农业环境科学学报 2004, 23(5):954 – 957
*Journal of Agro-Environment Science*

# 家蝇幼虫体内过氧化物酶 过氧化氢酶 抗坏血酸过氧化物酶与抗药性的关系 —— I. $H_2O_2$ 对酶活性的影响

郝友进, 渠 晖, 安春菊, 耿 华, 李德森, 杜荣骞

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

**摘 要**:采用室内饲养试验方法,研究了 $H_2O_2$ 对家蝇幼虫体内过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(AsA – POD)活性的影响。结果表明,外源 $H_2O_2$ 能不同程度地影响以上 3 种酶的活性,但变化规律却有明显差异:CAT 活性变化的基本趋势是随着龄期的增加而递增,处理组最大值分别是对照组的 1.2、1.26、1.47 倍,另外在 1、2 龄幼虫中 CAT 活性出现了对照比处理高的现象,而 3 龄幼虫则没有出现。经 $H_2O_2$ 处理后的 1、3 龄幼虫体内的 POD 出现了 2 个活性峰,1 龄幼虫被处理后,在第 1 个活性峰出现的时间内对照明显比处理高,且持续时间约为 5 h,然后酶活性骤然上升,活性高峰值是对照组的 6.8 倍;2 龄幼虫只有 1 个活性峰,是对照组的 3.68 倍;3 龄幼虫体内的 POD 也有 2 个活性峰出现,分别是对照组的 4.9、2 倍。AsA – POD 活性在整个实验过程中没有出现对照高于处理的现象,1、2 龄幼虫经过处理后出现了 2 个活性峰,分别是对照组的 1.3、1.3 倍和 2.08、1.73 倍,3 龄幼虫则只有 1 个活性峰,是对照组的1.8 倍。

**关键词**:家蝇;过氧化氢酶; 过氧化物酶; 抗坏血酸过氧化物酶; 抗药性

**中图分类号**:X171.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1672 – 2043(2004)05 – 0954 – 04

## Relationships Between the Activities of Peroxidase, Catalase and Ascorbic Acid Peroxidase and the Pesticide Resistance in Housefly (Musca Domestica) larvae I. Effect of $H_2O_2$ on the Activity of Enzymes

HAO You-jin, QU Hui, AN Chun-jü, GENG Hua, LI De-sen, DU Rong-qian

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract**: In order to probe the anti – pesticide mechanism in housefly, we firstly studied the effects of exogenous $H_2O_2$ on the activities of peroxidase, catalase and ascorbic acid peroxidase in the larvae to simulate the stress situation. The results showed that $H_2O_2$ could change the activities of POD, CAT and AsA – POD to some extent. The activity of CAT increased with the increase of instar. When the larvae were exposed to $H_2O_2$, the maximum of CAT activity in the treated group was 0.544U (CK: 0.7U), 0.7 (CK: 0.556U), 0.739U (CK: 0.508U), which were 1.2, 1.26 and 1.47 times of the control group, respectively. The CAT activity of the first and second instar larvae in the control group were higher than that in the treated group in the early stage after being exposed to $H_2O_2$, with the maximal inhibition rate being 15% in both instar larvae, while these results did not appear in the third instar larvae. The activity of POD decreased with the larvae growing, and after being exposed to $H_2O_2$, the POD activity in the first instar larvae was significantly lower than that in the treated group which lasted for about 5 hours with the maximal inhibition rate 65%, then, the POD activity increased quickly and reached its maximal activity unit (68U), being 6.8 times of that of control group. The second larvae reached the peak of 46.66U, being 3.68 times of that of control group (12.66U). The activity of POD in the third instar larvae also showed two peaks, with the peak value being 6.6U (CK: 1.34U) and 5.34U(CK: 2.66U), respectively, which was 4.9 and 2 times of that in the control group. The activities of AsA – POD had two peaks in the first and second instar larvae. The peak values were 26 U (CK: 20U) and 22.6U(CK: 17.4U) respectively in the first instar larvae, being both 1.3 times of the control group, while, in the second larvae, which were 25U(CK: 12U) and 26U(CK: 15U), 2.08 and1.73 times of the control group respectively. The third instar larvae had only one peak with the activity of 12U, which was 1.8 times of the control group.

**Keywords**: housefly (Musca Dometica); catalase; peroxidase; ascorbate acid peroxidase; pesticide resistance

**收稿日期**: 2003 – 12 – 08

**基金项目**:天津市自然科学基金资助项目(033604911)

**作者简介**: 郝友进(1973—),男,在读博士,主要从事家蝇幼虫体内抗菌物质的诱导、分离纯化工作。 E – mail: hyjin@eyou.com

家蝇（*Musca Domestica*）是世界性分布的重要害虫之一。对于家蝇的防治，目前主要采用化学防治的方法，随着化学药剂的广泛应用，家蝇抗药性已经成为众所关注的问题。自发现昆虫抗药性以来，各国学者已在家蝇抗药性形成的生化机理方面作了不少工作。从目前有关家蝇抗药性的研究文献来看，家蝇抗药性所涉及的机制有药剂穿透作用降低、代谢抗性及杀虫剂的作用位点敏感度降低等几个方面。代谢抗性是引起抗性的重要机制，其中多功能氧化酶起到了重要作用[1~4]。昆虫受到化学药剂刺激后，体内通过代谢会产生一些活性氧自由基如超氧阴离子（$O_2^-$）、氢氧根负离子（$OH^-$）、过氧化氢（$H_2O_2$）、羟自由基（·OH）、单线态氧（$^-O_2$）等物质[5]。它们有很强的氧化能力，很有可能把进入到体内的化学药剂氧化解毒，使杀虫剂的功效降低或丧失，进而反映成为家蝇的抗药性。李周直[6]等认为菜粉蝶、刺蛾体内 CAT、POD 与耐药性有关，陈尚文[7]认为马尾松毛虫体内 CAT、POD 与耐药性存在一定的相关性。目前，有关家蝇幼虫体内 CAT、POD 等酶活性与抗药性之间关系的研究报道较少。本试验对不同龄期家蝇幼虫体内的氧化物/氢酶的活性变化规律进行了研究，比较它们在不同虫龄的差异以及 $H_2O_2$ 处理后的变化情况，以期为克服或解决家蝇抗药性以及家蝇的综合防治提供理论参考。

## 1　材料与方法

### 1.1 试验材料及处理

家蝇幼虫由本实验室饲养（温度：28 ℃，相对湿度：75%，光/暗：12 h/12 h），饲料为麦麸：玉米蛋白粉：水 = 10∶1∶20。材料处理：取孵化后 2、3、4 d 的幼虫，经 30% $H_2O_2$ 浸泡 45 min 后，迅速用水将幼虫体表残留的 $H_2O_2$ 冲洗干净，喂养在以上饲料中待用。

### 1.2 酶的提取及活性测定

1.2.1 过氧化氢酶的提取及活性测定

CAT 提取：取 1 g 材料，加入 4 mL 0.025 mol·$L^{-1}$（pH 7.0）的磷酸缓冲液，冰浴研磨后，4 ℃下 13 000 r·$min^{-1}$ 离心 20 min，上清液即为酶粗提液。

以改进的 Aebi[8]方法测定 CAT 活性：反应混合液 3 mL 为 0.025 mol·$L^{-1}$ 磷酸缓冲液（pH7.0）、10 μL $H_2O_2$ 和 10 μL 酶液，于 240 nm 处测定 30 s 内的吸光度变化，以 ΔA240 nm·$\Delta t^{-1}$ = 0.01 $s^{-1}$ 表示一个酶活性单位（U）。

$$\text{酶活性抑制率}(\%) = \frac{\text{对照组} - \text{处理组}}{\text{对照组}} \times 100\%$$

1.2.2 过氧化物酶的提取及活性测定

POD 提取：取 1g 材料，加入 4 mL 0.05 mol·$L^{-1}$（pH7.2）磷酸缓冲液，冰浴研磨成匀浆，4 ℃下 10 000 r·$min^{-1}$ 离心 15 min，上清液即为粗酶液。

用 Bestwick[9] 愈创木酚法，测定 POD 酶活性：在 50 mL 0.05 mol·$L^{-1}$（pH7.2）磷酸缓冲液中加入 28 μL 愈创木酚，溶解后加入 19 μL $H_2O_2$ 作为 POD 反应液，取 150 μL 粗酶液 2.5 mL POD 反应液混匀后，立即于 470 nm 处每隔一分钟测定光吸收，以 ΔA470 nm·$\Delta t^{-1}$ = 0.01 $min^{-1}$ 表示一个酶活性单位（U）。酶活性抑制率的计算同 CAT。

1.2.3 抗坏血酸过氧化物酶的提取及活性测定

提取方法同 CAT。

AsA－POD 活性的测定采用修改的 Nakano & Asada[10]方法：3 mL 反应液为 0.025 mol·$L^{-1}$ 磷酸缓冲液（pH7.0），含有 0.1 mmol·$L^{-1}$ EDTA，1.0 mmol·$L^{-1}$ $H_2O_2$，0.25 mmol·$L^{-1}$ AsA 和适量酶液，测定间隔 30 s 内在 290 nm 下吸光度的变化，以每分钟吸光度的变化为一个酶活性单位（U）。

### 1.3 试验设计

本试验设计取样 10 次，分别在处理前 1h（记为‘－1’）、处理完毕（记为‘0’）及处理后 8 h 内，每间隔 1 h 取一次，依次记为‘1’、‘2’、‘3’、‘4’、‘5’、‘6’、‘7’和‘8’。

## 2　结果与分析

### 2.1 $H_2O_2$ 对不同龄期幼虫 CAT 活性的影响

从图 1～图 3 中酶活性单位的大小及变化幅度可以看出，不论处理组还是对照组 CAT 活性都随着虫龄的增加呈现上升趋势。同时，不同虫龄的幼虫对同一强度的 $H_2O_2$ 胁迫的应答规律基本相同：先上升，后下降。$H_2O_2$ 处理 1 龄幼虫后，在前面大约 3.5 h 左右，处理组的活性比对照组低，随后酶活性开始高于对照组，并且很快到达活性高峰，是对照组的 1.2 倍；接着酶活性缓慢下降，到处理后 8 h 仍比对照高。对 2 龄幼虫来说，经 $H_2O_2$ 处理以后前 2.5 h 内也出现了处理比对照活性低的现象，再经过 1 h，酶活性达到峰值，是对照组的 1.26 倍，随后开始下降，处理后 7 h 时基本达到对照水平。而 3 龄幼虫的酶活性没有出现对照高于处理的现象，在处理后前 4h 内，处理与对照基本保持在同一水平，接着处理组的酶活性开始高于对照组，到处理后 5 h 达到活性高峰，为对照组的 1.47 倍，然后缓慢下降，处理 3 h 后仍高于对照。

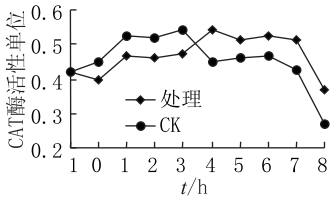


**图 1 $H_2O_2$ 对 1 龄幼虫 CAT 活性影响**

Figure 1 Effect of $H_2O_2$ on CAT activity of the first instar larvae of housefly

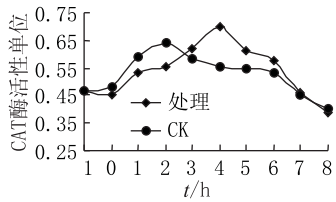


**图 2 $H_2O_2$ 对 2 龄幼虫 CAT 活性影响**

Figure 2 Effect of $H_2O_2$ on CAT activity of the second instar larvae of housefly

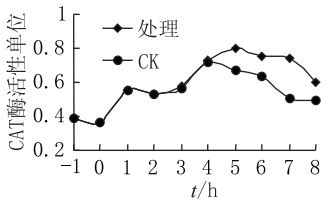


**图 3 $H_2O_2$ 对 3 龄幼虫 CAT 活性影响**

Figure 3 Effect of $H_2O_2$ on CAT activity of the third instar larvae of housefly

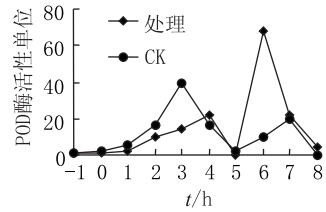


**图 4 $H_2O_2$ 对 1 龄幼虫 POD 活性影响**

Figure 4 Effect of $H_2O_2$ on POD activity of the first instar larvae of housefly

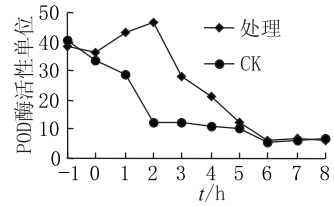


**图 5 $H_2O_2$ 对 2 龄幼虫 POD 活性影响**

Figure 5 Effect of H2O2 on POD activity of the second instar larvae of housefly

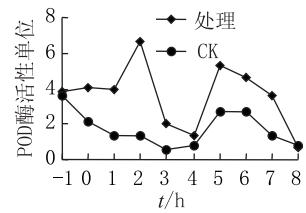


**图 6 $H_2O_2$ 对 3 龄幼虫 POD 活性影响**

Figure 6 Effect of $H_2O_2$ on POD activity of the third instar larvae of housefly

### 2.2 $H_2O_2$ 对不同龄期幼虫 POD 活性的影响

从图 4 ~ 图 6 可以看出,在整个试验过程中,家蝇幼虫体内 POD 的活性随着龄期的增加有递减趋势。经外源 $H_2O_2$ 处理后, 不同虫龄幼虫的 POD 活性的变化规律并不相同,但是一定时间内可以明显提高 POD 活性。1 龄幼虫经过处理后,POD 的活性在前 5 h 内明显比对照低,然后骤然上升,经过 1 h 后达到峰值,是对照组的 6.8 倍,接着开始迅速下降,再经过 1 h 后达到对照组水平。2 龄幼虫的 POD 活性变化没有出现 1、3 龄幼虫的 2 个活性峰,处理后 2 h 就达到峰值,是对照组的 3.68 倍, 然后快速下降, 处理 6h 后基本达到对照组水平。3 龄幼虫没有出现对照高于处理的现象, 从一开始酶的活性就很高, 整个过程也出现了 2 个活性峰,分别为对照组的 4.9 和 2 倍。

### 2.3 $H_2O_2$ 对不同龄期幼虫 AsA 活性的影响

从图 7 ~ 图 9 可以看出,$H_2O_2$ 对 AsA 的活性影响规律明显地与 POD 和 CAT 不同,在整个测试时间内,处理组的酶活性不但没有出现低于对照组的现象,而且同一龄期的处理组与对照组的变化规律几乎是一致的。1、2 龄幼虫经过处理后体内都出现了两个活性峰, 但是出现的时间和被诱导的强度有差异, 2 龄幼虫的两个活性峰峰值都是对照组的 1.3 倍; 但是 2 龄幼虫的第 1 个活性峰的出现时间比 1 龄幼虫的早 1h, 是对照组的 2.08 倍, 2 个龄期的第 2 个峰出现的时间大致相同,为对照组的 1.73 倍。3 龄幼虫只出现了 1 个活性峰,是对照组的 1.8 倍。

## 3 讨论

当幼虫受到强烈刺激后,体内会发生一系列的非特异性防御反应,动员机体的代偿适应功能来抵抗和适应各种刺激,活性氧自由基的大量产生便是应急反应的主要形式之一。由于活性氧自由基对底物氧化有

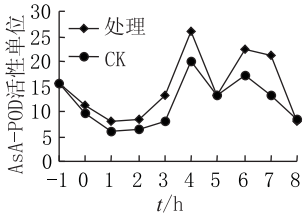


**图 7　$H_2O_2$ 对 1 龄幼虫 AsA – POD 活性影响**

Figure 7　Effect of $H_2O_2$ on AsA – POD activity of the first instar larvae of housefly

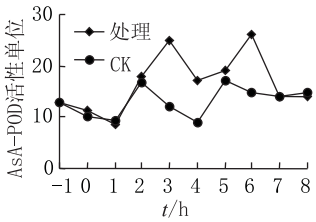


**图 8　$H_2O_2$ 对 2 龄幼虫 AsA – POD 活性影响**

Figure 8　Effect of $H_2O_2$ on AsA – POD activity of the second instar larvae of housefly

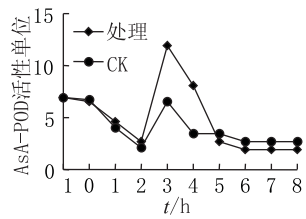


**图 9　$H_2O_2$ 对 3 龄幼虫 AsA – POD 活性影响**

Figure 9　Effect of $H_2O_2$ on AsA – POD activity of the third instar larvae of housefly

广泛性及复杂、多样化的作用机制，它们很可能将进入体内的多种物质进行氧化、代谢、解毒，从而造成家蝇对杀虫剂的抗药性。因此在化学防治中，除了合理选用新型杀虫剂外，可以考虑在杀虫剂中加入一种或几种能够诱导提高与活性氧自由基消除有关的酶活性的物质，这样就可以减少机体内因为杀虫剂的强烈刺激而产生的自由基对杀虫剂的破坏作用，从而提高功效，达到理想的防治效果。虽然，家蝇对杀虫剂产生抗药性的生化机制是相当复杂的，但有些因素可能起到了主导作用。对这些主导因素的作用机制进行较为深入、系统的研究，将有可能降低或延缓家蝇的抗药性的发生与发展，甚至可以解决抗药性问题。

有关杀虫剂在 CAT、POD、AsA – POD 不同活性期内的杀虫效果的研究结果，将另文发表。

**参考文献：**

[1] Rust M K, Owens J M, Reierson D A. Under – standing and controlling the German cockroach[M]. Oxford: Oxford University Press, 1995.

[2] 张大羽, 程家安 . 德国小蠊的抗药性: 水平和主要机制[J]. 中国媒介生物学与控制杂志, 1997, 8(3): 236 – 239.

[3] 唐振华 . 昆虫的抗药性及其治理[M]. 北京: 农业出版社, 1993.

[4] 孙耘芹, 袁家硅, 李　晶, 等 . 家蝇对除虫菊酯农药的抗药性机制[J]. 昆虫学报, 1990, 33 (3): 265 – 273.

[5] Marcelo Hermes – Lima , Tania Zenteno – Savin. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002. Part C, 133: 537 – 556.

[6] 李周直,沈惠娟, 蒋巧根, 等 . 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究[J]. 昆虫学报,1994, 37(4): 399 – 403.

[7] 陈尚文 . 马尾松毛虫过氧化氢酶及过氧化物酶与耐药性的关系[J]. 昆虫学报, 2001, 44(1): 9 – 14.

[8] Aebi H. Catalase in vitro[J]. Meth Enzymol, 1984, 105: 121 – 126.

[9] BestwiCK C S, Brown I R , Mansfield J W. Local – ized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the develop ment of a nohost hypersensitive reaction in Lettuce[J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 1065 – 1078.

[10] Nakano M A, Nsada K. Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate – specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 867 – 880.