

七星瓢虫的卵黄发生:脂肪体与卵巢中 卵黄原蛋白的合成与分泌

翟启慧 关雪辰 陈娥英 张建中

(中国科学院动物研究所)

摘要 本文利用 [^3H] 亮氨酸参入及特异性抗体沉淀等方法,研究了七星瓢虫体外培养的脂肪体中卵黄原蛋白合成与分泌的动力学,以及不同发育期脂肪体与卵巢中卵黄原蛋白合成的定量变化。脂肪体中卵黄原蛋白的合成与分泌在培养 1—4 小时内直线上升,到 6 小时稍下降。保留在脂肪体内的卵黄原蛋白缓慢积累,但一直水平很低。卵黄原蛋白合成的最初 30 分钟,分泌速率较慢,60% 以上的卵黄原蛋白保留在脂肪体内。1 小时后分泌速率加快,70% 以上的卵黄原蛋白被分泌,保留的卵黄原蛋白在 4 小时中逐渐被释放。在 4 小时,被分泌的卵黄原蛋白超过 80%,最高可达 92%。

在雌虫发育过程中,脂肪体中卵黄原蛋白合成的高峰在羽化后 11—15 天,所合成的卵黄原蛋白占整个发育期合成总量的 80%。在合成高峰期分泌的卵黄原蛋白高达 90% 以上,但在发育的早期和晚期分泌的卵黄原蛋白仅占 30% 或稍多。

卵黄发生前的卵巢就开始合成卵黄原蛋白,但卵巢中卵黄原蛋白的合成高峰期与脂肪体中大致相同。与脂肪体相反,卵巢合成的卵黄原蛋白大部分保留在卵巢内。在卵黄发生盛期,卵巢合成的卵黄原蛋白为脂肪体合成的卵黄原蛋白的 20%。

关键词 七星瓢虫 卵黄发生 卵黄原蛋白合成与分泌 脂肪体 卵巢

昆虫的卵黄发生 (vitellogenesis), 是在激素的调节下,脂肪体合成卵黄原蛋白 (vitellogenin, 以下简称 Vg), 分泌到血淋巴中,再被发育的卵母细胞摄取,沉积为卵黄。因此,卵黄发生是卵成熟的前提,Vg 的合成与分泌又是卵黄发生的关键性环节。过去的资料表明昆虫 Vg 是由脂肪体细胞中粗糙型内质网上的核糖体合成,经加工、修饰后,通过质膜的胞吐作用(exocytosis)分泌到血淋巴中(Engelmann, 1979)。整个过程的机理与高等动物中相同(Tata 和 Smith, 1979)。从定量的角度来看,Vg 的合成与分泌是一个比较复杂的动态过程在开展卵黄发生研究较早的一些昆虫,如伊蚊、飞蝗、马德拉蜚蠊中,都曾进行过这方面的研究(Hagedorn, 1974; Chen 等, 1979; Koeppel 和 Ofengand, 1976),但并不很全面,而且结果也不尽相同。在七星瓢虫中,我们曾对 Vg 在体内及体外的合成进行了不少研究(龚和等, 1980; 1982; Zhai 等 1984a; 翟启慧、张建中, 1984; 张建中、翟启慧, 1985),但尚未系统研究过脂肪体 Vg 合成与分泌的动态关系,以及在发育过程中的变化。本文采用体外培养结合同位素标记和免疫沉淀的方法,研究了卵黄发生盛期脂肪体合成与分泌 Vg 的动力学,以及不同发育期脂肪体合成与分泌 Vg 的定量变化。

昆虫 Vg 的传统定义中很重要的一点是,这种蛋白是在卵巢外组织中合成的,脂肪体是其唯一来源(Hagedorn 和 Kunkel, 1979)。但是近年来已经证明在果蝇中卵巢也和脂

本文于 1984 年 2 月收到。

李福兴同志参加部分技术工作,特此致谢。

肪体一样能产生 Vg (Bownes, 1982), 并已确定滤泡细胞是 Vg 在卵巢中的合成部位 (Brennan 等, 1982)。除了果蝇以外, 在七星瓢虫中卵巢本身也能合成 Vg。我们观察到, 彻底摘除了脂肪体的卵巢在离体条件下可合成 Vg 并释放到培养液中。卵巢及其培养液电泳和放射自显影图谱与脂肪体及其培养液的图谱很不相同, 表明不可能是由于脂肪体的沾污 (Zhai 等, 1984a)。此外, 我们曾将刚羽化雌虫的卵巢或其一部分卵巢管在仔细摘净脂肪体后植入雄虫腹腔, 卵母细胞可发育并沉积卵黄。在雄虫体内发育的卵母细胞可在离体条件下进行 Vg 合成, 而受体雄虫的脂肪体则不能合成 Vg, 其血淋巴中也检测不出 Vg (Zhai 等, 1984b)。在此基础上我们对不同发育期卵巢中 Vg 的合成进行了定量测定, 以阐明卵巢合成 Vg 的变化, 并与脂肪体的合成进行比较, 弄清二者在卵黄发生中的相对作用。

材料与 方法

一、实验材料

1982 年 5 月下旬与 1983 年 4 月中旬分别从北京郊区与云南昆明地区麦田采集七星瓢虫第一代蛹。在室内羽化后, 选择同一天羽化的成虫, 分组于 25℃ 左右室温下以菜蚜饲养。

二、脂肪体及卵巢的体外培养

在冷的七星瓢虫生理盐水 (翟启慧、张建中, 1984) 中小心地解剖出连在雌虫腹部背片表皮上的脂肪体及埋藏在其中的卵巢, 摘去其他各种组织。将卵巢从脂肪体中取出, 特别仔细地将附着在卵巢管上的脂肪体全部摘除干净。脂肪体与卵巢均用生理盐水洗净, 分别放在每微升含 1 微居里 [^3H] 亮氨酸 (比活 52 居里/毫克分子, 上海原子核研究所) 的培养液中保温。培养液按 Grace (1962) 配制, 但不含非放射性亮氨酸。在 26—27℃ 培养一定时间后, 按下述方法测定 Vg 中的放射性参入量。一般每 5 个脂肪体或 5 对卵巢用培养液 100 微升。

三、合成与分泌的卵黄原蛋白的测定

培养后, 组织中及其培养液中的 Vg 分别用免疫沉淀方法分离, 然后测定其中 [^3H] 亮氨酸的参入。组织中 Vg 的放射性表示保留在组织内的 Vg 的量, 培养液中 Vg 的放射性代表分泌的 Vg 的量, 两者之和为合成的 Vg 的总量。具体步骤如下:

培养完毕, 取出组织反复洗净, 制成匀浆, 离心后, 取表面脂层下的清液, 加入适量提纯的 Vg 作为载体, 以及抗卵黄蛋白血清 (龚 和等, 1980), 对照加正常兔血清。在 37℃ 水浴中保温 1 小时, 放置冰箱中过夜。培养液也进行同样反应。所得 Vg 的免疫沉淀物或按张建中、翟启慧 (1985) 描述的方法, 先用缓冲液反复洗净后, 用 0.5N NaOH 溶解, 1N HCl 中和, 在含 Triton X-100 的甲苯闪烁液中进行计数。或者先将沉淀用 0.5N NaOH 溶解, 1N HCl 中和, 取一定量点滴在 Whatman 3mm 滤纸小片上, 凉干后经过含 0.01M 亮氨酸的冷 10% 三氯乙酸、90℃ 5% 三氯乙酸、冷 5% 三氯乙酸、95% 乙醇、乙醚相继处理。待滤纸干燥后, 在对-联三苯 (*p*-terphenyl) 闪烁液中, 用 LKB 液闪计数器测定放射性。

本文结果为 2—5 次重复实验的平均值, 每次实验用 5—10 头同一发育期雌虫的脂肪

体或卵巢。

结 果

一、脂肪体中卵黄原蛋白合成与分泌的规律

为了揭示七星瓢虫雌虫脂肪体合成与分泌 Vg 的特点与规律,我们以卵黄发生盛期(羽化后 10 天左右)的雌虫为材料,进行了以下三方面的实验:

1. 将脂肪体在含 [³H] 亮氨酸的培养液中进行培养,每隔 1 小时取出培养液,测定 Vg 中放射性的参入。每次取出培养液后再加入新的培养液,将脂肪体继续培养。如此测得每小时脂肪体向培养液所分泌 Vg 的量,并在此基础上计算出脂肪体分泌 Vg 的速率。其结果如图 1 所示。在 1—4 小时之间,脂肪体所分泌的 Vg 随时间而直线增加,到 6 小时增长速率略为下降。

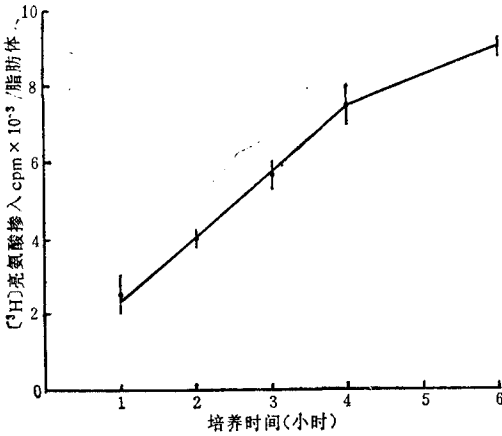


图 1 [³H] 亮氨酸参入脂肪体培养液中 Vg 的动力学

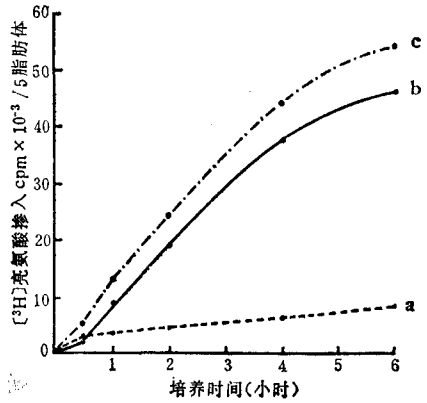


图 2 脂肪体合成与分泌 Vg 的动力学
a. 保留在脂肪体内的 Vg b. 分泌到培养液中的 Vg c. 脂肪体内的和培养液中的 Vg 总和

2. 将脂肪体在含放射性氨基酸的培养液中标记不同时间后,分别测定保留在脂肪体内和分泌到培养液中的 Vg 放射性,将两者相加得到脂肪体合成 Vg 的总量,代表脂肪体合成 Vg 的能力(图2)。脂肪体内保留的 Vg(图 2-a)随时间而缓慢积累,但始终保持在一个低水平。培养液中 Vg 的变化(图 2-b)与图 1 的结果一致。脂肪体合成 Vg 的总量(图 2-c)和被分泌的 Vg (图 2-b)相比,两者的规律相似。

图 3 是不同时间脂肪体保留的 Vg 和分泌的 Vg 各占总合成 Vg 的百分率。由图 3 可见在 30 分钟内所合成的 Vg 大部分(60% 以上)仍保留在脂肪体内,只有不到 40% 被分泌。到 1 小时,情况则相反,培养液中的放射性 Vg 多于脂肪体中的放射性 Vg,合成的 Vg 中有 70% 以上被分泌,保留在脂肪体内的 Vg 不足 30%。随着培养时间的延长,分泌的 Vg 继续增加,到 4 小时,合成的 Vg 中 80% 以上被分泌,最高可达 92%。但到 6 小时,分泌的 Vg 的百分率又略为下降。

3. 将脂肪体在含放射性氨基酸的培养液中标记一定时间后,再放在不含放射性的培养液中追踪。每隔 1 小时取出培养液,测定从脂肪体释放出来的放射性 Vg (图 4)。由图 4

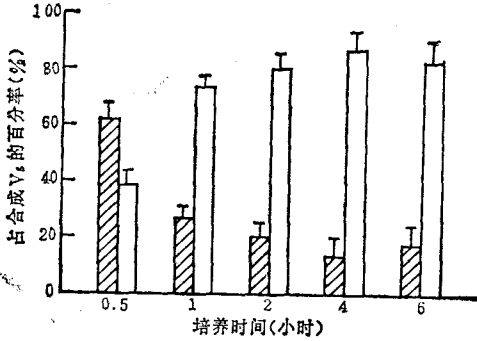


图3 培养不同时间脂肪体内 Vg 和培养液中 Vg 各占总合成 Vg 的百分率
 ▨ 脂肪体 Vg □ 培养液 Vg

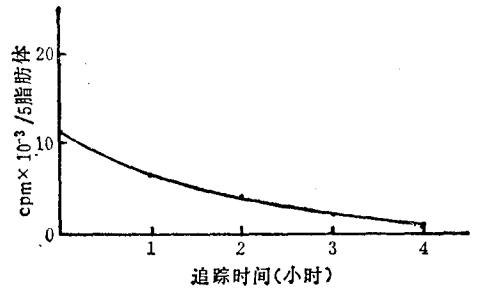


图4 脂肪体标记 1 小时后追踪 4 小时，Vg 的释放情况

可以看到积累在脂肪体内的 Vg 在长达 4 小时的过程中逐渐被释放。标记 2、4、6 小时后再进行追踪，脂肪体内放射性 Vg 的释放规律也基本相似。

综合以上结果来看，七星瓢虫脂肪体合成 Vg 后并不全部分泌。合成开始时，分泌速率较慢，合成的 Vg 大部分保留在细胞内。积累到一定量后，分泌速率大大加快，在合成的高峰阶段，被分泌的 Vg 可占合成 Vg 的 90% 以上。在体外培养条件下，脂肪体合成与分泌 Vg 的速率在 4 小时内均直线上升。积累在细胞内的 Vg 在一段较长的时间内缓慢被释放。

二、不同发育期雌虫脂肪体中卵黄原蛋白的合成与分泌

我们将羽化后不同天数的雌虫脂肪体在含 [³H] 亮氨酸的培养液中标记一定时间后，分别测定了脂肪体及培养液中 Vg 的放射性。结果见图 5。由图 5 可以看到，雌虫羽化后 3 天，脂肪体中就可测出 Vg 合成，但此时所合成的 Vg 大部分保留在细胞内，被分泌到培养液中的 Vg 较少。羽化后 5 天，Vg 合成明显上升，同时分泌也随之加强，所合成的 Vg 大部分被分泌。此后，Vg 合成短暂下降。到 9 天以后进入卵黄发生盛期，Vg 大量合成，11—15 天为合成高峰，Vg 分泌也同时出现高峰。高峰期所合成与分泌的 Vg 占整个发育期总量的 80%。20 天后 Vg 合成与分泌均急剧下降。到 27 天时，Vg 合成降到很低的水平，而且所合成的 Vg 大部分保留在细胞内。总的来看，在羽化后不同发育期脂肪体中 Vg 合成与分泌的变化规律基本上是一致的。保留在脂肪体内的 Vg，除第 5 天有一小峰外，一直保持在稳定的低水平。

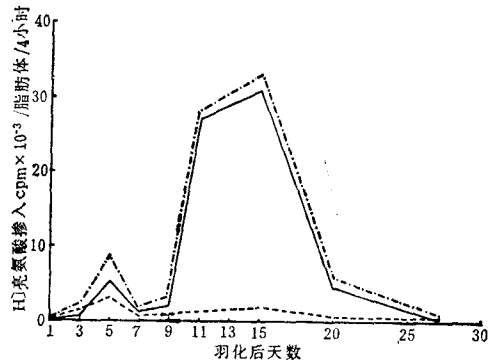


图5 不同发育期雌虫脂肪体中 Vg 的合成与分泌
 --- 脂肪体内 Vg ——— 培养液中 Vg
 -·-·- 脂肪体内 Vg 与培养液中 Vg 之和
 注：上图纵坐标中的 H 应改为 [³H]

根据以上结果可以看到，分泌 Vg 占总合成 Vg 的百分率在卵黄发生过程中有很大变化 (图 6)。在羽化后 3 天 Vg 合成刚开始时，分泌的 Vg 仅占 30%，5 天以后分泌的 Vg 增加到 60% 以上，在 11—15 天合成高峰期，分泌的 Vg 高达 90% 以上。到 20 天当 Vg

合成急剧下降时,分泌 Vg 的百分率并无明显减少。最后 Vg 合成很低时,分泌 Vg 的百分率也大幅度下降到合成开始时的水平。

三、卵巢中的卵黄原蛋白合成

我们将羽化后不同发育期的卵巢在与脂肪体相同的条件下进行体外培养和同位素标记,然后测定其中 Vg 的合成。图 7 的结果表明,在发育的不同阶段,卵巢中 Vg 合成的变化规律与脂肪体中(参看图 5)很不相同。最主要的差别是卵巢中所合成的 Vg 大部分保留在组织内,只有一小部分(约 20% 左右)释放到培养液中。其次,卵巢中 Vg 的合成在 9—13 天较高,但总的来看,没有非常突出的高峰,这也和脂肪体中 Vg 合成的规律明显不同。此外,卵巢所合成 Vg 的量也比脂肪体所合成的少得多。在羽化后 13 天的雌虫中,卵巢所合成的 Vg 仅为脂肪体所合成 Vg 的 20%。

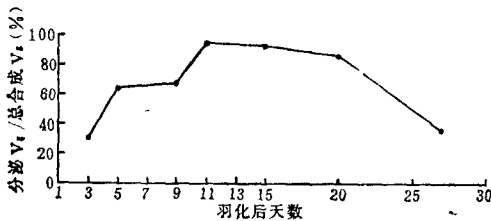


图 6 不同发育期雌虫脂肪体分泌的 Vg 占总合成 Vg 的百分率

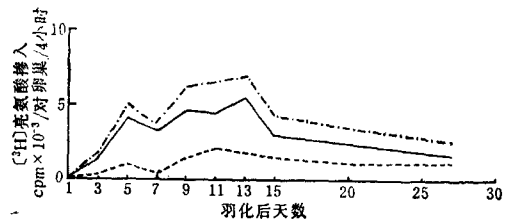


图 7 不同发育期卵巢中 Vg 合成的变化
 ----- 卵巢中的 Vg ———— 培养液中的 Vg
 - · - · - 卵巢中及培养液中 Vg 总和

讨 论

昆虫 Vg 的合成与分泌是一个比较复杂的动态过程。在体内, Vg 的合成与分泌和卵母细胞对 Vg 的摄取同时进行。要弄清 Vg 合成与分泌的动态变化,只能采用体外培养方法(翟启慧、张建中, 1984)。将我们用体外方法所得到的七星瓢虫 Vg 合成与分泌的规律,同其他昆虫中体外的结果相比较,显然在不同的种类中其规律不完全相同,在伊蚊中,脂肪体 Vg 合成速率在 1 小时内达到稳定,标记的 Vg 在大约相同的时间内全部分泌,因此,这种昆虫的脂肪体合成 Vg 后并不贮存(Hagedorn, 1974)。在七星瓢虫中则不同,合成进行 1 小时,70% 多的 Vg 被分泌,还有将近 30% 的 Vg 积累在脂肪体中,后者在 4 小时的过程中才逐渐全部释放。因此,合成的 Vg 有一部分被保留在脂肪体中一段时间。

脂肪体合成与分泌 Vg 的一个特点,是在合成开始阶段,大部分的 Vg 被保留在细胞内, Vg 的分泌有一个延缓期。经过一段时间,当脂肪体内积累了一定量的 Vg 后,分泌速率加大,被分泌的 Vg 就大大超过被保留的 Vg。这种规律看来是普遍存在的,在飞蝗(Chen 等, 1979) 和马德拉蜚蠊(Koeppe 和 Ofengand, 1976) 中也都有类似现象。在七星瓢虫整个发育过程中脂肪体 Vg 分泌的变化也符合以上规律,分泌 Vg 占合成 Vg 的百分率随合成能力的大小而增减。

七星瓢虫的卵巢在体外合成的 Vg 有一部分被释放到培养液中。这和 Postlethwait 等(1980) 在果蝇中所得到的结果相同。他们推测在活体内卵巢合成 Vg 后也先分泌到血淋巴中,然后被卵母细胞摄取。然而 Bownes (1982) 认为,果蝇卵巢在体外分泌 Vg 到培

养液是培养条件下的一种人为假象。在七星瓢虫中后一种可能性较大,因为在植入了卵巢的雄虫血淋巴中不能测到 Vg (Zhai 等, 1984b), 说明在活体内卵巢合成的 Vg 并不被分泌。

七星瓢虫卵巢中 Vg 合成开始于卵黄沉积之前。雌虫羽化后 3 天, 卵巢中即可测到低水平的 Vg 合成。在果蝇中也观察到卵黄发生前的卵室能合成 Vg (Isaac 和 Bownes, 1982)。但在这两种昆虫的卵巢中最高 Vg 合成都是在卵黄发生盛期。在果蝇中卵巢和脂肪体所合成的 Vg 的量大致相等 (Isaac 和 Bownes, 1982)。而七星瓢虫卵巢合成的 Vg 仅为脂肪体所合成 Vg 的 1/5, 因此, 卵巢只是一个次要的 Vg 来源。

七星瓢虫是迄今除果蝇外被证明卵巢也能合成 Vg 的唯一昆虫。还有许多问题, 如卵巢中哪一类细胞是 Vg 合成的部位、卵巢中 Vg 合成受哪一种激素调节等, 尚待深入研究。

参 考 文 献

- 龚 和等 1980 七星瓢虫的卵黄发生: 卵黄原蛋白的发生和取食代饲料的影响。昆虫学报 23(3): 252—9。
- 龚 和等 1982 七星瓢虫卵黄原蛋白的合成。动物学集刊 2: 175—81。
- 翟启慧、张建中 1984 七星瓢虫的卵黄发生: 体外培养的脂肪体中卵黄原蛋白的合成。昆虫学报 27(4): 361—7。
- 张建中、翟启慧 1985 七星瓢虫的卵黄发生: 保幼激素类似物对卵黄原蛋白合成的调节。昆虫学报 28(2): 121—8。
- Bownes, M. 1982 Hormonal and genetic regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *Quart. Rev. Biol.* 57: 247—74.
- Brennan, M. D. et al. 1982 The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 89: 225—36.
- Chen, T. T. et al. 1979 Juvenile hormone-controlled vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body. Hormonal induction *in vivo*. *Dev. Biol.* 69: 59—72.
- Engelmann, F. 1979 Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.* 14: 49—108.
- Hagedorn, H. H. 1974 The control of vitellogenesis in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Amer. Zool.* 14: 1207—17.
- Hagedorn, H. H. and Kunkel, J. G. 1979 Vitellogenin and vitellin in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 24: 475—505.
- Isaac, P. G. and Bownes, M. 1982 Ovarian and fat body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Biochem.* 132: 527—34.
- Koeppe, J. and Ofengand, J. 1976 Juvenile hormone-induced biosynthesis of vitellogenin in *Leucophaea maderae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 173: 100—13.
- Postlethwait, J. H. et al. 1980 Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 79: 379—87.
- Tata, J. R. and Smith, D. F. 1979 Vitellogenesis: A versatile model for hormone regulation of gene expression. *Recent Progress in Hormone Research* 35: 47—95.
- Zhai, Qi-hui et al. 1984a Vitellogenin synthesis in the lady beetle *Coccinella septempunctata*. *Insect Biochem.* 14(3): 299—305.
- Zhai, Qi-hui et al. 1984b Ovaries implanted in male lady beetles synthesize vitellogenin. *XVII Int. Congress Entomol. Abst. vol. p. 273.*

ON THE VITELLOGENESIS OF *COCCINELLA SEPTEMPUNCTATA*:
SYNTHESIS AND SECRETION OF VITELLOGENIN BY THE FAT
BODY AND THE OVARY

ZHAI QI-HUI, GUAN XUE-CHEN, CHEN E-YING, ZHANG JIAN-ZHONG

(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

The kinetics of vitellogenin (Vg) synthesis and secretion by the fat body and the quantitative changes of Vg synthesis in the fat body and the ovary during adult development of the female lady beetle *Coccinella septempunctata* have been studied by measuring the [³H] leucine incorporation *in vitro* after specific antibody precipitation. In vitellogenic females, Vg synthesis and secretion by the fat body showed a quick linear increase for 4 hr, whereas the Vg retained in the tissue accumulated slowly and remained at a low level. The percentage of Vg secreted by the fat body was less than 40% at 30 min and increased to a maximum of about 90% by 4 hr. Most of the Vg retained in the fat body was secreted during a chase of 4 hr.

In normal development, Vg synthesis by the fat body was maximal at 11–15 days after adult emergence. The Vg synthesized in this period accounted for 80% of the total Vg synthesized during adult life. At the time of maximal Vg synthesis, more than 90% of the newly synthesized Vg was secreted. In the early and later stages of development, only 30% or more Vg was secreted after synthesis.

Ovaries of previtellogenic stages can synthesize Vg, but the maximal level of Vg synthesis occurred in ovaries of the active vitellogenic stages. Contrary to the fat body, the ovaries retained most of the Vg synthesized. In active vitellogenic females, the Vg synthesized in the ovary was about 20% of that made in the fat body. Thus the ovary is a minor site of Vg synthesis in this species.

Key words *Coccinella septempunctata*—vitellogenesis—vitellogenin synthesis and secretion—fat body—ovary