

昆虫谷胱甘肽 *S*-转移酶的多样性 及其介导的抗药性*

尤燕春^{1,2,3,4} 谢苗^{1,2,3,4} 尤民生^{1,3,4**}

(1. 福建农林大学应用生态研究所 福州 350002; 2. 福建农林大学生命科学学院 福州 350002; 3. 农业部闽台作物有害生物综合治理重点实验室 福州 350002; 4. 福建省昆虫生态学重点实验室 福州 350002)

摘要 谷胱甘肽 *S*-转移酶 (GSTs) 是一类广泛分布于生物体的多功能解毒酶系, 参与许多内外源有毒物质的代谢。昆虫 GSTs 目前主要分为 6 个已知亚族, 其中 Delta 和 Epsilon 是昆虫特异的亚族, 已鉴定的抗性相关基因主要分属于这两个亚族。作为重要的解毒酶, 它主要参与昆虫对有机磷、拟除虫菊酯和有机氯等杀虫剂的抗性形成。本文主要对昆虫细胞质 GSTs 的分类、基因多样性及其在抗药性中的作用等相关研究进展进行综述。

关键词 谷胱甘肽 *S*-转移酶, 杀虫剂, 基因多样性, 抗药性

The diversity and role of glutathione *S*-transferase in insecticide resistance in insects

YOU Yan-Chun^{1,2,3,4} XIE Miao^{1,2,3,4} YOU Min-Sheng^{1,3,4**}

(1. Institute of Applied Ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
3. Key Laboratory of Integrated Pest Management of Fujian and Taiwan, Chinese Ministry of Agriculture,
Fuzhou 350002, China; 4. Provincial Key Laboratory of Insect Ecology, Fuzhou 350002, China)

Abstract Glutathione *S*-transferases (GSTs) are major enzymes involved in the detoxification of endogenous and xenobiotic toxins that are ubiquitous in aerobic organisms. These enzymes can be generally classified into six major categories, of which Delta and Epsilon are insect-specific subclasses. Most identified resistance-related genes are from these two categories. GSTs are important components that are involved in the process of developing resistance to organophosphate, pyrethroid and organochlorine insecticides.

Key words glutathione *S*-transferases, insecticide, genetic diversity, resistance

谷胱甘肽 *S*-转移酶 (glutathione *S*-transferases, GSTs, EC 2.5.1.18) 是一个多功能的超家族解毒酶系, 广泛分布于生物体内 (Sheehan *et al.*, 2001)。Booth 等 (1961) 首次在大鼠肝脏中发现了 GSTs, 推测其可能对药物具有解毒作用。昆虫 GSTs 的主要功能是催化谷胱甘肽的巯基与有毒亲电子类物质进行轭合反应, 以达到解毒目的。此外, GSTs 还可以作为配体结合蛋白以俘获有毒物

质, 行使解毒功能, 参与抗药性的形成 (Li *et al.*, 2007)。研究表明, GSTs 参与抗药性的机制是由于其表达量的提高 (Grant, 1991; Grant *et al.*, 1991)。

由于 GSTs 在癌症流行病学与治疗中起着重要作用, 所以哺乳动物 GSTs 的功能研究相对较为深入, 其在哺乳动物中的解毒作用和对药物抗药性的作用已明确。而有关昆虫 GSTs 作用机制的

* 资助项目: 973 项目 (2011CB100404); 国家自然科学基金项目 (30971925); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903034); 福建省自然科学基金 (2010J01074)。

** 通讯作者, E-mail: msyou@iae.fjau.edu.cn

收稿日期: 2012-02-12, 接受日期: 2012-05-03

研究则比较有限,主要集中于其与杀虫剂抗性的关系。部分昆虫 GSTs 成员具有硒非依赖性的谷胱甘肽过氧化物酶 (non-selenium dependent glutathione peroxidases, non-SeGPx) 活性,能降低杀虫剂对生物体引起的氧化应激损伤,是昆虫体内重要的抗氧化酶(房守敏,2010)。已有报道说昆虫 GSTs 在对有机磷(organophosphorus, OPs)、有机氯(organochlorines)和拟除虫菊酯(pyrethroids)等杀虫剂抗性的形成中起着重要作用。随着部分昆虫基因组全序列的测序完成以及基因组研究,近年来昆虫 GSTs 的研究报道日益增多。

本文就昆虫细胞质 GSTs 的分类、基因多样性及其在抗药性中的作用等相关研究进行了综述,旨在了解昆虫 GSTs 的研究现状及其在昆虫抗药性中的作用机制,为害虫抗性治理和新农药研发提供理论依据。

1 GSTs 的分类与命名

根据 GSTs 在细胞中的位置不同划分为线粒体 GSTs、微粒体 GSTs 和胞质 GSTs 三大类。线粒体 GSTs 仅存在于哺乳动物的线粒体和过氧化物酶体中,植物和昆虫中无此类 GSTs。微粒体 GSTs 是一类膜蛋白,目前已被归类为参与花生四烯酸和谷胱甘肽(glutathione, GSH)代谢的膜相关蛋白(membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism, MAPEG)超家族中(Jakobsson *et al.*, 1999)。胞质 GSTs 是三类中数量最多的,广泛分布于动物、植物、昆虫、细菌及真菌中(Sheehan *et al.*, 2001)。由于胞质 GSTs 存在的普遍性和功能的重要性,得到了较广泛和深入的研究。若无特别说明, GSTs 一般指胞质 GSTs。早期根据 GSTs 的等电点、免疫学特性和氨基酸序列相似性等特性,把昆虫胞质 GSTs 分为 I、II 两大类(Fournier *et al.*, 1992)。Ranson 等(2001)在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中发现了一种新的 GSTs 类别,并将其归为第 III 类。同年,Chelvanayagam 等(2001)把哺乳动物 GSTs 的分类命名规则应用到昆虫中,建立了与哺乳动物统一的昆虫命名机制,将第 I 类 GSTs 命名为 Delta 亚族,第 II 类分为 Sigma、Omega、Theta 和 Zeta 4 个亚族,第 III 类 GSTs 命名为 Epsilon 亚族,一些不能划分到已知亚族的则统称为未分类(unclassified)的 GSTs。其中 Delta 和 Epsilon 是昆虫特异的亚族,

而 Sigma、Omega、Theta 和 Zeta 这 4 个亚族则广泛分布于多种生物体中。通常把氨基酸序列一致性超过 40% 的 GSTs 同工酶归为同一亚族的成员,较严谨的分类应该还要考虑其它特性,如系统发育关系、免疫学特性和三级结构等(Ranson and Hemingway, 2005)。

2 昆虫 GST 基因多样性研究

第一个昆虫 GST 基因是从果蝇 *Drosophila melanogaster* 克隆出的 *DmGSTI* (Toung *et al.*, 1990)。随着人类基因组计划的顺利实施,昆虫基因组学也逐渐展开,大量的 EST 数据库和全基因组序列数据库出现,目前已鉴定出大量的昆虫 GST 基因(表 1)。

如表 1 所示,这些昆虫涉及双翅目、膜翅目、鞘翅目、鳞翅目和外翅部。致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 基因组中有 39 个 GST 基因;果蝇基因组中有 37 个 GST 基因;冈比亚按蚊基因组中有 32 个 GST 基因;埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 基因组中有 29 个 GST 基因;赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 基因组中有 33 个 GST 基因;家蚕 *Bombyx mori* 基因组中有 21 个 GST 基因;丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 基因组中有 18 个 GST 基因;意蜂 *Apis mellifera* 基因组中有 11 个 GST 基因;豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 基因组中有 24 个 GST 基因;人虱 *Pediculus humanus* 基因组中有 11 个 GST 基因。由此可见,不同昆虫其 GST 基因数目存在差异,且不同目之间的差异大于目内的差异。其中双翅目昆虫 GST 基因数目相对较多,而膜翅目昆虫的 GST 基因数目较少。

2.1 GSTs Delta 和 Epsilon 亚族

昆虫所特有的 Delta 和 Epsilon 两亚族在昆虫总 GST 基因数目中占较大比例。但并不是所有昆虫都同时含有 Delta 和 Epsilon 两个亚族,其中膜翅目(意蜂、丽蝇蛹集金小蜂)和外翅部(豌豆蚜、人虱)没有 Epsilon 亚族(表 1)。目前所知 Delta 亚族出现在所有昆虫中,而 Epsilon 亚族仅在双翅目、鞘翅目、鳞翅目昆虫中出现,所以 Delta 亚族被认为在起源上比 Epsilon 早, Epsilon 亚族是从 Delta 亚族进化来的,而不是由于基因丢失造成的(Robert, 2011)。

表 1 几种重要昆虫 GST 基因数目

Table 1 Number of GST genes in some of important insect species

昆虫种类 Species of insects	Delta	Epsilon	Omega	Sigma	Theta	Zeta	未分类 Unclassified	总计 Total
双翅目 Diptera								
致倦库蚊 <i>C. quinquefasciatus</i>	17	10	1	2	6	0	3	39
果蝇 <i>D. melanogaster</i>	12	14	4	1	4	2	0	37
冈比亚按蚊 <i>A. gambiae</i>	15	8	1	1	2	1	4	32
埃及伊蚊 <i>A. aegypti</i>	9	8	1	1	4	1	5	29
鞘翅目 Coleopteran								
赤拟谷盗 <i>T. castaneum</i>	1	19	3	6	2	1	1	33
鳞翅目 Lepidopteran								
家蚕 <i>B. mori</i>	4	4	4	2	1	2	4	21
膜翅目 Hymenoptera								
丽蝇蛹集金小蜂 <i>N. vitripennis</i>	4	0	2	8	3	1	0	18
意蜂 <i>A. mellifera</i>	2	0	1	4	1	1	2	11
外翅部 Exopterogota								
豌豆蚜 <i>A. pisum</i>	9	0	2	5	2	0	6	24
人虱 <i>P. humanus</i>	4	0	1	4	1	1	0	11

GST 基因簇通常分布在不同的染色体上,这些基因簇可能是通过串联和部分序列复制形成的,同一个 GST 亚族的成员间具有较高的序列相似性。Robert(2010)根据几种常见昆虫的 Delta 和 Epsilon GSTs 建立了系统进化树(图 1),从图 1 可见,Delta 和 Epsilon 亚族具有共同的分支,表明它们之间的关系较近。埃及伊蚊、冈比亚按蚊、致倦库蚊这 3 种昆虫的大部分 Epsilon GSTs 聚成一类,相比而言,它们的 Delta GSTs 相似性不高,且分支较多。果蝇的大部分 Delta 和 Epsilon GSTs 各聚成一类,反映了果蝇 Delta 和 Epsilon GSTs 亚族内成员间的基因相似性较高。通常,基因串联和序列重复是产生基因多样性的主要原因,整体来说,Epsilon GST 基因多样性不及 Delta GSTs 明显。

2.2 Omega、Sigma、Theta 和 Zeta GSTs 亚族

已有研究发现 Omega GST 基因可能是一类持家基因,它的主要功能是去除蛋白质上的巯基加和物(S-thioladducts),以保护生物大分子免受氧化损伤(Board *et al.*, 2000)。目前所知昆虫都有 Omega 亚族,但基因个数存在物种差异性,多数昆虫仅有一个 Omega GST,而果蝇和家蚕均有 4 个,且果蝇的 4 个 Omega GST 基因都分布于同一染色体上。

Sigma GSTs 广泛分布于昆虫中,数量较多。

据报道,果蝇和家蝇 *Musca domestica* 该类基因在飞行肌中与肌钙蛋白 H(troponin-H)密切相关,其 N-端富集脯氨酸和丙氨酸(proline/alanine)。此外,昆虫 Sigma GSTs 还具有催化活力(Singh *et al.*, 2001)。迄今,所研究的 Sigma GSTs 均由单基因编码产生。

Theta GSTs 广泛分布于细菌、植物和昆虫中,是个比较大的亚族,在 GSTs 中占有较大比例,存在明显的种间差异性。果蝇的 4 个 Theta GST 基因中有 3 个聚为一类,节点处的自展值为 90%,在染色体上处于相邻的位置,可能是由串联重复基因所产生(Robert, 2011)。

Zeta GSTs 具有马来酰乙酰乙酸异构酶(maleylacetoacetate isomerase)活性,在酪氨酸代谢途径中将马来酰乙酰乙酸异构化成延胡索二酰乙酰(fumarylacetoacetate)(Edwards and Dixon, 2005)。目前报道的除了果蝇和家蚕均有两个 Zeta GST 基因外,其它昆虫均只有一个。Board 等(1997)在其文章中报道 Zeta 亚族的氨基酸序列相对保守,且在 N-端有一保守的结构基序(SSCXWRVIAL motif),但其文中提供的图片显示这一保守结构基序应为 SSCXWRVRIAL,正如图 2 所示,横线处即为昆虫 Zeta 的保守基序,其序列为 SSCSWRVRIAL,高度保守结构表明其在酪氨酸代

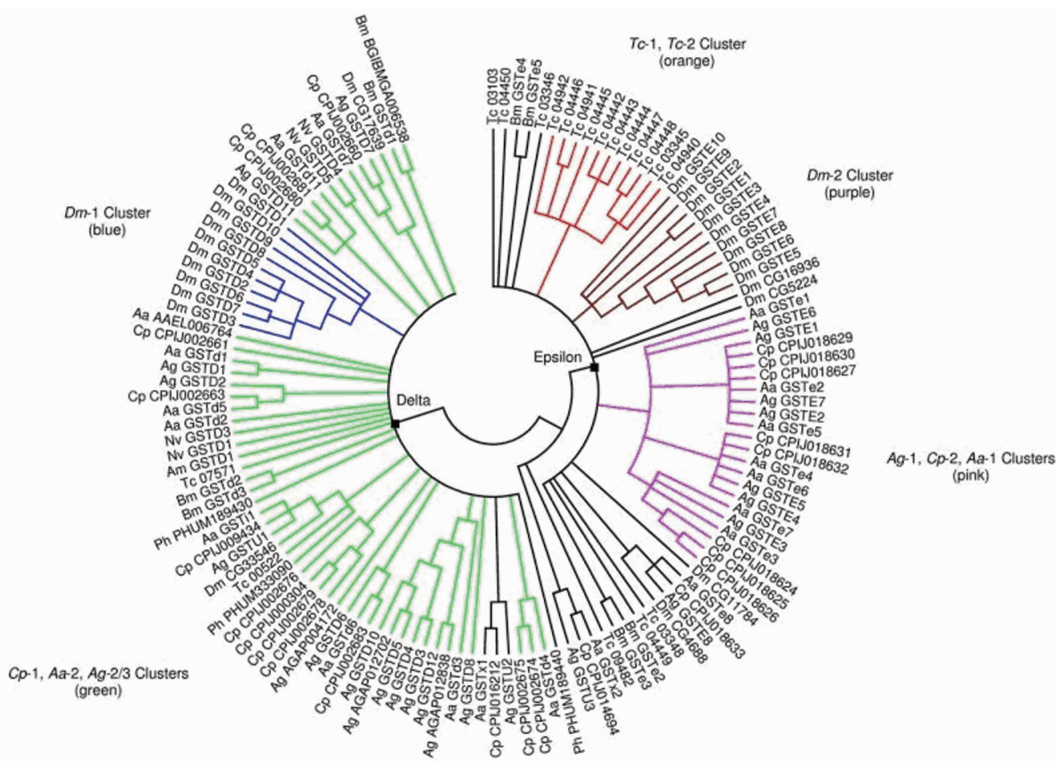


图 1 几种常见昆虫的 Delta 和 Epsilon GSTs 的进化分支图 (引自 Robert, 2011)

Fig. 1 Branching phylogeny of Delta and Epsilon GSTs in some of important insect species (Robert, 2011)

Aa: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*; Cp: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*; Am: 意蜂 *Apis mellifera*; Dm: 果蝇 *Drosophila melanogaster*; Nv: 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*; Bm: 家蚕 *Bombyx mori*; Ap: 豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*; Ag: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; Tc: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; Ph: 人虱 *Pediculus humanus*.

谢途径中起着重要作用。但埃及伊蚊的 Zeta GST 基因与其它昆虫差异较大,且没有 N-端的高度保守的基序,其原因有待进一步研究。

小菜蛾 *Plutella xylostella* *PxGSTz1* 的结构基序与 SSCSWRVRIAL 完全一致,且与家蚕 *BmGSTz1* 有着 91.63% 的序列一致性。小菜蛾 *PxGSTz1* 与 *PxGSTz2* 氨基酸序列一致性只有 41.01%, *PxGSTz2* 与 *BmGSTz2* 的氨基酸序列一致性达 55.09%,可见同个基因的种间差异小于种内同一亚族成员间的差异。Yamamoto 等 (2009) 研究发现家蚕 *GSTz2* 能提高其对氯菊酯的抗性,这可能与 *BmGSTz2* 的 SSCSWRVRIAL 这一结构基序发生突变有关,其具体的作用机制有待进一步研究。笔者正在进行的研究中也发现小菜蛾 *PxGSTz2* 中的这一结构基序中也有 2 个氨基酸残基的突变,即 S 变为 T, I 变为 A,与家蚕 *BmGSTz2* 类似,家蚕的是 I 变为 A, A 变为 M,这暗示着小菜蛾 *PxGSTz2* 可能与抗药性形成有关,具体作用有待进一步研究。

3 与昆虫抗药性相关的 GSTs

害虫产生抗药性的原因有多种,目前研究认为主要有行为改变、表皮穿透率降低、代谢解毒能力增强和靶标部位敏感性降低 (吴文君, 2000)。其中最重要的和研究较多的是代谢解毒能力的增强和靶标敏感性降低。其中靶标敏感性降低是指药剂的作用靶标发生了变异,从而对杀虫剂不再敏感,其主要涉及靶标基因的点突变。代谢解毒能力增强是指杀虫剂进入害虫体内到达靶标之前,会被各种代谢解毒酶如多功能氧化酶 (MFO)、羧酸酯酶 (CarE)、磷酸酯酶、GSTs 等所分解,主要涉及解毒酶的基因扩增和基因的过量表达 (唐振华和毕强, 2003)。

GSTs 作为重要的解毒酶,参与昆虫对有机磷、拟除虫菊酯和有机氯等杀虫剂的抗性形成。目前已知的 GSTs 参与杀虫剂抗性的机制有图 3 所示的 3 种。其中图 3 (A) 是 GSTs 催化 GSH 与杀虫剂

Nv: 丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis*; Am: 意蜂 *Apis mellifera*; Ph: 人虱 *Pediculus humanus*; Tc: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; Bm: 家蚕 *Bombyx mori*; Px: 小菜蛾 *Plutella xylostella*; Dm: 果蝇 *Drosophila melanogaster*; Ag: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; Aa: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*.

轭合,生成毒性较低的轭合物排出胞外达到解毒的目的;图 3(B)是 GSTs 通过消除反应解毒;图 3(C)是 GSTs 具有 GSH 过氧化物酶活性,可保护细

胞免受杀虫剂诱导的氧化应激损伤 (Ranson and Hemingway,2005)。

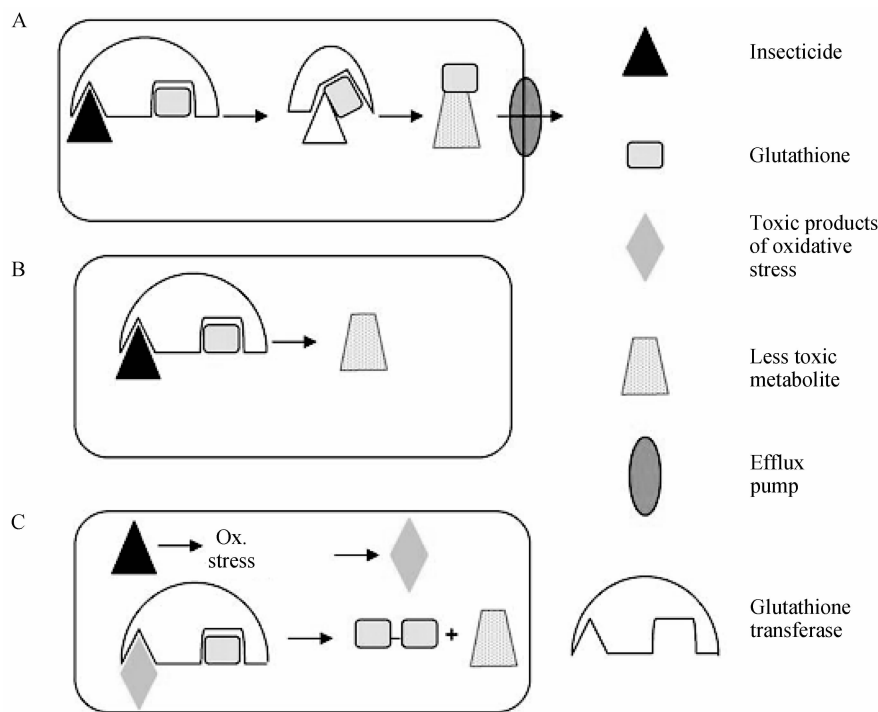


图 3 已知的 GSTs 参与杀虫剂抗性的机制 (引自 Ranson and Hemingway, 2005)

Fig.3 Overview of known GSTs involvement in insecticide resistant (from Ranson and Hemingway, 2005)

A. GSTs 催化 GSH 与杀虫剂轭合,生成毒性较低的轭合物排出胞外达到解毒的目的。GSTs can detoxify insecticides via glutathione conjugation;the conjugates are then exported from the cell; B. GSTs 通过消除反应解毒。GSTs can detoxify the insecticide DDT via an elimination reaction; C. GSTs 具有 GSH 过氧化物酶活性,可保护细胞免受杀虫剂诱导的氧化应激损伤。GSTs with glutathione peroxidase activity can protect against insecticide induced oxidative stress.

3.1 与昆虫有机磷抗性相关的 GSTs

有机磷杀虫剂是我国使用最广泛、用量最大的一类杀虫剂,主要是通过抑制乙酰胆碱酯酶的活性,使神经突触处释出的乙酰胆碱大量积累,阻断神经的正常传导,引起昆虫死亡。GSTs 在昆虫有机磷抗性形成过程中起着重要作用,在昆虫体内 GSTs 主要通过两种方式解毒,一种是通过 O-脱芳基(O-dearylation)作用,另一种是通过 O-脱烷基作用(O-dealkylation)(房守敏,2010)。如 GSTs 能催化谷胱甘肽与杀虫剂轭合,致使结构中的一个 O-甲基从杀虫剂上脱落,从而降低杀虫剂毒性 (Oppenoorth *et al.*, 1979; Fukuto, 1990);对硫磷和甲基对氧磷则是通过 GSTs 催化谷胱甘肽与杀虫剂的“离去基团”(leaving group)轭合而解毒

(Chiang and Sun,1993)。GSTs 常作为次级代谢酶对高毒的外源有毒物质进行解毒 (Azael *et al.*, 2009)。

与家蝇和小菜蛾有机磷抗性相关的 GSTs 研究较多,但进展较慢。Cheng 等 (1984) 发现小菜蛾同一龄期的速灭磷抗性品系中 GSTs 总酶活性比敏感品系高,表现出对速灭磷敏感性下降。Balabaskaran 等 (1989) 发现小菜蛾的整个发育期都能检测到 GSTs 的活性,蛹期时酶活达到最大值,抗性品系的酶活性比敏感品系的高出 3 ~ 4 倍,但两个品系的 GSTs 对 GSH 和 DCNB 的 K_m 值接近。Kao 和 Sun (1991) 首次证明谷胱甘肽共轭是小菜蛾对对硫磷和甲基对硫磷排毒的一个重要反应,同时推断小菜蛾中可能存在谷胱甘肽同工

酶。随后,Chiang 和 Sun(1993),Ku 等(1994)分别于 1993 年和 1994 年用亲和层析和阳离子交换层析技术从小菜蛾幼虫中分离纯化到 4 个 GSTs 同工酶,与家蝇 GSTs 倾向于钼合甲基相比,小菜蛾的这 4 个 GSTs 只钼合对硫磷和甲基对硫磷的芳基,而无法参与代谢杀螟硫磷、二嗪磷和谷硫磷等其它有机磷农药,GST-3 和 GST-4 对 CDNB 的活性比 GST-2 分别高出 8 倍和 20 倍,而且降解对硫磷、甲基对硫磷和对氧磷的能力比 GST-1 高出 13 倍,比 GST-2 高出 70 倍。Chiang 和 Sun(1993)发现同工酶 GST-3 对 DCNB、甲基对硫磷、对硫磷和对氧磷都有催化能力,而 GST-2 对 CDNB 有较高的活力。GST-1 和 GST-3 对 4-硝基苯乙酸的活力都比 GST-2 高,敏感品系和甲基对硫磷抗性品系都有这 3 种酶,只是含量不同。Huang 等(1998)从小菜蛾幼虫中克隆出 4 个 GST 基因,在 *E. coli* 异源表达了与昆虫有机磷抗性相关的同工酶 GST-3,研究其在抗性品系中表达量增加的分子机制,发现 *PxGST3* 在抗性品系中的表达量高于敏感品系,Southern 杂交结果表明其不是由于基因扩增而是表达量上调。*PxGST3* 是首次克隆出的与抗性相关的 GST 基因,其异源表达的生化性质和毒理学性质与活体分离的 GSTs 类似。吴刚等(2000)研究了 GSTs 在抗性和敏感品系小菜蛾不同发育期的变化及有机磷类杀虫剂对虫体 GSTs 的诱导作用,结果表明:GSTs 比活力在抗性和敏感品系小菜蛾的各发育期变化不大,但虫体 GSTs 总活力随虫体生长发育而显著增加,蛹期达到最大值,抗性品系小菜蛾 GSTs 活力明显高于敏感品系,甲胺磷和水胺硫磷对敏感品系小菜蛾幼虫 GSH 影响不明显,但可使抗性品系小菜蛾 GSH 质量摩尔浓度显著降低,因此可以认为,GSTs 活力的增高和与 GSH 的结合作用是小菜蛾对有机磷类杀虫剂抗性的重要机制。

Zhu 等(2007)用利尿酸和马来酸二乙酯作为增效剂处理盲蝽 *Lygus lineolaris* 做生测,发现马拉硫磷在两抗性品系中的毒性分别增加了 2 倍和 3 倍多,而敏感品系的则没有明显变化,抗性品系的 GSTs 对 CDNB 的活力提高 1.5 倍,荧光定量 PCR 分析发现抗性品系的 GST 基因转录水平是敏感品系的 1.3 倍。

Huang 等(2011)研究发现毒死蜱可以不同程度的诱导斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* *SlGSTe1*、

SlGSTe3、*SlGSTs1* 和 *SlGSTs3* 的表达,花椒毒素(xanthotoxin)可以诱导 *SlGSTe1*、*SlGSTe3*、*SlGSTs1*、*SlGSTs3* 和 *SlGSTo1* 的表达。

迄今为止,小菜蛾 *PxGSTe1* 是目前研究较为清楚的参与有机磷抗性的基因之一,该基因外源表达蛋白具有降解对硫磷、甲基对硫磷和对氧磷的活性(Huang *et al.*, 1998);而 *MdGSTd3* 和 *MdGST-6A* 则是家蝇对甲基对硫磷和二嗪磷产生抗性的重要基因(Syvanen *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2001)。

3.2 与昆虫拟除虫菊酯抗性相关的 GSTs

拟除虫菊酯是一类仿生合成的杀虫剂,是改变天然除虫菊酯的化学结构衍生的合成酯类,其作用机理是扰乱昆虫神经的正常生理,使之由兴奋、痉挛到麻痹而死亡。拟除虫菊酯因用量小、使用浓度低,故对人畜较安全,对环境的污染也很小。但其对鱼类毒性高,对某些益虫也有伤害,长期重复使用也会导致害虫产生抗药性。

Reidy 等(1990)发现赤拟谷盗对氟氯氰菊酯(cyfluthrin)抗性的产生与其体内 GSH 浓度和 GSTs 活力提高相关,抗性品系赤拟谷盗体内的细胞质 GSH 浓度是敏感品系的 2 倍,GSTs 对模式底物 CDNB 和 DCNB 的活性也比敏感品系提高了 4~6 倍。Lumjuan 等(2005)的研究发现冈比亚按蚊的 *GSt2* 的过表达会对 DDT 和苄氯菊酯产生抗性。在斜纹夜蛾、赤拟谷盗和埃及伊蚊中都发现高水平表达的 GSTs 与拟除虫菊酯抗性相关(Grant and Matsumura, 1989; Reidy *et al.*, 1990; Grant *et al.*, 1991)。拟除虫菊酯也能诱导意蜂、草地夜蛾 *Spodoptera frugiperda*、德国小蠊 *Blattella germanica* 中 GSTs 的表达(Yu *et al.*, 1984; Fred, 1993; Hemingway *et al.*, 1993)。

梁沛等(2003)研究了阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死剂量对小菜蛾 GSTs 活性的影响,用亚致死剂量的阿维菌素和高效氯氰菊酯处理小菜蛾敏感品系后,发现处理组小菜蛾的 GSTs 活性比对照组分别增加了 42% 和 70%,抗性品系经上述 2 种药剂同样处理后其 GSTs 活性比对照分别降低了 45% 和 30%,对 GSTs 的动力学研究表明,用高效氯氰菊酯处理后敏感品系的 GSTs 的 K_m 值比对照降低了近 40%,而阿维菌素处理后其 K_m 值变化不大,说明高效氯氰菊酯处理后,GSTs 对底物的

亲和力和明显增强,而处理组的抗性品系的 GSTs 的 K_m 值与对照皆无显著差异。

Dukre 等(2009)选用甲氰菊酯抗性品系和氯氰菊酯抗性品系小菜蛾来研究 GSTs 在对拟除虫菊酯抗性中的作用,发现抗甲氰菊酯品系的 GSTs 酶活比敏感品系高出 3.5 倍,抗氯氰菊酯品系比敏感品系高出 2 倍,说明 GSTs 可能参与小菜蛾拟除虫菊酯抗性的形成。

3.3 与昆虫其它杀虫剂抗性相关的 GSTs

Fournier 等(1992)从家蝇中分离出了两种 GSTs,研究发现抗性品系的抗性与 *GSTI* 转录水平的提高相关。Prapanthadara 等(2000)从按蚊中纯化了 4 种 GSTs 蛋白(GST-4a、GST-4b、GST-5、GST-6),其中 GST-4a 的 DDT 脱氯化氢酶活力是已研究的所有昆虫 GSTs 中最高的。Ranson 等(2001)的研究发现冈比亚按蚊的 *aggst3-2* 基因参与 DDT 抗性形成,在 DDT 抗性品系中该基因的 mRNA 表达水平比敏感品系高 5 倍,重组体 AgGST3-2 也具有很高的 DDT 脱氯化氢酶活力。

Dou 等(2006)研究了敌敌畏抗性品系(DDVP-R)、磷化氢抗性品系(PH3-R)和敏感品系的嗜卷书虱 *Liposcelis bostrychophila* 的 GSTs 的生化特性和毒理学效应,发现抗性品系中的 GSTs 活力明显高于敏感品系,且对 CDNB 的 K_m 值明显低于敏感品系,说明抗性品系的 GSTs 对 CDNB 的亲合力高于敏感品系,相反,敏感品系的 GSTs 对 CDNB 的催化活性明显高于抗性品系,用 GSH 作底物时,两种抗性品系的 GSTs 对 GSH 的亲合力下降,表明 GSTs 解毒能力的提高参与抗性形成。Sun 等(2011)的研究发现具有 DDT 抗性品系的果蝇中 GSTs 过表达,而在敏感品系中未发现此现象。同年,Niu 等(2011)的研究中也报道 GSTs 可能参与红蜘蛛 *Panonychus citri* 对鳞酮(pyridaben)的抗性形成。

Sonoda 和 Tsumuki(2005)用敏感品系和定虫隆抗性品系小菜蛾来研究 *GST-3* 与定虫隆抗性的相关性,发现抗性品系中 *GST-3* 的表达量和活力均较高,表明 *GST-3* 参与小菜蛾对定虫隆的解毒,Southern 杂交和序列分析表明抗性品系中 *GST-3* 表达量的增加不是由于基因的扩增而是由于基因转录的增强或点突变所致。

4 展望

随着大规模 ESTs 的测序、基因组精细图的绘制和全基因组表达芯片等一系列工作的完成,为进一步功能基因组的研究提供了支撑。随着越来越多的昆虫全基因组测序的完成,促进了抗性基因的鉴别和比较基因组学的研究,已有大量的昆虫 GST 基因得到鉴定。GSTs 作为重要的解毒酶,它参与昆虫对有机磷、拟除虫菊酯和有机氯等杀虫剂的抗性形成。近年来,GSTs 参与昆虫抗药性机制在分子水平上的研究获得了较大的进展,但对鉴定出的抗药性基因的表达调控研究进展较慢,陈凤菊等对此进行了综述(陈凤菊和高希武,2005)。目前多数研究的顺式、反式调控机制还处于推测阶段,有待实验证实(房守敏,2010)。了解 GST 基因的特性,有助于为进一步研究其调控元件在昆虫体内中的调控作用,以及如何应对环境条件的改变或外源有毒物质的侵袭奠定基础。因此,进一步研究和阐明昆虫 GST 基因的调控机制仍是昆虫抗药性研究的重要课题。

小菜蛾转录组测序工作的完成和全基因组测序的进行(He *et al.*, 2012),为快速筛选杀虫剂诱导以及在抗药性昆虫中过表达的候选基因提供了便利。抗药性候选基因的获得可用于后期的功能鉴定,大大缩短了抗性基因的鉴定时间。研究小菜蛾 GSTs 的功能,不仅能为防治小菜蛾和发明新型、高效、绿色杀虫剂奠定基础,同时也可为其他鳞翅目昆虫的研究和害虫防治提供重要的分子基础。

参考文献 (References)

- Azael CM, Penilla RP, Rodríguez DA, 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(8):1386–1397.
- Balabaskaran S, Chuen S, Muniandy S, 1989. Glutathione S-transferase from the diamondback moth (*Plutella xylostella* Linnaeus). *Insect. Biochem.*, 19(4):435–443.
- Board P, Baker R, Chelvanayagam G, Jermini L, 1997. Zeta, a novel class of glutathione transferase in a range of species from plants to humans. *Biochem. J.*, 328 (Pt3): 929–935.
- Board P, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastaugh S, Jermini L, Schulte G, Danley D, Hoth L, Griffon M, Kamath A,

- Rosner M, Chrunk B, Perregaux D, Gabel C, Geoghegan K, Pandit J, 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.*, 275(32):24798–24806.
- Booth J, Boyland E, Sims P, 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.*, 79(3):516–524.
- Chelvanayagam G, Parker MW, Board PG, 2001. Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chem. Biol. Interact.*, 133:256–260.
- Cheng EY, Chou TM, Kao CH, 1984. Insecticide resistance study in *Plutella xylostella* (L.) V. The induction, cross resistance and glutathione S-transferase in relation to mevinphos-resistance. *J. Agric. Res. China*, 33(1):73–80.
- Chiang FM, Sun CN, 1993. Glutathione transferase isozymes of diamondback moth larvae and their role in the degradation of some organophosphorus. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 45(1):7–14.
- Dou W, Wang JJ, Zhao ZM, 2006. Toxicological and biochemical characterizations of GSTs in *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocop., Liposcelididae). *J. Appl. Entomol.*, 130(4):251–256.
- Dukre AB, Moharil M, Basweshwar SG, Rao NG, 2009. Role of glutathione S-transferase in imparting resistance to pyrethroids in *Plutella xylostella* (L.). *Int. J. Integr. Biol.*, 6(1):17–21.
- Edwards R, Dixon D, 2005. Plant glutathione transferases. *Method. Enzymol.*, 401:169–186.
- Fournier D, Bride JM, Poirie M, Bergé JB, Plapp FW, 1992. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.*, 267(3):1840–1845.
- Fred P, 1993. Detoxification enzymes and the effects of temperature on the toxicity of pyrethroids to the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 105(2):155–158.
- Fukuto TR, 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health. Perspect.*, 87:245–254.
- Grant DF, 1991. Evolution of glutathione S-transferase subunits in culicidae and related nematocera: Electrophoretic and immunological evidence for conserved enzyme structure and expression. *Insect. Biochem.*, 21(4):435–445.
- Grant DF, Dietze EC, Hammock BD, 1991. Glutathione S-transferase isozymes in *Aedes aegypti*: purification, characterization, and isozyme specific regulation. *Insect. Biochem.*, 21(4):421–433.
- Grant DF, Matsumura F, 1989. Glutathione S-transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 33(2):132–143.
- He W, You M, Vasseur L, Yang G, Xie M, Cui K, Bai J, Liu C, Li X, Xu X, Huang S, 2012. Developmental and insecticide-resistant insights from the de novo assembled transcriptome of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Genomics*, 99(3):169–177.
- Hemingway J, Dunbar S, Monro A, Small G, 1993. Pyrethroid resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae): resistance levels and underlying mechanisms. *J. Econ. Entomol.*, 86(6):1631–1638.
- Huang HS, Hu NT, Yao YE, Wu CY, Chiang SW, Sun CN, 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(9):651–658.
- Huang Y, Xu Z, Lin X, Feng Q, Zheng S, 2011. Structure and expression of glutathione S-transferase genes from the midgut of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Noctuidae) and their response to xenobiotic compounds and bacteria. *J. Insect Physiol.*, 57(7):1033–1044.
- Jakobsson P, Morgenstern R, Mancini J, Ford HA, Persson B, 1999. Common structural features of MAPEG a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.*, 8(3):689–692.
- Kao CH, Sun CN, 1991. *In vitro* degradation of some organophosphorous insecticides by susceptible and resistant diamondback moth. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 41(2):132–141.
- Ku CC, Chiang FM, Hsin CY, Yao YE, Sun CN, 1994. Glutathione transferase isozymes involved in insecticide resistance of diamondback moth larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 50(3):191–197.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu. Rev. Entomol.*, 52:231–253.
- Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, Hemingway J, Ranson H, 2005. Elevated activity of an epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35(8):

- 861 – 871.
- Niu JZ, Liu GY, Dou W, Wang JJ, 2011. Susceptibility and activity of glutathione S-transferases in nine field populations of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) to pyridaben and azocyclotin. *Fla. Entomol.*, 94(2):321 – 329.
- Oppenoorth F, Van der pas L, Houx N, 1979. Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 11(13):176 – 188.
- Prapanthadara L, Promtet N, Koottathep S, Somboon P, Ketterman AJ, 2000. Isoenzymes of glutathione S-transferase from the mosquito *Anopheles dirus* species B; the purification, partial characterization and interaction with various insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30(5):395 – 403.
- Ranson H, Hemingway J, 2005. Glutathione Transferases// Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (eds.). Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier, Amsterdam. 383 – 402.
- Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth C, Collins F, Hemingway J, 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J.*, 359(Pt2):295 – 304.
- Reidy GF, Rose HA, Visetson S, Murray M, 1990. Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide resistant strain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 36(3):269 – 276.
- Robert F, 2011. Genomic organization of the glutathione S-transferase family in insects. *Mol. Phylogen. Evol.*, 61(3):924 – 932.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA, 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*, 360:1 – 16.
- Singh S, Coronella J, Benes H, Cochrane B, Zimniak P, 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *Eur. J. Biochem.*, 268(10):2912 – 2923.
- Sonoda S, Tsumuki H, 2005. Studies on glutathione S-transferase gene involved in chlorfluazuron resistance of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 82(1):94 – 101.
- Sun L, Schemerhorn B, Jannasch A, Walters KR, Adamec J, Muir WM, Pittendrigh BR, 2011. Differential transcription of cytochrome P450s and glutathione S-transferases in DDT-susceptible and -resistant *Drosophila melanogaster* strains in response to DDT and oxidative stress. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 100(1):7 – 15.
- Syvanen M, Zhou Z, Wharton J, Goldsbury C, Clark A, 1996. Heterogeneity of the glutathione transferase genes encoding enzymes responsible for insecticide degradation in the housefly. *J. Mol. Evol.*, 43(3):236 – 240.
- Toung YP, Hsieh TS, Tu CP, 1990. *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione S-transferase III. *PNAS*, 87(1):31 – 35.
- Wei SH, Clark AG, Syvanen M, 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (*MdGST-6A*) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(12):1145 – 1153.
- Yamamoto K, Shigeoka Y, Aso Y, Banno Y, Kimura M, Nakashima T, 2009. Molecular and biochemical characterization of a zeta-class glutathione S-transferase of the silkworm. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 94(1):30 – 35.
- Yu SJ, Robinson FA, Nation JL, 1984. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 22(3):360 – 368.
- Zhu Y, Snodgrass G, Chen M, 2007. Comparative study on glutathione S-transferase activity, cDNA, and gene expression between malathion susceptible and resistant strains of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 87(1):62 – 72.
- 陈凤菊, 高希武, 2005. 昆虫谷胱甘肽 S-转移酶的基因结构及其表达调控. 昆虫学报, 48(4):600 – 608.
- 房守敏, 2010. 昆虫谷胱甘肽 S-转移酶的基因组学研究及其介导的抗药性. 蚕学通讯, 30(4):28 – 35.
- 梁沛, 夏冰, 石泰, 高希武, 2003. 阿维菌素和高效氯氰菊酯亚致死剂量对小菜蛾谷胱甘肽 S-转移酶的影响. 中国农业大学学报, 8(3):65 – 68.
- 唐振华, 毕强, 2003. 杀虫剂作用的分子行为. 上海:上海远东出版社. 1 – 675.
- 吴刚, 尤民生, 赵士熙, 2000. 抗性和敏感小菜蛾谷胱甘肽 S-转移酶和谷胱甘肽的比较. 福建农业大学学报, 29(4):478 – 481.
- 吴文君, 2000. 农药学原理. 北京:中国农业出版社. 1 – 404.