

镉急性染毒对中华稻蝗羧酸酯酶和谷胱甘肽 *S*-转移酶活性的影响*

杨慧敏^{1,2} 张育平² 李丽君³ 马恩波² 郭亚平^{1**}

(1. 山西大学生命科学学院 太原 030006; 2. 山西大学应用生物学研究所 太原 030006;
3. 山西省农业科学院农业环境与资源研究所 太原 030006)

摘要 为深入探讨重金属镉(cadmium, Cd)的毒性效应,采用不同浓度氯化镉溶液对中华稻蝗 *Oxya chinensis* Thunberg 4龄若虫进行急性染毒,对处理后24、48、72和96 h虫体内羧酸酯酶(CarE)和谷胱甘肽 *S*-转移酶(GST)活性进行测定。结果表明,随着处理时间的延长,对照组和处理组 CarE 和 GST 活性均表现为先升后降的趋势。与对照组相比,以 α -NA 为底物时高浓度处理组($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) CarE 活性在处理48 h 被激活;以 β -NA 为底物时中浓度处理组($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) CarE 活性在72 h 达到最高;以 CDNB 为底物时,低浓度处理组($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) GST 活性在24 h 被激活达到最大值,之后降低。结果显示,中华稻蝗4龄若虫在 Cd 胁迫下,体内 CarE 和 GST 活性发生了变化,以此来抵御机体所受到的重金属毒害。

关键词 中华稻蝗, 镉, 羧酸酯酶, 谷胱甘肽 *S*-转移酶

Effects of Cd on carboxylesterase and glutathione *S*-transferase activity in *Oxya chinensis*

YANG Hui-Min^{1,2} ZHANG Yu-Ping² LI Li-Jun³ MA En-Bo² GUO Ya-Ping^{1**}

(1. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Institute of Agricultural Environment and Resource, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China)

Abstract To illustrate the toxic effects of cadmium in *Oxya chinensis* Thunberg, levels of CarE and GST activity induced by acute exposure (24, 48, 72, 96 h) to cadmium in forth-instar nymphs of *O. chinensis* were analyzed. The results show that the activity of both enzymes first increased then declined with exposure time in both control and treated plants. However, compared to control plants at the same treatment stage, CarE activity measured against β -NA of treatments ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was activated within 48 h, and the highest CarE activity measured against α -NA of treatments ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was observed within 72 h. The highest GST activity measured against CDNB of treatments ($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was observed within 24 h. These results indicate that CarE and GST activity in *O. chinensis* changed in response to exposure to cadmium as part of a mechanism to protect plants against the toxic effects of this heavy metal.

Key words *Oxya chinensis*, cadmium, carboxylesterase, glutathione *S*-transferase

重金属镉(cadmium, Cd)作为环境中重要的污染元素之一,主要来源于人类的生产活动,包括矿产开采、金属冶炼、煤和石油等燃料的燃烧以及化肥、农药的生产与施用(Belimov *et al.*, 2003)。Cd 污染具有毒性大、难降解的特点,它能够在生

物体内富集并具有生物放大效应,可以通过污染水环境和农作物等最终威胁到高等动物和人类的生存(Bodyii and Mackiewicz, 2007)。研究表明,Cd 进入动物和人体后,会诱导机体组织内氧自由基的不断聚集,进而导致脂质、蛋白质和 DNA 的

* 资助项目:国家自然科学基金项目(31071980)、山西省留学基金项目(2008114)、山西省自然科学基金项目(2011011033-1)、公益性行业(农业)科研专项(200903021)。

** 通讯作者, E-mail: guoy1955@163. com

收稿日期:2011-09-18, 接受日期:2011-10-24

过氧化反应,引起人和动物体的多种疾病(Waisberg *et al.*, 2003)。生物机体抵御重金属毒害的机制主要通过排泄机能、抗氧化酶系统及其它相关酶系的解毒作用等(Van, 1994)。

羧酸酯酶(carboxylesterase, CarE)是一类水解酶,能有效催化含酯键、酰胺键和硫酯键的内源性与外源性物质水解,并与多种药物、环境毒物及致癌物的解毒和代谢有关(滕霞和孙曼霁, 2003)。谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)能使有害的亲电物质与内源的还原型谷胱甘肽(GSH)结合,参与转运体内重要的脂类化合物,能为谷胱甘肽的 S 原子提供电子催化亲核反应,亲电性底物包括内源性物质及外源性物质(Gadagbui and James, 2000)。有研究表明,当过量的内源性和外源性化合物存在时,CarE 和 GST 可以通过酶的水解代替机体的氧化降解(Lindroth, 1989)。昆虫 CarE 和 GST 活性能被金属诱导,并且活性的改变与金属的属性、浓度及机体年龄、性别和发育阶段有关(Mathova, 1990; Postma *et al.*, 1994)。

目前,关于 Cd 对中华稻蝗 *Oxya chinensis* Thunberg 的毒性研究主要集中在抗氧化酶系统的作用机制方面(Li *et al.*, 2005a, 2005b; 吴昊等, 2008),对机体其它解毒酶系的功能研究尚未见报道。本文采用 Cd 急性染毒方法,研究中华稻蝗 CarE 和 GST 活性的变化,以揭示中华稻蝗 CarE 和 GST 在机体 Cd 解毒代谢中的作用,为镉解毒机理研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

实验用中华稻蝗卵于 2010 年 11 月采自山西省太原市晋源区,放入人工气候箱(27℃, L:D = 14:10, 60%湿度)内孵化,2 周后虫卵孵出,室温下饲养至 4 龄若虫后用于实验,实验期间每日以新鲜小麦苗饲喂。

1.2 主要化学试剂与仪器

氯化镉(CdCl₂ · 2.5H₂O, 分析纯,天津化工三厂); α -萘酚(α -NA, 上海生工生物工程有限公司); β -萘酚(β -NA, 上海生工生物工程有限公司);1-氯-2,4 二硝基苯(CDNB, 上海生工生物工程有限公司);牛血清蛋白(BSA, Bio-Rad 公司)。

DY89-II 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司),Spectra MAX 190 型酶标仪(美国 Molecular Device 公司)。

1.3 急性染毒

参照本实验室前期测定的 24 h LC₅ (190.38 mg · L⁻¹), 48 h LC₅ (90.07 mg · L⁻¹), 72 h LC₅ (56.49 mg · L⁻¹), 确定 20, 40 和 80 mg · L⁻¹ 3 个浓度梯度,以三蒸水为对照。将 4 μ L 溶液注射到中华稻蝗 4 龄若虫 2~3 腹节处,每个浓度注射雌雄虫各 60 头,设 3 个重复。染毒后分别在 24, 48, 72 和 96 h 4 个时间段随机取样(雌雄虫各 10 头),立即冻存于 -80℃ 冰箱中待测。

1.4 酶活测定

取出各样本,称重,以 1:9 (W/V) 加入 pH = 7.5 Tris-HCl 匀浆液,冰浴中匀浆,将匀浆液于 4℃ 离心(15 000 g, 20 min)后,收集并分装上清液用于测定。

羧酸酯酶活性的测定:用 α -NA、 β -NA 为底物,参照 Van Asperen (1962), Zhu 和 He (2000) 的方法在 600 nm (α -NA) 和 560 nm (β -NA) 测定 OD 值。

谷胱甘肽 S-转移酶活性的测定:用 CDNB 为底物,参照 Zhu 等(2000)的方法在 340 nm 处测定 OD 值。

蛋白含量的测定:蛋白含量参照 Smith 等(1985)的方法,用牛血清白蛋白作为标准测定,用酶标仪在 560 nm 处读取 OD 值。

1.5 数据分析

实验结果以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示,采用 SPSS11.5 统计软件对结果进行方差分析(ANOVA)与多重比较(LSD 法)。

2 结果与分析

2.1 Cd 对中华稻蝗 CarE 活性的影响

2.1.1 以 α -NA 为酶作用底物 由图 1 可以看出,相同 Cd 浓度处理后,随着时间的延长,CarE 活性均表现为 72 h 升高,96 h 降低的趋势,处理不同时间差异显著($P < 0.05$)。ANOVA 结果显示,处理后 24 和 72 h, CarE 活性在不同处理浓度间无显著差异($P > 0.05$)。处理后 48 h, CarE 活性呈现上升趋势,当 Cd 浓度在 80 mg · L⁻¹ 时, CarE 活性

最高。处理后 96 h, 高浓度处理组 ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与对照组相比, CarE 活性显著降低 ($P < 0.05$)。

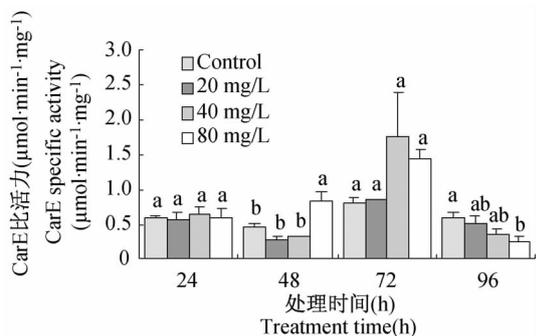


图1 Cd对中华稻蝗 CarE 活性 (α -NA 为底物) 的影响
Fig.1 Effect of Cd on CarE activity (against α -NA) in *Oxya chinensis*

图中数值为平均数 \pm 标准误, 不同小写字母表示同一时间不同浓度间的显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。Data are mean of three repetitions \pm SE. Histograms with different small letters indicate significant difference between the different Cd concentration ($P < 0.05$). The same below.

2.1.2 以 β -NA 为酶作用底物 由图 2 可以看出, 以 β -NA 为酶作用底物时, CarE 活性在 40 和 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组中表现为处理后 72 h 升高, 而 96 h 降低的趋势, 处理不同时间差异显著 ($P < 0.05$)。处理 24、48 和 96 h, ANOVA 分析显示, CarE 活性在不同处理浓度间无显著差异 ($P > 0.05$)。处理后 72 h, 随着 Cd 处理浓度的增加, CarE 活性呈现出先升后降的趋势。当 Cd 浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CarE 活性最高, 各处理组的酶活性

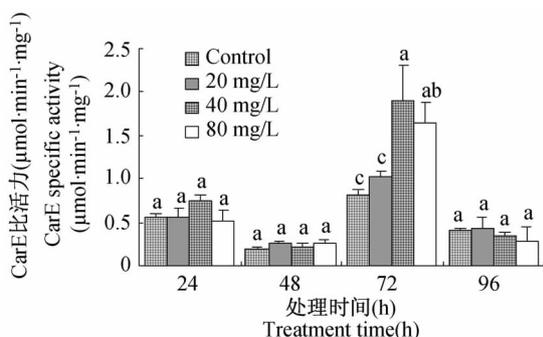


图2 Cd对中华稻蝗 CarE 活性 (β -NA 为底物) 的影响
Fig.2 Effect of Cd on CarE activity (against β -NA) in *Oxya chinensis*

分别是对照组的 1.26、2.3 和 2.0 倍。

2.2 Cd 对中华稻蝗 GST 活性影响

由图 3 可以看出, 随着处理时间的延长, GST 活性在 20 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组中表现为处理后 72 h 升高, 而 96 h 降低的趋势, 不同时间差异显著 ($P < 0.05$)。ANOVA 分析显示, 处理后 48 和 72 h GST 活性在不同处理浓度间无显著差异 ($P > 0.05$)。处理后 24 h, 随着 Cd 处理浓度的增加, GST 活性呈现出先升后降的趋势, 当 Cd 浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, GST 活性最高。

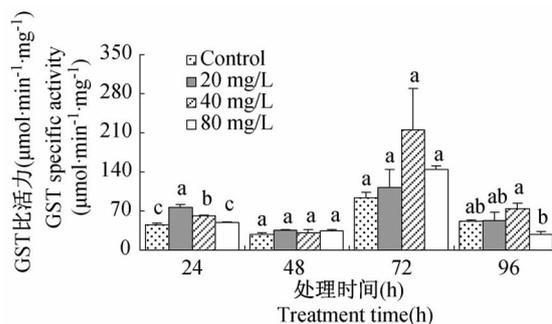


图3 不同 Cd 处理对中华稻蝗 GST 活性的影响
Fig.3 Effect of Cd on GST activity in *Oxya chinensis*

2.3 多因素方差分析

中华稻蝗 CarE 和 GST 活性的多因素方差分析结果见表 1。由表 1 可见, 整个模型的概率水平为 0, 判决系数为 0.866, 说明酶活性的变化能被酶的种类或不同底物、处理时间和处理浓度及三者的交互效应解释的部分为 86.6%。其中, 酶类型或不同底物和处理时间对酶活性有极显著的影响 ($P < 0.001$), 处理浓度对酶活性有显著影响 ($P < 0.05$)。酶 \times 时间及酶 \times 浓度有明显的交互作用 ($P < 0.05$), 而酶 \times 时间 \times 浓度三者之间无明显交互作用 ($P > 0.05$)。

3 讨论

中华稻蝗受到 Cd 胁迫后, 会产生相应的防御机制, 以调节机体对重金属的承受能力。本实验室的前期研究表明, 中华稻蝗可通过粪便和蜕皮将部分 Cd 排出体外 (数据未发表), 以保护中华稻蝗免受 Cd 的毒害, 同时, 中华稻蝗也可通过抗氧化酶系统来防御 Cd 的毒害 (Li *et al.*, 2005a,

表 1 中华稻蝗 CarE 和 GST 的多因素方差分析结果
Table 1 ANOVA results of CarE and GST activities in the grasshopper *Oxya chinensis*

方差来源 Source	Ⅲ型的 平方和 Type III sum of squares	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F 值 The value of F	P 值 The value of P
修正模型 Corrected model	273 397. 735 ^a	47	5 816. 973	13. 229	0. 000
截距 Intercept	83 438. 759	1	83 438. 759	189. 761	0. 000
酶 Enzymes	157 850. 101	2	78 925. 051	179. 495	0. 000
时间 Time	29 238. 243	3	9 746. 081	22. 165	0. 000
浓度 Concentration	3 728. 446	3	1 242. 815	2. 826	0. 043
酶 × 时间 Enzymes × Time	55 500. 688	6	9 250. 115	21. 037	0. 000
酶 × 浓度 Enzymes × Concentration	7 233. 970	6	1 205. 662	2. 742	0. 017
时间 × 浓度 Time × Concentration	6 849. 333	9	761. 037	1. 731	0. 092
酶 × 时间 × 浓度 Enzymes × Time × Concentration	12 996. 955	18	722. 053	1. 642	0. 065
误差 Error	42 211. 694	96	439. 705		
总离差 Total deviation	399 048. 189	144			
校正总离差 Corrected total	315 609. 429	143			

^a: R squared = 0. 866 (adjusted R squared = 0. 866).

2005b; 吴昊等, 2008; 孙鸽等, 2009)。CarE 和 GST 均为昆虫体内重要的代谢解毒酶系, 可参与各种外源毒物的代谢, 通过水解、氧化、还原和耦合等, 以起到解毒作用。

中华稻蝗 CarE 在所有实验组中均表现为 72 h 被激活, 而 96 h 被抑制的趋势(图 1, 2)。实验中对照组和处理组 CarE 活性随时间变化趋势相同, 可能是因为昆虫自身的生长发育及生理条件影响了酶的活性, Wilczek 等(2003)在研究重金属污染区的捕食性步甲 *Poecilus cupreus* 时发现不同发育阶段对照组 CarE 活性差异明显。以 α -NA 为底物时, 处理 48 h 后, 高浓度处理组 ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) CarE 比活力为同期对照组的 1. 89 倍; 以 β -NA 为底物时, 处理 72 h 后, 各处理组 CarE 比活力与同期对照组相比都有所提高。说明 Cd 能够刺激机体增强 CarE 活性, 这与 Stone 等(2002)关于重金属污染区步行虫 *Pterostichus oblongopunctatus* CarE 活性升高的研究结果相同。中华稻蝗 CarE 活性的改变只在处理后一定时间依赖于 Cd 的浓度, 这可能是因为重金属处理后在短时间内昆虫会通过体内抗氧化酶系统进行保护, 孙鸽等(2009)研究表明中华稻蝗经 Cd 急性染毒 48 h 后 SOD 和 GPx 活性最高。Frohlich(2002)将苜蓿切叶蜂 *Megachile rotundata* 酯酶作用于 36 种底物,

结果发现, 生物体酯酶作用于不同底物, 其亲和力不同, 故采用 α -NA、 β -NA 2 种不同酶作用底物测出的 CarE 活性存在差异。

本文中华稻蝗 GST 在所有实验组中均表现为 72 h 被激活, 而 96 h 被抑制的趋势(图 3)。对照组中 GST 活性呈现不规则变化, 与 Wilczek 等(2003)对捕食性步甲的研究结果相同。以 CDNB 为底物时, 处理 24 h 后, GST 的比活力在低浓度 ($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和中浓度处理组 ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 显著升高, 而高浓度处理组 ($80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与对照组相比没有显著差异, 说明 Cd 在一定范围内会激活 GST 活性。Stone 等(2002)的研究结果表明, 从金属污染区采集到的步行虫 *P. oblongopunctatus* 与非污染区相比 GST 活性升高。Wilczek 和 Migula(1996)在研究金属冶炼区的蜘蛛 *Pardosa palustris* 时也发现 GST 活性升高的现象, 本文研究结果与此相一致。GST 活性在 48 h 时没有提高可能是因为谷胱甘肽过氧化物酶对脂类过氧化物及 H_2O_2 的高亲和性, 避免体内 Cd 对机体的伤害(孙鸽等, 2009)。随着处理时间的延长, 高浓度的 Cd 破坏了 GST 的生物活性, 导致 96 h 时高浓度处理下 GST 活性显著下降。

多因素方差分析结果中(表 1)中华稻蝗 CarE 和 GST 与处理时间和浓度并没有显著的相关关系

($P > 0.05$),可能的原因是受 Cd 胁迫后虫体内同时有其它代谢酶系起作用,还有可能与虫体本身的激素调节有关(Wilczek *et al.*, 2003),这有待于我们在今后工作中进行系统研究。

CarE 和 GST 作为中华稻蝗体内的代谢解毒酶,其活性的增加有助于加强对外源物质 Cd 的分解,保证生物体正常的生理活动,而 Cd 浓度过高时也会抑制酶的活性。中华稻蝗在受到重金属胁迫后其它解毒酶系(如:细胞色素 P450 等)是否也在发挥作用,以及它们特定的解毒机制如何,有待进一步的研究。

参考文献 (References)

- Belimov AA, Safronova VI, Tsyganov VE, Borisov AY, Kozhemyakov AP, Stepanok VV, Martenson AM, Gianinazzi-Pearson V, Tikhonovich IA, 2003. Genetic variability in tolerance to cadmium and accumulation of heavy metals in pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*, 133 (1):25—35.
- Bodyii A, Mackiewicz P, 2007. Analysis of the targeting sequences of an iron-containing superoxide dismutase (SOD) of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* suggests function in multiple cellular compartments. *Arch. Microbiol.*, 187(4):281—296.
- Frohlich DR, 2002. Substrate specificity of esterases in a solitary bee, *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae): Variability in sex, age and life stage. *Biochem. Syst. Ecol.*, 18(7/8):539—547.
- Godagbui BK, James MO, 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquat. Toxicol.*, 49 (1/2):27—37.
- Li LJ, Liu XM, Guo YP, Ma EB, 2005a. Activity of the enzymes of the antioxidative system in cadmium-treated *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *Environm. Toxicol. Pharmacol.*, 20(3):412—416.
- Li LJ, Zhang F, Liu XM, Guo YP, Ma EB, 2005b. Oxidative stress related enzymes in response to chromium (VI) toxicity in *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea). *J. Environ. Sci.*, 17(5):823—826.
- Lindroth RL, 1989. Differential esterase activity in *Papilio glaucus* subspecies: Absence of cross-resistance between allelochemicals and insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 35(2):185—191.
- Mathova A, 1990. Biological effects and biochemical alterations after long-term exposure of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae to cadmium containing diet. *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 87(4):241—248.
- Postma JF, Buckert-de Jong MC, Staats N, Davids C, 1994. Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) at different food levels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26(2):143—148.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1):76—85.
- Stone D, Jepson P, Laskowski R, 2002. Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132(1):105—112.
- Van Asperen K, 1962. A study of house fly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8(4):401—416.
- Van SNM, 1994. Heavy metals adaptation in terrestrial arthropods—physiological and genetic aspects. *Proc. Exp. Appl. Entomol.*, 5:3—17.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D, 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis: a review. *Toxicology*, 192(2/3):95—117.
- Wilczek G, Kramarz P, Babczynska A, 2003. Activity of carboxylesterase and glutathione S-transferase in different life-stages of carabid beetle (*Poecilus cupreus*) exposed to toxic metal concentrations. *Comp. Biochem. Phys. C: Toxicol. Pharmacol.*, 134(4):501—512.
- Wilczek G, Migula P, 1996. Metal body burdens and detoxifying enzymes in spiders from industrially polluted areas. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354(5/6):643—647.
- Zhu KY, Gao JR, Starkey SK, 2000. Organophosphate resistance mediated by alterations of acetylcholinesterase in resistant clone of the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 68(3):138—147.
- Zhu KY, He FQ, 2000. Elevated esterases exhibiting arylesterase-like characteristics in an organophosphate-resistant clone of the greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 67(3):155—167.
- 孙鸽, 杨美玲, 吴海花, 马恩波, 郭亚平, 2009. 镉染毒对中华稻蝗 SOD、GPx 活力和 MDA 含量的影响. *山西大学学报(自然科学版)*, 32(S1):119—122.
- 滕霞, 孙曼霖, 2003. 羧酸酯酶研究进展. *生命科学*, 15(1):31—35.
- 吴昊, 孙鸽, 吴海花, 郭亚平, 马恩波, 2008. 镉对中华稻蝗 4 龄若虫抗氧化酶的影响. *四川动物*, 27(5):829—831.