAGCA	CCAAGTTGAGGGA
	CAAGAAG	CAGAGGTTA
	ATTACCAGAAAGA	ACTTCCTTCTTGTG
<i>tan</i>	TGTTAGCCA	CTCATCCC
	GGGATGAGAAAA	GTTGGTATCGAAAAG
	ATGTATGGGT	GTGGAGGA
<i>dat1</i>	CGTTCGTAATTG	AAGCTCGGGTAGG
	TAGTTGGTAG	GCGTTAA
	G TTCAGAAATACG	GAGGCTCCCATTAT
<i>yellow-f</i>	ACCAGGAC	GAAGTCGG
	GTTTGTTCGATATA	CATGTTAGCCAGGG
	AATACTCCA	TCTTATCGT
<i>th</i>	GTCCGTTCCAGCT	AATCTCGCCGTCAA
	TACACCAT	TCTGCTT
	CACAGCACCTCA	CCTACGTAGTCGCC
<i>black</i>	TCAGTCTT	GTTCTCAT
	GATTGTTTGTGAC	GGCAAGGCAACTG
	TGTCCCG	GCTCTG
<i>sw22934</i>	GGGTGAAATACA	GAGACAATTTCCGG
	GGGTGC	TGGCTTAC
	CCCAGTGGTGTGT	TGGTTTACGGTTGA
<i>sw22934</i>	CCTTAGAA	GTTCGG
	TCAGTGTATGCGA	TGGTAGGGTTGCAC
	TAGACGGA	GGATGT
<i>sw22934</i>	CTCGTGCAATGCG	GTTCTCAAGGAAG
	AAGTAC	GACTACTCGT
	GCCTTTCGAATTC	CGACCGCACTGGAT
<i>sw22934</i>	GTTTAC	ATGTTTG
		TTCGTA CTGGCTCT
		TCTCGT
<i>sw22934</i>		CAAAGTTGATAGCA
		ATTCCT

HPLC 测定条件：色谱柱为 C18 柱，流动相为甲醇-水 (体积比为 8 : 100)，流速为 0.8 mL/min。物质检测的激发波长为 280 nm，吸收波长为 320 nm，检测温度为 30 °C。

标准曲线绘制：先制备质量浓度为 1 g/L 母液，再将母液稀释成不同浓度梯度后上机，根据浓度梯度和对应的峰面积做标准曲线。多巴和多巴胺标准品测得 R^2 值分别为 0.999 和 0.996，说明标准曲线的拟合度较好 (图 1)，可以用于实验测定。

多巴、多巴胺含量计算：采用峰保留值比较法和叠加法进行定性分析，利用外标法测峰面积对应标样的回归方程计算含量。

1.6 大肠杆菌生长观察

在毛细针中将家蚕血淋巴与大肠杆菌新鲜

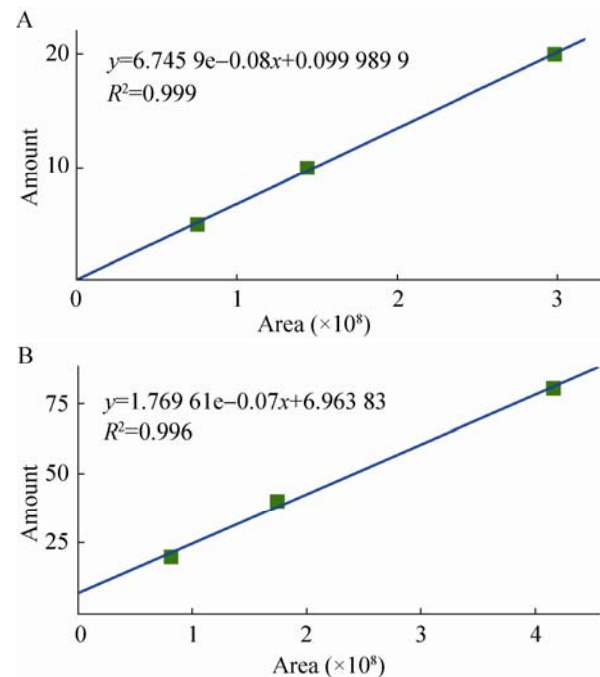


图 1 多巴 (A)、多巴胺 (B) 标准曲线

Fig. 1 Dopa and Dopamine standard curve. (A) Dopa. (B) Dopamine.

菌液混合 6 h 后通过无菌空气尽可能把其中所有液体打出涂板, 37 °C 人工气候培养箱中培养 12 h, 统计菌落数。每组实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 不同龄期家蚕血淋巴体外黑化观察

我们选取 4 龄第 1 天至 5 龄第 6 天的幼虫来调查家蚕不同生长时期血淋巴黑化是否有差异, 以及在不同保护温度下血淋巴黑化是否有差异。观察仍在毛细针中进行^[20], 血淋巴体积为 10 μ L。

对于 4 龄期共 4 d 的血淋巴来说 (图 2A), 体外放置 0.5 h 时均保持透明状态; 放置 12 h 时, 4 龄第 1 天 (4 L 1 d) 的血淋巴仍保持透明状态, 但 4 L 2 d 的血淋巴能在毛细针粗端看到颜色略微加深, 且 4 L 3 d 和 4 L 4 d 的血淋巴能在毛细针粗端看到明显黑褐色; 放置 24 h 时, 4 L 1 d 的血淋巴就能看到毛细针粗端颜色加深, 4 L 2 d、4 L 3 d 和 4 L 4 d 的血淋巴有明显的黑褐色, 并有随幼虫食桑生长经过时间增加黑化程度更强的趋势。

对于 5 龄期共 6 个不同生长时间的幼虫血淋巴, 体外放置 0.5 h 时, 除低温 4 °C 保持透明状态外, 在室温和高温 37 °C 保护的毛细针粗端均出现明显的黑褐色, 且黑褐色随幼虫经过时间增加逐渐加深并向毛细针细端扩展; 放置 12 h 时, 除 5 L 1 d 在 4 °C 保护的的血淋巴未见明显变色外, 其他样品都有明显的黑褐色, 并有随幼虫食桑生长和样品的保护温度提高、血淋巴变黑程度越深范围越广的初步特征; 放置 24 h 时, 所有血淋巴样品都见黑褐色, 从 5 龄初到 5 龄盛食期以及 5 龄上簇前, 血淋巴黑化程度和黑化范围随幼虫经过时间逐步变得更深更广, 这个现象特征比前面更加明显突出 (图 2B)。

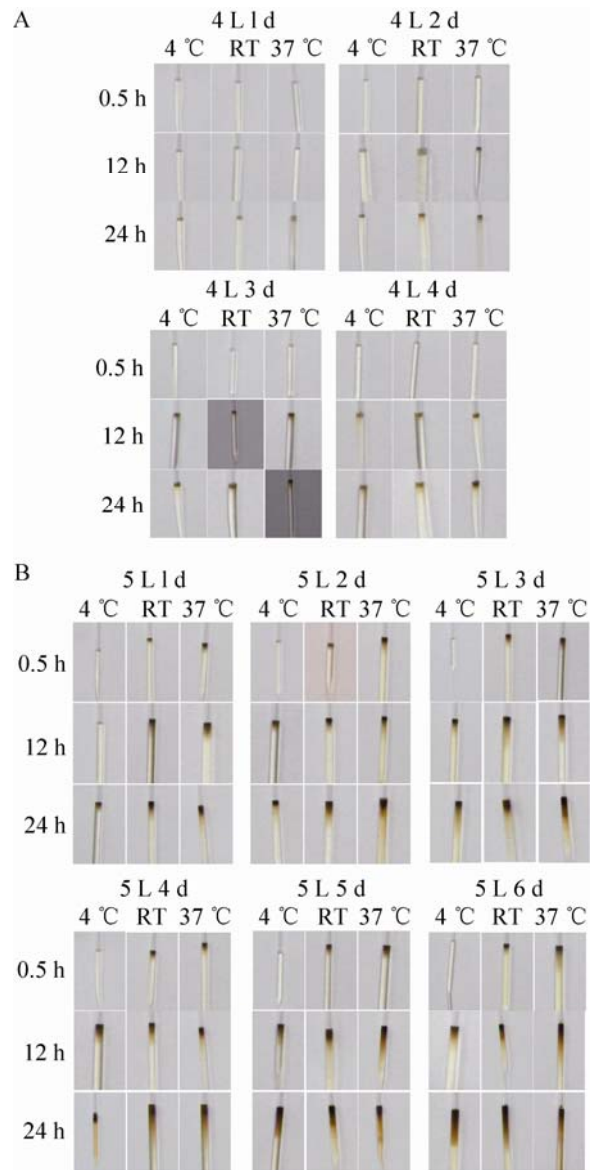


图 2 毛细针管内不同龄期家蚕血淋巴黑化的过程观察

Fig. 2 Melanization of haemolymph using different instars of silkworm in the capillary with time. (A) Days 4th instar larvae haemolymph. (B) Days 5th instar larvae haemolymph. RT: room temperature.

总之, 血淋巴在毛细针中的黑化速度和程度与家蚕幼虫不同生长时期以及保护温度都有明显关系。5 龄期的血淋巴比 4 龄期的黑化快;

同一龄期内, 龄初的血淋巴黑化较慢, 龄末的血淋巴黑化较快; 低温 4 °C 保护的血淋巴变黑速度最慢, 其次是室温, 37 °C 黑化最快。

2.2 不同龄期家蚕血淋巴对大肠杆菌生长的影响

为了探究家蚕血淋巴黑化作用的强弱与其杀灭外源微生物的能力是否相关, 我们根据前面不同生长期幼虫血淋巴的体外黑化观察实验, 分别选取 4 L 3 d 和 5 L 6 d 两个龄期的幼虫血淋巴进行实验。用 7.5 μL 血淋巴与 2.5 μL 大肠杆菌混合 6 h 后, 观察大肠杆菌生长状况。同等条件下用 7.5 μL PBS 缓冲液 (pH 7.4) 代替家蚕血淋巴作对照。大肠杆菌与 4 L 3 d 幼虫血淋巴混合反应 6 h 后, 平均菌落数为 32 个, 与 5 L 6 d 家蚕血淋巴混合后平均菌落数为 8 个, 与 PBS 混合 (对照) 后的平均菌落数为 51 个。大肠杆菌与家蚕血淋巴混合后生长受到抑制, 菌落数目明显减少, 达到统计学上的显著性; 黑化较强的 5 L 6 d 家蚕血淋巴对大肠杆菌生长的抑制作用比黑化较弱的 4 L 1 d 血淋巴的抑制作用更强、效果更好, 它们之间的差异达到统计学上的极显著水平。结果如图 3 所示。这些暗示家蚕幼虫血淋巴的黑化作用与防御免疫作用有关。

2.3 血淋巴中黑色素合成相关催化酶基因表达分析

黑色素合成需要多个步骤、多个酶参与一系列催化反应, 其中各个步骤的催化酶是黑色素合成的关键。家蚕造血器官功能发挥在 5 L 3 d 有一个高峰^[21]。我们用 RT-PCR 分析 5 L 3 d 家蚕血淋巴中目前已报道的与黑色素合成相关的 *Bmpah*、*Bmth*、*Bmblack*、*Bmyellow*、*Bmyellow-f*、*Bmdat1*、*Bmebony*、*Bmtan*、*Bmpo-1* 和 *Bmddc* 等 10 个基因的表达量。结果显示 (图 4), *Bmtan* (283 bp)、

Bmpo-1 (500 bp)、*Bmyellow-f* (549 bp) 和 *Bmddc* (663 bp) 等 4 个基因在正常血淋巴中均有高量表达, *Bmblack* (487 bp)、*Bmyellow* (464 bp) 和 *Bmpah* (566 bp) 等 3 个基因有清楚的扩增带, 未发现

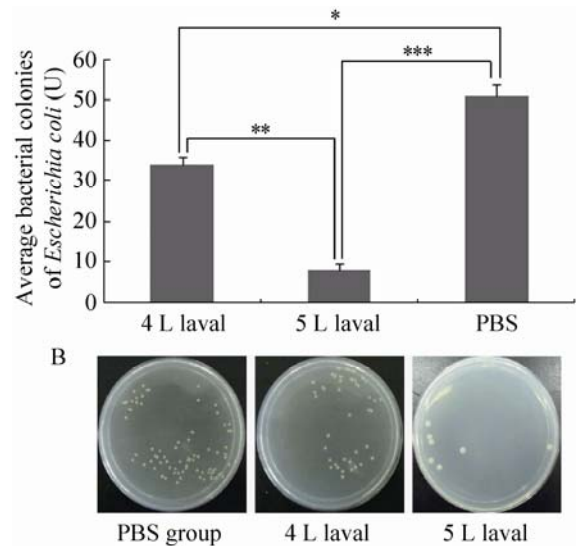


图 3 不同龄期家蚕血淋巴对体外培养大肠杆菌增殖的影响

Fig. 3 Influence of haemolymph using different instars of silkworm on the proliferation of *Escherichia coli* cultured *in vitro*. (A) The statistical analysis on the bacteria colonies between 4 L 3 d instar larvae haemolymph and 5 L 6 d instar larvae haemolymph. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. (B) Direct-viewing the bacteria colonies.

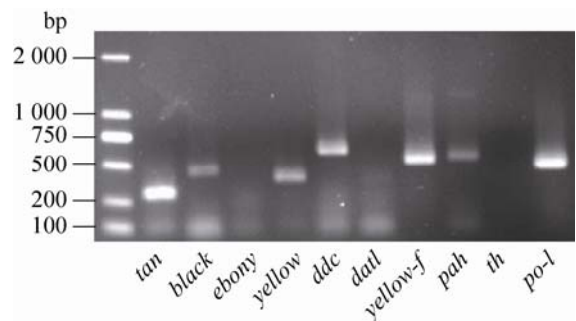


图 4 黑色素合成相关催化酶基因在 5 L 3 d 家蚕血淋巴中的表达模式

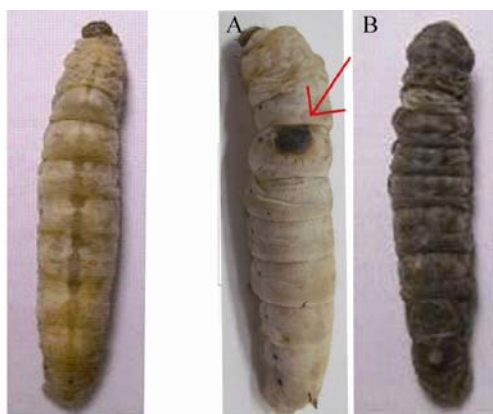
Fig. 4 Expression pattern of enzyme genes related to melanin biosynthesis in 5 L 3 d instar larvae haemolymph.

Bmth、*Bmebony* 和 *Bmdat1* 等 3 个基因明显的扩增带。

2.4 黑色素合成催化酶基因在黑化病蚕与正常蚕之间的表达差异分析

被蝇蛆寄生的家蚕，体壁上都有一个病原体进入体腔的黑色创口（图 5A）。发病严重的幼虫通体透出黑褐色，体腔内所有组织器官浸浴在黑褐色体液中，有腐烂趋势，容易断离。

为了探究黑化病蚕与黑色素合成催化酶基因是否有关，我们选取 5 龄相同生长期的健康幼虫（熟蚕）和被蝇蛆寄生通体透出黑褐色的幼虫（图 5B），用 *q*-PCR 比较相关黑色素合成催化酶基因的表达差异。结果显示，*Bmpah*、*Bmth*、*Bmblack*、*Bmddc*、*Bmyellow* 和 *Bmebony* 等 6 个基因在两种蚕体中的表达量均发生明显变化。除 *Bmpah* 在黑化病蚕中的表达量减少外，其余 5 个基因的表达水平在黑化病蚕中显著增加，尤其是 *Bmddc* 表达发生显著上调，表明黑化的病蚕能够引起黑色素代谢相关基因表达量的变化。



Normal silkworm larval Black disease silkworm larval

图 5 正常上簇蚕和黑化病蚕图

Fig. 5 Normal and black disease silkworm larval. (A) The early stage of silkworm being bit by flies. (B) The later stage of silkworm being bit by flies. The red arrow refers to flies bites.

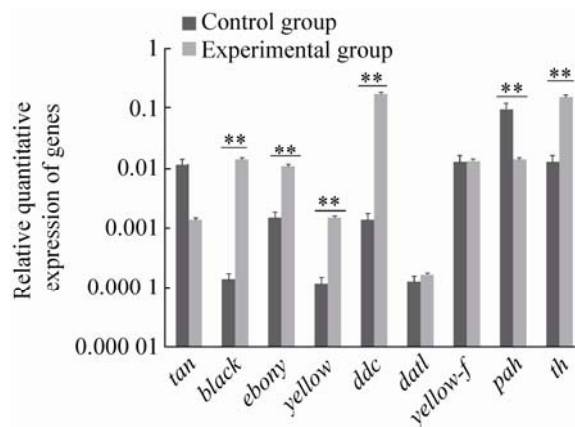


图 6 黑化病蚕中黑色素合成相关催化酶基因的表达分析

Fig. 6 Effects of black disease silkworm on the relative expression of enzyme genes related to melanin biosynthesis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, compared to the relative expression in normal silkworm.

2.5 多巴脱羧酶 (Ddc) 抑制剂对血淋巴黑化的影响

多巴脱羧酶 (Ddc) 基因在 5 L 3 d 家蚕血淋巴中高量表达，在黑化病蚕中相比正常蚕体表达上调极显著。为了探究 Ddc 是否在家蚕血淋巴黑化中发挥催化作用，我们用 Ddc 酶活性的特异抑制剂卡比多巴（大连美仑）来进行实验。革兰氏阴性菌胞壁主要成分脂多糖 (LPS, Sigma) 能够迅速诱导家蚕体外血淋巴发生黑化反应^[20]。用 5 L 3 d 家蚕血淋巴 7.5 μ L 与 2.5 μ L 卡比多巴 (10 mg/mL, PBS 为溶剂) 及 2.5 μ L LPS (1 mg/mL) 混合, PBS 代替卡比多巴作为对照。观察记录时间点为混合后 0、0.5、24 h。

由图 7 中我们可以看出 0 h 时两组毛细针中血淋巴呈透明状，几分钟后 PBS 组毛细针粗端能看到颜色稍有加深，0.5 h 后 LPS 诱导血淋巴明显变黑，而加入卡比多巴的毛细针在 0.5 h 才见粗端血淋巴颜色有微弱加深，在 24 h 时 PBS

组整个毛细针管中血淋巴变为黑褐色并逐渐向细端延伸，而加入卡比多巴的血淋巴在 24 h 时呈黄色，整个过程中没有出现血淋巴黑化现象。表明卡比多巴能够抑制家蚕血淋巴黑化作用，即 Ddc 与家蚕血淋巴黑化作用有关。

2.6 血淋巴中多巴 (Dopa) 和多巴胺(Dopamine) 含量

Ddc 是使 Dopa 转化成 Dopamine 的重要催化酶^[22]。Dopa 和 Dopamine 是黑色素合成的重要前驱物，对微生物的生长具有抑制作用^[20]。用 5 μ L 大肠杆菌注射 5 L 3 d 家蚕，然后用 HPLC 检测幼虫血淋巴中 Dopa 和 Dopamine 含量，检

测时间为注射后 6 h 和 24 h。以 PBS 代替大肠杆菌注射幼虫为对照。每组重复 3 次，Dopa 和 Dopamine 含量是 3 次结果的平均。

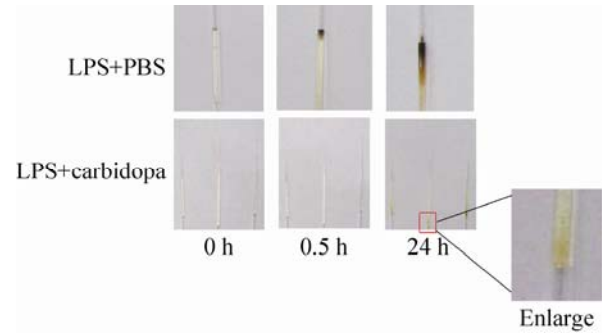


图 7 卡比多巴对家蚕血淋巴黑化的影响
Fig. 7 Influence of carbidopa on melanization of silkworm haemolymph.

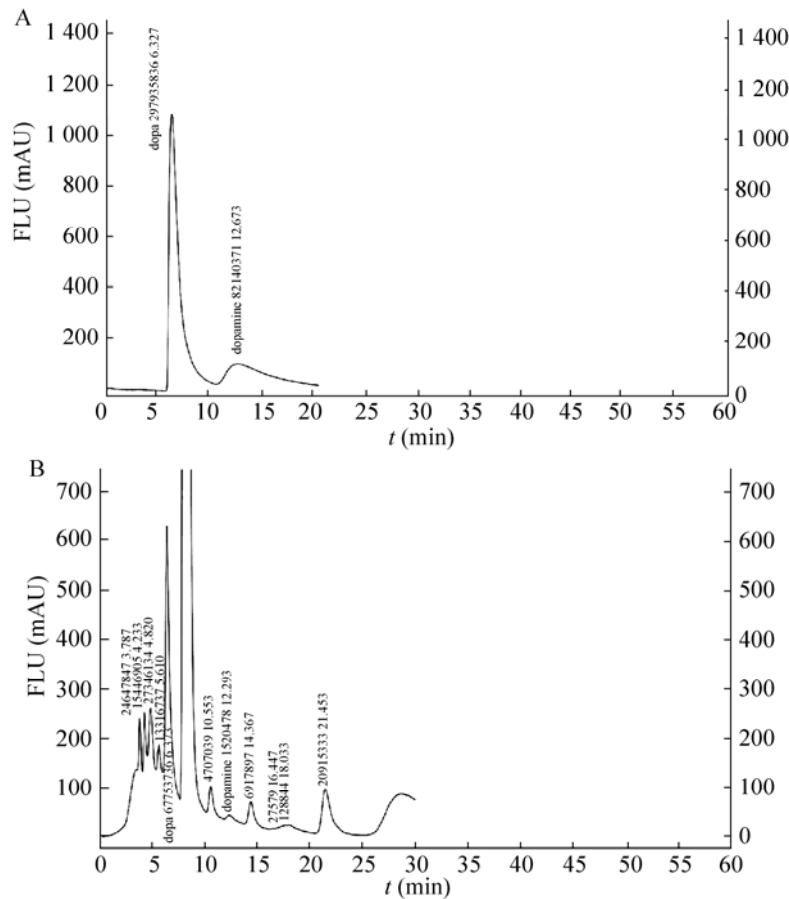


图 8 多巴和多巴胺的色谱图

Fig. 8 Chromatograms of Dopa and Dopamine. (A) The standards. (B) The experimental group.

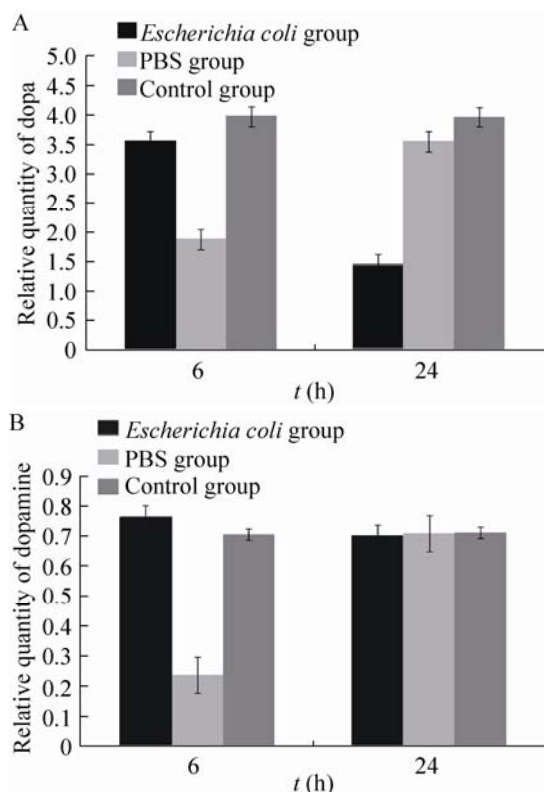


图 9 大肠杆菌感染后血淋巴中多巴和多巴胺含量检测

Fig. 9 Dopa and Dopamine content detection in silkworm haemolymph induced by *Escherichia coli*. (A) Dopa. (B) Dopamine.

正常条件下家蚕体内 Dopa 含量远远高于 Dopamine 含量。未注射 (对照组) 时家蚕体内 Dopa 和 Dopamine 含量保持稳定; 注射 PBS 后 6 h, Dopa 和 Dopamine 含量均明显降低, 且 24 h 时基本恢复正常水平; 注射大肠杆菌后 6 h 相比 PBS 组来说, Dopa 含量升高了 88.5%, Dopamine 含量升高了 2.3 倍, 24 h 时 Dopamine 含量恢复正常而 Dopa 含量相比 PBS 组降低了 59.0%。

3 讨论

不同生长期家蚕幼虫的血淋巴在体外黑化的速度不同: 5 龄幼虫血淋巴比 4 龄的黑化速度

快, 同一龄期内末龄幼虫血淋巴比龄初幼虫血淋巴黑化快。4 L 3 d 和 5 L 6 d 的幼虫血淋巴对大肠杆菌生长均有抑制作用, 其中 5 L 6 d 的幼虫血淋巴抑制作用比 4 L 3 d 更强。这些表明随家蚕幼虫食桑生长, 血淋巴黑化速度变快, 其防御免疫能力变强。这与先前认为家蚕幼虫对病原物的抵抗能力随生长发育增强的主要原因是由于体重的增加稀释了病原物而引起的观点^[23]不一致。

家蚕幼虫生长发育到 5 龄第 3 天, 其造血器官功能发挥达到顶峰, 此时血淋巴中基因的表达情况与血淋巴功能的发挥可能具有联系。RT-PCR 实验显示, 黑色素合成催化酶 BmTan、BmPo-1、BmYellow-f 和 BmDdc 等的基因在家蚕 5 L 3 d 血淋巴中有较高的表达, BmBlack、BmYellow 和 BmPah 等的基因在 5 L 3 d 血淋巴中也有明显表达。差异分析显示, 黑化病蚕中 *Bmtan*、*Bmddc*、*Bmyellow*、*Bmebony* 和 *Bmblack*, 尤其 *Bmddc* 表达发生了显著上调。这些基因在其他昆虫的免疫黑化研究中也有报道, 如苯丙氨酸羟化酶基因 (*pah*) 和 *ddc* 在埃及伊蚊 *Ae. Aegypti* 和骚扰阿蚊 *Armigeres subalbatus*^[24-25]、酪氨酸羟化酶基因 (*th*) 在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*^[26]、N-β 丙酰多巴胺合成酶基因 (*ebony*) 和 *ddc* 在地中海实蝇 *Ceratitis capitata*^[27-28]、*ebony* 在拟步行虫 *Tenebrio molitor*^[27] 等。

Ddc 酶的抑制剂能显著抑制 LPS 对血淋巴的诱导黑化作用, 说明 Ddc 酶与家蚕血淋巴免疫黑化作用有关。BmDdc 定位于家蚕 BmN 细胞中靠近核周围的细胞质中^[29]。地中海实蝇中的 *ddc* 参与先天免疫反应, 调控血细胞的吞噬、小结和黑化作用^[28]。结合 *Bmddc* 在家蚕 5 L 3 d 血淋巴中高量表达以及在黑化病蚕中表达显著

上调,我们认为,*Bmddc* 在家蚕血淋巴的免疫黑化中扮演了重要角色。

Dopa 和 Dopamine 是黑色素合成的重要前体物质,能有效抑制大肠杆菌的生长^[20]。当大肠杆菌注射家蚕后 6 h,这两种物质在血淋巴中的含量明显上升,暗示这两种物质与幼虫血淋巴免疫相关。当侵染 24 h 后,Dopamine 含量恢复正常,而 Dopa 含量明显低于正常。我们猜测:当家蚕血淋巴受到浸染时,免疫应答系统启动黑色素合成,Dopa 和 Dopamine 作为合成黑色素的重要原料被大量生产,导致含量上升;随着体内病原物减少,血淋巴的免疫应答机制逐渐停止,最终恢复常态,由于在黑色素合成中 Dopa 比 Dopamine 有更多的消耗途径,致使侵染 24 h 后血淋巴中 Dopa 含量还未恢复常态。

REFERENCES

- [1] Lu XF, Yang XY, Cheng JQ, et al. Progresses in insect antimicrobial peptides. *Acta Pharm Sin*, 1999, 34(2): 156–160 (in Chinese).
卢晓风, 杨星勇, 程惊秋, 等. 昆虫抗菌肽及其研究进展. *药学学报*, 1999, 34(2): 156–160.
- [2] Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35(5): 443–459.
- [3] Herrera-Ortiz A, Lanz-Mendoza H, Martínez-Barnette J, et al. *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured *in vitro*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34(9): 893–901.
- [4] Leem JY, Nishimura C, Kurata S, et al. Purification and characterization of *N*- β -Alanyl-5-*S*-glutathionyl-3, 4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (Flesh Fly). *J Biol Chem*, 1996, 271(23): 13573–13577.
- [5] Ling EJ, Yu XQ. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005, 35(12): 1356–1366.
- [6] Tang HP. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly*, 2009, 3(1): 105–111.
- [7] Zou Z, Shin SW, Alvarez KS, et al. Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity*, 2010, 32(1): 41–53.
- [8] Xu PZ, Zhang MR, Cheng TC, et al. Molecular cloning and expression profile analysis genes encoding pattern recognition receptors PGRP and β GRP in the silkworm, *Bombyx mori*. *Sci Sericult*, 2010, 36(3): 383–390 (in Chinese).
许平震, 张美蓉, 程廷才, 等. 家蚕模式识别受体 PGRP、 β GRP 编码基因的克隆鉴定及表达谱分析. *蚕业科学*, 2010, 36(3): 383–390.
- [9] Zhao P, Dong ZM, Duan J, et al. Genome-wide identification and immune response analysis of serine protease inhibitor genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e31168.
- [10] Xu M, Wang X, Tan J, et al. A novel *Lozenge* gene in silkworm, *Bombyx mori* regulates the melanization response of hemolymph. *Dev Comp Immunol*, 2015, 53(1): 191–198.
- [11] Wittkopp PJ, Carroll SB, Kopp A. Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in *Drosophila*. *Trends Genet*, 2003, 19(9): 495–504.
- [12] Yu HS, Shen YH, Yuan GX, et al. Evidence of selection at melanin synthesis pathway loci during silkworm domestication. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(6): 1785–1799.
- [13] Liu C, Yamamoto K, Cheng TC, et al. Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(29): 12980–12985.
- [14] Futahashi R, Sato J, Meng Y, et al. *yellow* and *ebony* are the responsible genes for the larval color mutants of the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics*,

- 2008, 180(4): 1995–2005.
- [15] Futahashi R, Banno Y, Fujiwara H. Caterpillar color patterns are determined by a two-phase melanin gene prepatterning process: new evidence from *tan* and *laccase2*. *Evol Dev*, 2010, 12(2): 157–167.
- [16] Dai FY, Qiao L, Tong XL, et al. Mutations of an arylalkylamine-*N*-acetyltransferase, *Bm-iAANAT*, are responsible for silkworm melanism mutant. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19553–19560.
- [17] Chen P, Li L, Wang JY, et al. *BmPAH* catalyzes the initial melanin biosynthetic step in *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e71984.
- [18] Chen P, Wang JY, Li HY, et al. Role of GTP-CHI links PAH and TH in melanin synthesis in silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 2015, 567(2): 138–145.
- [19] Biosciences Q. Compositions and methods for cDNA synthesis: US, 08420324. 2013-04-16.
- [20] Li T, Jiang GB, Lv Y, et al. *In vitro* induction of *Bombyx mori* haemolymph melanization by three types of microbes and their cell wall ingredients. *Sci Sericult*, 2015, 41(2): 278–285 (in Chinese).
李田, 蒋贵兵, 吕银, 等. 3种微生物及其胞壁物质体外诱导家蚕血液黑化反应的观察. *蚕业科学*, 2015, 41(2): 278–285.
- [21] Tan J, Xu M, Zhang K, et al. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 2013, 59(6): 595–603.
- [22] Trf W. The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet*, 1987, 24: 127–222.
- [23] Xiang ZH. *Silkworm's Heredity and Breeding*. Beijing: China Agricultural Press, 1991: 228–243 (in Chinese).
向仲怀. *家蚕遗传育种学*. 北京: 中国农业出版社, 1991: 228–243.
- [24] Infanger LC, Rocheleau TA, Bartholomay LC, et al. The role of phenylalanine hydroxylase in melanotic encapsulation of filarial worms in two species of mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34(12): 1329–1338.
- [25] Liu CT, Hou RF, Ashida M, et al. Effects of inhibitors of serine protease, phenoloxidase and dopa decarboxylase on the melanization of *Dirofilaria immitis* microfilariae with *Armigeres subalbatus* haemolymph *in vitro*. *Parasitology*, 1997, 115(Pt 1): 57–68.
- [26] Liu SS, Wang M, Li XC. Overexpression of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase associated with pupal melanization in *Spodoptera exigua*. *Sci Rep*, 2015, 5: 11273.
- [27] Schachter J, Pérez MM, Quesada-Allué LA. The role of *N*- β -alanyldopamine synthase in the innate immune response of two insects. *J Insect Physiol*, 2007, 53(11): 1188–1197.
- [28] Sideri M, Tsakas S, Markoutsas E, et al. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology*, 2008, 123(4): 528–537.
- [29] Wang MX, Cai ZZ, Lu Y, et al. Expression and functions of dopa decarboxylase in the silkworm, *Bombyx mori* was regulated by molting hormone. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(6): 4115–4122.

(本文责编 郝丽芳)