

# 利用蛋白组学解析淡色库蚊对氯氰菊酯的抗性机制

刘福岩<sup>1,2</sup>, 张倩<sup>3</sup>, 郭秀霞<sup>1</sup>, 宋晓<sup>1</sup>, 张崇星<sup>1\*</sup>

**[摘要]** **目的** 比较氯氰菊酯选育后抗性淡色库蚊与敏感淡色库蚊蛋白差异表达情况,揭示淡色库蚊抗氯氰菊酯杀虫剂的机制。**方法** 利用同位素相对和绝对定量(iTRAQ)技术,结合液相色谱/串联质谱(LC-MS/MS)分析技术,对氯氰菊酯敏感与抗性淡色库蚊进行蛋白组定量分析。**结果** 共鉴定出164种蛋白在氯氰菊酯抗性选育前后差异表达,其中上调蛋白54种、下调蛋白110种,大量细胞骨架结构与组成相关的表皮蛋白、幼虫表皮蛋白、蛹表皮蛋白及表皮结构成分蛋白在淡色库蚊氯氰菊酯抗性选育前后差异表达。通过平行反应监测验证了能量产生与转换、翻译、核糖体结构与生物发生、脂质转运与代谢、翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣、细胞骨架、细胞内运输等13种类型的蛋白在淡色库蚊氯氰菊酯选育后差异表达,可作为潜在抗性发生标记物。**结论** 氯氰菊酯抗性淡色库蚊中同时存在表皮抗性 & 代谢抗性等多种杀虫剂抗性机制,与抗氯氰菊酯杀虫剂相关的表皮基因及细胞色素P450蛋白酶可能在淡色库蚊氯氰菊酯抗性中发挥了重要作用。

**[关键词]** 淡色库蚊;氯氰菊酯;杀虫剂抗性;蛋白质组学;同位素标记相对和绝对定量;液相色谱/串联质谱

**[中图分类号]** R382.3 **[文献标识码]** B

## Study on the mechanism of resistance to cypermethrin in *Culex pipiens pallens* using proteomics

LIU Fu-Yan<sup>1,2</sup>, ZHANG Qian<sup>3</sup>, GUO Xiu-Xia<sup>1</sup>, SONG Xiao<sup>1</sup>, ZHANG Chong-Xing<sup>1\*</sup>

1 Shandong Institute of Parasitic Diseases, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, China;

2 Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Jining Medical University, China; 3 Jining Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong Province, China

\* Corresponding author

**[Abstract]** **Objective** To compare the differentially expressed proteins between cypermethrin-resistant and -sensitive *Culex pipiens pallens*, so as to unravel the mechanism underlying the resistance to cypermethrin in *Cx. p. pallens*. **Methods** A quantitative proteomic analysis was performed among cypermethrin-sensitive and -resistant isolates of *Cx. p. pallens* using isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) labeling coupled with liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Results** A total of 164 differentially expressed proteins were identified between cypermethrin-sensitive and -resistant isolates of *Cx. p. pallens*, including 54 up-regulated proteins and 110 down-regulated proteins. A large number of cuticular proteins, larval cuticular proteins, pupal cuticular proteins and cuticular structural constituent proteins, which are associated with cytoskeletal structure and components, were differentially expressed between cypermethrin-sensitive and -resistant isolates of *Cx. p. pallens*. Thirteen proteins, which were involved in energy production and conversion, translation, ribosomal structure and biogenesis, lipid transport and metabolism, post-translational modification, protein turnover, chaperones, cytoskeleton and intracellular transportation, were validated to be differentially expressed between cypermethrin-sensitive and -resistant isolates of *Cx. p. pallens*, which may serve as potential markers of cypermethrin resistance. **Conclusion** Multiple insecticide resistance mechanisms contribute to the resistance to cypermethrin in *Cx. p. pallens*, including cuticular resistance and metabolic resistance, and the cuticular protein genes and cytochrome P450 enzymes may play an important role in the resistance of *Cx. p. pallens* to cypermethrin.

**[Keywords]** *Culex pipiens pallens*; Cypermethrin; Insecticide resistance; Proteomics; Isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ); Liquid chromatography with tandem mass spectrometry

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81672059, 81871685);山东省自然科学基金(ZR2017YL004);山东省医药卫生科技发展计划(2018WSA302)

**[作者单位]** 1 山东省寄生虫病防治研究所、山东第一医科大学(山东省医学科学院)(济宁 272000);2 济宁医学院附属医院检验科;3 山东省济宁市中医院

**[作者简介]** 刘福岩,女,本科,中级检验师。研究方向:病原生物学

\* 通信作者 E-mail: chongxingzhang@aliyun.com; ORCID: 0000-0001-5529-6783

**[数字出版日期]** 2021-04-16 11:25

**[数字出版网址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20210416.1036.003.html>

蚊是多种人类疾病的传播媒介,可传播疟疾、淋巴丝虫病、登革热、基孔肯雅热和西尼罗河病毒病等多种蚊媒病,严重危害人类健康,造成了沉重的疾病和经济负担<sup>[1-2]</sup>。目前,化学杀虫剂长期、广泛及密集使用导致蚊媒抗药性的发生及抗药性水平不断增强<sup>[3-5]</sup>,在许多地区,蚊媒抗药性的广泛发展已造成蚊媒病发病呈上升趋势<sup>[6-7]</sup>。杀虫剂抗性已成为控制蚊媒病的最严重威胁之一,阐明杀虫剂抗性分子机制是解决抗性的前提和关键。

既往已采用cDNA微阵列、RNA测序(RNA-seq)等技术鉴定出包括细胞色素P450、谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)在内的一系列抗性相关基因<sup>[8-16]</sup>。目前,蚊媒中已被广泛接受的杀虫剂抗性机制是靶位点不敏感(靶标抗性)及蚊虫对杀虫剂代谢增强(代谢抗性)<sup>[13-16]</sup>。长期以来,杀虫剂抗性机制研究多停留于单基因分析。然而,单基因分析模式仅能将不同抗性机制割裂开来单独分析,无法实现系统研究,严重限制了蚊媒防治的理论发展和实际应用。随着蛋白组学技术的进展,特别是基于同位素相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)的蛋白组学技术的出现,大规模鉴定蚊虫杀虫剂抗性相关蛋白的可能性成为现实。

淡色库蚊在中国是流行性乙型脑炎病毒和淋巴丝虫病的主要传播媒介,已对几种用于蚊虫防治的杀虫剂产生了抗性<sup>[3-5]</sup>。本研究旨在通过对淡色库蚊氯氰菊酯抗性的蛋白组学研究,从整体层面阐明氯氰菊酯抗性的多蛋白调控作用,以提高对杀虫剂抗性机制的认识。

## 1 材料与方法

**1.1 淡色库蚊氯氰菊酯抗性品系的选育** 实验室淡色库蚊敏感品系于1960年采集于山东省济宁市唐口乡,后保存于实验室标准化饲养,从未接触任何杀虫剂,对杀虫剂完全敏感。所有敏感淡色库蚊均于28℃恒温环境和75%相对湿度条件下饲养(14 h光照/10 h黑暗)。以敏感淡色库蚊幼虫(Cx<sub>s</sub>)作为亲本进行氯氰菊酯抗性选育,其半数致死浓度(LC<sub>50</sub>)为 $2.9 \times 10^{-10}$  mol/L。首先在乙醇中稀释氯氰菊酯杀虫剂,然后在盛有幼虫的纸杯中加入250 mL水,每一代幼虫致死量为50%~70%,对存活幼虫饲养和繁殖,采用WHO标准生物测定法<sup>[17]</sup>对第一代和连续几代幼虫进行敏感性测定,获得其LC<sub>50</sub>值。反复筛选10代,产生氯氰菊酯独立抗性品系淡色库蚊(Cx<sub>cym</sub>),其LC<sub>50</sub>值为 $7.8 \times 10^{-9}$  mol/L,抗性水平较敏感品系增加27.03倍。

**1.2 主要试剂和仪器** 尿素(国药集团,纯度98%),乙二胺四乙酸(EDTA;国药集团,纯度98%),二硫苏糖醇(DTT;国药集团,纯度98%),蛋白酶抑制剂Cocktail(蛋白质组学级别,Takara),BCA试剂盒(Takara),iTRAQ蛋白组标记试剂(蛋白质组学级别,大连宝生物工程有限公司),Strata X C18脱盐柱(赛默飞世尔公司),e2695/2998高效液相色谱柱(赛默飞世尔公司),XBridge Peptide BEH高pH C18色谱柱(粒径3.5 μm、孔径130 Å、管径4.6 mm、长度250 mm,赛默飞世尔公司),PepMap® 100 C18色谱柱(粒径3 μm、孔径100 Å、管径75 μm、长度2 cm,北京汇海科仪公司),PepMap® RSLC C18分析柱(粒径2 μm、孔径100 Å、管径50 μm、长度15 cm,北京汇海科仪公司),超声破碎仪(美国SONICS公司),NanoLC 1000纳流液相色谱仪(赛默飞世尔公司),LTQ Orbitrap Elite组合式质谱仪(英国Aspec公司)。

**1.3 蛋白提取与鉴定** 分别将氯氰菊酯抗性和敏感淡色库蚊(5个卵筏、5只IV龄幼虫、5只蛹、5只雄性成蚊以及5只雌性成蚊)先用液氮研磨至均匀粉末,按100:1(w/v)加入尿素裂解液[8 mol/L尿素,2 mmol/L EDTA,10 mmol/L DTT,25 mmol/L吡啶-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),1%蛋白酶抑制剂Cocktail],超声裂解2 min后12 000 × g离心15 min,小心取出上清液。加入5倍体积以上-20℃预冷丙酮沉淀过夜,4℃16 000 × g离心5 min,弃上清。用Bradford法对蛋白浓度进行测定;根据Bradford定量结果,取100 μg样品,加入8 mol/L尿素溶液调整等体积,加入终浓度10 mmol/L DTT于37℃孵育45 min,还原蛋白二硫键,加入终浓度25 mmol/L 2-碘乙酰胺(iodoacetamide, IAM),室温孵育55 min。烷化保护巯基基团,根据1:50(质量比)加入胰蛋白酶,37℃酶解过夜。Strata X C18脱盐柱除盐,取出蛋白酶切后的蛋白样品进行iTRAQ标记并室温平衡,标记肽段通过C18柱经HPLC预分离组分,收集72个肽段流出组分,真空抽干后再合并成18个组分质谱鉴定。分别将18个组分溶于20 μL NanoLC A液,进样2 μL,经上样柱上样后通过分析柱梯度洗脱进入Q Exactive组合式质谱仪鉴定。

**1.4 蛋白组数据分析** 使用Proteome Discoverer 1.3软件将质谱仪对肽段鉴定的原始图谱文件(.raw文件)提交SEQUEST 2.0进行数据库检索,根据错误发现率(false discovery rate, FDR) < 0.01标准对数据进行筛选,获得高度可信的定性结果。质谱原始数据在致倦库蚊分类数据库搜索,按照如下参数配置搜库:

裂解酶选择胰蛋白酶,允许2个氨基酸缺失,固定修饰设置为氨基甲酰化,氧化以及N端乙酰化设置为可变修饰。质谱和串联质谱耐受性搜索参数为0.02 Da,肽质量耐受性 $4.8 \times 10^{-5}$  mol/L,使用诱饵数据库搜索肽序列计算1%错误发现率(false discovery rate, FDR),以富集倍值 $\geq 1.50$ 或富集倍值 $\leq 0.67$ 和 $P < 0.05$ 来确定蛋白上调和下调。

利用Blast2go程序在非冗余蛋白序列数据库完成所有定量蛋白注释、分类和功能预测,导出UniProt-GOA数据库([www.ebi.ac.uk/GOA/](http://www.ebi.ac.uk/GOA/))注释蛋白基因本体(gene ontology, GO),基于蛋白搜索获取蛋白身份(ID),将蛋白ID转换为UniProtKB数据库ID,然后根据UniProt中UniProtKB的ID查找淡色库蚊GO注释信息。通过KEGG公共数据库(<http://www.genome.jp/kegg/mapper.html>)查找差异表达蛋白中显著富集通路,用Fisher精确测试法进行通路富集统计,其中校正 $P$ 值 $< 0.05$ 的通路是最有意义通路,用鉴定蛋白BLAST比对直系同源聚类蛋白数据库预测蛋白质功能,并进行统计学分析( $P < 1 \times 10^{-5}$ ),使用InterProScan分析注释蛋白结构域。

1.5 差异表达蛋白的平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)验证 采用无标签PRM法<sup>[18]</sup>验证标记的蛋白,选取 $\beta$ 微管蛋白作为内参蛋白标准进行差异表达蛋白分析,其选择标准如下:① 8~25个氨基酸长度多肽;② 胰蛋白酶消化后优质多肽;③ 除非有针对性的修饰(半胱氨酸的烷基化),避免选择具有可变修饰的肽,如氧化、磷酸化、乙酰化和其他翻译后修饰等;④ 具有双重或三重合适电荷的肽前体;⑤ 具有稳定和强烈的色谱峰信号和质谱离子(前体和产物离子)峰信号的肽。通过标准40 min数据依赖性分析蛋白组谱测试并进行3次重复Q激发质谱法建立蛋白质谱库,基于蛋白质谱库,靶向定量实验收集平行反应监测方法下Q激发靶向所选多肽,等量白纹伊蚊滞育/非滞育卵蛋白样品进行半定量测量,每组3次重复,利用Skyline软件从PRM质谱数据中提取峰面积,为了避免样品间误差,利用内参蛋白多肽对样品进行标准化。

## 2 结果

2.1 差异蛋白 氯氰菊酯抗性淡色库蚊与敏感淡色库蚊蛋白组定量分析发现,有164种蛋白在氯氰菊酯抗性选育前后差异表达,其中54种蛋白表达上调、110种蛋白表达下调(图1)。对这些差异表达蛋白GO、KEGG通路分析表明,大量细胞骨架结构与组成

有关的表皮蛋白、幼虫表皮蛋白、蛹表皮蛋白及表皮结构成份在淡色库蚊氯氰菊酯抗性选育前后差异表达。

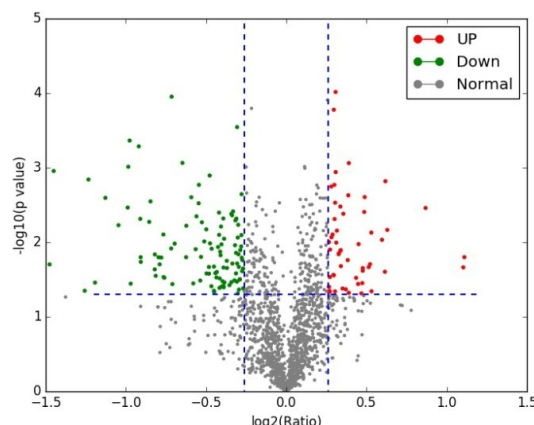
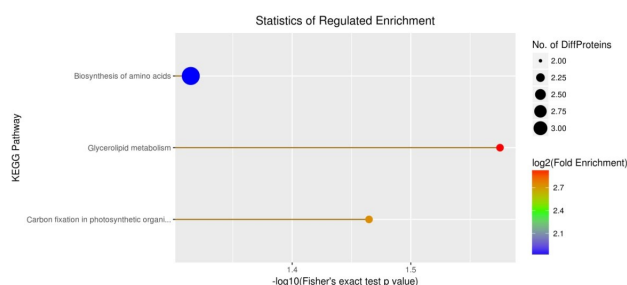


图1 氯氰菊酯抗性和敏感淡色库蚊差异表达蛋白火山图

2.2 差异表达蛋白GO功能注释和聚类分析 氯氰菊酯抗性选育前后淡色库蚊GO功能注释表明,差异表达蛋白可分为生物过程、分子功能及细胞过程3类。生物过程方面发现含核碱基的小分子代谢过程在上调差异蛋白中最为富集,下调差异蛋白中ATP代谢过程最为富集;催化活性及表皮结构组成为分子功能中上调和下调差异蛋白中最为富集。细胞构成上调和下调差异蛋白分别主要位于核糖体和酶复合体(表1)。

2.3 差异蛋白KEGG通路分析 KEGG通路富集分析显示,甘油酯代谢(map00561)、光合生物的固碳作用(map00710)、氨基酸的生物合成(map01230)上调(图2),而扩张型心肌病(map05414)、肥厚性心肌病(map05410)、致心律失常性右室心肌病(map05412)、光转导(map04745)、粘合连接(map04520)等通路则下调。



注:log10(Fisher确切概率法 $P$ 值)颜色代表富集的可靠性。

图2 氯氰菊酯抗性和敏感淡色库蚊差异表达蛋白KEGG通路富集分析

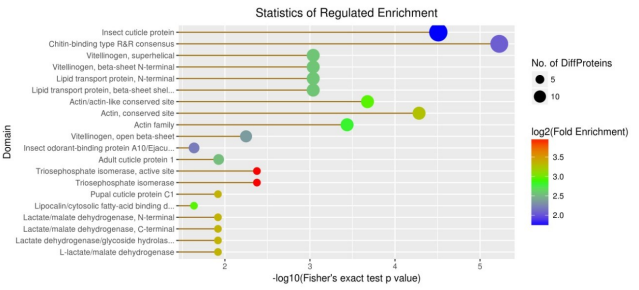


表1 氯氟菊酯抗性和敏感淡色库蚊差异表达蛋白GO功能注释

GO注释分类	调节模式	参与代谢过程(基因数量)
生物过程	上调	含核碱基的小分子代谢过程(5)、核苷二磷酸代谢过程(2)、细胞氮复合代谢过程(9)、初级代谢过程(12)、核苷代谢过程(3)、糖基化合物代谢过程(3)等
	下调	ATP代谢过程(6)、嘌呤核苷三磷酸代谢过程(6)、嘌呤核苷三磷酸代谢过程(6)、核苷三磷酸代谢过程(6)、核苷三磷酸代谢过程(6)等
分子功能	上调	催化活性(4)、结合部位(3)、结构分子活性(6)、转运活性(2)等
	下调	表皮结构组成(13)、结构分子活性(19)、底物特异性转运体活性(10)、脂质转运体活性(4)、L-苹果酸脱氢酶活性(2)等
细胞构成	上调	核糖体(6)、细胞部分(8)、细胞(5)、大分子复合体(6)、细胞器(2)、膜及膜部分(4)、细胞外部分(3)、细胞器部分(5)等
	下调	酶复合体(4)、质子转运ATP酶复合物及质子输运域(3)、质子转运ATP合酶复合物(3)、线粒体质子转运ATP合酶复合物(2)、线粒体膜蛋白复合物(2)等

2.4 差异蛋白结构域功能富集分析 结构域富集分析表明,几丁质结合 R&R 型(chitin-binding type R&R consensus)、昆虫表皮蛋白(insect cuticle protein)、肌动蛋白保守位点(actin, conserved site)、肌动蛋白/肌动蛋白样保守位点(actin/actin-like conserved site)、肌动蛋白家族(actin family)、脂质转运蛋白(lipid transport protein, beta-sheet shell)是最富集的结构域(图3)。

2.5 差异蛋白表达的 PRM 验证 采用 PRM 法对显著差异表达蛋白进行验证,按照功能分类共发现 13 种不同类型蛋白(表2)。



注:log10(Fisher确切概率法P值)颜色代表富集的可靠性。

图3 氯氟菊酯抗性和敏感淡色库蚊差异表达蛋白结构域富集分析

表2 PRM验证到的13种不同类型蛋白

蛋白类型	蛋白数据ID	蛋白描述	鉴定到的肽段序列
能量产生与转换	BOXA87	丙酮酸脱氢酶	VFILGEEVAQYDGAYK
翻译、核糖体结构与生物发生	B0WU22	酸性核糖体蛋白P1	AANVDIEPYWPGLFAK
脂质转运与代谢	B0WE67	乙酰辅酶A羧化酶	VASSIVAQTAEIPTLPWGSSELK
翻译后修饰,蛋白质周转,分子伴侣	B0WGF9	硫氧还蛋白还原酶1	VAVLDFVVPSPR
无机离子转运与代谢	B0WIC2	钠/钾依赖性ATPaseβ-2亚单位	LDNFLAPYR
细胞骨架	B0WY76	肌动蛋白	VAPEEHPILLTEAPLNPK
细胞内运输、分泌和囊泡运输	B0WUR5	分泌载体相关膜蛋白	ATVQSQFNQNR
碳水化合物运输和代谢	B0WEB5	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	AGAELYVVESTGVFTTIDK
氨基酸转运与代谢	B0WZS2	吡咯啉-5-羧酸还原酶	LAAQTVMGAGK
信号转导机制	B0W6W0	肌钙蛋白C	TGSISSETVAEILR
核苷酸转运与代谢	BOX890	尿苷磷酸化酶	LPAGTQLQDISAFSYR
辅酶转运与代谢	B0W244	腺苷甲硫氨酸合酶	DTVQHIGYDDSSK
次生代谢物生物合成、运输和分解代谢	B0WQV0	细胞色素P450 4g15	SFIDLFNENSR

### 3 讨论

本研究表明,淡色库蚊经氯氰菊酯抗性选育后,与敏感淡色库蚊品系比较,某些细胞骨架蛋白差异表达显著,大量功能多样的表皮蛋白在氯氰菊酯抗性选育后表现出高度差异表达。包括表皮蛋白(B0XDX1、B0W471、B0WRC4、B0W476、B0X2L3)、幼虫表皮蛋白(B0W470)、蛹表皮蛋白(B0WPT5、B0XI14)及表皮结构成份(B0X2L7)在内的氯氰菊酯抗性表皮蛋白富集组分均在蛋白水平下调。

既往有研究报道,埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)<sup>[19]</sup>、抗有机磷致倦库蚊(*Culex quinquefasciatus*)<sup>[20]</sup>和大叶库蚊(*Culex tarsalis*)<sup>[21]</sup>表皮增厚或化学组分改变可减少对有机磷的吸收。目前已经证实一些表皮蛋白基因在几种抗拟除虫菊酯的蚊虫中过度表达,包括斯氏按蚊<sup>[22]</sup>、冈比亚按蚊、不吉按蚊(*Anopheles funestus*)<sup>[8]</sup>及淡色库蚊<sup>[23]</sup>。近期研究表明,拟除虫菊酯抗性冈比亚按蚊和不吉按蚊较敏感按蚊有更厚的表皮层<sup>[24-25]</sup>。

代谢抵抗是通过蛋白水平或细胞色素 P450s、GST 等抗杀虫剂解毒酶活性的细微变化而发生<sup>[26-27]</sup>。P450 在许多重要内源分子的代谢中具有催化作用,使昆虫能够以更高的速率代谢杀虫剂<sup>[28-29]</sup>;P450 基因的上调或下调可能与杀虫剂解毒和蚊虫对细胞环境变化的稳态反应有关<sup>[30]</sup>。如大多数昆虫一样,淡色库蚊使用一套解毒酶来代谢杀虫剂等外源物。本研究通过蛋白组学研究直接鉴定发现了多种细胞色素 P450 并进行了注释,细胞色素 P450(B0XDA9)、细胞色素 P450 3A19(B0X758)、细胞色素 P450 4g15(B0WQV0、B0XHB7)、细胞色素 P450 9b1(B0W6Y4)、细胞色素 P450 单加氧酶 CYP9M10(E5E7H3)和细胞色素 P450 12b1(B0WTS3)。在本研究中,属于不同家族的 P450 蛋白表达水平在氯氰菊酯抗性选育前后发生显著变化,此外,许多其他研究也提示了细胞色素 P450 在不吉按蚊<sup>[8]</sup>和致倦库蚊<sup>[31-32]</sup>杀虫剂代谢中的关键作用。

除杀虫剂代谢和抗药性外,P450 酶在激素代谢或表皮碳氢化合物合成中也发挥着重要作用<sup>[33]</sup>。最近,负责长链脂肪醛氧化脱碳的 P450 酶<sup>[34]</sup>被证明是仅限于昆虫细胞色素 P450 CYP4G 亚家族<sup>[35]</sup>中的一员,具有清晰可识别的序列特征<sup>[35]</sup>,有趣的是,在本研究中,细胞色素 P450 4g15(B0WQV0、B0XHB7)正属于细胞色素 P450 CYP4G 家族。

本研究对淡色库蚊杀虫剂氯氰菊酯选育抗性株及敏感株进行蛋白质组学比较,在选育后的抗性淡色库蚊中同时存在多种杀虫剂抗性机制。通常情况下,

混合抗性机制提供了较单一抗性机制更高的抗性水平。此外,本研究还进一步支持了细胞色素 P450 基因在杀虫剂抗性中的作用,同时还暗示了表皮基因等其他基因家族也可能参与其中。对角质层蛋白和 P450 蛋白的功能研究可为鉴定杀虫剂抗性的热点奠定基础,这些结果显著增加了可用于其他蚊虫研究的分子资源,为了解蚊虫抗性发育过程中蛋白质表达水平的变化提供了一个框架,有助于更好地理解淡色库蚊抗性产生的基本机制,这可以为制定有效的杀虫剂抗性治理策略提供基础。

### 【参考文献】

- [1] Lounibos LP. Invasions by insect vectors of human disease [J]. Ann Rev Entomol, 2002, 47(1): 233-266.
- [2] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue [J]. Nature, 2013, 496(7446): 504-507.
- [3] Ranson H, N'guessan R, Lines J, et al. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? [J]. Trends Parasitol, 2011, 27(2): 91-98.
- [4] Hemingway J. The role of vector control in stopping the transmission of malaria: threats and opportunities [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2014, 369(1645): 20130431.
- [5] Toe KH, Jones CM, N'Fale S, et al. Increased pyrethroid resistance in malaria vectors and decreased bed net effectiveness, Burkina Faso [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(10): 1691-1696.
- [6] Kelvin AA. Outbreak of chikungunya in the Republic of Congo and the global picture [J]. J Infect Dev Ctries, 2011, 5(6): 441-444.
- [7] Hemingway J. An overview of insecticide resistance [J]. Science, 2002, 298(5591):96-97.
- [8] Gregory R, Darby AC, Irving H, et al. A de novo expression profiling of *Anopheles funestus*, malaria vector in Africa, using 454 pyrosequencing [J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17418.
- [9] Reid WR, Zhang L, Liu F, et al. The transcriptome profile of the mosquito *Culex quinquefasciatus* following permethrin selection [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47163.
- [10] Nwane P, Etang J, Chouaibou M, et al. Kdr-based insecticide resistance in *Anopheles gambiae* s.s populations in Cameroon: spread of the L1014F and L1014S mutations [J]. BMC Res Notes, 2011, 4: 463.
- [11] Alout H, Berthomieu A, Hadjivassilis A, et al. A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2007, 37(1): 41-47.
- [12] Shotkoski F, Zhang HG, Jackson MB, et al. Stable expression of insect GABA receptors in insect cell lines. Promoters for efficient expression of *Drosophila* and mosquito Rdl GABA receptors in stably transformed mosquito cell lines. [J]. FEBS Lett, 1996, 380(3): 257-262.
- [13] hemingway J. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34(7): 653-665.
- [14] Nardini L, Christian RN, Coetzer N, et al. DDT and pyrethroid re-

- sistance in *Anopheles arabiensis* from South Africa[J]. Parasit Vectors, 2013, 6(1): 229.
- [15] Liu N, Li T, Reid WR, et al. Multiple cytochrome P450 genes: their constitutive overexpression and permethrin induction in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23403.
- [16] Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, et al. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2011, 41(3): 203-209.
- [17] WHO. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides[EB/OL]. [1981-01-28] (2019-12-17). [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69615/WHO\\_VBC\\_81.807\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69615/WHO_VBC_81.807_eng.pdf).
- [18] Wang W, Zhou H, Lin H, et al. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards[J]. Anal Chem, 2003, 75(18): 4818-4826.
- [19] Kasai S, Komagata O, Itokawa K, et al. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(6): e2948.
- [20] Stone BF, Brown AW. Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied[J]. Bull World Health Organ, 1969, 40(3): 401-408.
- [21] Apperson CS, Georgiopoulos GP. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis* [J]. J Econ Entomol, 1975, 68(2): 153-157.
- [22] Vontas J, David JP, Nikou D, et al. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization[J]. Insect Mol Biol, 2010, 16(3): 315-324.
- [23] Wang W, Lv Y, Fang F, et al. Identification of proteins associated with pyrethroid resistance by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis in *Culex pipiens pallens*[J]. Parasit Vectors, 2015, 8: 95.
- [24] Wood O, Hanrahan S, Coetzee M, et al. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*[J]. Parasit Vectors, 2010, 3(1): 67.
- [25] Vannini L, Reed TW, Willis JH. Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species [J]. Parasit Vectors, 2014, 7: 24.
- [26] Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease.[J]. Annu Rev Entomol, 2000, 45: 371-391.
- [27] Feyereisen R. Insect P450 enzymes [J]. Ann Rev Entomol, 1999, 44: 507-533.
- [28] David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, et al. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013, 368(1612): 20120429.
- [29] Chandor-Proust CA. The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling[J]. Biochem J, 2013, 455(1): 75-85.
- [30] Yang T, Liu N. Genome analysis of cytochrome P450s and their expression profiles in insecticide resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29418.
- [31] Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T, et al. Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30(2): 163-171.
- [32] Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T. P450 monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say larvae[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 1998, 37(1): 47-56.
- [33] Feyereisen R. Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities[J]. Pest Manag Sci, 2015, 71(6): 793-800.
- [34] Reed JR, Vanderwel D, Choi S, et al. Unusual mechanism of hydrocarbon formation in the housefly: cytochrome P450 converts aldehyde to the sex pheromone component (Z)-9-tricosene and CO<sub>2</sub>[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(21): 10000-10004.
- [35] Qiu Y, Tittiger C, Wicker-Thomas C, et al. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(37): 14858-14863.

【收稿日期】 2020-12-18 【编辑】 钱熠礼

(上接第153页)

- cient origins, conserved structures, and divergent mechanisms [J]. Biomolecules, 2020, 10(1): 128.
- [19] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(1): 26-34.
- [20] Dematei A, Fernandes R, Soares R, et al. Angiogenesis in *Schistosoma haematobium*-associated urinary bladder cancer [J]. APMIS, 2017, 125(12): 1056-1062.
- [21] Chimponda TN, Mushayi C, Osakunor D, et al. Elevation of C-reactive protein, P-selectin and Resistin as potential inflammatory biomarkers of urogenital schistosomiasis exposure in preschool children[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 1071.
- [22] Herman AM, Kische A, Babu H, et al. Colorectal cancer in a patient with intestinal schistosomiasis: a case report from Kilimanjaro Christian Medical Center Northern Zone Tanzania [J]. World J Surg Oncol, 2017, 15(1): 146.
- [23] Yang Q, Qiu H, Xie H, et al. A *Schistosoma japonicum* infection promotes the expansion of myeloid-derived suppressor cells by activating the JAK/STAT3 pathway [J]. J Immunol, 2017, 198(12): 4716-4727.

【收稿日期】 2020-12-04 【编辑】 邓瑶