

河南省部分地区溴氰菊酯抗性中华按蚊 代谢酶活性的调查研究

祁欣^{1,2}, 张红卫³, 徐铁龙¹, 汤林华¹, 周水森¹, 郑彬¹

1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫与病原生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 中国检验认证集团河南有限公司, 河南 郑州 450008; 3 河南省疾病预防控制中心

摘要: **目的** 了解河南省部分地区溴氰菊酯抗性中华按蚊的代谢酶活性, 探讨中华按蚊对溴氰菊酯的代谢抗性机制。**方法** 2010 年 8 月在河南省桐柏、淮滨县和永城市采集中华按蚊样本, 子 1 代成蚊用接触筒内成蚊药膜滤纸接触法, 按照 WHO 标准, 区分溴氰菊酯抗性与敏感样本, 并用微量滴定板法测定抗性样本的非特异性酯酶、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)和 P450 单加氧酶活性。以实验室敏感品系蚊为对照。**结果** 淮滨、永城和桐柏三地中华按蚊抗性样本的 A、B 型非特异性酯酶活性均高于对照组($t=2.41, 3.30, 10.31, 7.67, 7.90, 11.17$, 均 $P<0.05$); 永城和淮滨地区中华按蚊抗性样本 GST 活性高于对照组的敏感品系($t=3.687, 2.484$, 均 $P<0.05$); 淮滨、永城及桐柏三地的中华按蚊抗性样本和敏感品系的 P450 单加氧酶活性的差异均无统计学意义($t=-1.489, 0.397, -0.413$, 均 $P>0.05$)。**结论** 永城、淮滨两个地区中华按蚊的溴氰菊酯抗性与酯酶和 GST 活性增高有关; 桐柏地区中华按蚊的溴氰菊酯抗性与酯酶活性增高有关。

关键词: 溴氰菊酯; 中华按蚊; 非特异性酯酶; 谷胱甘肽 S 转移酶; P450 单加氧酶

中图分类号: R384.1; S482.3; Q55 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2012)06-0536-03

Investigation of activity of metabolic enzymes in deltamethrin-resistant *Anopheles sinensis* from some regions of Henan province, China

QI Xin^{1,2}, ZHANG Hong-wei³, XU Tie-long¹, TANG Lin-hua¹, ZHOU Shui-sen¹, ZHENG Bin¹

1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China; 2 China Certification & Inspection Group Henan Co., Ltd, Zhengzhou 450008, Henan Province, China; 3 Henan Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: ZHENG Bin, Email: chuner97@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the activity of metabolic enzymes in *Anopheles sinensis* from some regions in Henan province, China and the mechanism of metabolic resistance to deltamethrin in *An. sinensis*. **Methods** *An. sinensis* samples were collected from Tongbai county, Huaibin county, and Yongcheng city (county-level) in Henan province in August 2010. The adult mosquitoes of the next generation were divided into deltamethrin-resistant group and deltamethrin-sensitive group by filter contact method according to WHO standard. The activity of metabolic enzymes in deltamethrin-resistant mosquitoes, including nonspecific esterase, glutathione S-transferase (GST), and P450 monooxygenase, was measured by microtiter plate method. The laboratory sensitive strain of *An. sinensis* was used as the control. **Results** The activity of types A and B nonspecific esterases was significantly higher in the deltamethrin-resistant samples from Tongbai, Huaibin, and Yongcheng than in the control group ($t=2.41, t=3.30, t=10.31, t=7.67, t=7.90, t=11.17, P<0.05$ for all comparisons). The activity of GST in the deltamethrin-resistant samples from Yongcheng and Huaibin was higher than that in the control group ($t=3.687, t=2.484, P<0.05$ for both comparisons). There were no significant differences in the P450 monooxygenase activity between the deltamethrin-resistant samples from Huaibin, Yongcheng, and Tongbai and the control group ($t=-1.489, t=0.397, t=-0.413, P>0.05$ for all comparisons). **Conclusion** The deltamethrin resistance in *An. sinensis* from Yongcheng and Huaibin are related to the increased activity of esterase and GST, but the deltamethrin resistance in *An. sinensis* from Tongbai is only related to the increased activity of esterase.

Key words: Deltamethrin; *Anopheles sinensis*; Nonspecific esterase; Glutathione S-transferase; P450 monooxygenase

根据卫生部颁发的《中国消除疟疾行动计划(2010—2020年)》要求,我国将于2020年在全国范围内消除疟疾。中华按蚊(*Anopheles sinensis*)是我国主要的传疟媒介之一,应用杀虫剂防蚊、灭蚊,切断传播

途径是重要的防治策略和措施。溴氰菊酯是一种拟除虫菊酯类杀虫剂,对哺乳动物毒性低和持效期长,在我国广泛使用。伴随其广泛使用,包括中华按蚊在内的许多蚊种对溴氰菊酯均产生了抗性,而抗药性的产生无疑给我国疟疾防控和消除带来一定的困难。本研究调查了河南省部分地区溴氰菊酯抗性中华按蚊的非特异性酯酶、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)和 P450 单加氧酶活

作者简介:祁欣(1986-),女,硕士研究生,从事医学昆虫学研究。

Email: qingxincool4@yahoo.com.cn

通讯作者:郑彬, Email: chuner97@yahoo.com.cn

性,并与实验室的溴氰菊酯敏感中华按蚊酶活性进行比较,以探讨中华按蚊对溴氰菊酯的代谢抗性机制。

1 材料与方 法

1.1 样本来源 2010年8月在河南省桐柏、淮滨县和永城市的猪圈和牛房中采集中华按蚊饱血成蚊,用10%葡萄糖水饲养至子1代羽化。将羽化1日龄的中华按蚊雌性成虫进行溴氰菊酯抗药性生物测定,并将抗药性检测后仍存活的样本定为抗性样本,检测其代谢酶活性。实验室对照敏感品系由江苏省血吸虫病防治研究所惠赠。

1.2 抗药性生物测定 使用WHO统一标准药膜滤纸,溴氰菊酯浓度为0.05%(0.0178 g/m²)。以WHO区分剂量标准进行测定^[1],间隔10 min记录蚊虫击倒数量,同时对对照药膜代替溴氰菊酯药膜设为对照。接触溴氰菊酯药膜60 min后的蚊虫移入恢复筒中饲以10%葡萄糖水,恢复饲养24 h后检查死亡数,计算校正死亡率。死亡蚊虫为溴氰菊酯敏感蚊,存活蚊虫为溴氰菊酯抗性蚊,并根据死亡率判定群体抗性级别。死亡率>98%为敏感群体(S),死亡率在80%~97%为初步抗性群体(M),死亡率<80%为抗性群体(R)。

1.3 代谢酶活性测定 按照Penilla等^[2]的方法,对溴氰菊酯抗药性生物测定恢复饲养24 h后(2日龄)的抗性样本及2日龄敏感品系进行GST、非特异性酯酶和P450单加氧酶活性测定。

1.4 统计学处理 使用SPSS 16.0软件,用独立样本t检验,对淮滨、桐柏县和永城市的抗性样本和敏感品系样本的代谢酶活性进行统计学分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 抗药性生物测定 淮滨、永城和桐柏地区中华按蚊60 min击倒率为20%~50%,校正死亡率为21.18%~73.33%;依据WHO抗药性评价指标判定,3个地区的中华按蚊均为溴氰菊酯抗性群体(R)。实验室敏感品系中华按蚊的60 min击倒率为100%,校正死亡率为98.06%,依据WHO抗性评价指标判定,为溴氰菊酯敏感群体(S)(表1)。

表1 实验室敏感品系及河南省部分地区中华按蚊对溴氰菊酯(0.05%)抗性测定结果

Table 1 Resistance to deltamethrin (0.05%) in laboratory sensitive strain of *An. sinensis* and *An. sinensis* samples from three regions in Henan province

采样点	0.05%溴氰菊酯(60 min)			抗性级别
	样本数(n)	击倒率(%)	校正死亡率(%)	
实验室对照	103	100.0	98.06	S
桐柏县	105	48.5	73.33	R
淮滨县	118	16.4	21.18	R
永城市	106	20.0	28.30	R

2.2 非特异性酯酶活性测定 淮滨、永城和桐柏3个地区中华按蚊抗性样本的 α -萘酚产量与敏感品系样本比较均有统计学意义($t=2.41, 3.30, 10.31$, 均 $P<0.05$),且3个地区中华按蚊抗性样本的 β -萘酚产量与敏感品系样本比较差异亦均有统计学意义($t=7.67, 7.90, 11.17$, 均 $P<0.05$)(表2),表明3个地区中华按蚊抗性与非特异性酯酶A、B两型的活性增加有关。

表2 河南省部分地区中华按蚊抗性样本与实验室敏感品系样本非特异性酯酶活性测定结果

Table 2 Nonspecific esterase activity in laboratory sensitive strain of *An. sinensis* and deltamethrin-resistant *An. sinensis* samples from three regions in Henan province

组 别	样本数(n)	α -萘酚消耗速率(pmol/min)	β -萘酚消耗速率(pmol/min)
实验室敏感品系样本	47	0.41±0.08	0.39±0.09
淮滨溴氰菊酯抗性样本	92	0.50±0.27	0.69±0.34
永城溴氰菊酯抗性样本	44	0.51±0.17	0.70±0.24
桐柏溴氰菊酯抗性样本	32	0.72±0.15	0.87±0.23

2.3 GST活性测定 淮滨和永城两地中华按蚊抗性样本的1-氯-2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, CDNB)结合产物量均数与实验室敏感品系样本比较差异均有统计学意义($t=2.484, 3.687$, 均 $P<0.05$);桐柏地区中华按蚊抗性样本的CDNB结合产物量均数与实验室敏感品系样本比较差异无统计学意义($t=1.599, P>0.05$)(表3)。

表3 河南省部分地区中华按蚊抗性样本与实验室敏感品系样本GST活性测定结果

Table 3 GST activity in laboratory sensitive strain of *An. sinensis* and deltamethrin-resistant *An. sinensis* samples from three regions in Henan province

组 别	样本数(n)	GST活性(mmol/min)
实验室敏感品系样本	25	0.031±0.011
淮滨溴氰菊酯抗性样本	93	0.038±0.015
永城溴氰菊酯抗性样本	38	0.040±0.021
桐柏溴氰菊酯抗性样本	30	0.033±0.015

2.4 P450单加氧酶活性测定 淮滨、永城和桐柏3个地区中华按蚊抗性样本的P450单加氧酶活性与实验室敏感品系样本比较差异均无统计学意义($t=-1.489, 0.397, -0.413, P>0.05$)(表4)。

表4 河南省部分地区中华按蚊抗性样本与实验室敏感品系样本P450单加氧酶活性测定结果

Table 4 P450 monooxygenase activity in laboratory sensitive strain of *An. sinensis* and deltamethrin-resistant *An. sinensis* samples from three regions in Henan province

组 别	样本数(n)	产物(μ mol/min)
实验室敏感品系样本	25	0.0125±0.0135
淮滨溴氰菊酯抗性样本	93	0.0174±0.0149
永城溴氰菊酯抗性样本	44	0.0148±0.0105
桐柏溴氰菊酯抗性样本	31	0.0137±0.0058

3 讨论

随着卫生和农业杀虫剂的大量使用,自1993年以来,时有我国中华按蚊对拟除虫菊酯类杀虫剂敏感性降低甚至产生抗性的报道^[3-4],而对其抗性机制的研究,仅有部分 *kdr* 基因突变的相关研究^[5-6]。国外研究表明,非特异性酯酶、GST和P450单加氧酶由于在杀虫剂代谢过程中的重要作用,其与昆虫对杀虫剂产生抗性有关。

酯酶是蚊虫体内主要代谢水解杀虫剂的酶之一。Hernandez等^[7]的研究中,比较了拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性品系和敏感品系微小牛虻(*Boophilus microplus*)羧酸酯酶mRNA的表达水平,发现在微小牛虻拟除虫菊酯类抗性品系中,酯酶的mRNA表达量明显上升。Vulule等^[8]在肯尼亚冈比亚按蚊(*Anopheles gambiae*)的抗氯菊酯种群中发现酯酶活性升高的现象。此外众多研究,通过测定酶活性或其表达量,发现在拟除虫菊酯类杀虫剂抗性蚊虫中均发现酯酶活性增强的现象^[9-11]。本研究中,桐柏、淮滨和永城3个地区溴氰菊酯抗性中华按蚊样本的非特异性酯酶活性都高于实验室敏感品系样本。该结果提示,非特异性酯酶活性的增高与中华按蚊对溴氰菊酯杀虫剂的抗性有关。

GST可以参与代谢拟除虫菊酯类杀虫剂的次级代谢物或催化其代谢产物与谷胱甘肽结合从而起到屏蔽作用而使昆虫产生抗药性^[12]。Etang等^[13]在冈比亚按蚊中发现DDT和拟除虫菊酯类抗性种群的GST活性升高。Hunt等^[14]将现场捕回的吸血蚊分为2组进行同步繁殖饲养,其中一组用0.1%的高效氯氟氰菊酯逐代筛选处理,结果发现,筛选组蚊虫的抗药性逐代升高,并且在繁殖至F3代后,其在1~4、10、14、20 d蚊龄时,酶活性均比未经筛选蚊的要高。本研究中淮滨和永城两地中华按蚊抗性组的GST活性高于实验室敏感组;桐柏县中华按蚊抗性样本与实验室敏感品系样本的GST活性差异无统计学意义。该结果提示,在淮滨和永城县的中华按蚊抗性样本中,GST活性的增高可能为其抗性机制。

P450单加氧酶是蚊虫体内重要的起代谢解毒作用的酶,因其具有可诱导性的特点,所以是蚊虫增加自我保护和适应外界环境的重要解毒酶^[15-16]。本研究检测了桐柏、淮滨和永城3个地区中华按蚊的P450单加氧酶的活性,但3个地区的中华按蚊抗性样本与实验室敏感品系样本的P450单加氧酶活性未见差异。

本研究中桐柏县中华按蚊的溴氰菊酯抗性与酯酶活性增高有关,永城和淮滨两地中华按蚊溴氰菊酯抗性与酯酶和GST活性增高有关,不同地区中华按蚊溴

氰菊酯抗性机制不同可能与当地环境和杀虫剂使用方式有关,具体原因有待进一步研究。

参考文献

- [1] WHO. Report of the WHO informal consultation. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces [R]. Geneva: WHO, 1998:12-14.
- [2] Penilla RP, Rodriguez AD, Hemingway J, et al. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico [J]. Med Vet Entomol, 1998, 12(3):217-233.
- [3] 蒋诗国,雷心田,夏瑞恒,等.重庆市中华按蚊对杀虫剂抗性检测报告[J]. 现代预防医学, 1993, 20(4):236-237.
- [4] 潘波,朱泰华,刘勇鹰,等.我国主要传疟媒介对杀虫剂的敏感性现状[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2001, 12(2):145-148.
- [5] 王金福,陆绍红,陈健行,等.中华按蚊对拟除虫菊酯抗性因子分布频率的研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 1996, 7(3):166-169.
- [6] 祁欣,崔晶,张红卫,等.河南省中华按蚊抗药性及其与 *kdr* 突变关联性的初步研究[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2011, 38(4):200-203.
- [7] Hernandez R, Guerrero FD, George JE, et al. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(9):1009-1016.
- [8] Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, et al. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets [J]. Med Vet Entomol, 1999, 13(3):239-244.
- [9] Givemore M, Hieronymo TM, Basil DB, et al. Pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles arabiensis* from Gwave, a malaria-endemic area in Zimbabwe [J]. Malaria J, 2008, 7(1):247-257.
- [10] Johnson M, Manisha AK, Franklin WM, et al. Biochemical basis of permethrin resistance in *Anopheles arabiensis* from Lower Moshi, north-eastern Tanzania [J]. Malaria J, 2010, 9(1):193-201.
- [11] 李士根,蒋滨,甄天民,等.微量滴定板法测定蚊虫非特异性酯酶检测抗药性的研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2002, 13(3):178-180.
- [12] Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens* [J]. Biochem J, 2001, 357(1):65-72.
- [13] Etang J, Manga L, Toto JC, et al. Spectrum of metabolic-based resistance to DDT and pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. populations from Cameroon [J]. J Vector Ecol, 2007, 32(1):123-133.
- [14] Hunt RH, Brooke BD, Pillay C, et al. Laboratory selection for and characteristics of pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus* [J]. Med Vet Entomol, 2005, 19(3):271-275.
- [15] Bergé J, Feyereisen R, Amichot M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects [J]. Trans R Soc Biol Sci, 1998, 353(1376):1701-1705.
- [16] Liu N, Xu Q, Zhu F, et al. Pyrethroid resistance in mosquitoes [J]. Insect Sci, 2006, 13(3):159-166.

收稿日期:2012-06-19