

宽缨酮抑制棉铃虫幼虫生长发育的差异代谢物分析

何翔宇^{1,2*}, 邵雪花^{2*}, 温雪梅¹, 梁赫¹, 秦子昕¹,

徐玉辉¹, 路伟^{1,3**}

(1. 新疆农业大学农学院, 棉花教育部工程研究中心, 新疆维吾尔自治区农林有害生物监测与安全防护重点实验室, 乌鲁木齐 830052; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 农业农村部南亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广东省热带亚热带果树研究重点实验室, 广州 510640; 3. 中国农业科学院西部农业研究中心, 新疆昌吉 831100)

摘要: 为明确宽缨酮 (Eurycomanone, EN) 抑制棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫生长发育的代谢谱变化, 本研究采用饲料混毒法检测了宽缨酮和糖、蛋白质及脂类对棉铃虫生长发育的影响, 进一步通过非靶向代谢组学技术, 对宽缨酮处理后棉铃虫幼虫的差异代谢物进行注释、筛选、分类和分析。结果表明, 10 $\mu\text{g/g}$ 宽缨酮可显著抑制棉铃虫的生长发育, 幼虫的体重降低 2.32 倍, 蛹重降低 1.35 倍, 化蛹率和羽化率分别降低 33.82% 和 29.68%。添加胰蛋白胍和蔗糖可部分恢复宽缨酮的抑制活性, 而添加甘油后对虫体的抑制活性无显著影响。筛选得到 19 个差异代谢物, 其中上调 11 个, 下调 8 个, 主要分布在氨基酸及其代谢物、核苷酸、脂肪酰类、碳水化合物等营养代谢途径中。其中, 甲磺酸、蛋氨酸亚砷、3-O-甲基多巴和 3,4-二羟基苯乙酸上调较显著, 与对照相比分别上调了 119.80 倍、3.34 倍、2.4 倍和 2.38 倍; L-蛋氨酸、十八碳二烯酰胺、L-酒石酸、腺嘌呤核苷三磷酸、胞苷-5'-三磷酸、 β -D-呋喃果糖基- α -D-吡喃葡萄糖苷、香菇嘌呤和 L-多巴, 分别下调了 0.49 倍、0.48 倍、0.48 倍、0.41 倍、0.36 倍、 5.41×10^{-3} 倍、 1.30×10^{-3} 倍和 1.48×10^{-4} 倍。本研究解析了宽缨酮抑制棉铃虫生长发育的代谢调控作用, 为该化合物的开发利用提供了理论依据。

关键词: 宽缨酮; 棉铃虫; 生长发育; 代谢组学; 差异代谢物

中图分类号: Q968.1;

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858(2024)00-0000-00

Analysis of the differential metabolites of eurycomanone inhibiting the growth and development of *Helicoverpa armigera* larvae

HE Xiang-Yu^{1,2*}, SHAO Xue-Hua^{2*}, WEN Xue-Mei¹, LIANG He¹, QIN Zi-Xin¹, XU Yu-Hui¹, LU

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFD1400304); 新疆维吾尔自治区重点研发专项 (2022B02033-1); 新疆维吾尔自治区“天山英才”三农骨干人才计划 (2023SNGG032); 新疆棉花产业技术体系(XJARS-03); 广东省基础与应用基础研究基金面上项目 (2021A1515012502)

*共同第一作者: 何翔宇, 男, 硕士研究生, 研究方向为植物源农药杀虫分子机制, E-mail: 1511280080@qq.com; 邵雪花, 女, 副研究员, 博士, 研究方向为果树栽培、育种及病虫害防治研究, E-mail: sxh19831017@163.com

**通信作者 Author for correspondence: 路伟, 男, 副教授, 研究方向为植物源农药杀虫分子机制, E-mail: teerakon@sina.com

收稿日期 Received: 2023-11-01; 接受日期 Accepted: 2024-05-23

Wei^{1,3**} (1. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Engineering Research Centre of Cotton, Ministry of Education, Key Laboratory of the Pest Monitoring and Safety Control of Crops and Forests of the University of the Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830052, China; 2. Institute of Pomology, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Biology and Utilization of Tropical Fruit Trees in South Asia, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China; 3. Western Agricultural Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changji 831100, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: To clarify the metabolic changes induced by Eurycomanone (EN) in inhibiting the growth and development of *Helicoverpa armigera* larvae. In this study, the effects of EN, as well as carbohydrates, proteins, and lipids, on the growth and development of *H. armigera* were examined using the method of mixing toxin with feed. Furthermore, non-targeted metabolomics techniques were employed to annotate, screen, classify, and analyze the differential metabolites in *H. armigera* larvae after EN treatment. The results of the growth and development experiment showed that 10 µg/g of EN significantly inhibited the growth and development of *H. armigera* larvae, with a 2.32-fold decrease in larval weight, a 1.35-fold decrease in pupal weight, and a 33.82% and 29.68% decrease in pupation rate and eclosion rate, respectively. The addition of pancreatic protein hydrolysate and sucrose partially restored the inhibitory activity of EN, while the addition of glycerol had no significant effect on larval growth and development. A total of 19 differential metabolites were screened using non-targeted metabolomics techniques, including 11 upregulated and 8 downregulated metabolites, mainly distributed in pathways related to amino acids and their metabolites, nucleotides, fatty acyls, and carbohydrates. Among them, Methanesulfonic acid, Methionine sulfoxide, 3-O-Methyldopa, and 3,4-Dihydroxybenzeneacetic acid were significantly upregulated, with fold changes of 119.80, 3.34, 2.40, and 2.38, respectively, compared to the control. On the other hand, L-Methionine, Octadecadienamide, L-Tartaric acid, ATP, CTP, β-D-Furanofructose group-α-D-glucopyranoside, Eritadenine, and L-Dopa were downregulated, with fold changes of 0.49, 0.48, 0.48, 0.41, 0.36, 5.41×10^{-3} , 1.30×10^{-3} and 1.48×10^{-4} , respectively. This study elucidated the metabolic regulatory mechanism underlying the inhibition of *H. armigera* growth and development by EN, providing a theoretical basis for the development and utilization of this compound.

Key words: Eurycomanone; *Helicoverpa armigera*; growth and development; metabolomics; differential metabolites

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属鳞翅目夜蛾科，是我国棉花的主要害虫之一（李兵发，2021）。幼虫以棉花蕾铃为食，导致蕾铃干枯、脱落，减少棉花产量（杨晓红，2020）；取食棉花嫩叶，导致棉花纤维破坏呈水渍状，影响棉花的品质（伍琦等，2018）；此外钻蛀棉花青铃，可诱发多种病菌侵染，导致棉花生长发育异常，甚至死亡（黄庆超，2020）。同时棉铃虫具有多食杂食的特点，对多种重要经济作物均可造成极其严重的危害，给全球农业造成了巨大的经济损失（黄云等，2022）。目前国内外防治棉铃虫危害的主要方法是施用化学农药，其虽然能够有效地降低棉铃虫的危害，但由于化学农药长期单一不合理的施用，会诱发棉铃虫产生抗药性（胡红岩等，2021；Stavarakaki *et al.*, 2024）。据报道，棉铃虫对氯虫苯甲酰胺及三氟氯氰菊酯已产生中等水平抗性，抗性倍数为 10.03 倍和 10.79 倍（王冬梅等，2020），且滥用化学农药也导致农药残留、污染环境和危害人体健康等问题突出。因此，寻找一种更加环保、安全、高效的棉铃虫防治方法成为了当前研究的热点之一。

植物源杀虫剂因具有独特的作用方式，且对环境和人畜安全，不易产生抗药性等优势，已被广泛应用于害虫防治方面（Huang *et al.*, 2010；于忻滢等，2021）。据不完全统计，全世界已报道的对昆虫具有杀虫活性的植物提取物有 1 005 种（李卓丽等，2022）。其中，一些植物提取物如苦参碱、除虫菊酯和印楝素等已被证明可以有效的防治棉铃虫危害，这为棉铃虫的防治提供了新的思路和途径（郭梅燕等，2020；郑凯元等，2022；常彦鹏等，2023）。宽缨酮 Eurycomanone, EN 是一种来源于东革阿里 *Eurycoma longifolia* 根部的苦木素二萜类化合物（周聪等，2020）。研究发现宽缨酮对白血病细胞 Jurkat 和 HL-60 具有较强的抑制作用，其抑制率分别为 80.2%和 96.0%（Tung *et al.*, 2017）；且对恶性疟原虫 W2 和 D6 的杀灭作用较强，其 IC₅₀ 分别为 14.912 ng/mL 和 26.094 ng/mL（Chan *et al.*, 2004）。近年来，本研究发现宽缨酮可显著抑制棉铃虫幼虫的生长发育，以 10 μg/g 宽缨酮的饲料饲喂棉铃虫幼虫，在第 11 天幼虫体重相比对照下降了 88.04%（梁赫等，2023），但其毒理机制尚未解析。

代谢组学作为一种新的技术手段，可以全面、高通量地分析生物体内代谢产物的种类和含量变化，从而揭示生物体内代谢产物与生物功能之间的关系（Ma and Qi, 2021；崔艺琳等，2022；黄文洁等，2022）。鉴于宽缨酮对棉铃虫幼虫具有较好的生长发育抑制活性，但其在幼虫生长发育过程中代谢物及代谢途径的影响尚不清楚。因此，本研究旨在通过代谢组

学技术寻找宽缨酮抑制棉铃虫幼虫生长发育的差异代谢物和主要信号通路,阐明其作用机制,从而为寻找一种更加环保、安全、高效的棉铃虫防治方法提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 供试昆虫饲养

棉铃虫培育:供试棉铃虫由广东省农业科学院果树研究所优稀水果研究室提供。在室内使用人工饲料(蒋金炜,2010)进行饲养,将初孵幼虫接入放有人工饲料的扎孔灭菌培养瓶中,后将3龄初期幼虫转移到瓶中单头饲养,化蛹后将蛹消毒,置于盖有白色纱布的饲养盒中待其羽化,成虫用10%蜂蜜水补充营养。每天更换纱布,将带卵纱布放入自封袋中,于恒温培养箱中培养,待其孵化后按照上述方法继续饲养下一代。养虫所用的工具及器皿在使用前后均严格消毒。

饲养条件:使用人工饲料在恒温恒湿光照箱中饲养,温度 $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $70\%\pm 10\%$,光周期L:D=14 h:10 h。

1.2 仪器与试剂

供试药剂:宽缨酮,纯度 $\geq 98\%$,CAS号:84633-29-4,购于四川省维克奇生物科技有限公司,其化学结构式如图1;井冈霉素,纯度 $\geq 98\%$,CAS号:37248-47-8,购于上海源叶生物科技有限公司;氟苯脲,纯度 $\geq 98\%$,CAS号:83121-18-0,坛墨质检科技股份有限公司,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),纯度 $\geq 99.8\%$,购于北京索莱宝科技有限公司;Tween-80(A100442-0500),购于上海博格隆生物技术公司。甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵均为色谱级,氨水 $\geq 25\%$ in H_2O 购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

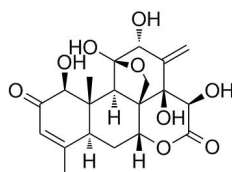


图1 宽缨酮结构式

Fig. 1 The chemical structural formula of eurycomanone

供试仪器:SPX-250B-G型微电脑光照培养箱购自上海博迅实业有限公司;FB224电子天平(1/10000)由上海舜宇恒平科学仪器有限公司提供;体视显微镜(MZ101)和显微镜相机(MSX2)购于广州市明美光电技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 宽缨酮对棉铃虫生长发育的影响

采用饲料混毒法（吴文君，1998）测定棉铃虫的生长发育指标。设未添加任何物质的正常饲料为对照组I；称取一定量固体饲料，按比例加入宽缨酮溶液并充分搅拌混合均匀，使宽缨酮含量为 10 $\mu\text{g/g}$ ，设为处理组II；取 3 份等体积未添加任何物质的正常饲料，分别加入胰蛋白胍、蔗糖和甘油三大营养物质，使其含量为总体积的 10%，并添加宽缨酮溶液，使其含量与处理组II一致（10 $\mu\text{g/g}$ ），设为处理组III、IV、V。每个处理选取 50 头发育健康、体长一致的 2 龄初幼虫单独饲养，每个处理 3 次重复。每天观察记录幼虫的体重及龄期的变化情况，直至蛹羽化，及时更换新鲜饲料。

1.3.2 样品制备与提取

在恒温培养箱中培养 24 h 后，将各处理棉铃虫幼虫分别收集到 2 mL 离心管中，液氮下研磨均匀，称量样本 20 ± 1 mg 液氮速冻，放于 -80°C 冰箱保存备用。每个处理 3 个生物学重复，用于代谢组学分析。同时，取出样本放到对应编号离心管中，加入 70% 甲醇水内标提取液 400 μL ，1 500 r/min 振荡 5 min，冰上静置 15 min； 4°C 条件下，12 000 r/min 离心 10 min，移取上清液 300 μL 到另一对应编号离心管， -20°C 冰箱中静置 30 min； 4°C 条件下，12 000 r/min 再离心 3 min，移取上清液 200 μL 到对应进样瓶内衬管，用于上机分析。

1.3.3 色谱质谱检测条件

液相色谱条件：色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18（1.8 μm ，2.1 mm \times 100 mm）；流动相 A 相为超纯水（含 0.1% 甲酸），B 相为乙腈（含 0.1% 甲酸）。流速为 0.4 mL/min；柱温为 40°C ；每个样品取 2 μL （杨帆，2020）洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase gradient elution

时间 (min) Time	流动相 A Mobile phase A	流动相 B Mobile phase B
0	95	5
11	10	90
12	10	90
12.1	95	5
14	95	5

质谱条件：电喷雾离子源（electrospray ionization, ESI）：雾化温度 500°C ，质谱电压 5 500 V 和 -4 500 V，离子源气体 I（GS I）55 psi，气体 II（GS II）60 psi，气帘气（curtain gas, CUR）25 psi，碰撞诱导电离（collision-activated dissociation, CAD）参数设置为高（徐岩，

2020)。

1.4 数据分析

利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据，正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 分析代谢物的变化。差异代谢物采用 VIP ($VIP \geq 1$) 和绝对 Log_2FC ($|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 1.0$) 进行测定，VIP 值从 OPLS-DA 结果中提取 (张娜娜, 2020)。利用 KEGG 化合物数据库 (<http://www.kegg.jp/kegg/compound>) 对鉴定出的代谢物进行注释。试验数据整理和统计学分析采用 SPSS 20.0、Excel 2016 软件，Origin 2017 绘图。

2 结果与分析

2.1 宽缨酮对棉铃虫生长发育的影响

2.1.1 宽缨酮对棉铃虫生长抑制作用

结果表明， $10 \mu\text{g/g}$ 宽缨酮可显著抑制棉铃虫的生长发育。处理组 II、III、IV、V 幼虫体重显著低于对照组 I ($P < 0.05$)，III 组 (胰蛋白胨) 和 IV 组 (蔗糖) 幼虫体重显著高于处理组 II 和处理组 V (图 2-A)。随时间增加，对照组 I 幼虫体重增长迅速，第 12 天发育至 5 龄，体重 4.16 g ，分别是 IV 组 (4 龄， 2.74 g)、III 组 (4 龄， 2.62 g)、II 组 (3 龄， 1.79 g) 和 V 组 (3 龄， 1.78 g) 体重的 1.52、1.58、2.32 和 2.34 倍。对照组 I 平均蛹重 0.2980 g ，显著高于其余各组，分别为 II、III、IV、V 组的 1.35、1.32、1.29、1.42 倍 (图 2-B)。

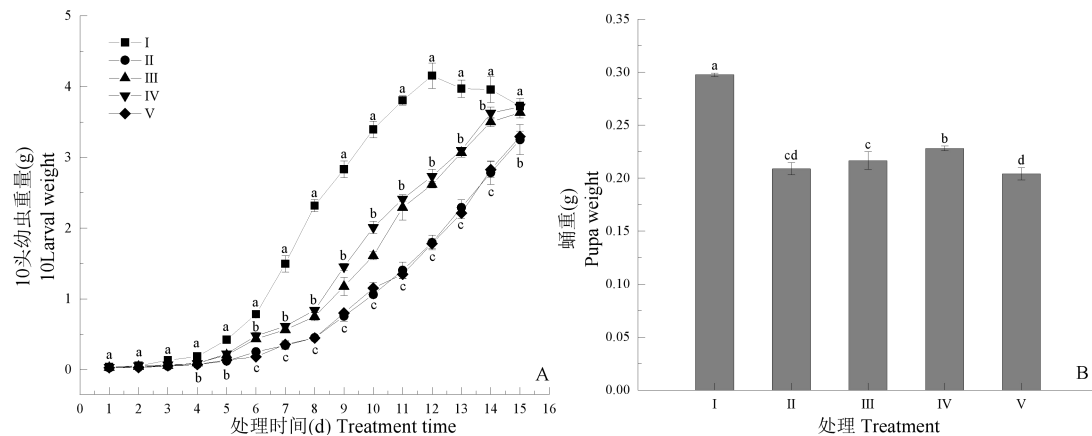


图 2 宽缨酮抑制棉铃虫幼虫的生长发育

Fig. 2 Effects of eurycomanone on the growth and development of *Helicoverpa armigera* larvae

注：A，不同营养物质与 $10 \mu\text{g/g}$ 宽缨酮共同处理棉铃虫 2 龄幼虫后饲养不同时间的体重变化；B，不同营养物质与 $10 \mu\text{g/g}$ 宽缨酮共同处理棉铃虫后蛹重的变化。使用单因素方差分析和邓肯氏多重比较进行样本之间的显著性分析，不同字母代表显著差异 ($P < 0.05$)。Note: A, Weight changes of the 2nd instar larvae of *Helicoverpa armigera* treated with different nutrients and $10 \mu\text{g/g}$ eurycomanone at different feeding times; B, The change of the pupa weight of *Helicoverpa armigera* after eurycomanone treatment with

different nutrients and 10 $\mu\text{g/g}$ curycomanone. Analysis of significance between samples was performed using one-way ANOVA and Duncan's multiple comparisons, with different letters representing significant differences ($P < 0.05$).

2.1.2 宽纓酮对棉铃虫生长表型及发育指标的影响

饲喂不同营养物质后,可不同程度的影响宽纓酮调控下棉铃虫的化蛹率和羽化率。添加胰蛋白胨和蔗糖对宽纓酮处理的幼虫生长发育有一定恢复作用,添加甘油则无显著影响。处理组II化蛹率和羽化率最低,分别为60.00%和50.00%,较对照组I的化蛹率(90.67%)和羽化率(85.33%)分别降低33.82%和29.68%。与处理II、V组相比,其余各组化蛹率和羽化率显著上升($P < 0.05$)。10 $\mu\text{g/g}$ 宽纓酮处理棉铃虫,可抑制其生长发育、导致蛹畸形和成虫翅膀发育不完整等。对照组I和处理组III、IV的蛹畸形率分别为7.33%、35.33%和35.67%,翅畸形率分别为5.33%、22.67%和20.67%;与处理组II相比其蛹畸形率分别下降了82.68%、16.53%和15.73%,翅畸形率分别下降了85.85%、39.82%和45.13%(图3-B)。

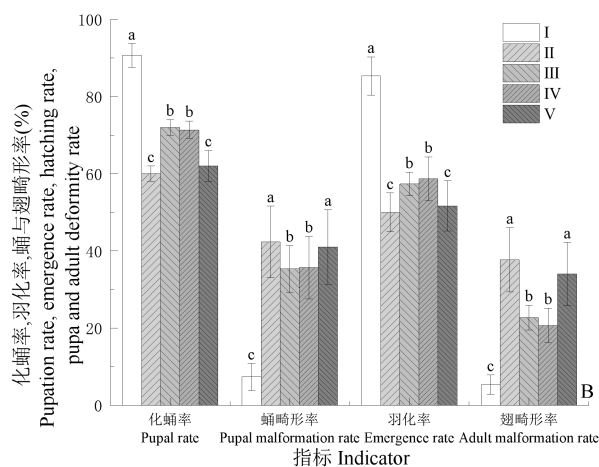
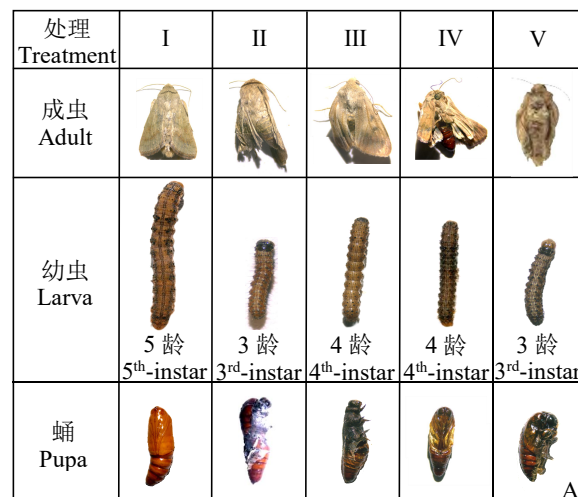


图3 宽纓酮对棉铃虫成虫翅发育、幼虫生长、蛹形态和发育指标的影响

Fig. 3 Effects of curycomanone on wing development in adult *Helicoverpa armigera*, larval growth, pupal morphology, and developmental indicators

注：A，I、II、III、IV、V分别为健康对照、EN处理、EN+10%胰蛋白胨、蔗糖、甘油处理；B，为宽缙酮对棉铃虫化蛹率、蛹畸形率、羽化率、成虫畸形率的影响。使用单因素方差分析和邓肯氏多重比较进行样本之间的显著性分析，不同字母代表显著差异 ($P < 0.05$)。Note: A: I, II, III, IV and V were healthy control, EN treatment, EN+10% tryptone, sucrose and glycerol treatment respectively; B, Effects of eurycomanone on the pupal rate, pupal malformation rate, emergence rate, adult malformation rate of *Helicoverpa armigera*, with different letters representing significant differences ($P < 0.05$)

2.2 代谢组样品检测

2.2.1 样本质控分析

利用软件 Analyst 1.6.3 处理质谱数据，绘制混样质控 QC 样本的总离子流图 (Total ions current, TIC) (孙立民, 2019)。检测结果表明，代谢物检测总离子流的曲线重叠性高，即保留时间和峰强度均一致 (图 4)，表明质谱信号稳定性较好，仪器稳定性高，数据重复性和可靠性强。

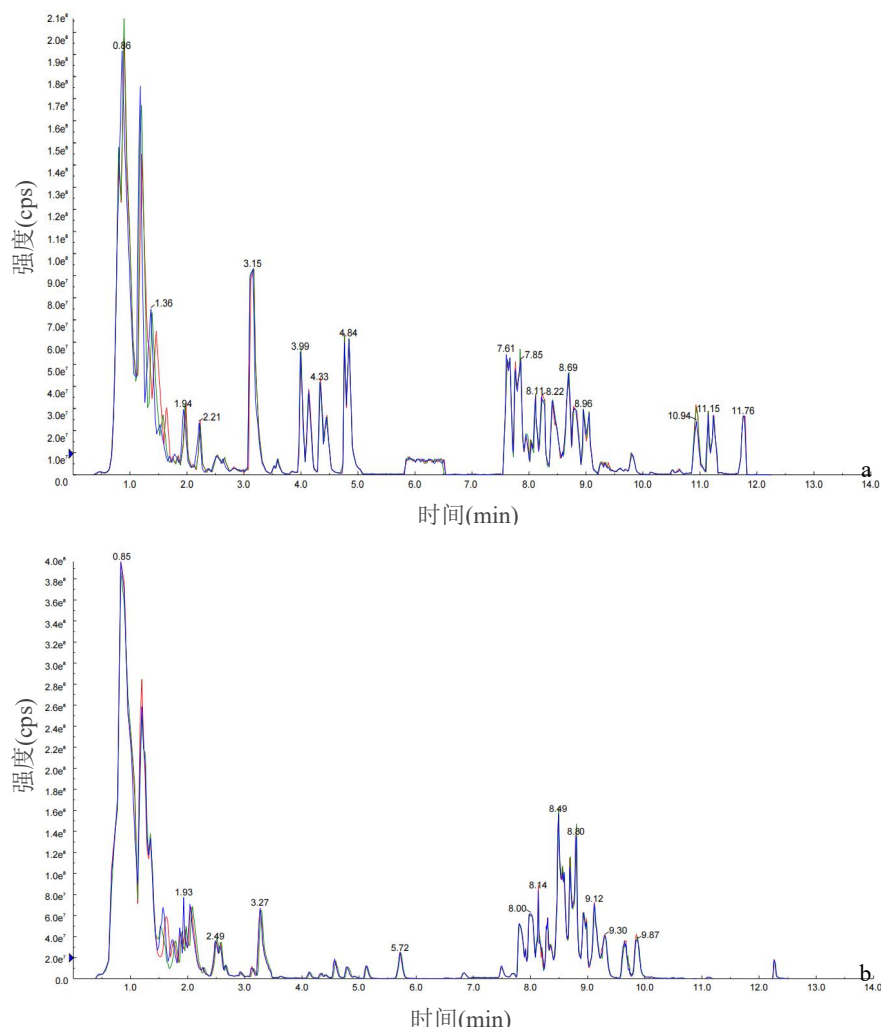


图 4 QC 样品质谱检测总离子流重叠图 (TIC)

Fig. 4 Overlap diagrams of total ion chromatogram detected by mass spectrometry of QC samples

注：a，在负离子模式下进行检测；b，在正离子模式下进行检测；横坐标，代表对宽缙酮代谢物测定时检测产物的残留时间（Rt，残留时间）；纵坐标，代表对离子测定时的离子流强度（强度单位为 Cps，每秒计数）。Note: a, Detection was carried out in negative ion mode; b, Detection in positive ion mode; Horizontal axis, Represented the residual time (Rt, Retention time) of the product detected during the determination of the metabolite of lanthanone; Ordinate, The intensity of the ion current at the time of ion measurement (intensity in Cps, counted per second).

2.2.2 正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）分析

为了充分分析所有样本间的差异代谢物，利用 OPLS-DA 评价模型进一步分析。对样本代谢物进行正交偏最小二乘模型识别分析，OPLS-DA 验证图显示，自变量 X 和因变量 Y 的解析率分别为 $R^2X = 0.490$ 、 $R^2Y = 1.00$ ，预测能力为 $Q^2 = 0.776$ ，表现出良好的拟合和预测能力，模型为有效模型，样本数据真实可靠度较高，稳定性和预测能力较强（图 5）。

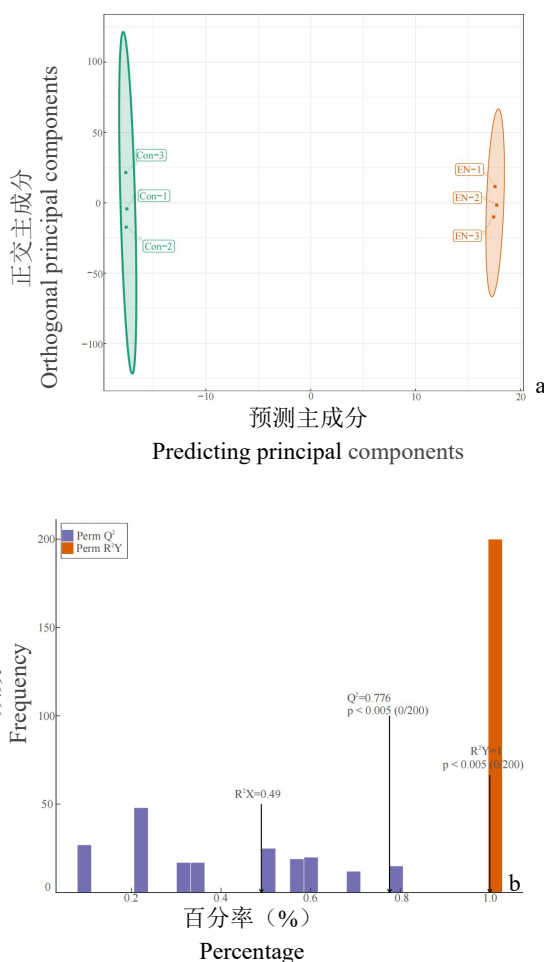


图 5 正离子模式下 OPLS-DA 得分图及 OPLS-DA 置换检验图

Fig. 5 OPLS-DA score in positive ion mode and OPLS-DA displacement test plot

注：a，OPLS-DA 得分图；横坐标，预测主成分；纵坐标，正交主成分；图中的每个点表示一个样品，同一个组的样品使用同一种颜色表示；b，OPLS-DA 检验图；横坐标表示模型 R^2Y 、 Q^2 值；纵坐标表示模型分类效果出现的频数；图中橙色，随机分

组模型 R^2Y ; 紫色, 随机分组模型 Q^2 ; 黑色箭头, 原始模型的 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 值。Note: a, OPLS-DA score plot; Abscissa, predicted principal component; Ordinate, orthogonal principal component; Each dot in the plot represented a sample, and samples from the same group are represented by the same color; b, OPLS-DA test diagram; The abscissa represented the R^2Y and Q^2 values of the model; The ordinate represented the frequency of the model's classification effect; Orange in the figure, randomized model R^2Y ; purple, randomized model Q^2 ; Black arrows, R^2X , R^2Y , and Q^2 values for the original model.

2.3 代谢物的鉴定与分类

经结构鉴定, 样本共得到 1 135 种代谢物, 包含氨基酸及其衍生物、有机酸及其衍生物、核苷酸及其代谢物、苯及衍生物、杂环化合物、甘油磷脂类、碳水化合物及其代谢物、醇和胺类等 16 大类活性物质 (表 2)。其中氨基酸及其衍生物种类最多, 有 402 种, 占代谢物总数的 34.0%; 其次为有机酸及其衍生物和核苷酸及其代谢物, 分别占总代谢物数量的 13.6% 和 10.3%, 苯及衍生物、杂环化合物、甘油磷脂类、碳水化合物及其代谢物、脂肪酰类占代谢物总数的 5%~7%, 醇和胺类、辅酶和维生素、激素及激素相关物质、其他、鞘脂类等代谢物数量较少, 占代谢物总数的 5% 以下。

表 2 主要代谢物分类和数量

Table 2 Type and number of major metabolite

分类 Type	数量 Number	所占比例 (%) Percentage
氨基酸及其代谢物 Amino acid and its metabolites	402	34.0
有机酸及其衍生物 Organic acid and its derivatives	161	13.6
核苷酸及其代谢物 Nucleotide and its metabolites	122	10.3
苯及衍生物 Benzene and substituted derivatives	76	6.4
杂环化合物 Heterocyclic compounds	76	6.4
甘油磷脂类 GP	75	6.3
碳水化合物及其代谢物 Carbohydrates and its metabolites	74	6.2
脂肪酰类 FA	70	5.9
醇和胺类 Alcohol and amines	52	4.4
辅酶和维生素 CoEnzyme and vitamins	30	2.5
激素及激素相关物质 Hormones and hormone related compounds	20	1.6
其他 Others	7	0.5
鞘脂类 SL	5	0.4

色胺、胆碱、色素 Tryptamines, Cholines, Pigments	5	0.4
胆汁酸 Bile acids	4	0.3
醛、酮、酯类 Aldehyde, Ketones, Esters	1	< 0.1

2.4 差异代谢物鉴定分析

通过 OPLS-DA 并结合 T 检验筛选差异表达代谢物, 在宽缙酮处理与对照组中共筛选获得 19 个差异代谢物 (8 个代谢物下调和 11 个上调), 其中氨基酸及其代谢物 5 个, 核苷酸及其代谢物 4 个, 脂肪酰类 3 个, 醇和胺类 2 个, 有机酸及其衍生物 2 个, 苯及其衍生物 1 个, 杂环化合物 1 个, 碳水化合物及其代谢物 1 个 (表 3)。各种差异代谢物的相对含量存在明显差异 (图 6), 其中下调表达的有 L-蛋氨酸 (L-Methionine)、十八碳二烯酰胺 (Octadecadienamide)、L-酒石酸 (L-Tartaric acid)、腺嘌呤核苷三磷酸 (Adenosine triphosphate, ATP)、胞苷-5'-三磷酸 (Cytidine-5'-triphosphate, CTP)、 β -D-呋喃果糖基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (β -D-Furanofructose group- α -D-glucopyranoside)、香菇嘌呤 (Eritadenine) 和 L-多巴 (L-Dopa), 差异倍数均小于 0.5 倍; 含量显著升高的分别是甲磺酸 (Methanesulfonic acid)、蛋氨酸亚砷 (Methionine sulfoxide)、3-O-甲基多巴 (3-O-Methyldopa) 和 3,4-二羟基苯乙酸 (3,4-Dihydroxybenzeneacetic acid), 差异倍数分别为 119.80、3.34、2.40 和 2.38 倍。

表 3 差异代谢物分类

Table 3 Classification of differential metabolites

类别 Class	总数 Total	上调 Up	下调 Down
氨基酸及其代谢物 Amino acid and its metabolites	5	3	2
核苷酸及其代谢物 Nucleotide and its metabolites	4	2	2
脂肪酰类 FA	3	3	0
醇和胺类 Alcohol and amines	2	1	1
有机酸及其衍生物 Organic acid and its derivatives	2	1	1
苯及其衍生物 Benzene and substituted derivatives	1	1	0
杂环化合物 Heterocyclic compounds	1	0	1
碳水化合物及其代谢物 Carbohydrates and its metabolites	1	0	1

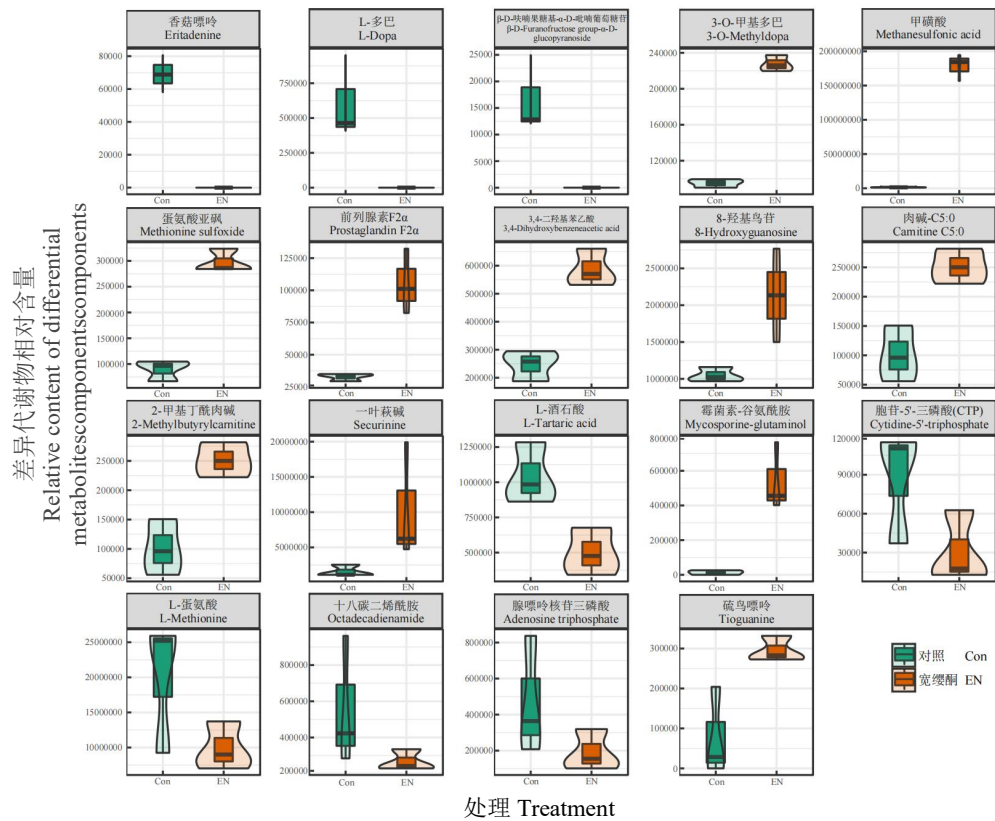


图 6 差异代谢物含量变化图

Fig. 6 Changes of differential metabolite content

2.5 差异代谢物 KEGG 功能注释及富集分析

利用 KEGG 数据库对差异代谢物的功能注释显示，差异代谢物富集到 4 大类（新陈代谢、遗传信息、环境信息处理和细胞过程）19 个代谢通路（表 4），其中代谢途径构成了新陈代谢类的 90%，其次是辅因子的生物合成，占 30%；核苷酸代谢、半胱氨酸和神经活性配体-受体相互作用通路占有较少，为 20%，注释到硫代谢、嘧啶代谢、嘌呤代谢和氧化磷酸化等代谢通路的差异代谢物最少，占代谢物总数的 10%。此外，氨酰基 tRNA 生物合成遗传信息处理的 20%，神经活性配体-受体相互作用占环境信息处理 10%，溶酶体占细胞过程的 10%。

表 4 差异代谢物的 KEGG 分类

Table 4 Classification of differential metabolites KEGG

代谢通路	总数	百分比 (%)	KEGG 分类
Metabolic pathway	Total	Percentage	KEGG Classification
代谢途径 Metabolic pathways	9	90	新陈代谢 Metabolism
辅因子的生物合成 Biosynthesis of cofactors	3	30	新陈代谢 Metabolism

酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	2	20	新陈代谢 Metabolism
核苷酸代谢 Nucleotide metabolism	2	20	新陈代谢 Metabolism
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	2	20	新陈代谢 Metabolism
硫代谢 Sulfur metabolism	1	10	新陈代谢 Metabolism
嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	1	10	新陈代谢 Metabolism
嘌呤代谢 Purine metabolism	1	10	新陈代谢 Metabolism
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	1	10	新陈代谢 Metabolism
甘露糖型 O-聚糖生物合成 Maose type O-glycan biosynthesis	1	10	新陈代谢 Metabolism
乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1	10	新陈代谢 Metabolism
药物代谢-其他酶 Drug metabolism-other enzymes	1	10	新陈代谢 Metabolism
D-氨基酸代谢 D-Amino acid metabolism	1	10	新陈代谢 Metabolism
氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	1	10	新陈代谢 Metabolism
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	1	10	新陈代谢 Metabolism
2-草酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	1	10	新陈代谢 Metabolism
氨酰基-tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	1	10	Genetic Information Processing
			遗传信息处理
神经活性配体-受体相互作用 Neuroactive ligand-receptor interaction	2	20	Environmental Information Processing Cellular
			环境信息处理
溶酶体 Lysosome	1	10	Processes 细胞过程

3 结论与讨论

宽缨酮是东革阿里中最具代表性的功能性成分，具有多种生物活性（徐梦婷，2021）。本团队前期研究发现宽缨酮对棉铃虫幼虫具有明显的拒食和生长发育抑制活性（梁赫等，2023）。本研究发现添加蔗糖和胰蛋白胨对宽缨酮处理后幼虫的生长发育有一定恢复作用，其体重明显增加，化蛹率和羽化率显著提升，而添加甘油后则无显著影响。蛋白质和碳水化合物是昆虫生长发育所需氨基酸和能量的来源（刘敏等，2021；庄明亮等，2022），作为储能物质脂类一般由蛋白质和碳水化合物积累转化而来，直接添加进饲料，对昆虫生长发育影响不显著（Simpson and Raubenheimer, 2012；张杨等，2021）。研究表明，饲料中添加蛋白质和糖，可提升甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 幼虫的存活率及蛹重（曹玲，2007）。综上，

宽繆酮抑制棉铃虫幼虫生长发育与营养成分的供给息息相关,可能是干扰了其体内氨基酸和糖类积累所致。

本研究筛选出宽繆酮处理后的 19 个差异代谢物,主要以氨基酸及代谢物、核苷酸及其代谢物和脂肪酰类为主,其中蛋氨酸亚砷是影响棉铃虫幼虫氨基酸代谢最显著的差异代谢物 ($P < 0.05$)。研究表明,生物体发生氧化损伤时,蛋白质中的蛋氨酸残基被活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 氧化成蛋氨酸亚砷,破坏蛋白质的结构和功能,进而影响氨基酸、核酸和碳水化合物等物质代谢(王正旋和杨林,2022)。与对照相比,腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)和胞苷-5'-三磷酸(CTP)显著下调,说明宽繆酮处理后棉铃虫的能量代谢明显降低;同时,L-多巴(L-Dopa)为下调最明显的氨基酸代谢物,由于多巴胺(Dopamine, DA)是重要的神经递质,参与昆虫的各种生命活动,是其生长发育过程中不可或缺的生物胺之一(张文慧等,2014)。鉴于昆虫抵抗外源有毒物需要消耗能量(王振越,2021),推测能量代谢降低、L-多巴的大量减少可能是宽繆酮抑制棉铃虫生长发育的主要原因。KEGG 注释发现,宽繆酮处理棉铃虫幼虫体内差异代谢物主要富集在代谢途径、辅因子的生物合成、核苷酸代谢和半胱氨酸代谢通路,这与印楝素对桔小实蝇幼虫的氨基酸、碳水化合物、核苷酸和辅因子等代谢具有显著影响(周游,2020),以及氟虫腈能够显著调节小菜蛾体内的蛋氨酸、酪氨酸、葡萄糖和乙醇胺等差异代谢物的结果类似(陈伟军,2017)。

综上所述,本研究测定了营养物质蔗糖、胰蛋白胨和甘油与宽繆酮混配对棉铃虫幼虫的生物活性,结合代谢组学技术明确了氨基酸、碳水化合物和核苷酸等能量代谢可能是宽繆酮抑制棉铃虫生长发育的主要途径,发现宽繆酮的毒理机理可能与活性氧过度积累导致营养物质代谢紊乱,进而干扰其生长发育,为天然产物宽繆酮的开发利用提供了理论依据,但这仍需要后续研究进一步验证。

参考文献 (References)

- Cao L. Study on the Effects of Different Diets on the Development, Reproduction and Energy Substances of *Spodoptera exigua* [D]. Chongqing: Southwest University, 2007. [曹玲. 不同食料对甜菜夜蛾发育繁殖和能源物质的影响研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2007]
- Chan KL, Choo CY, Abdullah NR, et al. Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifolia jack* using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum* [J]. *Journal of Ethnopharmacol*, 2004, 92 (2-3): 223-227.
- Chang YP, Zhang B, Geng ZC, et al. Molecular mechanism of abnormal molting of *Helicoverpa armigera* larvae caused by azadirachtin inhibiting gene transcription [J]. *China Journal of Biological Control*, 2023, 39 (3): 550-559. [常彦鹏, 张博, 耿梓宸, 等. 印楝素抑制基因转录导致棉铃虫幼虫蜕皮变态异常的分子机理 [J]. 中国生物防治学报, 2023, 39 (3): 550-559]

- Chen WJ. Resistance Analysis of *Plutella xylostella* to Fipronil Based on Metabonomic Data [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2017. [陈伟军. 基于代谢组数据的小菜蛾氟虫腈抗性分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2017]
- Cui YL, Yu XP, Li DT. Overview and prospect of metabonomics of rice pests [J]. *Acta Applied Entomology*, 2022, 59 (5): 950-959. [崔艺琳, 俞晓平, 李丹婷. 水稻害虫代谢组学研究概况与展望 [J]. 应用昆虫学报, 2022, 59 (5): 950-959]
- Guo MY, Chen YG, Wang XF, *et al.* The application effect of biological pesticides in the control of *Helicoverpa assulta*/*Helicoverpa armigera* [J]. *Tobacco Science and Technology*, 2020, 53 (7): 19-25. [郭梅燕, 陈玉国, 王雪芬, 等. 生物农药在烟田烟青虫/棉铃虫防治中的应用效果 [J]. 烟草科技, 2020, 53 (7): 19-25]
- Hu HY, Ren XL, Ma XY, *et al.* Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera* to three insecticides in North China cotton region [J]. *Journal of Plant Protection*, 2021, 48 (4): 900-906. [胡红岩, 任相亮, 马小艳, 等. 华北棉区棉铃虫对三种杀虫剂的抗性监测 [J]. 植物保护学报, 2021, 48 (4): 900-906]
- Huang QC. Toxicity Determination of Insecticides to Main Pests in Cotton Field and Safety Evaluation of *Harmonia axyridis* [D]. Shihezi: Shihezi University, 2020. [黄庆超. 杀虫剂对棉田主要害虫毒力测定及多异瓢虫安全性评价 [D]. 石河子: 石河子大学, 2020]
- Huang S, Rui W, Peng X, *et al.* Organic carbon fractions affected by long-term fertilization in a subtropical paddy soil [J]. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2010, 86 (1): 153-160.
- Huang WJ, Wu SW, Liu R, *et al.* Research progress of metabonomics data analysis technology based on mass spectrometry [J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2022, 49 (11): 96-109. [黄文洁, 吴绍文, 刘蕊, 等. 基于质谱的代谢组学数据分析技术研究进展 [J]. 广东农业科学, 2022, 49 (11): 96-109]
- Huang Y, Wu PZ, Zheng JY, *et al.* Resistance status and molecular mechanism of *Helicoverpa armigera* to chemical insecticides [J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49 (1): 336-350. [黄云, 吴沛卓, 郑钧月, 等. 棉铃虫对化学杀虫剂的抗性现状及分子机制研究进展 [J]. 植物保护学报, 2022, 49 (1): 336-350]
- Jiang JW, Ding SB, Zhang YM, *et al.* Effects of artificial feed on the growth and fecundity of *Helicoverpa armigera* [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2010, 44 (1): 78-82. [蒋金炜, 丁识伯, 张艳民, 等. 人工饲料对棉铃虫生长发育和繁殖力的影响 [J]. 河南农业大学学报, 2010, 44 (1): 78-82.]
- Li BF. Study on integrated control of *Helicoverpa armigera* [J]. *Peasant Staff*, 2021, 23: 47-48. [李兵发. 棉铃虫综合防治研究 [J]. 农家参谋, 2021, 23: 47-48]
- Li ZL, Xu JH, Li QD, *et al.* Research progress of botanical pesticides [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38 (21): 97-104. [李卓丽, 许见辉, 李启东, 等. 植物源杀虫剂研究进展 [J]. 中国农学通报, 2022, 38 (21): 97-104]
- Liang H, Shao XH, Qin ZX, *et al.* Effects of eurycomanone on antifeedant activity and growth of *Helicoverpa armigera* [J]. *Plant Protection*, 2023, 49 (1): 89-95. [梁赫, 邵雪花, 秦子昕, 等. 宽缨酮对棉铃虫的拒食活性及生长发育的影响 [J]. 植物保护, 2023, 49 (1): 89-95]

- Liu M, Liu AP, Han HB, *et al.* Differential expression analysis of diapause-related genes related to carbohydrate metabolism in *Lysiphlebus testaceipes* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (1): 147-157. [刘敏, 刘爱萍, 韩海斌, 等. 茶足柄瘤蚜蜜蜂碳水化合物代谢相关的滞育关联基因差异表达分析 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (1): 147-157]
- Ma A, Qi XQ. Mining plant metabolomes: Methods applications, and perspectives [J]. *Plant Communications*, 2021, 2 (5): 14
- Simpson JS, Raubenheimer D. The Nature of Nutrition: A Unifying Framework from Animal Adaptation to Human Obesity [M]. Princeton: Princeton University Press, 2012.
- Stavrakaki M, Ilias A, Simoglou K B, *et al.* Revision of *Helicoverpa armigera* insecticide resistance status in Greece [J]. *Crop Protection*, 2024, 175: 106446.
- Sun LM. Analysis of Transcription, Protein and Metabolic Regulation Mechanism of Flavonoid Synthesis in Ginkgo Biloba Leaves [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019. [孙立民. 银杏叶黄酮类化合物合成的转录、蛋白及代谢调控机制分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019]
- Tung NH, Uto T, Hai NT, *et al.* Quassinoids from the root of *Eurycoma longifolia* and their antiproliferative activity on human cancer cell lines [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2017, 13 (51): 459-462.
- Wang DM, Li HQ, Ding RF, *et al.* Resistance of *Helicoverpa armigera* population to three chemicals in Xinjiang [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47 (1): 211-212. [王冬梅, 李海强, 丁瑞丰, 等. 新疆棉铃虫种群对三种化学药剂的抗性 [J]. 植物保护学报, 2020, 47 (1): 211-212]
- Wang ZX, Yang L. Molecular mechanism of endogenous antioxidation based on methionine metabolism regulation [J]. *Bioinformatics*, 2022, 20 (3): 149-154. [王正旋, 杨林. 基于蛋氨酸代谢调控的内源性抗氧化分子机制 [J]. 生物信息学, 2022, 20 (3): 149-154]
- Wang ZY. Effects of Poplar Secondary Substances on the Growth and Development of *Lymantria dispar* and Main Detoxification Enzymes [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2021. [王振越. 杨树主要次生物质对舞毒蛾生长发育及主要解毒酶影响 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021]
- Wu Q, Liu ZW, Wu ZJ. Damage characteristics and integrated control measures of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura* in Northern Jiangxi [J]. *Cotton Science*, 2018, 40 (6): 30-34. [伍琦, 刘志文, 吴振江. 赣北地区棉铃虫及斜纹夜蛾的为害特征与综合防治措施 [J]. 棉花科学, 2018, 40 (6): 30-34]
- Wu WJ. Natural product pesticides-principles, methods and practices [J]. *Pesticide Translation*, 1998, 4: 56. [吴文君. 天然产物杀虫剂——原理·方法·实践 [J]. [农药译丛, 1998, 4: 56]
- Xu MT. Study on Pharmacological Mechanism of Eurycomanone Against Colorectal Cancer by Inhibiting Autophagy and Angiogenesis [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021. [徐梦婷. 宽绶酮通过抑制自噬与血管生成抗结直肠癌的药理学机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2021]
- Xu Y. Protective Effect and Mechanism of TGF- β /Smads/ERK Signaling Pathway Mediated by Pilose Antler Polypeptide on

- Adriamycin-induced Myocardial Injury [D]. Changchun: Changchun University of Traditional Chinese Medicine, 2020. [徐岩. 鹿茸多肽介导 TGF- β /Smads/ERK 信号通路对阿霉素诱导心肌损伤的保护作用及机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2020]
- Yang F. Preparation of Usnic Acid Nano-drug Delivery System and Preliminary Study on Its Attenuation [D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2020. [杨帆. 松萝酸纳米给药系统的制备及减毒作用的初步研究 [D]. 重庆: 重庆理工大学, 2020]
- Yang XH. Harm and control measures of *Helicoverpa armigera* in Urad Houqi, Inner Mongolia [J]. *Agricultural Engineering Technology*, 2020, 40 (8): 23. [杨晓红. 内蒙古乌拉特后旗棉铃虫危害及防治措施 [J]. 农业工程技术, 2020, 40 (8): 23]
- Yu XY, Zhang GL, Fan S, *et al.* Research progress of botanical pesticides [J]. *Heilongjiang Agricultural Science*, 2021, 7: 123-129. [于忻滢, 张国良, 范松, 等. 植物源农药研究进展 [J]. 黑龙江农业科学, 2021, 7: 123-129]
- Zhang NN. Study on Biomarkers of Type 2 Diabetes and Retinopathy Based on Metabonomics [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2020. [张娜娜. 基于代谢组学的 2 型糖尿病及视网膜病变的生物标志物研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2020]
- Zhang WH, Hou HX, Yang Q, *et al.* Effect of tebufenozide on gene expression of dopa decarboxylase in *Spodoptera litura* larvae [J]. *China Agricultural Science*, 2014, 47 (8): 1512-1521. [张文慧, 侯海霞, 杨琼, 等. 虫酰肼对斜纹夜蛾幼虫多巴脱羧酶基因表达的影响 [J]. 中国农业科学, 2014, 47 (8): 1512-1521]
- Zhang, Y, Xiu DY, Wang XD, *et al.* Effects of feed nutrients on biological and physiological characteristics of insects [J]. *Jilin Forestry Science and Technology*, 2021, 50 (4): 39-43. [张杨, 修冬莹, 王晓丹, 等. 饲料营养物质对昆虫生物学及生理特性的影响 [J]. 吉林林业科技, 2021, 50 (4): 39-43]
- Zheng KY, Huang HM, Zhang Y, *et al.* Insecticidal characteristics, action mechanism and application of pyrethroids from natural plants [J]. *Rural Science and Technology*, 2022, 13 (2): 51-53. [郑凯元, 黄慧明, 张瑜, 等. 天然植物源农药除虫菊酯的杀虫特性、作用机制及应用 [J]. 乡村科技, 2022, 13 (2): 51-53]
- Zhou C, Zhang YF, Wang JJ, *et al.* Research progress on pharmacological activities of eurycomanone and its analogues [J]. *Journal of Xiangnan University (Medical Edition)*, 2020, 22 (1): 71-75. [周聪, 张远芳, 王俊杰, 等. 宽缨酮及其类似物药理活性的研究进展 [J]. 湘南学院学报 (医学版), 2020, 22 (1): 71-75]
- Zhou Y. Metabonomics Study of Azadirachtin on *Bactrocera dorsalis* Larvae [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020. [周游. 印楝素对桔小实蝇幼虫的代谢组学研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2020]
- Zhuang ML, Li JF, Wang Z, *et al.* Effects of different protein diets on the physiological metabolism of worker bees under indoor sarong conditions [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2022, 44 (3): 579-585. [庄明亮, 李剑飞, 王志, 等. 室内纱笼条件下不同蛋白饲料对工蜂生理代谢的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (3): 579-585]