

几种昆虫体内保护酶系统活力的研究*

李周直 沈惠娟 蒋巧根 嵇保中

(南京林业大学, 南京 210037)

摘要 菜粉蝶 (*Pieris rapae*) 体内存在着超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD) 等保护酶系统, SOD 活力水平与虫龄关系密切。溴氰菊酯处理菜粉蝶后 10 分钟, SOD、CAT 及 POD 的活力水平均高于正常虫体。溴氰菊酯处理褐边绿刺蛾 (*Parasa consocia*) 和褐刺蛾 (*Thosea pastornata*) 后, 中毒的虫体内 SOD 及 CAT 活力随着中毒程度加重而逐渐上升, 接近死亡时又急剧下降; 未中毒的活虫体内 SOD 及 CAT 活力水平比对照活虫为高, 表明与昆虫耐药性有关。在褐边绿刺蛾和褐刺蛾体内未测得 POD。

关键词 菜粉蝶 刺蛾 超氧化物歧化酶 过氧化氢酶 过氧化物酶

自从 McCord 和 Fridovich (1969) 第一次从牛红血细胞中发现超氧化物歧化酶 (superoxi de dismutase, SOD) 以来, 接着在植物细胞中也发现了这种酶 (Beauchamp 和 Fridovich, 1971), 并且证明其功能是清除超氧化物离子 (O_2^-)。此后, 以 SOD 为中心的生物学活性氧代谢研究进展很快, 已形成了生物氧毒害的超氧化物学说 (Fridovich, 1976; Packer, 1984)。生物在逆境条件下, 使 O_2^- 、单线态氧 (1O_2)、过氧化氢 (H_2O_2)、氢氧自由基 ($HO\cdot$) 等活性氧增加。这些生物自由基具有很强的氧化能力, 对许多生物功能分子有破坏作用。但在正常情况下, 细胞内自由基水平很低, 不会引起伤害, 因为细胞内存在着自由基清除系统。这个清除系统主要是通过有关的酶, 如 SOD 就是生物细胞中最重要的清除自由基的酶之一。SOD 能清除 O_2^- 而形成 H_2O_2 , H_2O_2 能与 O_2^- 形成毒性更强的 $HO\cdot$ 。但由于细胞内还有过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD), 这两种酶具有分解 H_2O_2 的作用, 所以正常情况下, 细胞内自由基的产生与清除是在 SOD、CAT 及 POD 三种酶协调一致, 处于一种动态平衡状态, 使自由基维持在一个低水平, 从而防止自由基毒害, 一旦这种平衡受到破坏, 就可能产生伤害作用。因此, Fridovich (1977) 把以上三种酶统称为保护酶系统。

迄今, 对昆虫体内的保护酶系统未见报道。本文研究昆虫体内保护酶系统活力的变化, 以便探讨它与昆虫抗性的关系。

材 料 与 方 法

一、供试虫种

菜粉蝶 (*Pieris rapae*) 采自南京市郊白菜地里的幼虫; 褐刺蛾 (*Thosea pastornata*) 和褐边绿刺蛾 (*Parasa consocia*) 均采自南京林业大学校园内悬铃木和乌桕树上的幼虫。

本文于1992年4月收到。

* 国家自然科学基金资助项目。

二、酶液提取

将供试虫种加入预冷的 1% 聚乙烯吡咯烷酮 (用 pH7 的 50mmol/L 磷酸缓冲液配制), 在冰浴中研磨提取, 匀浆置于 2℃, 20000xg 下离心 20 分钟, 上清液即为酶提取液。

三、酶活测定

SOD 活性按略改进的 Beauchamp 和 Fridovich (1971) 方法测定。3ml 反应液中含 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7), 13mmol/L 蛋氨酸, 75 μ mol/L 氮蓝四唑 (NBT), 0.1mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 和 50 μ l 酶液, 最后加 4 μ mol/L 核黄素。置于 4klx 日光下进行光化学反应, 反应温度 25℃, 15 分钟, 然后用黑暗终止反应, 立即在 560nm 下比色。一个酶活单位为相当于引起 3ml 反应液达到 50% 抑制所需的酶量。

CAT 活性按略改进的 Chance 和 Machly (1955) 方法测定。5ml 反应液中含 50mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7), 8mmol/L H₂O₂ 及 100 μ l 酶液。30℃ 下反应 1 分钟, 加 2ml 10% H₂SO₄ 终止反应。用 2mmol/L KMnO₄ 滴定剩余 H₂O₂, 根据 H₂O₂ 的消失量计算 CAT 活性。

POD 活性按略改进的 Simon 等(1974)方法测定。3ml 反应体系中含 100mmol/L 磷酸缓冲液 (pH6), 30mmol 愈伤木酚, 26mmol/L H₂O₂ 和 150 μ l 酶液, 作用 5 分钟, 在 470nm 下比色。

结果与讨论

一、溴氰菊酯油烟剂对菜粉蝶保护酶活力的影响

从青菜上采集的各龄菜粉蝶幼虫, 一部分经冷冻预处理后供测定用, 另一部分用

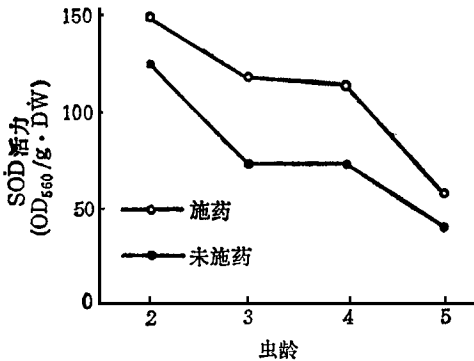


图1 溴氰菊酯对菜粉蝶 SOD 活力的影响

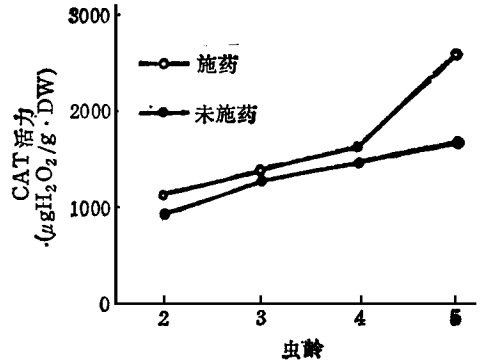


图2 溴氰菊酯对菜粉蝶 CAT 活力的影响

0.025% 溴氰菊酯油烟剂 (溴氰菊酯加油溶性溶剂等制成, 作喷烟雾使用) 喷烟雾处理, 烟熏时间 20 秒, 1 小时后幼虫全部中毒死亡, 取烟熏后 10 分钟已中毒的幼虫, 分别测定它们酶的活力。

1. SOD 活力的变化

从图 1 看出, 经烟熏处理和未经烟熏处理的菜粉蝶, 体内的 SOD 活力均随虫龄增大而降低, 呈负相关。幼龄幼虫的 SOD 活力明显高于老龄幼虫的 SOD 活力, 二龄幼虫

SOD 活力是五龄幼虫的 3 倍多。经烟熏处理后中毒的菜粉蝶幼虫,体内 SOD 的活力又高于未经烟熏处理的正常虫体。经方差分析,各虫龄之间和两种不同处理之间的差异均达显著水平 ($p < 0.05$),说明 SOD 活力水平与虫龄关系密切,对药剂反应敏感。

2. CAT 活力的变化

图 2 表明,菜粉蝶幼虫体内的 CAT 活力随虫龄增大而上升,呈正相关。与 SOD 活力的变化相反。经烟熏处理后中毒的菜粉蝶幼虫体内的 CAT 活力稍高于正常虫体,但老龄五龄幼虫急剧上升,是正常五龄幼虫的 1.5 倍。经方差分析结果,各虫龄之间和两种不同处理之间的差异均不显著,说明 CAT 活力水平与虫龄关系不很密切 ($p > 0.05$),对药剂的反应也不敏感。

3. POD 活力的变化

图 3 表明,菜粉蝶幼虫体内的 POD 活力随虫龄增大而稍有下降,但差异不显著。经烟熏处理后,二龄、三龄及四龄幼虫体内的 POD 活力明显高于正常虫体,而五龄幼虫却急剧下降,但仍高于正常的五龄幼虫。结果说明,POD 活力水平与虫龄关系不密切,但对药剂的反应敏感。

以上结果表明,菜粉蝶幼虫经药剂烟熏处理后,体内的 SOD、CAT 及 POD 活力水平均高于正常虫体。说明菜粉蝶幼虫内 SOD、CAT 及 POD 活力与药剂反应有关,而 SOD 和 POD 对药剂反应敏感。昆虫龄期之间与 SOD 关系密切,与 CAT 及 POD 关系不密切。

二、溴氰菊酯油烟剂对褐边绿刺蛾保护酶活力的变化动态

用 0.025% 溴氰菊酯油烟剂烟熏乌桕树上五龄褐边绿刺蛾 2 分钟,然后将烟熏后的褐边绿刺蛾幼虫放在未受烟熏的乌桕枝叶上喂养,按不同时间和不同中毒症状,分别测定它们的保护酶活力的变化,未受烟熏活虫作对照。

1. SOD 活力的变化动态

图 4 可以看出,中毒虫体在 2—24 小时内 SOD 活力逐渐上升;36 小时明显下降,但仍高于正常虫体的活力水平。

2. CAT 活力的变化动态

图 5 表明,中毒虫体在 2—8 小时内 CAT 活力上升,8—24 小时明显下降,并低于正常虫体的活力水平。

3. POD 活力的变化动态

在正常和中毒的褐边绿刺蛾体中均未测出 POD 活力。

以上结果说明,褐边绿刺蛾在中毒初期体内 SOD 及 CAT 活力被提高,达一定极限后又开始下降。SOD 和 CAT 活力的提高是否有利于昆虫体内氧自由基的消除,提高虫体的耐药力,有待作进一步的研究。

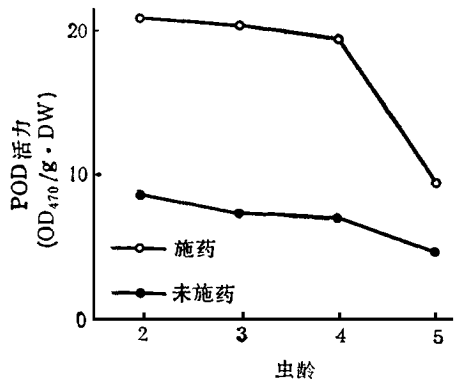


图 3 溴氰菊酯对菜粉蝶 POD 活力的影响

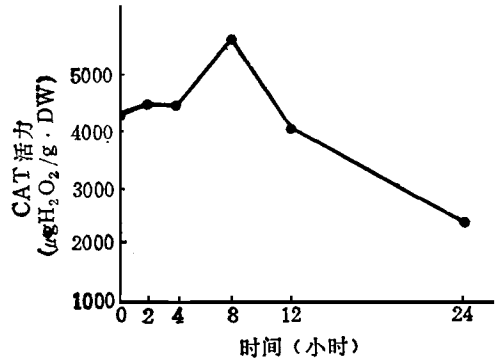
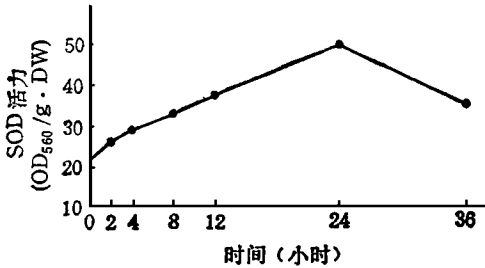


图 4 溴氰菊酯对褐边绿刺蛾 SOD 活力变化的动态

图 5 溴氰菊酯对褐边绿刺蛾 CAT 活力变化的动态

三、褐刺蛾体内保护酶活力的比较

1. SOD 和 CAT 活力的比较

用 0.025% 溴氰菊酯油烟剂烟熏悬铃木树上五龄褐刺蛾 2 分钟,然后按不同时间(4小时、8 小时、12 小时)取受烟熏后仍为活体的褐刺蛾,分别测定它们的保护酶活力。未受烟熏的褐刺蛾活体作对照。

从图 6 可以看出,未受烟熏的褐刺蛾活体与受烟熏后 4、8 及 12 小时仍为活体的褐刺蛾,SOD 活力是: 12 小时>8 小时>4 小时>0 小时; CAT 活力是: 受毒剂烟熏后仍为活体的大于对照的(0 小时)。结果表明: 虫体耐药力与 SOD、CAT 活力有关,随虫体耐药时间的延长而 SOD 及 CAT 活力提高。

在褐刺蛾体内未测得 POD。

2. 毒剂处理后虫态的酶活力比较

用 0.025% 溴氰菊酯油烟剂烟熏五龄褐刺蛾幼虫 2 分钟,取烟熏后 4 小时的活虫、中毒及死亡虫体,分别测定保护酶的活力。

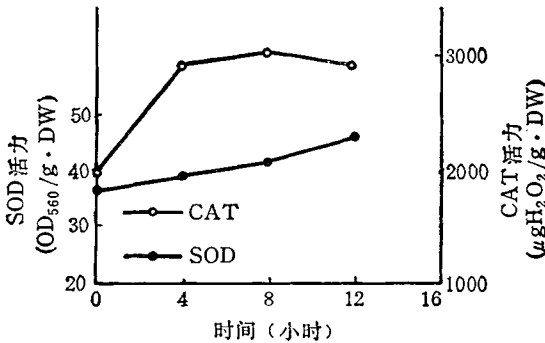


图 6 褐刺蛾 SOD 及 CAT 活力的比较

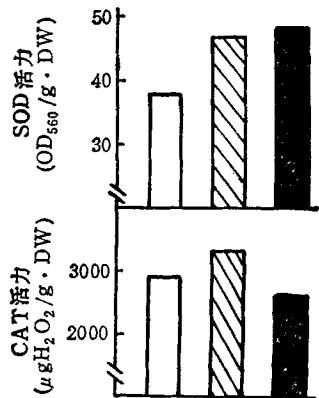


图 7 溴氰菊酯处理褐刺蛾后虫态的酶活力变化

□活虫 ▨中毒 ■死亡

图 7 表明,五龄褐刺蛾受毒剂处理后 4 小时中毒和死亡虫体的 SOD 活力均高于活

体。进一步证明, 毒剂处理后在短时间内(4 小时)中毒和死亡虫体的 SOD 活力是上升的。图 7 亦表明, 中毒的褐刺蛾体内的 CAT 活力大于死亡虫体, 而死亡虫体又低于未中毒活体的 CAT 活力。

试验结果表明, 昆虫与其它动植物一样, 在其体内也存在着一个清除自由基的保护体系, 如 SOD、CAT 及 POD 等保护酶系统。虫体中的 SOD 活力与虫龄呈负相关, 表现在幼龄时 SOD 活力最大。当毒剂处理后, 虫体中 SOD、CAT 及 POD 活力均高于正常虫体的活力, 表明机体本身能提高其保护酶活性, 以适应外界毒害的影响。对耐药力较高的虫体, 其保护酶活力有所提高, 也表明虫体中保护酶活力水平与抗性有关。因此, 研究保护酶的抑制剂对克服害虫抗药性有指导意义。

参 考 文 献

- Beauchamp, C. O. & I. Fridovich 1971 Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276—87.
- Chance, B. & A. C. Machly 1955 Assay of catalases and peroxidases. In Colowick S p, Kaplan NO (eds), *Methods in Enzymology*. Vol. 2, Academic Press, New York, pp. 764—775.
- Fridovich, I. 1976 Free Radical In Biology. Vol. I, Academic Press, New York, P. 239.
- Fridovich, I. 1977 Oxygen is toxic! *Bioscience* 27 (7): 462.
- McCord, J. M., & I. Fridovich 1969 Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 224: 6049—55.
- Packer, L. 1984 Oxygen Radicals in Biological Systems. Harcourt B. J. (ed.), *Methods in Enzymology*. Vol. 105, Academic Press, INC. London, pp. 273—280.
- Simon, L. M., Z. Fatrai, D. E. Jonas & B. Nathovies 1974 Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochem Physiol.* 166: 387—92.

A STUDY ON THE ACTIVITIES OF ENDOGENOUS ENZYMES OF PROTECTIVE SYSTEM IN SOME INSECTS

LI ZHOU-ZHI SHEN HUI-JUAN JIANG QIAO-GEN JI BAO-ZHONG
(Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

The endogenous enzymes of protective system including superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) were found to exist in the larvae of *Pieris rapae*. The level of SOD activity of the larva was closely correlated with the instars. After applying deltamethrin to the larvae, the levels of SOD, CAT and POD activity were found to be higher than that of the control within one hour. When deltamethrin was applied to the slug caterpillars *Parasa consocia* and *Thosea pastornata*, the SOD and CAT activities were enhanced gradually with the degree of poisoning, but declined rapidly near death. However, the SOD and CAT activities in the slug caterpillars survived from the deltamethrin treatment were higher than that of the control, showing that SOD and CAT activities were correlated with tolerance to insecticide.

Key words *Pieris rapae*—slug caterpillar—superoxide dismutase—catalase—peroxidase