百草枯对蜜蜂寿命及抗氧化酶基因表达影响*

王文祥** 王 欢 张 飞 吴小波 曾志将***

(江西农业大学蜜蜂研究所 南昌 330045)

摘 要 本研究用200、400和600 mg/L的百草枯饲喂刚出房的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola 工蜂,检测其对工蜂寿命及抗氧化酶基因 *Sod 1* 和 *Sod 2* 表达的影响,并以饲喂蔗糖作为对照组。结果表明:随着百草枯浓度的增加,工蜂的寿命极显著下降($P<0.01$);抗氧化酶基因 *Sod 1* 的相对表达量,随着百草枯浓度的增加而增加,其中对照组 *Sod 1* 基因的相对表达量显著低于各百草枯处理组($P<0.05$);*Sod 2* 基因的相对表达量,随着百草枯浓度的增加,先增加后减少,其中600 mg/L百草枯处理组 *Sod 2* 基因的相对表达量显著低于对照组和低剂量百草枯处理组($P<0.05$)。

关键词 意大利蜜蜂,工蜂,寿命,抗氧化酶基因

Effects of paraquat on lifespan and level of expression of antioxidant enzyme genes in worker bees of *Apis mellifera ligustica*

WANG Wen-Xiang** WANG Huan ZHANG Fei WU Xiao-Bo ZENG Zhi-Jiang***

(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract We investigated the effects of paraquat on lifespan and the level of expression of mRNA for the antioxidant enzyme genes *Sod 1* and *Sod 2* in newly emerged worker bees of *Apis mellifera ligustica* Spinola. Paraquat was given at doses of 200 mg/L, 400 mg/L and 600 mg/L. Bees in the control group were fed sucrose. The results showed that lifespans of honey bees decreased with the increase of paraquat concentration ($P<0.01$). The relative level of expression of the antioxidant enzyme gene *Sod 1* increased linearly with the increase of paraquat concentration and it was significantly lower in the control group than in the paraquat-treated groups ($P<0.05$). In contrast, the relative level of expression of the antioxidant enzyme gene *Sod 2* increased initially but then decreased with the increase of paraquat concentration. The level of expression of this gene was significantly lower in the high-dosage paraquat-treated group (600 mg/L) than that in both the control group and the low-and middle-dosage paraquat-treated groups ($P<0.05$).

Key words *Apis mellifera ligustica*, worker, lifespan, antioxidant enzyme

生物体在有氧代谢过程中,会产生超氧阴离子自由基(O_2^-)、H_2O_2 和羟自由基(-OH)等活性氧(ROS)。越来越多的研究表明:ROS 会导致细胞组分的氧化损伤,进而引起生物体的衰老和病变(Jin *et al.*, 2001)。为了避免氧化损伤,好氧性生物在进化过程中,形成了一个复杂且高度保守的抗氧化系统,用以清除代谢过程中产生的活性氧。这个抗氧化系统由酶促系统和非酶促系统两大类构成(Corona and Robinson,2006)。

百草枯(paraquat,PQ)是一种广泛使用的除草剂,在机体内通过氧化还原反应,将 O_2 还原生成 O_2^-,形成氧化应激(Day *et al.*, 1999)。近年来的报道显示,PQ 暴露可能导致人类患上帕金森症(Dinis-Oliveira *et al.*, 2006; Costello *et al.*, 2009)。在无脊椎动物中,PQ 同样诱导氧化应激,对果蝇的研究表明,PQ 使其死亡时间提前,并显著提高超氧化物歧化酶的活性(Rzezniczak *et al.*, 2011)。在蜜蜂中,科学家发现卵黄蛋白能提高雌

* 资助项目:国家蜂产业技术体系资助项目(CARS-45-kxj12)。

**E-mail: honesty0123@163.com

***通讯作者,E-mail:bees1965@sina.com

收稿日期:2012-06-27,接受日期:2012-08-02

性蜜蜂对 PQ 诱导的氧化应激的抗性(Seehuus *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2007)。本试验用不同浓度的百草枯饲喂刚出房的意大利蜜蜂工蜂,来探讨氧化应激对蜜蜂寿命及抗氧化酶基因表达的影响。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试昆虫 取自江西农业大学蜜蜂研究所饲养的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* Spinola。

1.1.2 实验分组 用 50% 的蔗糖溶液稀释百草枯(总有效成分:200 g/L),使其浓度为 200、400 和 600 mg/L,4℃保存,备用。本试验分成 4 个组,每组称取刚出房的意大利蜜蜂工蜂 160 只,放入小木箱(11 cm×13 cm×15 cm),在恒温恒湿箱中饲养(34℃,RH:65%)。先饲喂蔗糖溶液(1:1),24 h 后,取出已死亡的工蜂,开始正式试验。4 个组分别饲喂含 0、200、400 和 600 mg/L 百草枯的蔗糖溶液,分别为对照组(Ⅰ组)和 3 个实验处理组(Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组)。每 12 h 更换一次食物,并记录和清除已死亡的蜜蜂。等Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ 3 个实验组中工蜂全部死亡后,则结束试验。在试验期间,饲喂足量新鲜花粉。本试验重复 3 次。

1.1.3 工蜂样品采集 按上述方法饲喂工蜂,72 h 后进行取样,每个组取 8 只工蜂,以 4 个工蜂腹部作为 1 个样品,用于抗氧化酶基因 mRNA 表达量的检测,每组样品计为 6 个重复。取样后蜜蜂样品立即放入液氮速冻,-80℃保存,用于提取总 RNA。

1.1.4 试剂及仪器 总 RNA 提取试剂盒 Trizol,RNA 酶抑制剂购自全式金公司;M-MLV 反转录酶及 SYBR Green Ⅱ荧光定量试剂购自 TaKaRa 公司;百草枯购自合肥益丰化工有限公司。

普通离心机(飞鸽 KA-1000 型,上海安亭科学仪器厂公司产品),台式冷冻离心机(Eppendorf 5810R),移液器(Eppendorf 公司产品),Real-Time PCR System (Bio-Rad 公司产品)。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

每个样品用液氮研磨后,用 Trizol 试剂盒进行 RNA 的提取。所有操作均按照试剂盒说明书进行,RNA 最后溶于 30 μL RNA-free 的 DEPC 水中,经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后,放入 -80℃保存。

用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录,反应体系为 50 μL:8 μL 总 RNA,10 μL Buffer, 8 μL dNTP,1.5 μL M-MLV 反转录酶,3 μL Oligo dT,1 μL RNA 酶抑制剂,18.5 μL DEPC 水。反转录反应条件如下:体系混匀后,42℃反应 60 min,75℃ 5 min。反转录产物稀释 10 倍后保存于 -80℃。

1.3 荧光定量 PCR

所有引物均参照 GenBank 上已发表的序列,按照 SYBR premix Ex Taq™ Ⅱ试剂盒要求,采用 DNAMAN 5.0 设计引物(跨内含子),引物序列见表 1。qRT-PCR 反应体系为 10 μL: 1 μL 反转录产物,目的基因上游和下游引物各 0.4 μL,5 μL 2×SYBR premix Ex Taq™ Ⅱ,3.2 μL dd H_2O。PCR 扩增程序为 95℃预变性 30 s,95℃ 10 s,58.9℃ 1 min,40 个循环;最后以每 5 s 上升 0.5℃的速度从 61℃到 95℃记录熔解曲线,每个反转录样品重复 3 次。使用仪器为 Bio-Rad 公司的 MyiQ2。qRT-PCR 反应以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH-1*)为内参基因,反应结束后收集目的基因(*Sod 1* 和 *Sod 2*)与内参基因(*GAPDH-1*)的 C_T 值,用 qpcR package (Spiess and Ritz,2010),R(Hornik,2011)软件计算扩增效率,计算基因相对表达量(r)的数据分析方法参考 Huang 等(2012)。

表 1 *Sod 1*, *Sod 2* 和 *GAPDH-1* 基因扩增引物

Table 1 Primer pairs used in the amplification of *Sod 1*, *Sod 2* 和 *GAPDH-1* genes

目的基因 Target genes	引物序列(5′-3′) Primer sequences
Sod 1	F: GGATTGCATGGTTTTCATGTTC
	R: CATGATCCTTTCCTAATGGGTTG
Sod 2	F: AAGAAGTGCAGCGTCTGGTTTAC
	R: GGTGGTGGTCATTTGAATCATTC
GAPDH-1	F: GCTGGTTTCATCGATGGTTT
	R: ACGATTTCGACCACCGTAAC

1.4 数据统计与分析

本试验采用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行 Kaplan-Meier 法的生存分析。各试验组基因表达量的差异,采用 StatView 软件 ANOVA and *t*-test 中

的 ANOVA or ANCOVA 进行统计分析。

2　结果与分析

2.1　百草枯对蜜蜂寿命的影响

从表 2 可知:工蜂的平均寿命随着百草枯浓度的增加而减少。由图 1 和表 3 可知:随着百草枯含量的增加,工蜂的存活率极显著降低($P < 0.001$)。

表 2　百草枯对蜜蜂寿命的影响(h)

Table 2　Effects of paraquat on mean and median lifespan of honeybee(h)

处理 Treat	均值[a] Mean ± SE	中位数 Median
Ⅰ	260.720 ± 3.787	—
Ⅱ	191.120 ± 5.717	180.000
Ⅲ	125.086 ± 4.600	120.000
Ⅳ	97.146 ± 4.415	72.000

注:a. 如果估计值已删失,那么它将限制为最长的生存时间。

a. Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

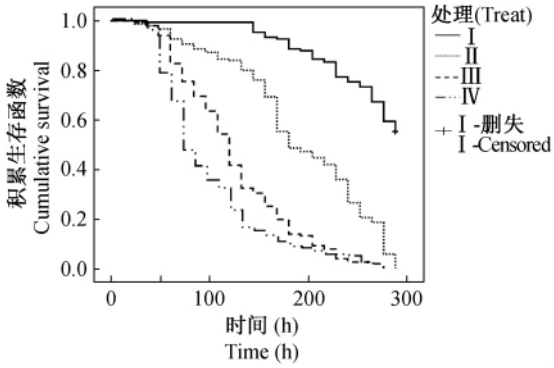

图 1　百草枯对蜜蜂生存率的影响

Fig. 1　Effects of paraquat on survival distribution function of honeybee

2.2　百草枯对蜜蜂抗氧化酶基因表达量的影响

从图 2 可见,各试验组工蜂 *Sod 1* 基因的相对表达量($r > 0$)均高于内参基因,且随着百草枯剂量的增加而增加,对照组 *Sod 1* 基因的相对表达量显著低于各百草枯处理组($P < 0.05$)。从图 3 可见,各试验组 *Sod 2* 基因的相对表达量($r < 0$)均低于内参基因,且随着百草枯浓度的增加先增加后减少,600 mg/L 百草枯处理组中 *Sod 2* 基因的相对表达量显著低于低剂量百草枯处理组和对照组($P < 0.05$)。

表 3　百草枯对蜜蜂寿命影响的成对比较

Table 3　Pairwise comparison of paraquat's effects on the lifespan of honeybee

	处理 Treat	Ⅰ		Ⅱ		Ⅲ		Ⅳ	
		卡方(χ^2)	P 值	卡方(χ^2)	P 值	卡方(χ^2)	P 值	卡方(χ^2)	P 值
Log-rank 检验	Ⅰ			141.257	< 0.001	262.703	< 0.001	296.899	< 0.001
	Ⅱ	141.257	< 0.001			76.322	< 0.001	122.912	< 0.001
	Ⅲ	262.703	< 0.001	76.322	< 0.001			14.382	< 0.001
	Ⅳ	296.899	< 0.001	122.912	< 0.001	14.382	< 0.001		

3　讨论

蜜蜂寿命有很强可塑性,受遗传、环境等诸多因素的影响(管翠等,2011)。Harman(1956)首次提出氧化应激理论,并认为生物体的寿命取决于机体内 ROS 的富集速率。这一假设在蝇类(Sohal *et al.*, 1995)、鸟类(Barja *et al.*, 1994)、哺乳类(Brunet-Rossinni,2004)中得到了证实。本实验的研究结果表明:随着百草枯浓度的增加,工蜂的寿命极显著下降,这可能是因为随着百草枯浓度的增加,蜜蜂摄入体内的百草枯的量也随之增加,导致机体内 ROS 的富集速率高于清除速率,使 ROS 在体内富集,对机体形成氧化应激,造成蜜蜂寿命的缩短。本试验的研究结果与在果蝇中的报道相一致(Rzezniczak *et al.*, 2011)。

为了防止氧化损伤,生物体内的抗氧化系统在不断的清除机体内产生的 ROS。Corona 和 Robinson(2006)对蜜蜂抗氧化相关的基因进行了注释,总共鉴定了 38 个抗氧化基因,其中包括酶促抗氧化系统的主要成分。超氧化物歧化酶

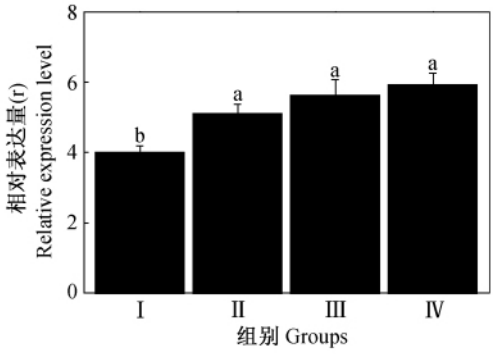

图 2　百草枯对蜜蜂 *Sod 1* 基因表达量的影响

Fig. 2　Effects of paraquat on expression level of *Sod 1* gene in honeybee

注:图中数据(平均值 ± SE)两两相比,相同字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下图同。

Dta are mean ± SE. Histograms with the different letters indicate significantly different at 0.05 level. The same below.

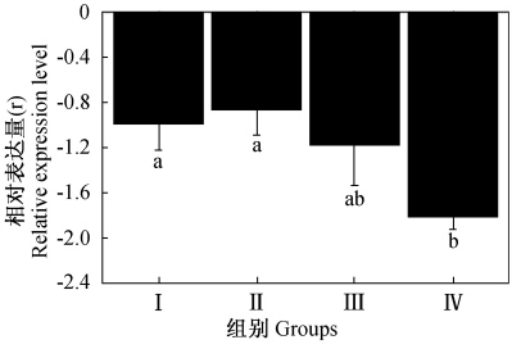

图 3　百草枯对蜜蜂 *Sod 2* 基因表达量的影响

Fig. 3　Effects of paraquat on expression level of *Sod 2* gene in honeybee

(SODs)是一种主要的抗氧化酶,它能催化超氧化物阴离子自由基发生歧化作用而生成分子氧和过氧化氢,为清除 ROS 提供第一道防线(Corona and Robinson,2006)。SODs 通常以 2 种形式存在于真核细胞中:Sod 1 存在于细胞质内,Sod 2 存在于线粒体内。本研究结果表明:*Sod 1* 基因的相对表达量随着百草枯剂量的增加而增加,且各处理组的 *Sod 1*基因的相对表达量均高于对照组,这可能是因为随着细胞内 ROS 的增加,为了防止细胞组分被氧化,维持细胞的正常功能,机体必须产生更多的 Sod 1 酶来清除过多的 ROS。然而,*Sod 2* 基因的相对表达量则随着百草枯剂量的增加先增加后减少,其中 600 mg/L 百草枯处理组 *Sod 2* 基因的相对表达量显著低于对照组和低剂量百草枯处理组。这可能是由于 Sod 2 存在于线粒体内,且线粒体是产生活性氧的主要细胞器(Perez-Campo *et al.*,1998),适量的增加百草枯的浓度,可能会刺激*Sod 2*基因的表达,但是当百草枯的浓度过量时,线粒体内的组分被氧化,可能会反过来抑制 *Sod 2* 基因的表达,从而使得细胞内抗氧化系统的崩溃,导致蜜蜂的衰老死亡,其详细机理还有待于进一步研究。

致谢:实验中得到了江西农业大学蜜蜂研究所田柳青、韩旭、潘其忠等同学的支持和帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献(References)

Barja G, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torres M, 1994. Low mitochondrial free radical production per unit O_2 consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic metabolic rate in birds. *Free Radic. Res.*, 21(5):317—327.

Brunet-Rossinni AK, 2004. Reduced free-radical production and extreme longevity in the little brown bat (*Myotis lucifugus*) versus two non-flying mammals. *Mech. Ageing. Dev.*, 125(1):11—20.

Corona M, Robinson GE, 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.*, 15(5):687—701.

Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, Robinson GE, 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *PNAS*, 104(17):7128—7133.

Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B, 2009. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am. J. Epidemiol.*, 169(8):919—926.

Day BJ, Patel M, Calavetta L, Chang LY, Stamler JS, 1999. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *PNAS*, 96(22):12760—12765.

Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, Carvalho F, 2006. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*,

27(6):1110—1122.

Hornik K, 2011. The R FAQ. ISBN 3 - 900051 - 08 - 9, 2011. http://CRAN. R - project. org/doc/FAQ/R—FAQ. html.

Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RF, 2012. Survival and immune response of drones of a *Nosemosis tolerant* honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(3):297—302.

Jin LH, Bahn JH, Eum WS, Kwon HY, Jang SH, Han KH, Kang TC, Won MH, Kang JH, Cho SW, Park J, Choi SY, 2001. Transduction of human catalase mediated by an HIV - 1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 31(11): 1509—1519.

Perez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G, 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B*, 168(3): 149—158.

Rzezniczak TZ, Douglas LA, Watterson JH, Merritt TJ, 2011. Paraquat administration in *Drosophila* for use in metabolic studies of oxidative stress. *Anal. Biochem.*, 419(2):345—347.

Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV, 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *PNAS*, 103(4): 962—967.

Sohal RS, Sohal BH, Orr WC, 1995. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radic. Biol. Med.*, 19(4):499—504.

Spiess A, Ritz C, 2010. qpcR: Modelling and analysis of real-time PCR data. R package version 1.3—2.

管翠, 刘亭亭, 颜伟玉, 曾志将, 2011. 蜜蜂寿命可塑性机制的研究进展. 应用昆虫学报, 48(4):1071—1076.