

研究论文

褐飞虱若虫中肠凋亡细胞的检测^{*}

汪晓雪 刘晓黎 杨之帆^{**}

(湖北大学生命科学学院 武汉 430062)

摘 要 为揭示褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 若虫在发育过程中中肠的凋亡细胞,使用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP-生物素断端标记法(TUNEL)进行中肠组织切片检测,结果表明,1~5龄若虫中肠分别存在2%~5%的凋亡细胞。利用4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸(DAPI)染色法检测表明,存在I,IIa和IIb期凋亡的细胞核,其特征包括染色体浓缩、边缘化及细胞核碎裂。透射电子显微镜检测结果表明,早期凋亡的细胞呈现染色质浓缩、边缘化特征,晚期凋亡的细胞出现细胞核碎裂、形成凋亡小体及细胞质空泡化等。本研究揭示了在正常发育过程中褐飞虱若虫中肠有少量的细胞发生了凋亡。通过人工干预的方式调控中肠细胞的凋亡进程有可能使之成为防治该水稻害虫的新靶标。

关键词 褐飞虱,中肠,细胞凋亡

Detection of midgut apoptosis in *Nilaparvata lugens* larvae

WANG Xiao-Xue LIU Xiao-Li YANG Zhi-Fan^{**}

(College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract Midgut apoptosis was investigated in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål, Hemiptera: Delphacidae) larvae. A terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay revealed that two to five percent of the 1st–5th larval instar midgut cells showed typical fluorescent signals representing genomic DNA cleavage. 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining revealed apoptotic nuclei presenting characteristic features in apoptosis stage I, IIa and IIb; including chromatin condensation, margination and nuclear fragmentation. Transmission electron microscopy revealed that early stage apoptotic midgut cells had apoptotic nuclear morphology, such as chromatin condensation and margination, while late stage cells had broken nuclei, apoptotic bodies and vacuolization of the cytoplasm. These findings demonstrate that a small percentage of the midgut cells of *N. lugens* larvae undergo apoptosis during normal development. It may be possible to regulate *N. lugens* midgut apoptosis artificially thereby making this process a novel method of control for this species.

Key words *Nilaparvata lugens*, midgut, apoptosis

凋亡是程序化细胞死亡的一种方式,其特征是基因组DNA经凋亡激活的内切核酸酶作用而片段化,许多重要的蛋白被降解,细胞最终被分割包裹成凋亡小体(Hengartner, 2000)。与细胞坏死不同,凋亡的细胞被临近的细胞吞噬而不发生裂解,避免了出现炎症反应(Evan and Littlewood, 1998)。正常生理过程中的各种信号分子以及环

境因子均可诱导细胞发生凋亡(McConkey *et al.*, 1990)。

昆虫中肠是消化系统中所占比例较大的部分,在食物消化和营养物质吸收方面发挥了重要作用,同时也是病原微生物、杀虫剂和植物毒素的靶标(Wigglesworth, 1972)。有关昆虫中肠细胞凋亡的研究已有诸多报道。例如果蝇 *Drosophila*

^{*} 资助项目:国家自然科学基金(30500328和31071679)。

^{**} 通讯作者, E-mail: sailyangzhf@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-01-26,接受日期:2010-10-13

melanogaster 若虫中肠细胞受类固醇激素调控而发生凋亡的现象及机理研究得较为广泛深入 (Jiang *et al.*, 1997)。在蜜蜂若虫正常的发育过程中中肠少数细胞被证实发生了凋亡 (Gregorc and Bowen, 1996; 1997)。经细菌 *Paenibacillus larvae*, 杀螨剂双甲脒 (Amitraz) 和土霉素 (Oxytetracycline) 处理后, 蜜蜂若虫的中肠凋亡细胞的数量增加 (Gregorc and Bowen, 2000)。在库蚊 *Culex pipiens* 的变态发育过程中以及被疟原虫卵寄生之后均观察到了中肠细胞凋亡的现象 (Han *et al.*, 2000; Nishiura and Smouse, 2000; Hopwood *et al.*, 2001)。库蚊 *Culex pipiens* 取食了被西尼罗河病毒 (west nile virus) 感染的血细胞后, 部分中肠上皮细胞发生了凋亡 (Vaidyanathan and Scott, 2006)。一种使毛虫松软的基因 (*mcf*) 编码的大分子毒素被证实能诱导昆虫血细胞和中肠上皮细胞的凋亡, 从而具有一定的杀虫功能 (Daborn *et al.*, 2002)。然而同翅目昆虫的若虫在正常的发育过程中是否也发生中肠细胞凋亡的现象至今未见报道, 是一个值得研究的问题。

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* Stål 是同翅目飞虱科的昆虫, 是一种非常重要的农业害虫。它通过吸食韧皮部的光合产物而直接为害水稻, 还能传播水稻病毒病引起间接危害 (Ling *et al.*, 1978)。科学治理褐飞虱是保证水稻产量的重要前提条件之一。在本研究中, 作者证实了在褐飞虱若虫正常的发育过程中同样存在中肠细胞凋亡的现象, 这为全面了解褐飞虱若虫的发育进程及揭示其中肠细胞凋亡的发生机理提供了一定的参考数据。

1 材料与方法

1.1 褐飞虱材料、试剂和仪器

褐飞虱种群饲养在感虫水稻品种台中 1 号 (TN1) 上, 条件为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 相对湿度 80%, 光周期 L:D = 16:8。收集 1~5 龄若虫用于固定和切片。另备一份 4 龄若虫中肠的超薄切片用于电子显微镜观察。

原位杂交试剂盒 (*In Situ* Cell Death Detection Kit) 为德国 Roche Applied Science 公司产品; 液体石蜡 molten paraffin、树脂包埋剂 Spurr resin 和 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸 (DAPI) 均为美国 Sigma 公司产品; 其它试剂为国产分析纯。

HistoSTAT 820 切片机为美国 Reichert

Scientific Instruments 公司产品; BX51 系统荧光显微镜为日本 Olympus 公司产品; CoolSNAP 数码 CCD 成像系统和相关软件为美国 Cambridge Research & Instrumentation (CRI), Inc 公司产品; PXS-1040 型电视显微镜为浙江托普仪器有限公司产品; LKB-5 超薄切片机为瑞典 LKB 公司产品; Hitachi-600 扫描电子显微镜为日本 Hitachi 公司产品。

1.2 TUNEL 检测

若虫在含 4% 多聚甲醛的 PBS (NaCl 150 mM, KCl 27 mM, Na_2HPO_4 100 mM, KH_2PO_4 20 mM, pH 7.4) 缓冲液中固定 24 h, 脱水透明后包埋于液体石蜡中。使用 HistoSTAT 820 切片机对若虫样品进行腹部横切, 切片厚度为 5 μm , 随后展片于洁净的载玻片上并自然风干制成装片。装片在二甲苯中脱蜡, 期间更换 3 次二甲苯, 每次处理 5 min。使用不同浓度梯度的乙醇 (100%、95%、85%、70%、30%, 每种梯度 5 min) 复水。每张切片滴加 50 μL 不含 DNase 的蛋白酶 k (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置于 25°C 处理 15 min。切片用 PBS 缓冲液淋洗 3 次, 在样品上覆盖 50 μL 的含末端脱氧核苷转移酶 (TdT) 的 TUNEL 反应混合液, 置于 37°C 保温 60 min 以进行标记反应。用 PBS 缓冲液淋洗 3 次。负对照用不含转移酶的 TUNEL 反应混合液处理; 作正对照的切片先用 50 μL 的 DNase I (浓度为 0.01 U/ μL) 于 25°C 处理 10 min 再进行标记。在 Olympus BX51 系统荧光显微镜下观察切片, 激发光和发射光的波长分别为 485 nm、528 nm; 使用 CoolSNAP 数码 CCD 进行图象拍摄。每一龄若虫选取 5 个大小均一的个体进行处理并切片, 再选取来源于同一个若虫的 3 张完整的装片进行观察。

1.3 DAPI 染色观察

由于在 TUNEL 反应中表现为阳性信号的细胞核也可能是坏死细胞的细胞核 (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995), 为证实本研究中所观察到的 TUNEL 阳性信号为凋亡细胞的细胞核, 使用 1 mg/mL 的 DAPI 溶液 (溶于 PBS) 对复水后的装片进行染色, 条件为 37°C 染 5 min。用 PBS 缓冲液淋洗 1 次, 再覆盖一薄层 PBS 缓冲液, 置于 Olympus BX51 系统荧光显微镜下观察并拍照。所用的激发光和发射光的波长分别为 330 nm、450 nm。为保证观察结

果的准确性,选取来自同一个 4 龄若虫的 3 张完整的装片进行观察,共观察 3 个若虫的 9 张装片。

1.4 透射电子显微镜观察

在体视显微镜下分离出 3 个 4 龄若虫的完整的中肠组织,立即投入 0.1 mol/L 的二甲胍酸盐缓冲液(含 2% 戊二醛和 2% 的多聚甲醛,pH 7.4)中,于 4℃ 固定 4 h。随后置于 1% OsO_4 中于 4℃ 固定过夜,依次用浓度梯度乙醇脱水(30%、50%、70% 于 4℃ 各 2 h;85%、95% 于室温各 1.5 h;100% 于室温脱水 3 次,每次 1 h)。样品最后用树脂包埋。用 LKB-5 切片机进行超薄切片,厚度为 70 nm。切片置于 200 目铜网上,用醋酸铀和柠檬酸铅染色。样品用 Hitachi-600 透射电子显微镜进行观察拍照。挑选 2 片承载单个 4 龄若虫的肠道

组织切片的铜网用于观察。

2 结果与分析

2.1 用 TUNEL 试剂盒检测褐飞虱凋亡的中肠细胞

经检测在褐飞虱若虫中肠发现有地高辛标记呈阳性的细胞(图 1:A~E)。通过计算凋亡细胞的数量与相应区域正对照细胞的数量比值,可知凋亡细胞发生的比例。在 1 龄若虫的中肠存在 2% 的凋亡细胞(图 1:A),2 龄的有 3% (图 1:B),而 3~5 龄的则分别有 5% 左右的凋亡细胞(图 1:C~E)。有趣的是绝大多数凋亡细胞随机分别于朝向腹侧的肠道壁上。在阳性对照中所有的细胞核呈现 TUNEL 阳性信号(图 1:F),而在阴性对照中检测不到阳性信号(图 1:G)。

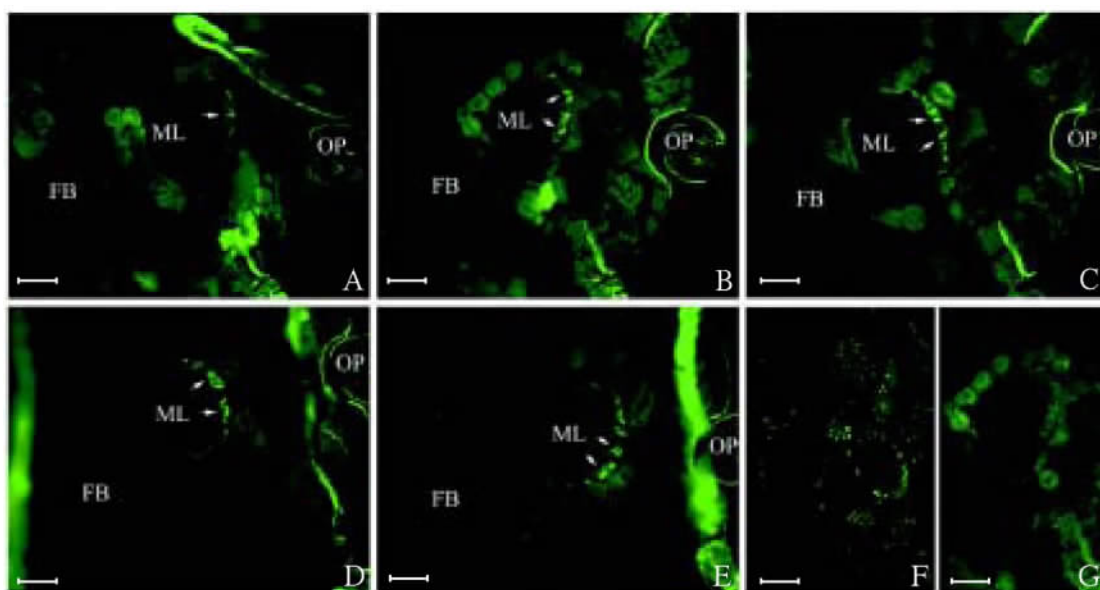


图 1 利用荧光显微镜检测经 TUNEL 反应处理的褐飞虱若虫横切装片

Fig. 1 Whole mount specimens with a TUNEL-positive reaction detected by fluorescent microscopy

褐飞虱中肠凋亡细胞在荧光显微镜下显示为较强的黄绿色荧光点。A,B,C,D 和 E 分别为 1st,2nd,3rd,4th 和 5th 龄若虫的整体切片。箭头指示若干个在 TUNEL 反应中标记为阳性的凋亡细胞的细胞核。F:正对照;G:负对照。ML:中肠腔;FB:脂肪体;OP:产卵器。比例尺为 120 μm 。

The apoptotic cells in *Nilaparvata lugens* midgut were shown as glowing yellow-green speckles under the fluorescent microscope. A, B, C, D and E representatives of whole-mount sections prepared from the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th instar larvae. The arrows indicate representative nuclei of apoptotic cells positively labeled by TUNEL in each photo. F: the positive control, G: the negative control, ML: midgut lumen, FB: fat body, OP: ovipositor. Scale bar = 120 μm .

2.2 DAPI 染色法检测凋亡的细胞核

通过荧光显微镜观察经 DAPI 染色的切片发现,4 龄若虫中肠的一些细胞呈现典型的 I、II a

和 II b 期凋亡细胞的细胞核特征,包括染色质浓缩、边缘化及细胞核碎裂,其它大多数中肠细胞有完整的细胞核结构(图 2)。经 DAPI 染色后观察

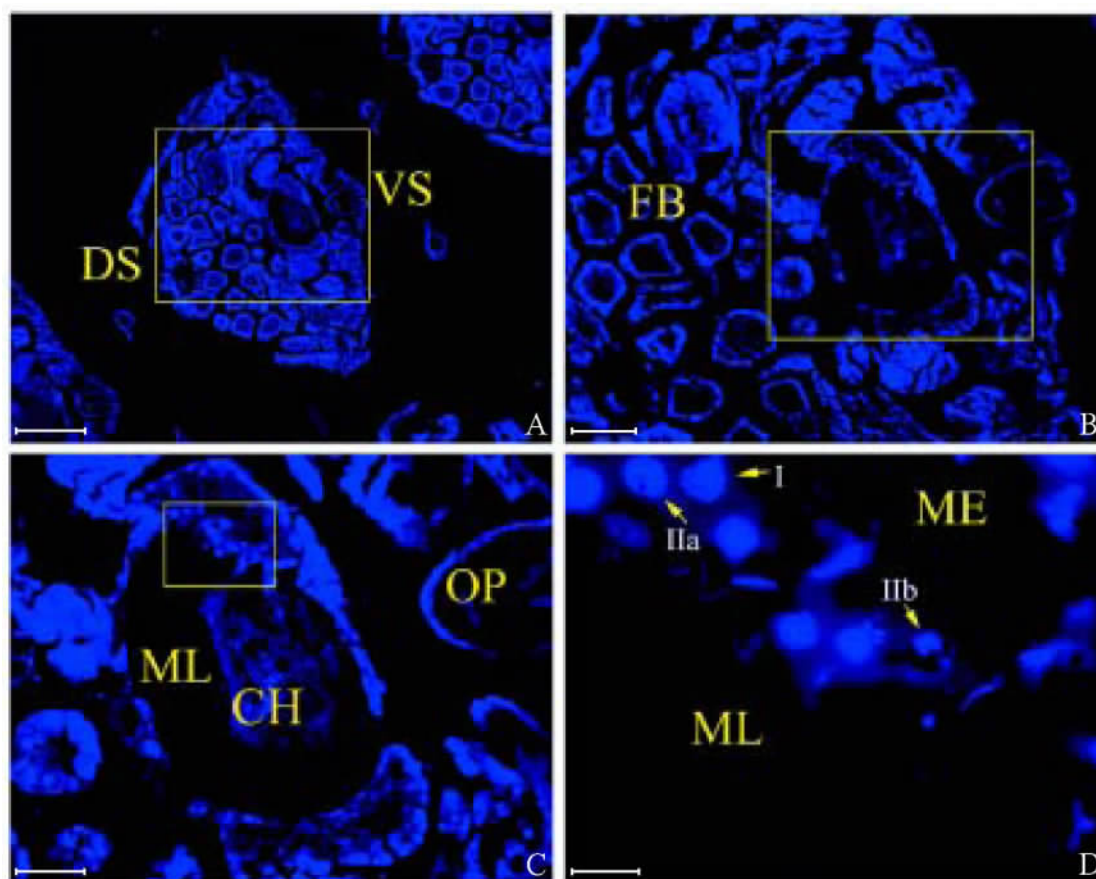


图2 经DAPI染色检测凋亡细胞核及染色质的形态变化

Fig. 2 Changes in nuclear morphology and chromatin condensation following apoptosis detected by DAPI staining
A: 一张完整的4龄若虫腹部横切片; B: 来自于A图方框区域的放大图片; C: 来自于B图方框区域的放大图片; D: 来自于C图方框区域的放大图片。箭头分别指示处于凋亡I、IIa、IIb期的细胞核。DS: 背侧; VS: 腹侧; FB: 脂肪体; ML: 中肠腔; ME: 中肠上皮; CH: 食糜; OP: 产卵器。比例尺: A为300 μm ; B为120 μm ; C为60 μm ; D为12 μm 。

A: a whole-mount transverse section of the 4th instar larva abdomen, B: a photo was magnified from the area boxed in A, C: a photo was magnified from the area boxed in B, D: a photo was magnified from the area boxed in C. The arrows indicate apoptotic nuclei in stage I, IIa and IIb, respectively. DS: dorsal side, VS: ventral side, FB: fat body, ML: midgut lumen, ME: midgut epithelium, CH: chyme, OP: ovipositor. Scale bars: A = 300 μm , B = 120 μm , C = 60 μm ; D = 12 μm .

的结果与TUNEL检测结果一致。

2.3 通过扫描电子显微镜观察中肠凋亡细胞

通过扫描电子显微镜观察了中肠凋亡细胞的超微结构。结果表明:处于凋亡I期的细胞中,因染色质浓缩形成的高电子密度区呈现较深的颜色,同时可以观察到线粒体肿胀(图3:B)。在凋亡IIa期的细胞中,染色质进一步浓缩并边缘化,细胞质中形成了一些大的空泡(图3:C),推测这些空泡可能来源于崩解的内质网,部分可能来源于肿胀的线粒体(Jin *et al.*, 2004)。到IIb阶段,

细胞核破裂,不同大小的染色质碎块与部分细胞质被分割的细胞膜包裹,形成凋亡小体(图3:D)。而绝大多数正常细胞有完整的细胞核及细胞质(图3:A)。

3 讨论

程序性细胞死亡,包括凋亡,为生物提供了一种清除多余的、废弃的及损伤细胞的重要机制,是多细胞生物正常发育的必不可少的调控手段。形态学研究定义了细胞凋亡是一种特定的细胞死亡过程,涉及细胞膜起泡、基因组DNA片段化、染色

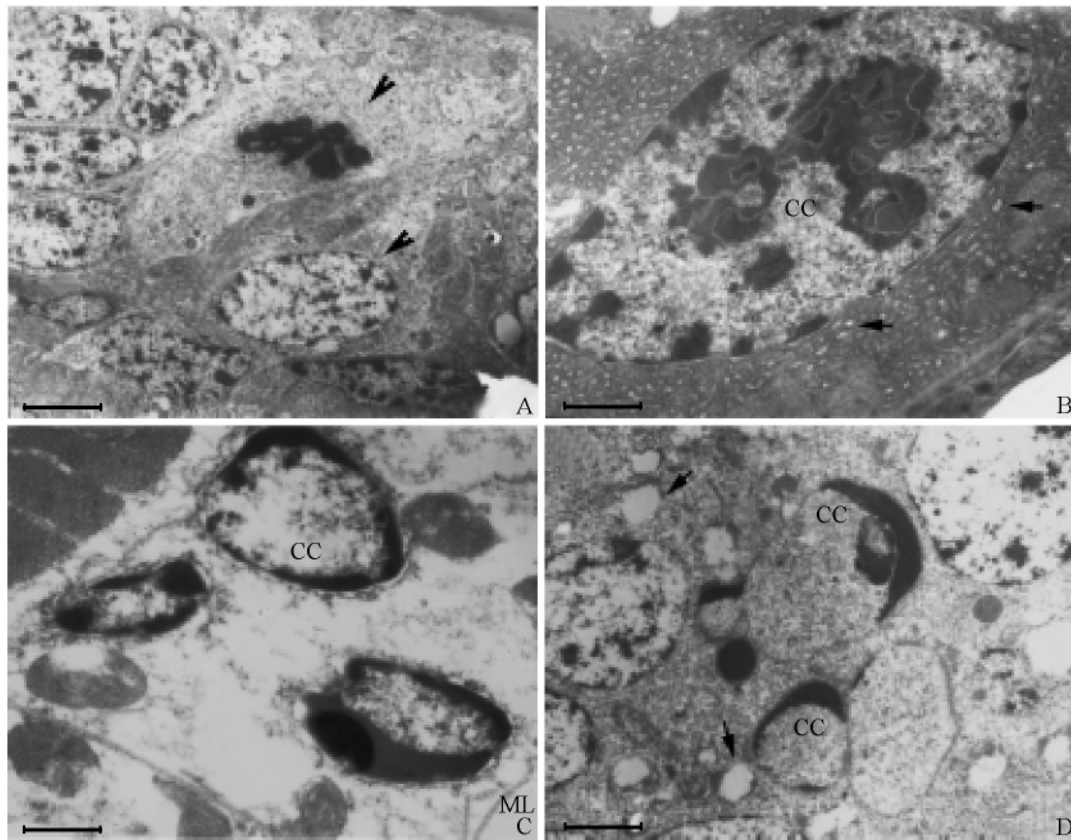


图3 褐飞虱4龄若虫中肠正常细胞和凋亡细胞的超微结构观察

Fig. 3 Ultrastructural analysis of normal cells and apoptotic midgut cells in the 4th instar *Nilaparvata lugens* larvae

A: 1个处于分裂间期含常染色质和异染色质的细胞核(下)和1个处于分裂前期含浓缩染色质的细胞核(上),箭头指示2个完整的细胞核;B: 1个处于凋亡I期的细胞的细胞核,染色质被浓缩,箭头指示2个肿胀的线粒体;C: 3个处于凋亡II a期的相邻细胞的细胞核;D: 处于凋亡II b期的细胞形成的细胞碎片及凋亡小体,箭头指示2个空泡。cc: 浓缩的染色质;ML: 中肠肠腔。比例尺: B为0.5 μm ,其它图为1 μm 。

A: a normal nucleus with euchromatin and heterochromatin in interphase (down) and a nucleus with chromatin condensed in prophase (up) were seen. Arrowheads point to two intact nuclei. B: an apoptotic cell in stage I. The chromatin was condensed. Arrows indicate two mitochondria which were swelling. C: Three adjacent apoptotic cells in stage II a. D: showing cell debris and apoptotic bodies in stage II b of apoptosis. Arrows indicate two vacuoles. cc: condensed chromatin, ML: midgut lumen. Scale bars: B = 0.5 μm , others = 1 μm .

质浓缩及 caspase 的活化等 (Danial and Korsmeyer, 2004)。目前用于检测凋亡细胞的方法都比较可靠,如基于检测基因组 DNA 断裂的 TUNEL 染色法、基于检测细胞核压缩及碎裂的 DAPI 染色法、基于检测染色质浓缩和凋亡小体形成的透射电子显微镜观察法,以及基于检测凋亡过程中形成的特定蛋白质及酶的免疫化学法等 (Gregorc and Bowen, 2000; McClusky *et al.*, 2008)。在本研究中,作者首先采用 TUNEL 染色法检测到褐飞虱若虫中肠存在凋亡的细胞,但由于在 TUNEL 反应中

表现为阳性信号的细胞核也可能是坏死细胞的细胞核 (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995),为证实本研究中所观察到的 TUNEL 阳性信号为凋亡细胞的细胞核,进一步对 DAPI 染色的切片进行了详细观察,结果显示褐飞虱4龄若虫中肠的少数细胞分别处于 I、II a 和 II b 不同的凋亡时期 (Susin *et al.*, 1999);而使用透射电子显微镜观察发现,在凋亡 II a 期的细胞的细胞质中形成了一些大的空泡,推测这些空泡可能来源于崩解的内质网,部分可能来源于肿胀的线粒体 (Jin *et al.*, 2004)。

褐飞虱若虫中肠横切面显示,位于腹侧的肠道壁比向着两侧及背侧的肠道壁要厚(图 1,2),推测朝向腹侧的肠道上皮细胞在发育过程中增殖速度要快于向着两侧及背侧的肠道上皮细胞,在食物消化和吸收过程中可能起着主要作用。已有的研究表明,在动物体内相对稳定的组织器官,凋亡的细胞较少,而在增殖较快的区域则发生凋亡的细胞较多(Rusconi *et al.*, 2000),但如果增殖的细胞过多,可通过凋亡途径清除多余的细胞以维持组织器官的形态和保持细胞的数量(Jacobson *et al.*, 1997)。由此推测,褐飞虱中肠朝向腹侧的上皮细胞发生凋亡可能源于清除过度增殖的细胞以维持正常的中肠结构和功能。

TN1 水稻是一种感虫品种(Yang *et al.*, 2005),饲养于该水稻植株上的褐飞虱若虫可以代表一种自然的发育过程。研究证实在正常的发育过程中昆虫(如蜜蜂等)若虫中肠确实存在细胞凋亡的现象(Gregorc and Bowen, 1996; 1997),而且凋亡细胞的比例不超过 5% 时被认为代表一种正常的组织结构及生理的转换(Gregorc and Bowen, 2000)。作者检测到的褐飞虱 1~5 龄若虫中肠凋亡细胞的比例分别占到 2%~5%,因而可以认为这些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。

本研究的结果加深了对褐飞虱若虫中肠在正常的生理条件下所发生的细胞反应的认识。由于褐飞虱若虫对水稻植株的危害程度远远大于成虫(Ling *et al.*, 1978),阐明若虫中肠细胞的凋亡机理将为找到控制褐飞虱的新策略提供线索,例如通过人工方法加速或抑制中肠细胞凋亡进程有可能使褐飞虱的取食、消化及正常的发育受到影响,达到治理该害虫的目的。

参考文献(References)

Daborn PJ, Waterfield N, Silva CP, Au CPY, Sharma S, Ffrench-Constant RH, 2002. A single *Photograph* gene, *makes caterpillars floppy (mcf)*, allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99: 10742—10747.

Danial NN, Korsmeyer SJ, 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116: 205—219.

Evan G, Littlewood T, 1998. A matter of life and cell death.

Science, 281: 1317—1322.

Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R, 1995. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*, 21: 1465—1468.

Gregorc A, Bowen ID, 1996. Scanning electron microscopy of the honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. *Zb. Veterinary Faculty Univ. Ljubljana*, 33: 261—269.

Gregorc A, Bowen ID, 1997. Programmed cell death in the honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. *Cell Biol. Int.*, 21: 151—158.

Gregorc A, Bowen ID, 2000. Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, Amitraz and oxytetracycline. *Cell Biol. Int.*, 24: 319—324.

Han YS, Thompson J, Kafatos FC, Barillas-Mury C, 2000. Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J.*, 22: 6030—6040.

Hengartner MO, 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407: 770—776.

Hopwood JA, Ahmed AM, Polwart A, Williams GT, Hurd H, 2001. Malaria-induced apoptosis in mosquito ovaries: a mechanism to control vector egg production. *J. Exp. Biol.*, 204: 2773—2780.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC, 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347—354.

Jiang C, Baehrecke EH, Thummel CS, 1997. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development*, 124: 4673—4683.

Jin QH, Zhao B, Zhang XJ, 2004. Cytochrome c release and endoplasmic reticulum stress are involved in caspase-dependent apoptosis induced by G418. *Cellul. Molec. Life Sci.*, 61: 1816—1825.

Ling KC, Tiongco ER, Aguiro VM, 1978. Rice ragged stunt, a new virus disease. *Plant Dis. Rep.*, 62: 701—705.

McCluskey LM, Barnhoorn IEJ, van Dyk JC, Bornman MS, 2008. Testicular apoptosis in feral *Clarias gariepinus* using TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 71: 41—46.

McConkey DJ, Orrenius S, Jondal M, 1990. Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis). *Immun. Today*, 11: 120—121.

Nishiura JT, Smouse D, 2000. Nuclear and cytoplasmic

- changes in the *Culex pipens* (Diptera: Culicidae) alimentary canal during metamorphosis and their relationship to programmed cell death. *J. Exp. Biol.*, 93: 282—290.
- Rusconi JC, Hays R, Cagan RL, 2000. Programmed cell death and patterning in *Drosophila*. *Cell Death Diff.*, 7: 1063—1070.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G, 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397: 441—446.
- Vaidyanathan R, Scott TW, 2006. Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with west nile virus infection. *Apoptosis*, 11: 1643—1651.
- Wigglesworth VB, 1972. The Principles of Insect Physiology. 7th, ed. Chapman & Hall, London. 827.
- Yang ZF, Zhang FT, He Q, He GC, 2005. Molecular dynamics of detoxification and toxin-tolerance genes in brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål., Homoptera: Delphacidae) feeding on resistant rice plants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 59: 59—66.