

AChE 在水稻抗性诱导的褐飞虱凋亡中 肠细胞中的定位及表达

王斯奇¹, 陈俊², 章娟娟¹, 杨之帆^{1,*}

(1. 湖北大学生命科学学院, 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心, 武汉 430062;

2. 武汉科技大学化学工程与技术学院, 武汉 430081)

摘要:【目的】褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是水稻的重要害虫之一。本研究旨在了解水稻品种抗性诱导的褐飞虱中肠细胞凋亡与细胞中乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 的关系。【方法】从 4 龄 I 型褐飞虱若虫中肠组织分离原代细胞, 用不同抗性的水稻幼苗汁液处理第一代继代细胞, 利用 TUNEL 染色法检测细胞的凋亡情况, 再分别利用免疫组织化学和荧光定量 PCR 技术对 AChE 进行亚细胞定位和检测其表达水平的变化。【结果】在对照组 (未处理) 细胞中, 检测不到代表凋亡细胞核的绿色荧光, 而免疫组化后阳性反应颜色很浅, 表明细胞中存在 AChE 的本底水平表达。感虫水稻品种 TN1 幼苗汁液处理细胞中, 细胞的凋亡率为 8%, 抗性水稻 B5 幼苗汁液处理的细胞中有 65% 的细胞发生凋亡; 而抗性水稻 TKM-6 幼苗汁液处理的细胞中则有 85% 的细胞发生凋亡。免疫组化的检测结果表明, 所有凋亡的细胞中都存在 AChE 的积累, 且主要分布在细胞质中; AChE 在凋亡后期并不迁入凋亡小体中, 而是集中在细胞核附近。荧光定量 PCR 检测表明, TKM-6, B5 和 TN1 幼苗汁液处理的细胞中 AChE 的表达量分别为对照细胞的 29.9, 18.4 和 8 倍, 该结果与细胞水平上免疫组化的检测结果一致。【结论】本研究结果证实了水稻品种抗性与其诱导的中肠细胞凋亡率呈正相关, 且凋亡细胞的细胞质中存在 AChE 的积累。这些发现为揭示 AChE 在褐飞虱与水稻的互作中的功能、促进抗性水稻新品种的选育及开发新的褐飞虱防治措施提供了一定的参考信息。

关键词: 褐飞虱; 乙酰胆碱酯酶; 中肠细胞凋亡; 细胞免疫组化; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2016)10-1033-10

Location and expression of AChE in apoptotic midgut cells of *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) induced by host rice resistance

WANG Si-Qi¹, CHEN Jun², ZHANG Juan-Juan¹, YANG Zhi-Fan^{1,*} (1. Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-Resources, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China; 2. College of Chemical Engineering and Technology, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract:【Aim】The brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, is one of the most destructive pests of rice. This study aims to investigate the relationship between acetylcholinesterase (AChE) and the apoptosis in midgut cells of *N. lugens* induced by host rice resistance.【Methods】Primary cells were isolated from the midgut of the 4th instar nymph (biotype I) of *N. lugens*. The first-generation subculture cells were treated with juice from rice seedlings with different resistance levels. Subcellular localization and expression of AChE were detected by using cell immunohistochemistry and real-time

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500328, 31071679, 31272050, 31301675)

作者简介: 王斯奇, 女, 1991 年 11 月生, 湖北仙桃人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: 943727201@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sailyangzhf@hubu.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-08-10; 接受日期 Accepted: 2016-09-20

fluorescence quantitative PCR techniques, respectively. 【Results】 No green fluorescent signals representing apoptotic nuclei were detected in the untreated control cells, but these cells exhibited few signals in immunohistochemistry reaction, suggesting a basal expression level of AChE within the cells. The cells treated with the juice from seedlings of the susceptible rice variety TN1 and two resistant rice varieties B5 and TKM-6 displayed apoptosis with the apoptotic rate of 8%, 65% and 85%, respectively. Immunohistochemistry reaction revealed that all apoptotic cells showed stronger signals representing overexpression and accumulation of AChE in the cytoplasm. AChE assembled around the nuclei instead of shifting to apoptotic bodies in the late apoptotic stage. The data from real-time fluorescence quantitative PCR showed 29.9-, 18.4- and 8-fold over-expression of AChE in cells treated with the juice from seedlings of TKM-6, B5 and TN1, compared with that in the control cells, which was consistent with the results from the immunohistochemistry detection. 【Conclusion】 The results confirm that host rice resistance is positively correlated with apoptosis in midgut cells of *N. lugens*, and AChE is overexpressed in apoptotic cells. These findings provide some valuable information for understanding the interaction mechanism of *N. lugens* and host rice, promoting breeding of novel resistant rice varieties and developing effective control strategies.

Key words: *Nilaparvata lugens*; acetylcholinesterase (AChE); midgut apoptosis; cell immunohistochemistry; real-time fluorescence quantitative PCR

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 属半翅目 (Hemiptera) 飞虱科 (Delphacidae), 是我国中、南部稻区的主要水稻害虫之一。褐飞虱的成虫和若虫都群集在稻株下部为害, 用刺吸式口器刺进稻株组织, 吸食汁液。受害稻苗叶尖发黄, 并发展到全叶发黄; 最后茎下部变黑褐色腐烂, 全叶变枯。受害稻田严重时, 先从田间出现一个个黄塘, 俗称“冒顶”, 然后连接成片, 直至全田枯黄。另外, 褐飞虱刺破的伤口, 还有利于菌核病和纹枯病的发生 (Rubia-Sanchez *et al.*, 1999)。因此, 褐飞虱在田间大规模发生时严重影响水稻的产量, 甚至导致绝收。在防治方面, 除了采取适合的农业耕作、水肥管理措施外, 直接而有效的方法就是化学防治, 但长期的化学农药的施用也带来了严重的后果: 一方面容易造成环境污染、稻田生态系统的破坏以及稻米的农药残留; 另一方面会导致抗药性褐飞虱的再猖獗。长期以来, 农业科技工作者坚持田间选育与推广抗虫性水稻新品种, 但褐飞虱致害性变异较快, 很容易适应新品种, 这一定程度上造成抗性水稻的推广和应用受到制约 (Yang *et al.*, 2011)。加强对褐飞虱基础生物学的研究, 可以为寻求有效而环保的治理措施提供线索。

乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 具有羧肽酶和氨肽酶的活性, 是动物体内神经传导中的一种关键酶, 其经典功能是快速水解神经递质乙酰胆碱, 保证神经信号在生物体内正常传递。此外, AChE 的非经典功能包括参与细胞的发育和成熟,

促进神经元发育和神经再生 (Behra *et al.*, 2002), 以及参与细胞凋亡过程 (Zhang *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2011)。最近, 张学军实验室的研究人员证实, 在细胞凋亡过程中, AChE 首先进入细胞核, 而后作为凋亡脱氧核糖核酸酶 (DNase) 而起作用 (Du *et al.*, 2015)。AChE 在有 Ca^{2+} - Mg^{2+} 的生理 pH 条件下, 能够切割裸露的 dsDNA, 也能切割预固定和凋亡细胞中的染色体 DNA。该活性不受 caspase 抑制剂的影响, 因而是 CAD (caspase-activated DNase) 和 EndoG (endonuclease G) 不依赖的作用方式 (Du *et al.*, 2015)。

在昆虫中我们更应该关注 AChE, 不仅是因为此酶是杀虫剂的直接靶标酶, 而且 AChE 基因的突变或异常表达可能是产生抗药性的原因之一, 与害虫的抗药性治理密不可分 (Wu *et al.*, 2010; 林璐璐等, 2014), 还与细胞凋亡进程密不可分。鉴于中肠组织是褐飞虱与水稻互作的重要界面, 证实 AChE 参与中肠细胞凋亡进程, 则可以在褐飞虱与水稻的协同进化、抗性水稻新品种的选育以及褐飞虱的科学治理方面获得全新的认识和一些有价值的参考信息。

为此, 本研究用感虫水稻 TN1、抗虫水稻 B5 和 TKM-6 幼苗汁液分别处理褐飞虱的中肠细胞, 检测细胞的凋亡率, 并初步研究了 AChE 在凋亡细胞中的表达水平变化、在亚细胞水平的定位以及与细胞凋亡的关系。研究结果为进一步了解 AChE 在褐飞虱与水稻互作中的功能及开发基于 AChE 的防控新举措奠定了一定的基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 褐飞虱:褐飞虱(生物型 I)初始种群由武汉大学何光存教授馈赠,已在本实验室连续饲养多代,饲养在感虫水稻品种台中 1 号(TN1)植株上,水稻培养条件:温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度为 80%,光周期 16L:8D,光强度 4 000 lx。

1.1.2 供试水稻:感虫水稻(TN1)种子、抗虫水稻(TKM-6 和 B5)种子避光于 37°C 浸泡催芽,待苗长至 3~4 cm 的长度,用解剖刀切取苗的部分,每种水稻分别收集 10 g 苗,无菌水冲洗干净,用灭菌的研钵进行研磨,用灭菌的纱布过滤匀浆,收集于 1.5 mL EP 试管中,用 EX-CELL 420 昆虫细胞无血清培养基稀释 10 倍使用。

1.1.3 试剂:EX-CELL 420 昆虫细胞无血清培养基为 Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 产品;胎牛血清、庆大霉素、青霉素和链霉素均为 Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA) 产品;同翅目生理缓冲溶液(homopteran physiological solution, HPS)参考 Li 等(2015)配制,稍作修改:178 mmol/L NaCl, 4.3 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L CaCl_2 , 3.8 mmol/L NaHCO_3 , 0.5% 庆大霉素, 0.01% 青霉素和 0.01% 链霉素。免疫组化试剂盒 SABC 即用型(SA1022)、褐飞虱 AChE 单克隆抗体(订制)、DAB 显色试剂盒(AR1022)均为武汉博士德生物工程有限公司(Boster Bioengineering Co., Ltd., 武汉)产品;苏木精(hematoxylin)染料、Hoechst33342、抗荧光猝灭封片液(P0126)、免疫染色固定液(P0098)、免疫染色洗涤液(P0106)、一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(C1088)、细胞凋亡与坏死检测试剂盒(C1056)均为碧云天生物技术公司(Beyotime Biotechnology, 江苏)产品;PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (AK2701)为宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa Biomedical Technology Co., Ltd, 大连)产品;分散酶(dispace II, neutral protease, grade II)为罗氏公司(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)产品。

1.1.4 仪器:细胞筛网(40 μm cell strainer)(Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA);Nano Drop 2000 型分光光度计(Thermo, Wilmington, USA);OLYMPUS BX51 荧光显微镜(Olympus, Tokyo, Japan);CFX Connect Real-Time System 荧光定量

PCR 仪(BIO-RAD, Hercules, CA, UAS)。

1.2 褐飞虱中肠细胞系的建立

选取 40 头 4 龄健康若虫饥饿 6 h 以排空消化道内容物,用含 1% NaClO_3 的 70% 乙醇浸泡 1 min,随后用无菌水冲洗 5 次,在体式显微镜下小心解剖出完整消化道,去除前端叉状部分(分叉的一枝连唾液腺,另一枝连口咽部位)及后端含马氏管的部分,中间的中肠部分置于六孔板中并加入含 0.001% NaClO_3 的 HPS 缓冲液漂洗 1 min,依次经过六孔板上 6 个含 HPS 缓冲液的细胞培养孔清洗 1 次,以尽可能去除血细胞及肠道污染物。清洗好的中肠转置于 1.5 mL Eppendorf (EP)管中。用 HEPES-buffered saline(50 mmol/L HEPES/KOH pH 7.4, 150 mmol/L NaCl)溶解分散酶 II 至 10 U/mL,用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤除菌。在 200 μL 反应体系中加入 20 μL 稀释好的分散酶 II,混匀后于 37°C 进行酶解 30 min,酶液经 40 μm 细胞筛网过滤以除去中肠底膜组织,将收集的细胞滤液以 $200 \times g$ 离心弃去上清,即获得分离的中肠细胞,于 18°C 用无血清的培养基清洗 4 次,最后悬浮于 2 mL 含 15% 血清、50 units/mL 的青霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的培养基中,转入六孔板置于 28°C 恒温培养。用常规稀碘液(碘化钾)染色法于光学显微镜下观察细胞的形状及大小。每周用 1 mL 新鲜培养基置换出一半旧的培养基。当细胞密度达到 90%~95% 时,用移液器小心吸出细胞转到 T25 培养瓶中,用新鲜培养基稀释并调整体积至 5 mL,使细胞密度达到 2.5×10^4 cell/mL,继续于 28°C 继代培养。每隔 20 d 继代一次,取第 2 代细胞进行后续实验。

1.3 免疫组化检测细胞中的 AChE 和 TUNEL 检测细胞凋亡

将圆形防脱玻片置于六孔板细胞培养孔底部,按 2.5×10^4 cells/mL 密度接种中肠细胞,避光培养以便使细胞粘附于玻片上(即细胞爬片),15 d(期间换新鲜培养基一次)后待贴壁细胞密度达 80%,向不同培养孔中分别加入 100 μL 的 TN1, B5 或 TKM-6 水稻幼苗汁液,留一组不做处理作空白对照,培养 1 d 后用镊子取出玻片,于室温晾干。用 PBS(pH 7.4)轻缓洗涤 3 次,每次 2 min,接着用 4% 多聚甲醛固定 15 min,随后置于空气中干燥 5 min,再用 PBS 洗涤 3 次,每次 2 min。将 0.3% Triton X-100(用 PBS 配制)覆盖于固定的细胞上,以防脱片,先于室温孵育 20 min,后用 PBS 清洗 3 次,每次 2 min。用 3% H_2O_2 处理 15 min,接着用 PBS 洗

3 次,每次 2 min。取免疫组化试剂盒中的封闭血清覆盖样品并孵育 20 min,之后加一抗(用 PBS 缓冲液按 1:1 000 稀释)于 4℃ 孵育过夜,然后 PBS 洗 3 次,每次 2 min。加二抗于 37℃ 孵育,30 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。最后用 DAB 显色试剂盒进行避光显色 8 min,无菌水洗 5 min 后转入六孔培养板中。依次用 Mayer 苏木素染液(冯清林等,2010)复染 15 s,0.1% 盐酸酒精分化 5 s,无菌水冲洗反蓝。再依次放入 75%,80%,85%,95% 和 100% 酒精中脱水,取出玻片后晾干。随后在每个玻片样品上加 50 μ L 的 TUNEL 检测液,于 37℃ 避光孵育 60 min,PBS 洗 3 次之后加 10 μ L 的 Hoechst33342 染色液(用 PBS 配成 100 μ g/mL 的溶液),冰浴 30 min,PBS 洗 3 次。用抗荧光猝灭封片液封片后置于荧光显微镜下观察。对一张玻片的同一个视野,在相同的放大倍数和不同波长的光照下分别观察拍照:首先在普通光源下进行细胞免疫组化的检测,接着用蓝光(480 nm)激发以观察 TUNEL 反应的结果,最后用紫外光(346 nm)激发样品中的 Hoechst33342 以观察并确定细胞核的位置。每个样品观察统计 4 个视野的细胞,得到 4 组数据,按下列公式计算凋亡指数:凋亡指数(AI) = 凋亡细胞数/(凋亡细胞数 + 正常细胞数)。

1.4 AChE 基因的 RT-PCR 检测

在六孔细胞培养板中按 2.5×10^4 /孔的密度接种细胞,避光培养 15 d(期间换新鲜培养基一次)后待贴壁细胞密度达到 80%,向不同培养孔中分别加入 100 μ L 的 TN1, B5 或 TKM-6 水稻幼苗汁液,留一组不做处理作空白对照,培养 1 d 后收集细胞并提取总 RNA。每个培养皿加入 1 mL 的 Trizol,冰上放置并用移液器吸头轻缓吹散细胞,按照 Trizol Reagent 说明书进行总 RNA 的提取。用 Nano Drop 测定总 RNA 的纯度及含量,确定 OD_{260}/OD_{280} 处于 1.9 ~ 2.1 之间及 $OD_{260}/OD_{230} = 2.0$ 的 RNA 样品留作后续实验。去除总 RNA 中残留基因组 DNA 的反应:体系中加入 4 μ L 总 RNA、5 \times Reaction Buffer 2.0 μ L、gDNA Eraser 1.0 μ L、RNase Free ddH₂O 3.0 μ L,混匀后置于 42℃ 恒温条件下反应 2 min。向上述 10 μ L 样品中加入 5 \times PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) 4 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix 1 μ L, RT Primer Mix 1 μ L, RNase Free ddH₂O 4 μ L。轻缓混匀后于 37℃ 水浴孵育 15 min,85℃ 金属浴变性 5 s,合成的总 cDNA 于 -80℃ 冰箱中保存。根据褐

飞虱 type 2) 的 mRNA (GenBank 登录号: JN688930.1) 序列,以及褐飞虱的肌动蛋白(β -actin)的 mRNA (GenBank 登录号: EU179847.1),利用 Beacon Designer 8 设计荧光定量检测引物。其中 AChE 的正向引物为 AChE-F(5'-CCGTCATCATCAAGATAAG C-3'),反向引物为 AChE-R(5'-CTACTATTACATCA CTGGAAGAAG-3');肌动蛋白(β -actin)基因的正向引物为 actin-F(5'-CCCCTCCACAATGAAGATCAAG-3'),反向引物为 actin-R(5'-GTTGGAAGGTGGAGAG GGAAG-3')。反应体系为 25 μ L: RNase Free 8.5 μ L、SYBR 12.5 μ L、上下游引物各 1 μ L、cDNA 2 μ L。反应程序:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火延伸共 30 s,进行 40 轮循环。记录溶解曲线,并采用相对定量法计算 AChE 表达量的变化。

1.5 数据统计分析

每组样品的 4 次重复数据的统计结果采用平均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,利用 Excel 进行计算。实时定量 PCR 检测的 AChE 表达水平采用相对定量法,依据各样品的 3 次重复结果及其对应的 Ct 值,参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) 方法计算 AChE 表达量的变化。

2 结果

2.1 褐飞虱中肠细胞的分离及继代培养

可以观察到刚分离的中肠细胞呈椭圆形、梭形或不规则形,3 h 后 85% 的细胞可以贴壁,表明存活率较高;30 d 以后细胞长满培养板孔底(细胞密度达到 90% ~ 95%),将细胞转入 T25 培养瓶继续于 28℃ 培养。原代细胞培养 30 d,此后每隔 20 d 继代一次。第 2 代(50 d)细胞存活率为 80%,细胞生长整齐,大小(20 ~ 25 μ m)和形态(椭圆形)基本一致(其中存在极少量的 3 ~ 5 个细胞聚集在一起的细胞团),适合用作实验材料。随着继代次数的增加细胞存活率逐渐下降,第 5 代(90 d)的细胞存活率依然可达 50%。刚分离的中肠细胞可通过细胞的形态特征和大小进行区分,其中杯状细胞最大,长度可达 30 ~ 40 μ m,宽度最宽达 20 ~ 30 μ m;其次为柱状细胞,长度达 20 ~ 30 μ m,宽度达 15 ~ 20 μ m,少数细胞以 2 到多个细胞团的形式存在;再次为干细胞或称再生细胞,直径多为 10 ~ 15 μ m。从结构上看,杯状细胞则为一头尖的高脚杯形状,柱状细胞多为椭圆形或长方形,而再生细胞多为圆形(图 1)。在继代培养后,大部分中肠细胞变成椭圆形或者圆

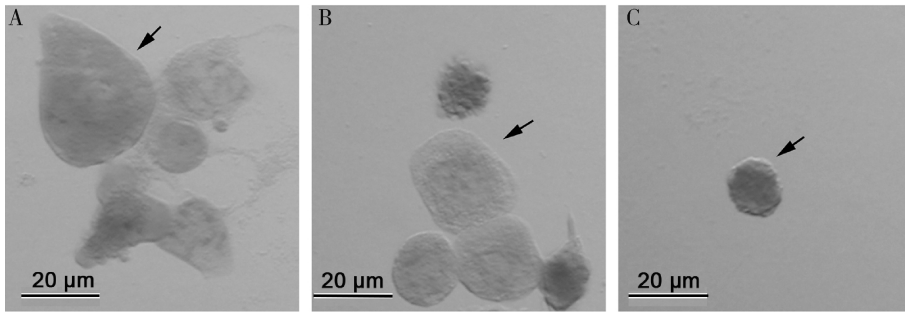


图 1 从褐飞虱若虫中肠组织分离的中肠原代细胞形态

Fig. 1 Morphology of the primary cells isolated from midgut of *Nilaparvata lugens* nymphs

A: 杯状细胞 Goblet cell; B: 柱状细胞 Columnar cell; C: 干细胞(再生细胞) Stem cell or regenerative cell.

形,能很好地贴壁生长。

2.2 不同抗性水稻幼苗汁液诱导褐飞虱中肠细胞凋亡及细胞内 AChE 的表达

在培养基中添加不同抗性水平的水稻的幼苗汁液,处理培养的第 2 代中肠细胞,通过原位免疫组织化学结合 TUNEL 染色法及 Hoechst 染色法,在凋亡的中肠细胞中定位 AChE 分子,并观察 AChE 的表达量变化。实验结果表明,没有添加水稻幼苗汁液的对照组中肠细胞中呈现微弱的阳性信号(棕色颜色),表明可能是细胞内存在本底水平表达的 AChE,而经 TUNEL 检测无绿色荧光信号,表明没有

发生细胞凋亡。添加了感虫水稻 TN1 幼苗汁液的中肠细胞,经免疫组化染色后少量细胞中有阳性信号,而且经 TUNEL 检测发现,这少量细胞的细胞核发出绿色荧光。该样品中细胞的凋亡率为 8%。与之相比,添加抗性水稻(B5 或 TKM-6)幼苗汁液的中肠细胞,免疫组化反应后有较多的细胞呈现阳性信号,同时 TUNEL 检测表明,相应的细胞核中存在明亮的绿色荧光信号,凋亡率分别为 65% 和 85%(表 1)。可见 TKM-6 幼苗汁液处理的细胞比 B5 幼苗汁液处理的细胞凋亡率更高,可能是由于 TKM-6 水稻本身具有较强抗性的缘故(图 2)。

表 1 不同抗性水平水稻幼苗汁液诱导的褐飞虱中肠细胞凋亡统计

Table 1 Statistics of apoptosis in *Nilaparvata lugens* midgut cells induced by the juice from rice seedlings with different resistance levels

重复 Replicate	凋亡指数 Apoptotic index		
	TN1	B5	TKM-6
Set 1	15/190	120/178	180/204
Set 2	12/145	102/155	161/185
Set 3	17/220	91/135	164/199
Set 4	10/120	92/151	135/163
平均值 Mean \pm SD	0.0805 \pm 0.00260	0.6525 \pm 0.02490	0.8500 \pm 0.02550

凋亡指数 = 凋亡细胞数 / (凋亡细胞数 + 正常细胞数)。Apoptotic index (AI) = Number of apoptotic cells / (Number of apoptotic cells + Number of normal cells).

细胞凋亡时细胞会失水同时细胞内骨架蛋白功能失活,导致凋亡的细胞体积变小,表面皱缩,细胞质浓缩,凋亡小体为数个圆形小体围绕在细胞周围。在此过程中细胞核染色质的形态学改变分为 3 期: I 期的细胞核呈波纹状或呈折缝样,部分染色质出现浓缩状态; II a 期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化(图 3: A, B); II b 期的细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体(图 3: C, D)。但从图中可以看出凋亡小体并非通过发芽脱落机制形成的,而是通过自噬体形成机制形成的,因为该过程中凋亡小体内并没有代表染色质碎片的紫色信号。

2.3 通过实时定量 PCR 技术检测 AChE 的表达

通过荧光定量 PCR 检测各组细胞中 AChE 的表达水平。首先用 AChE 和内参基因 β -actin 的引物,扩增各组细胞制备的总 cDNA,以检测两对引物的特异性及有效性,以及各 cDNA 样品的完整性。结果表明,对照细胞以及 TN1, B5 和 TKM-6 幼苗汁液处理的细胞中 3 个重复的 β -actin 扩增曲线出峰的时间大致一样,表明 β -actin 引物的专一性很好。而各样品组中目的基因 AChE 的扩增曲线,与 β -actin 引物的扩增结果相似。表明荧光定量 PCR 的数据能够真实地反映两个基因在各样品中的表达水平(图 4)。

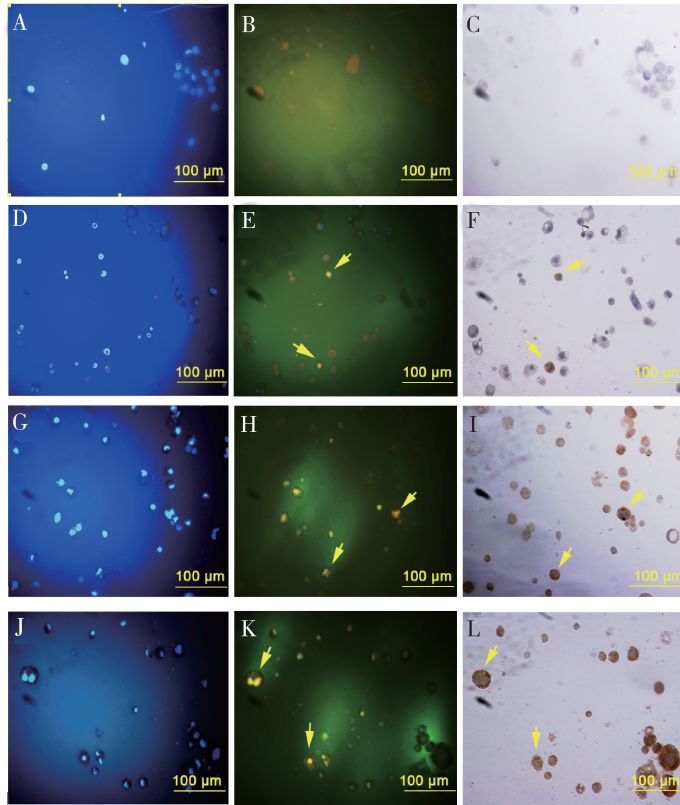


图 2 不同抗性水平水稻幼苗汁液诱导褐飞虱中肠细胞凋亡及诱导凋亡细胞中 AChE 的过表达

Fig. 2 Apoptosis in *Nilaparvata lugens* midgut cells and the overexpressed AChE in the apoptotic cells induced by the juice from rice seedlings with different resistance levels

A, B, C: 培养的对照(未处理)细胞,分别用 Hoechst 33342、TUNEL 染色和免疫组化后显示的一个代表性图片 The untreated control cells processed with Hoechst 33342 staining, TUNEL assay and immunohistochemistry reaction; D, E, F: 添加了感虫水稻 TN1 幼苗汁液的培养基中的细胞,同上处理 Cells treated with juice from seedlings of TN1 and processed as described above; G, H, I: 添加了抗性水稻 B5 幼苗汁液的培养基中的细胞,同上处理 Cells treated with juice from seedlings of B5 and processed as described above; J, K, L: 添加了抗性水稻 TKM-6 幼苗汁液的培养基中的细胞,同上处理 Cells treated with juice from seedlings of TKM-6 and processed as described above. 中间栏图片中箭头指示凋亡的细胞核;右侧栏图片中箭头指示积累了 AChE 的细胞。Arrows in the middle lane indicate the apoptotic nuclei, while arrows in the right lane indicate the accumulated AChE in the apoptotic cells.

依据各样品和其对应的 Ct 值,参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) 方法进行基因表达水平的定量。如图 5 所示,先分别计算对照组以及 TKM-6, B5 和 TN1 幼苗处理组中 AChE 相对 β -actin 的相对表达量,再用 TKM-6, B5 和 TN1 幼苗汁液处理组中 AChE 的相对表达量与对照细胞组中 AChE 的相对表达量进行比较,得出 TKM-6 幼苗汁液处理组的 AChE 的表达量上调了 29.9 倍, B5 幼苗汁液处理组的上调了 18.4 倍,而 TN1 幼苗汁液处理组的上调了 8 倍。该结果表明,抗性水稻幼苗汁液处理的褐飞虱若虫中肠细胞中 AChE 的表达量高于感性水稻处理组,而且抗性越强, AChE 的表达水平越高,这与免疫组化的检测结果相符(图 5)。表明 AChE 受抗性水稻的诱导,并且参与细胞凋亡进程。

3 讨论

中肠在昆虫生命活动中起着重要作用,不仅是消化吸收食物的重要功能器官,同时也是多种生物防治微生物作用的靶标。目前中肠细胞的分离方法可以分为 3 种:组织块法、机械分离法和酶消化法(童丹丹等, 2013)。本研究利用组织块法和酶消化法联合进行中肠细胞的分离,分离效率高,效果好,可以清楚地区分柱状细胞、杯状细胞和干细胞(图 1)。在选择原代细胞的培养基时,我们分别尝试了 EX-CELL 420, Grace, TC-100, IPL-41 和 TNM-FH 共 5 种培养基,结果在 EX-CELL 420 培养基中原代中肠细胞的存活率最高(数据未示),故认为 EX-CELL 420 是最适合褐飞虱中肠细胞的培养基。在

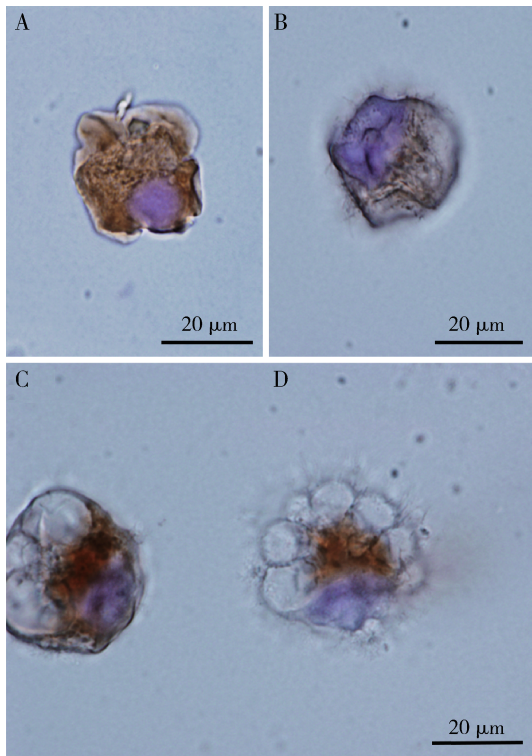


图3 褐飞虱中肠凋亡细胞的光镜观察结果

Fig. 3 Ultrastructural analysis of the apoptotic midgut cells of *Nilaparvata lugens*

A, B: 处于凋亡 II a 期的细胞 Apoptotic cells in stage II a; C, D: 处于凋亡 II b 期的细胞(细胞周围有泡状凋亡小体) Apoptotic cells in stage II b (showing apoptotic bodies generated from the apoptotic cells). 紫色信号指示细胞核中的染色质,褐色信号指示细胞中积累的 AChE. Purple signals indicate chromatin in the cells, while brown signals indicate AChE gathering in the cells.

实验中我们选择第 2 代细胞作为实验材料,因为第 2 代细胞是原代细胞在相同的培养条件下分裂而来的,生长一致,活力较强,且生理状态接近原代中肠细胞。鉴于中肠原代细胞分离培养困难、特别是难以保存,因此建立稳定的褐飞虱中肠细胞系势在必行。目前正在探讨褐飞虱中肠细胞培养技术的关键因素,以形成一套完整的细胞系建立体系,用于未来相关科学问题的研究。

在前期的工作中,我们已检测到正常发育的褐飞虱若虫的中肠存在不超过 5% 凋亡细胞的现象,推测这是过度增殖的细胞在正常的发育过程中,伴随着中肠组织的结构及生理转换而执行了程序性死亡过程(汪晓雪等, 2011)。有关昆虫中肠细胞凋亡的研究已有诸多报道。例如西洋接骨木植株中的凝集素 I、II 能引起昆虫中肠细胞系 CF-203 发生凋亡(Shahidi-Noghabi *et al.*, 2010)。抗性水稻中的凝集素是否参与诱导了褐飞虱中肠细胞凋亡尚需进一步

研究确定。

我国有 3 种野生稻,即普通野生稻、药用野生稻和疣粒野生稻。其中,药用野生稻 *Oryza officinalis* Wall 是最具有研究价值的资源,对许多逆境等具有很强的抗性,比如抗褐飞虱、白背飞虱、黑尾叶蝉、白叶枯病、稻瘟病等病虫害的抗性级别是各种野生稻中最高的。He(2007)利用药用野生稻渗入后代选育的水稻株系 B5,经鉴定对 I 型褐飞虱的抗性级别为 3,成为抗褐飞虱育种的重要种质资源。TKM-6 携带有抗性基因 *Bhpl*,表现出对水稻主要病虫害的高抗性而倍受育种工作者的青睐(Khan and Joshi 1990)。台中 1 号(TN1)是一个对褐飞虱敏感性的水稻品种, TN1 的抗性级别为 9(楼珏等, 2016)。在亚洲稻作区, TN1 和 TKM-6 是最常用的杂交育种亲本,不仅是重要的水稻育种种质资源,也是基础研究的重要材料(Upadhyay *et al.*, 2011)。在本研究中,取 TN1, B5 和 TKM-6 3 种不同抗性水稻的幼苗汁液,处理培养的褐飞虱中肠细胞,检测到处理的细胞发生不同程度凋亡的现象(图 2 和 3)。这表明水稻中存在诱导褐飞虱若虫中肠细胞凋亡的物质,而且水稻抗性越强,诱导凋亡率越高。另一个值得关注的现象是,无论实验条件下还是田间, TN1 都表现为完全感虫。在本研究中 TN1 处理同样可以诱导中肠细胞凋亡,这表明即使是感虫水稻 TN1,在遭遇褐飞虱为害时依然会主动产生抗性物质,只是这类抗性物质较少或者较弱,因而与 TKM-6 和 B5 相比, TN1 诱导细胞凋亡的能力较弱。

自 Zhang 等(2002)发现凋亡的细胞中存在过表达的 AChE 以来,科学家们付出了诸多努力,试图揭示 AChE 在细胞凋亡中的作用及其调控机制(Sánchez-Osuna and Yuste, 2015)。到 2015 年,张学军课题组取得了阶段性的进展,确定了 AChE 在细胞凋亡中起着 DNase 的作用(Du *et al.*, 2015),从而揭示了 AChE 在细胞凋亡过程中的功能之一。本研究中经免疫组化检测发现,在添加了不同品种水稻幼苗汁液进行诱导后,发生凋亡的中肠细胞中存在过表达的 AChE。添加抗性水稻 TKM-6, B5 幼苗汁液的中肠细胞中,乙酰胆碱酯酶的表达量升高的细胞数量明显多于添加感性水稻 TN1 幼苗汁液组中的中肠细胞,而对照组中肠细胞中积累的乙酰胆碱酯酶几乎检测不到(图 2)。结合 TUNEL 的检测结果发现,发生 AChE 积累的细胞恰恰是凋亡的细胞(图 2)。荧光定量 PCR 检测表明,抗性水稻幼苗汁液处理组中肠细胞的 AChE 表达量高于感虫水稻

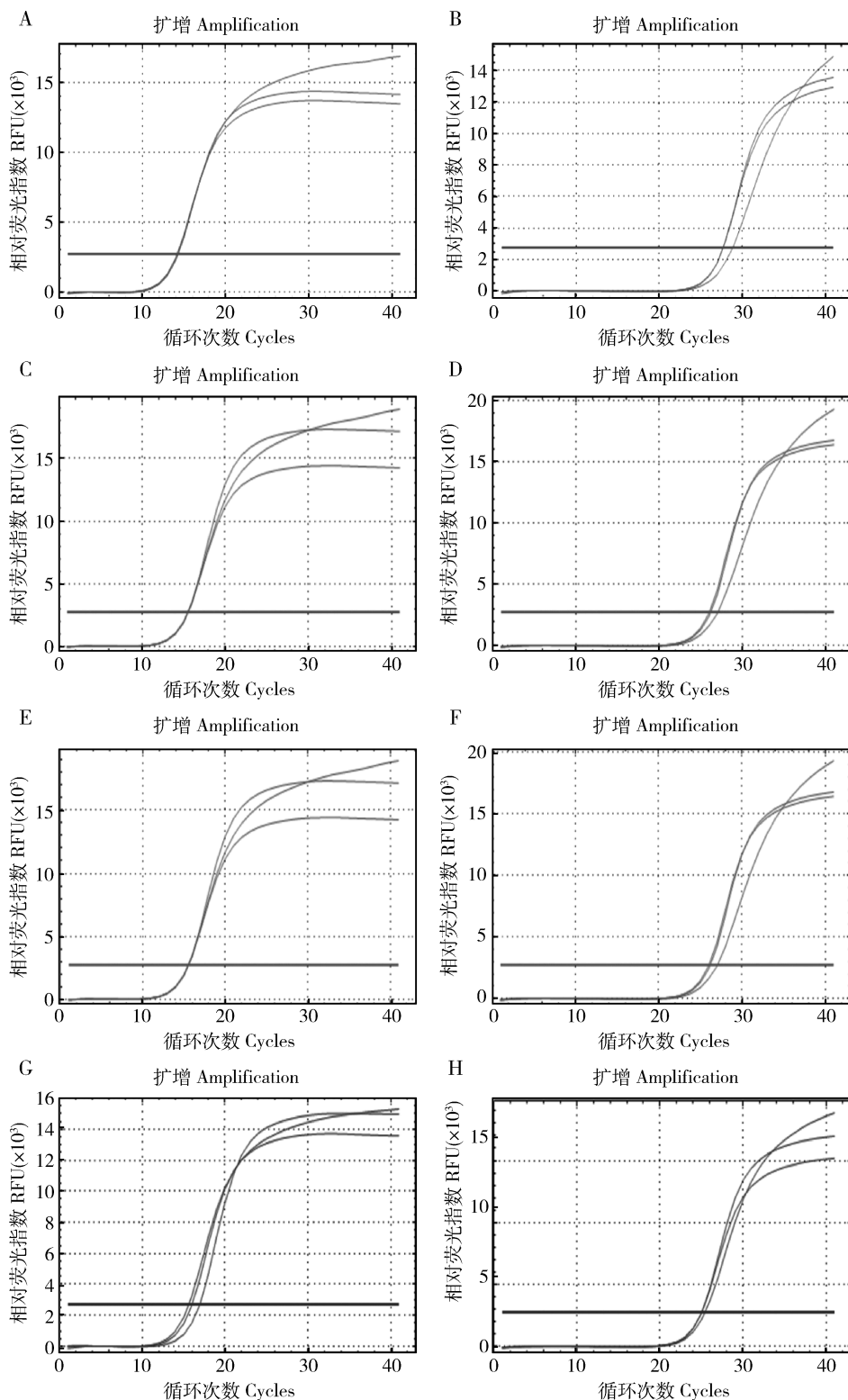


图4 不同抗性水平水稻幼苗汁液处理的褐飞虱若虫中肠细胞中内参基因 β -actin 和目的基因 $AChE$ 的扩增曲线

Fig. 4 Amplification curves of the reference gene β -actin and the target gene $AChE$ in *Nilaparvata lugens* midgut cells treated with the juice from rice seedlings with different resistance levels

A, C, E, G: 分别为对照(未处理)细胞以及 TN1, B5, TKM-6 幼苗汁液处理的细胞中内参基因 β -actin 的扩增曲线 Amplification curves of β -actin in the untreated control cells and cells treated with the juice from seedlings of TN1, B5 and TKM-6, respectively; B, D, F, H: 分别为对照(未处理)细胞以及 TN1, B5 和 TKM-6 幼苗汁液处理的细胞中目的基因 $AChE$ 的扩增曲线 Amplification curves of $AChE$ in the untreated control cells and cells treated with the juice from seedlings of TN1, B5 and TKM-6, respectively.

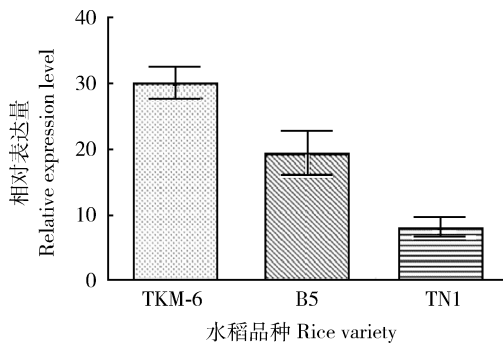


图5 荧光定量PCR检测不同抗性水平水稻幼苗汁液处理的褐飞虱中肠细胞中AChE的表达水平

Fig. 5 Expression level of AChE in *Nilaparvata lugens* midgut cells treated with the juice from seedlings of rice with different resistance levels detected by real-time fluorescence quantitative PCR

数据来自3次重复实验的平均值±标准差,每次实验均设置3个平行重复。Data are means ± SD based on three independent experiments (n=3)。

处理组细胞的,且与水稻抗性水平呈正相关,即水稻抗性越强,褐飞虱细胞中AChE表达量越高(图5)。但免疫组化检测表明,凋亡细胞中的AChE大部分定位于细胞质中,没有大规模进入细胞核,这可能是免疫组化检测灵敏度低,加上细胞核经染色后出现的紫色背景覆盖,因而有多少AChE在凋亡过程中进入了细胞核尚需进一步确定;即使在凋亡后期,自噬体形成机制形成的凋亡小体中也没有明显的AChE分布。根据这一亚细胞定位特点推测,AChE在细胞凋亡过程中可能还有其他功能。总之,AChE可能参与了褐飞虱与宿主水稻的互作过程,它调控了抗性物质诱导的中肠细胞凋亡,积极清除了受损伤的中肠细胞,以维持中肠组织结构的稳定及功能,在褐飞虱防御宿主抗性伤害和适应水稻品种方面发挥了重要作用。

本研究结果不仅拓展了对AChE这一经典的杀虫剂靶酶在褐飞虱与水稻协调进化中新功能的认识,而且为抗性水稻新品种的选育及开发新的褐飞虱防治措施提供了一定的参考信息。比如确定了来自水稻的诱导剂后,可以作为抗性性状在新品种选育中加以利用,另一方面利用RNA干扰或者基因组定点修饰等遗传学手段抑制褐飞虱AChE的表达,取代施用以AChE为靶标的杀虫剂,同时使中肠细胞通过凋亡而抵御水稻抗性的机制丧失,从而达到防治褐飞虱的目的。

参考文献 (References)

Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet

- A, Strähle U, 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neurosci.*, 5(2): 111–118.
- Du AY, Xie J, Guo KJ, Yang L, Wan YH, Yang QO, Zhang XJ, Niu X, Lu L, Wu J, Zhang XJ, 2015. A novel role for synaptic acetylcholinesterase as an apoptotic deoxyribonuclease. *Cell Disc.*, 1: 15002
- Feng QL, Jiang R, Lei B, Peng XH, Huang LK, 2010. The consequent comparison of two types of hematoxylin followed-staining of immunohistochemistry. *J. Chongqing Med. Univ.*, 35(11): 1700–1701. [冯清林, 姜蓉, 雷波, 彭小华, 黄良庠, 2010. 2种苏木精染液在免疫组织化学中复染效果的比较. 重庆医科大学学报, 35(11): 1700–1701]
- He GC, 2007. Brown planthopper resistance genes in rice: from germplasm to breeding. *Mol. Plant Breed.*, 5(2): 175–176.
- Khan ZR, Joshi RC, 1990. Varietal resistance to *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) in rice. *Crop Prot.*, 9: 243–251.
- Li JH, He F, Yang YB, Xiao YT, Peng R, Yao HC, Li XC, Peng JX, Hong HZ, Liu KY, 2015. Establishment and characterization of a novel cell line from midgut tissue of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 51(6): 562–571.
- Lin LL, Chen HL, Xie MH, Su WH, 2014. Research progress in insect acetylcholinesterase. *J. Anhui Agri. Sci.*, 42(7): 2053–2055. [林璐璐, 陈浩梁, 谢明惠, 苏卫华, 2014. 昆虫乙酰胆碱酯酶研究进展. 安徽农业科学, 42(7): 2053–2055]
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402–408.
- Lou Y, Yang WQ, Li ZX, Luo TK, Xie YC, Zheng GC, Yue GH, Xu JL, Lu HJ, 2016. Evaluation of improvement effect of restorer lines on pyramiding genes resistant to rice blast, bacterial leaf blight and brown planthopper. *Acta Agronom. Sin.*, 42(1): 31–42. [楼珏, 杨文清, 李仲惺, 罗天宽, 谢永楚, 郑国楚, 岳高红, 徐建龙, 卢华金, 2016. 聚合稻瘟病、白叶枯病和褐飞虱抗性基因的三系恢复系改良效果的评价. 作物学报, 42(1): 31–42]
- Rubia-Sanchez E, Suzuki Y, Miyamoto K, Watanabe T, 1999. The potential for compensation of the effects of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae) feeding on rice. *Crop Prot.*, 18(18): 39–45.
- Sánchez-Osuna M, Yuste VJ, 2015. AChE for DNA degradation. *Cell Res.*, 25: 653–654.
- Shahidi-Noghabi S, Van Damme EJM, Iga M, Smaghe G, 2010. Exposure of insect midgut cells to *Sambucus nigra* L. agglutinins I and II causes cell death via caspase-dependent apoptosis. *J. Insect Physiol.*, 56: 1101–1107.
- Tong DD, Wu YL, Zheng GL, Li CY, 2013. Research advances on insect midgut cell culture *in vitro*. *J. Environ. Entomol.*, 35(3): 390–398. [童丹丹, 吴艳蕾, 郑桂玲, 李长友, 2013. 昆虫中肠细胞的离体培养. 环境昆虫学报, 35(3): 390–398]
- Upadhyay P, Singh VK, Neeraja CN, 2011. Identification of genotype specific alleles and molecular diversity assessment of popular rice

- (*Oryza sativa* L.) varieties of India. *Int. J. Plant Breed. Genet.*, 5: 130 – 140.
- Wang XX, Liu XL, Yang ZF, 2011. Detection of midgut apoptosis in *Nilaparvata lugens* larvae. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(2): 338 – 344. [汪晓雪, 刘晓黎, 杨之帆, 2011. 褐飞虱若虫中肠凋亡细胞的检测. 应用昆虫学报, 48(2): 338 – 344]
- Wu S, Li M, Tang PA, Felton GW, Wang JJ, 2010. Cloning and characterization of acetylcholinesterase 1 genes from insecticide-resistant field populations of *Liposcelis paeta* Pearman (Psocoptera; Liposcelididae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(5): 415 – 424.
- Xie J, Jiang H, Wan YH, Du AY, Guo KJ, Liu T, Ye WY, Niu X, Wu J, Dong XQ, Zhang XJ, 2011. Induction of a 55 kDa acetylcholinesterase protein during apoptosis and its negative regulation by the Akt pathway. *J. Mol. Cell Biol.*, 3(4): 250 – 259.
- Yang ZF, Zhang YY, Liu XL, Wang XX, 2011. Two novel cytochrome P450 genes *CYP6CS1* and *CYP6CW1* from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera; Delphacidae): cDNA cloning and induction by host resistant rice. *Bull. Entomol. Res.*, 101(1): 73 – 80.
- Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, Guo LH, Alemany M, Zhang LY, Shi YF, 2002. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ.*, 9(8): 790 – 800.

(责任编辑: 袁德成)