

호랑나비의 용기 동안 조직 내 항산화 효소의 활성

신명자 · 김경근¹ · 임재환 · 정형진² · 서울원*

안동대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹대구산업정보대학 방사선과, ²안동대학교 생명자원과학부 생약자원전공

Received October 28, 2008 / Accepted December 10, 2008

Antioxidant Enzyme Activities in Tissues of *Papilio xuthus* during Pupal Stage. Myung Ja Shin, Kyoung Keun Kim¹, Jae Hwan Lim, Hyung Jin Jeong² and Eul Won Seo*. Dept. of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea, ¹Dept. of radio-technology, Daegu Polytechnic College, Daegu 706-711, Korea, ²School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea - The purpose of this study is to evaluate the activities of five different antioxidant enzymes in various tissues of *Papilio xuthus* during pupal stage. Superoxide dismutase (SOD) activity in haemolymph was the highest just after pupation and then decreased gradually until 7 days after pupation but the activity in other tissue was constant during metamorphosis. This result indicates that primary antioxidant process of reactive oxygen species proceed in haemolymph. Catalase (CAT) activity in studied tissues was also the highest just after pupation and its relative activity was also high during pupal stage, suggesting that CAT is the primary enzyme in catalysis of hydrogen peroxide. Glutathion peroxidase (GPX) activity was constant and its relative activity was very low in all tested tissues. Glutathione S-transferase (GST) activity in haemolymph was high at 3 days and 5 days after pupation, and the activity in fat body was the highest at the 1 day after pupation and then decreased gradually for 7 days after pupation. Glutathion reductase (GR) activity in haemolymph and fat body was high at 1 day after pupation, but relatively low GR activity was detected in the rest tissues. Based on these results, GST activity was higher than that of GPX and GR, and it is also believed that GST was more involved in reduction process through lipid peroxidation than GPX.

Key words : Antioxidant enzyme, tissue, pupal stage, *Papilio xuthus*

서 론

호기성 생물은 호흡을 통해 에너지를 획득하므로 산소는 생명 유지에 절대적으로 필요하다. 그러나 이러한 산소는 각종 물리·화학적 요인에 의해 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환하게 되면 생체에 치명적인 산소 독성을 일으키는 양면성을 지니고 있다. 유리 라디칼이나 활성산소는 체내 대사 과정에서 생성되며 단백질 및 DNA를 변형시키고 생체막을 손상시킴으로써 심각한 세포 손상을 일으키게 된다. 대부분의 곤충은 주로 식물을 먹고 살기 때문에 지속적으로 전산화물에 노출되며[24,25], H₂O₂ 매개성 반응에 의해 쉽게 산화적 손상을 받게 된다[22]. 곤충에서 과산화수소 매개성 지질 과산화 반응이 일어나게 되면 차후 발생과정에 심대한 영향을 미치게 된다[8]. 더구나 활성산소는 유전자 발현, 신호 전달 및 생리 조절 등 세포의 기능을 저해시킨다[7,28]. 따라서 곤충은 활성산소에 대한 방어기구로서 항산화효소를 통해 활성산소의 수준을 일정하게 유지시키고 있다[15]. 곤충에서 전산화물과 항산화물의 평형 조절은 생리적으로 매우 중요해서 결국 곤충의 생존, 성장, 발생, 생식 및 수명에 영향을 미치게 된다[2,20,21].

유리 라디칼과 과산화물은 각종 질병 및 노화에 직접적인 관계가 있는 것으로 밝혀지면서 이에 대한 해결책을 찾기 위해서 척추동물과 식물에 관한 연구는 폭 넓게 진행되고 있다. 곤충의 변태기 초기는 매우 특이한 생리적 휴면상태로서 호흡율이 낮아짐으로 인해 활성산소의 생성도 줄어든다. 그러나 변태기 동안 발생이 진행됨에 따라 내적으로는 유충시기의 조직이 분해되고 성충 조직이 신생되는 매우 복잡하고 엄격히 조절되는 시기이다. 새로운 성충 조직을 형성함에 따라 물질 대사과정도 활발히 진행되며 더불어 활성 산소의 생성도 증가하게 된다. 이 시기에 방출되는 유리 라디칼은 신생 합성되는 조직에 대한 유전자 발현에 영향을 미치기 때문에[7], 최적의 발생과 분화를 위해서는 적절한 세포 내 산화환원 상태가 유지되어야 한다[27]. 곤충의 항산화적 방어체제는 곤충의 발생을 조절하는데 있어 매우 중요하지만 변태기 동안 항산화효소의 활성에 관한 자료는 거의 없는 편이다. 따라서 본 연구는 호랑나비의 용기 동안 혈림프, 지방체, 표피, 큐티클 및 중장내 항산화효소의 활성 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 호랑나비(*Papilio xuthus*)는 대구광역시

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5462, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : ewseo@andong.ac.kr

수성구 매호동 금호강 인근에서 여름형 호랑나비 유충을 채집하여 동정하였다. 이 공시충은 자연 상태와 거의 유사한 조건(광주기 16L : 8D, 온도 27±1°C, 습도 75±5% r.h.)에서 탕자나무(*Poncirus trifoliata*) 잎을 식초로 사육하였고, 발생 시기에 따라 종령기(5L), 전용기(PP), 용화 직후(P0), 용화 1일(P1), 용화 3일(P3), 용화 5일(P5), 용화 7일(P7)의 간격으로 구분하여 시료를 채취하였다.

시료의 추출

발생단계에 따라 공시충으로 부터 혈림프는 미세한 침으로 공시충의 전지를 찌른 후 몸통을 눌러 뽑아내었으며, 암화를 방지하기 위해 소량의 phenylthiourea를 첨가하여 10,000 rpm에서 10 분간 원심분리 후 -70°C에 보관하였다. 지방체, 표피, 큐티클 및 중장 조직은 Ringer 용액하에서 적출하였다. 이 조직은 homogenation buffer (5 mM tris, 38 mM glycine, pH 8.4)하에서 완전히 균질화 시킨 후 15,000 rpm에서 10 분간 원심분리를 한 후 지질층을 제외한 상등액만을 모아 -70°C에 보관하였다.

항산화효소의 활성 측정

Superoxide dismutase (SOD)

superoxide dismutase의 활성은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 M cytochrome C, 50 mM xanthine, 0.1 mM EDTA 및 상기 조직의 추출액이 포함된 용액을 25°C에서 예치한 다음 xanthine oxidase를 첨가하여 반응을 개시하였다[17]. 효소의 활성은 550 nm에서 10초 단위로 150초간 흡광도를 측정하였으며, xanthine oxidase 첨가량은 효소액을 함유하지 않은 반응액의 흡광도 흡수가 분당 0.025가 되도록 조절하였다. 효소의 활성은 cytochrome C의 환원을 50% 억제하는 양을 1 unit로 하여 unit/mg protein/min으로 나타내었다.

Catalase (CAT)

catalase의 활성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml와 시료액 20 µl를 취하고 기질로 10 mM H₂O₂ 용액 1 ml를 가하여 잘 혼합한 후 240 nm에서 흡광도의 변화를 2 분간 측정하였다[1]. 대조실험으로는 기질인 H₂O₂용액 대신에 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)을 가하고 위와 동일한 방법으로 흡광도의 변화를 측정하였다. CAT의 활성은 1 분 동안에 1 µmol의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

Glutathione peroxidase (GPX)

glutathione peroxidase의 활성은 1 mM EDTA가 함유된 100 mM phosphate buffer (pH 7.6)에 0.25 mM GSH, 0.12 mM NADPH가 포함된 반응액을 제조하였으며, 이 반응액에 효소 시료액을 혼합한 후 37°C에서 5 분간 방치한 다음 4 mM cumene hydroperoxide를 60 µl를 가하여 340 nm에서

1 분간 흡광도의 변화를 측정하였다[11]. GPX의 활성은 1 분 동안에 1 nmol의 NADPH를 NADP로 산화하는 효소 양을 1 unit로 하여 표시하였다.

Glutathione S-transferase (GST)

glutathione S-transferase의 활성은 1 mM GSH와 1 mM chlorodinitrobenzene (CDNB)이 함유된 100 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 효소 시료를 넣은 후 340 nm에서 1분간 흡광도의 변화를 측정하였다[14]. GST의 활성은 1 분 동안에 1 nmol NADPH가 산화되는 양을 1 unit로 하였다.

Glutathione reductase (GR)

glutathione reductase의 활성은 1 mM oxidized glutathione (GSSG), 50 µM NADPH가 함유된 100 mM phosphate buffer (pH 7.6)에 효소 시료액을 넣은 후 340 nm에서 3 분간 변화하는 흡광도를 측정하였다[12]. GR의 활성은 1 분 동안에 1 nmol NADPH가 산화되는 양을 1 unit로 하였다.

통계 처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대하여 P<0.05를 유의차가 있는 것으로 간주하고 통계 프로그램 패키지(SPSS Inc., ver. 12.0K)를 이용하였다. 실험 자료에 대한 비교는 ANOVA test를 실시하였고 사후검정은 Duncan test로 각 실험 자료 사이에 유의적인 차이를 조사하였다. 결과는 표준값 ± 표준편차로 나타냈다.

결과 및 고찰

곤충은 다른 동물에 비해 매우 짧은 생활사를 갖고 있으며 산화적 스트레스에 비교적 노출되기 쉬운 생리적 특성을 갖고 있다. 기관계를 통한 호흡으로 인해 산소는 활성을 띤 가스 상태로 직접 조직에 전달되며, 곤충의 먹이인 식물에도 산화적 스트레스를 유도할 수 있는 전산화물이 풍부하다[9]. 또한 곤충의 비행이나 생체 발광 시에는 대량의 에너지가 사용됨으로 이로 인한 관련 조직의 산소 소비량이 급격히 증가함으로서 다량의 활성산소가 생성된다[16]. 이러한 사실은 항산화효소의 활성이 유충기보다는 날아다니는 성충기에 훨씬 높은 수준으로 나타나고[19], 생체 발광을 하는 곤충류는 비발광성 곤충류보다 훨씬 높은 수준의 SOD를 함유하고 있다[18]는 사실로도 뒷받침되고 있다. 이처럼 곤충은 대사적으로 활성을 띤 조직에서 활성산소와 다른 산화제의 과잉생성을 억제하고, 산화적 스트레스를 최소화할 수 있는 정교한 항산화 시스템의 존재가 생명 유지를 위해 필수적이다. 여러 곤충류에서 산화적 물질대사과정을 거치면서 생성되는 초과산화 이온이나 수산화 라디칼등과 같은 반응성이 매우 큰 유리 라디칼의 제거에는 저분자량의 ascorbate, glutathione, tocopherol 및 carotenoids 등과 같은 비효소성의 수

용성 혹은 지용성 항산화제가 매우 중요한 역할을 하고 있으며[6], 유리 라디칼에 의해 세포가 파괴되는 것을 보호하기 위해 다른 진행 생물들과 마찬가지로 항산화 효소를 갖고 있다[2]. 항산화효소의 활성은 유리 라디칼이 생성되는 조직과 발생 시기에 따라 다르게 나타난다. 곤충류에서도 항산화 효소에 관한 연구가 폭 넓게 진행되어 왔으나[2,9,10], 변태기 동안 여러 조직에서 나타나는 항산화 효소의 활성 변화에 관한 연구는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 호랑나비의 종령기 및 용시기 동안 혈림프, 지방체, 표피, 큐티클 및 중장내 SOD, CAT, GPx, GST 및 GR 등 여러 항산화효소의 활성 변화를 조사하였다.

본 연구에서 호랑나비 혈림프에서 SOD와 CAT의 활성은 용화 직후에 가장 높았으며 용후기로 갈수록 점차 감소하고 있다. GST의 활성은 종령기에 비해 용화 1 일에 높은 활성을 보이고 있다. 상대적인 효소의 활성도는 GST가 비교적 높은 활성을 보였으며, GPx와 GR은 매우 낮은 활성을 나타내고 있다(Fig. 1). 지방체에서 SOD와 CAT의 활성은 종령기보다는 전용기에 활성이 감소하지만 용화 직후에는 다시 활성이 증가하는 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 용화 1 일부터 용화가 진행됨에 따라 SOD의 활성은 점차 감소하는 한편 CAT의 활성은 감소한 후 용말기로 갈수록 다시 증가하는 상반된 결과를 나타냈다. GST의 활성은 용화 1 일에 가장 높은

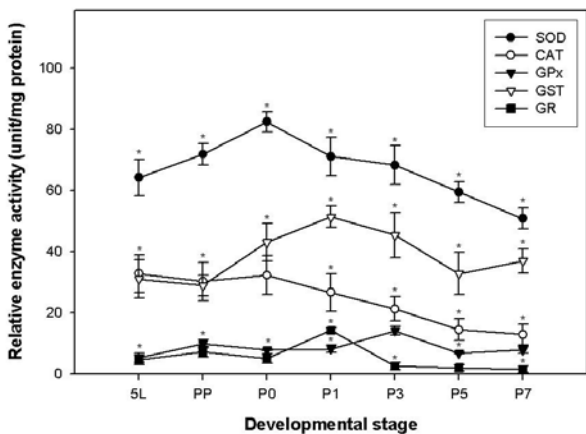


Fig. 1. SOD and CAT, GPx, GST and GR activity of haemolymph during metamorphosis of *Papilio xuthus*. In haemolymph, activities of SOD and CAT were the highest in the just after pupal stage and showed the similar pattern of gradual decrease in the activity from 1 day after pupal stage to 7 days after pupal stage. GST and GR showed the highest level of activity at 1 day after pupal stage, and the GPx showed the highest level of activity at 3 days after pupal stage. Symbols are mean values±SE from 7 independent experiments. **p*<0.05 as compared to antioxidant enzyme. (5L, 5th instar larval stage; PP, prepupal stage; P0, just after pupal stage; P1, 1 day after pupal stage; P3, 3 days after pupal stage; P5, 5 days after pupal stage; P7, 7 days after pupal stage)

활성을 보인 후 용말기로 감에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 GPx와 GR의 활성은 매우 낮게 나타났다(Fig. 2). 표피 내 SOD와 CAT의 활성은 용화가 진행됨에 따라 점차 증가하는 경향을 나타냈으며, GST의 활성은 발생 시기에 따라 변이의 진폭이 심해 전용기와 용화 1 일 및 용화 5 일에 높은 활성을 보여주고 있다. 그러나 GPx와 GR의 활성은 매우 낮게 나타났으며 전 시기에 걸쳐 활성의 변화는 거의 없었다(Fig. 3). 큐티클의 SOD와 CAT의 활성은 전 시기에 걸쳐 거의 일정하게 유지되고 있다. GST의 활성은 용화 직후에 가장 높았으며 GPx와 GR의 활성은 매우 낮고 전 시기에 걸쳐 일정하게 유지되고 있다(Fig. 4). 장 내 SOD와 CAT의 활성은 종령기에 비해 용화직후에 높았으며 용화 3 일 이후 SOD의 활성은 점차 감소하나 CAT의 활성은 증가하는 상반된 경향을 보여주고 있다. GST의 활성은 전용기 이후 용말기로 감에 따라 점차 감소하는 경향을 보이고 있으며 GPx와 GR의 활성은 변태기 동안 매우 낮게 유지되고 있다(Fig. 5).

곤충의 발생과정에서 SOD의 활성은 활발한 대사과정에 따라 급격히 증가되는 superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$)의 독성작용을 감소시키려는 방어 시스템이 작동함으로써 증가된다[4,23]. 또한 변태기의 대사활동은 처음에는 감소했다가 후기에 다시 증가하는 특징이 있는데, 이것은 곤충 변태 과정의 생리적 특성과 관련이 있다. 즉 용화 직후에는 유충조직이 분해될 때 해당작용 등의 무기호흡을 주로 하고, 용화 후기에 조직이 합성될 때에는 호기성 호흡을 하는 생리적 특징을 갖게 되는데, 이는 기관지의 발달과도 연관되어 있으며[26], 곤충

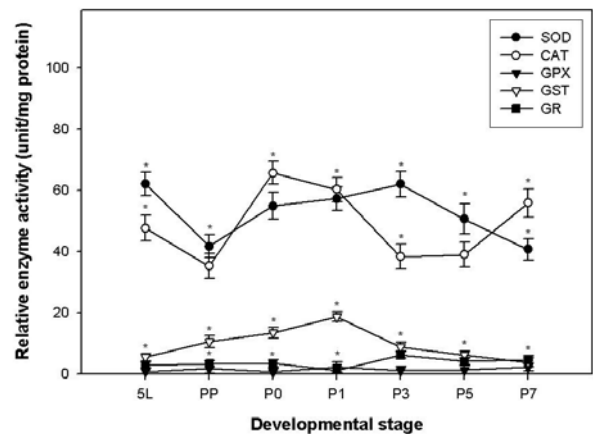


Fig. 2. SOD and CAT, GPx, GST and GR activity of fat body during metamorphosis of *P. xuthus*. In fat body, activity of SOD and CAT showed a similar pattern until the just after pupal stage, and from 1 day after pupal stage, the SOD decrease while CAT decreased then increased, displaying different patterns. GST and GPx showed the highest level of activity at 1 day after pupal stage, and the GR showed the highest level of activity at 3 days after pupal stage. Symbols are mean values±SE from 7 independent experiments. **p*<0.05 as compared to antioxidant enzyme.

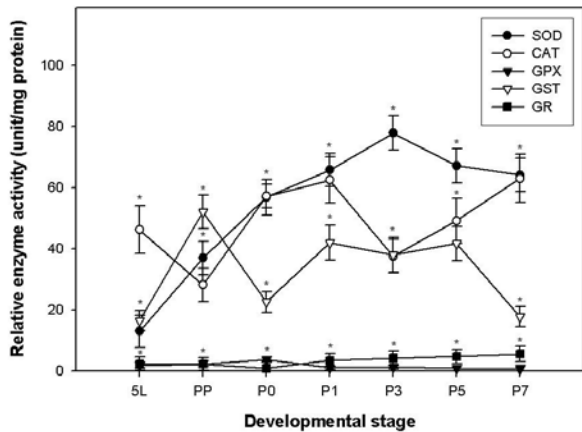


Fig. 3. SOD and CAT, GPx, GST and GR activity of epidermis during metamorphosis of *P. xuthus*. In epidermis, SOD and CAT activities showed similar activities of increasing until 1 day after pupal stage. GST showed high level of activity at the just after pupal stage, 1 day after pupal stage, and 5 days after pupal stage, but the activity of GPx and GR showed only slight changes in their relative enzyme activity. Symbols are mean values±SE from 7 independent experiments. * $p < 0.05$ as compared to antioxidant enzyme.

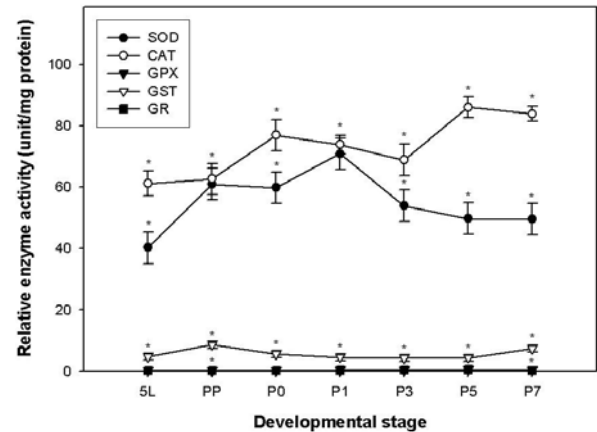


Fig. 5. SOD and CAT, GPx, GST and GR activity of mid-gut during metamorphosis of *P. xuthus*. In mid-gut, SOD and CAT activity showed similar pattern of increasing from the 5th instar larval stage to 1 day after pupal stage. GST showed the highest level of activity in the prepupal stage and 7 days after pupal stage, and the activity level of GPx and GR were very low. Symbols are mean values±SE from 7 independent experiments. * $p < 0.05$ as compared to antioxidant enzyme.

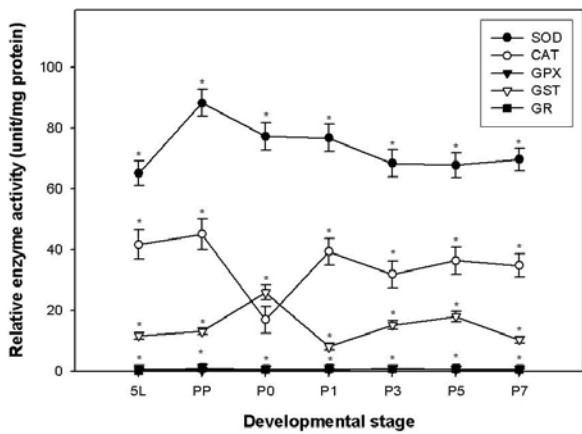


Fig. 4. SOD and CAT, GPx, GST and GR activity of cuticle during metamorphosis of *P. xuthus*. In cuticle, SOD and CAT showed a high level of activity in the prepupal stage, and displayed similar pattern of decreasing or maintaining a consistent level throughout pupation. GST showed the highest level of activity at the just after pupal stage, and the GPx and GR showed minimum activity throughout the testing period. Symbols are mean values±SE from 7 independent experiments. * $p < 0.05$ as compared to antioxidant enzyme.

의 변태기 동안 일어나는 조직의 분해와 합성과정 동안 생성되는 활성산소의 제거에는 SOD가 직접적으로 관여한다[23]. 본 연구에서도 대사과정이 활발한 종령기에 SOD의 활성이

높게 나타났으며, 혈림프와 장 조직의 경우 다른 조직에 비하여 SOD의 활성이 높게 나타났다. 이는 생성된 활성산소가 직접 방출되거나 먹이의 소화 과정 혹은 전산화물에 포함된 활성산소에 대하여 독성작용을 감소시키려는 방어 작용에 따라 활성이 높은 것으로 생각된다. catalase는 H₂O₂의 생성 분해에 관여하며 세포 소기관인 peroxisome에 주로 존재하고 있으며, H₂O₂가 과량으로 존재할 때 SOD에 의해 생성된 2 분자의 H₂O₂를 H₂O로 만들어주는 역할을 한다. 따라서 세포의 물질 대사 과정에서 생성되는 산화력이 강한 H₂O₂는 CAT에 의해 빠르게 분해됨으로써 갑작스런 H₂O₂의 축적이나 산화적 손상이 일어나지 않게 된다. 본 연구에서 SOD와 CAT의 활성은 혈림프, 큐티클에서는 용화기로 진행됨에 따라 활성이 감소하는 경향을 나타냈다. 이것은 SOD 활성이 낮아지므로 인해 세포내의 H₂O₂의 농도가 낮아지고 동시에 CAT의 활성도 낮게 조절된 것으로 생각된다. 또한 지방체와 표피 및 장에서는 용화 3 일을 기점으로 SOD와 CAT의 활성이 상반된 결과를 나타냈다. 이것은 증가된 SOD 활성으로 생성된 H₂O₂가 CAT가 아니라 GPx와 같은 다른 효소를 통하여 H₂O로 전환될 것으로 생각된다. 더불어 SOD 활성에 비하여 CAT 활성은 상당히 안정적인 양상을 보였는데 이것은 SOD에 의해 일차적으로 항산화 작용이 나타나지만 SOD 작용의 부산물로 생성된 H₂O₂ 역시 상당한 산화력을 갖고 있기 때문에 이에 대한 대비책으로 CAT의 활성이 일정하게 유지되는 것으로 보인다.

활성산소와 같은 유리 라디칼의 제거에는 SOD나 CAT 외

에도 glutathione을 이용하여 GPX와 GST 및 GR 등과 같은 항산화 효소가 과산화수소나 수산화 라디칼뿐만 아니라 지질 과산화과정 중에 생성되는 peroxy 라디칼의 제거에 관여하고 있다[3]. 지질 과산화반응은 일련의 연쇄반응으로 lipid peroxy radical이 형성되면, 이는 기타의 지질분자와 반응하여 lipid hydroperoxide와 기타의 LOO[·] radical이 형성되며 이러한 연쇄반응은 지속적으로 일어나게 된다. 이러한 연쇄반응으로 연쇄 중지 항산화제가 이 반응을 정지시키지 않는 한 수천 번이고 반복적으로 일어나 수많은 불포화 지방산을 파괴하게 되며 결국 세포막은 파괴된다. 이러한 지질과산화반응을 통해 막 유동성의 손실, 선택적 투과성의 손실, 막을 통한 aldehyde의 세포소기관 침투, 유기 라디칼과 단백질의 결합으로 인한 lipofuscin의 형성, 산화된 지질생성물의 수많은 효소 기능 억제 및 DNA와 작용하여 DNA 부가 생성물을 형성하게 된다[15]. 곤충류에서 GST의 활성은 *Trichoplusia ni*와 *Spodoptera eridania* 등에서 매우 높게 나타났는데[5,13], 본 연구에서도 GPX와 GR의 활성은 매우 낮은 반면 GST의 활성은 전 조직에서 비교적 높게 나타나고 있다. 이러한 사실은 지질 과산화반응을 통한 항산화 과정에 GPX보다는 주로 GST가 관여할 것으로 생각된다. 더불어 GST는 GPX와 유사하게 lipid hydroperoxides의 환원반응을 촉매 하지만, 곤충은 일반적인 해독 효소인 GPX가 결여되어 있거나 활성이 거의 없기 때문에 직접적으로는 H₂O₂를 제거할 수 없는 것으로 알려져 있으므로[5] GPX를 대신할 수 있는 또 다른 독성 제거 경로가 GST를 통해 이루어지는 것으로 사료된다. *Musca domestica*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera eridania*에서 측정된 GPX의 활성치는 평균 2-12 unit/mg protein인 것으로 보고되어 있는데[5], 본 연구에서도 호랑나비 조직으로부터 측정된 GPX의 활성치의 평균값이 1-15 unit/mg protein로 나타나고 있어 상기의 곤충류와 비슷한 활성을 보여주고 있지만 GR을 제외한 다른 항산화효소의 활성에는 거의 미치지 못하고 있으며 발생 시기에 따른 특이한 양상도 나타내지 않고 있다. 또한 CAT 활성과 비교해 보면 거의 모든 조직에서 GPX의 활성이 매우 낮게 나타나기 때문에, SOD의 작용으로 생성된 H₂O₂는 거의 전적으로 CAT에 의해 H₂O로 전환되는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 호랑나비의 용기 동안 혈림프, 지방체, 표피, 큐티클 및 중장에서 항산화효소의 활성을 조사하였다. 혈림프와 지방체에서 항산화효소 활성의 변화가 두드러지게 나타났다. SOD, CAT 및 GST의 활성은 높은 활성을 보인 반면, GPX와 GR은 상대적으로 활성이 매우 낮으므로 곤충의 변태기 동안 항산화과정에서 이들 효소의 역할은 매우 미미할 것으로 생각된다. 더불어 CAT의 활성은 대부분의 조직에

서 용화 직후에 높은 활성을 보이며 상대적인 활성도 매우 높게 나타나고 있어 과산화수소의 분해에는 GPX보다는 CAT가 주로 관여할 것으로 생각된다. 또한 GPX와 GR의 활성보다는 GST의 활성이 전 조직에서 비교적 높게 나타나는 것으로 보아 lipid peroxidation을 통한 항산화 과정에도 GPX보다는 주로 GST가 관여할 것으로 생각된다.

References

1. Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*, pp. 121-126, In Packer, L. (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 105, Academic Press Inc., NewYork.
2. Ahmad, S. 1992. Biochemical evidence of pro-oxidant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 269-296.
3. Ahmad, S. 1995. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. pp. 38-272, Chapman and Hall, NewYork.
4. Ahmad, S., C. A. Pritsos, S. M. Bowen, C. R. Heisler, G. J. Blomquist, and R. S. Pardini. 1988. Subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in the southern army worm, *Spodoptera eridania*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 7, 173-186.
5. Ahmad, S., M. A. Beilstein, and R. S. Pardini. 1989. Glutathione peroxidase activity in insects: A reassessment. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 12, 31-49.
6. Barbehenn, R. V. and J. Stannard. 2004. Antioxidant defense of the midgut epithelium by the peritrophic envelope in caterpillars. *J. Insect Physiol.* 9, 783-790.
7. Dalton, T. P., H. G. Shertzer, and A. Puga. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 67-101.
8. Downer, R. G. H. 1985. Lipid metabolism, pp. 77-113, In Kerkut, G. A. and L. I. Gilbert (eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. 10, Pergamon Press, Oxford.
9. Felton, G. W. 1995. Antioxidant defenses of invertebrates and vertebrates, pp. 356-434, In Ahmad, S. (ed.), *Oxidative stress and Antioxidant Defenses in Biology*, Chapman and Hall, NewYork.
10. Felton, G. W. and C. B. Summers. 1995. Antioxidant systems in insect. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 187-197.
11. Flohe, L., A. Wolfgang, and W. A. Gunzler. 1984. Assay of glutathione peroxidase, pp. 105-114, In Packer, L. (ed.), *Methods in enzymatic analysis*, Academic Press Inc., New York.
12. Glatzle, D., J. P. Vuilleumier, F. Weber, and K. Decker. 1974. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia.* 30, 665-668.
13. Grubor-Lajsic, G., W. Block, M. Telesmanic, A. Jovanovic, D. Stevanovic, and F. Baca. 1997. Effect of cold acclimation on the antioxidant defense system of two larval Lepidoptera. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 36, 1-10.

14. Habig, W. H. and W. B. Jakoby. 1981. Glutathione s-transferase in rat and human. *Meth. Enzymol.* **77**, 218-231.
15. Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1985. *Free radicals in biology and medicine*. pp. 323, Oxford University Press, London.
16. Krogh, A. and T. Weis-Fogh. 1951. The respiratory exchange of desert locust (*Schistocerca gregaria*), before, during and after flight. *J. Exp. Biol.* **28**, 342-257.
17. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte protein (Hemocuprotein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
18. Neto, P. C., E. J. H. Bechara, and C. Costa. 1986. Oxygen toxicity aspects in luminescent and non-luminescent elaterid larvae. *Insect Biochem.* **16**, 381-385.
19. Nickla, H., J. Anderson, and T. Palzkill. 1983. Enzymes involved in oxygen detoxification during development of *Drosophila melanogaster*. *Experientia.* **39**, 610-612.
20. Orr, W. C. and R. S. Sohal. 1994. Extension of life-span by over expression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**, 1128-1130.
21. Pardini, R. S. 1995. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidant. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**, 101-118.
22. Peric-Mataruga, V., D. Blagojevic, M. B. Spasic, J. Ivanovic, and M. Jankovic-Hladni. 1997. Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. *J. Insect Physiol.* **43**, 101-106.
23. Peters, L. D. and D. R. Livingstone. 1996. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. *J. Fish Biol.* **49**, 986-997.
24. Pritsos, C. A., S. Ahmad, S. M. Bowen, A. J. Elliott, G. J. Blomquist, and R. S. Pardini. 1988. Antioxidant enzymes of the black swallowtail butterfly, *Papilio polixenes* and their response to the prooxidant allelochemical quercetin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **8**, 101-112.
25. Pritsos, C. A., S. Ahmad, A. J. Elliott, and R. S. Pardini. 1990. Antioxidant enzyme levels response to prooxidant allelochemicals in larvae of southern armyworm moth, *Spodoptera eridania*. *Free Radical Res. Commun.* **9**, 127-133.
26. Riddiford, L. M. and M. Hori. 1985. Hormone action at the cellular level, pp. 37-84, In Kerkut, G. A. and L. I. Gilbert (eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Vol. **8**, Pergamon Press, Oxford.
27. Schafer, F. Q. and G. R. Buettner. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biol. Med.* **30**, 1191-1212.
28. Suzuki, Y. J., H. J. Forman, and A. Sevanian. 1997. Oxidant as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biol. Med.* **22**, 269-285.