

基础知识

细胞色素 P450 介导抗性的进化可塑性*

邱星辉** 李梅 何凤琴

(中国科学院动物研究所 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室 北京 100101)

Evolutionary plasticity of cytochrome P450 mediated insecticide resistance. QIU Xing-Hui**, LI Mei, HE Feng-Qin (State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Cytochrome P450 in insects is a supergene family. Increased detoxification of insecticides mediated by cytochrome P450s was proved to be an important and common mechanism of insecticide resistance. Recently, several studies have shown that insecticide resistance appears to evolve using different P450s or/and more than one P450 isoforms, and possibly different regulatory factors controlling P450 expression, even in insect strains selected with the same insecticide, indicating that the cytochrome P450 monooxygenases have some degree of plasticity in response to insecticide pressure:

Key words Cytochrome P450, insecticide resistance, evolutionary plasticity

摘要 细胞色素 P450 是超基因家族, 由其介导的杀虫剂代谢解毒的增强是昆虫产生抗药性的普遍而主要的机制。近年的研究表明, 细胞色素 P450 介导的代谢抗性表现出一定程度的进化可塑性: 即使是同种昆虫的不同种群在相同种类杀虫剂的胁迫下, 进化选择出的抗性相关的细胞色素 P450 也有所不同, 抗性的产生也可以是几种不同细胞色素 P450 协同作用或控制 P450 表达的调控因子的不同。

关键词 细胞色素 P450, 杀虫剂抗性, 进化可塑性

化学农药的使用导致了昆虫抗药性的产生, 至今, 已发现有 500 多种昆虫对不同类型的杀虫剂产生了抗药性^[1]。昆虫的抗药性已成为当今农业害虫和虫媒疾病(如霍乱、登革热)控制工作的一大障碍^[2]。由抗性引发的诸如农药使用次数和剂量增加、作物产量降低、环境污染以及虫媒人畜疾病的流行等问题已给人类带来巨大损失^[2]。杀虫剂作为人为的环境胁迫因子, 选择出能在农药使用环境中存活的抗性昆虫种群, 而且抗性昆虫携带的抗性基因能在昆虫种群中甚至在全世界范围内传播, 抗性因此是生物进化的一个特征。杀虫剂抗性的进化为进化生物学家提供了理想的模型系统来研究新的适应是如何快速获得的^[3]。

多年来的研究结果表明, 昆虫产生抗药性有不同的机制, 已公认的抗性机制包括: 穿透表

皮的杀虫剂量的减少、昆虫对杀虫剂代谢作用的增强(代谢抗性)以及靶标部位敏感性的降低(靶标抗性)等^[4]。近 10 年来, 随着遗传学、分子生物学和基因组学的发展, 人们对昆虫抗药性机制的研究已深入到分子水平。根据现有的研究结果, 以产生抗性的分子机制来看, 可以将昆虫抗药性的进化分为两种类型, 即简单保守的靶标抗性和复杂多变的代谢抗性。

杀虫剂靶标的研究揭示了靶标抗性进化的简单模式。研究发现所有 3 个主要的杀虫剂靶标位点(配体门控离子通道、电压门控离子通道、乙酰胆碱酯酶)都带有自然存在的导致抗性

* 国家自然科学基金资助项目(30671383)和北京市自然科学基金项目(5062026)资助。

** 通讯作者, E-mail: qixh@ioz.ac.cn

重登收稿日期: 2007-06-07, 接受日期: 2007-07-10

的氨基酸替换,靶标的单个氨基酸替换就足以使昆虫产生抗药性^[4]。比较研究还发现,不同种类的抗性昆虫,其靶标抗性表现为同源基因的相似位点发生变异^[4],表明单基因在昆虫对杀虫剂抗药性中起着重要的作用,体现了靶标抗性基因进化的保守性与趋同性。靶标位点突变的保守性与趋同性可以解释为靶标在抵抗杀虫剂的同时,还需保持它们各自的野生功能,因此这些重要的受体或酶仅能忍受有限数量的氨基酸取代^[4]。

相对而言,细胞色素 P450 介导的代谢抗性则要复杂得多^[4],这是因为:(1)代谢抗性涉及的酶往往属于多基因家族^[5],酶的种类表现出极大的多样性。例如,基因组测序结果表明果蝇 *Drosophila melanogaster* 中存在 90 种不同的细胞色素 P450^[6],冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 基因组中含 111 个 P450 基因^[5];(2)总体来看昆虫细胞色素 P450 的底物谱广,不同细胞色素 P450 之间往往存在一定程度的底物相似性或重叠性,在功能上表现一定程度的冗余,使得某种 P450 因防御需要用于代谢杀虫剂而产生抗药性的同时,其它 P450 可以替代该 P450 所发挥的正常的代谢作用^[4];(3)代谢相关酶的表达调控机制也更加复杂,可能涉及到结构基因的改变、调控基因的变化或转座子的作用等^[3,4]。

细胞色素 P450 酶系的结构功能特征赋予了其介导的昆虫抗药性的两大特征:一是其普遍性,研究表明 P450 介导的杀虫剂代谢解毒作用的增强是昆虫产生抗药性的普遍机制,也往往是大多数重要害虫对杀虫剂产生高水平抗性和交互抗性的主要原因^[2,3];二是其进化的可塑性(plasticity)或称生物适应性^[7],表现为,即使面对同一种杀虫剂选择压,昆虫进化选择出的与抗性有关的细胞色素 P450 也可能不同^[7],而且导致抗性的细胞色素 P450 可能不止一种^[8,9]。

细胞色素 P450 介导的抗性进化的可塑性在果蝇和家蝇 *Musca domestica* 中得到了体现。

果蝇对 DDT 的抗性 DDT 是一种广谱的有机氯杀虫剂,果蝇已对其产生了抗药性。通过

用包含所有 90 个果蝇细胞色素 P450 基因的微阵列(microarray)来分析不同的细胞色素 P450 的转录表达,发现采自全世界不同地区的抗性果蝇品系,只有一个 P450(即 *Cyp6g1*)在抗性种群中过量表达,其过量转录表达已用定量 RT-PCR 证实^[10]。用过量表达 *Cyp6g1* 的转基因果蝇为材料,证实了 *Cyp6g1* 的过量表达足于使果蝇产生对 DDT 的抗性,充分证明果蝇对 DDT 抗性是由于 P450 *Cyp6g1* 基因过量表达的结果^[10]。Pedra 等发现自然选择和实验室人为选择的 DDT 抗性品系果蝇都表现出 *Cyp6a2*, *Cyp12d1*, *Cyp6g1*, *Cyp6w1* 基因的过量表达^[8]。Le Goff 等用微阵列技术检验了用 DDT 进一步筛选的实验室品系果蝇的抗性的分子基础,发现过量表达 *Cyp6g1* 的田间品系果蝇在实验室用 DDT 连续汰选后,第 2 个基因(*Cyp12d1*)被选择出来,表现为 *Cyp6a2*, *Cyp12d1* 共同在同一个果蝇种群中过量表达。当用重组的方法将原田间品系的 *Cyp6g1* 抗性等位基因敲除后,再在实验室中用 DDT 继续汰选,则选择出另一个不同的基因 *Cyp6a8*^[12]。

果蝇为应对 DDT 农药的压力选择出不同的抗性细胞色素 P450,但不同的细胞色素 P450 的底物特异性可能不同,这种差异有可能赋予生物体不同的进化意义。*Cyp6g1* 在野外抗性种群果蝇中普遍过量表达,提示 *Cyp6g1* 可能具有独特的性质。研究发现过量表达 *Cyp6g1* 的果蝇对许多不同类型的杀虫剂,包括 DDT、新烟碱类化合物、有机磷和昆虫生长调节剂如苯甲酰苯基脲(lufenuron),表现出抗性^[1,10,12],*Cyp6g1* 凭借其对不同杀虫剂广谱的交互抗性而在自然条件下被优先选择,而过量表达其它种类细胞色素 P450(如 *Cyp6a8*)的果蝇种群则表现出较窄的交互抗性谱^[12]。

杀虫剂抗性相关的细胞色素 P450 的表达调控也可能存在差异。对 DDT 表现抗性 Rst(2) DDT^{wiscorsin} 品系果蝇,其 *Cyp6g1* 为组成型过量表达,其表达不被 DDT 所诱导,而 *Cyp12d1* 表现为组成型过量表达,同时也可被 DDT 诱导。

果蝇对苯甲酰苯基脲(lufenuron)的抗性
苯甲酰苯基脲是一种昆虫生长调节剂类杀虫剂,通过破坏昆虫幼虫的几丁质而合成发挥杀虫作用。果蝇对苯甲酰苯基脲的抗性最初在美国发现,研究表明其抗性是由于 *Cyp6g1* 基因的上调表达的结果^[10]。Bogwitz 等对澳大利亚的一个自然种群果蝇(NB16)的研究中发现,另一种线粒体细胞色素 P450(*Cyp12a4*)的上调表达导致对苯甲酰苯基脲的抗性^[11]。*Cyp12a4* 与 *Cyp6g1* 有所不同,在自然种群中, *Cyp12a4* 超量表达的果蝇较少,这可能是因为果蝇缺乏普遍接触苯甲酰苯基脲的机会。另外, *Cyp12a4* 超量表达的果蝇不表现出对其它测定的三种不同类型杀虫剂的抗性^[11],表现出较窄的底物谱。

家蝇对拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性 家蝇由 P450 介导的抗性研究的一个范例是美国 Cornell 大学 Scott JG 教授实验室对多抗性 LPR 品系家蝇抗性机制的研究,他们充分证明了 LPR 品系家蝇对拟除虫菊酯的抗性是 *CYP6D1* 超量表达的结果^[2]。随着研究的展开,发现 *CYP6D1* 并不是拟除虫菊酯的抗性相关的唯一的细胞色素 P450。Kamiya 等分析了从日本采集的拟除虫菊酯的抗性品系(YS, YPER, Hachinohe)家蝇的 P450 基因的表达,发现抗性家蝇同时表现出多个 P450 (*CYP6D1*, *CYP6D3v2*, *CYP6A24*)的超量表达^[13]。最近 Scott 和 Kasai 比较了来自日本和美国等不同地区、用同种杀虫剂(氯菊酯)选择的 4 个家蝇品系(YPER, LPR, ALHF, NG98)的抗药性的分子机制,发现不同品系家蝇与抗性相关的细胞色素 P450 位于家蝇不同的染色体上,为种类不同的细胞色素 P450^[7]。这些研究结果也表明,面对相同的杀虫剂选择压,家蝇进化选择出的抗性 P450 也有所不同,同一家蝇种群进化出的抗性相关的细胞色素 P450 可以有多种。抗药性与不同种类的 P450 相关,预示不同品系的家蝇具有不同的抗性与交互抗性模式^[7]。

从以上事例中我们看到,不同种类的昆虫,

由 P450 介导的对不同类型的杀虫剂抗性的进化表现出一定程度的可塑性。不同的细胞色素 P450 可被昆虫弹性地选择以应对环境的变化^[7],不同种类的杀虫剂可能选择出相同的细胞色素 P450,同种杀虫剂可能选择出不同的细胞色素 P450。P450 介导抗性进化的可塑性现象新近才被发现,事例在不断增加,其原因及生物学意义引起了人们的兴趣。至今,还有许多相关的科学问题没有得到阐明,比如抗性相关细胞色素 P450 基因的选择是随机的吗?不同的抗性 P450 之间在结构、功能和调控机制有什么异同?昆虫选择不同的抗性 P450 有什么进化生物学启示?这些问题将成为昆虫抗药性研究的一个热点。通过对这些问题的回答有利于更新我们对生物适应进化规律的认识,也将为害虫的有效防治提供重要的参考。

参 考 文 献

- 1 Derholm I., Devine G. J., Williamson M. S. *Science*, 2002, **297**(5 590): 2 222~ 2 223
- 2 Scott J.G., Wen Z. *Pest Manag. Sci.*, 2001, **57**(10): 958~ 967.
- 3 Oakeshott J. G., Horne I., Sutherland T. D., Russell R. *Gen. Biol.*, 2003, **4**(1): 202
- 4 Ffrench-Constant R. H., Daborn P. J., Goff J. L. *Trends Gen.*, 2004, **20**(3): 163~ 170
- 5 Ranson H., Claudianos C., Orrelli F., et al. *Science*, 2002, **298**(5 591): 179~ 181.
- 6 Tijet N., Helvig C., Feyereisen R. *Gene*, 2001, **262**(1~ 2): 189~ 198
- 7 Scott J. G., Kasai S. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2004 **78** (3): 171~ 178.
- 8 Pedra J.H., Mchtyre L.M., Scharf M.E., Pittendrigh B.R. *PNAS*, 2004, **101**(8): 7 034~ 7 039.
- 9 Brandt A., Schaff M., Pedra J. H., et al. *Insect Molec. Biol.*, 2002, **11**(4): 337~ 341.
- 10 Daborn P. J., Yen J. L., Bogwitz M., et al. *Science*, 2002, **297**(5 590): 2 253~ 2 256.
- 11 Bogwitz M. R., Chung H., Magoc L., et al. *PNAS*, 2005, **102**(36): 12 807~ 12 812
- 12 Le Goff G., Boundy S., Daborn P. J., et al. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2003, **33**(7): 701~ 708
- 13 Kamiya E., Yamakawa M., Shono T., Kono Y. *Appl. Entomol. Zool.*, 2001, **36** (2): 225~ 229