

溴氰菊酯诱导果蝇细胞毒性及相关基因表达的变化

焦东旭, 李娜, 程晨, 葛春男, 程罗根

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 溴氰菊酯(deltamethrin, DM)是一种神经毒剂,由于其高效、低毒而被广泛用于农业害虫的防治. 长期大范围不合理的使用导致害虫产生抗药性,但目前其确切的抗药性作用机制仍不十分清楚. 本研究对溴氰菊酯细胞毒性的研究显示 DM 染毒可以使果蝇 Kc 细胞增殖、细胞形态和细胞活性发生明显变化. 较低和较高浓度的 DM 能明显抑制细胞活性,在 15 ppm 诱导下果蝇细胞的活性有一定程度的升高. 实时荧光定量 PCR 和免疫印迹分析结果显示,经 DM 处理后的果蝇 Kc 细胞中与氧化应激反应和免疫相关的基因的表达量显著上调. 本研究对细胞毒性和基因表达差异的检测,为进一步探讨与溴氰菊酯抗药性相关的细胞和分子毒理提供了研究基础.

[关键词] 溴氰菊酯,细胞毒性,实时荧光定量 PCR,免疫印迹分析

[中图分类号] S481+4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)02-0106-06

Induction of the Cytotoxicity and the Relative Genes Expression Response of Deltamethrin in Drosophila Kc cells

Jiao Dongxu, Li Na, Cheng Chen, Ge Chunnan, Cheng Luogen

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Deltamethrin (DM) is a kind of nerve agent, and commonly used in controlling crop pests, because of the high efficacy, low toxicity. Widespread and improper use of DM induced insect resistance, but the resistance mechanism is not clear at present. Cytotoxicity analysis reveals that the cells proliferation, cellular morphology and cells viability have significant changes under DM stress. Too Low or too high concentration of DM could obviously inhibit the activity of cells. Under 15 ppm treatment, cell activity was higher. Real-time quantitative PCR and western-blotting analysis demonstrated that the genes associated with oxidative stress and immune responses were induced sharply under DM stress. Our research focuses on the cytotoxicity and gene differential expression, these results can provide basis for the study of molecular toxicology and mechanism of deltamethrin resistance.

Key words: deltamethrin, cytotoxicity, real-time quantitative PCR, western blotting

溴氰菊酯是杀虫活性高、击倒速度快、杀虫谱广、对人畜低毒的一类杀虫剂,因此在防治卫生害虫和农作物害虫中占有重要地位^[1]. 长期大量不合理使用杀虫剂会导致害虫抗药性的产生与发展,代谢抗性是重要的抗性机制. 昆虫的代谢抗性主要是昆虫在杀虫剂的选择压力下,诱导体内解毒酶基因的扩增和过表达,使得代谢酶的活性显著提高,加速体内杀虫剂的代谢使其变成低毒或无毒物质,由此产生对杀虫剂的抗性^[2]. 昆虫体内代谢解毒酶主要有以下三类:谷胱甘肽 S-转移酶, P450 单加氧酶,酯酶^[3]. 溴氰菊酯的代谢是多种基因,多种信号通路协同相互作用来实现的.

近年来有关杀虫化合物诱导的昆虫细胞毒性作用的文献报道渐多,其中杀虫剂对昆虫细胞凋亡诱导作用引起的细胞形态和细胞活性是关注的重点,戴璇颖等^[4]采用荧光染色、单细胞凝胶电泳、流式细胞仪等技术研究认为,莠去津浓度处理家蚕卵巢培养细胞后 24 h 可诱导产生明显的细胞凋亡等一系列细胞形态的变化,且有明显的时间—剂量效应,方心葵等^[5]报道氰戊菊酯以 25 $\mu\text{mol/L}$ 处理粉纹夜蛾离体细胞 (Tn) 时,细胞死亡与凋亡数明显高于对照. 田间获得的和室内筛选的杀虫剂抗性昆虫品系高表达一系列

收稿日期:2013-11-28.

基金项目:江苏省高校优势学科(生物学)建设工程项目、江苏省研究生科研创新计划项目、南京师范大学大学生实践创新训练计划项目.

通讯联系人:程罗根,博士,教授,研究方向:分子遗传学,遗传毒理学. E-mail:chengluogen@njnu.edu.cn

的解毒基因,表明抗药性与解毒基因表达之间具有相关性^[6,7].在杀虫剂胁迫下会引起昆虫体内的应激反应,进而诱导复杂的、特异的调控机制,其中包括对关键杀虫剂代谢基因的转录调控^[8].许多研究已经报道杀虫剂胁迫下基因转录水平的变化,在家蝇体内 CYP6D1 基因的过表达导致其对拟除虫菊酯的抗药性^[9].在 K⁺去极化条件下,分析溴氰菊酯对敏感、抗性家蝇品系脑突触体释放神经递质去甲肾上腺素的影响.结果表明家蝇对溴氰菊酯的抗性与 Na⁺通道的亲和性降低有关^[10].进一步寻求农药抗性防治的可能途径和靶点是本研究的重点.

Kc 细胞系是从果蝇卵巢中分离而建立的离体培养昆虫细胞系,是深入研究活性物质作用机制的理想实验材料,本研究以果蝇 Kc 细胞为模式系统,研究在溴氰菊酯胁迫下,果蝇细胞的细胞毒性、形态学分析以及相关基因表达量的变化,并通过 mRNA 水平实时定量 PCR 和蛋白水平的免疫印迹分析对涉及氧化还原反应和免疫反应的基因进行检测和分析,为昆虫抗性机理研究和抗性防治工作提供新思路和新途径.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

溴氰菊酯(纯度≥98%)购自上海农药研究所,以二甲基亚砜(DMSO)溶解,0.2 μm 滤膜过滤,制备浓度为 100 ppm 的储备液,并用 DMSO 稀释成 6 个浓度梯度:5 ppm,10 ppm,15 ppm,20 ppm,30 ppm,50 ppm 备用;无血清昆虫细胞培养基(SH30278.02)购自 Thermo 生物公司;CCK-8 试剂盒购自 Dojindo 公司;TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司;PrimeScript[®] RT reagent Kit 和 SYBRGreen I 购自 Takara 公司;引物由上海生工股份有限公司代为合成.BCA 蛋白定量试剂盒购自上海捷瑞生物有限公司,Anti-NOS 和 Anti-SOD 以及辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 均购自 abcam 公司,Ultra ECL 显色试剂盒购自浙江杭州联科生物有限公司,硝酸纤维素膜(NC 膜)购自美国 Millipore 公司.其他未特别说明均为分析纯试剂和常规耗材,细胞继代培养、冻存复苏按常规方法进行.

1.1.2 细胞

果蝇 Kc 细胞由东南大学生命科学研究院韩俊海教授课题组惠赠,在无 CO₂,28 ℃ 细胞培养箱中培养,该细胞是半贴壁细胞,细胞形态为均匀圆形,个别呈双极梭型.培养基为无血清昆虫细胞培养基,每隔 3 d~4 d 更换一次.

1.2 方法

1.2.1 细胞传代培养

用无血清昆虫细胞培养基培养果蝇细胞,每隔 3 d~4 d 更换一次.传代过程中,先吸除上清培养基,然后加入新鲜培养基反复轻轻吹打,尽量降低对细胞的化学和机械损伤,使半贴壁的果蝇细胞完全悬浮,然后转入新的 6 cm 培养皿中继续培养.待细胞生长稳定后,更换新的培养基,将 Kc 细胞制成单细胞悬液,以 1×10⁴ 个/100 μL/孔接种于 96 孔板,于 28 ℃ 无 CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,使细胞处于对数生长期.

1.2.2 溴氰菊酯诱导果蝇细胞

用二甲基亚砜(DMSO)将溴氰菊酯母液稀释成一系列的浓度梯度(5 ppm,10 ppm,15 ppm,20 ppm,30 ppm,50 ppm).上述 96 孔板的细胞在 28 ℃ 培养 24 h 后分别加入 2 μL 一系列不同浓度的溴氰菊酯,每个药物浓度组设 3 个复孔,空白对照组亦设 3 个复孔(只加 100 μL 培养基).加药后重新放至细胞培养箱中,相同条件下培养 24 h.

1.2.3 倒置显微镜下细胞形态特征变化

形态学变化是果蝇细胞在 DM 胁迫下最易观察到的现象,通过倒置显微镜可清晰观察到细胞的形态特征及生长状况,是初步判断细胞活性的最常用最直观依据.挑选经 DM 诱导后细胞活性较高的处理组放在倒置显微镜下(目镜 10× 物镜 20×)观察记录处理 24 h 后细胞的形态特征变化.

1.2.4 细胞毒性检测

加药 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂(Dojindo,Japan),28 ℃ 孵育 4 h 后在酶标仪上检测各孔的光吸收值,选择波长 450 nm;与对照组相比,利用下列公式计算细胞相对存活率.

$$\text{细胞活力}(\%) = [A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(\text{不加药}) - A(\text{空白})] \times 100\%.$$

式中,A(加药):具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的吸光度;A(空白):具有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的吸光度;A(不加药):具有细胞和 CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的吸光度。

1.2.5 溴氰菊酯诱导细胞相关基因 mRNA 表达量的变化

将果蝇细胞分为实验组和对照组,实验组以终浓度 15 ppm 的溴氰菊酯处理细胞,对照组不加溴氰菊酯而给予等体积 DMSO 处理细胞,其余同实验组。另外再设正常果蝇细胞不加溴氰菊酯也不加 DMSO 作为空白对照组。

1.2.5.1 细胞总 RNA 提取

将 3 组细胞悬液转移到离心管中,4 ℃、8 000 r/min 离心 2 min,弃上清。向每 10⁷ 个细胞中加入 1 mL~2 mL 的 Trizol,用移液枪反复吹吸直至裂解液无明显沉淀,室温静置 5 min,加入 200 μL 氯仿,用力颠倒混匀,室温静置 5 min,吸取上清转移到另一新的离心管中,加入等体积异丙醇,混匀后静置 10 min,4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min,弃上清。加入 1 mL 的 DEPC 水清洗沉淀,4 ℃、13 000 r/min 离心 5 min,弃上清,干燥沉淀,溶于适量的 DEPC 水中至 RNA 完全溶解并进行凝胶电泳检测其纯度和完整性。

1.2.5.2 实时荧光定量 PCR 检测基因 mRNA 表达量的变化

按照 Primerscript™ RT reagents kit (TaKaRa, Japan) 操作说明进行 cDNA 第一链的合成,反应体系如下:

试剂	使用量
5×Primerscript™ buffer	2 μL
Primerscript™ RT enzyme Mix I	0.5 μL
Oligo dT primer	0.5 μL
Random 6 mers	0.5 μL
Total RNA	500 ng
RNAase free H ₂ O	加至 10 μL

反转录反应条件:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。

利用合成的 cDNA 为模板,以 18S rRNA 为内参标准基因,根据 FlyBase 中已有的果蝇基因序列,用 Primer Primer 5.00 设计并合成目的基因和内参基因的引物。实时荧光定量 PCR 反应体系为 25 μL,根据 SYBRGreen I 试剂盒的说明书按步骤进行操作,为保证结果的可靠性,重复实验 3 次。

HO-1、NOS、PGRP-LD、18S rRNA 特异性荧光定量引物序列如下:

No	Gene	Forward primer	Reverse primer
1	Nitric oxide synthase (Nos)	TTTGGACGCGCCTTATCGAA	TGTTAGACTCACCTGTGCATTGA
2	Heme oxygenase-1 (HO-1)	ATGTCAGCGAGCGAAGAAAC	GTCATCAGAAAGGGCAAGTG
3	Peptidoglycan recognition protein LD (PGRP-LD)	GCTGCCCTACAACCTTCT	CCATCACCAACGAGTCTATT
4	18S rRNA	CGGCTACCACATCTAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT

1.2.6 免疫印迹分析相关蛋白表达量的变化

为了进一步鉴定溴氰菊酯胁迫下相关蛋白质表达量的变化情况,进行以下 Western blotting 实验。

1.2.6.1 蛋白样品的提取和制备

根据总蛋白提取试剂盒的说明书,按步骤分别从 15 ppm 处理、DMSO 处理和未被处理的正常果蝇细胞中提取蛋白质,所有提取蛋白质的操作都在冰上进行。然后用 BCA 定量方法确定蛋白质的浓度。取 20 μg~100 μg 的总蛋白,加入同样体积的 2×蛋白上样缓冲液,于沸水中煮 5 min(高温使蛋白质变性,伸展结合 SDS),然后 6 000 r/min 离心 2 min,取上清待用。

1.2.6.2 Western blotting 分析

用上海天能公司的电泳仪 EPS-300 对蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,分离胶为 12%,浓缩胶为 4%。电泳完毕后将胶剥离,然后电转印到 NC 膜上。转膜后,经 Western blotting 封闭液室温振荡,取下 NC 膜,TBS 短暂漂洗后经 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h,TBST 漂洗 3 次后与 Anti-SOD, Anti-NOS (NOS 1:1 000, Sod-1 1:1 000) 多抗 4 ℃ 孵育过夜,次日 TBST 漂洗 3 次,与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG (1:5 000) 孵育 1 h,最后 TBST 洗膜 3 次。按 Ultra ECL 试剂盒的说明,来进行显色反应,在暗盒内曝光拍照。利用 Image J software 分析图片的灰度值,并进行统计学分析。各实验组待测蛋白的表达水平用与对照组待测蛋白的平均表达水平的比值表示。

1.2.7 统计分析

采用 SPSS 12.0 软件进行应用单因素方差分析和最小显著差法分析。

2 结果与分析

2.1 溴氰菊酯诱导的细胞形态的变化

正常细胞形态规则,生长状态良好,细胞长势一致,排列紧密,大部分处于贴壁状态(图1(a)). 溴氰菊酯处理果蝇 Kc 细胞 24 h,低浓度组细胞形态与正常 Kc 细胞相比无明显变化,但细胞密度较对照组低;高浓度处理时细胞发生明显的形态特征的改变(图1(b)),细胞增殖缓慢,贴壁细胞明显减少,能够贴壁的细胞多有出泡现象,多数细胞飘浮聚集成团。

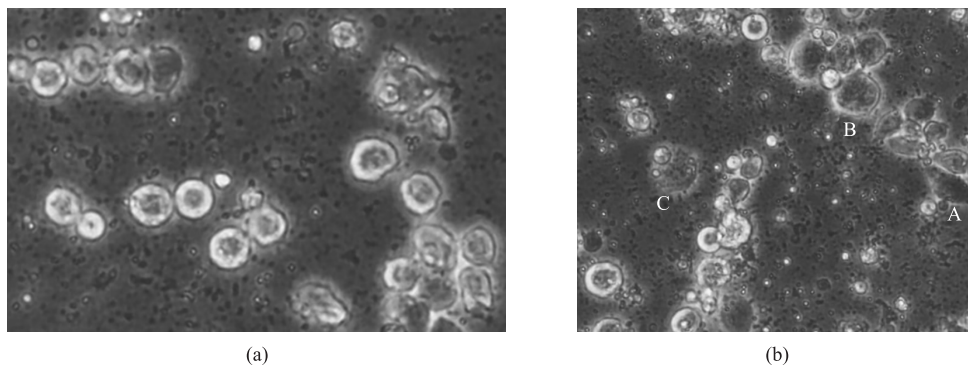


图1 溴氰菊酯诱导的果蝇 Kc 细胞的倒置显微形态特征变化

Fig.1 Morphological changes in Kc cells induced by DM observed by inverted phase contrast microscope

(a) 正常 Kc 细胞形态:小的,圆形,表面光滑。(b) 15 ppm 处理后细胞形态变化,有皱缩(A),出泡(B),细胞表面不光滑(C)。

(a) The morphology of normal *Drosophila* Kc cells; small, round cells and smooth edge. (b) After 15 ppm DM treatment we observed the distinct morphological features, such as shrinkage(A) and blebbing(B), the edge was not smooth(C).

2.2 溴氰菊酯诱导的细胞毒性的变化

细胞毒性分析发现,在 5 ppm ~ 50 ppm DM 的浓度范围内细胞活性先大幅度降低后出现升高,说明较低和较高浓度的 DM 都能明显抑制细胞活性,并具有浓度依赖性(图2)。在 15 ppm 处理细胞时,细胞活性达到较高水平,随着农药浓度的增高细胞活力显著降低。

2.3 溴氰菊酯诱导基因表达量的变化

经不同浓度的 DM 处理后,提取细胞内的总 RNA 进行凝胶电泳检测其纯度和完整性(图3),将 RNA 反转录成 cDNA 进行实时荧光定量检测,结果表明一定浓度的 DM 诱导果蝇细胞内血红素加氧酶(HO-1)的 mRNA 的表达量显著上调,其中 15 ppm 浓度处理后的细胞上调水平较明显,这和细胞毒性检测结果一致,进一步说明了 15 ppm 可作为适合的处理浓度。实时荧光定量结果显示,15 ppm 浓度处理后细胞内的一氧化氮合酶(NOS)和肽聚糖识别蛋白(PGRP-LD)的 mRNA 的表达量也出现了显著上调(图4),这种基因表达量的变化和细胞活力的变化呈正相关。

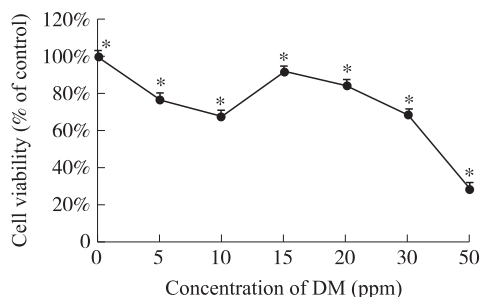


图2 CCK-8 试剂盒对细胞毒性的检测

Fig.2 Cytotoxicity assay using CCK-8 kit

用一系列浓度梯度的溴氰菊酯处理果蝇细胞 24 h 后检测细胞的存活率。实验重复 3 次。

Drosophila Kc cells were treated with DM for 24 h and measured the viability after treatment. The same experiment was done for three times.

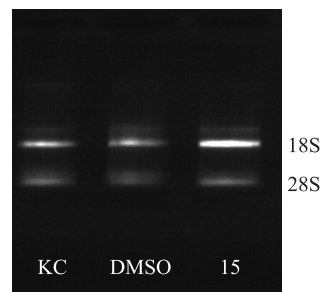


图3 总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.3 The total RNA to electrophoresis on a 1% agarose gel

3 μ g 的总 RNA 用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,溴化乙锭染色显示其相对浓度和完整性。

3 μ g of the total RNA to electrophoresis on a 1% agarose gel and then stained with ethidium bromide to determine the relative intensities and the integrity.

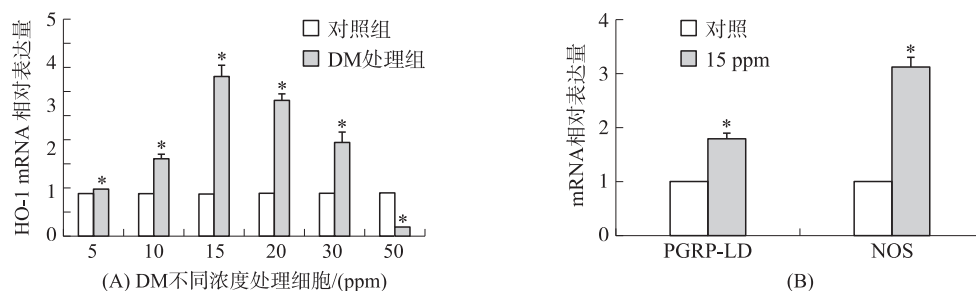


图4 溴氰菊酯诱导果蝇 Kc 细胞基因 mRNA 的表达量变化

Fig.4 mRNA expression changes of *Drosophila* Kc cells induced by DM

(A)不同浓度溴氰菊酯处理后 HO-1 mRNA 表达量的变化;(B)15 ppm 浓度诱导 PGRP-LD 和 NOS mRNA 表达量的变化.

(A)HO-1 mRNA expression changes after different concentrations of DM treatment. (B) PGRP-LD, NOS mRNA expression changes under 15 ppm DM stresses.

2.4 溴氰菊酯诱导蛋白质表达量的变化

Western blotting 结果显示,在 15 ppm 的溴氰菊酯胁迫下,细胞内超氧化物歧化酶(Sod)和一氧化氮合酶(Nos)的表达量显著上调(图5),这2种酶主要参与细胞内的氧化还原反应,保护细胞免受过氧化反应的损伤.

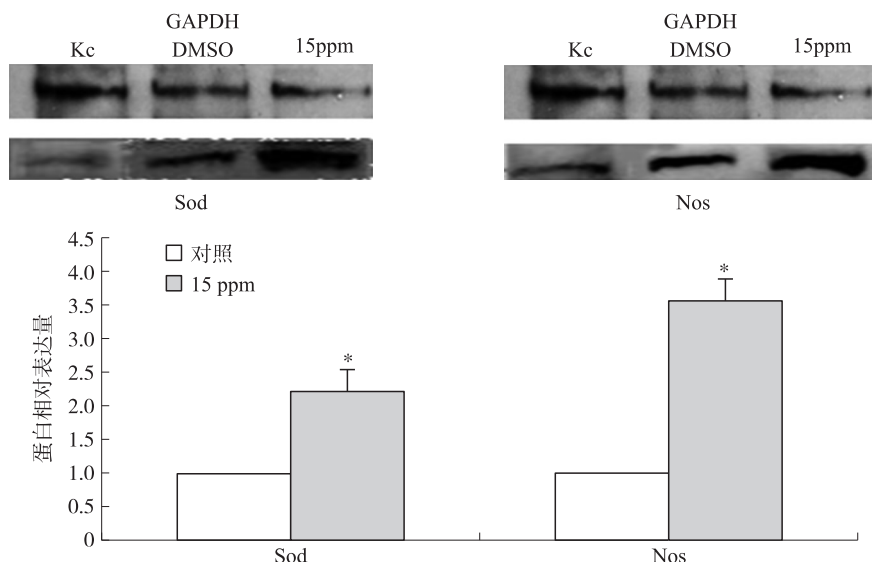


图5 免疫印迹分析差异基因在蛋白水平的表达

Fig.5 Western blotting analysis of differential gene expression at the protein level

(A)表示分子量为 18 kDa 的超氧化物歧化酶的印迹分析;(B)表示分子量为 155 kDa 的一氧化氮合酶的印迹分析. 正常未被处理细胞(Kc)和溶剂(DMSO)处理组作为对照组,GAPDH 作为内参.

(A)Representative immunoblot of Sod, which has a molecular weight of 18 kDa. (B) Representative immunoblot of Nos, molecular weight of 155 kDa. Kc and DMSO were seen as control. Western blot for GAPDH, a cytoplasmic marker, was used to internal control.

3 讨论

用倒置显微镜观察溴氰菊酯胁迫下细胞形态的变化,直观快速判断农药是否具有明显的昆虫细胞诱导效果,结合细胞毒性检测初步确定一种较为合适的溴氰菊酯处理浓度. 研究表明,溴氰菊酯对果蝇细胞具有明显的增殖抑制作用,细胞形态发生显著变化,影响细胞骨架结构,使细胞的贴壁粘附能力降低.

溴氰菊酯对细胞的增殖抑制作用可能是影响害虫生长发育的原因之一,细胞是构成果蝇个体的基本单位,是生物体进行物质和能量交流的主要场所. 细胞活力与状态直接影响昆虫的生命活动.

细胞形态及骨架的变化可能是由于细胞微管和微丝结构受到影响,由微管蛋白组成的纺锤丝也受到影响,使细胞的有丝分裂受到抑制. 复制后的染色体不能分开而造成细胞膨大,从而影响细胞的正常功能.

根据 CCK-8 试剂盒细胞毒性检测结果显示在 15 ppm 浓度处理下细胞活性较 10 ppm 时明显增高,可以推测 15 ppm 处理时 DM 诱导了一系列与药物代谢相关的基因的表达,进而启动复杂的解毒机制,加速

代谢进入昆虫体内的杀虫剂,由此产生对杀虫剂的抗性^[11].在细胞水平我们发现细胞能抵抗溴氰菊酯的胁迫而出现活力增强的现象,RT-qPCR 结果也显示经不同浓度处理后 HO-1、NOS、PGRP-LD mRNA 的表达量均显著上调,Western blotting 分析结果显示 Sod 和 Nos 的表达量也显著上调.血红素加氧酶(Heme Oxygenase,HO)是催化血红素在体内氧化降解的限速酶,维持血红素代谢平衡,其在氧化应激中具有重要作用^[12].超氧化物歧化酶和一氧化氮合酶主要参与细胞内的氧化还原反应,其亲电子效应可以通过清除活性代谢物保护细胞免受氧化应激和脂质过氧化反应,在外源化合物代谢和保护机体免受过氧化损伤作用中发挥着重要作用^[13].肽聚糖识别蛋白(PGRP-LD)主要参与细胞内的免疫反应,识别外源化合物,启动细胞内的免疫信号通路抵御外界侵袭^[14].昆虫在外环境胁迫下可诱导 HO-1、NOS 和 SOD 的大量表达,值得注意的是胁迫的共同点是能造成氧化应激,进而促使转录因子与抗氧化反应原件相结合,启动 HO-1 等基因的大量表达^[15],最终激活包括氧化还原反应在内的一系列代谢反应,加速杀虫剂在体内的代谢降解,使昆虫对杀虫剂的敏感性降低.由此可以推测,昆虫抗药性可能是由氧化应激反应和免疫反应等多种机制协同交互作用来实现的,具体的机制有待后续试验进一步研究.

本研究以果蝇 Kc 细胞为模型,作为模式生物果蝇的基因组已经研究的比较清楚,有比较完善的基因数据库,为研究与杀虫剂代谢相关的基因谱系及其相关功能提供了保障.同时该模式系统的研究结果也为其他昆虫抗性的研究提供重要参考.在细胞水平上研究了溴氰菊酯对昆虫的生长发育抑制和对细胞的毒性作用,表明适当浓度的溴氰菊酯能诱导细胞表达大量的与杀虫剂代谢相关的基因来抵抗外界压力,为后续基因表达谱的检测奠定了基础.杀虫剂胁迫下诱导的上调基因的发现为进一步阐明杀虫剂抗性的分子机制和建立抗药性检测方法提供了新的科学依据,具有重要的理论意义和潜在的实际应用价值.

[参考文献]

- [1] Casida J E, Gammon D W, Glickman A H, et al. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1983, 23(1): 413–438.
- [2] 邢剑飞, 刘艳, 颜冬云. 昆虫对拟除虫菊酯农药的抗性研究进展[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(10): 68–74.
- [3] Chen X G, Mathur G, James A A. Gene expression studies in mosquitoes[J]. Advances in Genetics, 2008, 64: 19–50.
- [4] 戴璇颖, 徐世清, 陈息林, 等. 环境激素阿特拉津对家蚕卵巢培养细胞(BmN)凋亡的影响[J]. 蚕业科学, 2006, 32(4): 495–499.
- [5] 方心葵, 王朝霞, 陆敏, 等. 氰戊菊酯对 *Trichoplusia ni* 细胞活力的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(4): 101–104.
- [6] Daborn P J, Yen J L, Bogwitz M R, et al. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila* [J]. Science, 2002, 297(5590): 2253–2256.
- [7] Bogwitz M R, Chung H, Magoc L, et al. Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(36): 12807–12812.
- [8] Perry T, Batterham P, Daborn P J. The biology of insecticidal activity and resistance[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(7): 411–422.
- [9] Tomita T, Scott J G. cDNA and deduced protein sequence of Cyp6D1: the putative gene for a cytochrome p450 responsible for pyrethroid resistance in house fly[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 25(2): 275–283.
- [10] 冯国蕾. 神经递 3H-去甲肾上腺素释放与家蝇对拟除虫菊酯抗性的关系[J]. 昆虫学报, 2002, 45(2): 204–208.
- [11] Misra J R, Horner M A, Lam G, et al. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila* [J]. Genes and Development, 2011, 25(17): 1796–1806.
- [12] Maines M D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases[J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1997, 37(1): 517–554.
- [13] Zou S, Meadows S, Sharp L, et al. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(25): 13726–13731.
- [14] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. Current Opinion in Immunology, 1998, 10(1): 23–28.
- [15] Gong P, Hu B, Stewart D, et al. Cobalt induces heme oxygenase-1 expression by a hypoxia-inducible factor-independent mechanism in Chinese hamster ovary cells regulation by Nrf2 and MafG transcription factors [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(29): 27018–27025.

[责任编辑:黄敏]