

● 江苏省蚕桑学会丛书

山下兴亚 博士

家蚕生理生化 研究专集

● 朱 江 ● 沈卫德 ● 戴玉锦编译

《江苏蚕业》

江苏省蚕桑学会丛书

家蚕生理生化研究专集

日本名古屋大学山下兴亚讲授

朱江 沈卫德 戴玉锦编译

8-8891

《江苏蚕业》编辑部

编译的话

山下兴亚博士的《家蚕生理生化研究专集》和大家见面了。本专集理论性强，内容新颖，富有实用性，反映了家蚕生理生化学和昆虫内分泌学八十年代的新水平。由于篇幅和印刷条件所限，许多很有价值的图片只能忍痛割爱。

全书编译后，由朱江同志审稿校订，插图由刘长贵同志翻拍，金维惠同志复墨。《江苏蚕业》编辑倪松年同志在出版过程中给予了大力协助。

本书编译工作得到江苏省丝绸总公司、苏州蚕桑专科学校领导及江苏省蚕桑学会的支持和帮助，全书完稿后，又承苏州蚕桑专科学校教授郑声镛先生作进一步校订，在此一并致谢。

由于我们的水平有限，错误之处在所难免，敬希读者批评指正。

1988年3月

序

日本名古屋大学农学部副教授山下兴亚博士应中国蚕桑学会、江苏省蚕桑学会和苏州蚕桑专科学校邀请，于1986年11月25日至12月14日来我国访问，先后在苏州蚕桑专科学校、中国农科院蚕业研究所和浙江农业大学进行了学术讲演。

山下兴亚博士长期致力于家蚕生理化学和昆虫内分泌学研究，取得了许多具有世界先进水平的学术成果。这次应邀来华讲学以专题形式重点介绍了自己的研究成果。

昆虫内分泌学是当代生物学重要领域之一。六十年代生物学中重大成就之一，是发现激素直接作用于遗传物质，这一观点首先由Karlson, P.等通过对昆虫摇蚊的研究提出，然后才在高等动物中获得证明。七十年代以来昆虫激素类似物和抗激素物质的人工合成以及近年来分子生物学对昆虫内分泌学的渗透，使该领域的研究面目一新。在这方面山下兴亚博士及其研究室以家蚕为实验材料开展了许多创造性的工作：家蚕滞育激素的研究；有效的抗蜕皮激素物质作用机理的研究；超龄幼虫、永久幼虫的诱导及其发生机理的研究等。

近年来，对昆虫卵黄蛋白及其激素调控的研究是昆虫生理学中最活跃的研究领域之一。在这方面山下博士所领导的研究小组对家蚕主要的卵黄蛋白从纯化、特性、激素调控到cDNA的克隆化，进行了系统、深入的研究，成果堪称世界一流。

讲学过程中，山下博士不但向听讲者介绍了新理论、新

观点和新技术，而且也带来了象“蚕卵长期保存”、“多种激素的综合应用”等实用效果很强的研究成果，给从事蚕桑生产的技术人员以启迪。山下博士还详细介绍了实验动机，试验过程中遇到的种种挫折，如何对试验结果作客观分析，从而推进试验深化的思想方法。他严谨的学风、谦逊的态度、锲而不舍的精神，这些都值得我国蚕业界同行认真学习。

为了使更多的读者了解山下兴亚博士的研究工作，更好地促进中日两国家蚕生理生化学者之间的学术交流，由江苏省蚕桑学会约请苏州蚕桑专科学校朱江、沈卫德、戴玉锦三位同志根据现场录音和他的有关参考文献编译成专辑，作为江苏省蚕桑学会丛书，刊印出版。此书可供从事家蚕和昆虫生理生化科研、教学以及与生产实践有关的人员参考。

山下博士在访华中多次谈到：世界蚕丝业的中心在东方。中国是丝绸大国，也是发源之地，日本有先进的蚕丝科学技术，中日两国理应真诚地合作，挑起发展世界蚕丝事业的重任。我们认为，山下先生的心愿也是中日两国蚕丝界人士的共同愿望。愿望经过努力和奋斗是完全可以实现的。

山下兴亚博士这次来我国讲学是成功的，在此致以衷心祝贺，并谨向促成这次访问讲学的日本蚕丝学会会长、东京大学教授吉武成美博士致以敬意，感谢他为中日两国蚕业科技交流和合作所作的不懈努力。

中国蚕学会副理事长

江苏省蚕桑学会理事长

朱竹雯 谨识

1988年3月于南京

目 录

第一部分 家蚕滞育的生理生化学	(1)
一、激素与滞育.....	(1)
二、滞育激素的化学.....	(12)
三、滞育激素的作用.....	(20)
四、滞育的代谢生理.....	(40)
第二部分 蚕卵和卵巢的长期保存	(62)
一、环境和内分泌调节的蚕卵长期保存.....	(62)
二、卵巢的超低温长期保存.....	(72)
第三部分 家蚕卵形成和胚胎发育的生理生化学	(78)
一、卵黄磷蛋白是否为胚胎发生所必需.....	(78)
二、卵特异蛋白的发现.....	(87)
三、卵特异蛋白的生物合成.....	(96)
四、卵特异蛋白 cDNA 的克隆化	(103)
五、卵特异蛋白在胚胎发生期间的分解和利用	(109)
第四部分 家蚕发育的内分泌调节	(128)
一、保幼激素和蜕皮激素的调节	(131)
二、抗蜕皮激素对发育的调节	(152)
附录: 山下兴亚业绩一览	(166)

第一部分 家蚕滞育的生理生化学

一、激素与滞育

(一) 内分泌学发展概略

现已查明，家蚕的滞育是一种内分泌现象。1842年，法国学者作了有名的实验（图1—1），将公鸡的睾丸摘除，公鸡的鸡冠变小，象母鸡一样，并失去了好斗的特性。若重新植入睾丸，鸡冠又变大，并且恢复好斗的特性。由此看来，雄鸡这些特性不是由全身，而是由某一器官决定的。这是一个重要的发现。19世纪末，俄国的巴甫洛夫派认为，生物体的一切活动都是由神经支配的。他们用狗作了这样的实验（图1—2）：狗吃肉后，胃即分泌胃液，胰脏即分泌消化



图1—1 公鸡阉割试验

A, 摘除睾丸的公鸡 B, 正常公鸡 C, 正常母鸡

酶。若在狗吃肉时摇铃，如此反复进行，以后狗听到铃声

（未吃到肉），胃和胰脏就分泌胃液和消化酶。

说明脑发出的神经控制着胃液和消化酶的分泌活动。1902年，英国学者作了这样的实验，先将狗的大脑通向胃和胰脏的神经切断，再让狗吃肉后胰脏仍能分泌大量的消化液和消化酶。这说明胃液和消化酶的分泌不受神经控制。但这一实验结果没有得到巴甫洛夫的承认，理由是，切除神经是高难度的手术，只要留下一根神经未切除干净，就可以认为仍受神经控制。英国学者又做了以下实验，从吃肉的狗身上

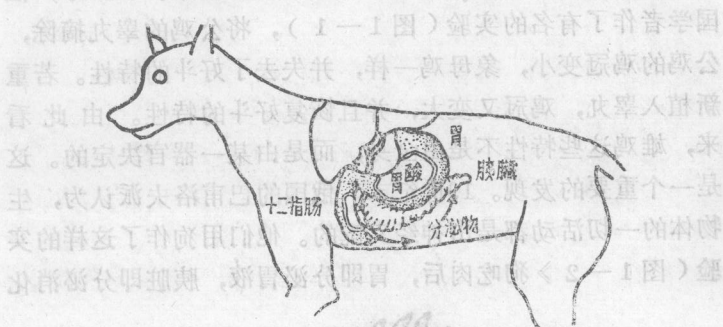


图 1—2 狗的胃酸及消化酶分泌试验。

抽出血液，然后注射到未吃过肉的狗体内，结果被注射的狗的胃大量分泌胃液，胰脏大量分泌消化酶，从这个实验中得出一个结论，胃分泌胃液，胰脏分泌消化酶，并不受神经控制，而是溶解于血液的某种物质控制的。这种物质称为“荷尔蒙”（激素），意为刺激者。这就是首次发现激素的实验。那时，就认识到激素参与生物体恒常性的维持。例如，每顿饭后，糖被大量地吸收，但血液含糖量基本恒定。因

此，激素也用来治疗某些疾病。

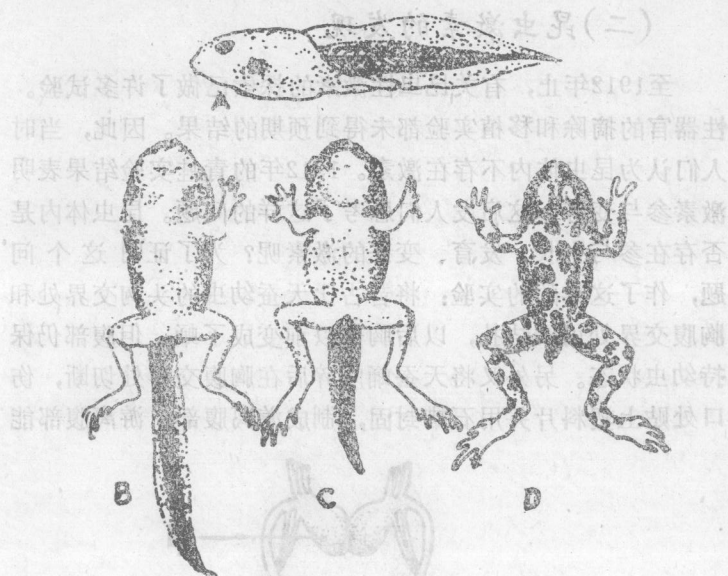


图 1—3 用羊甲状腺粉饲养蝌蚪、蝌蚪迅速变态成青蛙

A~D: 生长发育变态过程

1912年，德国学者又做了这样一个著名的实验。他用羊甲状腺粉饲养的蝌蚪迅速生长发育，很快变态为青蛙，比自然条件下蝌蚪变成青蛙的速度要快得多（图 1—3）。在这以前，人们已经知道，甲状腺分泌的激素促进能量代谢，产生生物体生命活动所需的能量。青蛙实验又发现了甲状腺素新的作用，它能使蝌蚪一类小动物速度生长变态，同时告诉人们，激素具有促进生物体生长、发育、变态的功能。

(二)昆虫激素的发现

至1912年止，有关昆虫性激素的探索已做了许多试验。性器官的摘除和移植实验都未得到预期的结果。因此，当时人们认为昆虫体内不存在激素。1912年的青蛙实验结果表明激素参与变态。这启发人们思考了这样的问题。昆虫体内是否存在参与生长、发育、变态的激素呢？为了证明这个问题，作了这样的实验：将昔古比天蚕幼虫的头胸交界处和胸腹交界处用线结扎，以后胸部以前变成了蛹，但腹部仍保持幼虫状态。另外又将天蚕蛹麻醉后在胸腹交界处切断，伤口处贴上塑料片并用石蜡封固，制成游离腹部，游离腹部能

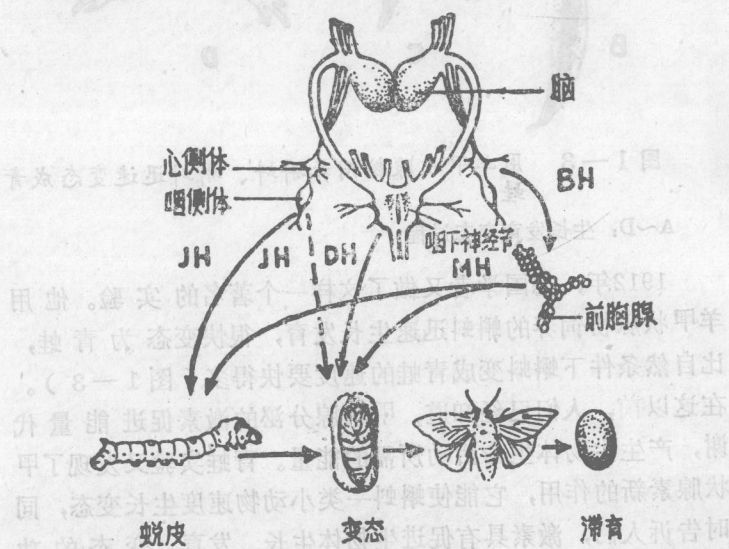


图 1—4 昆虫内分泌器官对蛻皮、变态、滞育的控制

长期存活。分别向游离腹部移植脑、前胸腺等各种器官。结果当移植前胸腺时，游离腹部发育变态为成虫。因此得出结论，昆虫中某种特定器官也同样具有控制生长变态的能力。以后在全世界范围内，用许多种昆虫做了大量的结扎及器官移植试验。弄清了脑、前胸腺、咽侧体、咽下神经节等器官分别分泌相应的激素，控制着昆虫的生长发育、变态、滞育等生命现象（图1—4）。咽侧体分泌的保幼激素（JH）和前胸腺分泌的蜕皮激素（MH）协同作用，控制着幼虫→幼虫生长蜕皮和幼虫→蛹的变态蜕皮。前面已讲到，促进青蛙变态的是一种激素——甲状腺激素，但昆虫不同，它的变态由两种激素——保幼激素和蜕皮激素控制，这是十分重要的不同点。因此我常讲，要使家蚕变大，使用一种激素不可能得到圆满的结果，而要用两种激素，这种想法的根源就在这里。

（三）控制昆虫滞育的内分泌系统

关于控制昆虫滞育的内分泌系统的研究，也同样采取了结扎、器官移植等实验形态学的手段。昆虫滞育因种类而异发生在不同的发育阶段。昆虫中有40%的种类在卵期滞育，家蚕就是其中的一个种类，30%的种类在蛹期滞育，其余在成虫或幼虫期滞育。

控制滞育的诱导、开始及解除的内分泌机构大致可分成三种类型（表1—1和图1—5），第1种类型是由脑—前胸腺控制蛹滞育。幼虫期的短日照条件使化蛹时的脑不活化，前胸腺也就因缺乏促前胸腺激素（PTTH）而不行分泌活动，结果使体内形成蜕皮激素（MH）欠缺的状态，蛹不

表1—1

控制昆虫滞育的内分泌系统

内分泌器官	滞育期	激 素 量	
		开始滞育	解除滞育
脑—前胸腺	蛹	缺乏PTTH—MH	出现PTTH—MH
咽 侧 体	幼虫	JH维持一定水平	JH消失
	成虫	缺乏JH	出现JH
咽下神经节	卵	出现DH	

发生成虫化而进入滞育。低温和长日照条件使脑活性化，脑分泌的PTPH使前胸腺活性化并分泌MH，于是滞育就解除了。

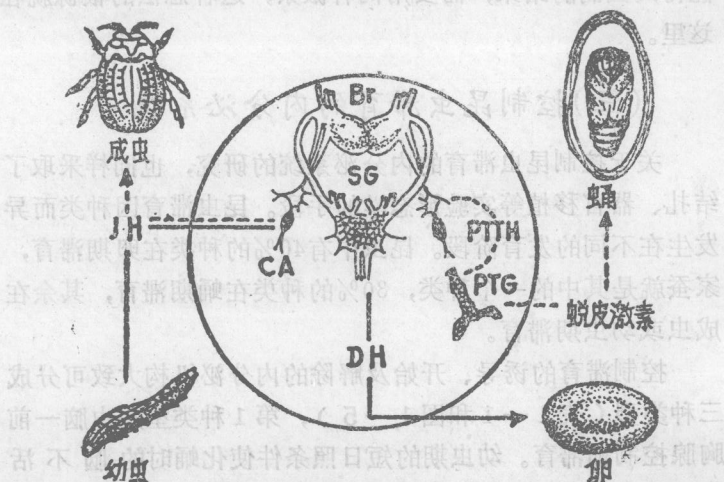


图1—5 控制昆虫滞育的内分泌系统

第2种类型是咽侧体控制幼虫和成虫的滞育，咽侧体分泌保幼激素（JH）的活性变动支配着滞育的诱导，开始和解除过程。当幼虫老熟时，咽侧体不失去分泌活性，继续分泌一定量的JH，结果使幼虫进入滞育；当咽侧体的机能衰退，接着前胸腺分泌MH，滞育就结束了（Yagi 1981, Chipendale和Turucn1981）。成虫滞育是由与此完全相反的咽侧体活性消长过程支配的。当成虫羽化时，咽侧体处于不活化状态，体内缺乏JH而卵巢不发育，于是进入滞育（生殖滞育）。当滞育个体受到一定的刺激时，通过脑的作用使咽侧体活化，开始分泌JH，JH诱导卵黄蛋白的合成，致使卵巢发育，于是滞育就解除了。在马铃薯叶甲中，卵巢发育是受JHⅢ支配的，幼虫蜕皮受JHⅠ支配，蛹蜕皮受JHⅡ支配（De Kort 1981）。这一事实暗示了JH分子机能分化，同时表明，滞育是受JHⅢ支配的。

第3种类型是咽下神经节控制滞育，这是根据对家蚕卵滞育的一系列研究成果确立起来的（Yamashite等1981，Yamashite和Hasegawa1983），其特征是参与滞育的激素与上述两者不同。第一种和第二种类型的内分泌系统是由参与蜕皮——变态的内分泌系统的活性变化构成的，而卵滞育特别是胚发生初期的滞育，是由与后胚期所见的激素系统不同的内分泌系支配的。这种激素是咽下神经节分泌的神经激素，称为滞育激素（DH），此激素的有无决定了滞育诱导的开始与否。由咽下神经节支配卵滞育的昆虫，除了家蚕以外，还有古毒蛾（Kind, 1972）和苜蓿盲蝽（Emen 1966）但是，对于内分泌器官是否参与卵滞育的解除过程，现在还不清楚。这是因为滞育发生在胚组织未分化的胚盘形成期，

这时要确定某一特定的内分泌器官是不可能的。

图1—6是家蚕头胸部内分泌器官位置图。其中咽下神经节是控制卵滞育的内分泌器官，用电镜观察咽下神经节，可以着到咽下神经节分泌细胞中有许多分泌物，证明它确实是一个内分泌器官。

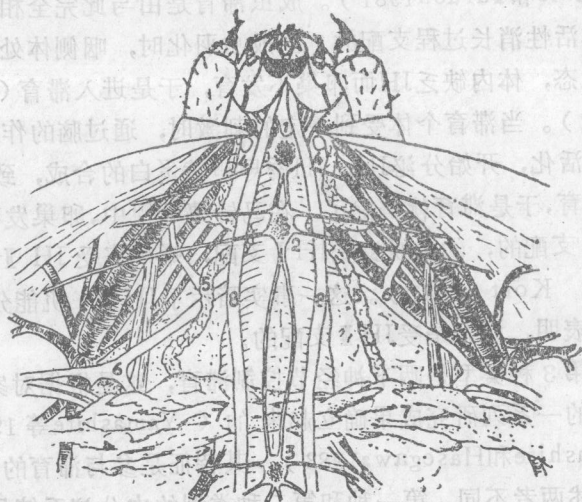


图1—6 家蚕头胸部的内分泌器官位置图

1、咽下神经节 2、第三神经节 3、第四神经节 4、咽侧体 5、涎腺 6、前胸腺 7、食道下腺 8、前部丝腺

在实验中，怎样能使多化性蚕产下滞育卵，又怎样能使滞育性蚕产下非滞育卵呢？用图1—7加以说明。供试蚕是二化性品种，图上方的用低温短日照催青（17℃，每日光照10小时），图下方的用高温长日照催青（25℃每日光照20小时）。经低温短日照催青的蚕发育成蛾后，产非滞育卵；但在

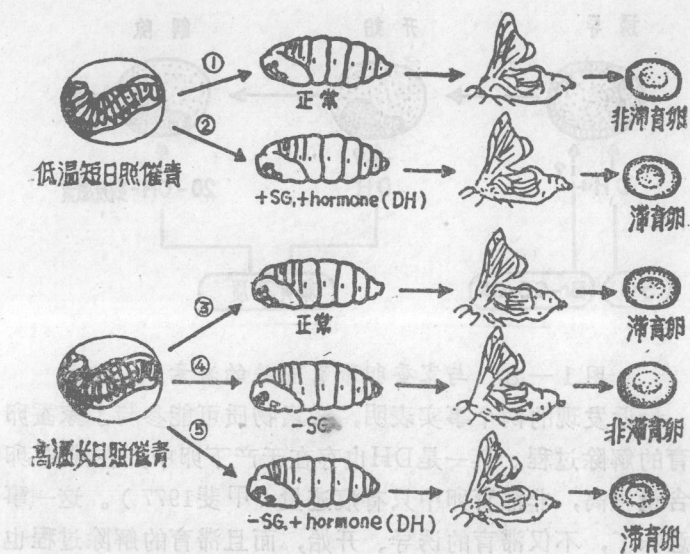


图 1—7 改变家蚕化性的实验方法

其化蛹后移植入咽下神经节或在化蛹后第三天注射滞育激素 (DH) 后, 就会使其改变化性产下滞育卵。经高温长日照催青的蚕发育成蛾后, 产滞育卵; 但若在化蛹当天将蛹的咽下神经节摘除, 羽化后的蛾子就会产生非滞育卵, 若在化蛹当天摘除咽下神经节后又可在第三天注射滞育激素, 羽化后蛾子仍产生滞育卵。这个实验除了证明咽下神经节分泌 DH 控制着卵滞育外, 还告诉我们家蚕卵的滞育性是蛹期决定的。

以上是昆虫滞育内分泌系统的经典学说和模式, 下面介绍一下这种经典学说最近有了哪些发展 (图 1—8)。

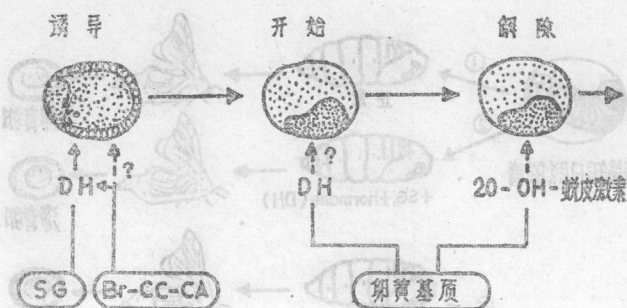


图 1—8 与家蚕卵滞育有关的激素

最近发现的两个事实表明，激素物质可能参与了家蚕卵滞育的解除过程。其一是DH也存在于产下卵中，在滞育卵中含量很高，非滞育卵中只有痕迹量（甲斐1977）。这一事实意味了，不仅滞育的诱导、开始，而且滞育的解除过程也与DH的多少有关。卵内存在一定量的DH期间处于滞育状态，DH分解消失后滞育即解除。

其二是发现了蜕皮激素与滞育有关的事实。家蚕卵巢及卵中蓄积了多量的蜕皮激素，蜕皮激素的存在形式因卵的发育时间而异（Ohnishi1981）在体外培养家蚕滞育胚时，如果向培养基中添加20—羟蜕皮激素，就会打破滞育，胚胎进入发育阶段（Ghanib等1981）。这些事实说明，蜕皮激素支配着家蚕卵滞育的解除过程。据报导，其他昆虫中也有蜕皮激素参与胚发生的调节。可见、蜕皮激素参与滞育解除过程的可能性很大。当然，在进行滞育胚的人工培养时，除了激素外，还必须考虑到氧气和卵壳的影响等因素（冈田1975）。如果上述事实能成立，那就不能说卵滞育的内分泌系是独立

于蜕皮——变态激素系的机构了，这是对经典学说的发展。

据估计，卵滞育的昆虫占全部昆虫的40%，滞育发生在胚胎的各个时期。巨头蚴是一种临反转期进入滞育的昆虫，滞育的解除与JH有关（Neumann—Viescher 1976）。在幼虫体基本完成，即将孵化时进入滞育的昆虫中，蛹型脑—前胸腺内分泌系对滞育性起着支配作用。因此，即使是卵滞育，也由于进入滞育的胚胎期不同，支配滞育的内分泌系存在很大差异，咽下神经节—滞育激素系可以认为是适于胚胎初期滞育的内分泌机构。

咽下神经节—滞育激素系是否只是在家蚕等初始期滞育昆虫中特异地发达起来的内分泌系统呢？将不进行卵滞育的昆虫的咽下神经节移植入非滞育性家蚕，也会使蚕产下滞育卵（Hasegawa 1952, Ogura和Soro 1973、Andrewartha等1974）。根据这一现象，可以说明咽下神经节—滞育激素系作为内分泌系存在于多种昆虫中。最近还发现烟草天蛾的蛹滞育时，咽下神经节起着积极的作用（Williams信件）这些事实表示，咽下神经节—滞育激素系不仅对卵滞育，而且可能对蛹滞育等其他一切滞育形式普遍起作用。

在非滞育性家蚕蛹的特定发育时期，植入咽侧体—心侧体，就会产下滞育卵（Takeda 1977）；而将咽侧体植入滞育性幼虫体内，容易发生不滞育卵（Morohoshi和Ohshiki, 1969）。这表明咽侧体也可能参与对家蚕卵滞育的支配过程但是咽侧体的的这种功能由JH代替。因此推测，咽侧体同脑一样具有调节咽下神经节活性的机能，或者这些器官也分泌DH活性物质（Sonzobe和Keino 1975）。

最近的内分泌学认为激素并非由特定的单一组织分泌产