



昆虫神经肽 F 的研究进展*

黄一村** 时 敏 陈学新***

(浙江大学昆虫科学研究所, 农业部农业昆虫学重点实验室, 杭州 310058)

摘 要 神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 家族作为一种神经递质, 参与到脊椎动物许多生理功能的调控。神经肽 F (Neuropeptide F, NPF) 作为 NPY 在非脊椎动物中的同源肽, 也具有类似的功能, 目前 NPF 已经在许多的昆虫中得到鉴定, 它一般由 28 ~ 45 个残基组成, C 端为保守的 RPRFamide 结构。通过与配对的 G 蛋白偶联受体 NPFR (Neuropeptide F receptor) 结合, 在昆虫的取食、酒精敏感性、攻击行为、繁殖、时钟节律和学习能力等诸多行为中发挥调节作用, 但 NPF/NPFR 信号通路目前尚不明确。本文概述了 NPF 及其受体在一些模式动物上的分布及生理功能。

关键词 昆虫, 神经肽 F, 受体, 行为调控, 功能

Advances in research on the insect neuropeptide F

HUANG Yi-Cun** SHI Min CHEN Xue-Xin***

(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Agricultural Entomology and Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract The neuropeptide Y (NPY) family acts as neurotransmitters and contributes to a diversity of physiological functions in vertebrates. Neuropeptide F (NPF), the NPY-like ortholog in invertebrates, has been identified in numerous insects and shares some similar functions with NPY. Commonly, NPFs consist of 28-45 residues and have a conserved C-terminal RPRFamide. They play a very important role in feeding, ethanol sensitivity and stress responses, including aggression, reproduction, circadian rhythm, and learning, by interaction with NPFRs, which are a kind of G protein-coupled receptor (GPCR). However, the NPF/NPFR signaling pathway is not well understood. This paper provides an overview of the distribution and functions of NPFs and their receptors in several model insects.

Key words insect, neuropeptide F, receptor, behavior regulation, function

在脊椎动物与非脊椎动物中, 神经肽都具有非常重要的调节功能, 而且它们非常保守, 一些非脊椎动物的神经肽与脊椎动物的神经肽甚至很相似或是同源 (Vanden, 2001; Blumenthal, 2010; Van Loy *et al.*, 2010; Nässel and Wegener, 2011)。脊椎动物的神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 在许多的重要行为中发挥调控作用, 比如取食、能量代谢、学习等 (Chee and Colmers,

2008; Hökfelt *et al.*, 2008)。而在非脊椎动物中, NPY 的同源肽 NPF (Neuropeptide F, NPF) 也有着许多与 NPY 相似的调节功能。

至今为止, 在许多非脊椎动物中鉴定得到了 NPF, 比如涡虫、绦虫、软体动物、线虫、甲壳纲动物以及昆虫 (Leung *et al.*, 1992; Maule *et al.*, 1992; Rajpara *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1999; de Jong-Brink *et al.*, 2001; Clynen *et al.*, 2009;

* 资助项目 Supported projects: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2013CB127600); 国家自然科学基金创新群体项目 (31321063); 浙江省杰出青年基金 (R3110049)

**第一作者 First author, E-mail: 820489002@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: xxchen@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-06-01, 接受日期 Accepted: 2015-06-12

Marks and Maule, 2010; Christie *et al.*, 2011; Dirksen *et al.*, 2011)。近 20 年来,昆虫神经肽的研究成为了热点,包括 NPF 在内的许多神经肽在昆虫上的研究取得了突出的进展。目前 NPF 基因已经在果蝇 *Drosophila melanogaster* (Brown *et al.*, 1999)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Garczynski *et al.*, 2005)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Stanek *et al.*, 2002)、黄胸散白蚁 *Reticulitermes flavipes* (Nuss *et al.*, 2010)、家蚕 *Bombyx mori* (Roller *et al.*, 2008)、还有蜜蜂 *Apis mellifera* (Hummon *et al.*, 2006)、蝗虫 *Locusta migratoria* (Clynen *et al.*, 2006) 等许多昆虫上成功得到鉴定。

NPF 是一个多效应肽,在昆虫许多行为中发挥了重要的调控作用,诸如取食 (Shen and Cai, 2001; Wu *et al.*, 2003, 2005a, 2005b; Lingo *et al.*, 2007)、学习和记忆 (Krashes *et al.*, 2009)、压力反馈 (Xu *et al.*, 2010)、酒精敏感性 (Wen *et al.*, 2005)、攻击性 (Dierick and Greenspan, 2007)、时钟节律 (Lee *et al.*, 2006) 以及求偶与繁殖 (Lee *et al.*, 2006; Hermann *et al.*, 2012), 其在运动中发挥的作用较弱 (Kiss *et al.*, 2013)。作为研究分子机制及行为调节的模式动物,大量 NPF 的功能均是在果蝇上首次发现 (Nässel and Wegener, 2011),而在其他的昆虫中,除了进食之外,鲜有其他功能得到验证 (Ament *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Van Wielendaele *et al.*, 2013a, 2013b)。所以,本文也主要通过果蝇来阐述 NPF 在调控昆虫行为上的作用。

1 NPF 与其受体 (NPFR) 简介

在非脊椎动物上首次发现 NPF 是在莫尼兹绿虫 *Moniezia expansa* 上 (Maule *et al.*, 1992), 因其序列与哺乳动物 NPY 同源,在其序列的 C 末端的一个酪氨酸 (Y) 被苯丙氨酸 (F) 取代,所以取名为 NPF,用来与哺乳动物中的 NPY 家族进行区别。通过莫尼兹绿虫 NPF 的特异性抗血清,陆续在马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* (Spittaels *et al.*, 1996) 与沙漠蝗虫

Schistocerca gregaria (Veenstra and Lambrou, 1995) 上纯化出一些短肽,这些短肽只有 8~10 个氨基酸,但 C 端也具有相似的 RLRamide 或者 RPRamide 结构。此后的几年间,凡是通过这种途径纯化得到的短肽,无论长短,都称作为 NPFs。直到 1999 年,在果蝇上首次鉴定得到了一个“长型”NPF (Long neuropeptide F, NPF) 多肽 (Brown *et al.*, 1999), 并且找到了第一个编码“短型”NPF (Short neuropeptide F, sNPF) 的基因 (Vanden Broeck, 2001), 此时学者们才意识到它们并不只是名字上的区别而已, NPF 与 sNPF 实际上是由两种完全不同的基因编译,无论是在基因水平上还是前体水平上,均无较大的相关性,本文我们主要讨论 NPF。

在脊椎动物中, NPY 通过与其受体 (Neuropeptide Y receptor, NPYR) 结合,从而激活其下游效应器,通过信号级联放大,对生物体的表型进行调控 (Bockaert and Pin, 1999), 这些受体主要包括 Y1、Y2、Y4、Y5 与 Y6 等几种亚型 (Blomqvist and Herzog, 1997; Larhammar and Salaneck, 2004), Y3 受体由药理学实验推测而来,目前并没有在任何生物上获得鉴定 (Bromée *et al.*, 2006)。这些受体都属于 GPCR (G protein-coupled receptors) 家族,具有典型的 7 次跨膜结构域,但他们在体内的分布有很大不同, Y1、Y2、Y4、Y5 与 Y6 除了都在下丘脑中表达外 (Larhammar and Salaneck, 2004), Y2 还在外围神经系统、肠道中有分布 (Dumont *et al.*, 2000), Y4 分布最为广泛,在全身骨骼肌、结肠、肺、生殖器官中均有表达 (Bard *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1997), Y6 在肾脏中也有所表达 (Weinberg *et al.*, 1996), NPY 以及其类似物多肽 YY (Polypeptides YY, PYY)、胰多肽 (Pancreatic polypeptides, PP) 通过与不同的 NPY 受体结合,介入到不同信号通路的调节。

在昆虫中,首次鉴定到的 NPF 受体 (Neuropeptide F receptor, NPFR) 是果蝇的 NPFR (DmNPFR1; CG1147), 它由 481 个氨基酸组成,能够与同位素标记的果蝇 NPF 特异性结合,在稳定表达 NPFR 的中国仓鼠卵巢细胞

(Chinese hamster ovary, CHO) 细胞中, NPF 能抑制由毛喉素刺激引起的胞内 cAMP 的合成 (Garczynski *et al.*, 2002)。此外, 还在其他的昆虫上也鉴定得到了 NPFR, 例如冈比亚按蚊 *A. gambiae*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、家蚕 *B. mori* 等 (Garczynski *et al.*, 2005; Hauser *et al.*, 2008; Yamanaka *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2010)。在丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 上鉴定到的 NPFR (Hauser *et al.*, 2010) 更类似 sNPF 受体。有趣的是, 目前在蜜蜂中并没鉴定到 NPFR (Hauser *et al.*, 2006)。

2 NPF 的结构

NPF 进化相对保守, 尤其是其 C 末端, 一般由 28~45 个氨基酸组成, 有学者将 86 种昆虫的 NPF 序列进行同源性比较, 得出 NPF 的一般性结构, 可大概表示为 $x_nPxRx_nYLx_2Lx_2YYx_4-RPRFamide$ (Nässel and Wegener, 2011)。按照 C 端的不同, 一般可分为以下几种类型, 通常情况下为 RPRFamide (果蝇为 RVRFa), 已知的 NPF 80% 以上都是这种结构; 另一种结构为 RGRYamide, 这是一种特殊结构的 NPF, 为鳞翅目的昆虫特有, 并且它们往往同时具有两种结构的 NPF, 一种 C 端是与脊椎动物相似的 RYamide 结构, 另一种 C 端是非脊椎动物特有的 RFamide 结构, 虽然他们由完全不同的基因转录前体剪切所得, 但却都能与相同的 NPF 受体结合, 引起胞内钙流上升, 但对于这两种 NPF 功能性的差异, 目前还没有研究 (Roller *et al.*, 2008); 除此之外, 还有一些特殊结构, 比如金小蜂与蜜蜂的 NPF, 它们的 C 末端为 KARYamide (Hummon *et al.*, 2006; Hauser *et al.*, 2010)。

3 NPF 及 NPFR 在体内的分布

3.1 NPF 在昆虫体内的分布

NPF 主要由神经中枢与肠道内分泌细胞分泌 (Brown *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003, 2005a, 2005b; Krashes *et al.*, 2009; Veenstra, 2009), 因此有的学者也称它为脑肠肽 (Brain-gut

peptide)。通过原位杂交与免疫标记的方法定位了 NPF 在果蝇大脑与肠道中的分布 (Brown *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003, 2005a, 2005b), 但在腹神经索中被没有检测到表达 NPF 的神经元。

后来 *npf*-Gal4 启动子和其他技术的运用, 对果蝇大脑中表达 NPF 的神经元有了更为准确的定位。果蝇脑中表达 NPF 的神经元的分布及数量在幼虫期与成虫期有显著的不同, 在果蝇 3 龄幼虫脑中共有 6 个表达 NPF 的神经元, 其中两对在前脑背部与中部, 另一对在食管下神经节; 羽化之后成虫大脑中表达 NPF 的神经元变得更为丰富, 其数量具有典型的性别分化, 在雄性果蝇成虫中有 26 个表达 NPF 的神经元, 而在雌性果蝇脑中仅有 20 个, 雄性中多出的 3 对神经元主要是前脑叶的背侧神经元 (Lateral dorsal neurons, LN_dS), 而这些神经元均属于时间神经元亚群, 这暗示 NPF 可能参与调节果蝇的时钟节律行为 (Lee *et al.*, 2006)。通过设计新的 NPF 特异性抗体, 排除了类似神经肽 Tachykinin 的干扰, 更为精确地定位了 NPF 在果蝇中肠中的分布: NPF 主要分布在中肠中部, 少量分布在中肠前段 (Marianes and Spradling, 2013; Veenstra and Ida, 2014)。

通过特异抗血清, 对吸血蝽 *Rhodnius prolixus* (Gonzalez and Orchard, 2008)、黄胸散白蚁 *Reticulitermes flavipes* (Nuss *et al.*, 2008)、埃及伊蚊 *A. aegypti* (Stanek *et al.*, 2002)、家蚕 *B. mori* (Roller *et al.*, 2008)、棉铃虫 *Helicoverpa zea* (Huang *et al.*, 2011) 等也进行了 NPF 分布研究, 在吸血蝽大脑中央与侧面神经分泌细胞以及心侧体和背血管都能检测到极显著荧光, 在食管下神经节、腹神经节、胸神经节中也能检测到较弱荧光。NPF 在脑神经中枢的广泛分布暗示 NPF 极可能是一种神经激素 (Gonzalez and Orchard, 2008)。

在棉铃虫幼虫大脑中可以检测到 40~50 个表达 NPF 的神经元, 在食管下神经节中能检测到 12 个, 在胸神经节有 2~4 个, 在腹神经节也能检测到 2 个。这些脑神经元中有一部分属于神经分泌细胞, 并通过轴突与心侧体连接。羽化后,

在成虫前脑背面及侧面还有视叶上的一些神经元也能检测到 NPF 表达 (Huang *et al.*, 2011)。

在黄胸散白蚁脑中, NPF 的表达比较丰富, 分布在大脑中 140 个神经元和所有的腹神经节中 (Nuss *et al.*, 2008)。而在埃及伊蚊脑中, 一对表达 NPF 的神经元分布在中央神经分泌细胞, 2 对在前脑侧面, 另一对在食管下神经节。

Roller 等 (2008) 运用原位杂交的方法对家蚕幼虫的两种 NPF 进行了定位研究分析, 发现脑中约有 24~32 个表达 NPF1 的神经元被检测到, 在咽下神经节有 2 对表达 NPF1 的神经元, 背侧与背外侧神经元各能检测到 3 个, 前额神经节也能检测到一个 NPF1 表达信号; 相对于 NPF1, NPF2 的表达明显少于 NPF1, 脑中只检测到 5 个表达 NPF2 的神经元, 而咽下神经节仅有一对表达 NPF2 的神经元, 在背侧神经节只能检测到很微弱的信号。除此之外, 在中肠中 NPF1 和 NPF2 均有大量表达。NPF1 与 NPF2 分布的差异, 可能暗示两者并不是单纯的冗余神经肽, 而是参与到不同的信号通路中 (Roller *et al.*, 2008)。

3.2 NPFR 在昆虫体内的分布

NPFR 的分布研究并不是很广泛。运用原位 RNA 杂交, 发现果蝇 3 龄末期幼虫中肠、脑还有副神经索中有大量 NPFR 表达 (Garczynski *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2003)。Wen 等 (2005) 使用表达 GPF 的 *npfr*-Gal4 的果蝇系探究了 NPFR 在果蝇成虫大脑中的表达情况, 在大脑背外侧检测到 2 个表达 NPFR 的神经元, 其他 3 个分布在食管下神经元, 但都只能检测到少量的 NPFR 的表达。在家蚕上 NPFR 的分布较为广泛, 用定量 PCR 的方法对 5 龄幼虫全组织中的 NPFR 相对表达量进行分析, 发现 NPFR 在精巢与中肠中表达量最高, 其次为卵巢、表皮和脑, 在表皮和脂肪体中表达量相对较低 (Deng *et al.*, 2014)。

4 NPF 的生理功能

4.1 NPF 对取食的影响

在鉴定获得果蝇 NPF 后不久 (Brown *et al.*,

1999), NPF 的功能性验证开始成为研究热点。由于 NPF 与 NPY 同源性的特点, 学者们从已经验证的 NPY 生理功能来推测 NPF 的作用, 首个在果蝇上被验证的 NPF 功能就是取食 (Shen and Cai, 2001; Wu *et al.*, 2003, 2005a)。在果蝇幼虫发育到 3 龄末期时, 幼虫会进入徘徊阶段, 此时幼虫会停止取食并寻找合适的化蛹场所 (Wu *et al.*, 2003), 这种取食行为的转变恰好与大脑与中肠中 NPF 的表达下调相吻合。通过 RNAi 手段对 NPF 通路进行干扰, 发现 NPF 的缺失会使幼虫表现出老龄化, 被干扰的幼虫会提前进入到徘徊阶段并化蛹, 而 NPF 的过表达则会延长果蝇幼虫的取食时间, 推迟徘徊阶段的出现 (Wu *et al.*, 2003)。

另一项研究表明 NPF 还会影响果蝇幼虫对劣质食物的耐受性。一般而言, 除了在非常饥饿的情况下, 低龄幼虫不会取食低质量的食物。通过对 NPF 信号通路的干扰会增加正常幼虫对低质量食物的摄入 (Wu *et al.*, 2005a, 2005b), 进一步的研究还发现 NPFR 的过表达会增加果蝇幼虫在有害低温条件下的取食行为, 而干扰之后会有相反的表型 (Wu *et al.*, 2005b; Lingo *et al.*, 2007)。

除了果蝇, 近年来也有研究表明 NPF 能对其他昆虫产生类似的调节作用 (Van Wielendaele *et al.*, 2013a)。在饥饿状态下, 沙漠蝗虫 *S. gregaria* 中枢神经系统中 NPF 的表达量是正常取食组的 2 倍以上, 而当饥饿组的蝗虫饱食一顿之后 1.5 h, 脑中的 NPF 表达量会显著下降。通过对蝗虫 NPF 信号通路进行干扰, 在同样的营养条件下, 被干扰的成虫每次取食明显下降, 而通过重新注射 NPF 之后的恢复组则与对照无明显差异 (Schoofs *et al.*, 2001; Van Wielendaele *et al.*, 2013a)。

4.2 NPF 对大脑奖励系统的影响

交配、酒精、食物等都能刺激果蝇大脑的奖励系统 (Devineni and Heberlein, 2009; Kaun *et al.*, 2011), 而 NPF/NPFR 信号可能是果蝇大脑奖励系统活性强度的代表 (Shohat-Ophir

et al., 2012)。雄性果蝇被剥夺交配机会 (Sexual deprivation) 以后会刺激 NPF 表达上调, 此时果蝇会增加奖励寻求行为, 例如摄入酒精。相反, 充分交配以后的雄性果蝇 NPF 则会下调, 此时, 果蝇趋向减少奖励寻求行为。当 NPFR 基因被沉默后, 发现充分交配后的雄虫也会显著降低酒精嗜好 (Shohat-Ophir *et al.*, 2012)。使用热激活阳离子通道 dTRPA1, 可以人为激活大脑中表达 NPF 的神经元, 此通道受 *npf*-GAL4 调控 (Rosenzweig *et al.*, 2005; Krashes *et al.*, 2009)。当环境温度为 20℃ 时, 通道未激活, 表达 NPF 的神经元受到抑制, 此时被剥夺交配机会的雄性果蝇与对照组一样会增加对酒精的摄入; 但环境温度达到 29℃ 时, 通道激活, NPF 大量表达, 被剥夺交配机会的雄性果蝇酒精摄入行为明显降低。由此可见, NPF/NPFR 信号不仅是大脑奖励系统活性水平的指示剂, 而且也能作为调节剂影响大脑奖励系统, 从而影响诸如取食、交配、酒精摄入等奖励寻求行为 (Shohat-Ophir *et al.*, 2012)。

4.3 NPF 对学习行为的影响

饥饿果蝇在嗅觉学习实验中表现良好, 而饱腹的果蝇表现欠佳。最近有实验表明, 一个 NPF 参与的神经通路与食物记忆相关, 它能够整合饥饿和饱食记忆的内部状态 (Krashes *et al.*, 2009)。对转基因果蝇表达 NPF 的神经元进行刺激 (使用热激活阳离子通道 dTRPA1), 用来模拟食物不足的状态, 发现此种处理也能让饱腹果蝇在嗅觉试验中表现良好。另外, 还发现有一组控制蕈形体的多巴胺神经元能够表达 NPFR, 切除这 6 个神经元会明显提高饱腹果蝇在嗅觉试验中的表现, 而激活这些神经元则会抑制饥饿果蝇的学习表现, 认为表达 NPF 与 NPFR 的神经元组成一个开关, 能动态调节食欲记忆的输出。但目前仍然不清楚果蝇脑中 20~26 个表达 NPF 的神经元中具体是哪些参与到这个调控 (Krashes *et al.*, 2009)。

4.4 NPF 对时钟节律的影响

在正常的光暗周期下 (Light-dark, LD), 果蝇在亮灯前后表现出典型的早活动高峰, 在熄灯

前后表现出典型的黄昏活动高峰, 这两个行为受到不同的脑神经元控制。表达神经肽⁺色素趋散因子 (Pigment dispersing factor, PDF) 的 4 个小型腹侧神经元 (Small ventral lateral neurons, s-LN_vs) 调控果蝇的早间活动 (Helfrich-Förster, 1995); 而背侧神经元 (Lateral dorsal neurons, LN_{ds}) 调控黄昏活动 (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004)。在上文中提到, NPF 在雄性果蝇额外 3 对时钟神经元中有表达, 这 3 对神经元属于前脑叶的背侧神经元, 将表达 NPF 的阳性神经元切除后, 发现对雄性果蝇黄昏活动的时长和活动都有影响, 猜测表达 NPF 的神经元可能有调控黄昏活动的功能 (Lee *et al.*, 2006; Setzu *et al.*, 2012)。使用表达致死基因的 *npf*-GAL4 系统将果蝇脑中表达 NPF 的神经元全部切除后, 发现不管是在 16L: 8D 或是 12L: 12D 的情况下, 处理组的果蝇比对照组提前到达黄昏活动高峰, 并且平均活动强度显著高于对照组, 雌雄果蝇的黄昏活动行为差异不大 (Hermann *et al.*, 2012)。

4.5 NPF 对酒精敏感性的影响

有研究表明, NPF 信号通路能急剧调节果蝇对酒精的敏感性, 通过抑制 NPF/NPFR 信号, 会减弱成年果蝇对酒精的敏感性, NPF 的过表达则会引起相反的表型 (Wen *et al.*, 2005)。这种敏感性的改变只对乙醇具有特异性, NPF/NPFR 信号的抑制对乙醚的敏感性没有影响。因此, NPF 信号一方面可以急剧调节果蝇对酒精的敏感性, 另一方面也可以在寻找食物时充当酒精感应器 (Wen *et al.*, 2005)。果蝇嗜好成熟与发酵的水果, 而具有挥发性的乙醇是觅食过程中其中一个很重要的食物线索, 因此猜测 NPF 信号能加强觅食行为可能是 NPF 增加酒精敏感性的结果 (Wen *et al.*, 2005)。在线虫与小鼠中, NPF/NPY 同样与酒精耐受性相关 (Thiele *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2003)。

4.6 NPF 对求偶与繁殖的影响

在雄性果蝇脑中, 有 3 对“时钟”神经元能够表达 NPF, 这些神经元在果蝇脑中的表达受到

两种因子的共同调控, 其中一个是一个时间基因 *clock* 和 *cycle*, 另一个是一种雄性 *fruitless* (Fru^M) 基因, 它负责编码一种 BTB 锌指转录因子, 同时 Fru^M 又受到变性因子 *transformer* (tra^F) 性别决定通路的调控, 通过操作 tra^F 的表达, 可以使雄性果蝇雌性化, 从而特异性地沉默这 3 对表达 NPF 的神经元 (Lee *et al.*, 2006)。通过雌性化雄性果蝇, 发现果蝇的求偶行为有所减弱, 因此, 推断雄性果蝇的求偶行为可能受到这额外 3 对表达 NPF 的神经元控制。

交配延长行为 (Longer mating duration, LSD) 是果蝇的一种社会性行为。当雄性果蝇交配时, 如果周围有其他雄性聚集, 在交配的雄性果蝇会延长交配时间, 以提高遗传自己基因的几率 (Bretman *et al.*, 2009, 2010)。这种行为由果蝇大脑的时钟节律神经元控制 (Kim *et al.*, 2012), 后来的实验证明是由时钟神经元分泌的 NPF 与 PDF 两种神经肽共同参与了调节雄性果蝇的竞争诱导的延长交配行为。通过将神经元逐个切除, 发现表达 PDF 的 4 个 sLN_v 神经元与表达 NPF 的 2 个 LN_d 神经元参与调节这一个通路; 将这些神经元切除后, 处理组的雄性果蝇 LMD 行为明显减弱 (Kim *et al.*, 2013)。

在沙漠蝗虫中, 通过向雄性成虫连续注射 trNPF, 发现会使雄性成虫的精巢与精囊相对重量上升 (精巢重量 $\times 100$ /虫重, 精囊重量 $\times 100$ /虫重), 与处女雌虫交配后产出的卵表现出更大的卵荚与更高的孵化率。然而, 通过 RNAi 对 trNPF 前体进行敲除, 则会使精巢与精囊的相对重量下降, 与雌虫交配后产出的卵卵荚变小且孵化率降低。除此之外, 当连续注射 trNPF, 雄性成虫会性早熟并提前开始交配, 相对于正常对照组的雄性成虫, 处理组的雄虫提前 2 d 完成交配 (90% 以上的雄虫进行过交配), 而注射 trNPF-dsRNA 的成虫的最终交配率只有 60% 左右, 显著低于对照组 (Van Wielendaele *et al.*, 2013b), 这说明 NPF 对雄性蝗虫的生殖行为有很大影响。

4.7 NPF 对攻击性行为的影响

Karl 等 (2004) 发现 NPYR 能够影响小鼠因

领土引起的攻击行为。作为 NPY 的同源肽, 有学者猜测 NPF 也可能参与昆虫的攻击性行为, 这一功能目前只在果蝇上得到验证 (Dierick and Greenspan, 2007)。领土、食物与交配权往往是引发争斗的主要原因。雄性果蝇的攻击性要显著强于雌性个体, 由于雌雄果蝇分泌 NPF 的神经元数量存在差异 (Lee *et al.*, 2006), 这也许是导致雌雄果蝇群体攻击性不同的一个重要原因。通过切除雄性果蝇表达 NPF 的神经元, 果蝇的攻击行为 (以争斗频率为指标) 显著提升; 有趣的是, 通过 tra^F 因子将雄性果蝇雌性化, 此处理同样会增加攻击性行为 (Dierick and Greenspan, 2007)。雌性果蝇相较于雄性天生缺少 3 对表达 NPF 的神经元, 可是雌性的攻击行为却弱于雄性个体, 这说明 NPF 的表达水平并不是决定果蝇攻击性的直接原因, 作者推测 NPF 可能是通过一种间接的方式来调控攻击行为: 雄性果蝇中存在一个触发攻击行为的特异神经回路, 并且能受到 NPF 的抑制。

4.8 NPF 对保幼激素合成的影响

还有研究表明, NPF/NPFR 参与了保幼激素的合成 (Wang *et al.*, 2012)。对果蝇幼虫的 2 种 NPFR 基因 (NPFR、NepYr) 进行沉默后, 发现在进入徘徊阶段的果蝇 3 龄幼虫中, 环腺 (Ring gland) 合成的 JHIII (Juvenile hormone III) 与 JHB₃ (JHIII bisepoxide) 与对照组相比下降了 35% 左右。而到成虫后, 这种影响却不明显, 只有在沉默掉 NepYr 的果蝇系中, JHB₃ 的合成表现出明显受到抑制, 其他的果蝇系与对照组均无明显差异, 因此 NPF/NPFR 信号主要参与了幼虫 JH 的分泌, 而到成虫之后这种效应变弱 (Wang *et al.*, 2012)。

5 NPF 的研究及应用展望

在哺乳动物中, NPY 是一种多效应肽, 它能够刺激食欲、引起血管收缩、抗焦虑, 并且参与调节时钟节律、心跳、呼吸、性行为和痛觉传递 (Larhammar, 1996; Beck, 2001; Brumovsky *et al.*, 2007; Sundström *et al.*, 2008)。除此之外,

表 1 常见昆虫 NPF 序列对比
Table 1 Alignment of common insects' NPF sequences

Order	Species	Sequence	Reference/ Accession number
Hemiptera	<i>Aphis gossypii</i> NPF	NPVTSSEVESIARPTRPKTFGSPDELRSYLDQLGQYLAV VSRPRFG	AEE01348
	<i>Acyrtosiphon pisum</i> NPF	HPVTSTEVESIARPTRPKTFGSPDELRSYLDQLGQYLAV VARPRG	XP_001944865
Coleoptera	<i>Dendroctonus ponderosae</i> NPF	EPIPRSDDMFRELIKLDQLYSSIARPRFG	G0486382
	<i>Tribolium castanneum</i> NPF	ARTSRSDMLERLIKLDDEMYSAVARPRFG	AAJJO1002624
	<i>Antheraea assama</i> NPF1	REEGPHDMADALRMLQELDRYYTQAARPRFG	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Bombyx mori</i> NPF1	REEGPNNVAEALRILQLLDNYYTQAARPRFG	NP_001166SS3
	<i>Danaus plexippus</i> NPF1	REEGPHDMADALRMLQELDRLYTQASRPRFG	AGH20045
	<i>Helicoverpa zea</i> NPF1	REEGPHDMADALRMLQELDRYYTQAARPRFG	ADK66276
	<i>Heliothis virescens</i> NPF1	REEGPHDMADALRMLQELDRYYTQAARPRFG	GT212569
	<i>Manduca sexta</i> NPF1	REEGPHDMADALRMLQELDRYYTQAARPRFG	AGH20046
	<i>Melitaea cinxia</i> NPF1	REEGPHEMADALRMLQELDRLYTQAARPRFG	Contig_13337
	<i>Ostrinia nubilalis</i> NPF1	REEGPHDMADALRMLQELDRYYTQAARPRFG	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Plodia interpunctella</i> NPF1	REEGPHDMADAIRMLQELDRLYTQAARPRFG	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Spodoptera frugiperda</i> NPF1	REEGPHDMADALRMLQELDRYYTQAARPRFG	Sf2M08859-3-1
Lepidoptera	<i>Helicoverpa assulta</i> NPF1	REEGPHDMADALRMLQELDRYYTQAARPRFG	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Plutella xylostella</i> NPF2	QALGPRLRRPERLHNAEQLSNYLKELQEYYSVHGRGRYG	(Shi <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Bombyx mori</i> NPF2	QYPRRRRPERFDTAEQISNYLKELQEYYSVHGRGRYG	NP_001124361
	<i>Danaus plexippus</i> NPF2	QYPRRRRPERFDTAEQISNYLKELQEYYSVHGRGRYG	EHJ7240S
	<i>Heliothis virescens</i> NPF2	QYPRRRRPERFDTAEQISNYLKELQEYYSVHGRGRYG	HOO52951
	<i>Manduca sexta</i> NPF2	RPERFDTAEQISNYLKELQEYYSVHGRGRYG	IC7130AfEcon27560
	<i>Melitaea cinxia</i> NPF2	QYPRRRRPERFDTAEQISNYLKELQEYYSVHGRGRYG	Contig_15738
	<i>Ostrinia nubilalis</i> NPF2	QYPRRRRPERLDTAEQISNYLRELQEYYSVHGRGRYG	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Helicoverpa assulta</i> NPF2	QYPRRRRPERFDTAEQISNYLKELQEYYSVHGRGRYG	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Aedes aegypti</i> NPF	SFTDARPQDDPTSAEAIIRLLQELETKHAQHARPRFG	AAM74026
Diptera	<i>Anopheles gambiae</i> NPF	LVAARQSDSAASVAAAIRYLQELETKHAQHARPRFG	AAT81601
	<i>Drosophila melanogaster</i> NPF	SNSRPPRKNDVNTMADAYKFLQDLDTYYGDRARVRFG	AAD42053
Orthoptera	<i>Locusta migratoria</i> NPF	AEAQQADGNKLEGLADALKYLQELDRFYQSQVARPRFG	CO854418
Isoptera	<i>Reticulitermes flavipes</i> NPF	VPSVWAKPSDPEQLADTLKYLEELDRFYQSQVARPRFG	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
Phthiraptera	<i>Pediculus humanus</i> NPF	NMLRPTRPKIFSSPNDFKSYLEDLGNFYAAGRPRFG	XP_0024282S5
Hymenoptera	<i>Nasonia vitripennis</i> NPF	EPEPMARPTRPKVFESPEELRQYLDLVKEYYSLSGKARYG	XP_008206769
	<i>Apis mellifera</i> NPF	EPEPMARPTRPEIFTSPEELRRYIDHVSDDYLLSGKARYG	XP_006559366
Acarina	<i>Varroa destructor</i> NPF	QEAPNNLNAALEYLEGLDRYYSAKARPRYG	ADDG0102S646
	<i>Tetranychus urticae</i> NPF	RPNIDEMANMAEALRYLEKLDKYYSQIARPRFG	GW042697
Araneida	<i>Latrodectus hesperus</i> NPF	HPHGEDDMEMAEALHFLEKLDKYYSQIARPRYG	(Christie, 2015)
Primates	<i>Homo sapiens</i> NPY	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRYG	AAA59946

NPY 还控制一些脑垂体激素的分泌 (Larhammar, 1996; Barb *et al.*, 2006)。有学者提出下丘脑的 NPY 与能量平衡和血液瘦素水平的改变有关, 在营养状况与生长繁育之间起到纽带作用 (Suzuki *et al.*, 1996; Barb *et al.*, 2006), 最新的研究表明 NPY 可能参与到免疫反应中 (Farzi *et al.*, 2015), 这些发现为 NPF 的功能探索提供了一些方向。

近年来在许多昆虫中已经鉴定得到了 NPF, 即 NPY 的同源物, 但其功能的验证还处在初始阶段, 对 NPF/NPFR 信号通路的研究也不多。近 10 多年来, NPF 的功能研究主要集中在果蝇上 (Wu *et al.*, 2003, 2005a, 2005b; Lee *et al.*, 2006; Krashes *et al.*, 2009), 但除了进食以外, 其他功能很少在其他昆虫上得到验证。因此, 目前 NPF 的主要研究方式是在模式昆虫上进行功能挖掘, 然后在其他昆虫上验证。

随着“i5k”计划 (曼哈顿昆虫基因组计划) 的提出, 在 2016 年预计得到超过 5 000 种主要昆虫及节肢动物的基因组 (Robinson *et al.*, 2011), 这为 NPF/NPFR 的研究带来了巨大的便利。更多物种的 NPF 及 NPFR 序列得到鉴定, 将使我们更容易找到新的类型的 NPF 和 NPFR, 为新功能的发现奠定基础。

害虫抗药性的产生日益成为害虫防治的首要问题, 对 NPF/NPFR 的调控是一个潜在的防治手段 (Verlinden *et al.*, 2014)。如上文所述, NPF 参与到昆虫许多重要的行为, 如取食、生殖、时钟节律等行为的调控, 加上其分布广泛、保守度高等特点, 使得 NPF/NPFR 能够成为新型杀虫剂的潜在靶标 (Van Hiel *et al.*, 2010)。在以后的研究中, 仍需要进一步阐明 NPF/NPFR 的上下游作用元件, 从而利用药理学筛选出稳定并且高活性的阻遏剂, 对其通路进行抑制, 达到对靶标害虫的特异性控制。

参考文献 (References)

- Ament SA, Velarde RA, Kolodkin MH, Moyse D, Robinson GE, 2011. Neuropeptide Y-like signalling and nutritionally mediated gene expression and behaviour in the honey bee. *Insect Mol. Biol.*, 20(3): 335–345.
- Barb CR, Kraeling RR, Rampacek GB, Hausman GJ, 2006. The role of neuropeptide Y and interaction with leptin in regulating feed intake and luteinizing hormone and growth hormone secretion in the pig. *Reproduction*, 131(6): 1127–1135.
- Bard JA, Walker MW, Branchek TA, Weinshank RL, 1995. Cloning and Functional expression of a human y4 subtype receptor for pancreatic-polypeptide, neuropeptide-y, and peptide Yy. *J. Biol. Chem.*, 270(45): 26762–26765.
- Beck B, 2001. KO's and organisation of peptidergic feeding behavior mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25(2): 143–158.
- Blomqvist AG, Herzog H, 1997. Y-receptor subtypes - How many more? *Trends in Neurosciences*, 20(7): 294–298.
- Blumenthal S, 2010. From Insulin and insulin-like activity to the insulin superfamily of growth-promoting peptides a 20th-century odyssey. *Perspect. Biol. Med.*, 53(4): 491–508.
- Bockaert J, Pin JP, 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo. J.*, 18(7): 1723–1729.
- Bretman A, Fricke C, Chapman T, 2009. Plastic responses of male *Drosophila melanogaster* to the level of sperm competition increase male reproductive fitness. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.*, 276(1662): 1705–1711.
- Bretman A, Fricke C, Hetherington P, Stone R, Chapman T, 2010. Exposure to rivals and plastic responses to sperm competition in *Drosophila melanogaster*. *Behav. Ecol.*, 21(2): 317–321.
- Bromée T, Sjödin P, Fredriksson R, Boswell T, Larsson TA, Salaneck E, Zoorob R, Mohell N, Larhammar D, 2006. Neuropeptide Y-family receptors Y-6 and Y-7 in chicken - Cloning, pharmacological characterization, tissue distribution and conserved synteny with human chromosome region. *Febs. J.*, 273(9): 2048–2063.
- Brown MR, Crim JW, Arata RC, Cai HN, Chun C, Shen P, 1999. Identification of a *Drosophila* brain-gut peptide related to the neuropeptide Y family. *Peptides*, 20(9): 1035–1042.
- Brumovsky P, Shi TS, Landry M, Villar MJ, Hokfelt T, 2007. Neuropeptide tyrosine and pain. *Trends Pharmacol. Sci.*, 28(2): 93–102.
- Chee MJ, Colmers WF, 2008. Y eat? *Nutrition*, 24(9): 869–877.
- Christie AE, 2015. In silico characterization of the neuropeptidome of the Western black widow spider *Latrodectus hesperus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 210: 63–80.
- Christie AE, Chapline MC, Jackson JM, Dowda JK, Hartline N, Malecha SR, Lenz PH, 2011. Identification, tissue distribution and orexigenic activity of neuropeptide F (NPF) in penaeid shrimp. *J. Exp. Biol.*, 214(Pt 8): 1386–1396.
- Clynen E, Huybrechts J, Verleyen P, De Loof A, Schoofs L, 2006. Annotation of novel neuropeptide precursors in the migratory

Ament SA, Velarde RA, Kolodkin MH, Moyse D, Robinson GE, 2011. Neuropeptide Y-like signalling and nutritionally mediated gene expression and behaviour in the honey bee. *Insect Mol.*

- locust based on transcript screening of a public EST database and mass spectrometry. *BMC Genomics*, 7: 201.
- Clynen E, Husson SJ, Schoofs L, 2009. Identification of new members of the (short) neuropeptide F family in locusts and *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1163: 60–74.
- Davies AG, Pierce-Shimomura JT, Kim H, VanHoven MK, Thiele TR, Bonci A, Bargmann CI, McIntire SL, 2003. A central role of the BK potassium channel in behavioral responses to ethanol in *C. elegans*. *Cell*, 115(6): 655–666.
- de Jong-Brink M, ter Maat A, Tensen CP, 2001. NPY in invertebrates: molecular answers to altered functions during evolution. *Peptides*, 22(3): 309–315.
- Deng XY, Yang HP, He XB, Liao Y, Zheng CX, Zhou Q, Zhu CG, Zhang GZ, Gao JM, Zhou NM, 2014. Activation of *Bombyx* neuropeptide G protein-coupled receptor A4 via a G α i-dependent signaling pathway by direct interaction with neuropeptide F from silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 45(1): 77–88.
- Devineni AV, Heberlein U, 2009. Preferential ethanol consumption in *Drosophila* models features of addiction. *Curr. Biol.*, 19(24): 2126–2132.
- Dierick HA, Greenspan RJ, 2007. Serotonin and neuropeptide F have opposite modulatory effects on fly aggression. *Nat. Genet.*, 39(5): 678–682.
- Dirksen H, Neupert S, Predel R, Verleyen P, Huybrechts J, Strauss J, Hauser F, Stafflinger E, Schneider M, Pauwels K, Schoofs L, 2011. Genomics, transcriptomics, and peptidomics of *Daphnia pulex* neuropeptides and protein hormones. *J. Proteome Res.*, 10(10): 4478–4504.
- Dumont Y, Cadieux A, Doods H, Pheng LH, Abounader R, Hamel E, Jacques D, Regoli D, Quirion R, 2000. BIIE0246, a potent and highly selective non-peptide neuropeptide YY2 receptor antagonist. *Brit. J. Pharmacol.*, 129(6): 1075–1088.
- Fan Y, Sun P, Wang Y, He XB, Deng XY, Chen XP, Chang GZ, Chen X, Zhou NM, 2010. The G protein-coupled receptors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40(8): 581–591.
- Farzi A, Reichmann F, Holzer P, 2015. The homeostatic role of neuropeptide Y in immune function and its impact on mood and behaviour. *Acta Physiologica*, 213(3): 603–627.
- Feng GP, Reale V, Chatwin H, Kennedy K, Venard R, Ericsson C, Yu K, Evans PD, Hall LM, 2003. Functional characterization of a neuropeptide F-like receptor from *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Neurosci.*, 18(2): 227–238.
- Garczynski SF, Brown MR, Shen P, Murray TF, Crim JW, 2002. Characterization of a functional neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Peptides*, 23(4): 773–780.
- Garczynski SF, Crim JW, Brown MR, 2005. Characterization of neuropeptide F and its receptor from the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Peptides*, 26(1): 99–107.
- Gonzalez R, Orchard I, 2008. Characterization of neuropeptide F-like immunoreactivity in the blood-feeding hemipteran, *Rhodnius prolixus*. *Peptides*, 29(4): 545–558.
- Grima B, Chelot E, Xia RH, Rouyer F, 2004. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, 431(7010): 869–873.
- Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Blenau W, Grimmlikhuijzen CJP, 2006. A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Prog. Neurobiol.*, 80(1): 1–19.
- Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Park Y, Li B, Tanaka Y, Predel R, Neupert S, Schachtner J, Verleyen P, Grimmlikhuijzen CJP, 2008. A genome-wide inventory of neurohormone GPCRs in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Front. Neuroendocrinol.*, 29(1): 142–165.
- Hauser F, Neupert S, Williamson M, Predel R, Tanaka Y, Grimmlikhuijzen CJP, 2010. Genomics and peptidomics of neuropeptides and protein hormones present in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *J. Proteome Res.*, 9(10): 5296–5310.
- Helfrich-förster C, 1995. The period clock gene is expressed in central-nervous-system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(2): 612–616.
- Hermann C, Yoshii T, Dusik V, Helfrich-Forster C, 2012. Neuropeptide F immunoreactive clock neurons modify evening locomotor activity and free-running period in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.*, 520(5): 970–987.
- Hököfelt T, Stanic D, Sanford SD, Gatlin JC, Nilsson I, Paratcha G, Ledda F, Fetisov S, Lindfors C, Herzog H, Johansen JE, Ubink R, Pfenninger KH, 2008. NPY and its involvement in axon guidance, neurogenesis, and feeding. *Nutrition*, 24(9): 860–868.
- Huang YQ, Crim JW, Nuss AB, Brown MR, 2011. Neuropeptide F and the corn earworm, *Helicoverpa zea*: A midgut peptide revisited. *Peptides*, 32(3): 483–492.
- Hummon AB, Richmond TA, Verleyen P, Baggerman G, Huybrechts J, Ewing MA, Vierstraete E, Rodriguez-Zas SL, Schoofs L, Robinson GE, Sweedler JV, 2006. From the genome to the proteome: uncovering peptides in the *Apis* brain. *Science*, 314(5799): 647–649.
- Karl T, Lin S, Schwarzer C, Sainsbury A, Couzens M, Wittmann W, Boey D, von Horsten S, Herzog H, 2004. Y1 receptors regulate aggressive behavior by modulating serotonin pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(34): 12742–12747.
- Kaun KR, Azanchi R, Maung Z, Hirsh J, Heberlein U, 2011. A

- Drosophila* model for alcohol reward. *Nat. Neurosci.*, 14(5): 612–619.
- Kim WJ, Jan LY, Jan YN, 2012. Contribution of visual and circadian neural circuits to memory for prolonged mating induced by rivals. *Nat. Neurosci.*, 15(6): 876–883.
- Kim WJ, Jan LY, Jan YN, 2013. A PDF/NPF neuropeptide signaling circuitry of male *Drosophila melanogaster* controls rival-induced prolonged mating. *Neuron*, 80(5): 1190–1205.
- Kiss B, Szlanka T, Zvara A, Zurovec M, Sery M, Kakas S, Ramasz B, Hegedus Z, Lukacsovich T, Puskas L, Fonagy A, Kiss I, 2013. Selective elimination/RNAi silencing of FMRF-related peptides and their receptors decreases the locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp.*, 191: 137–145.
- Krashes MJ, DasGupta S, Vreede A, White B, Armstrong JD, Waddell S, 2009. A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell*, 139(2): 416–427.
- Larhammar D, 1996. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept.*, 62(1): 1–11.
- Larhammar D, Salaneck E, 2004. Molecular evolution of NPY receptor subtypes. *Neuropeptides*, 38(4): 141–151.
- Lee GH, Bahn JH, Park JH, 2006. Sex- and clock-controlled expression of the neuropeptide F gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(33): 12580–12585.
- Leung PS, Shaw C, Maule AG, Thim L, Johnston CF, Irvine GB, 1992. The primary structure of neuropeptide F (NPF) from the garden snail, *Helix aspersa*. *Regul. Pept.*, 41(1): 71–81.
- Lingo PR, Zhao Z, Shen P, 2007. Co-regulation of cold-resistant food acquisition by Insulin- and neuropeptide Y-like systems in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*, 148(2): 371–374.
- Liu XG, Zhang YF, Zhou ZJ, Zhao ZW, Liu XG, 2013. Cloning and sequence analysis of neuropeptide f from the oriental tobacco budworm *Helicoverpa Assulta* (Guenee). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 84(3): 115–129.
- Marianes A, Spradling AC, 2013. Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *Elife*, 2: e00886.
- Marks NJ, Maule AG, 2010. Neuropeptides in helminths: occurrence and distribution. *Neuropeptide Systems as Targets for Parasite and Pest Control*, 692: 49–77.
- Maule AG, Shaw C, Halton DW, Brennan GP, Johnston CF, Moore S, 1992. Neuropeptide F (*Moniezia expansa*): localization and characterization using specific antisera. *Parasitology*, 105(3): 505–512.
- Nässel DR, 1993. Neuropeptides in the insect brain - a review. *Cell Tissue Res.*, 273(1): 1–29.
- Nässel DR, Wegener C, 2011. A comparative review of short and long neuropeptide F signaling in invertebrates: any similarities to vertebrate neuropeptide Y signaling? *Peptides*, 32(6): 1335–1355.
- Nuss AB, Forschler BT, Crim JW, Brown MR, 2008. Distribution of neuropeptide f-like immunoreactivity in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*. *J. Insect Sci.*, 8(68): 1–18.
- Nuss AB, Forschler BT, Crim JW, TeBrugge V, Pohl J, Brown MR, 2010. Molecular characterization of neuropeptide F from the eastern subterranean termite *Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Peptides*, 31(3): 419–428.
- Rajpara SM, Garcia PD, Roberts R, Eliassen JC, Owens DF, Maltby D, Myers RM, Mayeri E, 1992. Identification and molecular cloning of a neuropeptide Y homolog that produces prolonged inhibition in *Aplysia* neurons. *Neuron*, 9(3): 505–513.
- Robinson GE, Hackett KJ, Purcell-Miramontes M, Brown SJ, Evans JD, Goldsmith MR, Lawson D, Okamuro J, Robertson HM, Schneider DJ, 2011. Creating a buzz about insect genomes. *Science*, 331(6023): 1386–1386.
- Roller L, Yamanaka N, Watanabe K, Daubnerova I, Zitnan D, Kataoka H, Tanaka Y, 2008. The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1147–1157.
- Rosenzweig M, Brennan KM, Tayler TD, Phelps PO, Patapoutian A, Garrity PA, 2005. The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes Dev.*, 19(4): 419–424.
- Setzu M, Biolchini M, Lilliu A, Manca M, Muroi P, Poddighe S, Bass C, Angioy AM, Nichols R, 2012. Neuropeptide F peptides act through unique signaling pathways to affect cardiac activity. *Peptides*, 33(2): 230–239.
- Shen P, Cai HN, 2001. *Drosophila* neuropeptide F mediates integration of chemosensory stimulation and conditioning of the nervous system by food. *J. Neurobiol.*, 47(1): 16–25.
- Shi M, Dong S, Li MT, Yang YY, Stanley D, Chen XX, 2015. The Endoparasitoid, *Cotesia vestalis*, regulates host physiology by reprogramming the neuropeptide transcriptional network. *Scientific Reports*, 5. doi: 10.1038/srep08173.
- Shohat-Ophir G, Kaun KR, Azanchi R, Heberlein U, 2012. Sexual deprivation increases ethanol intake in *Drosophila*. *Science*, 335(6074): 1351–1355.
- Schoofs L, Clynen E, Cerstiaens A, Baggerman G, Wei Z, Vercammen T, Nachman R, De Loof A, Tanaka S, 2001. Newly discovered functions for some myotropic neuropeptides in locusts. *Peptides*, 22(2): 219–227.
- Spittaels K, Verhaert P, Shaw C, Johnston RN, Devreese B, Van Beeumen J, De Loof A, 1996. Insect neuropeptide F (NPF)-related peptides: isolation from Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) brain. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26(4): 375–382.

- Stanek DM, Pohl J, Crim JW, Brown MR, 2002. Neuropeptide F and its expression in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Peptides*, 23(8): 1367–1378.
- Stoleru D, Peng Y, Agosto J, Rosbash M, 2004. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*, 431(7010): 862–868.
- Sundström G, Larsson TA, Brenner S, Venkatesh B, Larhammar D, 2008. Evolution of the neuropeptide Y family: new genes by chromosome duplications in early vertebrates and in teleost fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 155(3): 705–716.
- Suzuki N, Okada K, Minami S, Wakabayashi I, 1996. Inhibitory effect of neuropeptide Y on growth hormone secretion in rats is mediated by both Y1- and Y2-receptor subtypes and abolished after anterolateral deafferentation of the medial basal hypothalamus. *Regul. Pept.*, 65(2): 145–151.
- Tensen CP, Cox KJ, Smit AB, van der Schors RC, Meyerhof W, Richter D, Planta RJ, Hermann PM, van Minnen J, Geraerts WP, Knol JC, Burke JF, Vreugdenhil E, van Vreugdenhil H, 1998. The *lymnaea* cardioexcitatory peptide (LyCEP) receptor: a G-protein-coupled receptor for a novel member of the RFamide neuropeptide family. *J. Neurosci.*, 18(23): 9812–9821.
- Thiele TE, Marsh DJ, Ste Marie L, Bernstein IL, Palmiter RD, 1998. Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. *Nature*, 396(6709): 366–369.
- Van Hiel MB, Van Loy T, Poels J, Vandersmissen HP, Verlinden H, Badisco L, Broeck JV, 2010. Neuropeptide receptors as possible targets for development of insect pest control agents. *Neuropeptide Systems as Targets for Parasite and Pest Control*, 692: 211–226.
- Van Loy T, Vandersmissen HP, Poels J, Van Hiel MB, Verlinden H, Vanden Broeck J, 2010. Tachykinin-related peptides and their receptors in invertebrates: a current view. *Peptides*, 31(3): 520–524.
- Van Wielendaele P, Dillen S, Zels S, Badisco L, Vanden Broeck J, 2013a. Regulation of feeding by Neuropeptide F in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(1): 102–114.
- Van Wielendaele P, Wynant N, Dillen S, Zels S, Badisco L, Vanden Broeck J, 2013b. Neuropeptide F regulates male reproductive processes in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(3): 252–259.
- Vanden Broeck J, 2001. Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Peptides*, 22(2): 241–254.
- Veenstra JA, 2009. Peptidergic paracrine and endocrine cells in the midgut of the fruit fly maggot. *Cell Tissue Res.*, 336(2): 309–323.
- Veenstra JA, Ida T, 2014. More *Drosophila* enteroendocrine peptides: Orcokinin B and the CCHamides 1 and 2. *Cell Tissue Res.*, 357(3): 607–621.
- Veenstra JA, Lambrou G, 1995. Isolation of a novel RFamide peptide from the midgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213(2): 519–524.
- Verlinden H, Vleugels R, Zels S, Dillen S, Lenaerts C, Crabbe K, Spit J, Vanden Broeck J, 2014. Receptors for neuronal or endocrine signalling molecules as potential targets for the control of insect pests. *Target Receptors in the Control of Insect Pests: Pt II*, 46: 167–303.
- Walker MW, Smith KE, Bard J, Vaysse PJJ, Gerald C, Daouti S, Weinshank RL, Branchek TA, 1997. A structure-activity analysis of the cloned rat and human Y4 receptors for pancreatic polypeptide. *Peptides*, 18(4): 609–612.
- Wang CT, Zhang JR, Tobe SS, Bendena WG, 2012. Defining the contribution of select neuropeptides and their receptors in regulating sesquiterpenoid biosynthesis by *Drosophila melanogaster* ring gland/corpus allatum through RNAi analysis. *Gen. Comp.*, 176(3): 347–353.
- Weinberg DH, Sirinathsinghji DJS, Tan CP, Shiao LL, Morin N, Rigby MR, Heavens RH, Rapoport DR, Bayne ML, Cascieri MA, Strader CD, Linemeyer DL, MacNeil DJ, 1996. Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J. Biol. Chem.*, 271(28): 16435–16438.
- Wen TQ, Parrish CA, Xu D, Wu Q, Shen P, 2005. *Drosophila* neuropeptide F and its receptor, NPFR1, define a signaling pathway that acutely modulates alcohol sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(6): 2141–2146.
- Wu Q, Wen TQ, Lee G, Park JH, Cai HN, Shen P, 2003. Developmental control of foraging and social behavior by the *Drosophila* neuropeptide Y-like system. *Neuron*, 39(1): 147–161.
- Wu Q, Zhang Y, Xu J, Shen P, 2005a. Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(37): 13289–13294.
- Wu Q, Zhao ZW, Shen P, 2005b. Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. *Nat. Neurosci.*, 8(10): 1350–1355.
- Xu J, Li M, Shen P, 2010. A G-protein-coupled neuropeptide Y-like receptor suppresses behavioral and sensory response to multiple stressful stimuli in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 30(7): 2504–2512.
- Yamanaka N, Yamamoto S, Zitnan D, Watanabe K, Kawada T, Satake H, Kaneko Y, Hiruma K, Tanaka Y, Shinoda T, Kataoka H, 2008. Neuropeptide receptor transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathways. *PLoS ONE*, 3: e3048.