

利用 iTRAQ 蛋白质组技术筛选福寿螺 抗药相关的候选蛋白

牟希东^{1,2} 徐猛¹ 杨叶欣¹ 顾党恩¹ 罗渡¹ 危起伟^{2,3} 胡隐昌¹

1. 农业农村部休闲渔业重点实验室/广东省现代休闲渔业工程技术中心/

中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380;

2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 3. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

摘要 采用同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术对杀螺剂胁迫下福寿螺肝脏蛋白质组进行研究,以期从蛋白质组学水平了解福寿螺对杀螺剂四聚乙醛的胁迫应答。结果鉴定到108个具有定量信息的差异蛋白($P < 0.05$),其中显著上调的蛋白有55个,下调蛋白53个。理化性质分析和GO(gene ontology)注释分析发现,这些蛋白分别具有抗氧化、催化结合、抗菌等功能,并影响福寿螺的细胞结构组成、肌肉收缩、代谢调节和免疫调节,引起神经毒性。研究测定出57个具有不同活性的细胞色素450酶系蛋白(CYP450),推测CYP450活性是福寿螺对四聚乙醛产生抗药性的重要原因。

关键词 福寿螺; 四聚乙醛; iTRAQ; 差异表达蛋白

中图分类号 S 966.28 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)06-0116-07

福寿螺(*Pomacea canaliculata*)是世界百种恶性外来入侵物种之一,也是中国环保总局列入首批入侵中国的16种“危害最大的外来物种”之一。由于环境和缺乏天敌控制等因素,福寿螺暴发成灾,已侵入我国13个省(市)、246个县(市),受害农田超过4.27亿 hm^2 ^[1],致使农业生产损失巨大。福寿螺与生态系统内水生生物争夺空间、食物,占据生态位,侵入的水域鱼类和贝类资源均遭到不同程度的破坏^[2]。福寿螺还携带广州管圆线虫(*Angiostrongylus cantonensis*)^[3],已在我国北京和温州等地发生因食用福寿螺引起嗜酸性脑膜炎群体致病事件,使人们的身体健康受到威胁。鉴于此,福寿螺的生物入侵危害及其综合防治问题成为农作物生产及水产业所共同关注的问题。

近年来,国内外许多学者对福寿螺的防控技术进行研究^[4-5],但化学防治仍是目前福寿螺有效的控制方式。四聚乙醛(methaldehyde)是常用的杀螺剂,随着四聚乙醛等杀螺剂广泛和高剂量使用,福寿螺对四聚乙醛的耐受能力增强,导致化学防治效果

下降。开展福寿螺抗药性机制研究,不仅对建立有效的控制技术和研发新型杀螺剂具有积极作用,而且也可以进一步阐明福寿螺大范围成功入侵的机制。迄今为止,国内外许多科研机构开展了有害生物物的抗药性机制研究,发现很多与抗药性相关的抗性基因,如谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferases, GST)^[6]、乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AChR)、神经递质 γ -氨基丁酸(γ -amino butyric acid, GABA)、乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)、细胞色素P450酶系(cytochrome P450 system, CYP450)^[7-8]和羧酸酯酶(carboxylesterase, EC)^[9]基因等。而关于福寿螺抗药性的报道不多,前期笔者从福寿螺转录组找到了大量CYP450基因^[10],考虑到蛋白是行使各种生物学功能的最终形式之一,现利用同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术和生物信息学分析方法,筛选福寿螺与药物胁迫相关的候选蛋白,旨在为福寿螺抗药性形成的分子机制研究提供新的依据。

收稿日期: 2018-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31300468); 广东省自然科学基金项目(2014A030313660); 农业农村部农业入侵防治项目(2130108); 国家水产种质资源共享服务平台项目(2018DKA30470)

牟希东, 副研究员. 研究方向: 种质资源与城市渔业. E-mail: muxd1019@163.com

通信作者: 胡隐昌, 研究员. 研究方向: 城市渔业与生态安全. E-mail: huyc22@163.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

福寿螺(*P. canaliculata*)采集于中国水产科学研究院珠江水产研究所外来水生生物入侵风险评估中心(113°13.375'E, 23°03.375'N),水体一直未施加任何农药,所用螺体质量为 9.02~13.28 g,壳高 3.2~4.7 cm。自然光照条件,暂养于去氯充氧的淡水培养箱(150 cm×150 cm×70 cm)中,备用。四聚乙醛(metaldehyde)购自广州威佳生物公司。设置 2 组(对照组 S1、S2 和实验组 R1、R2),每组 2 个重复。参考项目组前期的试验结果^[1],试验组药物四聚乙醛的质量浓度为 0.5 mg/L。取样时间为 24 h,每组 10 个活螺的肝脏混合为 1 个样品,液氮保存。

1.2 样品总蛋白提取

研磨前先在研钵中倒入液氮预冷,然后取约 0.2 g 组织置于研钵中,迅速加入液氮。在研钵中加入 800 μ L RIPA 裂解液,充分溶解(收集)粉末后转移至 1.5 mL EP 管中,再加 400 μ L LB 研钵 1 次,转移到相同的 EP 管中。冰浴超声处理(5% 功率,超声 1 s,间隔 1 s,共 5 min),破碎核酸,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。将上清液分装成 4 管,每管约 250 μ L,每管再加入 1 mL 丙酮-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。沉淀完的蛋白质于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min,倒去上清液,打开管盖平放于干净的纸巾上自然干燥,即可得到处理后的蛋白质团块,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。在干燥后的蛋白质团块中加入 200 μ L RIPA 裂解液,反复吹打直至蛋白质充分分散。冰浴超声助溶(1% 功率,超声 1 s,间隔 1 s,共 5 min)后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min,吸出上清液,转移至新的 EP 管中。

1.3 蛋白质样品上机检测方法

提取后的蛋白样品使用还原烷基化处理,60 $^{\circ}$ C 反应 1 h,打开二硫键以便后续充分酶解蛋白。使用 GE healthcare 的 2D quant kit 进行蛋白质的浓度测定。等体积进行 SDS-PAGE 电泳,对蛋白酶进行检测。按照胰蛋白酶:蛋白=1:50(质量比)的比例加入胰蛋白酶,37 $^{\circ}$ C 酶解过夜。酶解后的蛋白片段使用标 iTRAQ 标记试剂与酶解后肽段充分混合,室温下孵育 2 h。将标记后的肽段进行等量混合,使用强阳离子交换色谱(strong cation exchange chromatography, SCX)进行预分离。分离色谱采用

液相串联质谱(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)鉴定。

1.4 蛋白质鉴定和定量

使用 Mascot(2.3.02)软件进行蛋白质鉴定和定量,采用福寿螺转录组测序获得的蛋白序列数据为鉴定数据库,设置检索参数:肽段质量误差设为 ± 0.05 u,碎片离子误差为 ± 0.1 u。蛋白质的差异倍数以 Mascot 搜库结果为基础,分别对试验组和对照组鉴定到的同一组肽段进行比较计算,分析蛋白表达差异。选择肽段数 ≥ 2 、差异倍数 > 1.5 ,且经统计检验 $P < 0.05$ 的蛋白作为显著差异表达蛋白。

1.5 差异蛋白分析

为了解差异蛋白与生物学功能的相关性,将显著差异蛋白映射到基因本体(gene ontology, GO)数据库(<http://www.geneontology.org/>)的各个 term,通过计算每个 term 的蛋白数目,获得差异蛋白的 GO 分类数据。对 GO 分类后的蛋白数据,采用超几何检验,以 $P < 0.05$ 为阈值,分析差异显著蛋白相比于背景蛋白显著富集的 GO 条目。使用 WEGO(<http://wego.genomics.org.cn/>)软件对富集的条目进行可视化作图。利用京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库对差异表达基因进行通路分析,KEGG 通路分析均以 $P < 0.05$ 作为显著性富集标准。

2 结果与分析

利用 iTRAQ 技术对福寿螺肝组织进行相对定量分析,结果鉴定到 3 830 个蛋白,其中发现与抗药相关的 57 个 CYP450 (CYP1A1、CYP2B4、CYP2D3、CYP2J2、CYP2J5、CYP2U1、CYP3A10、CYP3A11、CYP3A15、CYP3A16、CYP3A18、CYP3A21、CYP3A24、CYP3A28、CYP3A30、CYP3A31、CYP3A41A、CYP3A5、CYP3A56、CYP3A6、CYP4A25、CYP4A4、CYP4F2、CYP4F3、CYP4F4、CYP4F6、CYP4V2、CYP6A9、CYP6J1、CYP7A1、CYP9E2、CYP18A1、CYP20A1 等)、GSTs 14 个、AChR 2 个、GABA 1 个、AChE 2 个等。依据蛋白质丰度水平,鉴定出 108 个差异表达蛋白(差异倍数 > 1.5 ,且 $P < 0.05$),其中 57 个上调,53 个下调。Amy1、rgn、Acadv1、TLDC1、Gcat、SARP-19 precursor 等蛋白上调表达差异显著($P < 0.01$),而 ACOX1、Mllt4、yajO、VAT1L、Gld、TMLHE、DKC1、Naaa、CYP3A24 等蛋白下调表达差异显著($P < 0.01$) (表 1)。

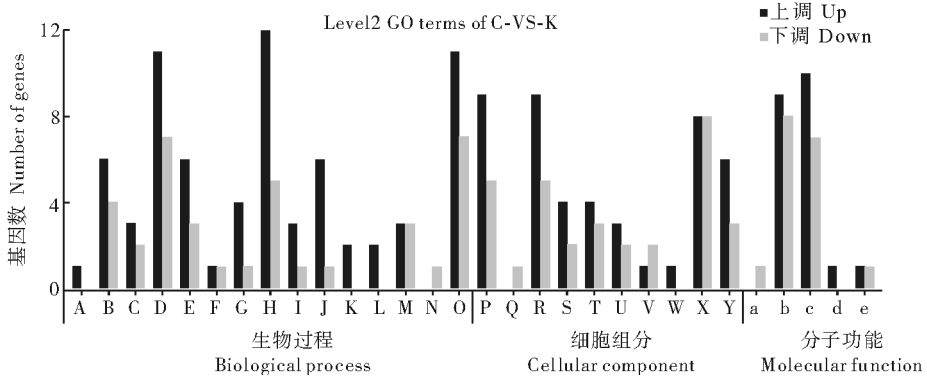
表 1 福寿螺与四聚乙醛相关的部分差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed proteins in response to metaldehyde from *Pomacea canaliculata*

序号 Number	P	登录号 Accession number	蛋白名称 Protein	代号 Symbol	物种 Organism	等电点 PI	分子量/kD MW	表达类型 Type
1	0.000 28	XP_012935860.1	过氧化物酰基辅酶 A 氧化酶 1 Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1-like isoform X3	ACOX1	<i>Aplysia californica</i>	9.05	10 131.53	↓
2	0.000 41	ACA34372.1	α -淀粉酶 Alpha-amylase	Amy1	<i>Mytilus edulis</i>	6.30	9 119.26	↑
3	0.000 65	XP_0111454610.1	钙调素 Regucalcin	RGN	<i>Crassostrea gigas</i>	9.36	12 342.89	↑
4	0.000 68	XP_012937979.1	Afadin-like	AFDN	<i>Aplysia californica</i>	9.33	26 956.5	↓
5	0.001 03	BAU45070.1	4-脱氧-L-赤-5-己酮糖精醛还原酶 4-Deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid reductase	yaJO	<i>Haliotis discus hannai</i>	7.09	37 052.32	↓
6	0.002 03	XP_013084831.1	突触囊泡膜蛋白 Synaptic vesicle membrane protein homolog-like isoform X3	VAT1L	<i>Biomphalaria glabrata</i>	6.12	42 381.78	↓
7	0.002 32	XP_013399374.1	钙调素 Regucalcin	RGN	<i>Lingula anatina</i>	4.74	14 047.61	↑
8	0.002 46	EKC37229.1	脊柱后侧凸肽酶 Kyphoscoliosis peptidase	KY	<i>Crassostrea gigas</i>	4.81	18 933.24	↑
9	0.002 75	XP_005106264.1	非常长链特异性酰基辅酶 A 脱氢酶 Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADVL	<i>Aplysia californica</i>	7.69	66 770.43	↑
10	0.003 00	XP_012942825.1	葡萄糖脱氢酶 Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like	GLD	<i>Aplysia californica</i>	9.20	26 249.93	↓
11	0.003 15	EKC24856.1	三甲基赖氨酸双加氧酶 Trimethyllysine dioxygenase, mitochondrial	TMLHE	<i>Crassostrea gigas</i>	4.75	7 599.51	↓
12	0.003 47	XP_005102865.1	含 TLD 结构域的蛋白 TLD domain-containing protein 1-like	TLDCl	<i>Aplysia californica</i>	5.39	49 508.01	↑
13	0.005 58	XP_019625903.1	N-乙酰乙醇胺水解酶酰胺酶 N-Acylethanolamine-hydrolyzing amidase-like	NAAA	<i>Branchiostoma belcheri</i>	4.72	36 425.03	↓
14	0.007 65	XP_003460273.2	补体 C1q 肿瘤坏死因子相关蛋白 3 Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3	C1QTNF3	<i>Oreochromis niloticus</i>	4.85	15 812.56	↓
15	0.007 90	XP_005099525.1	2-氨基-3-酮丁酸辅酶 A 连接酶 2-Amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial-like isoform X2	GCAT	<i>Aplysia californica</i>	7.69	43 223.49	↑
16	0.008 47	ACQ09303.1	细胞色素 P450 Cytochrome P450	CYP3A24	<i>Hyriopsis cumingii</i>	7.01	55 831.53	↓
17	0.008 67	XP_013094409.1	原肌球蛋白 2 Tropomyosin-2 isoform X17	-	<i>Biomphalaria glabrata</i>	4.61	32 750.08	↓
18	0.008 79	AAM20842.1	分泌的凋亡相关蛋白 Secreted apoptosis-related protein	SARP	<i>Littorina littorea</i>	4.53	18 187.42	↑
19	0.018 93	EJW86594.1	钙调蛋白 Calmodulin	CALML5	<i>Wuchereria bancrofti</i>	4.22	7 710.49	↓
20	0.010 94	XP_013078297.1	肌球蛋白调节链 12B Myosin regulatory light chain 12B-like	MYL12B	<i>Biomphalaria glabrata</i>	4.70	19 731.24	↓
21	0.012 84	XP_013074159.1	ATP 合酶亚单位 γ ATP synthase subunit gamma, mitochondrial-like	ATP5C1	<i>Biomphalaria glabrata</i>	9.69	33 062.07	↑
22	0.048 84	XP_005110253.1	肽基脯氨酸顺反异构酶 Peptidyl-prolyl <i>cis</i> -trans isomerase	FKBP8	<i>Aplysia californica</i>	8.90	33 830.75	↑
23	0.046 95	ADV36303.1	G 型溶菌酶 G-type lysozyme		<i>Physella acuta</i>	6.51	18 559.76	↑
24	0.010 05	XP_012946903.1	白细胞分化抗原 CD109 antigen-like	CD109	<i>Aplysia californica</i>	6.09	14 351.59	↓
25	0.015 92	XP_005093011.2	补体 C3 Complement C3-like	C3	<i>Aplysia californica</i>	6.82	164 100.62	↓
26	0.039 01	XP_018319278.1	5-Phosphohydroxy-L-lysine phospho-lyase	PHYKPL	<i>Agrilus planipennis</i>	8.33	7 363.53	↑
27	0.040 17	XP_012941403.1	二氢蝶啶还原酶 Dihydropteridine reductase-like	QDPR	<i>Aplysia californica</i>	5.94	24 199.66	↓
28	0.012 06	XP_013094639.1	墨蝶呤还原酶 Sepiapterin reductase-like	SPR	<i>Biomphalaria glabrata</i>	4.17	8 159.19	↓

利用 WEGO 软件对差异蛋白的主要功能类别进行 GO 功能分类, 可将 108 个差异蛋白分为 3 类 (图 1): (1) 在细胞组分中, 差异蛋白数量最多的 3 个功能组是细胞器 (organelle)、膜结合细胞器 (membrane-bounded organelle) 和细胞 (cell), 但细胞器内膜 (organelle inner membrane) ($P < 0.01$)、细胞器膜 (organelle envelope) ($P < 0.05$)、膜 (envelope) ($P < 0.05$) 和线粒体 (mitochondrion) ($P < 0.05$) 等差异显著; (2) 在分子功能方面, 差异蛋白数量最多的 3 个功能组分别是结合 (binding)、催化活性 (catalytic activity) 和蛋白结合 (protein binding); (3) 在生物过程方面, 差异蛋白数量最多的 3 个功能组是代谢过程 (metabolic process)、单生物信号过程 (single-organism cellular process) 和细胞代谢过程 (cellular metabolic process)。KEGG 分析发现,

108 个差异蛋白涉及到 80 个代谢通路, 蛋白种类最多的代谢通路是碳代谢 (carbon metabolism)、氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 和溶酶体 (lysosome)。而 6 条代谢通路差异显著 ($P < 0.05$), 分别为抗坏血酸盐和醛酸盐代谢 (ascorbate and aldarate metabolism, ko00053)、芳香族化合物降解 (degradation of aromatic compounds, ko01220)、叶酸生物合成 (folate biosynthesis, ko00790)、血管平滑肌收缩 (vascular smooth muscle contraction, ko04270)、心肌细胞肾上腺素信号 (adrenergic signaling in cardiomyocytes, ko04261) 和赖氨酸降解 (lysine degradation, ko00310)。其中抗坏血酸盐和醛酸盐代谢 (ascorbate and aldarate metabolism) 和芳香族化合物降解 (degradation of aromatic compounds) 差异极显著 ($P < 0.01$) (图 2)。



A: 特性; B: 生物调节; C: 组织成分或生物合成; D: 细胞过程; E: 发育过程; F: 免疫系统过程; G: 定位; H: 代谢过程; I: 多个体过程; J: 多细胞生物过程; K: 生殖; L: 生殖过程; M: 外界刺激反应; N: 信号; O: 单一生物过程; P: 细胞; Q: 胞间连接; R: 细胞部分; S: 大分子复合物; T: 细胞膜; U: 细胞膜部分; V: 膜封闭腔; W: 拟核; X: 细胞器; Y: 细胞器部分; a: 抗氧化活性; b: 结合; c: 催化活性; d: 分子功能调节; e: 转运活性。A: Behavior; B: Biological regulation; C: Component organization or biogenesis; D: Cellular process; E: Developmental process; F: Immune system process; G: Localization; H: Metabolic process; I: Multi-organism process; J: Multicellular organismal process; K: Reproduction; L: Reproductive process; M: Response to stimulus; N: Signaling; O: Single-organism process; P: Cell; Q: Cell junction; R: Cell part; S: Macromolecular complex; T: Membrane; U: Membrane part; V: Membrane-enclosed lumen; W: Nucleoid; X: Organelle; Y: Organelle part; a: Antioxidant activity; b: Binding; c: Catalytic activity; d: Molecular function regulator; e: Transporter activity.

图 1 福寿螺鉴定的差异蛋白的功能分类

Fig.1 Functional classification of the 108 differential protein spots identified from *Pomacea canaliculata*

3 讨论

肝脏是生物积聚和转化有毒物质的重要场所, 是代谢和解毒中心, 因此选择肝脏进行蛋白质定量分析。本研究利用蛋白质组学技术比较了福寿螺敏感品系在杀螺剂四聚乙醛胁迫下蛋白质的表达变化情况, 结果显示, 在 0.5 mg/L 四聚乙醛胁迫下, 共有 3 830 个蛋白参与了胁迫反应, 并表现出不同的表

达量。福寿螺体内葡萄糖脱氢酶 (GLD) 等表达明显下调 (表 1), 说明福寿螺体内抗坏血酸、醛糖、芳香化合物和赖氨酸代谢途径受损, 影响福寿螺能量产生。福寿螺体内类线粒体 ATP 合成酶 γ 亚基 (ATP5C1) 显著上调 ($P < 0.05$), 说明体内 ATP 合成增加。福寿螺虽然通过糖类、芳香化合物提供能量的途径受损, 但是它可能通过增加糖代谢来增加能量的产生, 以此对抗外界药物胁迫环境。福寿螺

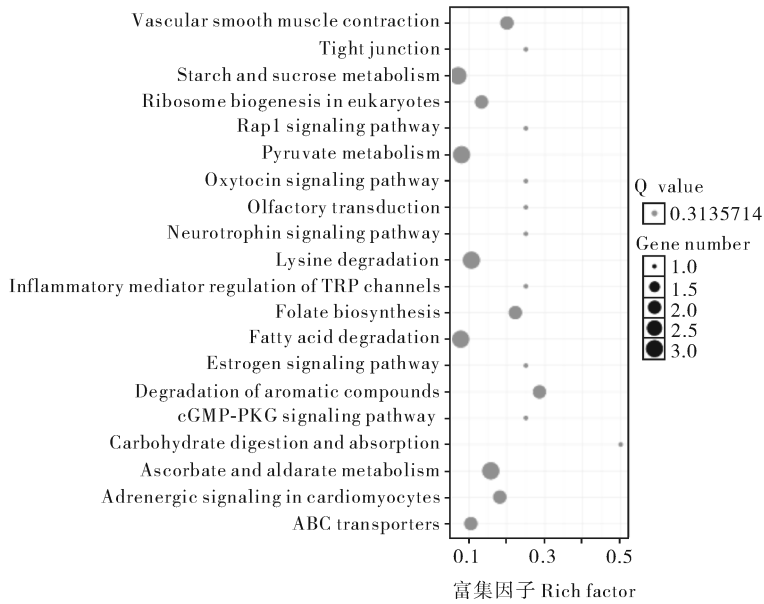


图 2 福寿螺 KEGG 分析中富集的 20 条通路

Fig.2 Top 20 enriched pathways in KEGG analysis of *Pomacea canaliculata*

的钙调蛋白(CALML5)、类肌球蛋白调节轻链 12B(SQH)和类原肌球蛋白-亚型 2-X17(tropomyosin-2 isoform X17)表达均下调,说明四聚乙醛胁迫可能降低福寿螺的运动能力。而肌球蛋白作为一种超家族蛋白质,是细胞骨架的重要组成部分^[13]。细胞骨架重构参与细胞结构维系、形态变化、迁移、增殖及凋亡等生物学过程^[14]。本研究中,福寿螺类肌球蛋白调节轻链 12B(SQH)表达下调,说明四聚乙醛胁迫影响了福寿螺的细胞骨架构成。

肽基-脯氨酰顺式-反式异构酶参与 Ca^{2+} 合成,在生物细胞凋亡起着重要的作用^[12]。在 0.5 mg/L 四聚乙醛胁迫下,福寿螺体内的类肽基-脯氨酰顺式-反式异构酶(FKBP8)表达下调,引起福寿螺的氧化应激,调动自身先天性免疫的调节。福寿螺体内 G 型溶菌酶(G-type lysozyme)上调,说明引起福寿螺自身的先天性免疫。而免疫因子(CD109、C3、C1QTNF3)均下调,预示着药物胁迫破坏福寿螺的免疫信号通路。同时,福寿螺突触囊泡膜蛋白同系物(VAT1L)表达活性显著下调($P < 0.01$) (表 1),而突触泡位于神经末梢用于调节神经递质储存和释放,VAT1L 表达降低说明四聚乙醛胁迫可能影响了神经细胞内神经递质的释放,损伤神经细胞。

另外,在杀螺剂四聚乙醛胁迫下福寿螺共有 57 个 CYP450 酶系蛋白参与反应(表 1),并且不同的 CYP 家族或亚型表现出不同的表达量。CYP450 是广泛存在于生物有机体中的一类代谢酶系,不仅对

外来物质如杀虫剂、药物等其他环境有毒物质具有代谢作用,还参与一些重要生理功能的内源性物质,如激素、脂肪酸的代谢,在生物体中起着十分重要的作用^[13-14]。CYP450 是人类众多抗肿瘤药物发挥药效和解毒过程中重要的药物代谢酶,如 CYP2A6^[15]、CYP2B6^[16],也是有害生物解毒酶中研究最多的,能有效催化杀虫剂的代谢和降解^[17]。沈晋良等^[18]认为抗药性是由有害生物对杀虫剂代谢能力提高造成的,其中 CYP450 等起着关键作用。进一步分析发现,57 个 CYP450 酶系蛋白中以 CYP3 家族和 CYP4 家族居多。CYP3 是负责药物代谢的最重要的 CYP450 同工酶之一,参与许多临床上有用的治疗剂的氧化生物转化^[19-20],在药物代谢中具有重要作用。大量的研究证明,有害生物的抗药性与 CYP450 活性相关。李凤良等^[21]通过增效剂试验证明了 CYP450 活性增强是小菜蛾对溴氰菊酯形成抗药性的重要机制。Qian 等^[22]研究证明 CYP450 活性提高是抗虫酰肼小菜蛾品系对阿维菌素产生交互抗药性的主要原因。一般来说,有害生物产生抗药性的机制主要包括表皮穿透速率降低、害虫对杀虫剂解毒代谢能力的增强以及杀虫剂靶标部位敏感性的降低^[23-24]。本研究发现福寿螺体内 CYP450 数量较多且存在较大的活性变化,这与项目组前期分析转录组的研究结果^[10]相一致,因此,推测福寿螺对四聚乙醛较强的解毒能力即 CYP450 表达量提高是福寿螺逐步对四聚乙醛产生抗药性的

原因之一。另外, CYP3A 家族有 1 个亚型蛋白 CYP3A24 表达下调, 且差异极显著 ($P < 0.01$), 但 CYP3A24 亚型蛋白是一种新型的 CYP 蛋白, 目前仅在软体类牡蛎中发现^[25], 还无法判断其功能。下一步可利用 RNAi 技术沉默 CYP3A24 基因的表达, 进而验证 CYP3A24 是否参与抗性的形成及其功能。综上所述, 福寿螺的药物胁迫的应答机制是一个复杂的过程, 四聚乙醛胁迫造成福寿螺的氨基酸、赖氨酸等代谢紊乱、破坏细胞骨架和肌肉收缩, 引起免疫应答, 造成细胞凋亡和神经毒性, 并导致机体死亡。蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 是生命体结构和生命活动的基础和特征, 控制着生命活动的各个过程。PPI 及其构建的作用网络, 在很多生命活动中发挥着重要的作用^[30], 如细胞信号的转导和调控、代谢途径等。本研究初步进行了福寿螺 108 个差异蛋白的 PPI 分析 (数据未显示), 但由于福寿螺大部分蛋白属于未知蛋白, 下一步的研究集中寻找潜在的关键蛋白, 并利用免疫共沉淀技术结合 Western 印迹实验进行功能验证, 解析福寿螺对四聚乙醛产生抗药性的分子机制。

本研究利用 iTRAQ 技术鉴定出福寿螺与杀螺剂四聚乙醛胁迫相关的差异蛋白。功能分析发现差异蛋白主要参与抗坏血酸和醛糖代谢 (GLD、HPGD)、叶酸生物合成 (SPR、QDPR)、血管平滑肌收缩 (CALML5、sqh、tropomyosin-2 isoform X17)、细胞凋亡 (FKBP8)、免疫应答 (G-type lysozyme、CD109、C1QTNF3) 等, 发现 6 条代谢通路差异显著 ($P < 0.05$), 这些数据信息对于深入理解福寿螺药物胁迫应答的分子基础提供了参考。

参 考 文 献

- [1] 刘雨芳. 福寿螺在湖南的分布现状、危害与扩散风险预警[J]. 水生生物学报, 2011, 35(6): 1067-1071.
- [2] BRÖNMARK C, HANSSON L A. Invading herbivory: the golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands [J]. Ecology, 2004, 85(6): 1575-1580.
- [3] LV S, ZHANG Y, LIU H X, et al. Phylogenetic evidence for multiple and secondary introductions of invasive snails, *Pomacea* species in the People's Republic of China [J]. Diversity and distributions, 2013, 19(2): 147-156.
- [4] DING W, HUANG R, ZHOU Z, et al. Ambrosia artemisiifolia as a potential resource for management of golden apple snails, *Pomacea canaliculata* (Lamarck) [J]. Pest management science, 2018, 74(4): 944-949.
- [5] 张海涛, 罗渡, 牟希东, 等. 应用多个生态位模型预测福寿螺在中国的潜在适生区[J]. 应用生态学报, 2016, 27(4): 1277-1284.
- [6] SAMRA A I, KAMITA S G, YAO H W, et al. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from pyrethroid-resistant *Culex pipiens* [J]. Pest management science, 2012, 68(5): 764-772.
- [7] PUINEAN A M, FOSTER S P, OLIPHANT L, et al. Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae* [J/OL]. PLoS genetics, 2010, 6(6): e1000999 [2018-10-17]. <https://journals.plos.org/plosgenetics/article/file?id=10.1371/journal.pgen.1000999&type=printable>.
- [8] SUN Y, ZOU P, YU X Y, et al. Functional characterization of an arrestin gene on insecticide resistance of *Culex pipiens pallens* [J/OL]. Parasites and vectors, 2012, 5(1): 134 [2018-10-17]. <https://link.springer.com/article/10.1186/1756-3305-5-134>.
- [9] ZHANG L, GAO X, LIANG P. Beta-cypermethrin resistance associated with high carboxylesterase activities in a strain of house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) [J]. Pesticide biochemistry and physiology, 2007, 89(1): 65-72.
- [10] MU X D, HOU G Y, SONG H M, et al. Transcriptome analysis between invasive *Pomacea canaliculata* and indigenous *Cipangopaludina cahayensis* reveals genomic divergence and diagnostic microsatellite/SSR markers [J/OL]. BMC genetics, 2015, 16(1): 12 [2018-10-17]. <https://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-015-0175-2>.
- [11] 张文领, 牟希东, 韦慧, 等. 四聚乙醛亚致死剂量对福寿螺 AchE、GSTs 和 MFO 活性的影响[J]. 植物保护, 2016, 42(6): 58-62.
- [12] SHIRANE M, NAKAYAMA K I. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis [J]. Nature cell biology, 2003, 5(1): 28-37.
- [13] SIMPSON E R, MAHENDROO M S, MEANS G D, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis [J]. Endocrine reviews, 1994, 15(3): 342-355.
- [14] 高希武. 害虫抗药性分子机制与治理策略[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [15] HOSONO H, KUMONDAI M, ARAI T, et al. CYP2A6 genetic polymorphism is associated with decreased susceptibility to squamous cell lung cancer in Japanese smokers [J]. Drug metabolism and pharmacokinetics, 2015, 30(4): 263-268.
- [16] COLLIER J K, KREBSFAENGER N, KLEIN K, et al. The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antiestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver [J]. British journal of clinical pharmacology, 2015, 54(2): 157-167.
- [17] 朱文雅, 吴海花, 张学尧, 等. 飞蝗细胞色素 P450 基因 Lmcy6fd3 的表达及其在杀虫剂解毒中的作用 [J]. 昆虫学报, 2017, 60(7): 742-749.

- [18] 沈晋良,吴益东. 棉铃虫抗药性及其治理[M]. 北京:农业出版社,1995:25-88.
- [19] WILKINSON G R. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of *in vivo* activity in humans [J]. Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics, 1996, 24(5): 475-490.
- [20] EKINS S, STRESSER D M, WILLIAMS J A. *In vitro* and pharmacophore insights into CYP3A enzymes [J]. Trends in pharmacological sciences, 2003, 24(4): 161-166.
- [21] 李凤良,程罗根. 小菜蛾对溴氰菊酯的抗性遗传分析[J]. 西南农业学报, 2000, 13(4): 62-66.
- [22] QIAN L, CAO G, SONG J, et al. Biochemical mechanisms conferring cross-resistance between tebufenozide and abamectin in *Plutella xylostella* [J]. Pesticide biochemistry and physiology, 2008, 91(3): 175-179.
- [23] SONODA S. Molecular analysis of pyrethroid resistance conferred by target insensitivity and increased metabolic detoxification in *Plutella xylostella* [J]. Pest management science, 2010, 66(5): 572-575.
- [24] NOPPUN V, SAITO T, MIYATA T. Cuticular penetration of S-fenvalerate in fenvalerate-resistant and susceptible strains of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J]. Pesticide biochemistry and physiology, 1989, 33(1): 83-87.
- [25] HU Q, XIAO H, TIAN H, et al. Identification and expression of cytochrome P450 genes in the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* [J]. Theriogenology, 2017, 95: 62-68.
- [26] BRAUN P, GINGRAS A C. History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks [J]. Proteomics, 2012, 12(10): 1478-1498.

Identification of candidate proteins related to molluscicide resistance in apple snail, *Pomacea canaliculata* based on iTRAQ analysis

MU Xidong^{1,2} XU Meng¹ YANG Yexin¹ GU Dang'en¹
LUO Du¹ WEI Qiwei^{2,3} HU Yinchang¹

1. Key Laboratory of Recreational Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Guangdong Modern Leisure Fisheries Engineering Technology Center / Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract The stress response of *Pomacea canaliculata* to molluscicide metaldehyde at proteomic level was analyzed in this study, which lays a foundation for future study of the molecular mechanism of resistance to drugs in snail. Proteome of the *P. canaliculata* liver was studied using the isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) technology. The results showed that 108 differentially expressed proteins ($P < 0.05$) with quantitative information were identified, of which 55 were significantly up-regulated and 53 were down-regulated. The physical and chemical properties analysis and GO (gene ontology) annotation analysis showed that these proteins could be functionally categorized into antioxidant, catalytic and antibacterial functions, affecting the cellular structure composition, muscle contraction, metabolic regulation and immunoregulation and causing neurotoxicity of snail. All the 57 Cytochrome P450 were found to show different expression activity, suggesting that CYP450 may contribute to metaldehyde resistance of *P. canaliculata*.

Keywords *Pomacea canaliculata*; metaldehyde; iTRAQ; differentially expressed proteins