

昆虫蜕皮激素生物合成及其神经肽调控^{*}

王 升 李 胜^{**}

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 上海 200032)

摘 要 蜕皮激素是对节肢动物体内类固醇激素的统称,昆虫的蜕皮激素主要由内分泌器官前胸腺合成,具有诱发幼虫周期性蜕皮以及最终变态蜕皮的生理功能。近期的研究工作阐明了前胸腺中原先被称为“黑箱”的一系列酶促反应步骤,此外促前胸腺激素受体的成功鉴定使人们对 PTTH 信号转导通路调控前胸腺蜕皮激素合成有了更深入的理解。

关键词 蜕皮激素, 生物合成, 神经肽

Insect ecdysteroids biosynthesis and its regulation by neuropeptides

WANG Sheng LI Sheng^{**}

(Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract Molting hormone, the general name for steroid substance found in arthropods. In insect, ecdysteroids are synthesized in the endocrine organ-prothoracic glands, and trigger major development transition such as the periodical larval molting as well as the metamorphosis. Recent works in *Drosophila melanogaster* identify some of the important players in “black box”. The identification of PTTH receptor will help us understand the regulation of ecdysteroids biosynthesis by PTTH signaling pathway.

Key words ecdysteroids, biosynthesis, neuropeptides

蜕皮激素是对节肢动物体内类固醇激素的统称,最初由 Butenandt 和 Karlson (1954) 从 500 kg 家蚕蛹中纯化得到。此外,在植物、真菌以及哺乳动物中都发现了昆虫蜕皮激素类似物,一些植物中的蜕皮激素类似物还具有昆虫蜕皮激素同样的生理功能,可能参与了昆虫-植物的互作 (http://leuzea.ru/leuzea_ecdysteroids.htm)。昆虫蜕皮激素的主要作用是诱发幼虫周期性蜕皮以及最终的变态蜕皮,进而调控昆虫的体型大小以及形态变化。除此之外,蜕皮激素还有其他一些重要的生理功能,如蜕皮激素信号是果蝇中期胚胎发育必需的;幼虫—蛹变态阶段,蜕皮激素诱导体内老旧组织的细胞凋亡,促进成虫盘细胞的增殖;蜕皮激素还调控一些昆虫的卵黄发生和生殖能力,与脊椎动物中甾醇类激素具有调控生殖的功能这一现象非常相似 (Kozlova and Thummel, 2000, 2003)。

本文将对昆虫蜕皮激素的生物合成及其神经肽调控这两方面的研究进展进行详细的介绍。

1 蜕皮激素的生物合成

在大多数昆虫的幼虫阶段,前胸腺是合成蜕皮酮的主要场所;在高等双翅目昆虫如黑腹果蝇中,蜕皮酮由环腺合成,该器官包括了前胸腺、咽侧体和心侧体。许多昆虫的前胸腺在变态过程中因细胞凋亡而消失,蛹期和成虫的蜕皮酮主要由雌虫卵巢的滤泡细胞和雄虫的雄性附性腺合成 (Dai and Gilbert, 1997)。

昆虫自身不能从头合成胆固醇,因此它们只能通过取食摄入胆固醇这一蜕皮激素生物合成所必需的重要前体物质。食物中的固醇类物质在昆虫的肠道中被转化成为胆固醇,然后由肠上皮细胞吸收进入血淋巴中。由胆固醇到蜕皮酮的一系

^{*} 资助项目:2012CB114605, 10JC1416700, 30870299, KSCX2-EW-J-12 以及中国科学院百人计划经费。

^{**} 通讯作者, E-mail: shengli@sippe.ac.cn

收稿日期:2011-11-14, 接受日期:2011-12-28

列生化反应在前胸腺中完成,下面以果蝇为例详细介绍昆虫体内蜕皮激素生物合成的途径。

如图 1 所示,果蝇蜕皮激素生物合成的途径包括多个酶促反应步骤。该途径中的第一步由 Neverland 这一含有 Rieske 功能结构域的蛋白所催化,将胆固醇转化成为 7-脱氢胆固醇 (Yoshiyama *et al.*, 2006),然后被转运至线粒体中,该转运过程被认为是蜕皮激素生物合成途径中的限速步骤 (Thummel and Chory, 2002)。由 7-脱氢胆固醇转化为三脱氧蜕皮酮之间的步骤还不是很清楚,之前被称为“暗箱”。根据目前的研究,人们对其中的酶促反应步骤已经有了一定的认识。Namike 等 (2005) 在家蚕中发现一个前胸腺特异表达的细胞色素 P450 基因 *Cyp307a1*,发育过程中该基因的表达水平与家蚕幼虫血淋巴中蜕皮激素滴度呈正相关,而且通过序列比对他们发现果蝇基因组中 *spook* 基因也编码 CYP307A1,而 *spook* 只在胚胎时期以及雌性成虫卵巢中表达,*spook* 突变后胚胎中蜕皮激素浓度降低并导致胚胎发育停滞,他们推测 *spook* 可能调控昆虫蜕皮激素的生物合成。Ono 等 (2006) 进一步研究表明果蝇中 *spook* 编码产物定位于微粒体中,发现该基因的时空表达模式与家蚕和烟草夜蛾等鳞翅目昆虫不同,此外他们还在果蝇基因组中找到另一个编码微粒体细胞色素 P450 的基因 *spookier* (*Cyp307a2*),*spookier* 在幼虫前胸腺中表达,用双链 RNA 干扰 *spookier* 的表达导致幼虫发育停滞在一龄时期。添加 20-羟基蜕皮酮 (20E),蜕皮酮 (E) 或者三脱氧蜕皮酮 (ketodiol) 都能挽救 *spook* 以及 *spookier* 突变造成的胚胎和幼虫发育停滞的表型,而添加 7-脱氢胆固醇则没有作用,因此,作者认为 *spook* 和 *spookier* 作用于 7-脱氢胆固醇之后“暗箱”中的酶促反应步骤。最近, Niwa 等 (2010) 发现短链脱氢/还原酶 *non-molting glossy* (*nm-g*)/*shroud* (*sro*) 也参与蜕皮激素生物合成“暗箱”中的转化过程,他们通过图位克隆得到了家蚕中 *nm-g* 基因,根据序列相似性发现了果蝇中的同源物 *sro*,*sro* 在前胸腺和卵巢中表达,突变后体内蜕皮激素含量降低并导致发育停滞,喂食蜕皮激素或其前体三脱氧蜕皮酮可以挽救这些表型,而喂食胆固醇或 7-脱氢胆固醇则没有效果。

研究表明,3 个前胸腺特异性表达的细胞色素 P450 基因: *phantom* (*phm*, *CYP306A1*),

disembodied (*dib*, *CYP302A1*), *shadow* (*sad*, *CYP315A1*) 直接参与了前胸腺中的蜕皮酮生物合成。果蝇 *Phm* 基因在前胸腺特异性表达,它编码微粒体 25-羟化酶,催化 2,22,25-三脱氧蜕皮酮 (2,22,25-酮二醇) 向 2,22-二脱氧蜕皮酮 (2,22-酮三醇) 转化。该基因的突变体在胚胎发育早期没有异常表型,但胚胎发育后期出现表皮不能分化,头部内翻与背部闭合失败和后肠非正常弯曲等一系列异常表型,在胚胎发育末期死亡 (Niwa *et al.*, 2004; Warren *et al.*, 2004)。 *DmDib*, *DmSad* 和 *DmShd* 基因编码产物依次催化 20-羟基蜕皮酮生物合成的最后 3 个步骤,其突变体表型与 *DmPhm* 突变体的表型非常相似。果蝇 *Dib* 基因编码蜕皮甾醇 22-羟化酶,催化 2,22-二脱氧蜕皮酮 (2,22-酮三醇) 向 2-脱氧蜕皮酮转化。胚胎发育早期, *DmDib* 基因先在表皮中表达,然后仅在前胸腺细胞中特异性表达 (Chavez *et al.*, 2000; Warren *et al.*, 2002)。利用果蝇 S2 细胞瞬时转染表达 *DmSad* 基因,证明其编码 2-羟化酶,催化 2-脱氧蜕皮酮向蜕皮酮转化 (Warren *et al.*, 2002)。 *DmShd* 基因编码蜕皮酮 20-羟化酶,在 S2 细胞中转染表达 *DmShd* 能将蜕皮酮转化成为 20-羟基蜕皮酮。但是 *DmShd* 与 *DmDib* 和 *DmSad* 不同,它不在前胸腺中表达,而是表达于血细胞、表皮、中肠、马氏管和脂肪体等外周组织中 (Petryk *et al.*, 2003)。这说明前胸腺合成的是没有活性的蜕皮酮,当被释放进入血淋巴后,在体内其他组织中完成蜕皮激素生物合成最后也是最重要的一步——向具有生理活性的 20-羟基蜕皮酮的转化。 *DmPhm*, *DmShd*, *DmDib* 和 *DmSad* 这 4 个 P450 基因统称为 Halloween 基因。

2 昆虫神经肽调控前胸腺中蜕皮酮的生物合成

昆虫神经肽促前胸腺激素 PTTH 是调控蜕皮激素合成与释放的关键因子 (Rybczynski, 2005)。研究人员首先从家蚕脑提取物中分离纯化了具有生理活性的 PTTH (Kawakami *et al.*, 1990; Kataoka *et al.*, 1991)。PTTH 由昆虫脑部的一对侧分泌细胞合成,通过咽侧体释放进入血淋巴 (Agui *et al.*, 1979),分泌进入血淋巴后,游离的 PTTH 与前胸腺细胞膜表面的受体结合后促进其中蜕皮酮的合成。

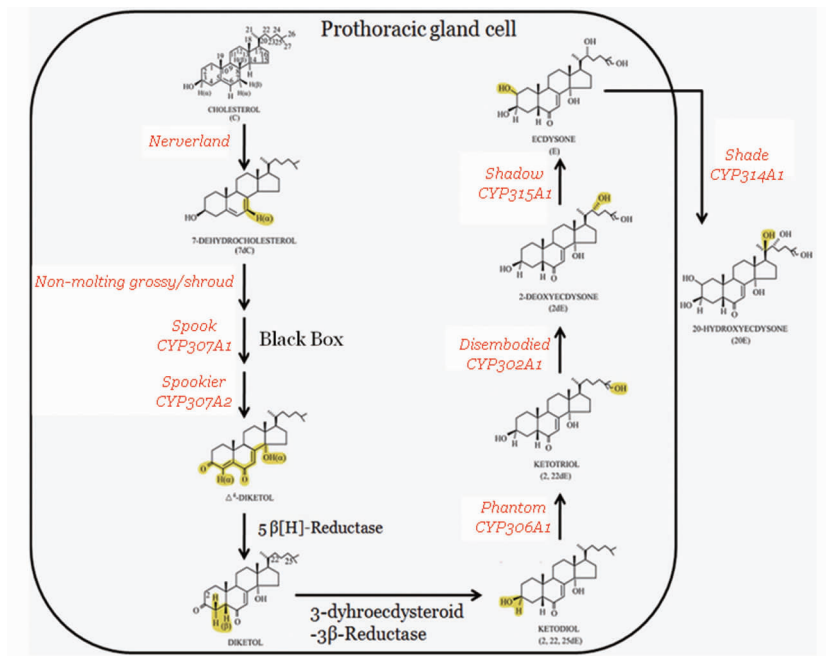
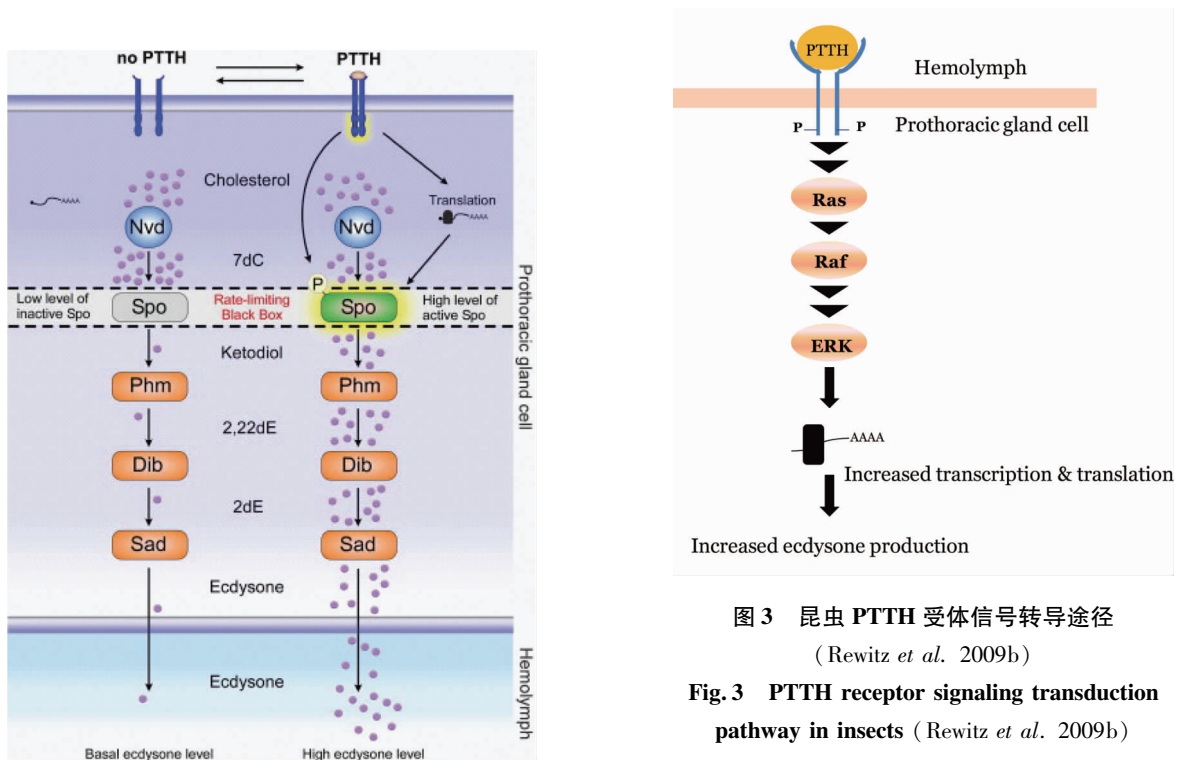
图 1 果蝇蜕皮激素生物合成途径 (Huang *et al.*, 2008)Fig. 1 Ecdysone biosynthesis pathway in *Drosophila* (Huang *et al.*, 2008)

图 3 昆虫 PTTH 受体信号转导途径

(Rewitz *et al.* 2009b)Fig. 3 PTTH receptor signaling transduction pathway in insects (Rewitz *et al.* 2009b)图 2 PTTH 通过磷酸化 Spo 促进前胸腺合成蜕皮酮 (Rewitz *et al.*, 2009a)Fig. 2 PTTH stimulates production of ecdysone in the prothoracic glands by phosphorylating Spook (Rewitz *et al.*, 2009a)

果蝇中的研究初步揭示了 PTTH 的分子作用机理。通过分子遗传学技术摘除脑中合成 PTTH 的神经元后,前胸腺中基因表达分析结果显示,参与 20E 生物合成途径的 *nvd*, *phm*, *spok* 以及 *dib* 转录水平降低,导致体内 20E 的滴度下降,果蝇幼

虫个体发育延缓, 体积和重量增加 (McBrayer *et al.*, 2007)。

Rewitz 等(2009a)用 PTTH 处理烟草夜蛾前胸腺并分析了其中的磷酸化蛋白后发现, 蜕皮酮合成途径中的细胞色素 P450 蛋白 Spook, 以及 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 途径中 ERK 和 MEK 的磷酸化水平升高, 同时还发现细胞内信号转导、囊泡运输、细胞骨架、基因转录和翻译过程中的许多蛋白也被磷酸化。根据这些结果, 他们认为 PTTH 信号通路直接作用于蜕皮酮生物合成途径中的关键因子, 进而促进前胸腺合成蜕皮酮(图 2)。

后续研究发现果蝇前胸腺特异性表达的 *Torso* 基因编码 PTTH 受体。PTTH 受体 *Torso* 是酪氨酸激酶受体, 而非之前人们猜测的 G-蛋白偶联受体。PTTH 与 *Torso* 结合后, 激活 MAPK 途径, 其中包括 Ras, Raf 和 Erk, 促进前胸腺中蜕皮激素的合成 (Rewitz *et al.*, 2009b) (图 3)。

除了 PTTH, 昆虫前胸腺合成蜕皮酮的活性还受其他神经肽的调控。Gu 等(2009)发现 insulin-like peptide (ILP) 促进家蚕幼虫前胸腺中蜕皮酮的合成, 与 PTTH 的作用机理不同, ILP 并不激活前胸腺中 MAPK 途径, 而是通过 PI3K-Akt 途径完成的。此外, 蜕皮酮的合成还受 PTSP (prothoracicostatic peptide) 的抑制 (Hua *et al.*, 1999)。Liu 等(2004)发现 5 龄末期家蚕幼虫注射 Bm-PTSP 后, 导致幼虫血淋巴中蜕皮激素滴度降低, 上簇行为推迟。

3 结语

经过众多昆虫学研究人员的共同努力, 目前我们对昆虫蜕皮激素生物合成途径特别是“黑箱”中的酶促转化步骤有了较为深刻的理解。而且, 昆虫 PTTH 受体的鉴定阐明了 PTTH 调控昆虫前胸腺合成蜕皮激素的分子机理。

但是, 昆虫蜕皮激素生物合成这一研究领域中依然有不少问题值得我们去探讨。PTTH 受体信号转导通路下游是否还有其他的调控因子影响前胸腺蜕皮激素的合成能力? 近期 Cáceres 等(2011)发现黑腹果蝇前胸腺合成一氧化氮 (NO) 与蜕皮激素下游效应因子 E75 结合, 调控包括个体发育等一系列生理过程, 而已有的研究表明 E75A 突变体中蜕皮激素滴度降低 (Bialecki

et al., 2002)。这些结果提示我们, 蜕皮激素下游效应因子可能参与调控前胸腺中蜕皮激素的生物合成。

参考文献 (References)

- Agui N, Granger NA, Bollenbacher WE, Gilbert LI, 1979. Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: in vitro assay of a single neurosecretory cell. *PNAS*, 76 (11):5694—5698.
- Bialecki M, Shilton A, Fichtenberg C, Segraves WA, Thummel CS, 2002. Loss of the ecdysteroid-inducible E75A orphan nuclear receptor uncouples molting from metamorphosis in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 3 (2):209—220.
- Butenandt A, Karlson P, 1954. Über die Isolierung eines Metamorphosehormons der Insekten in kristallisierter Form. *Z. Naturforsch.*, 9b:389—391.
- Cáceres L, Necakov AS, Schwartz C, Kimber S, Roberts IJ, Krause HM, 2011. Nitric oxide coordinates metabolism, growth, and development via the nuclear receptor E75. *Genes Dev.*, 25:1476—1485.
- Chavez VM, Marques G, Delbecq JP, Kobayashi K, Hollingsworth M, Burr J, Natzle JE, O'Connor MB, 2000. The *Drosophila* *disembodied* gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development*, 127:4115—4126.
- Dai JD, Gilbert LI, 1997. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal-adult metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27 (1):69—78.
- Gu SH, Lin JL, Lin PL, Chen CH, 2009. Insulin stimulates ecdysteroidogenesis by prothoracic glands in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39 (3):171—179.
- Hua YJ, Tanaka Y, Nakamura K, Sakakibara M, Kataoka H, 1999. Identification of a prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 274:31169—31173.
- Huang X, Warren JT, Gilbert LI, 2008. New players in the regulation of ecdysone biosynthesis. *J. Genet. Genomics*, 35 (1):1—10.
- Kataoka H, Nagasawa H, Isogai A, Ishizaki H, Suzuki A, 1991. Prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: amino acid sequence and dimeric structure. *Agric. Biol. Chem.*, 55:73—86.
- Kawakami A, Kataoka H, Oka T, Mizoguchi A, Kimura-

- Kawakami M, Adachi T, Iwami M, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H, 1990. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science*, 247 (4948):1333—1335.
- Kozlova T, Thummel CS, 2003. Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*, 301 (5641):1911—1914.
- Kozlova T, Thummel CS, 2000. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends Endocrinol. Metab.*, 11 (7):276—280.
- Liu X, Tanaka Y, Song Q, Xu B, Hua Y, 2004. *Bombyx mori* prothoracicostatic peptide inhibits ecdysteroidogenesis in vivo. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 56 (4):155—161.
- McBrayer Z, Ono H, Shimell M, Parvy JP, Beckstead RB, Warren JT, Thummel CS, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, O' Connor MB, 2007. Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Dev. Cell*, 13 (6):857—871.
- Namiki T, Niwa R, Sakudoh T, Shirai K, Takeuchi H, Kataoka H, 2005. Cytochrome P450 CYP307A1/Spook: a regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 337 (1):367—374.
- Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Fujimoto Y, Kataoka H, 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *J. Biol. Chem.*, 279 (34):35942—35949.
- Niwa R, Namiki T, Ito K, Shimada-Niwa Y, Kiuchi M, Kawaoka S, Kayukawa T, Banno Y, Fujimoto Y, Shigenobu S, Kobayashi S, Shimada T, Katsuma S, Shinoda T, 2010. Non-molting glossy/shroud encodes a short-chain dehydrogenase/reductase that functions in the 'Black Box' of the ecdysteroid biosynthesis pathway. *Development*, 137 (2):1991—1999.
- Ono H, Rewitz KF, Shinoda T, Itoyama K, Petryk A, Rybczynski R, Jarcho M, Warren JT, Marqués G, Shimell MJ, Gilbert LI, O' Connor MB, 2006. Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Dev. Biol.*, 298 (2):555—570.
- Petryk A, Warren JT, Marques G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li Y, Dauphin-Villemant C, O' Connor MB, 2003. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *PNAS*, 100 (24):13773—13778.
- Rewitz KF, Larsen MR, Lobner-Olesen A, Rybczynski R, O' Connor MB, Gilbert LI, 2009a. A phosphoproteomics approach to elucidate neuropeptide signal transduction controlling insect metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39 (7):475—483.
- Rewitz KF, Yamanaka N, Gilbert LI, O' Connor MB, 2009b. The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science*, 326 (5958):1403—1405.
- Rybczynski R, 2005. Prothoracicotropic Hormone. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford: Elsevier. 61—123.
- Thummel CS, Chory J, 2002. Steroid signaling in plants and insects—common themes, different pathways. *Genes Dev.*, 16:3113—3129.
- Warren JT, Petryk A, Marques G, Jarcho M, Parvy JP, Dauphin-Villemant C, O' Connor MB, Gilbert LI, 2002. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 99 (17):11043—11048.
- Warren JT, Petryk A, Marques G, Parvy JP, Shinoda T, Itoyama K, Kobayashi J, Jarcho M, Li Y, O' Connor MB, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34 (9):991—1010.
- Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Kataoka H, Niwa R, 2006. Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development*, 133:2565—2574.