

酚氧化酶研究概况 I

——特性、功能、分布和在胚胎发育中的变化

ADVANCE ON THE STUDY OF PHENOLOXIDASE I

——PROPERTIES, FUNCTIONS, DISTRIBUTION AND CHANGE DURING EMBRYONIC STAGE

李国荣^{1,2} 张士瑾¹ 李红岩¹ 王昌留¹(¹ 中国海洋大学生命学院 青岛 266003)(² 山东师范大学生物系 济南 250014)

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)04-0004-05

酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 参与无脊椎动物的防御反应。在无脊椎动物中, PO 一般以无活性的酶原形式——酚氧化酶原 (prophenoloxidase, proPO) 存在^[1]。无活性的 proPO 在丝氨酸型蛋白酶作用下转变成具有活性的 PO。丝氨酸型蛋白酶本身也以酶原的形式存在, 可被细菌和真菌等的细胞壁成分激活。酚氧化酶及其因子构成了一个复杂的酶级联反应系统, 即所谓的酚氧化酶原激活系统 (prophenoloxidase-activated system, proPOAS)。该系统由 PO、蛋白酶、模式识别蛋白和蛋白酶的抑制剂构成。proPOAS 能被微生物的细胞壁成分如 β -1,3-葡聚糖等激活, 显示该系统能识别微生物的表面分子。在 proPOAS 活化过程中产生一系列具有生理活性的物质, 可通过多种方式参与宿主防御反应, 包括提供调理素 (opsonin)^[2]、促进血细胞吞噬作用、包裹作用和结节形成以及介导凝集和凝固、产生杀菌物质等。最近, 在对甲壳动物的研究中发现 proPOAS 的成分直接参与细胞信息传递^[3], 可见, 该系统在甲壳动物的防卫中起极为重要的作用。因此, 人们把 proPOAS 作为一种识别系统, 并认为它与脊椎动物的补体系统类似。

1 生化特性

酚氧化酶又称为酪氨酸酶 (tyrosinase, EC 1.10.3.1)。它是一种含铜的酶, 能够催化单酚羟化生成二酚 (如多巴), 并把二酚氧化成醌; 醌在非酶促条件下形成最终的反应产物黑色素^[4]。1996 年, Sugumaran^[5] 建议: 酪氨酸酶这个名字应专门用于哺乳类,

而 PO 专门用于无脊椎动物。PO 和酪氨酸酶两者催化的生化反应十分相似, 但它们的 DNA 序列并不完全相同; PO 缺乏酪氨酸酶的信号肽和跨膜域的氨基酸顺序。

自从 1917 年 Bloch 发现 L-3,4-二羟苯丙氨酸 (L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-多巴) 可作为体外人体皮肤黑色素细胞中黑色素形成的底物, 这种反应已成为酚氧化酶 (酪氨酸酶) 存在和定位检测的基础。此后, 一些作者利用这种方法对多种生物的 PO 进行了研究。50 年代, 在果蝇中首先发现 proPO 的存在及其激活作用。30 多年后, 由于发现昆虫能合成对感染细菌发生反应的抗菌肽, 尤其是发现脊椎动物组织中也存在相似的肽类, 使得有关无脊椎动物特别是节肢动物免疫作用的研究愈来愈受到重视, 以至成为一个令人兴奋的研究领域。

PO 广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中, 人们已从多种动物中纯化并鉴定了 PO。依据种类的不同, 其分子量、最适 pH、最适温度、激活剂和抑制剂也不相同。Hiruma 和 Riddiford^[6] 证明烟草天蛾角质中的 PO 由 90 ku 的亚基组成, 是一种糖蛋白。当昆虫体内缺乏

第一作者: 李国荣, 出生于 1964 年, 博士, 副教授, 目前在研项目: 山东省科委“通过核移植技术构建转 tPA 基因小鼠”, 通信地址: 山东师范大学生物系, 250014, E-mail: liguorong66@hotmail.com

收稿日期: 2002-11-28; 修回日期: 2003-02-18

保幼激素时,表皮合成足够的 PO 使昆虫完全黑化。在昆虫 *Heliothis virescens* 中,PO 的分子量为 250 ku,最适 pH 是 9.0,最适温度是 45 °C。其 PO 活性不受 Ca^{2+} 和 EDTA 的影响,但可被 EDTA 和 SDS 抑制^[7]。Hara 等对家蝇幼虫和蛹的 PO 进行了比较研究,发现它们 PO 的分子量分别为 320 和 330 ku,均由 60 ku 的亚基组成,等电点均为 4.85,最适 pH 为 7.4 和 7.5。夜蛾血浆中的 PO 以酶原的形式存在,部分纯化的 PO 可被甲醇激活,但不能被昆布多糖、脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、牛胰蛋白酶和胰凝乳酶激活;最适 pH 一般在 7.0 ~ 7.5 之间; Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 对 PO 活性都有刺激作用,但 EDTA 没有影响。二硫苏糖醇和曲酸可抑制其 PO 活性。Burks 和 Fuchs 分离纯化了蚊子血浆中的 PO,其分子量为 130 ku,含有 76, 62 ku 和 58 ku 三种亚基。尽管无脊椎动物中 proPO 和 PO 的分子量各不相同,但在 proPO 的激活过程中,所去除的小肽的分子量一般都在 5 ~ 15 ku 之间^[8]。

在脊椎动物中,Barisas 和 McGuire 分离纯化了蛙 *Rana pipiens* 的酪氨酸酶原和酪氨酸酶,它们的等电点分别为 9.35 和 9.25,分子量为 200 ku $\pm$ 12 ku,分别由 54 ku 和 50 ku 的四个亚基组成四聚体。铜离子的

螯合剂二乙基二硫氨基甲酸钠 (DDC) 能抑制 PO,但这种抑制可通过增加铜浓度而恢复。Penafiel 等从蛙 *Rana esculenta ridibunda* 的表皮中分离纯化出酪氨酸酶原和酪氨酸酶,其中,酶原的分子量为 115 ku,由 68 ku 的同源亚基组成二聚体;酪氨酸酶的分子量为 210 ku,由 62 ku 的同源亚基组成四聚体。它们的等电点均 7.2。酪氨酸酶原在体外可被胰蛋白酶、胰凝乳酶、链霉蛋白酶和光线激活。1982 年 Vijayan 等研究了人皮肤的酪氨酸酶,发现它是 66 ku 的单体,该酪氨酸酶催化酪氨酸羟化成多巴和多巴氧化成多巴醌两步反应。

酚氧化酶原激活系统可以作为节肢动物的识别和防御系统。proPOAS 的终末成分是酚氧化酶 PO,它在大多数节肢动物中以 proPO 的形式存在,由 proPO 到 PO 的转变可通过有限的蛋白水解作用产生。活性 PO 能够催化单酚的羟化以及二酚氧化成醌;醌在非酶促条件下形成黑色素(见图 1)。黑色素能在入侵的寄生虫等异物上沉积,此即黑化反应,它是宿主血淋巴中防御反应的结果。

在所有已研究过的无脊椎动物中,PO 一般都以无活性的酚氧化酶原形式存在于血淋巴中,可被内源

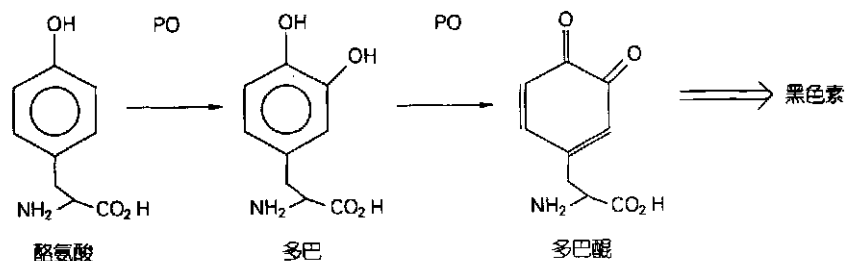


图 1 酚氧化酶催化形成黑色素的模式

性的激活系统和外源性的激活剂如蛋白酶、去污剂或有机溶剂等激活^[12](见图 2)。另外,研究结果发现:对 proPO 有激活作用的微生物细胞壁成分包括 β -1, 3-葡聚糖 (β -1, 3-glucan)、LPS、肽聚糖 (peptidoglycan) 和酵母聚糖 (zymosan, 含有 β -1, 3-葡聚糖);对 proPO 有激活作用的蛋白酶包括胰蛋白酶、胰凝乳酶、组织蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶等;去污剂有十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 和十六烷基氯化吡啶 (cetylpyridinium chloride, CPC)。除此之外,加热或 Ca^{2+} 等也对 proPO 的激活起促进作用。在两栖类中,有报道说光线也可以激活酪氨酸酶原。夜蛾血浆中的 proPO 可被甲醇激活。不同的激活剂对 proPO 的激活机理不同。昆虫的 proPO 通过两种不同的机理激活,一种是酶原的蛋白裂解,另一种是去污剂激活。Hall 等^[10]发现昆虫 *Manduca sexta* 血淋巴中纯化的 proPO

通过这两种模式都可以激活。甲醇对昆虫血淋巴中的 PO 不但具有激活作用^[11],并且其激活作用是可逆的,因此,有人推测这种激活是通过一种可诱导的结构变化产生的。在蟑螂中,内源性的凝集素能诱导 proPO 的激活。在马蹄蟹中,磷脂诱导粗制品中酚氧化酶的激活。至于微生物多肽对 proPO 的激活作用,有人推测它可能与特异性的血浆蛋白结合,以一种尚未知晓的方式,诱导酚氧化酶原激活酶的活化,最终导致 proPO 的激活。这些激活反应的生化机理尚待进一步探索。

proPO 的激活过程也可能包含其它因子。在海鞘中,用丝氨酸蛋白酶的抑制剂如苯胺啉 (benzamide) 和大豆胰蛋白酶抑制剂预处理血细胞溶解物的上清液,发现这两种抑制剂并没有消除 LPS 的刺激作用,只是降低了 20% 的 PO 活性。这说明 LPS 对海鞘血细

胞 PO 的激活作用中可能还包括其它因子的参与。

酚氧化酶是一种含铜的酶,铜的螯合剂能够特异性地抑制 PO 活性,如苯硫脲(phenylthiourea, PTU)、二乙基二硫氨基甲酸钠(DDC, Sodium diethyldithiocarbamate)和托酚酮(tropolone)等均被用来作为 PO 的特异性抑制剂^[12]。

PO 既具有单酚氧化酶的活性,也具有二酚氧化酶的活性。因此,在不同动物中 PO 可能具有不同的底物特异性,但是,多数情况下,L-多巴(二酚)被用来作为 PO 常规分析的底物。有趣的是,Hall 等^[10]发现:丙氨基多巴胺和 4-甲基邻苯二酚是昆虫 *M. sexta* 血淋巴中 PO 的优良底物,而用多巴作底物的效果并不好。

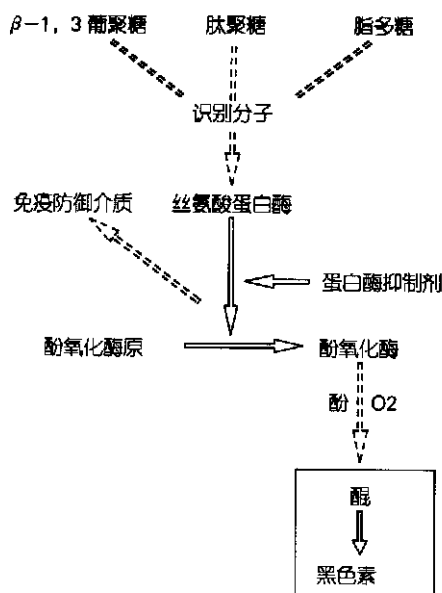


图 2 节肢动物酚氧化酶激活模式

2 功能

目前,已从数种无脊椎动物中分离纯化出 proPO,并对此作了鉴定。proPO 以寡聚体的形式存在,亚基的分子量大约是 70~80 ku,经蛋白水解激活后,PO 的分子量一般为 60~70 ku^[13]。

有几种节肢动物 proPO 的一级结构业已被确定。节肢动物 proPO 缺乏信号肽,但都包含两个功能性的结合铜的位点^[14]。在一些昆虫中,存在两种或多形式的 proPO,这种多态性的意义尚不清楚。有人推测:不同的 proPO 或许具有不同的功能。例如,一种形式可以在角质中沉积,而另一种形式则存在于血淋巴中,角质和血淋巴 PO 的物理和化学性质并不完全相

同。有证据显示:在蚕中,血液中的 proPO 可以被转到角质中沉积,proPO 可能参与角质的硬化并抵御寄生虫的入侵。

在昆虫 *Bombyx mori* 中,由 proPO 转变为活性 PO 的激活位点已被确定,该位点即位于 proPO 氨基酸序列精氨酸 50 和苯丙氨酸 51 之间的肽键,激活作用导致约 6 ku 小肽的释放。*M. sexta* 和 *Drosophila melanogaster* 的 proPO 序列在位置 50~52 及 51~53 之间也存在精氨酸和苯丙氨酸序列,推测精氨酸和苯丙氨酸之间可能是昆虫 proPO 蛋白水解激活的共同序列。Hall 等^[10]根据分子生物学的分析结果提出:昆虫 *M. sexta* proPO 的激活作用可能通过不止一个肽键的裂解而发生。此外,去污剂也能激活 proPO。可见:proPO 的激活既可通过一个或多个位点的蛋白裂解造成多肽结构上的变化而发生,也可通过与去污剂分子的结合而发生。

酚氧化酶(酪氨酸酶)广泛分布于微生物、植物和动物中,主要参与色素和其它多酚化合物的形成,具有多种功能。在高等植物中,酪氨酸酶通过催化形成黑色素愈痂,防止昆虫和微生物的进一步攻击,人们可在苹果、西红柿和马铃薯叶子的损伤组织中观察到这种现象。在脊椎动物中,酪氨酸酶催化产生的黑色素扩散或聚集在低等脊椎动物的黑素体中,或者分泌进入哺乳动物表皮和毛发的角质细胞中,使体表着色。哺乳动物合成的黑色素可以保护皮肤和眼睛,抵御紫外线的辐射,防止内部组织过热等。缺乏酪氨酸酶的突变体即为白化病。在较高等的无脊椎动物如节肢动物中,PO 具有多种功能,它不仅参与黑色素形成、角质的硬化和伤口愈合,而且在宿主的防御反应中还作为非自身识别系统发挥功能。PO 是黑色素形成的关键酶,由黑化反应形成的色素沉着对有机体起到保护作用。此外,PO 还通过硬化反应来硬化角质,它是唯一参与角质硬化的酶。硬化对所有昆虫的成活都是至关重要的,因为它为柔软的无脊椎动物身体提供保护。在硬化过程中,PO 产生的醌与角蛋白及甲壳质相互作用,最终交联形成角质,高度硬化的角质能阻断微生物和异物的入侵。

在节肢动物中,PO 除了参与角质的硬化和黑化之外,还参与其它两种重要的生理过程——防御反应(节肢动物免疫)和伤口愈合。对于小颗粒异物如细菌,宿主可通过吞噬作用来消灭它。当入侵的异物太大(如寄生虫)而无法被单个血细胞吞噬时,宿主便通过黑色素包裹反应来抵抗和消灭寄生虫,而 PO 在这个过程中起重要作用。当外来物入侵时,proPO 从血细胞中释放出来,并被激活成 PO,在外来有机体上产生黑色素沉积,通过包裹和黑化来限制入侵的外来物。因此,人们很容易在包裹物的周围、血细胞的结节

中和感染真菌的角质部位看到黑色素的沉积。与此相似,当昆虫受伤时,损伤部位出现深色色素区。这是由于 proPO 被蛋白酶水解激活,而激活的 PO 将酚氧化成醌,最终形成黑色素所致。PO 在伤口处催化产生黑色素沉淀以防止血淋巴丢失,并阻止入侵的微生物乘机进入,由此对机体产生保护作用。

活性氧如超氧阴离子、羟基自由基和过氧化氢一直被认为是脊椎动物和无脊椎动物防御系统的细胞毒性成分^[15]。黑色素形成过程中伴随着活性氧的产生,同时也产生具细胞毒性的半醌和三羟酚。半醌有结合亲核物质的特性,醌具毒性的分子基础可能是它们能结合到外来细胞的表面,通过形成黑色素包裹来隔离入侵的外来物,并通过醌和其它的中间产物(如醌甲基化物和半醌)产生氧的还原形式来摧毁这些入侵的外来物如病原菌或寄生虫。黑色素通过愈合伤口和封闭病原菌,在节肢动物的防御反应中起重要作用。

Ratcliffe 等也证明了 proPO AS 在免疫识别中的作用。他们在昆虫的单层血细胞中加入昆布多糖(laminarin, 含 β -1,3 葡聚糖)后,发现血细胞对细菌的吞噬活性明显增强。Leonard 等进一步证明了吞噬作用对昆布多糖的刺激极其敏感,而右旋糖酐(dextran, α -1,6 葡聚糖)不具备这种刺激作用。因此,这种细胞识别过程似乎具有特异性,主要针对糖的 β -1,3 键而发生。proPO 的激活剂昆布多糖能明显增加昆虫血细胞的吞噬活性,而丝氨酸蛋白酶的抑制剂(*p*NPGB, 对硝基苯-对胍乙基苯甲酸酯)则可以消除这种吞噬活性的增加作用,这也就是说丝氨酸蛋白酶在昆布多糖存在下参与“调理”作用。

除节肢动物外, Cammarata 等^[16]在体外实验中发现:脊索动物海鞘的血细胞能够抵抗兔红细胞和人的 K562 瘤细胞,且这种抵抗作用明显与 PO 有关。用铜螯合剂苯硫尿(PTU)和托酚酮(tropolone)所做的抑制实验以及利用底物的类似物苯甲酸酯钠和抗坏血酸钠所做的实验都支持海鞘血细胞的细胞毒性依赖于酚氧化酶的作用。超氧化物歧化酶和过氧化氢酶分别去除超氧自由基和过氧化氢,通过这两种抗氧化酶对血细胞的作用,排除了黑色素形成过程中产生的氧自由基的细胞毒性。这样的结果也证明黑色素形成过程中产生的醌类化合物可能是细胞毒性分子。

3 组织定位

以多巴和多巴胺为底物孵育组织来显示酚氧化酶是研究脊椎动物黑色素形成的标准细胞化学技术,这种技术同样也用于无脊椎动物中。在无脊椎动物中,PO 研究最多的部位是血淋巴。因为节肢动物的血淋巴既包含体液免疫的成分,又包含细胞免疫的成

分,因此,许多学者对 proPO 在血淋巴中的定位感兴趣。那么,PO 究竟存在于血细胞中,还是存在于整个血淋巴中呢?早期的研究由于抗凝血剂的使用(抗凝血剂能不可逆地抑制 PO 活性)造成实验结果的不可信^[17]。为了明确确定 proPO 在血淋巴中的分布及免疫功能,随后的许多学者在研究时都谨慎地使用抗凝血剂。1994 年, Coles 和 Pipe^[12]没有用抗凝血剂从贻贝(*Mytilus edulis*)的血淋巴中分离出血细胞,并用组化方法检测到血细胞中存在 proPO。Asokan 等通过离心将贻贝的血淋巴分成血浆和血细胞,用蛋白酶或去污剂激活后清楚地证明:proPO 既存在于血细胞中,也存在于血浆中;不仅如此, Asokan 等还证明血细胞中 proPO 的含量至少是血浆中的 20 倍,这说明血细胞是贻贝 proPO 的主要储存场所。在甲壳动物中,proPO 几乎全部位于血细胞中。

1988 年, Ashida 等用免疫电镜细胞化学技术间接定位了蚕血细胞中的 proPO。结果显示:仅仅浆细胞和类绛色细胞中存在 proPO; proPO 既分布在胞质中,也分布在核质中,而在颗粒细胞、球形细胞和原始血细胞中则没有 proPO。

Coles 和 Pipe^[12]用光镜组织化学技术和电镜酶细胞化学技术发现:PO 反应产物存在于贻贝血细胞的细胞质颗粒中,且主要定位在嗜酸性颗粒细胞中。超微结构观察显示:PO 阳性产物位于血细胞细胞质大颗粒中,呈均质状,电子密度高。除了血淋巴外,一些研究者还检测了 PO 在其它组织中的分布。Stevenson 和 Adomako 观察到螯虾新形成的上表皮(epicuticle)和蜕皮前的内表皮(endocuticle)中存在 PO;PO 分泌出来后似乎渗入上表皮和内表皮中;当硬化发生时,PO 活性消失。Locke 和 Krishnan 观察到 PO 存在于蛾角质上皮细胞的高尔基体和多泡体中,在这种昆虫中,上皮既能分泌 PO,也能重吸收 PO。Binnington 和 Barrett^[18]用超微结构细胞化学技术显示:PO 存在于昆虫角质的上表皮(epicuticle)和原表皮(procuticle)中,原表皮中的 PO 活性只有在人为的角质损伤激活过程发生后才能被检测到。此外,表皮细胞的多泡体中也有 PO 阳性产物。蚊子的中肠上皮中也存在 PO,PO 与蚊子抗寄生虫感染的生理功能有关^[19]。Brey 等^[20]利用免疫细胞化学方法显示:蚊子中肠上皮中的 proPO 几乎全部位于顶部的分泌颗粒和溶酶体中,中肠腔内的细菌表面上也有 proPO 免疫金标颗粒。另外,唾液腺远端中叶和侧叶中央的腔中也有反应产物。他们认为:中肠腔中细菌表面的 proPO 可能是从上皮的顶部颗粒中释放出去的,也可能是由唾液腺产生的。

4 在胚胎发育中的变化

PO 在动物胚胎发育中的研究报道很少。在无脊

椎动物中, Mnganti^[21]发现:在色素合成开始前,酪氨酸酶首先出现在海鞘脑的适当区域。Whittaker^[22]进一步检测了酪氨酸酶在海鞘胚胎发育中的变化。该酶在预定的色素细胞开始合成黑色素前几小时就已出现在细胞内的小泡中。在随后的幼虫发育过程中,这些小泡中开始积累底物 L-酪氨酸,但它并不与酶相互作用。但是,细胞受到轻微的扰乱(通过冻融或低渗作用)即释放出活性酶。这些酪氨酸酶显然是一种功能性的酶,其积累即预示着黑色素合成的开始。1981年,Whittaker^[22]还用显微密度计对海鞘整体胚胎的酚氧化酶进行了定量测定。

在脊椎动物中, Benson 和 Triplett^[23]对蛙 *Rana pipiens* 胚胎发育中酪氨酸酶的变化进行了研究。结果显示:从未受精卵到原肠中期最初的 24 h 发育期间,酪氨酸酶的活性较低。到原肠中期,没有检测到酪氨酸酶活性。用胰蛋白酶激活后,在神经诱导作用完成后的神经胚时期,重新出现了酪氨酸酶活性。这种酪氨酸酶活性持续、急剧地增加直到尾芽期。

参考文献

- 1 Brookman J L, Ratcliffe N A, Rowley A F. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect Biochem*, 1989, 19: 47-57
- 2 Smith V J, Soderhall K. β -1,3-glucan activation of crustacean haemocytes in vitro and in vivo. *Biol Bull*, 1983, 164: 299-314
- 3 Barracco M A, Duvic B, Soderhall K. The β -1,3-glucan binding protein from the crayfish *Pacifastacus ieniusculus*, when reached with a β 43 man, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. *Cell Tissue Res*, 1991, 266: 491-497
- 4 Lerch K. Protein and active-site structure of tyrosinase. In: Bagnara J (ed). *Advances in pigment cell research*. New York: Alan R Liss, 1988. 85-98
- 5 Sugumaran M. Roles of the insect cuticle in host defence reactions. In: Soderhall K, Iwanaga S, Vasta G (eds). *New directions in invertebrates immunology*. NY: SOS Publication, fair Haven. 1996. 355-374
- 6 Hiruma K, Riddiford L M. Granular phenoloxidase involved in cuticular melanization in the tobacco hornworm: regulation of its synthesis in the epidermis by juvenile hormone. *Dev Biol*, 1988, 130: 87-97
- 7 Lockey T D, Outh D D. Isolation and characterization of hemolymph phenoloxidase from *Heliothis virescens* larvae. *Comp Biochem Physiol*, 1992, 102B: 891-896
- 8 Gollas-Galvan T, Hernandez-Lopez J, Vargas-Albores F. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) haemocytes. *Comp Biochem Physiol*, 1999, 122: 77-82
- 9 Asada N, Fukumitsu T, Fujimoto K, et al. Activation of prophenoloxidase with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol*, 1993, 23: 515-520
- 10 Hall M, Scott T, Sugumaran M, et al. Proenzyme of *Manduca sexta* phenoloxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7 764-7 768
- 11 Andersson K, Sun S C, Boman H G, et al. Purification of the prophenoloxidase from *Hyalophora cecropia* and four proteins involved in its activation. *Insect Biochem*, 1989, 19: 629-637
- 12 Coles J A, Pipe R K. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 1994, 4: 337-352
- 13 Kwon T H, Lee S Y, Lee J H, et al. Purification and characterization of prophenoloxidase from the hemolymph of coleopteran insect, *Hbionichia diomphilia* larvae. *Mol Cells*, 1997, 7: 90-97
- 14 Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, et al. Molecular cloning of insect prophenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7 774-7 778
- 15 Anderson R S, Oliver L M, Brubacher L L. Superoxide anion generation by *Cassiopea virginica* haemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction. *J Invertebr Pathol*, 1992, 59: 303-307
- 16 Cammarata M, Arozza V, Parrinello N, et al. Phenoloxidase-dependent cytotoxic mechanism in ascidian (*Styela plicata*) haemocytes active against erythrocytes and K562 tumor cells. *Eur J Cell Biol*, 1997, 74: 302-307
- 17 Saul S L, Bin L, Sugumaran M. The majority of prophenoloxidase in insect hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the haemocytes. *Dev Comp Immunol*, 1987, 11: 479-486
- 18 Binnington K C, Barrett F M. Ultrastructural localization of phenoloxidases in cuticle and haemopoietic tissue of the blowfly *Lucilia cuppina*. *Tissue & Cell*, 1988, 20: 405-419
- 19 Paskewitz S M, Brown M R, Collins F H, et al. Ultrastructural localization of phenoloxidase in the midgut of refractory *Anopheles gambiae* and association of the enzyme with encapsulated *Plasmodium cynwolgi*. *J Parasitol* 1989, 75(4): 594-600
- 20 Brey P T, Ashida A, Lee W J, et al. Tyrosinase-type prophenoloxidase distribution in the alimentary canal of strains of *Anopheles gambiae* refractory and susceptible to *Plasmodium* infection. *Exp Parasitol*, 1995, 80: 654-664
- 21 Mnganti A. Ricerche istochimiche sulla localizzazione del territorio presuntivo degli organi sensoriali nelle larve di Ascidie. *Pubbl Staz Zool Napoli*, 1951, 23: 52-57
- 22 Whittaker J R. Quantitative measurement by microdensitometry of tyrosinase (dopa oxidase) development in whole small ascidian embryos. *Histochemistry*, 1981, 71: 349-359
- 23 Benson S, Triplett E. The synthesis and activity of tyrosinase during development of the frog *Rana pipiens*. *Dev Biol*, 1974, 40: 270-282

(本文编辑:刘珊珊)