

印楝素对中华稻蝗血细胞的毒性影响

王小莉^{1*} 张雪娟¹ 张欣¹ 刘庆华² 张小民^{1**}

(1. 山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2. 太原市食品药品检验所, 太原 030006)

摘要 【目的】近年来, 农药的长期使用使害虫产生抗性, 同时造成了环境污染, 目前多数研究侧重于化学农药对昆虫酶活性的影响, 而植物源农药对昆虫的免疫毒理研究较少。【方法】通过给中华稻蝗 *Oxya chinensis* (Thunberg) 注射不同浓度的印楝素, 用 Wright-Giemsa 染液染色和光学显微镜观察感染后血细胞的形态, 对各种类型细胞进行数量统计; 酶联免疫测定 SOD, POD, PO, AchE, P450 氧化酶和 CES 的活性变化。【结果】实验组血细胞发生固缩、空泡、脱粒和细胞变形等现象; 与空白对照组相比, 感染后不同时间段浆血细胞的数量先升高后降低, 粒血细胞的数量先降低后升高, 感染后期囊血细胞数量显著增加; 与溶剂组相比, 60 $\mu\text{g/L}$ 和 120 $\mu\text{g/L}$ 的 SOD 活性被极显著 ($P<0.01$) 激活; 60 $\mu\text{g/L}$ 和 120 $\mu\text{g/L}$ 的 POD 活性在注射后 6–24 h 间被显著 ($P<0.05$) 激活; 120 $\mu\text{g/L}$ 的 PO 活性在 6–24 h 被极显著 ($P<0.01$) 激活; 实验组中 AchE 活性均在 10–24 h 被极显著 ($P<0.01$) 激活; 30 $\mu\text{g/L}$ 的 CES 活性被极显著 ($P<0.01$) 激活; P450 活性均被激活, 但激活效果不明显。【结论】研究表明: 植物源农药使稻蝗血细胞的形态和数量发生显著变化, 血细胞中相关酶活性的变化情况可推测出稻蝗对印楝素的毒害产生免疫反应, 进一步探讨了稻蝗的免疫机理。本研究不仅为稻蝗的预防和治理提供了理论依据, 也为昆虫的免疫毒理学提供了参考。

关键词 稻蝗血细胞; 印楝素; 酶活性; 形态; 数量

Effect of azadirachtin on the hemocytes of *Oxya chinensis*

WANG Xiao-Li^{1*} ZHANG Xue-Juan¹ ZHANG Xin¹ LIU Qing-Hua² ZHANG Xiao-Min^{1**}

(1. College of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Food and Drug Inspection Institute, Taiyuan 030006, China)

Abstract [Objectives] Long-term use of pesticides has selected for pesticide resistance in pests and environmental pollution. Currently most studies focus on the effects of chemical pesticides on insect enzymes and there have been relatively little research on the immunotoxicity of plant-derived pesticides to insects. [Methods] Different concentrations of azadirachtin were injected into *Oxya chinensis* (Thunberg) and hemocyte morphology and the number of various cell types were observed at different times under an optical microscope after Wright-Giemsa dyeing. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the activity of SOD, POD, PO, AchE, P450 oxidase and CarE. [Results] The hemocytes of treatment groups showed signs of contracting, vacuole development, threshing and cell deformation. Compared to the control group, the number of plasma cells at different times after injection first increased then decreased, and the number of granulocytes first decreased then increased. The number of hemocytes dramatically increased. SOD and POD activity of the 60 $\mu\text{g/L}$ and 120 $\mu\text{g/L}$ treatment groups were significantly ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively) higher than those of the control group between 6 h and 24 h. PO activity of the 120 $\mu\text{g/L}$ treatment group was also significantly ($P<0.01$) higher than that of the control group over the same time period and AchE activity in all treatment groups was significantly ($P<0.01$) higher than that in the control group between 10 h and 24 h. CES activity in the 30 $\mu\text{g/L}$ treatment group was also significantly ($P<0.01$) higher than that of the control group. Although P450 activity was also higher, it was not significantly different to that in the control. [Conclusion] Treatment with plant-derived pesticides changed the morphology, and quantity, of hemocytes in *O. chinensis*. Changes in related enzymes activity in hemocytes could be used to infer the immune response of *O. chinensis* to azadirachtin.

*第一作者 First author, E-mail: 243352436@qq.com

**通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangxm@sxu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-06-25; 接受日期 Accepted: 2018-12-20

and further explore the immune response mechanisms of this species. These results not only provide a theoretical basis for the prevention and control of *O. chinensis*, but also general a reference for insect immunotoxicology.

Key words *Oxya chinensis* hemocytes; azadirachtin; enzyme activity; shape; quantity

早在 1669 年发现昆虫的第一个血细胞后, 科研学者对昆虫血细胞便展开一系列的研究。Gupta (1929) 对昆虫血细胞的形态和功能进行了研究。Brehelin 等 (1975) 对飞蝗 *Locusta migratoria* 和大栗鳃角金龟 *Melolontha melolontha* 血细胞的包被作用进行了研究。Tojo 等 (2000) 对蜡蛾 *Galleria mellonella* 浆血胞和粒血胞免疫反应中的吞噬作用进行了研究。Lavine 和 Stand (2002) 研究了昆虫血细胞的形态结构及其免疫作用, 并对鳞翅目昆虫的血细胞类型进行了总结。Ribeiro 和 Brehelin (2006) 研究了昆虫血细胞的类型。Stand (2008) 阐述了昆虫血细胞在免疫反应中具有重要的作用。Marmaras 和 Lampropoulou (2009) 对昆虫血细胞在无脊椎动物中的免疫反应过程进行了研究。Mohammed 和 Mohammed (2012) 对昆虫血细胞的分类做了总结, 并对浆血胞和粒血胞的功能进行了简单研究。Julián (2016) 对昆虫的免疫及造血进行了研究。之后, 科研学者还研究了某些菌对昆虫血细胞形态数量或酶活的影响。Cheung 等 (1978) 用苏云金杆菌感染美洲棉铃虫 *Heliothis zea* 的血细胞, 观察了血细胞数量和血淋巴蛋白的变化。Miranpuri 和 Khachatourians (1993) 对血黑蝗 *Melanoplus sanguinipes* 感染白僵菌后血细胞表面变化进行了研究。Gillespie 等 (2000) 对沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 感染真菌的免疫反应进行了研究。Heather 等 (2015) 研究了昆虫免疫系统对 3 种不同免疫挑战的反应。Ying 等 (2016) 研究了 Wright-Giemsa 染色后飞蝗 *Locusta migratoria* 吞噬细胞感染绿僵菌的变化。Wu 等 (2018) 研究了大肠杆菌和枯草芽孢杆菌感染玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 后对血细胞酚氧化酶的影响。在农药对昆虫的影响方面, 大部分是对体内酶活性的研究。李钦 (2003) 研究了有机磷农药对坛紫菜过氧化物酶活的影响。闫建国等

(2006) 研究了久效磷对黄鳝乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶活性的影响。侯军等 (2007) 研究了鬼臼毒素对小菜蛾 *Plutella xylostella* 体内几种代谢酶系的影响。方国飞 (2011) 研究了 3 种农药对红裸须摇蚊 *Prosilocerus akamusi* 羧酸酯酶活性的影响。

目前为止对昆虫的研究主要集中在菌侵入昆虫后, 昆虫的形态变化或一些抗氧化酶活性的研究, 而对农药进入昆虫体内血细胞形态变化及代谢酶等的毒害影响研究尚少, 其中植物源农药对昆虫的毒性影响研究更少。本文将印楝素用于稻蝗, 利用光学显微镜观察感染农药后稻蝗血细胞形态和数量的变化, 以及血细胞中某些抗氧化酶和代谢酶活性的变化来探究其对稻蝗的毒害损伤, 不仅对稻蝗的免疫毒理进行了探讨, 而且为开发有效治理稻蝗的农药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中华稻蝗成虫于 2017 年 9 月 11 号采自山西省太原市晋源区, 东经 E:112°48', 北纬 N:37°73'。0.3% 的印楝素乳油 (成都绿金生物科技有限公司); 昆虫超氧化物歧化酶酶联免疫分析试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 昆虫过氧化物酶酶联免疫分析试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 昆虫羧酸酯酶酶联免疫分析试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 昆虫乙酰胆碱酯酶酶联免疫分析试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 昆虫 P450 氧化酶酶联免疫分析试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 昆虫酚氧化酶酶联免疫分析试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 印楝素的注射浓度 本实验依据高书晶等 (2010) 等测定的印楝素的 LD₅₀, 设置 4 个

处理组, 分别为 0、30、60、120 $\mu\text{g/L}$, 和 1 个空白对照组。

1.2.2 饲养方法 将从田里采回的稻蝗成虫放置在 90 cm×60 cm×60 cm 的养虫笼内, 喂食新鲜的狗尾巴草, 每天换草 1-2 次; 饲养期间每隔 4 h 在笼外撒水保持湿度, 持续饲养一周。

1.2.3 供试虫的处理 早晨 7:00 给饲养一周的稻蝗成虫分为按照浓度为 0、30、60、120 $\mu\text{g/L}$ 进行注射, 每只稻蝗注射 20 μL , 每个浓度注射 30 只, 注射完后按照浓度放置在 30 cm×30 cm×30 cm 的养虫笼内, 做好标签; 此外再取 30 只放置在一个笼中作为空白对照。在注射 2、6、10、24 h 时取血, 取血时均取活稻蝗的血淋巴。

1.2.4 血涂片制作 以注射相同浓度印楝素的 5 只稻蝗为一个单位, 75%乙醇擦拭其胸腹部, 用消毒后的解剖针在其胸腹部取 1-2 滴血液于载玻片上, 涂片。Wright-Giemsa 染液染色, 树胶封片。选择染色均匀视野清晰的血涂片进行观察与计数。

1.2.5 血细胞数量统计方法 在血涂片细胞分布均匀处, 随机选择 5 个视野, 统计各类型细胞数。每种浓度取 5 个血涂片进行重复试验, 取平均值。

1.2.6 超氧化物歧化酶活性测定 (1) 血液处理: 印楝素处理稻蝗后, 在稻蝗胸腹部取血, 并将血液收集到 1.5 mL 的离心管中, 在 4 000 r/min 的低温冷冻离心机中离心 10 min, 取出离心完毕的 10 μL 上清液待测。(2) 活性测定: 依据试剂盒的测定方法进行, 每个样品重复 3 次。在酶标板的孔中加入 40 μL 的样品稀释液和 10 μL 的待测样品混匀, 封板后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中温育 30 min, 揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 加入洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 重复 5 次, 拍干, 之后加入酶标试剂 50 μL , 再次封板后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中温育 30 min, 揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 加入洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 重复 5 次, 拍干, 加入显色剂 A 液 50 μL 和显色剂 B 液 50 μL 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min, 再加入终止液 50 μL , 15 min 后在 450 nm 波长处测定 OD 值。每个浓

度重复测试 8 次, 取其平均值。

1.2.7 过氧化物酶活性测定 参照 1.2.5 的测定方法。

1.2.8 酚氧化酶活性测定 参照 1.2.5 的测定方法。

1.2.9 P450 氧化酶活性测定 参照 1.2.5 的测定方法。

1.2.10 羧酸酯酶活性测定 参照 1.2.5 的测定方法。

1.2.11 乙酰胆碱酯酶活性测定 参照 1.2.5 的测定方法。

1.2.12 酶活计算方法 用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程, 将样本的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。每种酶活的计算方法均一致。本研究酶活性单位均用 U/L 表示。

1.3 统计分析

实验中数据分析均是用 Spss22.0 统计软件进行处理间数据的差异显著性分析。采用单因素方差分析法分析实验组与空白对照组间的差异显著性检验 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$) 和溶剂对照组 (0 $\mu\text{g/L}$) 间的差异显著性检验 ($^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$)。

2 结果与分析

2.1 稻蝗血细胞形态的变化

稻蝗的血细胞中, 可以观察到 8 种类型的细胞, 浆血胞、粒血胞、囊血胞、珠血胞、脂血胞、类绛血胞、巨核血胞、足血胞。在对稻蝗处理后, 发现变化最大的细胞类型是浆血胞、粒血胞和囊血胞, 且血细胞形态会出现如下变化:

(1) 细胞固缩

注射印楝素后, 在浆血胞和粒血胞中出现细胞固缩的现象, 它们的细胞核和细胞质整体上变小。正常浆血胞的平均大小为 10 μm ×13.75 μm , 固缩后浆血胞的平均大小变为 5 μm ×5 μm ; 正常的粒血胞的平均大小为 10 μm ×15 μm , 固缩后粒血胞的平均大小变为 8 μm ×6 μm , WG 染色后,

细胞颜色变深,不再透亮(图 1:1,2)。

(2) 细胞变形

正常细胞的细胞核边缘光滑,除蠕形细胞的细胞核为梭形外,其他细胞的细胞核均为圆形的;感染后的细胞核边缘不再光滑,出现褶皱,细胞核的形状变得不规则,有的细胞核移到细胞的一侧(图 1:9)。

(3) 脱粒现象

粒细胞的脱粒现象表现在粒细胞的颗粒物从细胞质中流出,弥散在细胞液中,使细胞周围出现许多小颗粒物,细胞核甚至出现溶血现象(图 1:5,6)。

(4) 细胞核凋亡

主要出现在浆血胞中,浆血胞的细胞核变成一个个小圆球,小球的平均大小为 $3.75\ \mu\text{m} \times 3.75\ \mu\text{m}$,有的包在细胞质中,有的已经从细胞质中分离出来(图 1:3,4)。

(5) 空泡化

在各种类型的细胞中均会出现细胞的空泡化,但以浆血胞中的空泡最为典型,空泡大部分出现在细胞质中,有的细胞中会产生一个大空泡,将细胞核挤到边缘,剩余部分全由空泡占据;有的细胞中会出现几个大小不等的空泡,最小的空泡大小为 $2.5\ \mu\text{m} \times 2.5\ \mu\text{m}$ (图 1:7,8)。

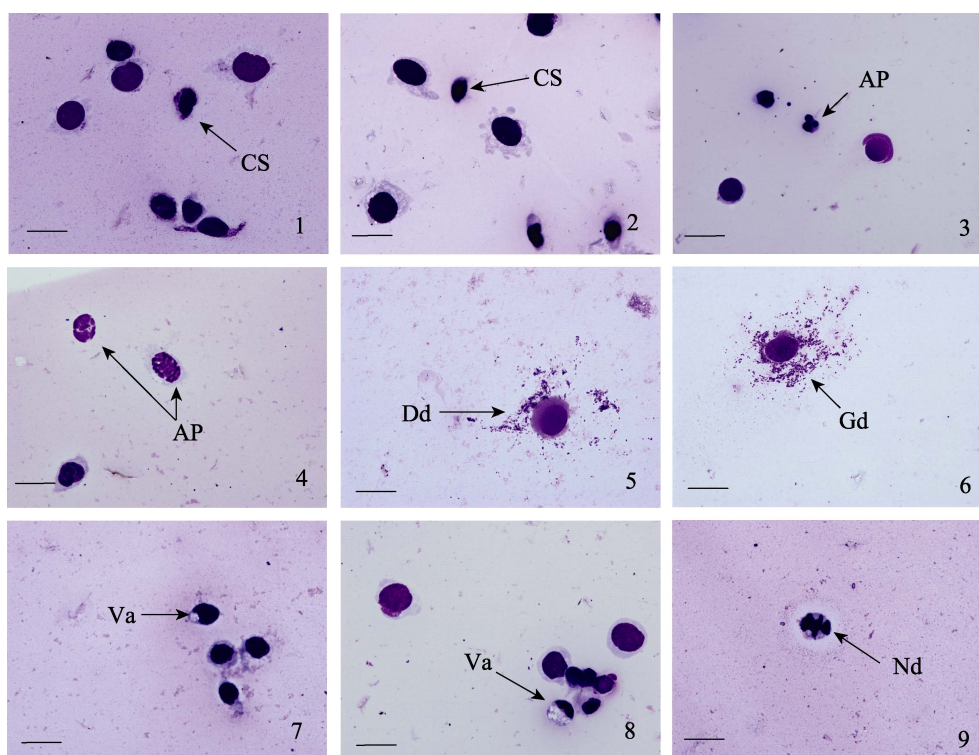


图 1 感染印楝素后稻蝗血细胞的变化

Fig. 1 Changes of hemocytes in *Oxya chinensis* after infection with azadirachtin

1-2. 细胞固缩 $\times 1\ 000$; 3-4. 细胞凋亡 $\times 1\ 000$; 5-6. 粒细胞脱粒 $\times 1\ 000$; 7-8. 空泡 $\times 1\ 000$; 9. 细胞核变形 $\times 1\ 000$ 。比例尺=10 μm 。

1-2. Cell shrinkage (Cs) $\times 1\ 000$; 3-4. Apoptosis (Ap) $\times 1\ 000$; 5-6. Granulocyte detachment (Gd) $\times 1\ 000$;

7-8. Vacuole (Va) $\times 1\ 000$; 9. Nuclear deformation (Nd) $\times 1\ 000$. Scale bar=10 μm .

2.2 稻蝗血细胞中各种类型细胞数量的变化

如图 2 所示,与空白对照和溶剂对照相比,不同浓度印楝素感染后,浆血胞的数量均低于对照组,说明印楝素对血细胞产生毒害作用,引起血细胞中浆血胞的免疫反应,使浆血胞的数量降

低。30 $\mu\text{g/L}$ 印楝素处理后的浆血胞数量呈现先降低后升高的趋势,在 24 h 时数量达到最大;60 $\mu\text{g/L}$ 和 120 $\mu\text{g/L}$ 印楝素处理后的浆血胞数量均呈现先升高后降低的趋势,均是在 6 h 时浆血胞的数量达到最高。

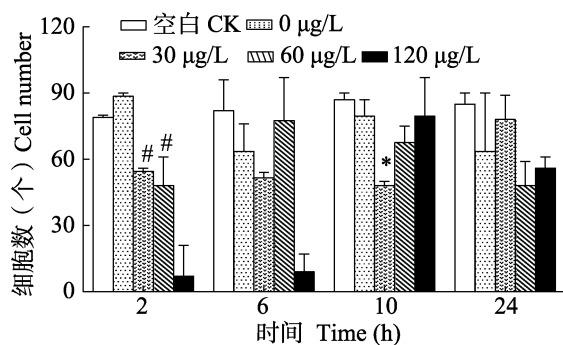


图2 印楝素处理后浆血细胞的数量变化
Fig. 2 Changes in plasma cell count after azadirachtin treatment

图中的数据为5次重复的平均值±误差；与空白对照相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与溶剂组相比，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。下同。

The data in the graph is the mean ± error of 5 replicates; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to the blank control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared to the solvent group. The same below.

如图3所示，与空白对照和溶剂对照组相比，实验组中粒血细胞的数量均高于对照组，可见，印楝素也引起了血细胞中粒血细胞的免疫反应，30 μg/L和60 μg/L的印楝素处理后浆血细胞的数量呈现先升高后降低的趋势，30 μg/L印楝素处理的粒血细胞在2 h时，粒血细胞的数量达到最高，而60 μg/L印楝素处理的粒血细胞在6 h时粒血细胞数量达到最高；120 μg/L印楝素处理的粒血细胞数量呈现先降低后升高的趋势，在6 h时达到最低，之后持续升高。

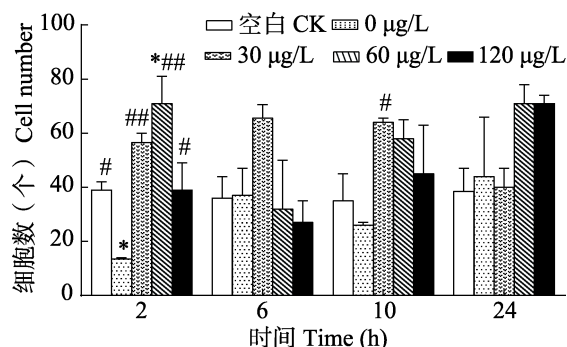


图3 印楝素处理后粒血细胞的数量变化
Fig. 3 Change of granulocytes count after azadirachtin treatment

如图4所示，空白对照组中，囊血细胞的数量基本保持稳定，在1-4之间波动。与空白对照组相比，囊血细胞的数量随时间的增加均有所增加，说明印楝素处理后会对其产生影响。而与溶

剂对照组相比，囊血细胞的数量均降低，说明印楝素可能会加速囊血细胞的降解，使其数量降低。

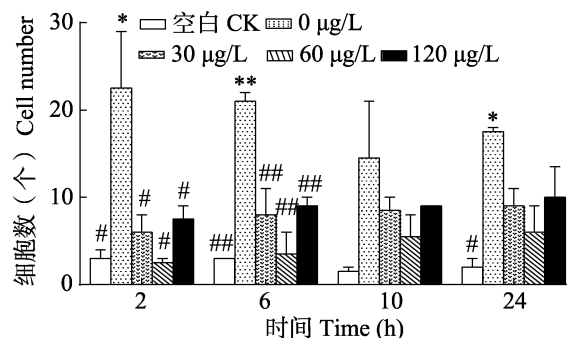


图4 印楝素处理之后囊血细胞的数量变化
Fig. 4 Changes in the number of cyst blood cells after azadirachtin treatment

2.3 稻蝗血细胞中酶活性的变化

2.3.1 感染印楝素后稻蝗血细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化 如表1所示，与空白对照组相比，溶剂组SOD活性仅在24 h时出现极显著 ($P < 0.01$) 增加；与溶剂组相比，30 μg/L实验组在6 h之后SOD活性一直显著 ($P < 0.05$) 增加；60 μg/L和120 μg/L实验组中SOD活性均极显著 ($P < 0.01$) 增加。整体上，SOD活性均高于空白对照组和溶剂组，说明印楝素对机体造成了伤害。

2.3.2 感染印楝素后稻蝗血细胞中过氧化物酶(POD)活性的变化 如表2所示，与空白对照相比，溶剂组在6 h和10 h时出现极显著 ($P < 0.01$) 增加，其余时间增加效果不明显；与溶剂组相比，30 μg/L实验组在6 h时POD活性极显著 ($P < 0.01$) 增加，60 μg/L实验组在6 h和10 h时呈现显著 ($P < 0.05$) 增加，120 μg/L实验组在6 h和24 h时呈现显著 ($P < 0.05$) 增加，其余时间增加效果不明显。

2.3.3 感染印楝素后稻蝗血细胞中酚氧化酶(PO)活性的变化 如表3所示，与空白对照组相比，溶剂组中，PO活性在10 h时出现极显著性 ($P < 0.01$) 增加，随着时间增加，在24 h时活性变化显著性降低；与溶剂组相比，30 μg/L和60 μg/L实验组中，PO活性均只在10 h时出现极显著 ($P < 0.01$) 增加，在120 μg/L实验组中PO活性从10 h后一直呈现极显著 ($P < 0.01$) 增加，其余时间活性的增加均不明显。

表 1 印楝素感染后不同时间段稻蝗血细胞中超氧化物歧化酶 (SOD) 的变化
Table 1 Changes of SOD in hemocytes of *Oxya chinensis* in different periods after azadirachtin infection

分组 Group	n	感染时间 Infection time (h)			
		2 h (U/L)	6 h (U/L)	10 h (U/L)	24 h (U/L)
空白对照组 CK	8	385.06±52.18	348.82±10.15	388.68±3.62	387.21±1.94 ^{##}
0 μg/L	8	372.13±5.85	421.75±2.53	425.37±27.91	442.32±11.32 ^{**}
30 μg/L	8	406.57±1.71	403.00±2.02 [#]	477.17±1.61 ^{**#}	402.54±0.48 [#]
60 μg/L	8	506.06±1.53 ^{***}	466.47±3.70 [#]	493.73±1.24 ^{***}	484.07±0.47 ^{***}
120 μg/L	8	524.07±0.82 ^{***}	527.21±5.39 ^{##}	487.79±7.15 ^{***}	499.86±1.29 ^{***}

表中的数据为 8 次重复的平均值±误差; 与空白对照相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与溶剂组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。下表同。
The data in the graph is the mean±error of 8 replicates; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared to the blank control; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared to the solvent group. The same below.

表 2 印楝素感染后不同时间段稻蝗血细胞中过氧化物酶 (POD) 的变化
Table 2 Changes of POD in hemocytes of *Oxya chinensis* in different periods after azadirachtin infection

分组 Group	n	感染时间 Infection time (h)			
		2 h (U/L)	6 h (U/L)	10 h (U/L)	24 h (U/L)
空白对照组 CK	8	120.23±8.54	111.20±7.59 ^{##}	102.18±5.22 ^{##}	105.96±4.61
0 μg/L	8	148.03±4.94	152.07±4.13 ^{**}	166.24±2.25 ^{**}	150.37±1.78
30 μg/L	8	118.29±6.50	117.40±1.01 ^{##}	153.50±1.69 ^{**}	154.87±1.82
60 μg/L	8	147.65±4.08	133.12±9.45 ^{*#}	151.11±8.52 ^{**#}	177.16±3.18 [*]
120 μg/L	8	144.89±2.24	130.54±3.20 [#]	164.16±3.12 ^{**}	170.39±2.64 [#]

表 3 印楝素感染后不同时间段稻蝗血细胞中酚氧化酶 (PO) 的变化
Table 3 Changes of PO in hemocytes of *Oxya chinensis* in different periods after azadirachtin infection

分组 Group	n	感染时间 Infection time (h)			
		2 h (U/L)	6 h (U/L)	10 h (U/L)	24 h (U/L)
空白对照组 CK	8	255.77±20.34	261.32±8.32	260.85±24.49 ^{##}	265.99±7.34 [#]
0 μg/L	8	280.67±12.07	311.85±2.15	310.29±1.60 ^{**}	329.27±35.36 [*]
30 μg/L	8	316.41±3.42	320.95±2.78	349.73±3.37 ^{***}	316.18±2.99
60 μg/L	8	300.35±13.86	373.30±15.26 [*]	377.46±3.99 ^{***}	378.18±10.77
120 μg/L	8	299.13±0.06 [*]	359.69±3.30 ^{##}	414.30±1.49 ^{***}	417.04±3.23 ^{***}

2.3.4 感染印楝素后稻蝗血细胞中乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的变化 如表 4 所示, 与空白对照相比, 溶剂组在 2 h 到 10 h 之间 AChE 活性均是极显著 ($P<0.01$) 增加; 与溶剂组相比, 30、60、120 μg/L 实验组中, AChE 活性均在 10 h 和 24 h 是呈现极显著 ($P<0.01$) 增加, 其余时间的增加效果不明显。

2.3.5 感染印楝素后稻蝗血细胞中羧酸酯酶 (CES) 活性的变化 如表 5 所示, 与空白对照组相比, CES 活性除在 6 h 时未出现明显增加外, 其余时间均显著性 ($P<0.05$) 增加; 与溶剂组相比, 30 μg/L 实验组中, CES 活性均呈现显著 ($P<0.05$) 增加, 60 μg/L 和 120 μg/L 实验组中 CES 活性仅在 24 h 时呈现极显著 ($P<0.01$) 增加。

表 4 印楝素感染后不同时间段稻蝗血细胞中乙酰胆碱酯酶 (AchE) 的变化
Table 4 Changes of AchE in hemocytes of *Oxya chinensis* in different periods after azadirachtin infection

分组 Group	n	感染时间 Infection time (h)			
		2 h (U/L)	6 h (U/L)	10 h (U/L)	24 h (U/L)
空白对照组 CK	8	81.67±11.54 ^{##}	90.90±15.09 ^{##}	89.13±9.06 ^{##}	88.15±3.06
0 μg/L	8	103.48±5.83 ^{**}	115.93±0.40 ^{**}	111.07±4.50 ^{**}	110.07±1.02
30 μg/L	8	112.10±0.84 ^{**}	120.51±0.30 ^{**}	125.61±0.49 ^{**##}	130.81±0.41 ^{##}
60 μg/L	8	101.98±0.12 ^{**}	120.62±6.51 ^{**}	136.39±1.34 ^{**##}	143.03±1.29 ^{##}
120 μg/L	8	104.88±1.06 ^{**}	124.88±2.31 ^{**}	133.73±0.36 ^{**##}	157.12±2.27 ^{**##}

表 5 印楝素感染后不同时间段稻蝗血细胞中羧酸酯酶 (CES) 的变化
Table 5 Changes of CES in hemocytes of *Oxya chinensis* in different periods after azadirachtin infection

分组 Group	n	感染时间 Infection time (h)			
		2 h (U/L)	6 h (U/L)	10 h (U/L)	24 h (U/L)
空白对照组 CK	8	86.19±4.17 [#]	81.42±3.87	89.16±2.97 [#]	85.81±2.62 ^{##}
0 μg/L	8	96.27±1.21 [*]	101.50±0.70	101.25±1.90 [*]	104.59±1.31 ^{**}
30 μg/L	8	81.94±0.61 ^{##}	82.81±1.73 [#]	81.98±0.90 ^{##}	82.05±0.86 ^{##}
60 μg/L	8	90.36±4.50	93.48±2.16	96.95±5.53	89.80±0.91 ^{##}
120 μg/L	8	89.18±2.13	102.82±4.37	92.74±1.49	87.38±2.84 ^{##}

2.3.6 感染印楝素后稻蝗血细胞中细胞色素氧化酶 (P450) 活性的变化 如表 6 所示, 与空白对照相比, 溶剂组在 2 h 到 24 h 间均呈现极显著增加; 与溶剂组相比, 30 μg/L 实验组在 2 h 和 24 h 时活性显著 ($P<0.05$) 增加, 120 μg/L 实验组中仅在 6 h 时活性极显著 ($P<0.01$) 增加, 其余时间活性增加效果均不明显。

3 讨论

3.1 印楝素对稻蝗血细胞形态的毒性影响

目前, 对于蝗虫血细胞的分类尚没有明确的

界定, 而且关于参与免疫的细胞类型也并不清楚。前人对稻蝗血细胞的分类进行了多次研究, 其中任彩红 (2014) 的研究最为全面, 她发现 9 种类型的血细胞: 原血胞、浆血胞、粒血胞、类绛血胞、珠血胞、脂血胞、囊血胞、蠕形血胞和巨核血胞。本研究以任彩红 (2014) 研究的血细胞类型为依据, 通过给稻蝗注射不同浓度印楝素来探究其对血细胞形态的毒性影响。观察血涂片, 发现注射印楝素后, 浆血胞和粒血胞固缩, 并且固缩细胞大量的堆积在一起, 同时, 浆血胞中出现细胞变形, 细胞核凋亡, 空泡化和粒细胞的脱粒现象。这与莫非和包怀恩 (2001) 报道的

表 6 印楝素感染后不同时间段稻蝗血细胞中细胞色素氧化酶 (P450) 的变化
Table 6 Changes of P450 in hemocytes of *Oxya chinensis* in different periods after azadirachtin infection

分组 Group	n	感染时间 Infection time (h)			
		2 h (U/L)	6 h (U/L)	10 h (U/L)	24 h (U/L)
空白对照组 CK	8	24.27±0.69 [#]	22.14±0.42 ^{##}	24.55±1.16 ^{##}	22.70±2.55 ^{##}
0 μg/L	8	32.28±3.28 [*]	30.45±0.51 ^{**}	32.98±0.97 ^{**}	34.40±0.67 ^{**}
30 μg/L	8	25.94±0.45 ^{*#}	31.97±0.50 ^{**}	32.58±0.36 ^{**}	29.42±0.62 ^{**#}
60 μg/L	8	27.23±0.41	30.62±1.12 ^{**}	32.62±1.60 ^{**}	33.64±1.65 ^{**}
120 μg/L	8	28.30±0.15	36.65±0.22 ^{**##}	32.71±0.21 ^{**}	33.21±0.20 ^{**}

感染大链壶菌后致倦库蚊幼虫血细胞的形态变化相似。本研究首次发现稻蝗血细胞细胞核的凋亡现象,说明印楝素可能会引起稻蝗血细胞细胞核的凋亡。血细胞的变化可能在印楝素入侵后,细胞伸出伪足去吞噬印楝素受到其毒素的伤害而变形,因而出现固缩,空泡化,变形,凋亡等现象。

3.2 印楝素对稻蝗血细胞数量的影响

有研究表明,当昆虫受到农药毒害时,血细胞的数量会发生变化,而血细胞的数量直接与细胞免疫相关,当血细胞数量增加时,细胞免疫的活性相对较强。本研究发现注射印楝素,对浆血细胞、粒细胞和囊血细胞数量的影响较大;对其他类型细胞的影响较小。由图 2 可知,浆血细胞的数量随时间的增加呈先上升后下降的趋势,其原因可能是注射印楝素,导致原有的浆细胞大量固缩,失去作用,原血细胞转化为浆血细胞,同时,机体也不断的产生浆血细胞,因此浆血细胞的数量上升;大约在 10 h 时浆血细胞的数量开始下降,这可能是浆血细胞因固缩,细胞核出现凋亡而死亡或浆血细胞出现溶血现象而逐渐溶血消失。晏容(2012)的实验结果中浆血细胞数量变化的趋势与本实验中的结果大体一致。由图 3 可知,粒细胞的数量随时间的增加呈先下降后上升的趋势,原因可能是粒细胞参与免疫反应形成包囊或农药的毒素、酶以及相关的代谢对细胞造成损伤(Jamileh *et al.*, 2017)。由图 4 可知,囊血细胞的数量随时间的增加而呈增加的趋势,这可能是浆血细胞参与免疫反应后出现溶血现象或粒细胞脱粒后产生溶血状况,因而使囊血细胞数量增加,然而囊血细胞的数量并不是极具增加,这是由于囊血细胞溶血的发生较快,消失速度极快,因而囊血细胞数量增长缓慢。

昆虫血细胞在细胞免疫反应中起主要作用,当异物入侵时,会引起血细胞形态和数量的变化。昆虫细胞免疫主要依赖于血细胞的吞噬、结缔和包囊。本实验中,浆血细胞和粒血细胞的形态和数量均发生明显变化,说明当印楝素入侵时,浆血细胞和粒细胞立即靠拢并粘附,伸出伪足进行吞噬,受到印楝素的毒害,使细胞变形,同时,机

体不断产生浆血细胞和粒细胞来完成细胞免疫,降低印楝素对机体的毒害。可见,浆血细胞和粒细胞在细胞毒害免疫中发挥重要作用。由此可知,在本研究中主要参与血细胞免疫反应的细胞类型主要是浆血细胞和粒细胞。

3.3 印楝素对稻蝗血细胞中酶活性的影响

3.3.1 印楝素对稻蝗血细胞中抗氧化酶系的影响 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶被称为是昆虫体内主要的抗氧化酶系。正常情况下,以上三种酶协调一致参与细胞内自由基的产生和消除,使得生物体内的自由基维持在一个相对稳定的状态下,保证生物体免受自由基的损伤(查黎春, 2011)。在受到异物刺激时,昆虫体内自由基平衡打破,抗氧化酶相应发生改变。当昆虫体内自由基增加时, SOD 会催化 O_2^- 转化为 H_2O_2 , 再由 CAT 和 POD 将 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2 , 从而清除自由基。由表 1 可以看出,与空白对照相比,浓度增加, SOD 活性整体上也是呈现升高的趋势,同一浓度,随时间增加, SOD 活性整体上也是呈上升趋势。从表 2 可以看出,与空白对照相比,同一浓度下,随时间的增加, POD 活性呈现先降低后升高的趋势,同一时间段,随浓度的升高, POD 活性也相应的增加。用溴氰菊酯感染褐边绿刺蛾 *Parase consocia* 其 SOD 活性也呈先升高后降低的趋势(李周直等, 1994)。感染异小杆线虫后菜青虫 *Pieris rapae* 体内 SOD 活性呈先升高后降低的趋势, POD 活性呈先降低后升高的趋势(张奎花等, 2012)。本实验的结果与李周直、张奎花的结果大体上相似。此类研究表明,农药通过激发活性氧产生氧胁迫,酶活性降低,活性氧自由基增加,从而对细胞造成损伤。本研究中印楝素会刺激稻蝗产生一系列的应激反应,其迅速启动血细胞中 SOD 和 POD 酶系统抵御应激反应中自由基的伤害,清除自由基达到解毒目的,维持机体正常的生命活动。

3.3.2 印楝素对稻蝗血细胞中酚氧化酶的影响

昆虫没有像哺乳动物那样,拥有完善的免疫系统,它只能通过自身的免疫防御来抵抗外源物的

毒害, 酚氧化酶在免疫防御方面具有重要的作用。酚氧化酶在昆虫体以无活性的酚氧化酶原的形式存在, 当异物入侵时, 酚氧化酶原从血细胞中释放出来并被激活成酚氧化酶, 在外来物上产生黑色素沉淀, 以包囊和黑化的形式抵抗外来物的毒害。用虫霉菌 *Entomophthora aulicae* 感染舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫 6 h 后发现, PO 活性是对照组的 5 倍, 而且感染后有 3 种形式的 PO 被激活 (Bidochka and Hajek, 1998)。用松油烯-4-醇感染家蝇 *Musca domestica* 后发现酚氧化酶的活性与对照组相比差异性显著 (马志卿等, 2008)。在本实验中, 从表 3 可以看出, 用印楝素感染稻蝗后, 血细胞中酚氧化酶的活性整体均高于对照组, 可见印楝素对稻蝗血细胞中的 proPO 起促进作用。印楝素分子结构中具有不稳定的基团, 在紫外线等的照射下, 容易分解, 为了防止其分解, 在印楝素中加入一些有机溶剂制成印楝油 (高振兴, 2004)。而无脊椎动物中, 酚氧化酶原系统一般可被蛋白酶、去污剂以及有机溶剂激活 (王树栋, 2010)。本实验中稻蝗血细胞中 proPO 系统由印楝素激活, proPO 被特异性丝氨酸蛋白酶级联反应水解, 切断一段肽链而激活成 PO, 经酶级联放大, 生成黑色素抵抗外来物的入侵。

3.3.3 印楝素对稻蝗血细胞中代谢酶系的影响

细胞色素氧化酶 (P450)、羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶等是昆虫体内重要的代谢酶类, 参与免疫反应和各种毒物的代谢, 如水解、氧化、还原和耦合等, 起到解毒作用 (马志卿等, 2008)。细胞色素 P450 酶系在昆虫的生长、发育和摄食等方面发挥着作用, 它对外来物质的代谢是昆虫对杀虫剂抗药性及对植物有毒物质耐受性的主要原因之一, 它还参与昆虫体内激素的合成和代谢 (舒耀皋, 2008)。从表 6 可以看出, 印楝素处理稻蝗后, 与空白对照组相比, 前期 3 种浓度处理下 P450 活性均被激活, 这可能是稻蝗对印楝素产生抗性的原因或是稻蝗对印楝素毒性具有较高的抵抗力, 因而增强代谢达到解毒目的。后期酶活性有所下降, 这可能是由于血细胞将印

楝素产生的毒害作用清除, 也可能是由于其他因素造成的, 这有待进一步的研究。

羧酸酯酶能够催化脂类和酰胺类化合物的水解, 将毒物的酯键水解成酸和醇, 从而降低毒物的毒性 (米智等, 2013)。从表 5 中可以看出, 随时间的增加, 60 $\mu\text{g/L}$ 和 120 $\mu\text{g/L}$ 组羧酸酯酶的活性呈波浪状, 30、60、120 $\mu\text{g/L}$ 组的羧酸酯酶活性均低于溶剂对照组, 说明印楝素可能对羧酸酯酶产生抑制作用, 使印楝素的毒性不能代谢, 停留在稻蝗体内使其中毒而亡。

乙酰胆碱酯酶是昆虫神经系统中重要的一类酶, 是有机磷农药和氨基甲酸酯类杀虫剂的作用靶标, 作用是催化水解突触间隙间的乙酰胆碱, 终止信号的传递。杀虫剂与酶分子结合后, 使酶磷酸化或氨基甲酰化, 钝化酶的活性而阻断正常神经传导而使昆虫死亡 (王莹, 2008)。由表 4 可知, 与空白对照相比, 实验组中乙酰胆碱酯酶的活性均显著高于对照组, 印楝素属于四环三萜类化合物, 原理上不会与乙酰胆碱酯酶分子结合, AchE 活性也不应该出现显著升高, 本实验中却发现 AchE 活性显著升高, 产生此现象的原因有待进一步探讨。

参考文献 (References)

- Brehelin M, Hoffmann JA, Matz G, Porte A, 1975. Encapsulation of implanted foreign bodies by hemocytes in *Locusta migratoria* and *Melolontha melolontha*. *Cell Tiss. Res.*, 160(3): 283–289.
- Cheung PYK, Grula EA, Burton RL, 1978. Hemolymph responses in *Heliothis zea* to inoculation with *Bacillus thuringiensis* or *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 31(2): 148–156.
- CJ, 2018. β -1, 3-Glucan recognition protein 3 activates the prophenoloxidase system in response to bacterial infection in *Ostrinia furnacalis* Guenee. *Dev. Comp. Immunol.*, 79(2): 31–43.
- Cha LC, Hu CX, Cao CW, 2011. Effect of three pesticides on superoxide dismutase activity of caterpillars, *J. Dongbei Fore. Univ.*, 39(5): 105–107. [查黎春, 胡春祥, 曹传旺, 2011. 三种农药对天幕毛虫超氧化物歧化酶活性的影响. 东北林业大学学报, 39(5): 105–107.]
- Fang GF, 2011. Toxicity of three pesticides and their effects on

- carboxylesterase activity of *Propillocerus akamusi*. *Acta Ecologica Sinica*, 31(17): 4914–4918. [方国飞, 2011. 三种农药对红裸须摇蚊毒力和羧酸酯酶活性的影响. *生态学报*, 31(17): 4914–4918.]
- Gupta AP, 1929. Insect Hemocytes: Developent, Forms, Functions and Technigues. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 6–14.
- Gillespie JP, Burnett C, Charnley AK, 2000. The immune response of the desert locust *Schistocerca gregaria* during mycosis of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *J. Insect Physiol.*, 46(4): 429–437.
- Gao ZX, 2004. Azadirachtin bioactivity, mechanism of action, and application techniques of rice stem borer. Master's dissertation. Yangzhou: Yangzhou University. [高振兴, 2004. 印楝素对水稻二化螟的生物活性、作用机制和应用技术研究. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学.]
- Gao SJ, Liu AP, Xu LB, Cao YX, Te ME, Cui ZL, 2010. Experiment on tne efficacy of azadirachtin and abamectin+b. t. for controlling grasshoppers. *Modern Agrochemicals*, 9(2): 44–46. [高书晶, 刘爱萍, 徐林波, 曹艺潇, 特木儿, 崔志玲, 2010. 印楝素和阿维苏云金对草原蝗虫的防治效果试验. *现代农药*, 9(2): 44–46.]
- Heather MC, Killian KA, 2015. Response of the insect immune system to three different immune challenges. *J. Insect Physiol.*, 81(10): 97–108.
- Hou J, Ma ZQ, Feng JT, Zhang X, 2007. Bioactivity of podophyllotoxin against *Plutella xylostella* and its effect on metabolic enzymes. *Acta Entomol. Sin.*, 50(9): 895–899. [侯军, 马志卿, 冯俊涛, 张兴, 2007. 鬼臼毒素对小菜蛾的生物活性及对其几种代谢酶系的影响. *昆虫学报*, 50(9): 895–899.]
- Julián FH, 2016. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.*, 58(5): 102–118.
- Jamileh A, Javad K, Mohammad G, Mahbubeh S, Ahmad A, 2017. Physiological defence of the white grub, *Polyhylla adspersa* Motschulsky (Col. , Scarabaeidae) against entomopathogenic nematodes. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(3): 878–885.
- Lavine MD, Strand MR, 2002. Insect haemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32(10): 1295–1309.
- Li Q, Zheng WY, Wang ZG, Yu Q, Chen JX, 2003. Study on effect of peroxidase in *Porphyra haitanensis* exposed to organophosphorus pesticides. *J. Xiamen Univ.*, 42(2): 201–204. [李钦, 郑微云, 王重刚, 余群, 陈纪新, 2003. 有机磷农药对坛紫菜过氧化物酶活性影响的研究. *厦门大学学报*, 42(2): 201–204.]
- Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. Study on the activity of protective enzyme system in several insects. *Acta Entomol. Sin.*, 37(4): 399–403. [李周直, 沈惠娟, 蒋巧根, 嵇保中, 1994. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究. *昆虫学报*, 37(4): 399–403.]
- Marmaras VJ, Lampropoulou M, 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal.*, 21(2): 186–195.
- Mohammed SA, Siddiqui MI, 2012. Circulating haemocytes in insects: Phylogenic review of their types. *Pakistan J. Zool.*, 44(6): 1743–1750.
- Mi Z, Ruan CL, Li JR, Fu QJ, Du WH, Li GN, Long YH, Zhu Y, 2013. Influence of fluoride on activity of carboxylesterase and esterase in hemolymph of *Bombyx mori*. *Chin. J. Ecology*, 33(4): 1134–1141. [米智, 阮成龙, 李姣蓉, 付巧娟, 杜文华, 李冠楠, 隆耀航, 朱勇, 2013. 氟化物对家蚕血液羧酸酯酶及全酯酶活性的影响. *生态学报*, 33(4): 1134–1141.]
- Mo F, Bao HE, 2001. Observation on hemocytes of culex pipiens quinquefasciatus larvae infected by *Lagenidium giganteum*. *Chin. J. Parasitol Parasit Dis.*, 19(6): 330–332. [莫非, 包怀恩, 2001. 感染大链壶菌后致倦库蚊幼虫血淋巴细胞的观察. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 19(6): 330–332.]
- Ma ZQ, Feng JT, Guo ZB, Zhang X, 2008. Effects of terpinen-4-ol on four kinds of metabolizing enzymes and polyphenol oxidase in *Muscadomestica*. *J. Zhengjiang Univ.*, 34(5): 509–515. [马志卿, 冯俊涛, 郭志波, 张兴, 2008. 松油烯-4-醇对家蝇几种代谢酶及酚氧化酶的影响. *浙江大学学报*, 34(5): 509–515.]
- Miranpuri GS, Khachatourians GG, 1993. Hemocyte surface changes in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes* in response to wounding and infection with *Beauveria bassiana*. *Entomol. Exp. Appl.*, 68(2): 157–164.
- Ribeiro C, Brehelin M, 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? *J. Insect Physiol.*, 52(5): 417–429.
- Ren CH, 2014. The morphology study on hemocytes of *Oxya chinensis*. Master's dissertation. Taiyuan: Shanxi University. [任彩红, 2014. 中华稻蝗血细胞形态学的研究. 硕士学位论文. 太原: 山西大学.]
- Shu YA, 2008. Effects of several pesticides on hepatic cytochrome P450 in *Curassius auratus*. Master's dissertation. Wulumuqi: Xinjiang Agricultural University. [舒耀皋, 2008. 几种农药对鲫鱼肝脏微粒体 P450 酶系的影响. 硕士学位论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学.]

- Strand MR, 2008. The insect cellular immune response. *Insect Sci.*, 15(1): 1–14.
- Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S, 2000. Involvement of both granular cells and plasmaocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.*, 46(7): 1129–1135.
- Wu TY, Zhao Y, Wang ZY, Song QS, Wang ZX, Xu QW, Wang YG, Wang LB, Zhang YQ, Feng CJ, 2018. β -1, 3-Glucan recognition protein 3 activates the prophenoloxidase system in response to bacterial infection in *Ostrinia furnacalis* Guenee. *Dev. Comp. Immunol.*, 79(2): 31–43.
- Wang Y, 2008. The effect of four pesticides on *Paratrioza sinsca* Yang et Li and the activity of acetylcholinesterase. Master's dissertation. Huhehaote: Neimenggu Agriculture University. [王莹, 2008. 四种农药对枸杞木虱及其乙酰胆碱酯酶活性的影响. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古农业大学.]
- Wang SD, 2010. Study on the effects of four plant-derived compounds on phenoloxidase of *Spodotera exigua*(Hubner) and immunology of the enzyme. Doctor's dissertation. Tai'an: Shandong Agriculture University. [王树栋, 2010. 四种植物源化合物对甜菜夜蛾酚氧化酶的影响及酶免疫学研究. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Yan JG, Ru SG, Wang W, 2006. On effects of monocrotophos on AchE, CaE, ALP and ACP activities of *Monopterus albus*. *Journal of Safety and Environment*, 6(3): 61–63. [闫建国, 汝少国, 王蔚, 2006. 久效磷对黄鳝乙酰胆碱酯酶、羧酸酯酶和磷酸酶活性的影响. 安全与环境学报, 6(3): 61–63.]
- Yan R, Liu L, Liu H, He LF, 2012. Study on hemocytes classification and immunologic function of *Musca domestica* larva. *Sichuan J. Zool.*, 31(1): 104–107. [晏容, 刘流, 刘晖, 贺莉芳, 2012. 家蝇幼虫血细胞类型及免疫功能的初步研究. 四川动物, 31(1): 104–107.]
- Ying Y, Gao YQ, Xia, YX Liu FH, 2016. Wright-Giemsa staining to observe phagocytes in *Locusta migratoria* infected with *Metarhizium acridum*. *J. Invertebr. Pathol.*, 139(9): 19–24.
- Zhang KH, Qian XJ, Ji GH, Liu CZ, 2012. Changes of the activites of protective enzymes in *Pierisrapae* infected by *Heterorhabditis megidis*. *J. Gansu Agri. Univ.*, 47(2): 58–61. [张奎花, 钱秀娟, 姬国红, 刘长仲, 2012. 异小杆线虫对菜青虫体内保护酶活力的影响. 甘肃农业大学学报, 47(2): 58–61.]