



乔宪凤, 王康, 彭雄, 张晓赫, 陈茂华. CPR 和 P450 基因在昆虫抗药性中的作用研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2023, 45 (4): 862–870.

CPR 和 P450 基因在昆虫抗药性中的作用研究进展

乔宪凤¹, 王康², 彭雄², 张晓赫², 陈茂华^{2*}

(1. 西北农林科技大学图书馆, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学植保学院/作物抗逆与高效生产全国重点实验, 陕西杨凌 712100)

摘要: P450 酶系在昆虫代谢农药中有重要作用, NADPH-细胞色素 P450 还原酶 (NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR) 和细胞色素 P450 (P450) 在该酶系起核心作用。昆虫具有 P450 超基因家族, 但只有一个单一的 CPR 基因, CPR 是昆虫所有参与农药代谢的 P450 酶的唯一电子供体, 其影响 P450 活性。P450 基因的高水平表达在害虫抗药性中具有重要作用, P450 基因介导的昆虫抗药性是最重要的代谢抗性类型。不同 P450 基因的高表达的调控机制不同, 引起 P450 基因过量表达的原因可能有 P450 基因的编码区突变、顺式作用元件和反式作用因子变化、基因扩增等。细胞色素 P450 介导的抗药性存在一定程度的进化可塑性, 即同种昆虫不同种群对相同的农药产生抗药性时, 导致抗性产生的 P450 基因不同; 同一昆虫品系在某种农药的抗性选择压力下, 影响抗性的 P450 基因的种类和表达特性会随着持续的农药选择而发生变化。最近的研究显示, CPR 的变异和昆虫抗药性相关, 但是昆虫 CPR 基因介导抗药性的机制还缺乏深入研究。全面阐释 P450 酶系介导昆虫抗药性的机制、建立基于 P450 基因表达量变化与 CPR 突变的抗性分子标记, 对于害虫抗药性治理具有重要意义。

关键词: P450; CPR; 昆虫抗药性; 表达调控; 突变; 过表达; 进化可塑性

中图分类号: Q963; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2023) 04-0862-09

The roles of CPR and P450 genes in the resistance of insects to insecticides

QIAO Xian-Feng¹, WANG Kang², PENG Xiong², ZHANG Xiao-He², CHEN Mao-Hua^{2*}

(1. University Library of Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China;

2. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Area/College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract: The cytochrome P450 monooxygenase (P450) system is involved in the detoxification and metabolism of insecticides in insects. NADPH-cytochrome P450 reductase (CPR) and the cytochrome P450 monooxygenases (P450s) are the main and key parts of the system. P450 is a super gene family, whereas there is only one CRP gene in insects. CPR is the only electron donator of all insect P450s that metabolize insecticides, and affects the activity of the P450s. The overexpression of P450 genes play important role in insecticide resistance of insects. The regulation mechanisms for P450 gene overexpression varied in different insects, including mutation in gene coding region, trans-regulation, cis-regulation, gene amplification and so on. There is evolutionary plasticity for P450-mediated insecticide resistance, i. e., varied P450 genes could contribute to the resistance of different populations of one insect species to a same insecticide; P450 gene expression pattern and gene type could change in a insect species under the a

基金项目: 国家自然科学基金 (31972263, 32172407); 陕西省重大科技专项 (2020zdzz03-03-02); 科技部对发展中国家援助项目 (KY202002018)

作者简介: 乔宪凤, 女, 黑龙江鸡西人, 硕士, 副研究员, 研究方向为动物生物技术, E-mail: qiaoxianfengzi2001@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 陈茂华, 男, 博士, 教授, 研究方向为害虫抗药性, E-mail: maohua.chen@nwsuaf.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-03-22; 接受日期 Accepted: 2022-12-01

insecticide selection pressure. Previous reports have found that CPR is a vital part of P450-mediated insecticide resistance, but the mechanisms are not known. The comprehensive understanding of mechanisms for the P450-mediated insecticide resistance as well as the development of molecular markers for insecticide resistance monitoring based on the P450 gene expression and CPR gene mutations is important for insecticide resistance management of pest insects.

Key words: P450; CPR; insecticide resistance; expression regulation; mutation; overexpression; evolutionary plasimity

细胞色素 P450 酶系是一种非常重要的氧化酶系, 其主要包括细胞色素 P450 (Cytochrome P450, P450)、CPR (Cytochrome P450 reductase, CPR)、细胞色素 b5 (Cytochrome b5)、NADH-细胞色素 b5 还原酶 (Nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductase) 以及磷脂 (Phospholipid) 等, 其中细胞色素 P450 和 CPR 在该酶系起中心作用。细胞色素 P450 酶系广泛存在于自然界所有需氧有机体中, 其在生物个体代谢内源化合物 (如类固醇、脂肪酸和激素等) 和外源化合物 (如农药、药物、环境污染物、植物毒素等) 中起重要作用 (Pandey and Fluck, 2013)。

作为细胞色素 P450 酶系的核心组成部分, CPR 与 P450 形成一个电子传递链, CPR 将电子传递给 P450 后, P450 才能与农药等化合物发生氧化还原反应。昆虫和其他动物 P450 基因是一个超大基因家族, 包含多个 P450 基因, 这些 P450 可分为微粒体型和线粒体型 P450, 但是真核生物代谢外源物质的 P450 主要是依赖于 CPR 的微粒体 P450。动物体内只有一个 CPR, 因为 CPR 是 P450 唯一的电子供体, 所以这个单一的 CPR 必然与多种不同的 P450 相互作用, 因此, CPR 在 P450 活性反应及代谢化合物中起到限速因子的作用, 即单一的 CPR 控制所有的 P450 的代谢速度与代谢能力, CPR 的突变会显著影响 P450 的代谢能力 (Pandey and Fluck, 2013)。大量的研究表明, CPR 基因突变是影响人类 P450 代谢药物和环境有毒物质的重要因素 (Liang *et al.*, 2017), CPR 基因突变及遗传多态性对人类药物代谢的影响相关研究非常深入 (Agrawal *et al.*, 2008; Hart *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2017), 然而, 有关 CPR 基因突变影响害虫对农药的代谢抗性的研究较为薄弱。本文总结了 P450 基因高表达介导昆虫对杀虫剂抗性的调控机制、P450 基因介导的昆虫抗药性进化可塑性、CPR 基因在害虫

抗药性中的作用、CPR 基因遗传多态性对 P450 代谢能力的影响, 旨在为深入研究害虫抗药性机制和进行害虫抗药性治理提供依据。

1 P450 基因高表达介导昆虫对杀虫剂抗性的调控机制

大量研究显示, P450 基因的过量表达导致昆虫对不同农药产生高水平的代谢抗性。引起抗药性昆虫 P450 基因过量表达的原因可能有 P450 基因的编码区突变、顺式作用元件和反式作用因子变化、基因扩增等等 (Li *et al.*, 2007; Zimmer *et al.*, 2018)。

P450 基因启动子区的变异 (即启动子区顺式作用突变, Cis-acting mutation) 介导的昆虫抗药性在昆虫中有较多报道。在卫生害虫的研究中发现, *CYP6D1* 的超高表达是导致家蝇 *Musca domestica* 对拟除虫菊酯类农药产生抗药性的重要原因, 采自美国的 LRR 家蝇抗性品系的 *CYP6D1* 启动子区存在一个 15 bp 的插入, 该插入片段和家蝇对拟除虫菊酯的抗性相关 (Seifert *et al.*, 2002), 而采自中国的家蝇拟除虫菊酯抗性个体中并非都包含这个 15 bp 插入片段, 分析认为, 来自不同地区的家蝇中包含 15 bp 启动子插入的 *CYP6D1* 基因具有单一起源 (Single origin) 特性 (Pan *et al.*, 2018)。*CYP6G1* 的过量表达导致拟果蝇 *Drosophila simulans* 对 DDT 的高水平抗性, 但抗性拟果蝇 *CYP6G1* 启动子区插入的是 *Doc* 转座子 (Schlenke *et al.*, 2004)。*CYP6G1* 的过量表达也是黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 对 DDT 产生高水平抗性的主要原因, 抗性种群 *CYP6G1* 基因的启动子区插入了一个 *Accord* 转座子, 该转座子插入是介导 *CYP6G1* 在抗性种群中过量表达的重要因子 (Chung *et al.*, 2007), 有些种群的抗性个体 *CYP6G1* 基因还有 *P* 因子和 *HMS-Beagle* 两种转座

子插入, 这些转座子插入也可能在抗性的黑腹果蝇 *CYP6G1* 的过量表达起调控作用 (Schmidt *et al.*, 2010)。致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* JPal-per 抗性品系对氯菊酯 (Permethrin) 等拟除虫菊酯类农药产生极高水平抗性, *CYP9M10* 基因的过量表达是抗性产生的重要原因, 而抗性个体中 *CYP9M10* 基因启动子区的 *CuRE1* 转座子插入和其他顺式作用突变是导致该基因过量表达的重要原因 (Itokawa *et al.*, 2010)。

P450 介导的农业害虫抗药性的顺式调控机制近年来也有报道。桃蚜 *Myzus persicae* *CYP6CY3* 启动子区一个 (AC)_n 重复微卫星能调控该基因表达, 从而影响 *CYP6CY3* 对烟碱和新烟碱类农药的代谢 (Bass *et al.*, 2013)。Pang *et al.* (2014) 研究还发现, 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* *CYP6AY1* 基因启动子区存在丰富的多态性, 这些多态性位点与 *CYP6AY1* 介导的褐飞虱对吡虫啉和噻嗪酮高水平抗性相关。*CYP6ER1* 基因的高表达导致褐飞虱对吡虫啉 (Imidacloprid) 的高水平抗性 (Pang *et al.*, 2016), Liang *et al.* (2018) 研究发现, 褐飞虱 *CYP6ER1* 基因一个选择性剪接体 A2 的启动子区存在多态性, 抗性个体中的 4 个 SNPs 提高了该基因的启动子活性, 并且可能调控该基因的表达水平。*CYP6B7* 基因在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 对拟除虫菊酯农药的代谢抗性中发挥作用, 该基因能够被外源化合物诱导表达, Xu *et al.* (2018) 分析了调控 *CYP6B7* 启动子区调控该基因表达的顺式作用因子, 这些因子的变化影响 *CYP6B7* 的表达水平, 并可能与棉铃虫的抗药性及外源物质代谢的相关。Li *et al.* (2018) 研究发现, *CYP6BG1* 的上调表达与小菜蛾 *Plutella xylostella* 对氯虫苯甲酰胺 (Chlorantraniliprole) 的抗性相关, 通过对抗性品系和敏感品系的比较分析显示, 该虫 *CYP6BG1* 基因启动子区存在多态性, 启动子变异的顺式调控影响了该基因的表达水平 (Li *et al.*, 2019)。

反式作用因子调控昆虫 P450 表达, 进而导致昆虫高水平代谢抗性的报道较少。拟除虫菊酯抗性品系的家蝇 *CYP6D1* 基因的表达除了受顺式因子调控外, 也可能受反式作用因子的影响 (Liu *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1999)。最新的研究显示, 转录因子 *CncC/Maf* 能够调控 P450 基因的表达, 导致马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、甜菜夜蛾 *Spodoptera*

exigua 等害虫分别对不同农药的抗性 (Gaddelapati *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020)。除了启动子区的顺式作用调控外, 转录因子 *FTZ-F1* 的反式调控作用也影响小菜蛾 *CYP6BG1* 基因表达, 二者共同介导该虫对氯虫苯甲酰胺的抗性 (Li *et al.*, 2019)。转录因子 *CREB* (cAMP-response element binding protein) 能够直接被蛋白激酶基因 *MAPK* (Mitogen-activated protein kinase) 激活, 从而介导 P450 *CYP6CMI* 基因的高表达, 导致烟粉虱 *Bemisia tabaci* 对新烟碱类农药的抗性 (Yang *et al.*, 2020)。

piRNA (Piwi-interacting RNA) 或 miRNA (microRNA) 介导的抗药性相关基因转录后调控也有报道, 靶向抗药性相关基因的 piRNA 或 miRNA 负调控这些基因的表达 (Ye *et al.*, 2017)。piRNA-3878 靶向 *CYP307B1* 基因, 影响淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 对溴氰菊酯的抗性 (Ye *et al.*, 2017)。有研究发现, miR-2b-3p 和 miR-14b-5p 在小菜蛾对氯虫苯甲酰胺的抗性发展具有重要作用, 注射 miR-2b-3p 和 miR-14b-5p 模拟物能显著抑制 *CYP9F2* 和 *CYP307a1* 基因的表达水平, 食物中添加 miR-2b-3p 模拟物能显著提高抗性小菜蛾幼虫经溴氰菊酯处理后的死亡率 (Etebari *et al.*, 2018)。在果蝇的抗 DDT 种群中, *CYP6G1* 和 *CYP6G2* 基因高水平表达, miR-310s 能和这两个 P450 基因 3'-UTR 结合并调控这两个基因的表达 (Seong *et al.*, 2020)。miR-285 靶向淡色库蚊 *CYP6N23* 基因, 通过调控该基因的表达水平影响淡色库蚊对溴氰菊酯的抗性, RNAi 干扰 *CYP6N23* 以及注射 miR-285L 模拟物后, 该基因的表达水平显著降低且该虫对溴氰菊酯敏感性上升 (Tian *et al.*, 2016)。

P450 编码区的变异导致昆虫抗药性的报道较少, 在牧草盲蝽 *Lygus pratensis* 抗苯氯菊酯的品系中, *CYP6X1* 编码区存在大量的核苷酸变异, 但是这些变异与抗药性的关系有待进一步研究 (Zhu *et al.*, 2003)。在褐飞虱的吡虫啉抗性品系中, *CYP6ER1* 编码区也发现突变, 这些突变是导致褐飞虱对吡虫啉的抗性的重要原因 (Zimmer *et al.*, 2018)。研究发现, 棉铃虫拟除虫菊酯抗性品系中, 存在一个由 *CYP337B1* 和 *CYP337B2* 嵌合而成的新的 *CYP337B3* 基因, 嵌合基因 *CYP337B3* 的出现可能是导致棉铃虫对氟戊菊酯 (Fenvalerate) 和氯氰菊酯 (Cypermethrin) 等拟除虫菊酯农药产生抗性的重要原因, 不同棉铃虫地理种群 *CYP337B3*

基因存在差异,这种嵌合 P450 基因可能是 P450 介导害虫抗性的一种新机制 (Durigan *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018)。除了上述机制之外, P450 基因扩增 (Gene duplication) 导致的高水平代谢抗性在桃蚜和褐飞虱等昆虫中有报道,桃蚜和褐飞虱通过 P450 基因拷贝数的增加来产生对吡虫啉等新烟碱类农药的高水平抗性 (Puinean *et al.*, 2010; Zimmer *et al.*, 2018)。

2 P450 基因介导的昆虫抗药性进化可塑性

同种昆虫不同种群对相同的农药产生抗药性时,导致抗性产生的 P450 基因不同,而且多个 P450 基因在不同种群中存在显著不同的上调表达;同一昆虫品系在某种农药的抗性选择压力下,影响抗性的 P450 基因的种类和表达特性,会随着持续的农药选择而发生变化;同种昆虫的不同品系对某种农药产生相似的抗性倍数时,不同 P450 基因的过量表达水平存在明显差异;这些现象被称为细胞色素 P450 介导抗药性的进化可塑性 (Evolution plasticity) (Scott and Kasai, 2004; Festucci-Buselli *et al.*, 2005; 邱星辉等, 2008; Gao *et al.*, 2012)。Scott and Kasai (2004) 分析指出,影响 P450 基因过量表达的调控因子的差异,可能是造成其介导的抗性可塑性的重要原因之一。

Scott and Kasai (2004) 研究显示,采自美国的不同家蝇抗苯氯菊酯品系中,介导抗性产生的 P450 基因明显不同,在 LPR 抗性品系中,位于染色体 1 和染色体 2 的 *CYP6D1* 过量表达是抗性产生的主要原因,但 *CYP6D1* 在 YPER 抗性品系中表达量上调不明显,而且 YPER 抗性品系的染色体上不存在 *CYP6D1* 基因位点,分析认为,LPR 品系和 YPER 品系通过不同的 P450 基因的变化来介导其对抗苯氯菊酯的抗性。Gao *et al.* (2012) 对 6 个采自中国的抗性家蝇苯氯菊酯抗性品系的比较研究表明,8 个 P450 基因 (*CYP6A5v1*、*CYP6A5v2*、*CYP6A36*、*CYP6A40*、*CYP6D1*、*CYP6D3*、*CYP6D8* 和 *CYP6G4*) 在 6 个不同品系中具有明显不同的上调表达特性;在抗性倍数相似的品系中,P450 基因过量表达特点亦不同;而抗性倍数差别较大的品系中,某些 P450 基因上调表达的倍数却相似,该研究组认为,P450 基因的进化可塑性介导了这些家蝇种群对拟苯氯菊酯的抗性,在各品系上调

表达的 P450 基因中,*CYP6G4* 和 *CYP6D1* 起主导作用。

在黑腹果蝇相关研究中,*CYP6A2*、*CYP6A8*、*CYP4E2*、*CYP6G1*、*CYP6G1* 和 *CYP6I2D1* 在不同 DDT 抗性品系中具有不同过量表达特性 (Festucci-Buselli *et al.*, 2005),其中 *CYP6G1* 过量表达是介导黑腹果蝇 DDT 的主要因子,而且该基因过量表达导致的 DDT 抗性在世界各地不同种群中广泛存在 (Schmidt *et al.*, 2010; Morra *et al.*, 2010),然而,过量表达 *CYP6G1* 的黑腹果蝇田间品系在实验室 DDT 的选择压力下,其 *CYP12D1* 和 *CYP6A2* 的表达量显著上调,而将 *CYP6G1* 敲除后,在实验室相同的 DDT 选择压力下,*CYP6A8* 表达量显著上调 (Le Goff *et al.*, 2003),可见,在 DDT 的选择压力下,黑腹果蝇对的 P450 基因具有复杂的进化可塑性。

在灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 溴氰菊酯抗性品系中,4 个 P450 基因 (*CYP353D1v2*、*CYP6FU1*、*CYP6AY3v2* 和 *CYP439A1v3*) 过量表达,而且不同基因过量表达的水平不同,体外表达的 *CYP6FU1* 和 *CYP6AY3v2* 皆能代谢溴氰菊酯 (Mian *et al.*, 2019)。在世界不同地方,褐飞虱的田间种群都通过 *CYP6ER1* 的过量表达产生对吡虫啉的高水平抗性 (Zimmer *et al.*, 2018),但是不同地理种群 *CYP6ER1* 可变性剪接体不同,且 *CYP6ER1* 过量表达的调控机制存在差异,采自泰国、越南、印度尼西亚和印度的田间种群发现 *CYP6ER1* 在抗性个体中发生编码区突变,且具有这些突变的 *CYP6ER1* 可变性剪接体拷贝数是敏感个体的 2 倍 (Zimmer *et al.*, 2018);采自中国的褐飞虱吡虫啉抗性品系在 *CYP6ER1* 启动子区存在大量 SNPs,这些 SNPs 影响 *CYP6ER1* 启动子活性 (Pang *et al.*, 2014),由此可见,不同的褐飞虱地理种群通过同一个 P450 基因的高表达产生对吡虫啉产生抗性,但是存在不同的调控机制。与同一个敏感品系相比,在棉蚜的噻虫嗪抗性品系中,*CYP6CY14*、*CYP6DC1*、*CYP6CZ1*、*CYP6DD1*、*CYP6CY9*、*CYP6CY13-2*、*CYP6CY5*、*CYP6CY18*、*CYP6CY12* 等 9 个 P450 基因表达量显著上调,而桃蚜的螺虫乙酯 (spirotetramat) 抗性品系中 *CYP6CY14*、*CYP6CY4*、*CYP6DC1*、*CYP6CY18* 等 4 个基因表达量显著提高,两个不同抗性品系中有 3 个相同的 P450 基因都上调表达,但是上调表达的模式明显不同 (Schlenke *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2018)。

3 CPR 的基本结构和功能

细胞色素 P450 可分为微粒体型和线粒体型, 真核生物代谢外源物质的 P450 主要是依赖于 CPR 的微粒体 P450 (以下简称 P450), 所有微粒体型 P450 均需要依靠 CPR 获得电子进而产生催化活性 (Pandey and Fluck, 2013; Feyereisen, 2015)。CPR 和 P450 皆属于膜结合蛋白, 锚定于细胞内质网膜上。CPR 存在两个功能区域, 即 N 端疏水膜结合区和 C 端亲水催化活性区。N 端疏水膜结合区锚定在生物膜上, 其作用是维持正确的蛋白空间构象, 保证细胞色素 P450 还原酶与细胞色素 P450 之间的电子传递能够顺利进行。C 端亲水催化活性区是细胞色素 P450 还原酶发挥催化活性的主要部分, 起电子传递作用。催化活性区包含三个结构域, 分别为 FMN (黄素单核苷酸, Flavin mononucleotide) 结合域、FAD (黄素腺嘌呤二核苷酸, Flavin adenine dinucleotide) 和 NADPH (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 结合域, FMN 与 FAD 之间的连接域则保证两个结合域之间空间定位一致, 保证电子传递的畅通。CPR 从 NADPH 处获得电子, 经 FAD 传递给 FMN 并将 FMN 还原, 还原性 FMN 将电子传递给 P450 的血红素 (Heme) 结合位点, 从而还原 P450 且激活分子氧, 进而引起底物的羟化反应。

不同动物的 CPR 蛋白大小存在一定差异, 一般大小约为 80 kDa, 大约 680 个氨基酸组成 (Pandey and Fluck, 2013), 例如, 禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi* 的 CPR 基因 DNA 全长 16 000 bp, 含有 14 个外显子, ORF (开放阅读框) 全长 2 046 bp, 编码 681 个氨基酸, 大小为 77.11 kDa (Wang *et al.*, 2016)。

4 CPR 基因在害虫抗药性中的作用

CPR 变异介导昆虫的抗药性是一种新的抗药性机制, 目前昆虫 CPR 与农药代谢和抗药性关系的研究较少。CPR 与抗药性相关在几种昆虫中已有报道, 但是具体机制还缺乏研究。人 CPR 遗传多态性影响 P450 对药物代谢的相关研究广泛而深入 (Hart *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2017), 这对昆虫 CPR 介导抗药性的机制研究具有很好的借鉴作用。

有研究发现, 微小按蚊 *Anopheles minimus* CPR 的 L86 和 L219 两个位点在其与 FMN 结合中具有重要作用, 体外定点突变 L86F 和 L219F 能提高微小按蚊 CPR 的 FMN 结合能力和 *CYP6AA3* 对溴氰菊酯的代谢能力, 突变的 CPR 酶与 FAD 结合力较弱。进一步地定点突变分析显示, L86F/L219F/C427R 三突变可以较好结合 FAD, 而 L86F/L219F/W678R 和 L86F/L219F/W678R 三突变的 CPR 酶对 FAD 的结合能力没有影响, 说明不同的氨基酸位点在底物结合中的作用不同 (Sarapusit *et al.*, 2010; Sarapusit *et al.*, 2013)。通过冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 CPR 进行体外表达和生化特性分析发现, 冈比亚按蚊的 CPR 和人的 CPR 对小分子化合物有不同的结合特性, 分析认为, CPR 可以作为开发安全农药的潜在靶标 (Lian *et al.*, 2011)。注射 CPR dsRNA 可以显著增加臭虫 *Cimex lectularius* 抗性品系对溴氰菊酯的敏感性, 但是对敏感品系的影响不显著 (Zhu *et al.*, 2012); 饲喂 CPR dsRNA 可以显著提高灰飞虱抗性品系对噻嗪酮的敏感性, 但是对敏感品系无显著影响, 说明 CPR 在臭虫和灰飞虱的抗药性中发挥作用 (Zhang *et al.*, 2016)。Huang *et al.* (2015) 研究发现, CPR 基因在橘小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 马拉硫磷 (Malathion) 抗性品系和敏感品系中表达水平相似, 在注射 CPR dsRNA 后显著提高成虫对马拉硫磷的敏感性。朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 的 CPR 在甲氰菊酯抗性品系中显著上调表达, 饲喂 CPR dsRNA 可显著降低朱砂叶螨 P450 总酶活力, 且显著提高抗性品系对甲氰菊酯的敏感性, 而对敏感品系没有显著影响 (Shi *et al.*, 2015)。注射 CPR dsRNA 后, 可以显著提高冈比亚按蚊、棉铃虫、飞蝗 *Locusta migratoria*、柑橘蚜 *Toxoptera citricidus*、柑橘木虱 *Diaphorina citri*、二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 等对农药的敏感性 (Lycett *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017; Jing *et al.*, 2018; Adesanya *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2021)。

5 CPR 基因遗传多态性对 P450 代谢能力的影响

在环境的选择压力下, 同一群体一些个体在某些基因位点会产生突变, 如果某个位点突变在群体中超过 1%, 就称为遗传多态性 (Genetic

polymorphisms) (Hedrick, 2011)。CPR 在人体中与类固醇和药物代谢关系紧密, CPR 遗传多态性显著影响人的药物代谢, 不同种族的人群具有不同的 CPR 遗传多态性, 因此不同种族人群对相同药物的代谢能力不同, 其原因是这些 CPR 遗传多态性影响了 P450 的代谢能力, 相关研究对指导药物种类和剂量的选择具有重要意义。

同一个 CPR 突变对不同的 P450 代谢能力的影响不同, 其影响作用甚至相反; 不同的 CPR 突变对同一个 P450 代谢能力的影响也不同。Huang *et al.* (2008) 研究发现, 842 个健康美国人的 CPR 在 32 个位点存在氨基酸多态性, CPR 的 A503V 突变在美国华人中的突变率为 36.7%, 而在美国非洲裔中的突变率只有 19.1%; 对这 32 个突变位点进一步的体外表达分析发现, 不同突变位点对两个 P450 基因 *CYP1A2* 和 *CYP2C19* 代谢能力的影响不同; A287P 和 R457H 突变皆使 *CYP1A2* 和 *CYP2C19* 失去代谢能力; 与野生型 CPR 相比, CPR 的 A503V 突变使 *CYP1A2* 活力降低 15%, 但使 *CYP2C19* 代谢能力提高 13% (Huang *et al.*, 2008); 而 Q153R 突变的 CPR 使 *CYP1A2* 和 *CYP2C19* 活力分别提高到野生型的 144% 和 284%; Q153R、G213E、P452L、A503V、G504R 突变对 *CYP1A2* 和 *CYP2C19* 活力影响差异极显著 (Agrawal *et al.*, 2008)。另外研究则发现, 人 CPR 基因的 A287P 突变使 *CYP17A2* 的活性降低 80% (Huang *et al.*, 2005), A287P 突变使 *CYP21A2* 的活力降低 24% (Dhir *et al.*, 2007), A503V 突变显著提高了 *CYP2C9.1*、*CYP2C9.2* 和 *CYP2C9.3* 的代谢能力 (Subramanian *et al.*, 2012), 因此, 同一个 CPR 多态性位点对不同的 P450 活力影响不同, 特定的 CPR 突变对某个 P450 基因代谢能力的影响必须用这个 P450 基因做具体分析, 不能用其他的 P450 基因代替 (Agrawal *et al.*, 2008; Subramanian *et al.*, 2012)。

CPR 遗传多态性和突变对 P450 活力影响的机制也不相同。人的 CPR 基因 R457H、Y459H 和 V492E 突变位于其 FAD 结合域, 因而影响了 CPR 与 FAD 的结合, 从而导致 *CYP17A1* 和 *CYP19A1* 两个 P450 完全失去代谢能力 (Kranendonk *et al.*, 2008; Pandey and Fluck, 2013); 而 CPR 的 Q153R、M263V 突变靠近其 FMN 结合域, 因而使 CPR 的细胞色素 c 的还原活性降低 40% ~ 90% (Huang *et al.*, 2005); G539R 突变位于 CPR 的

NADPH 结合域, 使 CPR 的细胞色素 c 的还原活性降低 91% (Huang *et al.*, 2005)。A287P 位于 FMN 与 FAD 之间的连接域, 该 CPR 突变的影响因 P450 代谢底物的不同而不同, 例如, 其显著影响 *CYP17A1* 代谢 17, 20 碳链裂解酶 (17, 20 lyase) 的活性, 对 *CYP17A1* 代谢 17 α -羟化酶的影响较小 (17 α -hydroxylase), 对 *CYP19A1* 和 *CYP21* 的底物代谢能力没有影响 (Dhir *et al.*, 2007)。

此外, CPR 的突变可以导致一种人类常染色体隐性遗传病, 即 P450 还原酶缺陷症 (P450 oxidoreductase deficiency), 该疾病的原因是 CPR 基因突变影响了人体某些 P450 (*CYP17* 和 *CYP21*) 对类固醇的代谢能力, 而这些 P450 基因本身并没有发生变化, 目前已经报道了 CPR 的 A287P、R457H、V492E、C569Y 和 V608F 等约 20 个突变位点能引起 P450 还原酶缺陷症, 且不同种族患者的 CPR 突变和遗传多样特征不同 (Hart *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2017)。由于 CPR 的突变与人类药物代谢及 P450 功能缺陷疾病密切相关, 很多 CPR 突变已经成为分子标记, 用于评判不同种族人群对药物的代谢能力及 P450 还原酶缺陷症的发病可能性 (Hart *et al.*, 2008)。

如上所述, 抗药性昆虫 CPR 的表达量的变化及其 CPR 编码区突变在多种昆虫中报道, 但是 CPR 影响昆虫抗药性的机制亟待阐明, 在下一步的研究中, 可以借鉴人和高等动物中相关的研究成果, 深入阐述这一害虫抗药性新机制。

6 总结与展望

害虫抗药性机制非常复杂, 常见的抗性类型有行为抗性、表皮穿透性降低、代谢抗性与靶标抗性等, 但害虫抗药性机理远未阐明, 随着相关研究的深入, 抗药性新机制不断被发现。P450 酶系介导的昆虫代谢抗性是昆虫抗药性的最重要类型, 一直受到广泛的关注。目前关于 P450 酶系在害虫抗药性中的研究主要集中在 P450 基因的表达调控机制和 P450 基因表达量的变化等方面。虽然 CPR 基因与害虫抗药性相关在多种昆虫已经发现, 但是其具体机制尚待深入阐明。深入研究 CPR 基因变异对 P450 介导的害虫抗药性的影响, 不仅可以阐明 P450 酶系介导昆虫抗药性的新机制, 而且对于建立基于 CPR 突变的抗性监测和抗性预警的分子标记以及害虫抗药性治理具有重要意义。

参考文献 (References)

- Adesanya AW, Cardenas A, Lavine MD, et al. RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase increases susceptibilities to multiple acaricides in *Tetranychus urticae* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020, 165: 104550.
- Agrawal V, Huang NW, Miller WL. Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: Effect of sequence variants on activities of *CYP1A2* and *CYP2C19* [J]. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2008, 18: 569–576.
- Bass C, Zimmer CT, Riveron JM, et al. Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 2013, 110: 19460–19465.
- Choi BH, Hur JH, Heckel DG, et al. Development of a highly accurate and sensitive diagnostic tool for pyrethroid-resistant chimeric P450 *CYP337B3* of *Helicoverpa armigera* using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2018, 99 (3): e21504.
- Chung H, Bogwitz MR, McCart C, et al. Cis-regulatory elements in the accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene *Cyp6g1* [J]. *Genetics*, 2007, 175 (3): 1071–1077.
- Dhir V, Ivison HE, Krone N, et al. Differential inhibition of *CYP17A1* and *CYP21A2* activities by the P450 oxidoreductase mutant A287P [J]. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21: 1958–1968.
- Durigan MR, Correa AS, Pereira RM, et al. High frequency of *CYP337B3* gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2017, 143: 73–80.
- Etebari K, Afrad, MH, Tang B, et al. Involvement of microRNA miR-2b-3p in regulation of metabolic resistance to insecticides in *Plutella xylostella* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27 (4): 478–491.
- Festucci-Buselli RA, Carvalho-Dias AS, Oliveira-Andrade D, et al. Expression of *Cyp6g1* and *Cyp12d1* in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2005, 14 (1): 69–77.
- Feyereisen R. Insect P450 inhibitors and insecticides: Challenges and opportunities [J]. *Pest Management Science*, 2015, 71: 793–800.
- Gaddelapati SC, Kalsi M, Roy A, et al. Cap 'n' collar C regulates genes responsible for imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 99: 54–62.
- Gao Q, Li M, Sheng CF, et al. Multiple cytochrome P450s overexpressed in pyrethroid resistant house flies *Musca domestica* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2012, 104 (3): 252–260.
- Gong L, Zhang CM, Lv JF, et al. Polymorphisms in cytochrome P450 oxidoreductase and its effect on drug metabolism and efficiency [J]. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2017, 27: 337–346.
- Hart SN, Wang S, Nakamoto K, et al. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 oxidoreductase influence microsomal P450-catalyzed drug metabolism [J]. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2008, 18: 12–24.
- Hedrick P. Genetics of Populations (4th edition) [M]. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2011.
- Hu B, Ren MM, Fan JF, et al. Xenobiotic transcription factors CncC and maf regulate expression of *CYP321A16* and *CYP332A1* that mediate chlorpyrifos resistance in *Spodoptera exigua* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 398: 122971.
- Huang N, Agrawal V, Giacomini KM, et al. Genetics of P450 oxidoreductase: Sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105: 1733–1738.
- Huang N, Pandey AV, Agrawal V, et al. Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis [J]. *American Journal Human Genetics*, 2005, 76: 729–749.
- Huang Y, Lu XP, Wang LL, et al. Functional characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase from *Bactrocera dorsalis*: Possible involvement in susceptibility to malathion [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 18394.
- Itokawa K, Komagata O, Kasai S, et al. Genomic structures of *Cyp9m10* in pyrethroid resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 40: 631–640.
- Jing TX, Tan Y, Ding BY, et al. NADPH-cytochrome P450 reductase mediates the resistance of *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Kirkaldy) to abamectin [J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 986.
- Kranendonk M, Marochic C, Panda SP, et al. Impairment of *CYP1A2*-mediated xenobiotic metabolism by Antley-Bixler syndrome variants of cytochrome P450 oxidoreductase [J]. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 475: 93–99.
- Le Goff G, Boundy S, Daborn PJ, et al. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33 (7): 701–708.
- Li X, Li R, Zhu B, et al. Overexpression of cytochrome P450 *CYP6BG1* may contribute to chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.) [J]. *Pest Management Science*, 2018, 74 (6): 1386–1393.
- Li X, Shan C, Li F, et al. Transcription factor FTZ-F1 and cis-acting elements mediate expression of *CYP6BG1* conferring resistance to chlorantraniliprole in *Plutella xylostella* [J]. *Pest Management Science*, 2019, 75 (4): 1172–1180.
- Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics [J]. *Annual Review of Entomology*, 2007, 52: 231–253.
- Lian LY, Widdowson P, McLaughlin LA, et al. Biochemical comparison of *Anopheles gambiae* and human NADPH P450

- reductases reveals different 2' - 5' - ADP and FMN binding traits [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6: e20574.
- Liang ZK, Pang R, Dong Y, et al. Identification of SNPs involved in regulating a novel alternative transcript of P450 *CYP6ER1* in the brown planthopper [J]. *Insect Science*, 2018, 25: 726 - 738.
- Liu D, Zhou XJ, Li M, et al. Characterization of NADPH-cytochrome P450 reductase gene from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. *Gene*, 2014, 545: 262 - 270.
- Liu N, Scott JG. Increased transcription of *CYP6DI* causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 28 (8): 531 - 535.
- Lu K, Cheng YB, Li WR, et al. Activation of *CncC* pathway by ROS burst regulates cytochrome P450 *CYP6AB12* responsible for lambda-cyhalothrin tolerance in *Spodoptera litura* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 387: 121698.
- Lycett GJ, McLaughlin LA, Ranson H, et al. Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility [J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15: 321 - 327.
- Miah MA, Elzaki ME A, Han ZJ. Resistance irrelevant *CYP417A2v2* was found degrading insecticide in *Laodelphax striatellus* [J]. *Ecology and Evolution*, 2019, 7 (14): 5032 - 5040.
- Morra R, Kuruganti S, Lam V, et al. Functional analysis of the cis-acting elements responsible for the induction of the *cyp6a8* and *cyp6g1* genes of *Drosophila melanogaster* by DDT, phenobarbital and caffeine [J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19 (1): 121 - 130.
- Pan YO, Chai PJ, Zheng C, et al. Contribution of cytochrome P450 monooxygenase *CYP380C6* to spirotetramat resistance in *Aphis gossypii* Glover [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018, 148: 182 - 189.
- Pandey AV, Fluck CE. NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 2013, 138 (2): 229 - 254.
- Pandey AV, Kempna P, Hofer G, et al. Modulation of human *CYP19A1* activity by mutant NADPH P450 oxidoreductase [J]. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21: 2579 - 2595.
- Pang R, Chen M, Liang ZK, et al. Functional analysis of *CYP6ER1*, a P450 gene associated with imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34992.
- Pang R, Li Y, Dong Y, et al. Identification of promoter polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP6AY1* linked with insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2014, 23 (6): 768 - 778.
- Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, et al. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae* [J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6 (6): e1000999.
- Qiu XH, Li M, He FQ. Evolution plasticity of cytochrome P450 mediated insecticide resistance [J]. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45 (4): 660 - 662. [邱星辉, 李梅, 何凤琴. 细胞色素 P450 介导抗性的进化可塑性 [J]. 昆虫知识, 2008, 45 (4): 660 - 662]
- Saraputit S, Lertkiatmongkol P, Duangkaew P, et al. Modeling of *Anopheles minimus* mosquito NADPH-Cytochrome P450 oxidoreductase (CYPOR) and mutagenesis analysis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14: 1788 - 1801.
- Saraputit S, Pethuan S, Rongnoparut P. Mosquito NADPH-cytochrome p450 oxidoreductase: Kinetics and role of phenylalanine amino acid substitutions at leu86 and leu219 in *cyp6aa3*-mediated deltamethrin metabolism [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2010, 73: 232 - 244.
- Schlenke TA, Begun DJ. Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101 (6): 1626 - 1631.
- Schmidt JM, Good RT, Appleton B, et al. Copy number variation and transposable elements feature in recent, ongoing adaptation at the *Cyp6g1* locus [J]. *PLoS Genetics*, 2010, 6 (6): e1000998.
- Scott JG, Kasai S. Evolutionary plasticity of monooxygenase - mediated resistance [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004, 78: 171 - 178.
- Scott JG, Liu N, Wen Z, et al. House-fly cytochrome P450 *CYP6DI*: 5' flanking sequences and comparison of alleles [J]. *Gene*, 1999, 226 (2): 347 - 353.
- Seifert J, Scott JG. The *CYP6DIv1* allele is associated with pyrethroid resistance in the house fly, *Musca domestica* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2002, 72: 40 - 44.
- Seong KM, Coates BS, Pittendrigh BR. Post-transcriptional modulation of cytochrome P450s, *Cyp6g1* and *Cyp6g2*, by miR-310s cluster is associated with DDT-resistant *Drosophila melanogaster* strain 91-R [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 14394
- Shi L, Zhang J, Shen G, et al. Silencing NADPH-cytochrome P450 reductase results in reduced acaricide resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15581.
- Subramanian M, Agrawal V, Sandee D, et al. Effect of P450 oxidoreductase variants on metabolism of model substrates mediated by *CYP2C9.1*, *CYP2C9.2* and *CYP2C9.3* [J]. *Pharmacogenetic Genomics*, 2012, 22: 590 - 597.
- Tang T, Zhao C, Feng X, et al. Knockdown of several components of cytochrome P450 enzyme systems by RNA interference enhances the susceptibility of *Helicoverpa armigera* to fenvalerate [J]. *Pest Management Science*, 2012, 68: 1501 - 1511.
- Tian MM, Liu BQ, Hu HX, et al. MiR-285 targets P450 (*CYP6N23*) to regulate pyrethroid resistance in *Culex pipiens pallens* [J]. *Parasitology Research*, 2016, 115: 4511 - 4517.
- Wang K, Peng X, Zuo YY, et al. Molecular cloning, expression pattern and polymorphisms of NADPH-cytochrome P450 reductase in the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (L.) [J]. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0154633.
- Wu YQ, Xu HF, Pan YO, et al. Expression profile changes of cytochrome P450 genes between thiamethoxam susceptible and

- resistant strains of *Aphis gossypii* Glover [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018, 149: 1–7.
- Xu L, Li DZ, Luo YY, et al. Identification of the 2-tridecanone cis-acting element in the promoter of cytochrome P450 *CYP6B7* in *Helicoverpa armigera* [J]. *Insect Science*, 2018, 25 (6): 959–968.
- Yang X, Deng S, Wei XG, et al. MAPK-directed activation of the whitefly transcription factor *CREB* leads to P450-mediated imidacloprid resistance [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117: 10246–10253.
- Ye WY, Liu XM, Guo JX, et al. piRNA-3878 targets P450 (*CpCYP307B1*) to regulate pyrethroid resistance in *Culex pipiens pallens* [J]. *Parasitology Research*, 2017, 116: 2489–2497.
- Yuan CY, Jing TX, Li W, et al. NADPH-cytochrome P450 reductase mediates the susceptibility of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* to imidacloprid and thiamethoxam [J]. *Pest Management Science*, 2021, 77 (2): 677–685.
- Zhang XY, Wang JX, Liu J, et al. Knockdown of NADPH-cytochrome P450 reductase increases the susceptibility to carbaryl in the migratory locust, *Locusta migratoria* [J]. *Chemosphere*, 2017, 188: 517–524.
- Zhang Y, Wang Y, Wang L, et al. Knockdown of NADPH-cytochrome P450 reductase results in reduced resistance to buprofezin in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Fallen) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2016, 127: 21–27.
- Zhu F, Sams S, Moural T, et al. RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase results in reduced insecticide resistance in the bed bug, *Cimex lectularius* [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e31037.
- Zhu YC, Snodgrass GL. Cytochrome P450 *CYP6X1* cDNAs and mRNA expression levels in three strains of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae) having different susceptibilities to pyrethroid insecticide [J]. *Insect Molecular Biology*, 2003, 12 (1): 39–49.
- Zimmer CT, Garrod WT, Singh KS, et al. Neofunctionalization of duplicated P450 genes drives the evolution of insecticide resistance in the brown planthopper [J]. *Current Biology*, 2018, 28: 268–274.