

甲酸乙酯对米象乙酰胆碱酯酶 和羧酸酯酶的影响

唐培安, 邓永学*, 王进军

(西南大学昆虫学及害虫控制工程重点实验室, 重庆 400716)

摘要 报道了甲酸乙酯对米象[*Sitophilus oryzae* (Linnaeus)]乙酰胆碱酯酶(AChE)和羧酸酯酶(CarE)的活性影响,甲酸乙酯对米象表现出很高的毒力,25℃下熏蒸处理24 h的 LC_{50} 为28.65 $\mu\text{L/L}$ 。亚致死剂量的甲酸乙酯可以使米象成虫体内AChE的比活力显著下降,用20 $\mu\text{L/L}$ 的浓度处理24 h,AChE的比活力由15.684 nmol/mg·min下降至9.530 nmol/mg·min;酶动力学研究表明,甲酸乙酯可使米象成虫体内AChE的 K_m 值明显增加。对于羧酸酯酶,在活体条件下表现为先抑制后激活的规律,离体条件下则主要表现为抑制作用,且随着药剂浓度的增大抑制率也增大。

关键词 甲酸乙酯; 乙酰胆碱酯酶; 羧酸酯酶; 米象

中图分类号 S 482.6

Effects of ethyl formate on acetylcholinesterase and carboxylesterase in *Sitophilus oryzae*

Tang Pei'an, Deng Yongxue, Wang Jinjun

(Key Laboratory of Entomology & Pest Control Engineering, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract The effects of ethyl formate on carboxylesterase (CarE) and acetylcholinesterase (AChE) in *Sitophilus oryzae* Linnaeus were studied. The results of bioassay revealed that LC_{50} of ethyl formate was 28.65 $\mu\text{L/L}$ with a 24 hours treatment at 25℃, and there was a significant decline in AChE specific activity of *S. oryzae* treated with sub-lethal concentration. Compared to the control, the specific activity of AChE decreased from 15.684 nmol/mg·min to 9.530 nmol/mg·min. In addition, the kinetics study showed that a higher K_m value was induced when *S. oryzae* was treated with ethyl formate. As for CarE, its activity *in vivo* was firstly inhibited, and then activated, while ethyl formate showed a significant inhibition on CarE activity *in vitro* and the inhibition percentage ascended with the increase of pesticide concentration.

Key words ethyl formate; acetylcholinesterase (AChE); carboxylesterase (CarE); *Sitophilus oryzae*

粮食储藏是合理利用粮食资源的重要手段之一^[1],而粮食在储存期间容易受到有害生物的危害,造成粮食质量和数量的巨大损失^[2]。药剂熏蒸法是目前最为有效和经济的防治手段,熏蒸剂溴甲烷即将被淘汰、磷化氢抗性问题的日益严重,使得现在可选择的药剂品种越来越少,对粮食的安全储藏提出了严峻的挑战^[3]。甲酸乙酯(ethyl formate)是一种对环境友好的新型绿色熏蒸剂,在常温下为无色液体,沸点为54.1℃,2002年甲酸乙酯作为处理干果的熏蒸剂在澳大利亚登记注册^[4]。近年来,澳大利

亚联邦科学与工业研究组织(CSIRO)的科学家们经研究发现,甲酸乙酯作为粮食熏蒸剂具有以下优点:①杀虫迅速,一般在2 d内就能发挥很好的杀虫活性;②熏蒸后植物种子的品质与发芽率不受影响;③甲酸乙酯会很快降解至自然水平,不会在储藏物中残留。因此,被广泛认为是一种很有潜力的粮食熏蒸剂。甲酸乙酯与CO₂组成的液态混合熏蒸剂(VAPORMATE™)也已经在澳大利亚注册成功,关于甲酸乙酯应用的其他剂型正在开发期间^[5-7]。

米象[*Sitophilus oryzae* (Linnaeus)]隶属鞘翅

目(Coleoptera)象甲科(Curculionidae),是一种世界性的储粮害虫,严重危害各种谷物及种子、谷物加工品、豆类、油料、干果和药材等^[8]。本文研究了甲酸乙酯亚致死剂量对米象体内乙酰胆碱酯酶和羧酸酯酶的影响,以期有助于阐明该药剂的毒理机制和主要靶标。

1 材料与方法

1.1 试虫

供试昆虫米象由国家粮食储备局成都粮食科学研究所提供,并在西南农业大学重庆市昆虫学及害虫控制工程重点实验室养虫室内人工饲养。将米象成虫接种于经 $\text{Co}^{60}\gamma$ 射线消毒过的小麦中,产卵7 d后将成虫筛去,后代在温度为 $(30\pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(75\pm 5)\%$,24 h黑暗的条件下继续培养。以羽化后7~14 d的健康成虫作为试虫。

1.2 供试药剂和主要仪器

甲酸乙酯(含量 $>98\%$)、 α -萘酚(中国医药集团上海化学试剂公司生产);乙酸- α -萘酯(α -NA)(中国上海青浦合成试剂厂);毒扁豆碱(Sigma公司);固蓝B盐、碘化硫代乙酰胆碱(ATChI)、双(4-硝基-3-羧基苯)二硫化物(DTNB)(Fluka公司);十二烷基硫酸钠(SDS)、考马斯亮蓝G-250(AMRESCO分装)。以上试剂均为分析纯。

UV-8500型紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。

1.3 生物测定

采用广口瓶密闭熏蒸法。先将米象成虫放于容量为1 000 mL的广口瓶中,再将定量的甲酸乙酯滴在熏蒸盒($d=2\text{ cm}$, $h=1\text{ cm}$)底部的滤纸上,然后迅速用尼龙纱布将盒子包好,置于广口瓶内,盖上瓶盖,并用保鲜膜将瓶口密封。将广口瓶置于事先设定好温度的培养箱内,全黑暗条件下进行熏蒸,24 h药剂浓度设定24、26、28、30、32、34 $\mu\text{L/L}$ 6个梯度,48 h设定浓度梯度为20、22、24、26、28、30、32 $\mu\text{L/L}$,每个处理供试成虫50头,3次重复,并设空白对照,在散气24 h后检查记录成虫死亡数量。采用IRM害虫抗药性管理软件进行回归分析,用几率值法求出毒力回归线和 LC_{50} 。

1.4 乙酰胆碱酯酶(AChE)活性测定

1.4.1 活体测定

参照Ellman的方法^[9]。将米象成虫置于1 000 mL

的广口瓶中,按照10、15、20 $\mu\text{L/L}$ 的浓度加入甲酸乙酯,放置在 25°C 全黑暗的温箱中,在熏蒸4、8、16 h和24 h后散气,分别取存活的成虫10头,加入预冷的 $\text{pH } 8.0$ 、 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液1.5 mL,于冰水浴中匀浆,匀浆液在 4°C 、 $10\,000\text{ g}$ 条件下离心20 min,取上清液冰浴待测。用碘化硫代乙酰胆碱(ATChI)(1.5 mmol/L)作底物,经AChE水解后生成硫代胆碱和乙酸,与显色剂DTNB(1.0 mmol/L)生成黄色物质,以毒扁豆碱($1\times 10^{-4}\text{ mol/L}$)终止反应,在412 nm处测其OD值,每处理重复3次,并测定酶液中蛋白质含量。根据消光系数 $[e=1.36\times 10^{-4}(\text{mol/L})^{-1}\text{ cm}^{-1}]$ 将OD值换算成AChE的比活力($\text{nmol/mg}\cdot\text{min}$)。以酶活抑制率表示药剂对酶活力的影响,酶活抑制率=(对照组酶活力-处理组酶活力)/对照组酶活力 $\times 100\%$ 。

K_m 值测定的反应总体积3.6 mL,底物终浓度分别为0.005、0.02、0.1、0.5、2.0 mmol/L。计算方法参照Wilkinson(1961)^[10]。

1.4.2 离体测定

取未用药剂熏蒸过的米象成虫,按与活体测定相同的方法提取酶液。以丙酮为溶剂,先将甲酸乙酯配成0.1、1、10 mL/L和100 mL/L的不同浓度,在反应体系中预加入0.1 mL上述4种浓度的药液,再与酶液混合保温,其他同活体测定。

1.5 羧酸酯酶(CarE)活性测定

1.5.1 活体测定

参照van Aspern的方法^[11]。试虫处理同AChE活体测定,取10头处理过的米象成虫,加入预冷的 $\text{pH } 7.0$ 、 0.04 mol/L 的磷酸缓冲液1.2 mL,于冰浴条件下匀浆,匀浆液在 4°C 、 $10\,000\text{ g}$ 条件下离心15 min,取上清液冰浴,稀释3倍后测定CarE活性,母液用于测定蛋白质含量。用 α -萘酚制作标准曲线。以 α -乙酸萘酯(α -NA)($3\times 10^{-4}\text{ mol/L}$)作底物,经羧酸酯酶水解后生成 α -萘酚,与显色剂V(1%坚固蓝B):V(5%SDS)=2:5,可生成深蓝色物质,在600 nm处测OD值。根据制作的标准曲线和酶原蛋白含量的测定结果,将OD值换算成比活力($\mu\text{mol/mg}\cdot 30\text{ min}$)。

1.5.2 离体测定

取未熏蒸过的米象成虫按与活体测定相同的方法提取酶液。药剂与酶液的处理和AChE离体测定相似,再按与CarE活体测定相同的方法分别测定

OD 值,计算比活力。

1.6 蛋白质含量测定

参照 Bradford 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定^[12]。

2 结果与分析

2.1 甲酸乙酯对米象成虫的毒力

甲酸乙酯对米象表现出很高的毒力,尤其在短

时间内就能发挥很好的杀虫效果,在熏蒸处理 24 h 后其 LC₅₀ 为 28. 650 $\mu\text{L/L}$,处理 48 h 后 LC₅₀ 为 25. 805 $\mu\text{L/L}$ (表 1)。

2.2 乙酰胆碱酯酶活性

2.2.1 甲酸乙酯对 AChE 活性的活体抑制作用
活体条件下未用药处理的米象成虫体内 AChE 活力变化较小,而处理试虫的酶活性差异显著,表现为抑制作用(表 2)。

表 1 25 $^{\circ}\text{C}$ 时甲酸乙酯对米象成虫的熏蒸活性

处理时间/h	回归方程($y=$)	LC ₅₀ / $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$	95%置信限/ $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$	LC ₉₅ / $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$	95%置信限/ $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$	χ^2
24	$-11.655+11.430x$	28. 650	28. 146~29. 154	39. 905	37. 774~42. 036	4. 711 0*
48	$-8.030+9.230x$	25. 805	25. 282~26. 328	38. 896	36. 566~41. 226	3. 493 7*

表 2 活体条件下甲酸乙酯对米象 AChE 活力的影响¹⁾

药剂浓度/ $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$	AChE 的比活力 / $\text{nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$			
	4 h	8 h	16 h	24 h
CK	(15. 452 $\pm$ 0. 853) c	(15. 186 $\pm$ 0. 896) c	(15. 469 $\pm$ 0. 626) d	(15. 684 $\pm$ 0. 591) c
10	(15. 041 $\pm$ 0. 897) bc	(13. 941 $\pm$ 0. 439) bc	(13. 288 $\pm$ 0. 555) c	(13. 142 $\pm$ 0. 776) b
15	(12. 678 $\pm$ 0. 876) ab	(11. 823 $\pm$ 0. 315) ab	(10. 866 $\pm$ 0. 249) b	(10. 663 $\pm$ 0. 567) a
20	(11. 787 $\pm$ 0. 333) a	(11. 175 $\pm$ 0. 781) a	(9. 264 $\pm$ 0. 435) a	(9. 530 $\pm$ 0. 345) a

1) 表中数据为 3 次重复的平均值;同一列数值后字母相同表示邓肯氏新复极差法检验差异不显著($p<0.05$)。

在相同处理时间下随着药剂浓度的增大 AChE 的比活力逐渐降低,10 $\mu\text{L/L}$ 的甲酸乙酯处理米象 16 h 后,AChE 的比活力由 15. 469 $\text{nmol/mg} \cdot \text{min}$ 降至 13. 288 $\text{nmol/mg} \cdot \text{min}$,而在 20 $\mu\text{L/L}$ 的浓度下处理时则降至 9. 264 $\text{nmol/mg} \cdot \text{min}$;在相同的药剂浓度下随着处理时间的延长 AChE 的比活力也逐渐降低,15 $\mu\text{L/L}$ 的甲酸乙酯处理米象 4 h 后 AChE 的比活力由 15. 452 $\text{nmol/mg} \cdot \text{min}$ 降至 12. 678 $\text{nmol/mg} \cdot \text{min}$,而处理 24 h 后则由 15. 684 $\text{nmol/mg} \cdot \text{min}$ 降至 10. 663 $\text{nmol/mg} \cdot \text{min}$ 。

2.2.2 甲酸乙酯对 AChE 活性的离体抑制作用

从表 3 可以看出,在离体条件下甲酸乙酯对米象 AChE 的活性影响较小,尽管药剂处理后米象 AChE 活性略有提高,但与对照相比差异并不显著,不同药剂浓度造成 AChE 活性差异亦未达到显著水平($p>0.05$)。

表 3 离体条件下甲酸乙酯对米象 AChE 活力的影响¹⁾

药剂浓度/ $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$	AChE 的比活力/ $\text{nmol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{min})^{-1}$
CK	(15. 200 $\pm$ 0. 834) a
0. 1	(15. 200 $\pm$ 1. 169) a
1	(15. 559 $\pm$ 0. 657) a
10	(15. 619 $\pm$ 0. 619) a
100	(15. 380 $\pm$ 0. 648) a

1) 表中数据为 3 次重复的平均值;同一列数值后字母相同表示邓肯氏新复极差法检验差异不显著($p<0.05$)。

2.2.3 甲酸乙酯对 AChE 酶促反应动力学的影响
酶促反应动力学研究表明,用甲酸乙酯处理后米象成虫体内 AChE 的 K_m 值明显变大,15 $\mu\text{L/L}$ 和 20 $\mu\text{L/L}$ 的甲酸乙酯处理 8 h 使 K_m 值从 $6.058 \times 10^{-3} \text{ mmol/L}$ 增大至 $8.069 \times 10^{-3} \text{ mmol/L}$ 和 $1.728 \times 10^{-2} \text{ mmol/L}$,表明甲酸乙酯的抑制降低了 AChE 对底物 ATChI 的亲合力。

2.3 羧酸酯酶活性

2.3.1 甲酸乙酯对 CarE 活性的活体抑制作用
表 4 表明,用 10、15、20 $\mu\text{L/L}$ 的甲酸乙酯处理试虫 4 h 和 8 h 后,米象体内 CarE 的比活力均显著低于对照,而不同药剂浓度间差异不显著($p>0.05$)。当处理时间增加至 16 h 后,米象体内 CarE 的比活力均高于对照,但其差异并不显著($p>0.05$)。当处理时间延长到 24 h 后,20 $\mu\text{L/L}$ 的浓度下米象体内 CarE 的比活力显著低于对照($p<0.05$),其他浓度与对照间差异不明显。

2.3.2 甲酸乙酯对 CarE 活性的离体抑制作用
离体条件下甲酸乙酯对米象 CarE 比活力有显著抑制作用($p<0.05$),且表现为在一定药剂浓度范围内,随甲酸乙酯浓度的增高抑制能力增强的趋势(表 5)。0. 1 mL/L 的甲酸乙酯对 CarE 比活力的抑制率为 3. 256%,10 mL/L 的浓度下抑制率为 10. 73%,100 mL/L 的抑制率为 21. 201%。

表4 活体条件下甲酸乙酯对米象 *CarE* 活力的影响¹⁾

药剂浓度/ $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>CarE</i> 的比活力/ $\mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot 30 \text{ min})^{-1}$			
	4 h	8 h	16 h	24 h
CK	(9.611±0.324) b	(9.605±0.191) b	(9.314±0.168) a	(9.354±0.200) b
10	(8.190±0.496) a	(8.394±0.604) a	(9.781±0.737) a	(9.513±0.287) b
15	(8.561±0.876) ab	(8.292±0.292) a	(9.986±0.907) a	(9.226±0.396) b
20	(8.023±0.333) a	(8.133±0.244) a	(9.881±0.548) a	(8.283±0.143) a

1) 表中数据为3次重复的平均值;同一列数值后字母相同表示邓肯氏新复极差法检验差异不显著($p<0.05$)。

表5 离体条件下甲酸乙酯对米象成虫 *CarE* 活力的影响¹⁾

药剂浓度/ $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>CarE</i> 的比活力/ $\mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot 30 \text{ min})^{-1}$	抑制率/%
CK	9.245±0.151 d	—
0.01	9.221±0.112 d	0.260
0.1	8.944±0.100 cd	3.256
1	8.696±0.049 c	5.938
10	8.253±0.029 b	10.730
100	7.285±0.136 a	21.201

1) 表中数据为3次重复的平均值;同一列数值后字母相同表示邓肯氏新复极差法检验差异不显著($p<0.05$)。

3 讨论

甲酸乙酯对米象成虫的熏蒸活性结果表明,甲酸乙酯对米象表现出较强的速效性,熏蒸24 h后其 LC_{50} 为28.650 $\mu\text{L/L}$,处理48 h后 LC_{50} 为25.805 $\mu\text{L/L}$ 。乙酰胆碱酯酶(*AChE*)是动物体内广泛存在的在神经兴奋传递过程中起重要作用的一种酶,能通过水解突触间隙的乙酰胆碱,而终止神经兴奋的传导,此酶一旦被抑制达到一定程度时,会使动物过度兴奋而死亡^[13]。测定甲酸乙酯对*AChE*活性的影响,结果表明在15、20 $\mu\text{L/L}$ 的浓度下甲酸乙酯对*AChE*具有显著的抑制活性,且随着药剂浓度的增大和处理时间的延长抑制作用越明显,酶动力学研究表明,甲酸乙酯还可以使*AChE*与底物*ATChI*的亲合力下降,说明甲酸乙酯可能是通过影响了*AChE*的性质从而发挥其杀虫活性的;但是在离体条件下的影响却不显著,表明甲酸乙酯本身可能对*AChE*没有明显的抑制作用,而在米象体内被代谢后的产物却能明显抑制*AChE*的活性。

羧酸酯酶是昆虫体内一种主要的代谢解毒酶,该酶具有广泛的底物专一性和重叠性,能催化水解脂肪族羧酸酯、芳酸酯及相应的硫代酯等多种化合物^[14]。同时,害虫还可以通过大量产生该酶并与杀虫剂结合,使杀虫剂在到达靶标位点之前被阻断或降解。本研究结果表明,甲酸乙酯对米象成虫*CarE*的影响表现为,先抑制后诱导的作用,而*CarE*活性被诱导后将更易降解可以被该酶降解的其他药剂。据谢尊逸等的研究表明^[15],米象对磷化氢产生的抗性与*CarE*无关,所以*CarE*活性的提高不会对磷化氢的药效发挥产生不良影响。从这方面讲,甲酸乙酯可以与磷化氢混用或

轮换使用,但要实际应用还需要进一步研究证明。

参考文献

[1] 翟燕萍,沈美庆,王军,等. 磷化氢熏蒸剂的研究进展[J]. 化学工业与工程,2003,20(4):248-251.

[2] 赵志模. 农产品储运保护学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:1-5.

[3] 胡刚,徐汉虹,胡林. 储粮害虫熏蒸剂和防护剂的研究概况[J]. 安徽大学学报(自然科学版),2001,25(4):94-101.

[4] WRIGHT E J, REN Y L, HARITOS V, et al. Update on ethyl formate: New toxicity data and application procedure [C]// Proceedings of the Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, 2001: 55-56.

[5] VU L T, REN Y L. Natural levels of ethyl formate in stored grains determined using an improved method of analysis [J]. Journal of Stored Products Research, 2004, 40: 77-85.

[6] ALLEN S E, DESMARCHELIER J M. Ethyl formate as a fast fumigant for disinfestations of sampling equipment at grain export terminals [C]// WRIGHT E J, BANKS H J, HIGHLEY E. Proceedings of the 2nd Australian Postharvest Technical Conference. Canberra: CSIRO Entomology, 2000: 82-88.

[7] DAMCEVSKI K A, ANNIS P C. The response of three stored product insect species to ethyl formate vapour at different temperatures [C]// WRIGHT E J, BANKS H J, HIGHLEY E. Proceedings of the 2nd Australian Postharvest Technical Conference. Canberra: CSIRO Entomology, 2000: 78-81.

[8] 白旭光. 储藏物害虫与防治[M]. 北京:科学出版社,2002: 268-269.

[9] ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V J. A new and rapid colorimetric determination of an acetylcholinesterase activity [J]. Biochemical Pharmacology, 1961, 7: 88-94.

[10] WILKINSON G N. Statistical estimations in enzyme kinetics [J]. Journal of Biochemistry, 1961, 80: 324-332.

[11] VAN ASPERN K. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method [J]. Journal of Insect Physiology, 1962, 8: 401-416.

[12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.

[13] 林忠莲,张立力. 磷化氢对谷蠹和玉米象成虫体内乙酰胆碱酯酶的影响[J]. 郑州工程学院学报,2001,22(4):35-41.

[14] 王光峰,张友军,柏连阳,等. 多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶和羧酸酯酶的影响[J]. 农药学报,2003,5(2):40-45.

[15] 谢尊逸,贾宝琦,何凤琴. 米象对磷化氢抗性机理的初步研究[J]. 粮食储藏,1986(4):1-7.