



李贝贝, 田野, 闫多子, 李红梅, 曹广春, 刘明娜, 张泽华, 王广君. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin1 对东亚飞蝗酶学免疫的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (6): 1476 - 1484.

丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin1 对东亚飞蝗酶学免疫的影响

李贝贝^{1,2}, 田野^{1,3}, 闫多子^{1,2}, 李红梅⁴, 曹广春¹,
刘明娜¹, 张泽华^{1,2}, 王广君^{1,2*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193; 2. 农业农村部锡林郭勒草原有害生物科学观测实验站/国家林业和草原局内蒙古草地有害生物监测防控国家长期科研基地, 内蒙古锡林浩特 026000; 3. 河北农业大学植物保护学院, 河北保定 071001; 4. 中国农业科学院植物保护研究所/农业农村部—CABI 生物联合实验室, 北京 100193)

摘要: Serpins 是东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 体内具有免疫调节功能的一类丝氨酸蛋白酶抑制剂。前期研究发现 Serpin1 能够降低绿僵菌 *Metarhizium* 对蝗虫的杀虫效果, 本研究旨在从酶学角度明确 Serpin1 蛋白抑制绿僵菌毒力的原因, 进一步揭示 Serpins 的功能与作用机制。本实验采用饵料饲喂的方法进一步明确 Serpin1 蛋白对绿僵菌侵染东亚飞蝗的抑制效果; 测定绿僵菌侵染东亚飞蝗过程中, 添加 Serpin1 蛋白对东亚飞蝗体内保护酶 (超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD、酚氧化酶 PO)、解毒酶 (多功能氧化酶 MFO、谷胱甘肽转移酶 GSTs、乙酰胆碱酯酶 AChE) 共 6 种酶的影响, 以明确 Serpin1 对东亚飞蝗酶学免疫的调节作用。结果表明, Serpin1 能够显著降低绿僵菌对蝗虫的杀虫效果; 将 Serpin1 与绿僵菌混合后处理东亚飞蝗, 12 d 后其死亡率为 63.5%, 显著低于绿僵菌单独处理 (死亡率为 80.6%)。酶活测定结果显示, 将绿僵菌 IMI330189 与 Serpin1 蛋白混合处理后, 与绿僵菌处理组相比, 东亚飞蝗体内保护酶 SOD 和 PO 的活力总体表现为上调, 而 POD 的活力呈现降低的趋势; 解毒酶 MFO、GSTs 的活性呈现升高趋势, AChE 的活力呈现先升高后降低的趋势。上述结果表明, Serpin1 蛋白能够增强东亚飞蝗体内解毒酶和保护酶的活性, 提高东亚飞蝗的酶学免疫, 增强对绿僵菌侵染的抵御能力, 从而降低东亚飞蝗的死亡率。本研究为进一步揭示 Serpins 的功能提供了参考。

关键词: 东亚飞蝗; Serpin1; 绿僵菌; 保护酶; 解毒酶

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 06-1476-09

Effect of serine protease inhibitor Serpin1 on enzymatic immunity of *Locusta migratoria manilensis*

LI Bei-Bei^{1,2}, TIAN Ye^{1,3}, YAN Duo-Zi^{1,2}, LI Hong-Mei⁴, CAO Guang-Chun¹, LIU Ming-Na¹, ZHANG Ze-Hua^{1,2}, WANG Guang-Jun^{1,2*} (1. State Key Laboratory of Plant Diseases and Insect Pests/Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. Scientific Observing and Experimental Station of Pests in Xilingol Rangeland, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ National Long-term Scientific Research Base for Grassland Pests Monitoring and Control in Inner Mongolia, National Forestry and Grassland Administration, Xilinhot 026000, Inner Mongolia, China;

基金项目: 现代农业产业技术体系 (CARS-34-07B); 中国农业科学院国际农业科学计划 (CAAS-ZDRW202108); 中央级科研院所基本科研业务费专项 (S2021XM01, S2020XM17, Y2020XC18)

作者简介: 李贝贝, 女, 1994 年生, 河北邢台人, 硕士研究生, 研究方向为生物防治, E-mail: bei996633@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 王广君, 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为草原害虫的生物学与防控技术研究, E-mail: wangguangjun@caas.cn

收稿日期 Received: 2020-09-11; 接受日期 Accepted: 2021-01-09

3. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei Province, China;
4. MARA-CABI Joint Laboratory for Bio-safety, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Serpins are a class of serine protease inhibitors that perform immune function in *Locusta migratoria manilensis*. Previous studies had confirmed that the Serpin1 protein could effectively inhibit the infection of *Metarhizium anisopliae* on *L. migratoria manilensis*. This study aims to investigate the immune mechanism of Serpin1 in *L. migratoria manilensis*. The results showed that there was a significant difference in the cumulative mortality of *L. migratoria manilensis* among treatments. The cumulative mortality of *M. anisopliae* treatment was 80.6%, which was significantly higher than that of the control. And that of the *M. anisopliae* + Serpin1 treatment was 63.5%, which was significantly lower than that of *M. anisopliae* alone treatment. The results of enzyme activity assay showed that after mixing Serpin1 protein with *M. anisopliae* IMI330189, compared with the treatment of IMI330189 alone, the activity of protective enzymes SOD and PO increased, while that of POD decreased. Meanwhile the activity of detoxification enzymes MFO and GSTs generally increased with that of AChE showing a trend of increasing first and then decreasing. These results indicated that Serpin1 protein significantly improved the natural immune response of *L. migratoria manilensis* through increasing the activity of detoxification enzymes and protective enzyme, which enhanced the resistance of *L. migratoria manilensis* against *M. anisopliae* infection, thereby reduced the mortality of *L. migratoria manilensis* and provided evidence for revealing the function of Serpins.

Key words: *Locusta migratoria manilensis*; Serpin1; *Metarhizium anisopliae*; protective enzymes; detoxifying enzymes

与哺乳动物获得性免疫不同, 昆虫在面对病原菌时, 主要依靠自身天然免疫反应来抵抗病原菌的入侵。昆虫体内的酶学相关免疫反应是昆虫先天性免疫中重要的组成部分, 这些酶系变化情况在一定程度上可以反映昆虫与病原物之间的相互作用, 体现病原菌的致病力, 同时反映昆虫对外源物质的抗性程度 (王正浩, 2016)。昆虫体内免疫相关酶类主要包括保护酶、解毒代谢酶类, 其中保护酶系主要包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 及过氧化氢酶 (CAT) 等 (李周直等, 1994); 代谢解毒酶主要包括谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs)、多功能氧化酶 (MFO)、乙酰胆碱酯酶 (AChE)、羧酸酯酶 (CarEs) 及全脂酶 (ESTs) 等 (Bolter and Chefurka, 1990; Li *et al.*, 2007)。

丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine protease inhibitors, Serpins) 是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族中最大的一类, 在动物、植物、微生物和病毒中广泛存在 (Olson and Gettins, 2011), 主要通过调控丝氨酸蛋白酶级联反应, 参与昆虫的体液免疫反应 (Tong and Kanost, 2005)。Serpins 通过不可逆的结合丝氨酸蛋白酶, 形成非共价复合物, 调控昆虫体液免疫反应的 Toll 通路和黑化反应 (Law

et al., 2006), 一方面使免疫反应迅速剧烈的进行, 另一方面将免疫反应限定到在一定的程度与范围内, 保护宿主自身免受伤害 (Han *et al.*, 2000)。

金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 是一种非常重要的昆虫病原真菌, 研究表明绿僵菌对蝗虫有较好的防治效果 (雷仲仁和问锦曾, 2004)。本实验室前期研究发现 Serpin1 蛋白能降低绿僵菌对飞蝗的毒力 (李贝贝等, 2020)。为进一步明确 Serpin1 的作用机制, 本实验测定了在绿僵菌处理蝗虫的同时, 加入 Serpin1 蛋白对东亚飞蝗体内保护酶、解毒代谢酶共 6 种酶活力的影响, 从酶学水平探索了 Serpin1 抑制绿僵菌毒力的原因, 为进一步明确 Serpins 的功能提供了参考。

1 材料与方法

1.1 供试真菌

金龟子绿僵菌菌株 IMI330189 由中国农业科学院植物保护研究所保藏。将 IMI330189 菌株接种在 PDAY 固体培养基上, 28℃ 培养 7 d, 将孢子粉刮下, 低温干燥后采用血球计数板计算总孢子含量,

并通过萌发培养基检测萌发率, 计算活孢子含量。其中活孢子量 = 总孢子含量 × 萌发率。4℃ 储存备用。

1.2 供试蝗虫及饲养方法

东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis* 卵购于河北沧州。蝗卵在人工气候培养箱中孵化, 温度 30℃ ± 2℃, 相对湿度为 60% ± 5%, 光周期 L:D = 14 h:10 h。将孵化后的蝗蛹转移到 60 cm × 50 cm × 70 cm 规格的养虫笼中饲养至 3 龄备用, 温度 30℃ ± 2℃, 光周期 L:D = 14 h:10 h。

1.3 Serpin1 蛋白的提取

将含有 *serpin1* 基因的大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 菌株接种至 LB 液体培养基中, 37℃ 摇床培养过夜, 2% 转接至 200 mL LB 培养基中, 37℃ 培养 2 h (OD 值 0.5 ~ 0.6), 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 28℃ 培养 10 h。12 000 r/min 离心、收集菌体, 加入 10 mL PBS 缓冲液洗两次, 重悬, 超声破碎 20 min, 离心取上清, 采用 8M 尿素法变性, 在采用梯度复性的方法获得活性的 Serpin1 蛋白, 采用 BCA 定量法, 进行 SDS-PAGE 电泳, 测定 Serpin1 蛋白的含量, -80℃ 冰箱储存备用。

1.4 杀虫活性测定方法

实验共设 4 个处理。处理 1: 金龟子绿僵菌 IMI330189 孢子粉; 处理 2: Serpin1 蛋白; 处理 3: 金龟子绿僵菌 IMI330189 孢子粉 + Serpin1 蛋白; 处理 4: 对照 (大肠杆菌 BL21 (pET-21b) 经 IPTG 诱导后提取的蛋白)。根据前期实验结果, 设置本实验各处理中绿僵菌孢子粉和 Serpin1 蛋白含量, 详见表 1 (李贝贝等, 2020)。

表 1 不同处理所用的饵料组分及浓度

Table 1 Components and concentration of baits from different treatments

处理 Treatments	孢子浓度 (spore/g) Concentration of <i>M. anisopliae</i>	蛋白浓度 (mg/g) Protein concentration
绿僵菌 IMI330189	2.50×10^8	0
Serpin1 蛋白 Serpin1 protein	0	1
绿僵菌 + Serpin1 蛋白 IMI330189 + Serpin1 protein	2.50×10^8	1
对照 Control	0	0

注: 饵料是含有 5% 植物油的无菌麦麸。Note: The bait was sterile wheat bran containing 5% vegetable oil.

饵料配制方法: 每个处理分别称取 10 g 麦麸, 加入 5% 植物油, 混匀, 按照表 1 每个处理中孢子和蛋白的含量, 依据绿僵菌孢子粉中的活孢子含量和 Serpin1 蛋白原始浓度, 分别计算、并称量所需的孢子粉和蛋白, 加入麦麸中, 混匀, 各自均分成 5 份, 分别放入灭菌的培养皿中备用。

杀虫活性测定方法: 将预先饥饿处理 12 h 的 3 龄蝗蛹放入无菌的生测筐中, 每筐 30 头为 1 个重复, 将分好的饵料分别放入装有蝗蛹的生测筐中, 每个处理 5 筐 (重复 5 次)。饲喂 24 h 后将饵料取出, 用新鲜麦苗饲喂至实验结束, 温度 30℃, 光照 16 L:8 D。每日记录死亡和存活数, 并计算累计死亡率。

1.5 蝗虫蛋白酶提取液的制备

实验处理和蝗虫饲喂方法同 1.4, 在东亚飞蝗蝗蛹开始饲喂麦苗的当天开始, 在每个处理的 5 个重复中各取蝗虫 1 头, 每个处理共取 5 头, 连续取样 5 d (王正浩, 2016)。将每头蝗蛹分别置于研钵中, 加入液氮研磨成粉, 倒至 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL trizol 冰浴匀浆。将匀浆液在 4℃ 下 12 000 rpm 离心 20 min, 取上清液作为酶提取液备用。

1.6 保护酶活性测定

超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 试剂盒购自南京建成生物工程公司, 操作步骤按说明书的方法进行。酚氧化酶 (PO) 活性测定参照罗万春的方法 (罗万春, 2010)。每个样本重复测定 5 次。

1.7 解毒酶活性测定

多功能氧化酶 (MFO) 活性测定参照 Han 等的方法 (Han *et al.*, 1998); 谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 活性测定参照 Oppenoorth 和 Welling 的方法 (Oppenoorth and Welling, 1976); 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 酶活测定参照高希武的方法 (高希武, 1991)。每个样本重复测定 5 次。

1.8 虫体提取液总可溶性蛋白含量测定

以牛血清蛋白 BSA 为标准蛋白, 参照 Bradford 方法测定 (Bradford, 1976), 每个样本重复测定 3 次。

1.9 数据处理

所有酶活测定数据采用 Softmax Pro 6.1 软件进行记录。本实验各酶活数据利用 SPSS 19.0 进行数据分析, 采用 Duncan 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 东亚飞蝗 Serpin1 蛋白对绿僵菌致病力的影响

东亚飞蝗的累计死亡率在不同处理组中的变化趋势见图 1。在金龟子绿僵菌 IMI330189 处理组, 东亚飞蝗蝗蛹从第 3 天起开始死亡, 至第 11 天时累计死亡率达到 80.6%; 从第 3 天到第 11 天, 每天的累计死亡率都显著高于对照 ($P < 0.05$)。在 Serpin1 蛋白单独处理组, 从第 1 天至第 11 天, 东亚飞蝗蝗蛹的累计死亡率都很低, 且与对照无显著差异 ($P > 0.05$)。将 Serpin1 蛋白和绿僵菌 IMI330189 孢子混合处理东亚飞蝗后, 第 1 天和第 2 天的累计死亡率与其他各组无显著性差异, 第 3 天和第 4 天累计死亡率与对照组和 Serpin1 单独处理组之间都无显著差异 ($P > 0.05$), 但显著低于绿僵菌 IMI330189 单独处理组 ($P < 0.05$); 从第 5 天至第 11 天, 每天的累计死亡率较对照组和 Serpin1 单独处理组都显著升高 ($P < 0.05$), 但仍低于相同时间内绿僵菌 IMI330189 单独处理组的累计死亡率, 且差异显著 ($P < 0.05$)。上述结果表明 Serpin1 蛋白能够显著降低绿僵菌对东亚飞蝗蝗蛹的致病力, 使东亚飞蝗蝗蛹的死亡率降低。

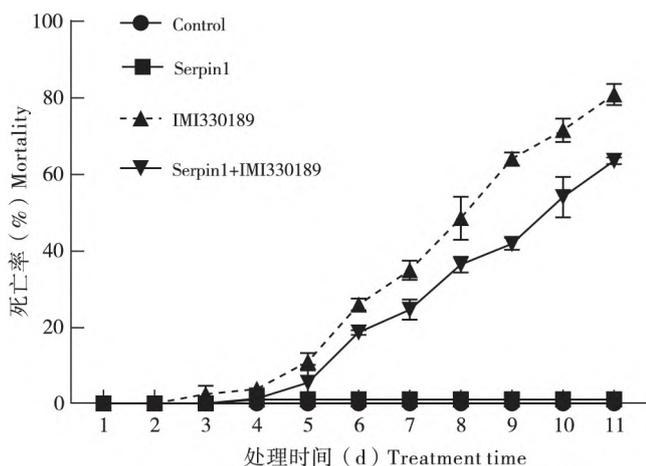


图 1 不同处理后东亚飞蝗蝗蛹的死亡率

Fig. 1 Mortality of *Locusta migratoria manilensis* treated from different treatments

2.2 Serpin1 蛋白对东亚飞蝗保护酶活性的影响

2.2.1 对超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响

不同处理组的 SOD 的活性表明 (图 2-A),

Serpin1 蛋白处理组在第 4 天和第 5 天的 SOD 活性显著高于对照组, 在其它天内两组间无显著性差异。绿僵菌 IMI330189 处理组在处理的 5 d 内的 SOD 活性均高于对照组, 且第 2 天和第 4 天的差异显著。绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组在前 4 d 的 SOD 活性均显著高于对照组, 且高于绿僵菌 IMI330189 处理组。总体上讲, Serpin1 蛋白处理和绿僵菌处理后东亚飞蝗体内的保护酶 SOD 活性呈上升趋势; 绿僵菌 IMI330189 与 Serpin1 蛋白混合后, SOD 活性较绿僵菌 IMI330189 单独处理组呈升高的趋势。

2.2.2 对过氧化物酶 (POD) 活性的影响

不同处理组的 POD 的活性表明 (图 2-B), Serpin1 蛋白处理组在第 4 天的 POD 活性显著高于对照组, 在其它天内两组间无显著差异。绿僵菌 IMI330189 处理组除第 1 天外, 在其它天内的 POD 活性均显著高于对照组。绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组在处理的第 2、第 3 和第 5 天, 其 POD 活性显著低于绿僵菌 IMI330189 单独处理组, 在其它天内差异不显著。总体来说, Serpin1 蛋白处理和绿僵菌处理后飞蝗体内的 POD 活性呈现上升的趋势, 绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组的 POD 活性较绿僵菌 IMI330189 单独处理组呈下降趋势。

2.2.3 对酚氧化物 (PO) 酶活性的影响

不同处理组的 PO 的活性表明 (图 2-C), Serpin1 蛋白处理组除第 4 天外, 在其它天内的 PO 活性显著高于对照组。绿僵菌 IMI330189 处理组在处理的第 1、第 3 和第 5 天的 PO 活性显著高于对照组, 在其它天内两组差异不显著。绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组在第 1 天的 PO 活性显著高于对照组和绿僵菌 IMI330189 处理组; 第 3 天时, 绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组显著高于对照组, 但与绿僵菌 IMI330189 处理组无显著差异, 在其它天内 3 组差异不显著。总体来讲, Serpin1 蛋白处理和绿僵菌处理后飞蝗体内的 PO 活性呈现上升的趋势, 且在第 1 天上升最为明显; 绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组的 PO 活性较绿僵菌 IMI330189 单独处理组在第 1 天呈现上升的趋势, 后期二者之间无显著差异。

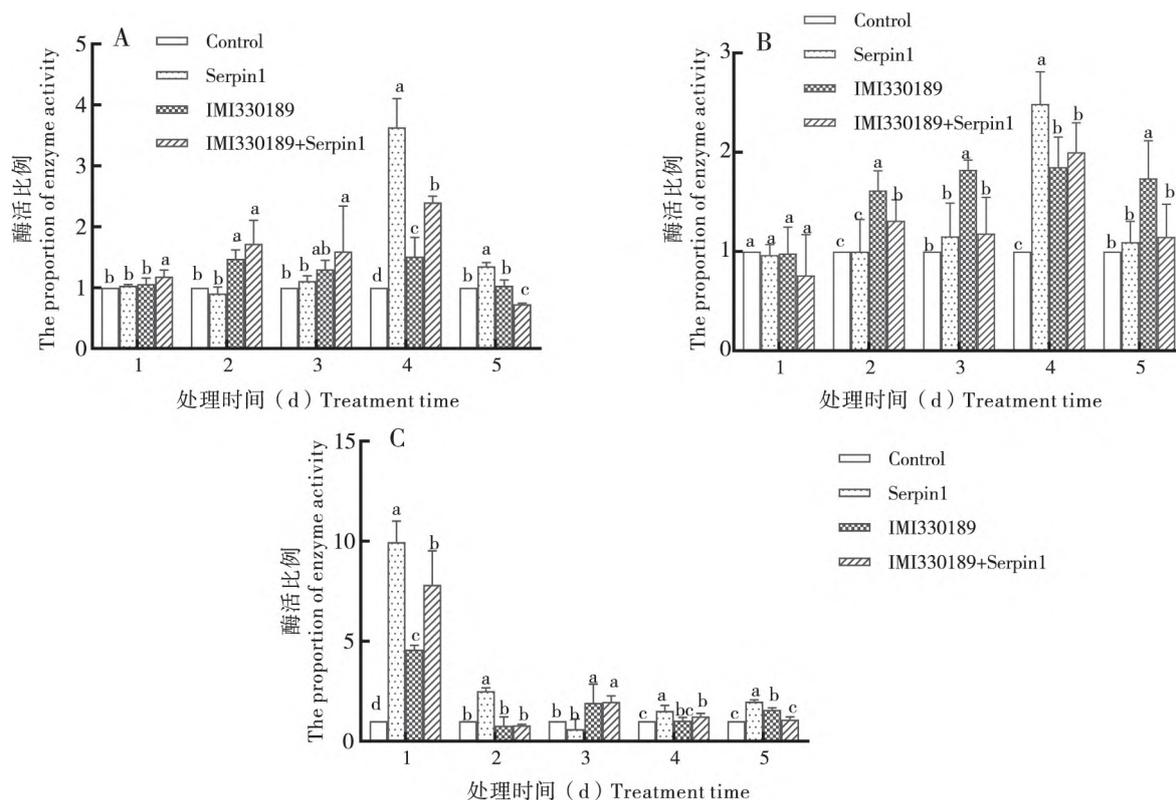


图2 不同处理组对东亚飞蝗保护酶活性比较

Fig. 2 Comparison of protective enzymes activity of *Locusta migratoria manilensis* in different treatment groups

注: A, 超氧化物歧化酶活性; B, 过氧化物酶活性; C, 酚氧化酶活性。各酶活性是处理组酶活与对照组酶活的比值。图中不同字母代表0.05水平差异显著性。Note: A, SOD activity; B, POD activity; C, PO activity. The value of enzymes activities of treatment group divided by control group. Different letters in the figure represented the significance of difference at the 0.05 level.

2.3 Serpin1 蛋白对东亚飞蝗解毒酶活性的影响

2.3.1 对多功能氧化酶 (MFO) 活性的影响

不同处理组的 MFO 的活性表明 (图 3-A), Serpin1 蛋白处理组除第 4 天外, 在其它天内的 MFO 活性显著高于对照组。绿僵菌 IMI330189 处理组在处理的第 2、第 3 和第 5 天的 MFO 活性较对照组显著上升, 在其它天内差异不显著。绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组除处理的第 5 天外, 其它天数时其 MFO 活性显著高于对照组, 且在第 2、第 3 和第 4 天, 其混合处理组的 MFO 活性显著高于绿僵菌 IMI330189 单独处理组, 在第 1 天和第 5 天时, 其 MFO 活性显著低于绿僵菌 IMI330189 单独处理组。总体上看, 绿僵菌单独处理组和 Serpin1 蛋白处理组的 MFO 活性较对照均呈现上升的趋势, 绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组的 MFO 活性高于绿僵菌单独处理组。

2.3.2 对谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs) 活性的影响

不同处理组的 GSTs 的活性表明 (图 3-B), Serpin1 蛋白处理组在第 2 天和第 4 天的 GSTs 活性显著高于对照组, 在第 3 天时的 GSTs 活性显著低于对照组。绿僵菌 IMI330189 处理组在第 1、第 3 和第 4 天的 GSTs 活性显著低于对照组, 在第 2 天和第 5 天时, 其 GSTs 活性显著高于对照组。绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组在处理后的第 2 天和第 4 天的 GSTs 活性显著高于对照组, 在第 3 天显著低于对照组, 且除第 5 天外, 绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组的 GSTs 活性显著高于绿僵菌 IMI330189 处理组。总体上看, Serpin1 蛋白处理后, 东亚飞蝗体内 GSTs 活力呈现升高再降低的趋势; 绿僵菌 IMI330189 处理后, 其 GSTs 活力呈现升高 - 降低 - 再升高的趋势; 绿僵菌 IMI330189 与 Serpin1 蛋白混合后, 比绿僵菌单独处理时, GSTs 活力在前期呈现上调的趋势。

2.3.3 对乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的影响

不同处理组的 AChE 的活性表明 (图 3-C), Serpin1 蛋白处理组在第 1、第 3 和第 4 天的 AChE 的活性均显著高于对照组; 第 5 天时, Serpin1 蛋白处理组的 AChE 活性显著低于对照组。绿僵菌 IMI330189 处理组在处理后的第 1、第 2 和第 4 天的 AChE 活性显著高于处理组; 第 5 天时, 绿僵菌 IMI330189 处理组显著低于对照组。绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组在处理后的第

2 天和第 3 天时的 AChE 活性显著高于对照组和绿僵菌 IMI330189 单独处理组; 在第 1 天和第 4 天时, 显著低于绿僵菌 IMI330189 单独处理组。总体上看, Serpin1 蛋白处理组和绿僵菌处理后飞蝗体内的 AChE 活性呈先上升后降低的趋势, 绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合处理组的 AChE 活性较绿僵菌 IMI330189 单独处理组前期呈先升高后降低的趋势。

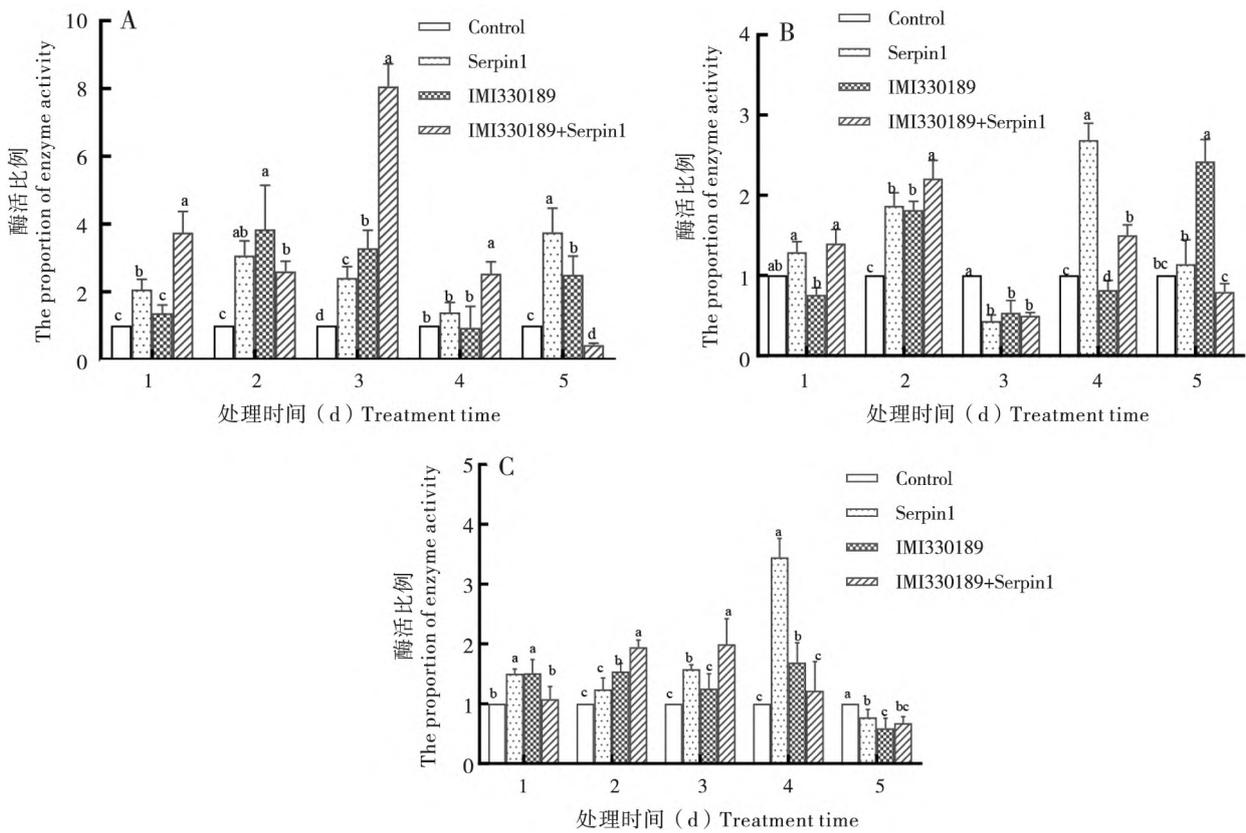


图 3 不同处理组对东亚飞蝗解毒酶活性比较

Fig. 3 Comparison of detoxifying enzymes activity of *Locusta migratoria manilensis* in different treatments

注: A, 多功能氧化酶活性; B, 谷胱甘肽-S-转移酶活性; C, 乙酰胆碱酯酶活性。各酶活性是处理组酶活与对照组酶活的比值。图中不同字母代表 0.05 水平差异显著性。Note: A, MFO activity; B, GSTs activity; C, AChE activity. The value of enzymes activities of treatment group divided by control group. Different letters in the figure represented the significance of difference at the 0.05 level.

综上所述, 将 Serpin1 蛋白与绿僵菌 IMI330189 混合处理东亚飞蝗后, 与绿僵菌 IMI330189 单独处理相比, 东亚飞蝗体内的 MFO、GST、SOD、PO 的活力升高, POD 的活力降低, AChE 的活力呈现先上升后降低的趋势, 在这些酶活性的综合调节下, 最终造成混合处理组的死亡率较绿僵菌单独处理组显著降低。

3 结论与讨论

昆虫在病原物侵染时, 会诱导自身的免疫反应以抵抗并消除病原菌, 其中酶学反应是免疫的重要组成部分 (Desneux *et al.*, 2007)。前期研究发现饲喂绿僵菌孢子粉后, 东亚飞蝗体内的保护

酶呈现先上升后下调的趋势, 多功能氧化酶和活性氧呈现出先降低后升高的趋势 (郭隆隆, 2019)。Serpins 可以通过调控体内丝氨酸蛋白酶级联反应, 从而调控昆虫免疫过程 (Olson and Gettins, 2011)。本实验通过测定 Serpin1 蛋白与绿僵菌混合处理东亚飞蝗后的死亡率, 证明 Serpin1 能够有效抑制绿僵菌对东亚飞蝗的侵染, 降低东亚飞蝗的致死率。因此, 明确 serpins 对蝗虫体内免疫相关酶的影响, 对于揭示 Serpins 抑制绿僵菌毒力的机制、明确 Serpins 的功能具有重要意义。

超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 能够清除超氧化物阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 , 在昆虫抵御病原菌的侵染中起到重要作用。贾苗研究发现, 将吡虫啉与绿僵菌混合处理东亚飞蝗, 可致使东亚飞蝗体内的保护酶 SOD 和 POD 的活性升高 (贾苗, 2017)。表明绿僵菌侵入后可能造成东亚飞蝗体内 $O_2^{\cdot-}$ 增多, 使虫体的保护酶系统开启, 诱导并增强 SOD 活性来清除 $O_2^{\cdot-}$, 并进一步诱导体内的 POD 活性升高以清除过多的 H_2O_2 (李周直等, 1994)。本研究发现, Serpin1 蛋白处理组和绿僵菌 IMI330189 与 Serpin1 蛋白混合组 SOD 活力较绿僵菌单独处理组表现为升高的趋势, 表明 Serpin1 蛋白能够进一步提高东亚飞蝗体内 SOD 活力, 增强虫体消除机体吞噬或包囊病原体等过程中所产生的过量活性氧的能力, 保护昆虫避免因过多活性氧造成自身损伤。Serpin1 蛋白处理组的 POD 的酶活性显著升高, 而绿僵菌 IMI330189 与 Serpin1 蛋白混合组 POD 的酶活性表现为降低的趋势, 推测可能是因为绿僵菌的侵入菌丝在东亚飞蝗体内大量萌发, 致使体内的 POD 活性受到抑制, 确切原因需要进一步深入探索。

当病原菌侵入时, 昆虫会催化自身黑化反应以清除外来病原物, 其中酚氧化酶 (PO) 是催化黑化反应的重要因子 (Duan and Otvosi, 2001)。在分子氧存在条件下, PO 能把酚类物质氧化成醌类物质, 最终再聚合成黑色素参与免疫防御过程中, 与此同时其氧化过程中形成的醌类物质可协助杀死被包被的微生物 (Cerenius and Soderhall, 2004)。如当白僵菌 *Beauveria bassiana* 侵入冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 时, 白僵菌体内的分生孢子、菌丝均可以诱导冈比亚蚊产生黑色素并引发黑化反应, 阻碍白僵菌在虫体内的生长发育

(Yassine *et al.*, 2012)。本研究发现, 在绿僵菌侵入的前期, 东亚飞蝗的 PO 活性显著高于对照组, 表明东亚飞蝗黑化反应被激活以抵抗绿僵菌的侵染, 并在绿僵菌侵染前期发挥作用; Serpin1 蛋白单独处理后 PO 活性表现出升高趋势, 将绿僵菌 IMI330189 与 Serpin1 蛋白混合后, 东亚飞蝗体内 PO 活性进一步升高, 表明 Serpin1 蛋白能够有效增强东亚飞蝗的黑化反应, 提高东亚飞蝗的免疫力。

多功能氧化酶 (MFO) 的成分包括细胞色素和黄素蛋白等, 其中起主要作用的是细胞色素 P450。病原菌进入昆虫体内, 昆虫体内的氧化型 P450 与之结合形成复合物, 后被 NADPH 还原, 最后结合并激活氧, 裂解成产物并合成水, 最终降解病原菌的毒性 (Zhou *et al.*, 2010)。贾苗研究发现, 用绿僵菌与环氧虫啉联合处理东亚飞蝗时, 致使东亚飞蝗体内的解毒酶 MFO 活性显著升高 (贾苗, 2017)。罗林珍采用不同杀虫剂处理韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia Odriphaga* 幼虫时, 发现不同杀虫剂均可使韭菜迟眼蕈蚊体内的 MFO 活性呈现出升高的趋势 (罗林珍, 2017)。这些研究都进一步明确了 MFO 的解毒功能。本研究发现, 饲喂绿僵菌后东亚飞蝗体内的 MFO 活性升高, 表明虫体在积极分解绿僵菌的毒性; Serpin1 蛋白单独处理后 PO 活性表现出升高趋势, 将绿僵菌 IMI330189 与 Serpin1 蛋白混合后, 东亚飞蝗体内的 MFO 活性较绿僵菌单独处理组呈现增高趋势, 表明 Serpin1 蛋白能增强东亚飞蝗体内多功能氧化酶活性, 提高东亚飞蝗降解绿僵菌毒素的能力。

谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs) 的解毒作用主要体现在能够催化还原谷胱甘肽, 使其通过与各种有害化学物质的亲电子基团相结合, 最终形成硫醚氨酸促使各种毒性物质排出体外。当昆虫受到有毒物质的胁迫时, 通过增加 GSTs 的表达量来增加其本身的解毒能力, 达到缓解毒害的目的 (周先碗, 1999)。蒋兴川等研究发现草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 幼虫在受到甲氨基阿维菌素苯甲酸盐刺激时, 其体内的 GSTs 活力会呈现先降低后升高再降低的趋势 (蒋兴川等, 2019)。麦扁盾蝽 *Eurygaster integriceps* 经球孢白僵菌及次生代谢产物侵入的中期, 体内的 GSTs 活力显著升高 (Zibae *et al.*, 2009)。本研究发现, 东亚飞蝗经绿僵菌侵染后, GSTs 表现出先升高再降低的趋势,

表明绿僵菌的侵入引起东亚飞蝗分泌 GSTs 来抵抗绿僵菌的入侵, 后期绿僵菌菌丝在东亚飞蝗体内大量增殖, 使体内的免疫系统紊乱, 造成 GSTs 活力降低。经 Serpin1 蛋白单独处理, GSTs 也表现出升高的趋势, 且将绿僵菌 IMI330189 与 Serpin1 蛋白混合后, GSTs 的活力较绿僵菌单独处理组呈现增高的趋势, 表明 Serpin1 蛋白能够增强 GSTs 的活性, 提高东亚飞蝗的解毒能力, 以抵抗病原菌的侵袭。

乙酰胆碱酯酶 (AChE) 是昆虫体内重要的神经系统酶, 在昆虫神经化学传递中起着至关重要的作用。它主要是通过迅速分解虫体的乙酰胆碱, 防止因乙酰胆碱积累造成的神经传递阻断, 将有毒物质转化为无毒物质, 从而降低病原物对昆虫的毒害作用 (Fournier and Mutero, 1994; 唐培安等, 2007)。当使用有机磷杀虫剂侵染处理果蝇 *Drosophila* 和麦二叉蚜 *Schizaphis graminum* 时, 它们体内的 AChE 活性显著升高, 从而降低了对杀虫剂的敏感性 (Zhu and Gao, 1999)。王龙江等研究发现, 红火蚁 *Solenopsis invicta* Buren 感染白僵菌后, 其体内乙酰胆碱酯酶也呈现先上升后下降的趋势, 表明病原物侵染可以诱导昆虫体内乙酰胆碱酯酶上调, 从而增强对病原物的抵抗力 (王龙江等, 2010)。本研究中, 经过绿僵菌侵染后, 东亚飞蝗体内的 AChE 活性也呈现先升高再降低的趋势, 推测东亚飞蝗通过提高分解乙酰胆碱酯酶的能力从而抵抗绿僵菌的侵入, 后随着绿僵菌大量增殖, 体内乙酰胆碱含量升高, 导致神经阻断而酶活力下降。经 Serpin1 蛋白处理, AChE 活性表现出升高的趋势, 且绿僵菌 IMI330189 + Serpin1 蛋白混合组的 AChE 活性较绿僵菌单独处理组先升高再降低, 推测前期 Serpin1 蛋白的增加导致蝗虫分解乙酰胆碱的能力增强, 从而迅速降低绿僵菌的毒力, 后期 AChE 活性降低可能是 Serpin1 蛋白为防止体内过多的 AChE 破坏东亚飞蝗自身的神经系统, 导致虫体因过度免疫而死亡。

本实验通过测定 Serpin1 蛋白与绿僵菌 IMI330189 混合后对东亚飞蝗体内保护酶和解毒酶等 6 种免疫相关酶的影响, 证明 Serpin1 蛋白能够有效调控东亚飞蝗的体内相关酶的活力, 提高东亚飞蝗的免疫力, 从而降低绿僵菌对东亚飞蝗的致死率, 为进一步明确 Serpins 的功能提供了参考。

参考文献 (References)

- Bolter CJ, Chefurka W. Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse liver mitochondria using the respiratory inhibitors phosphine, myxothiazol, and antimycin and spectral analysis of inhibited cytochromes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 278 (1): 65–72.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72 (1): 248–254.
- Cerenius L, Soderhall K. The prophenoloxidase – activating system in invertebrates [J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198 (1): 116–126.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods [J]. *Annual Review of Entomology*, 2007, 52 (1): 81–106.
- Duan L, Otvos IS. Influence of larval age and virus concentration on mortality and sublethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the west spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. *Environmental Entomology*, 2001, 30 (1): 136–146.
- Fournier D, Mutero A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 1994, 108 (1): 19–31.
- Gao XW. A review of methods for determination of insect cholinesterase [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 1991, 28 (4): 253–255. [高希武. 昆虫胆碱酯酶测定方法综述 [J]. 昆虫知识, 1991, 28 (4): 253–255]
- Guo LL. Effect of Extracellular Protease of *Metarhizium anisopliae* on Host Immunity [D]. Beijing: Academy of Agricultural Sciences Master Thesis, 2019. [郭隆隆. 绿僵菌胞外蛋白酶对宿主免疫影响 [D]. 北京: 中国农业科学院硕士论文, 2019]
- Han JH, Zhang HY, Min GS, et al. A novel *Drosophila* serpin that inhibits serine proteases [J]. *FEBS Letters*, 2000, 468 (2–3): 194–198.
- Han Z, Moores GD, Denholm I, et al. Association between biochemical markers and insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1998, 62 (3): 164–171.
- Jia M. The Combination of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* with the Insecticide Suppresses Immunity Against *Locusta migratoria* (Meyen) [D]. Beijing: Academy of Agricultural Sciences PhD Thesis, 2017. [贾苗. 绿僵菌和杀虫剂协同抑制飞蝗免疫研究 [D]. 北京: 中国农业科学院博士论文, 2017]
- Jiang XC, Shen YD, Sun JC, et al. Effect of chlorantraniliprole and emamectin benzoate on toxicity and detoxification enzymes activity in *Spodoptera frugiperda* larva [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2019, 5: 961–967. [蒋兴川, 沈怿丹, 孙劲超, 等. 氯虫苯甲酰胺和甲维盐对草地贪夜蛾幼虫的毒力及解毒酶活性的影响 [J]. 环境昆虫学报, 2019, 5: 961–967]

- Law RH, Zhang Q, Megowan S, *et al.* An overview of the serpin superfamily [J]. *Genome Biology*, 2006, 7 (5): 216.
- Lei ZR, Wen JZ. Advance in locust control with *Metarhizium anisopliae* [J]. *Plant Protection*, 2004, 30 (4): 14–17. [雷仲仁, 问锦曾. 绿僵菌治蝗研究进展 [J]. 植物保护, 2004, 30 (4): 14–17]
- Li BB, Tian Y, Du GL, *et al.* Effect of serine protease inhibitor (Serp1) of *locusta migratoria* on the infection of *Metarhizium anisopliae* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2020, 36 (5): 729–736. [李贝贝, 田野, 杜桂林, 等. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serp1 对绿僵菌侵染飞蝗的影响 [J]. 中国生物防治学报, 2020, 36 (5): 729–736]
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics [J]. *Annual Review of Entomology*, 2007, 52: 231–253.
- Li ZZ, Shen HJ, Jiang QH, *et al.* Study on the activity of protective enzyme system in several insects [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 1994, 4: 399–403. [李周直, 沈惠娟, 蒋巧很, 等. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究 [J]. 昆虫学报, 1994, 4: 399–403]
- Luo LZ. Effect of Pesticides on Activity of Detoxification Enzyme in *Bradysia odriphaga* Yang et Zhang [D]. Yangling: Northwest A&F University Master Thesis, 2017. [罗林珍. 杀虫剂对韭菜迟眼蕈蚊解毒酶活性的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士论文, 2017]
- Luo WC. Insect Phenol Oxidase and its Inhibitors [M]. Beijing: Science Press, 2010. [罗万春. 昆虫酚氧化酶及其抑制剂 [M]. 北京: 科学出版社, 2010]
- Olson ST, Gettins PGW. Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily [J]. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2011, 99: 185–240.
- Oppenorth FJ, Welling W. Biochemistry and physiology of resistance [J]. *Insecticide Biochemistry and Physiology*, 1976: 507–551.
- Tang PA, Deng YX, Wang JJ. Effects of ethyl formate on acetylcholinesterase and carboxylesterase in *Sitophilus oryzae* [J]. *Plant Protection*, 2007, 33 (1): 44–47. [唐培安, 邓永学, 王进军. 甲酸乙酯对米象乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶的影响 [J]. 植物保护, 2007, 33 (1): 44–47]
- Tong Y, Kanost MR. *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenoloxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression and characterization [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (15): 14923–14931.
- Wang LJ, Lv LH, Xie MQ, *et al.* Changes of activities of protective enzymes and esterase in *Solenopsis invicta* Buren infected with *Beauveria bassiana* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, 29 (3): 282–286. [王龙江, 吕利华, 谢梅琼, 等. 红火蚁感染白僵菌后体内保护酶和酯酶活性的变化 [J]. 华中农业大学学报, 2010, 29 (3): 282–286]
- Wang ZH. Virulence of *Metarhizium anisopliae* Extracellular Proteinases in Midgut of *Locusta migratoria manilensis* Meyen [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University Master Thesis, 2016. [王正浩. 绿僵菌胞外蛋白酶对东亚飞蝗中肠毒力差异分析 [D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士论文, 2016]
- Yassine H, Kamareddine L, Osta MA. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8 (11): e1003029.
- Zhou XW. A new method of separating glutathione S-transferases from insects [J]. *Chinese Journal of Biochemistry Molecular Biology*, 1999, 15 (2): 269–273. [周先碗. 昆虫谷胱甘肽 S-转移酶分离纯化的新方法 [J]. 中国生物化学与分子生物学, 1999, 15 (2): 269–273]
- Zhou X, Ma C, Li M, *et al.* CYP9A12 and CYP9A17 in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: Sequence similarity, expression profile and xenobiotic response [J]. *Pest Management Science*, 2010, 66 (1): 65–73.
- Zhu KY, Gao JR. Increased activity associated with reduced sensitivity of acetylcholinesterase in organophosphate-resistant greenbug, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae) [J]. *Pest Management Science*, 1999, 55 (1): 11–17.
- Zibae A, Bandani AR, Tork M. Effect of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, and its secondary metabolite on detoxifying enzyme activities and acetylcholinesterase (AChE) of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae) [J]. *Biology Science & Technology*, 2009, 19 (5): 485–498.