

昆虫蜕皮的分子机理及应用^{*}

赵小凡^{**}

(山东大学生命科学学院 济南 250100)

Molecular mechanism of insect molting and application. ZHAO Xiao-Fan^{**} (*School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China*)

Abstract Insect molting is a cascade of sequential gene expression and interaction, initiated by PTTH and regulated by hormones. Demonstrating the molecular mechanisms of insect molting may not only interpret the scientific questions in insect development, find new approaches to control pests, but also discover new molecules for use in production. We identified 30 differentially expressed proteins from molting larvae of *Helicoverpa armigera* Hübner by proteomics study. In addition, we identified 100 expression sequences tags (EST) from molting larvae, metamorphic committed larvae and feeding larvae of *H. armigera* by suppression subtractive hybridization (SSH) technique. Eleven of these ESTs were proved differentially expressed during larval molting or metamorphosis. By RT-PCR, we cloned *H. armigera* hormone receptor 3 and investigated its expression patterns during development. The gene was further inserted into AcMNPV to construct a genetically manipulated baculovirus marked by green fluorescence protein (AcMNPV-GFPHHR3-Polh). Results showed that AcMNPV-GFPHHR3-Polh may infect *H. armigera* larvae via ingestion or injection. The virus resulted in abnormal ecdysis, growth retardance and median survival time decrease on the *H. armigera* larvae. These results suggest a prospect that the molting related genes can be used in pest control. The expression and regulation of the molting related genes, 20E initiated signal transduction path ways, molecular mechanisms of tissue histolysis and remodeling during metamorphosis, mechanisms of the cascade of gene sequential expression, metamorphosis initiating factor and JH receptor are the major study directions in the future work.

Key words insect molting, functional genes, molecular mechanisms, pest control

摘要 昆虫蜕皮是一个由 PTTH 启动的、激素介导的基因序列表达和相互作用的级联反应过程。阐明昆虫蜕皮的分子机理,不仅可以解释发育生物学的科学问题,为害虫控制提供新的思路,还可以从中发现新的可资生产应用的分子。作者通过蛋白质组学方法从棉铃虫 *Helicoverpa armigera* Hübner 蜕皮幼虫鉴定到 30 个差异表达的蛋白质。通过抑制性消减杂交技术,从棉铃虫蜕皮幼虫、变态决定幼虫和 5 龄取食幼虫鉴定到 100 个表达序列标签(EST)。证明其中的 11 个 EST 在蜕皮或变态时差异表达。通过 RT-PCR 方法克隆棉铃虫激素接受子 3 基因,研究该基因在发育中的表达模式。用该基因构建具有绿色荧光蛋白标记和多角体蛋白的基因重组病毒(AcMNPV-GFP-HHR3-Polh)。实验结果表明,AcMNPV-GFPHHR3-Polh 病毒可以通过注射或口服感染棉铃虫,导致棉铃虫幼虫非正常蜕皮、生长延缓、半数存活时间下降。该研究显示昆虫蜕皮功能基因在害虫控制中有很好的应用前景。蜕皮功能基因的表达与调控、蜕皮激素介导的信号转导通路、变态过程中组织解体和重建的分子机理、激素调控基因顺序表达的分子机理、变态起始因子、JH 受体等是本领域今后的主要研究方向。

关键词 昆虫蜕皮, 功能基因, 分子机理, 害虫控制

^{*} 国家自然科学基金资助(No. 30330070; 30670265), 山东省自然科学基金(Z2003004); 本文为《昆虫知识》编委会特邀稿件。

^{**} E-mail: xfzhao@sdu.edu.cn

收稿日期: 2007-03-09, 接受日期: 2007-03-30

1 研究背景

蜕皮(molting)是线虫和节肢动物等蜕皮类动物特有的生命现象。全变态昆虫(holometabolous)一生要经过多次蜕皮才能成熟,包括胚胎孵化蜕皮(hatch)、幼虫不同龄期间的蜕皮(larval molting)、幼虫到蛹的蜕皮(pupation)和蛹到成虫的蜕皮(emergence)。蜕皮的形态学过程包括不吃少动的昏睡阶段(lethargus)和脱去坚硬外壳的脱壳阶段(ecdysis)^[1]。变态(metamorphosis)则是指全变态昆虫从幼虫转变为成虫的过程。变态要经历游走期(wandering)、预蛹期(pre-pupa)、蛹期和羽化等过程。变态除了变态蜕皮(metamorphic molting)外,还涉及幼虫组织解体(histolysis)和成虫组织重建(remodeling)等复杂的分子生物学过程^[2]。

昆虫蜕皮是由多种激素调控完成的。在外界光照、温度、营养等因素、内在虫体生长尺度引起的膨胀压力和牵张力以及体重的影响下,脑细胞合成和释放促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone, PTH),促使前胸腺合成和释放蜕皮激素(蜕皮酮,ecdysione)。蜕皮激素释放到血淋巴后转化成20-OH-蜕皮酮(20E),启动蜕皮过程,包括停食少动、头壳爆裂、皮层溶离。当20E滴度下降后,合成新表皮蛋白和多巴脱羧酶^[3]。在羽化激素(eclosion hormone EH)、前脱壳触发激素(pre-ecdysis triggering hormone, PETH)和脱壳触发激素(ecdysis triggering hormone, ETH)作用下完成脱壳行为^[4]。在鞣化激素(bursicon)作用下新表皮黑化和硬化(鞣化)^[5]。咽侧体合成的保幼激素(juvenile hormone, JH)则控制蜕皮的方向。当保幼激素存在时,蜕皮激素启动幼虫不同龄期间的蜕皮,当保幼激素滴度降低或消失时,蜕皮激素启动变态蜕皮^[6]。JH的合成受脑释放的促咽侧体素(allatotropin)和抑咽侧体素(allatostatin)调控。咽侧体合成的JH被分泌到血淋巴,立即与血淋巴中的JH载体蛋白(hemolymph JH binding protein, hJHBP)结合,随

血液循环而输送到靶细胞^[7]。JH的分解代谢受保幼激素酯酶(JH esterase JHE)、JH环氧化物水解酶(JH epoxide hydrolase, JHEH)和保幼激素二醇激酶(JHDK)等催化完成^[8]。

昆虫蜕皮的分子生物学过程包括3个阶段:即PTTH介导的蜕皮激素合成阶段、蜕皮激素调控转录因子和效应基因表达阶段、和脱去旧表皮以及新表皮鞣化阶段。对于PTTH介导的蜕皮激素合成的信号转导途径目前已经有较多了解。已经阐明了蜕皮激素前体的合成是在神经激素PTTH介导下,由G-蛋白、钙离子通道蛋白、腺苷酸环化酶、蛋白激酶C、核糖体蛋白S6激酶和细胞色素P450等分子参与的信号转导过程^[9]。对于蜕皮激素调控早期转录因子表达也已经有了一些了解,目前认为昆虫蜕皮的分子调控机理是由蜕皮激素(20E)与蜕皮激素受体(EcR)和Ultraspiracle protein(USP)形成的二聚体结合形成三聚体,再结合在早期转录因子的启动子部位,启动一系列早期转录因子表达,早期转录因子再调控下游的效应基因表达^[10]。对于脱去旧表皮以及新表皮鞣化的分子机理目前知之甚少。因此昆虫蜕皮实际上是一个由PTTH启动的、激素介导的基因序列表达和相互作用的过程。

由于昆虫在蜕皮时不吃少动,对作物没有危害,因此,昆虫蜕皮一直是害虫控制的研究靶标。现在已经发展出用保幼激素类似物(methoprene)^[11]和蜕皮激素类似物(RH-化合物)作为生长调节剂类杀虫剂^[12]。我们用蜕皮激素类似物RH-2485对棉铃虫进行的实验室和田间防治实验表明,RH-2485对棉铃虫有很好的防治效果^[13]。此外,由于昆虫蜕皮是一套完善而且精确控制的多基因参与的级联反应,特别是全变态昆虫从幼虫蜕皮转换到变态蜕皮,以及组织解体和重建,是研究发育生物学的理想模型。阐明昆虫蜕皮基因表达和调控,不仅可以为害虫控制提供新的思路,还可以从中发现新的可资利用的分子。例如,蜕皮级联反应中的关键分子EcR和USP已经被发展成为控制转基因植物外源蛋白表达的分子开关^[14],通

过在田间施用蜕皮激素类似物来调控目的基因的定时表达^[5]。因此昆虫蜕皮已经成为昆虫学和发育生物学领域的研究热点和前沿,具有重要的理论意义和应用前景。

虽然目前已经阐明了蜕皮激素调控部分早期转录因子表达的机理,并且阐明了一些蜕皮调节转录因子基因,如 EcR, USP, E74, E75, β FTZF1 (fushi tarazu factor)、激素接受子 3(HR3)等^[6, 16],但离阐明昆虫蜕皮的分子机理还相差甚远。除了大家研究报道较多的少数几个蜕皮相关基因外,其它参与蜕皮的新基因鲜有报道。蜕皮功能基因间的相互关系、是否存在蜕皮激素介导的信号转导通路、变态过程中组织解体和重建的分子机理、激素调控基因顺序表达的分子机理、变态起始因子、JH 受体等均有待阐明。

2 本实验室研究主题及结果

我们实验室在国家自然科学基金重点项目和面上项目资助下,以棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 为材料开展了昆虫蜕皮分子机理研究。主要研究目标是通过蛋白质组学方法和抑制性消减杂交技术发现新的蜕皮相关基因,研究基因的时空表达和激素调控模式,探索利用昆虫蜕皮功能基因控制害虫的方法。通过双向电泳,我们比较了 5 龄蜕皮幼虫(头壳爆裂)和 6 龄取食幼虫(6th ~ 48 h)的表皮、血淋巴、脂肪体和中肠中蛋白差异表达,共找到 77 个差异表达的蛋白,分别来自于表皮(20 个)、血淋巴(36 个)和脂肪体(21 个)。但没有从蜕皮幼虫的中肠中找到差异表达的蛋白。通过基质依赖激光吸收飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和与果蝇蛋白质组比较,从这些差异表达的蛋白质中鉴定到 30 个蛋白质,分别来自 5 龄蜕皮幼虫的表皮(10 个)、血淋巴(11 个)和脂肪体(9 个)。这些蛋白质包括多种酶类、调节因子、蛋白水解酶、受体和未知功能蛋白。这些蛋白质中有的已经被阐明与蜕皮有关,如有丝分裂激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases),生物钟控制蛋白(circadian clock-controlled protein),溶菌酶 X(lysozyme X), caspase Nc, 钙结合蛋白

(calcium binding proteins)、annexin X 和 neurocalcin homologue 等。其它的蛋白质是首次报道在幼虫蜕皮时期高表达或特异性表达,包括真核翻译其始因子(eukaryotic translation initiation factor)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein phosphatase)、转录起始因子(transcription initiation factor TFIID)、气味结合蛋白(general odourant-binding protein)以及信息素结合蛋白(pheromone-binding protein)等。我们的研究结果为进一步研究这些蛋白在幼虫蜕皮中的功能奠定了基础^[17]。

通过抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH),我们分别进行了 5 龄蜕皮幼虫(5th-molting)和 6 龄取食幼虫(6th ~ 48 h)、变态幼虫(6th ~ 72, 96, 120 h)和 5 龄取食幼虫(5th-feeding)、5 龄取食幼虫(5th-feeding)和变态幼虫(6th ~ 72, 96, 120 h)的表皮、中肠、脂肪体、血细胞和头部之间的抑制性消减杂交。获得了 100 个表达序列标签(EST),其中 73 个 EST 可以在 GenBank 中找到相似的基因,27 个 EST 没有从 GenBank 中找到相似基因。通过 Northern blot 和 RT-PCR,我们证明了其中的 11 个 EST 在蜕皮或变态时差异表达,包括蛋白酶类、核转运因子、G-蛋白和核糖体蛋白等,说明它们参与了蜕皮或变态。此外,该研究还提供了一系列鳞翅目昆虫蜕皮或变态差异表达的新基因,包括 basic-leucine zipper gene、basic juvenile hormone-suppressible protein 2, DEAD box RNA helicase 等,它们可以作为进一步研究鳞翅目昆虫幼虫蜕皮和变态调控机理的候选基因。该研究将拓展我们在全变态昆虫幼虫蜕皮和变态级联反应过程中的知识(Dong D. J., He H. J., Chai L. Q., Wang J. X., Zhao X. F. *BMC Dev. Biol.*, 2007, In press)。

通过 RT-PCR 方法,我们克隆了棉铃虫激素接受子 3(HHR3, GenBank: AF337637)基因。激素接受子 3 是蜕皮激素与 EcR 和 USP 结合后启动的早期转录因子,属于核激素受体家族成员。它在蜕皮级联反应过程中的功能目前并不完全清楚。在 *Manduca* 中的研究认为它可

以调控蜕皮的下游基因表达,同时阻遏幼虫表皮蛋白表达,并通过结合蜕皮激素使蜕皮激素水平下降,从而反馈调控其自身表达,解除对表皮蛋白表达的抑制,开始形成新的表皮,因此蜕皮激素接受子3是蜕皮级联反应中的关键因子^[8]。HHR3的cDNA为1668 bp,编码556个氨基酸,蛋白质理论分子量为62 kDa,等电点6.5,没有信号肽和N-糖基化位点。该蛋白质在107~133氨基酸处具有1个DNA结合域,在72~90氨基酸处有一个从外向内的过膜螺旋。Northern blots显示HHR3有5个同源异构体,分别命名为0, 1, 2, 3, 4, 分子量分别为2.1, 2.6, 3.6, 4.5和5.5 kb。异构体1~4仅在蜕皮时表达,而异构体0在取食和蜕皮时均有表达。异构体1和2可以被蜕皮激素类似物RH-2485诱导表达,可以作为研究蜕皮激素类似物杀虫剂的标记分子^[18]。

鉴于HHR3在蜕皮级联反应中的功能,我们探索了HHR3在害虫防治中的应用。我们将HHR3重组到苜蓿银纹夜蛾 *Autographa californica* 多角体病毒(AcMNPV)中,构建了具有绿色荧光蛋白标记和多角体蛋白的基因重组病毒(AcMNPV-GFP-HHR3-Polh)。免疫荧光显微镜检测显示,感染病毒的Sf21细胞中有HHR3表达,说明重组病毒中的HHR3被成功表达。感染的虫体发出绿色荧光,说明病毒在虫体内成功复制。实验结果表明,AcMNPV-GFP-HHR3-Polh病毒可以通过注射或口服感染棉铃虫,导致棉铃虫幼虫的非正常蜕皮、生长延缓、半数存活时间下降。该研究显示昆虫蜕皮功能基因在害虫控制中有很好的应用前景。由于该重组病毒具有绿色荧光蛋白标记,便于在田间跟踪病毒行为,而且,病毒的多角体蛋白使病毒可以在田间自然环境中存活,可以在生产中应用^[19]。今后的研究任务是通过昆虫蜕皮的分子生物学研究,获得更多更有效的功能基因,提高基因重组病毒的杀虫效果。

3 展望

阐明昆虫蜕皮的分子机理,不仅可以解释

发育生物学的基本科学问题,为害虫控制提供新的思路,还可以从中发现新的可资利用的分子,用于生产实践。本领域今后的研究方向主要是昆虫蜕皮功能基因的表达与调控、蜕皮激素介导的信号转导通路、变态过程中组织解体和重建的分子机理、激素调控基因顺序表达的分子机理、变态起始因子、JH受体等。我们希望在不久的将来科学家们可以阐明昆虫蜕皮和变态的分子机理。

参 考 文 献

- Mesce K. A., Fahrbach S. E. *Front Neuroendocrinol.*, 2002, **23**: 179~199.
- Thummel C. S. *BioEssays*, 2001, **23**: 677~682.
- Hiruma K., Carter M. S., Riddiford L. M. *Dev. Biol.*, 1995, **169**: 195~209.
- Wells C. Jr., Aparicio K., Salmon A., Zadel A., Fuse M. *Pptides*, 2006, **27**: 698~709.
- Luo C., Dewey E. M., Sudo S., Ever J., Hsu S., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2005, **102**: 2820~2825.
- Riddiford L. M., Hiruma K., Zhou X. F., Nelson C. A. *Insect Biochem. Mole. Biol.*, 2003, **33**: 1327~1338.
- Riddiford L. M., Hewes R. S., Truman J. W. *J. Neurobiol.*, 1994, **25**: 819~830.
- Hammock B. D., Sparks T. C. *Anal. Biochem.*, 1977, **82**: 573~579.
- Gilbert L. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2004, **215**: 1~10.
- Palli S. R., Ladd T. R., Sohi S. S., Cook B. J., Retnakaran A. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1996, **26**: 485~499.
- Butler M., Lebrun R. A., Ginsberg H. S., Gettman A. D. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 2006, **22**: 333~338.
- Retnakaran A., Smith L. F. R., Tomkins W. L., Primavera M., Palli S. R., et al. *Can. Entomol.*, 1997, **129**: 871~885.
- Zhao X. F., Li Z. M., Wang J. X., Wang J. B., Wang S. L., et al. *Crop. Prot.*, 2003, **22**: 959~965.
- Kumar M. B., Fujimoto T., Potter D. W., Deng Q., Palli S. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2002, **99**: 14710~14715.
- Tavva V. S., Dinkins R. D., Palli S. R., Collins G. B. *Plant J.*, 2006, **45**: 457~69.
- Li F. Q., Ueda H., Hirose S. *Mol. Cell Biol.*, 1994, **14**: 3013~3021.
- Zhao X. F., He H. J., Dong D. J., Wang J. X. *J. Proteome Res.*, 2006, **5**: 164~169.
- Zhao X. F., Wang J. X., Xu X. L., Li Z. M., Kang C. J. *Insect Mol. Biol.*, 2004, **13**: 407~412.
- Shao H. L., Dong D. J., Hu J. D., Zhang X. C., Zhang Y. B., et al. *Biocontr. Sci. Techn.*, 2007, **14**: 95~104.