



cullin-2 抑制果蝇翅成虫盘神经源性启动研究*

张 瑶^{1,2**} 龙淑婷^{1,2**} 张翼飞^{1,2***} 刘雨芳²
孙远东² 崔小娟² 陈家慧^{1,2} 潘本山^{1,2}

(1. 湖南科技大学三亚研究院, 三亚 572024; 2. 湖南科技大学生命科学与健康学院, 湘潭 411201)

摘 要 【目的】黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 感觉器官前体细胞 (Sensory organ precursors, SOP) 的发育依次受预模式基因、原神经基因和神经源性基因的调控, SOP 调控基因的功能失常可导致异位 SOP 表型。*cullin-2* (*cul-2*) 基因下调引发一种新型异位 SOP 表型, 本研究旨在探究该基因在 SOP 发生中的作用。【方法】通过 RNA 干扰、X-gal 染色、免疫组织化学染色和原位杂交来验证翅成虫盘中基因表达模式。【结果】果蝇 *cul-2* 基因抑制果蝇翅成虫盘中 SOP 形成, 且其机制与传统 SOP 调控基因不同: 敲低翅成虫盘中 *cul-2* 会导致异位 SOP 的形成, 这些异位 SOP 在空间上呈连续分布, 且不局限于内源性原神经簇区域。与 *cul-2* 相关的异位 SOP 的形成需要原神经基因 *scute* 的激活, 上调 Notch (N) 信号通路抑制了与 *cul-2* 相关的异位 SOP 形成, 而敲低 N 信号通路对 *cul-2* 表达没有影响, 表明在 *cul-2* 相关的异位 SOP 形成中 N 信号通路没有被激活。而在 *cul-2* 敲低后, N 信号通路的配体 Delta (DI) 的表达未被上调, 可解释 N 信号通路为何未被激活。【结论】本研究揭示了 *cul-2* 在果蝇翅成虫盘细胞中抑制神经源性命运的新功能。

关键词 感觉器官前体细胞; *cullin-2*; *scute*; Notch 信号通路; Delta

Research on the role of the *cullin-2* gene in the development of *Drosophila* wing disc cells

ZHANG Yao^{1,2**} LONG Shu-Ting^{1,2**} ZHANG Yi-Fei^{1,2***} LIU Yu-Fang²
SUN Yuan-Dong² CUI Xiao-Juan² CHEN Jia-Hui^{1,2} PAN Ben-Shan^{1,2}

(1. Sanya Institute of Hunan University of Science and Technology, Sanya 572024, China;

2. School of Life Science and Health, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China)

Abstract [Aim] To investigate the role of the *cullin-2* (*cul-2*) gene in the development of sensory organ precursors (SOPs) in *Drosophila melanogaster*. [Methods] Gene expression patterns in the wing imaginal disc were verified by RNA interference, X-gal staining, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization. [Results] The *Drosophila cul-2* gene suppressed SOP formation in the wing imaginal disc via a mechanism different from that used by classical SOP regulatory genes. Knock-down of *cul-2* in the wing disc led to the formation of ectopic SOPs, which had a spatially continuous pattern and were not restricted to endogenous, proneural cluster areas. The formation of *cul-2*-associated ectopic SOPs required the activation of the proneural gene *scute*. The upregulated Notch (N) signaling pathway suppressed the formation of *cul-2*-associated ectopic SOPs, whereas knock-down of this pathway had no effect on *cul-2* expression, indicating that the N signaling pathway was not activated during the formation of *cul-2*-associated ectopic SOPs. Moreover, the expression of Delta (DI), the ligand of the N signaling pathway, was not upregulated after *cul-2* knock-down, which may explain why the N

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (32270528); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20240883)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: 1315632012@qq.com; 2804534143@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangyf@hnust.edu.cn

收稿日期 Received: 2026-01-26; 接受日期 Accepted: 2026-03-04

signaling pathway was not activated. **[Conclusion]** These results reveal a novel function of *cul-2* as a suppressor of neurogenic potential in the development of *Drosophila* wing disc cells.

Key words sensory organ precursors; *cullin-2*; *scute*; Notch signaling; Delta

果蝇背板的刚毛是外周神经系统的感受器,其发生机制具有高度保守性 (Usui *et al.*, 2004; Marcellini and Simpson, 2006)。感受器可分为大刚毛和小刚毛两类,均由果蝇 3 龄幼虫或蛹早期阶段翅成虫盘上的单个感觉器官前体细胞 (Sensory organ precursors, SOP) 发育而来。大刚毛以特定模式分布,数量和位置都精确定,而小刚毛则成排分布,具体位置并不固定。二者虽在形态结构和生理功能上存在差异,但具有相似的结构和发育调控机制 (García-Bellido and Merriam, 1971; de Navascués and Modolell, 2010)。

翅成虫盘中刚毛前体细胞的发育依赖于编码螺旋-环-螺旋蛋白 (Basic-helix-loop-helix, BHLH) 的原神经基因 *achaete-scute* 表达的复合体 (Achaete-scute complex, ASC)。ASC 与另一种 BHLH 转录因子 Daughterless 形成异源二聚体,赋予细胞神经源性的潜能 (Murre *et al.*, 1989; Van Doren *et al.*, 1991; Marshall and Heckscher, 2022; Kato *et al.*, 2024)。尽管 *achaete* (*ac*) 和 *scute* (*sc*) 都曾被认为对翅成虫盘 SOP 的发育有着至关重要的作用,但有研究认为仅后者在 SOP 的启动过程中起决定性作用 (Marcellini *et al.*, 2005)。根据“预模式假说” (Prepattern hypothesis) (Modolell and Campuzano, 1998; Gómez-Skarmeta *et al.*, 2003; Ikmi *et al.*, 2008), ASC 的表达受到 3 组基因的精确调控,分别对应感觉器官前体细胞形成的 3 个连续阶段。首先,预模式基因设定了时空坐标,决定 ASC 表达区域 (Ghysen and Dambly-Chaudière, 1988; Usui *et al.*, 2008)。其次,特定的预模式因子组合在原神经簇的特定区域激活原神经基因的表达 (Campuzano *et al.*, 1985; Skaer *et al.*, 2002; Marcellini *et al.*, 2005)。最后,神经源性基因通过由 Notch(N) 信号通路介导 (Rebay *et al.*, 1991; Huppert *et al.*, 1997; Struhl and Adachi, 1998;

Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Schweisguth, 2004; Bray, 2006; Koto *et al.*, 2011) 的侧向抑制将每个原神经簇中的 SOP 发生限制在 1-2 个细胞中:先由原神经簇细胞中 ASC 激活 N 信号通路配体 Delta (DI) 的表达, DI 随即与相邻细胞膜上的 N 受体结合,激活 N 信号通路,进而引发下游转录抑制因子表达,从而阻止靶细胞中原神经基因的转录;通过这种相邻细胞相互竞争,最终只有维持高水平 ASC 表达的少数细胞转化为 SOP (Huppert *et al.*, 1997; Culi and Modolell, 1998; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Huppert and Huppert, 2011)。

这些调控基因的功能异常往往会改变 SOP 数量。例如, N 信号下调会导致侧向抑制缺失,使原神经簇中所有细胞均转化为 SOP (Campos-Ortega, 1993; Culi and Modolell, 1998; Bray, 2006; Kaspar *et al.*, 2008; Troost *et al.*, 2015), 但这些异位 SOP 都局限于翅成虫盘的内源性原神经簇区域内。异位 SOP 还可由预模式基因的错误调控或原神经基因过表达造成:促进型预模式基因 (如 *pannier*) 的过表达、抑制型预模式基因 (如 *hairy*, *extramacrochaeta*) 的下调、或原神经基因 (如 *sc*) 的异位表达都能导致异位 SOP 形成 (Fromental-Ramain *et al.*, 2008; Kaspar *et al.*, 2008; Usui *et al.*, 2008; Ayyar *et al.*, 2010; Fromental-Ramain *et al.*, 2010; Yamasaki *et al.*, 2011)。由于侧向抑制的作用,这些簇外异位 SOP 被非神经源性细胞隔开,呈空间上不连续分布。综上所述,单个调控基因功能失调所导致的异位 SOP 发生,通常仅表现为簇内空间连续型或簇外空间非连续型中的一种,而不会出现簇外 SOP 连续分布的表型。

Chandra 等 (2003) 报道过与 *fred* 下调相关的新型异位 SOP 表型。*fred* RNA 在翅成虫盘中广泛表达,敲低该基因后,大量异位 SOP 不仅在源神经簇内出现,更发生于簇外区域,且在空

间上呈连续分布。该发现揭示了神经源性潜能存在于大多数翅成虫盘细胞中,而非局限于原神经簇内。为探究敲低 *fred* 后表达异常的基因,我们进行了微阵列分析(宋凯月等, 2026),发现 *cul-2* 位列其中。在本研究中,我们将展示敲低 *cul-2* 会产生类似的 SOP 新表型。

Cullin 家族是一个进化保守的蛋白家族,在真核生物中广泛存在(Duda *et al.*, 2011),其功能是作为多亚基 Cullin-RING E3 泛素连接酶的组分。这类连接酶是最大的 E3 连接酶家族,在泛素依赖性蛋白质降解中起关键作用(Merlet *et al.*, 2009; Hua and Vierstra, 2011; Ashitomi *et al.*, 2025; Gong *et al.*, 2025; Rizvi and Lander, 2025)。E3 泛素连接酶主要分为两类: Cullin-RING 型和 HECT 型(Sarikas *et al.*, 2011),与 HECT 型 E3 泛素连接酶的单分子结构不同, Cullin-RING 型 E3 泛素连接酶是由 Cullin 支架蛋白、RING-finger 蛋白和适配子组成的多亚基复合物。Cullin-RING E3 连接酶利用其 RING-finger 结构域变构激活 E2 泛素结合酶,并通过其 Cullin 元件将与 RING-finger 结合的 E2 连接到底物上,从而实现泛素从 E2 向底物的转移。

在果蝇中发现了 6 个 Cullin 蛋白家族成员(CUL1-CUL6),它们参与细胞周期、细胞凋亡、Hedgehog 信号通路、细胞骨架与细胞运动、DNA 损伤应答、突触形成、卵子发生和眼发育等过程(Wing *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005; Higa *et al.*, 2006; Ou *et al.*, 2007; Hudson and Cooley, 2010)。其中,果蝇 CUL-3 已被证明可促进感觉器官的正常发育(Mistry *et al.*, 2004),但这种作用仅限于内源性原神经簇中。而线虫 *Caenorhabditis elegans* 的 CUL-2 在细胞周期、生殖谱系、卵子发生、极性建立、衰老、低氧应答和 MPK1 激活中发挥作用(DeRenzo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Sonnevile and Gönczy, 2004; Vasudevan *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2009)。果蝇 CUL-5 和 CUL-2 已被证明在神经肌肉接头发育和卵子发生中具有协同作用(Ayyub, 2011)。

在本研究中,我们揭示了 *cul-2* 在果蝇 SOP 命运调控中的一个新功能:抑制幼虫翅成虫盘中

翅袋和翅铰链区域细胞神经源性潜能。*cul-2* 敲低会诱导异位 SOP 发生,与前述经典表型不同的是:这些 SOP 在空间上呈连续分布,且不局限于内源性原神经簇区域。同时, N 信号在 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 中未被激活,这可能是由于 *cul-2* 敲低情况下缺乏 N 配体 DI 的表达所致。

1 材料与方法

1.1 果蝇品系

所用果蝇为: *UAS-cul-2-RNAi* (VDRC: 105101)(Dietzl *et al.*, 2007)来自奥地利维也纳果蝇资源中心(Vienna Drosophila Resource Center, VDRC); *UAS-cul-2-RNAi* (BDSC:30494), *c765-GAL4* (BDSC:26862), *pnr^{MD237}-GAL4* (BDSC:3039)(Heitzler *et al.*, 1996), *UAS-E(spl)^{m7}* (BDSC:51671)(Ligoxygakis *et al.*, 1999), *neur^{A101}-lacZ* (BSSC:4369)(Huang *et al.*, 1991), *UAS-N-RNAi* (BDSC:7078), *UAS-sc* (BDSC:26687), *UAS-sc-RNAi* (BDSC:26206), *UAS-GFP* (BDSC:4775), *UAS-DsRed* (BDSC:59853), *UAS-lacZ* (BDSC:1776)和 *en-GAL4* (BDSC:1973)来自布卢明顿果蝇资源中心(Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC)。

1.2 组织化学法

X-gal 染色、免疫组织化学染色和原位杂交均按照标准程序进行(Chandra *et al.*, 2003)。所使用的抗体为 rabbit anti- β -gal (1:2 000, 美国 MP Biomedicals 公司, 产品号 0856032)、mouse anti-DI (1:25, 美国 DSHB 中心, 产品号 AB3106502)以及 Dylight-AffiniPure 二抗 (1:500, 美国 Jackson ImmunoResearch 公司, 产品号 715-475-150)。

为了制备原位杂交探针,模板通过 PCR 生成,并在产物中引入 T7 启动子。引物序列如下:正向 5'-TGGCGCCTGTATATGATTGA-3',反向 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATTAGGCGCTTGGCTAACAGT-3'。

用 Megascript T7 试剂盒(美国 Ambion 公

司, 产品号 AM1333) 和地高辛标记的 UTP (1 : 2 000, Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, 美国 Roche 公司, 产品号 11093274910) 合成了地高辛标记的 *cul-2* 反义 RNA。

1.3 异位 SOP 空间分布统计分析

针对 *en > cul-2-RNAi* 和 *en > UAS-sc* 两个实验组中位于后翅袋区域(即异位 SOP 所在区域)、以 *neur^{A101}-lacZ* (Bellen *et al.*, 1989; Yeh *et al.*, 2000) 标记的异位 SOP, 两组各随机选取 50 个 SOP 样本, 针对每个样本, 在图上找出与之最邻近的 SOP, 并测量二者之间距离, 两组数据进行独立样本 *t* 检验 (Independent Student's *t*-test), 数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 以 $P < 0.01$ 为差异表示具有统计学差异显著性。

1.4 表达量差异统计分析

针对以 *neur^{A101}-lacZ* 标记的 SOP 总量或以免疫荧光标记的 DI 表达量, 在对照组与实验组均设置 6 次独立重复试验, 所摄翅成虫盘图像以 Image J 软件对后翅袋区域 (即异位 SOP 所在区域) 的 SOP 或 DI 表达进行相对定量 (以同一张图内源性 SOP 所在的前翅袋区域表达量为基准), 组间差异比较采用独立样本 *t* 检验 (Independent Student's *t*-test), 数据以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 显著性判定标准为: $P > 0.05$ 表示无显著差异, $P < 0.001$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 *cul-2* 是成体感觉器官和背板正常发育所必需的

为确认 *cul-2* 基因的功能, 本研究使用了不同来源的 *cul-2-RNAi* 品系: VDRC (105101) 和 BDSC (30494) 敲减 *cul-2* 基因表达, 以提高实验可靠性。两种 RNAi 构建载体基于 19-mer 标准均没有预测到脱靶基因。使用 3 种驱动子分别敲低后部 (*en-GAL4*)、背板中部 (*pnr-GAL4*) 和整个翅成虫盘 (*c765-GAL4*) 中的 *cul-2*。结果

显示, 在 *en-GAL4* 或 *c765-GAL4* 驱动下, 抑制 *cul-2* 会导致大量果蝇蛹死亡, 而存活的成体果蝇表现出多种表型: *en > cul-2-RNAi* (“>” 左边表示所用特异性 *GAL4* 驱动子, 右边表示被驱动表达的基因或 RNAi, 下同) 和 *c765 > cul-2-RNAi* 的成年果蝇均表现出翅尺寸缩小、翅形态异常、翅脉数量增多或减少、平面细胞极性改变、以及翅刚毛排列紊乱等表型 (图 1: A, D)。其中 *c765 > cul-2-RNAi* 翅变小并呈波浪状 (图 1: B, B'), 而 *en > cul-2-RNAi* 果蝇翅在后半部区域严重扭曲 (图 1: D)。此外, *en > cul-2-RNAi* 未羽化成虫表现出背侧刚毛缺失等表型, 而存活的成蝇背板形态基本正常, 偶尔有刚毛增生或缺失。在 *pnr > cul-2-RNAi* 果蝇中, 表现出背板中部刚毛缺失和密度变化的弱表型 (图 1: E, F')。较弱的背板中部表型提示该区域 *cul-2* 内源性表达水平可能较低, 为验证这一假设, 本研究通过原位杂交分析了 *cul-2* 的 RNA 在翅成虫盘的表达模式。在早期 3 龄幼虫中, *cul-2* 的 RNA 在整个翅袋中表达量较高, 而在背板中部表达量较低。而在晚期 3 龄幼虫中, *cul-2* 的 RNA 表达富集在翅缘 (图 2: A, B), 表明 *cul-2* 在翅成虫盘发育中可能发挥动态调控作用。3 龄幼虫翅成虫盘中 *cul-2* 在翅袋中的表达水平高于在背板中部的表达水平, 与假设预期一致, 可解释为何 *cul-2* 敲低后在翅袋区域观察到的表型比背板中部更强。

2.2 *cul-2* 抑制果蝇翅成虫盘细胞的神经源性潜能

在 *cul-2-RNAi* 成体果蝇上观察到 *cul-2* 对刚毛的形成与分化过程具有调控功能。为验证这一点, 本研究测试了在 *en > cul-2-RNAi* 幼虫翅成虫盘中 SOP 标记物 *neur^{A101}-lacZ* 的表达情况 (图 3: A, B), 并做了定量分析。基于 *neur^{A101}-lacZ* 染色信号, 使用 ImageJ 对翅成虫盘右半区 (后翅袋, *en-Gal4* 表达区) 与左半区 (前翅袋, 内参区) 的蓝绿色信号强度进行像素级定量, 计算后翅袋与前翅袋表达量比值。结果显示: 在 *en-GAL4* 组中, 表达量比值为 0.53 ± 0.06 (图 3:

A) 而在 $en > cul-2-RNAi$ 组中, 后翅袋中该比值升为 4.79 ± 0.37 (图 3: B), 两组差异极显著 ($t = 27.84$, $P < 0.001$)。这表明果蝇翅成虫盘后半部区域 (图 3: C) 的 $cul-2$ 下调导致后翅袋中大量异位 SOP 形成 (图 3: B), 且在 3 龄早期和晚

期幼虫中均观察到这一现象。这种异位 SOP 常伴随两个异常特征: 首先, 大多数异位 SOP 细胞中 $neur^{A101}-lacZ$ 的表达水平低于内源性 SOP; 其次, 异位的 $neur^{A101}$ 阳性细胞在空间上呈连续分布。

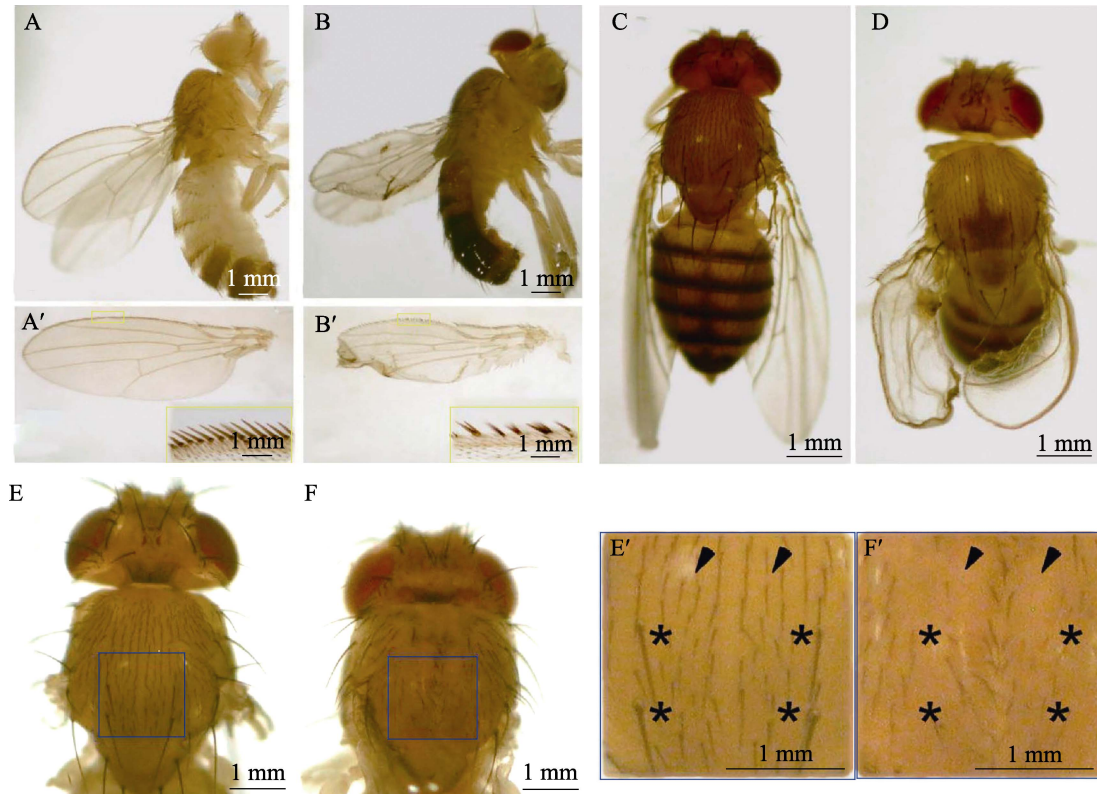


图 1 敲低 $cul-2$ 的果蝇成虫表型

Fig. 1 *Drosophila* adult phenotypes associated with knock-down of $cul-2$

A-B'. 基因型为 $c765 > GFP$ (A-A') 和 $c765 > cul-2-RNAi$ (B-B') 的果蝇及蝇翅;

C 和 D. 基因型为 $en > GFP$ (C) 和 $en > cul-2-RNAi$ (D) 的果蝇;

E-F'. 基因型为 $pnr > GFP$ (E) 和 $pnr > cul-2-RNAi$ (F) 的果蝇背板; E'和 F'分别是 E 和 F 的蓝色方框放大。

A'和 B'中的黄色框矩形区域为被放大显示前翅边缘的刚毛。 $c765 > cul-2-RNAi$ 果蝇的翅小于 $c765 > GFP$, 部分果蝇在前翅边缘观察到成簇的刚毛。C 和 D 中后半部区域敲低 $cul-2$ 导致翅形状扭曲和后半部变小。

在 E 和 F 中的蓝色矩形框分别在 E'和 F'中放大, 以显示背板上的刚毛。 $cul-2$ 敲低导致刚毛缺失, 黑色星号表示大刚毛, 黑色箭头表示小刚毛。

A-B'. Adults with genotypes $c765 > GFP$ (A-A') and $c765 > cul-2-RNAi$ (B-B');

C-D. Wing phenotypes of flies with genotypes $en > GFP$ (C) and $en > cul-2-RNAi$ (D);

E-F'. Notum phenotypes of flies with genotypes $pnr > GFP$ (E) and $pnr > cul-2-RNAi$ (F). E' and F' show magnified views of the blue box in E and F, respectively.

The yellow framed rectangular regions in A' and B' are magnified to show the sensory bristles at the anterior wing margin.

The wings of $c765 > cul-2-RNAi$ flies are smaller than those of $c765 > GFP$ flies, and clustered bristles are observed at the anterior wing margin in some flies. In C and D, knock-down of $cul-2$ in the posterior compartment results in twisted wings and a smaller posterior compartment. The blue framed rectangular regions in E and F are magnified in E' and F', respectively, to show the sensory bristles on the notum. Knock-down of $cul-2$ leads to loss of bristles.

Black asterisks indicate macrochaetes, and black arrows indicate microchaetes.

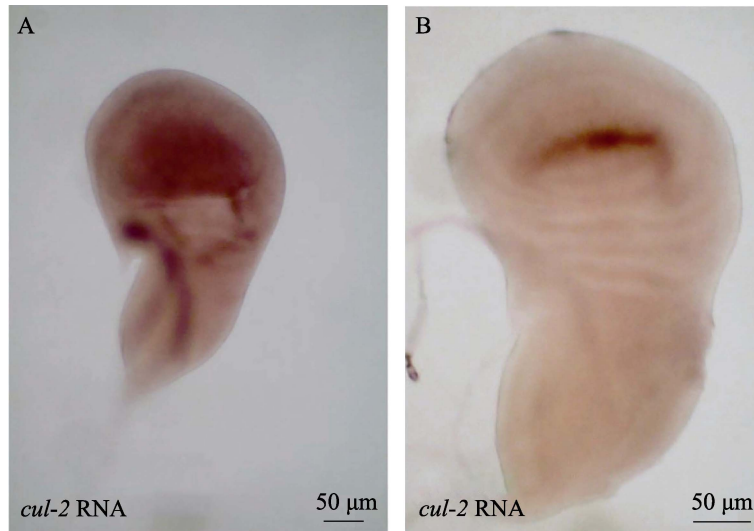


图 2 *cul-2* 在果蝇翅成虫盘中的表达

Fig. 2 *cul-2* expression pattern in the *Drosophila* wing disc

A, B. 野生型果蝇 3 龄幼虫翅成虫盘的 *cul-2* 原位杂交。原位杂交显示 *cul-2* RNA 在野生型 3 龄早期 (A) 和 3 龄晚期 (B) 翅成虫盘中的表达。*cul-2* 的表达在 3 龄早期的翅成虫盘中普遍存在, 而在 3 龄晚期的翅成虫盘中, 仅在翅缘检测到较高的表达水平。

A, B. *In situ* hybridization of *cul-2* in 3rd instar larval wing discs of wild type flies. Expression of *cul-2* RNA in wild type early 3rd instar (A) and late 3rd instar (B) larval wing discs as shown by *in situ* hybridization. High levels of *cul-2* expression are prevalent throughout the younger 3rd instar disc, while in the older 3rd instar wing disc, *cul-2* expression is more enriched at the wing margin.

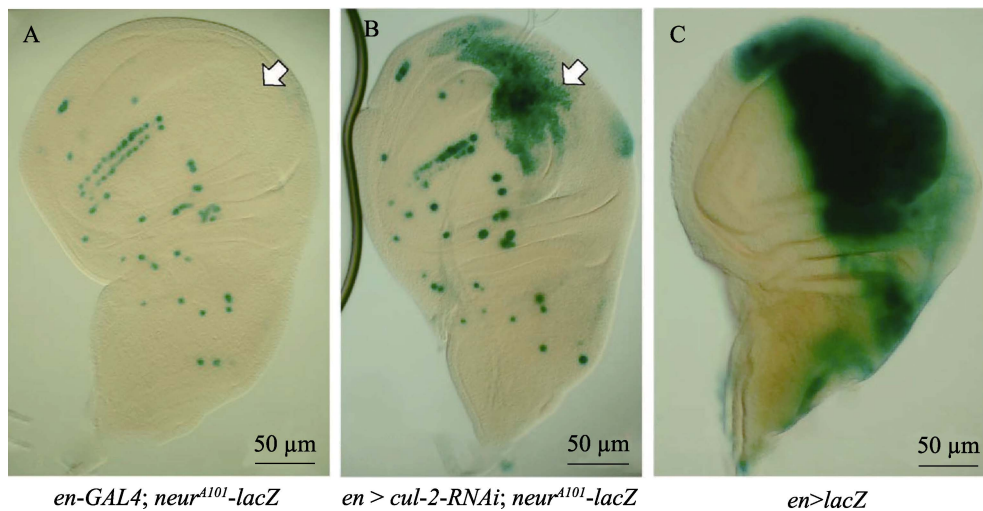


图 3 敲低 *cul-2* 诱导果蝇翅成虫盘异位 SOP 形成

Fig. 3 Knock-down of *cul-2* results in ectopic SOP formation in the *Drosophila* wing disc

A 和 B. 基因型为 *en-GAL4; neur^{A101}-lacZ* (A) 和 *en > cul-2-RNAi; neur^{A101}-lacZ* (B) 的翅成虫盘;

C. 基因型为 *en > lacZ* 的翅成虫盘 X-gal 染色。

A 和 B 中 SOP 由 *neur^{A101}-lacZ* 标记。*cul-2* 敲低后, 在翅袋后半部观察到大量异位表达 SOP (白色箭头)。

C 中显示 *en-GAL4* 驱动区域在翅成虫盘后半部, 以翅袋部表达最强。

A and B: X-gal staining of wing discs of flies with genotypes *en-GAL4; neur^{A101}-lacZ* (A) and *en > cul-2-RNAi; neur^{A101}-lacZ* (B); C: X-gal staining of a wing disc with genotype *en > lacZ*.

In A and B, SOPs are labeled by *neur^{A101}-lacZ*. Knock-down of *cul-2* induces numerous ectopic SOPs in the posterior wing pouch (white arrows). In C, *en-GAL4* is expressed in the posterior half of the wing imaginal disc, with the strongest expression in the wing pouch.

2.3 *cul-2* 敲低诱导形成异位 SOP 依赖于原神经基因的调控

原神经基因产物 ASC 是 SOP 表达和转化所必需的。为了验证 *cul-2-RNAi* 诱导异位 SOP 形成是否需要激活 ASC, 本研究分析了 *en > cul-2-RNAi; sc-RNAi* 幼虫中 *neur^{A101}-lacZ* 的表达情况, 同时使用 *en > cul-2-RNAi; DsRed* 幼虫作为对照 (图 4: A, B)。定量分析显示: 在 *en > cul-2-RNAi*

组中, 后翅袋 SOP 信号显著升高, 表达量比值为 4.02 ± 0.18 (图 4: A); 而当 *sc-RNAi* 和 *cul-2-RNAi* 共同表达时, 该比值降至 0.81 ± 0.07 (图 4: B)。两组差异极显著 ($t = 74.3, P < 0.001$), 表明 *cul-2-RNAi* 诱导的 *neur^{A101}* 异位激活被 *sc* 的敲减强烈抑制。因此, *cul-2-RNAi* 诱导异位 SOP 形成需要原神经基因的表达。换句话说, *cul-2-RNAi* 诱导产生的 *neur^{A101}* 阳性细胞确实是 SOP 细胞。

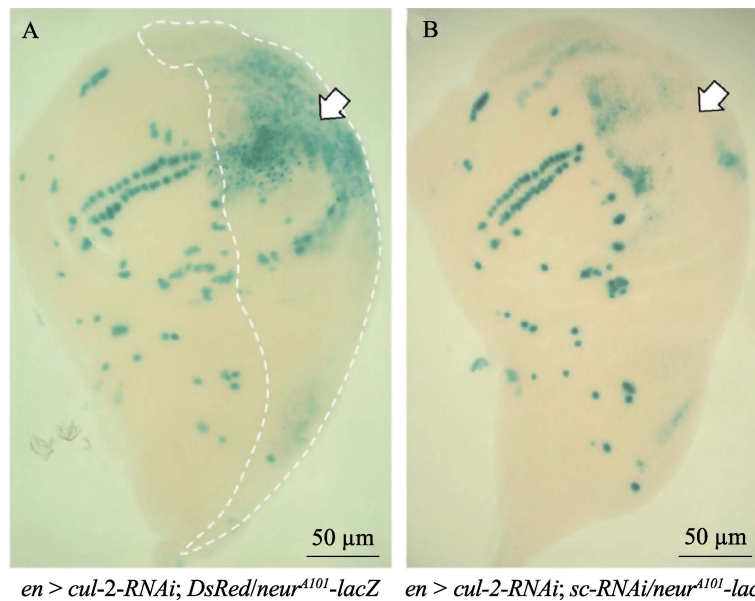


图 4 敲低 *sc* 抑制与 *cul-2-RNAi* 相关的异位 SOP 形成

Fig. 4 *sc* knock-down suppresses ectopic SOP formation associated with *cul-2-RNAi*

A. 基因型为 *en > cul-2-RNAi; DsRed/neur^{A101}-lacZ* 的果蝇翅虫盘 X-gal 染色;

B. 基因型为 *en > cul-2-RNAi; sc-RNAi/neur^{A101}-lacZ* 的果蝇翅成虫盘 X-gal 染色。

en-GAL4 的表达区域如白色虚线框所示, 成虫盘的 SOP 由 *neur^{A101}-lacZ* 标记。A 中, *DsRed* 的共表达不影响由 *cul-2* 敲低导致的大量异位 SOP 生成; B 中, 在 *sc* 敲低的作用下, 由 *cul-2-RNAi* 引发的异位 SOP 数量显著减少 (白色箭头)。

A. X-gal staining of a *Drosophila* wing disc with the genotype *en > cul-2-RNAi; DsRed/neur^{A101}-lacZ*;

B. X-gal staining of a *Drosophila* wing disc with the genotype *en > cul-2-RNAi; sc-RNAi/neur^{A101}-lacZ*.

The *en-GAL4* expression region is indicated by the white dashed box, and the SOPs in wing discs are labeled with the SOP marker *neur^{A101}-lacZ*. In A, knockdown of *cul-2* in the posterior half of the wing imaginal disc results in the generation of numerous ectopic SOPs, while co-expression of *DsRed* does not affect the formation of ectopic SOPs induced by *cul-2-RNAi*. In B, upon *sc* knock-down, the number of ectopic SOPs induced by knock-down of *cul-2-RNAi* is significantly reduced (white arrows).

2.4 *cul-2* 敲低诱导的异位 SOP 与 ASC 过表达诱导的异位 SOP 表型不同

由于 *cul-2-RNAi* 诱导的 SOP 可通过敲低 *sc* 来抑制, 表明 *cul-2* 对 SOP 的调控作用很可

能源于对 ASC 基因的抑制。由此可预期 ASC 过表达引发的异位 SOP 模式似乎应与 *cul-2-RNAi* 表型相似。为此, 本研究测试了 *en > cul-2-RNAi* 和 *en > sc* 翅成虫盘中 SOP 标记物 *neur^{A101}* 表达情况 (图 5: A, B), 正如 Lai (2003) 报

道的一样, *sc* 过表达导致异位 SOP 形成 (图 5: B, B'), 但与 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 模式存在明显差异 (图 5: A', B')。与内源性 SOP 类似, *en > sc* 果蝇翅盘中的异位 SOP 由 *neur^{A101}* 阴性细胞分隔, 呈现空间不连续性。相比之下, *cul-2-RNAi* 诱导 SOP 标记物 *neur^{A101}* 虽然在表达水平上存在差异, 但其异位 SOP 在空间上是连续的 (图 5: A, A')。为验证这一点, 我们作了如下统计分析: 在 *cul-2-RNAi* 组与 *UAS-sc* 组中各随机选取 50 个 SOP, 针对每个选定的

SOP, 在图上找到与之最邻近的 SOP, 并测量二者的距离。两组数据进行独立样本 t 检验, 结果显示: *cul-2-RNAi* 组的平均最邻近距离为 $(4.6 \pm 0.4) \mu\text{m}$, 表现为高度聚集的空间连续性分布 (图 5: A, A'); 而 *UAS-sc* 组的平均最邻近距离为 $(20.1 \pm 0.8) \mu\text{m}$ (图 5: B, B'), 表现为离散的空间不连续性分布。两组间差异极显著 ($t = 130.2, P < 0.001$)。这表明在 *cul-2* 敲低后, 用于限制的 SOP 命运的侧向抑制调节机制并未激活。

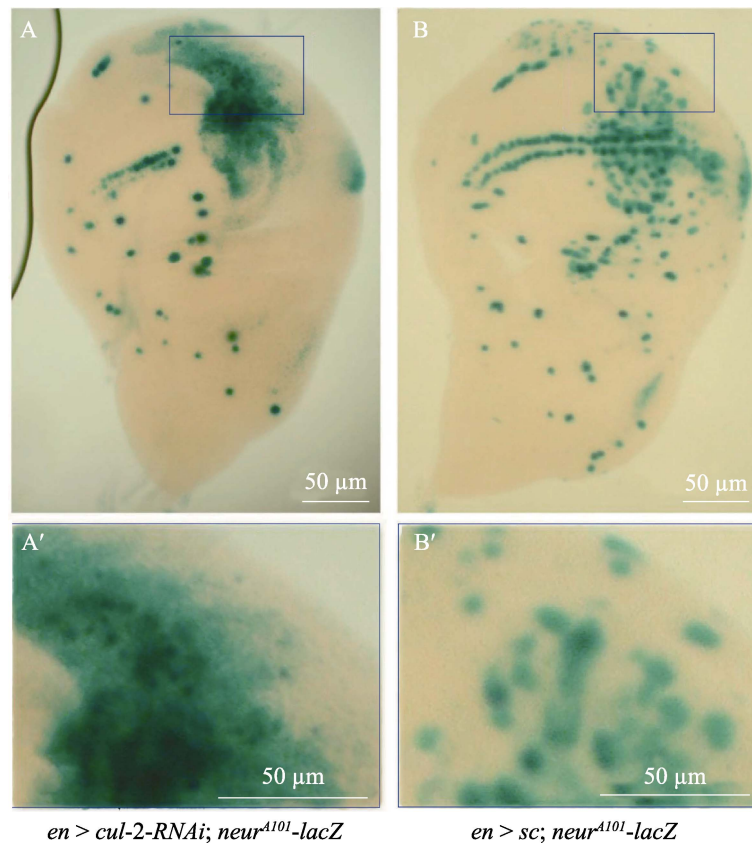


图 5 *cul-2* 敲低与 *sc* 上调引发的异位 SOP 空间模式不同

Fig. 5 Ectopic SOPs induced by *cul-2* knock-down or *sc* up-regulation show different spatial patterns

A. 基因型为 *en > cul-2-RNAi; neur^{A101}-lacZ* 的果蝇翅成虫盘 X-gal 染色; A'. A 中的蓝框区域放大;

B. 基因型为 *en > sc; neur^{A101}-lacZ* 的果蝇翅成虫盘 X-gal 染色; B'. B 中的蓝框区域放大。

成虫盘的 SOP 由 *neur^{A101}-lacZ* 标记, A-A' 显示由 *cul-2* 敲低引发的异位 SOP 呈空间连续模式。

B-B' 显示由 *sc* 过表达引发的异位 SOP 呈空间分离模式。

A. X-gal staining of a *Drosophila* wing disc with the genotype *en > cul-2-RNAi; neur^{A101}-lacZ*;
A'. Magnification of the blue-boxed area in A;

B. X-gal staining of a *Drosophila* wing disc with the genotype *en > sc; neur^{A101}-lacZ*;
B'. Magnification of the blue-boxed area in B.

SOPs in wing discs are labeled with the marker *neur^{A101}-lacZ*. A-A' show that the ectopic SOPs induced by *cul-2* knockdown exhibit a spatially continuous pattern. B-B' show that the ectopic SOPs induced by *sc* overexpression exhibit a spatially segregated pattern.

2.5 *cul-2* 敲低与 N 信号敲低诱导的异位 SOP 形成机制不同

为了探究 N 信号通路在 *cul-2-RNAi* 相关的异位 SOP 表型形成中的作用,本研究对比了 *en > N-RNAi* 与 *en > cul-2-RNAi* 翅成虫盘中 SOP 标记物 *neur^{A101}* 的表达 (图 6: A, B)。发现敲低 N 信号会诱导异位 SOP 且呈空间连续分布,但严格局限于原神经簇内,边界清晰 (图 6: B),而 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 出现在本无原神经簇的翅袋后半部大片区域。相比之下,敲低 *cul-2* 导致更广泛区域的异位 SOP 形成 (图 6: A),表明 *cul-2* 可能比 N 信号通路更早地参与神经发生的调控。

2.6 *cul-2* 敲低诱导的异位 SOP 可被 N 信号通路成员 *E (spl)^{m7}* 的上调抑制,但不受 N 信号敲低的影响

N 信号通路的激活可以抑制神经源性的发生,其下游信息分子 *E (spl)* 复合体过表达会导致原神经簇内 SOP 形成的缺失。因此,本研究通过检测 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 对过表达 *E (spl)^{m7}* 的反应来观察 N 信号通路和 *cul-2* 之间的遗传互作。定量分析显示:在 *en > cul-2-RNAi* 组中,后翅袋(即异位 SOP 所在区域)与前翅袋(即内源性 SOP 所在区域)的 *neur^{A101}* 表达量比值为 3.13 ± 0.091 (图 6: D),而当 *E (spl)^{m7}* 共表达时,该比值下降至 0.23 ± 0.022 (图 6: E)。两组差异极显著 ($t = 72.32, P < 0.001$),表明与 *cul-2-RNAi* 相关的异位 SOP 形成被 *E (spl)^{m7}* 抑制,即 N 信号途径在 *cul-2* 调控 SOP 命运过程中显示出上位效应。

另一方面,*cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 在空间上呈连续分布,表明这些异位 SOP 形成过程中缺乏由 N 信号通路介导的侧向抑制。若在 *cul-2-RNAi* 翅成虫盘中 N 信号未被激活,则进一步降低 N 信号水平很可能不会改变 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 形成。为了验证这一点,本研究在 *en > cul-2-RNAi* 翅成虫盘中通过共表达 *N-RNAi* 来抑制 N 信号 (图 6: C),结果 *N-RNAi*

和 *cul-2-RNAi* 共表达后的异位 SOP 在原神经簇内的表型与单独 *N-RNAi* 表达时相同 (图 6: B),而在原神经簇外的表型又与单独 *cul-2-RNAi* 表达时相同 (图 6: A)。因此由 *N-RNAi* 和由 *cul-2-RNAi* 导致的异位 SOP 表型呈叠加效应,互不干扰。

总之, N 信号的激活能够抑制 *cul-2-RNAi* 诱导异位 SOP 的形成,而调低 N 信号水平对 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 影响甚微,这说明:尽管 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 能够对 N 信号增强做出反应,但在这些异位 SOP 形成过程中, N 信号通路并没有被激活。

2.7 敲低 *cul-2* 未激活 N 配体 D1 的表达

前文提到, *cul-2* 敲低没有激活 N 信号。与之不同的是,当 *sc* 过表达时,在原神经簇外发现了明显分离的异位 SOP (图 5: B, B'),表明 N 信号通路引发的侧向抑制被激活。为厘清敲低 *cul-2* 时翅成虫盘 N 信号通路未被激活的机制,本研究考察了 *cul-2-RNAi* 背景下 N 的配体 D1 的表达 (图 7: A-C)。结果显示,在对照组 (*en-GAL4/+*) 中 D1 在后翅袋的相对表达量为 0.38 ± 0.015 (图 7: A');在 *sc* 过表达组中为 2.15 ± 0.07 (图 7: B'),与对照组差异极显著 ($t = 60.56, P < 0.001$);而在 *cul-2-RNAi* 组中 D1 在后翅袋的相对表达量为 0.39 ± 0.017 (图 7: C'),与对照组无显著性差异 ($t = 0.36, P > 0.05$),表明 *cul-2* 敲低未能上调 D1 表达水平。这种 *cul-2* 敲低后 D1 表达未上调的现象,至少在一定程度上解释了 *cul-2-RNAi* 翅成虫盘中 N 信号通路未被激活的原因。

3 结论与讨论

本研究揭示了 *cul-2* 作为神经源性潜能的全局性抑制因子在果蝇翅成虫盘细胞中抑制其神经命运的新功能,该功能在此前文献中并未描述 (DeRenzo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Sonnevile and Gönczy, 2004; Vasudevan *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2009; Ayyub, 2011; Neumüller

et al., 2011), 因此本研究扩展了对 *cul-2* 参与发育调控的认知。此外, 本研究还分析了 *cul-2* 在

抑制神经源性命运过程中的独特特征及其与 N 信号通路的关系。

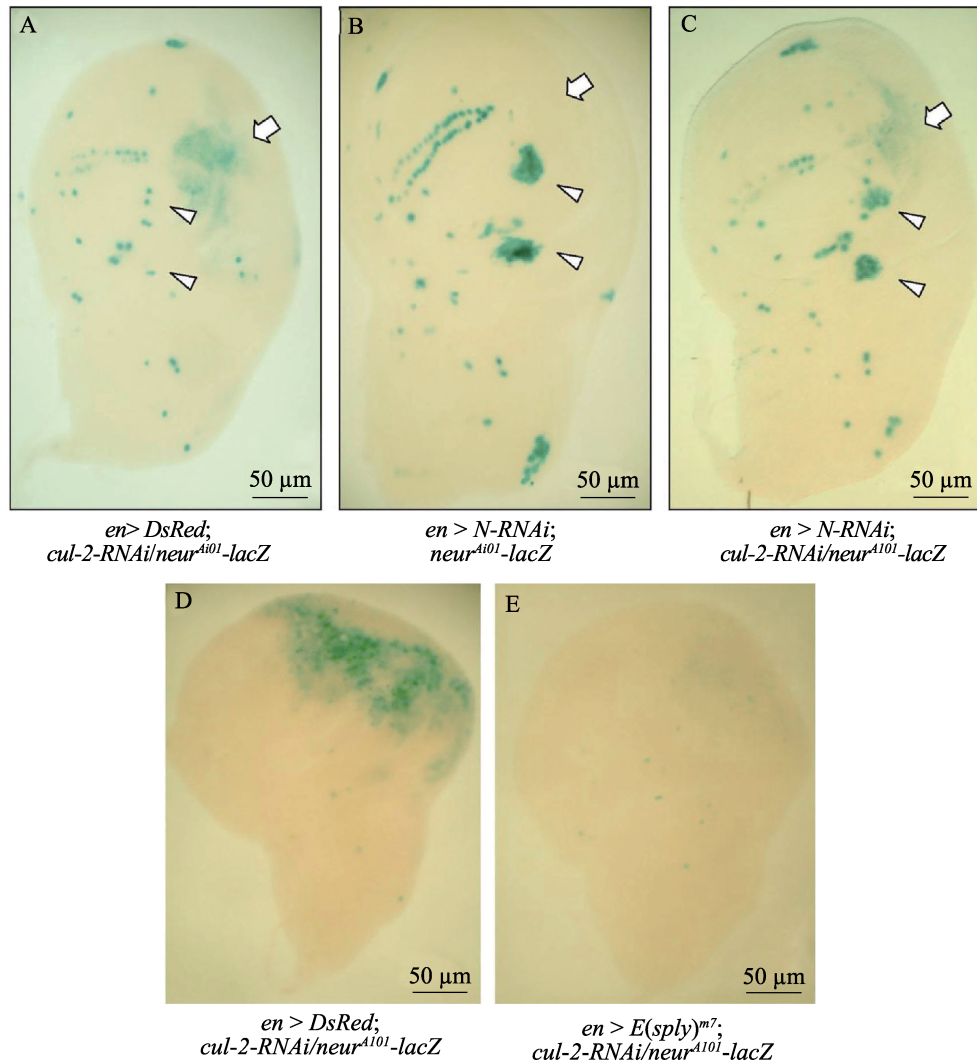


图 6 *cul-2* 敲低诱导的异位 SOP 形成不受 N 信号敲低的影响, 但受 N 信号上调的抑制
Fig. 6 Ectopic SOP formation induced by *cul-2* knock-down is not affected by knock-down of N signaling, but suppressed by up-regulated N signaling

A-C. 基因型为 *en > DsRed; cul-2-RNAi/neur^{A101}-lacZ* (A)、*en > N-RNAi; neur^{A101}-lacZ* (B) 和 *en > N-RNAi; cul-2-RNAi/neur^{A101}-lacZ* (C) 果蝇翅成虫盘的 X-gal 染色;
D 和 E. 基因型 *en > DsRed; cul-2-RNAi/neur^{A101}-lacZ* (D) 和 *en > E(spl)^{m7}; cul-2-RNAi/neur^{A101}-lacZ* (E) 果蝇翅成虫盘的 X-gal 染色。

A-C 显示 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 出现在原神经簇外 (箭头), 而 *N-RNAi* 诱导的异位 SOP 仅限于内源性原神经簇内 (白色箭头), *cul-2* 和 *N* 基因同时敲低并未改变这两种表型。

D 和 E 中显示 *E(spl)^{m7}* 的过表达显著抑制了由 *cul-2* 敲低诱导的异位 SOP。

A-C. X-gal staining of *Drosophila* wing imaginal discs of the following genotypes: *en > DsRed; cul-2-RNAi/neur^{A101}-lacZ* (A), *en > N-RNAi; neur^{A101}-lacZ* (B), and *en > N-RNAi; cul-2-RNAi/neur^{A101}-lacZ* (C);

D and E. X-gal staining of *Drosophila* wing imaginal discs of genotypes *en > DsRed; cul-2-RNAi/neur^{A101}-lacZ* (D) and *en > E(spl)^{m7}; cul-2-RNAi/neur^{A101}-lacZ* (E).

A-C show that ectopic SOPs induced by *cul-2-RNAi* appear outside the proneural cluster (arrows), whereas those induced by *N-RNAi* are confined within the endogenous proneural cluster (white arrows). Simultaneous knockdown of *cul-2* and *N* does not alter these two phenotypes. D and E show that overexpression of *E(spl)^{m7}* significantly suppresses the ectopic SOPs induced by *cul-2* knockdown.

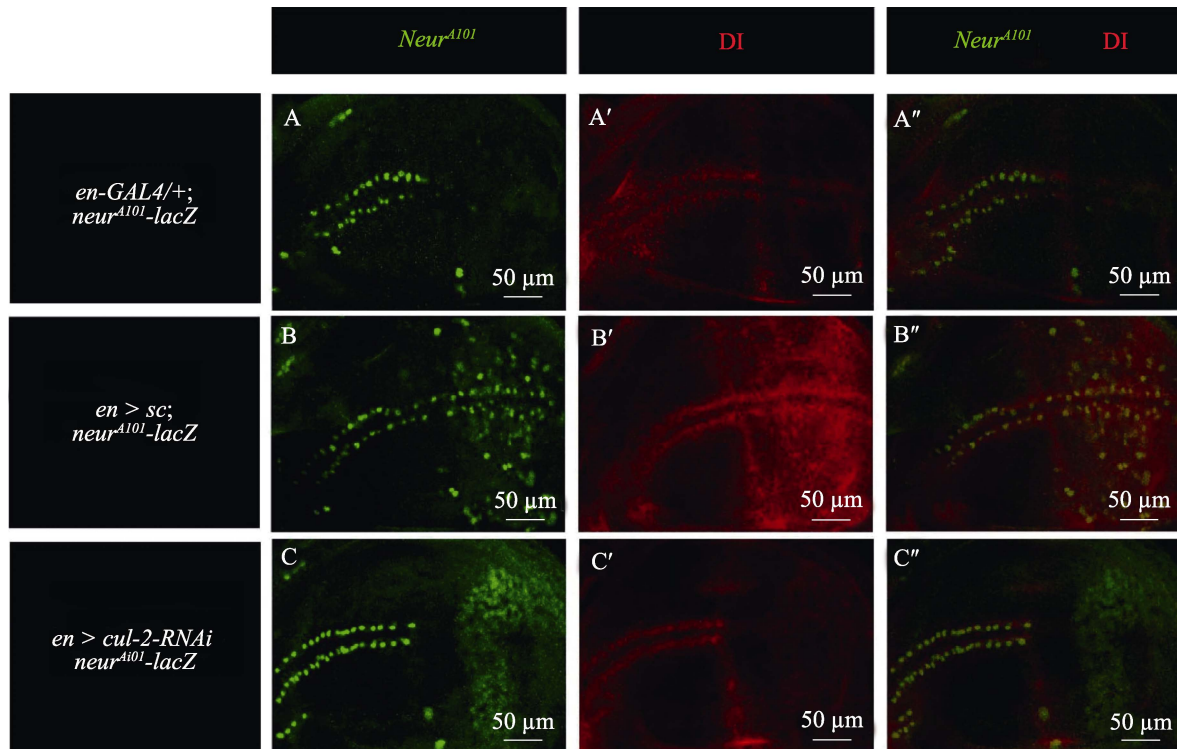


图 7 *sc* 的上调和 *cul-2* 的敲低对 DI 表达的影响

Fig. 7 Ectopic DI expression is induced by upregulation of *sc*, but not by knock-down of *cul-2*

A-C". 基因型为 *en-GAL4/+; neur^{A101}-lacZ* (A-A"), *en > sc; neur^{A101}-lacZ* (B-B") 和 *en > cul-2-RNAi; neur^{A101}-lacZ* (C-C") 果蝇翅成虫盘抗 β-gal (绿色) 和抗 DI (红色) 双染。

A-A"显示 *en-GAL4/+* 类似野生型 SOP 分布和 DI 表达; B-B"显示 *sc* 过表达后半部 (右) 有分隔的异位 SOP 分布, 同时 DI 的表达上升; C-C"显示 *cul-2* 敲低后半部 (右) 有连续的异位 SOP 分布, 但 DI 表达没有明显变化。

A-C". Immunofluorescence double staining for β-gal (green) and DI (red) in *Drosophila* wing imaginal discs of the following genotypes: *en-GAL4/+; neur^{A101}-lacZ* (A-A"), *en > sc; neur^{A101}-lacZ* (B-B"), and *en > cul-2-RNAi; neur^{A101}-lacZ* (C-C").

A-A" show a wild-type-like SOP pattern and DI expression in the control (*en-GAL4/+*); B-B" show segregated ectopic SOPs and increased DI expression in the posterior compartment (right) upon overexpression of *sc*;

C-C" show that after *cul-2* knockdown, the posterior part (right) exhibits continuous ectopic SOP distribution, but there is no significant change in DI expression.

3.1 *cul-2* 是抑制翅成虫盘翅袋和翅铰链区细胞神经命运所必需的

本研究表明, *cul-2* 是限制翅成虫盘中 SOP 细胞形成所必需的, 但与同样具有限制 SOP 细胞形成的 N 信号通路机制不同。果蝇翅成虫盘中的 N 信号是在原神经簇形成后被激活 (Culi and Modolell, 1998), 因此 N 信号的下调只影响原神经簇细胞中的 SOP 形成。而使用诱导性 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术 (Fire *et al.*, 1998; Perrimon *et al.*, 2010) 敲低 *cul-2* 会导致翅成虫盘的翅袋和翅铰链区域出现呈空间连续分布的特殊异位 SOP 表型, 且这些异位

SOP 位置不局限于原神经簇区域。这类表型此前仅在敲低了 *fred* (Chandra *et al.*, 2003) 基因的研究中观察到, 且在 *cul-2* 出现在了 *fred-RNAi* 转录组分析中的下调基因列表中, 表明 *cul-2* 和 *fred* 可能参与了同一类对 SOP 的调节过程。值得注意的是, 在野生型翅成虫盘的后翅袋这一大片区域内, 并无内源性原神经簇分布, 但仍然生成了大面积的异位 SOP, 表明 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 形成不需要原神经簇存在, 这提示大多数翅成虫盘细胞均具备神经源性的潜能。然而, *fred* 敲低也诱导了背板区域异位 SOP 的形成, 而 *cul-2* 敲低则无此效应。由于 *fred* 在翅成虫盘中普遍表达 (Chandra *et al.*, 2003), 而 *cul-2* 表达

则更集中于翅袋区域,因此空间表达差异可能是二者对 SOP 调控区域差别的缘由。

3.2 敲低 *cul-2* 诱导的异位 SOP 中, N 信号没有被激活

虽然 *cul-2-RNAi* 诱导异位 SOP 需要 *sc* 活性,但它与 *UAS-sc* 诱导表达的 SOP 不同,前者诱导的 SOP 在空间呈连续分布,而后者则彼此分离(意味着 N 信号引发的侧向抑制被激活)。N 信号的激活是通过 N 配体(如 DI)启动的(Giniger *et al.*, 1993; Culi and Modolell, 1998; Le Borgne and Schweisguth, 2003)。由于原神经基因 *sc* 可靶向 *dl* 基因座的增强子而直接激活 DI 蛋白的表达(Haenlin *et al.*, 1994; Gómez-Skarmeta *et al.*, 2003),因此,在 *sc* 过表达区域可成功建立 N 信号介导的侧向抑制。而本研究发现,与 *cul-2-RNAi* 相关的异位 SOP 形成可被 *sc* 的表达下调抑制,因此 *cul-2* 的敲低理应激活了原神经基因 *sc*;然而,在 *cul-2* 敲低的区域并未观察到 DI 蛋白水平升高,且在该区域未观察到与 N 信号通路相关的侧向抑制。这就引出一个问题:为什么在敲低 *cul-2* 诱导 *sc* 异位表达的情况下,DI 蛋白的表达并没有上升?本研究认为可能的原因有二:其一,*cul-2* 敲低诱导的 *sc* 表达水平可能不足以激活 *dl* 的转录。这一推测与我们的观察一致:在 *cul-2-RNAi* 诱导的异位 SOP 中,多数细胞的 SOP 标记物 *neur^{A101}* 表达水平显著低于内源性 SOP。由于 *neur* 也是原神经基因的靶标之一,这间接提示 *sc* 的激活程度可能处于一个“亚阈值”水平,虽足以启动部分神经命运程序(如激活 *neur*),却不足以触发 *dl* 表达所需的高阈值。相比之下,利用外源启动子驱动 *UAS-sc* 过表达,可达到超生理水平的表达,从而跨越激活 *dl* 表达的阈值。其二,*cul-2* 的敲低可能同时上调了 *dl* 基因的转录抑制因子,或影响了 *dl* mRNA 的稳定性。*cul-2* 作为 E3 泛素连接酶的组分,其底物可能包含某些抑制 *dl* 表达的负调控因子。当 *cul-2* 缺失时,这些负调控因子可能因降解受阻而累积,从而抵消了 *sc* 对 *dl* 的激活作用。这两种机制并非相互排斥,未来通过定量 PCR 检测

cul-2-RNAi 背景下 *sc* 与 *dl* 的转录水平,以及进行遗传筛选寻找 *cul-2* 下游的 *dl* 表达调控因子,将有助于厘清这一问题。

3.3 *cul-2* 和 *cul-3* 在翅成虫盘 SOP 的调控中扮演不同角色

作为 Cullin-RING E3 泛素连接酶的支架组分,Cullin 蛋白能够将底物靶向 E3 泛素连接酶 RING-finger 亚基结合,从而促进底物的泛素化。尽管 Cullin 蛋白家族在进化上保守且成员间有高度同源性,但因底物特异性差异,每种 Cullin 蛋白都有独特的功能。在果蝇的 6 个 Cullin 蛋白中,已知 CUL-3 具有调控 SOP 分化的功能(Mistry *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005)。*cul-3* 缺失导致翅成虫盘中出现异位 SOP 和成虫背板刚毛增生(Mistry *et al.*, 2004),表明 *cul-3* 可能抑制 SOP 细胞形成,在这一点上与 *cul-2* 有些类似。然而,二者的调控机制存在本质差异。*cul-3* 在整个翅成虫盘中表达,但异位 SOP 似乎只出现在靠近内源性原神经簇的 *cul-3* 克隆中,而不出现在远离原神经簇的区域(Mistry *et al.*, 2004)。相比之下,敲低 *cul-2* 诱导的异位 SOP 位置则不受与内源性原神经簇的距离限制。因此,与 *cul-3* 缺失相关的异位 SOP 更可能起源于已有的原神经簇或其邻近区域,而与 *cul-2* 敲低相关的异位 SOP 显然独立于内源性原神经簇。未来若能鉴定这两个 Cullin 蛋白的特异性底物,将有助于深入理解它们在 SOP 调控中的不同作用。

致谢: 本研究得到了俄亥俄州立大学 Harald Vaessin 和 Kirsten Bremer 夫妇友情提供的果蝇品系和 Jared Kuzar 提供的宝贵建议,在此一并致谢。

参考文献 (References)

- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ, 1999. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415): 770-776.
- Ashitomi H, Nakagawa T, Nakagawa M, Hosoi T, 2025. Cullin-RING ubiquitin ligases in neurodevelopment and

- neurodevelopmental disorders. *Biomedicines*, 13(4): 810.
- Ayyar S, Negre B, Simpson P, Stollewerk A, 2010. An arthropod *cis*-regulatory element functioning in sensory organ precursor development dates back to the Cambrian. *BMC Biology*, 8(1): 127.
- Ayyub C, 2011. Cullin-5 and cullin-2 play a role in the development of neuromuscular junction and the female germ line of *Drosophila*. *Journal of Genetics*, 90(2): 239–249.
- Bellen HJ, O’Kane CJ, Wilson C, Grossniklaus U, Pearson RK, Gehring WJ, 1989. P-element-mediated enhancer detection: A versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes & Development*, 3(9): 1288–1300.
- Bray SJ, 2006. Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9): 678–689.
- Campos-Ortega JA, 1993. Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurobiology*, 24(10): 1305–1327.
- Campuzano S, Carramolino L, Cabrera CV, Ruiz-Gómez M, Villares R, Boronat A, Modolell J, 1985. Molecular genetics of the achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*. *Cell*, 40(2): 327–338.
- Chandra S, Ahmed A, Vaessin H, 2003. The *Drosophila* IgC2 domain protein friend-of-echinoid, a paralogue of echinoid, limits the number of sensory organ precursors in the wing disc and interacts with the Notch signaling pathway. *Developmental Biology*, 256(2): 302–316.
- Culí J, Modolell J, 1998. Proneural gene self-stimulation in neural precursors: An essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes & Development*, 12(13): 2036–2047.
- de Navascués J, Modolell J, 2010. The pronotum LIM-HD gene tailup is both a positive and a negative regulator of the proneural genes achaete and scute of *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 127(9/12): 393–406.
- DeRenzo C, Reese KJ, Seydoux G, 2003. Exclusion of germ plasm proteins from somatic lineages by cullin-dependent degradation. *Nature*, 424(6949): 685–689.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauber S, 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448(7150): 151–156.
- Duda DM, Scott DC, Calabrese MF, Zimmerman ES, Zheng N, Schulman BA, 2011. Structural regulation of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(2): 257–264.
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806–811.
- Fromental-Ramain C, Taquet N, Ramain P, 2010. Transcriptional interactions between the pannier isoforms and the cofactor U-shaped during neural development in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 127(9/12): 442–457.
- Fromental-Ramain C, Vanolst L, Delaporte C, Ramain P, 2008. Pannier encodes two structurally related isoforms that are differentially expressed during *Drosophila* development and display distinct functions during thorax patterning. *Mechanisms of Development*, 125(1/2): 43–57.
- García-Bellido A, Merriam JR, 1971. Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 24(1): 61–87.
- Ghysen A, Dambly-Chaudière C, 1988. From DNA to form: The achaete-scute complex. *Genes & Development*, 2(5): 495–501.
- Giniger E, Jan LY, Jan YN, 1993. Specifying the path of the intersegmental nerve of the *Drosophila* embryo: A role for Delta and Notch. *Development*, 117: 431–440.
- Gómez-Skarmeta JL, Campuzano S, Modolell J, 2003. Half a century of neural pre-patterning: The story of a few bristles and many genes. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(7): 587–598.
- Gong MY, Luo JQ, Liang QK, Liu Y, Zheng YJ, Yang XD, 2025. Chromatin-associated cullin-RING E3 ubiquitin ligases: Keeping transcriptionally active NF- κ B in check. *Frontiers in Immunology*, 16: 1584999.
- Haenlin M, Kunisch M, Kramatschek B, Campos-Ortega JA, 1994. Genomic regions regulating early embryonic expression of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Mechanisms of Development*, 47(1): 99–110.
- Heitzler P, Bourouis M, Ruel L, Carteret C, Simpson P, 1996. Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila*. *Development*, 122(1): 161–171.
- Higa LA, Yang XM, Zheng JY, Banks D, Wu M, Ghosh P, Sun H, Zhang H, 2006. Involvement of CUL4 ubiquitin E3 ligases in regulating CDK inhibitors dacapo/p27Kip1 and cyclin E degradation. *Cell Cycle*, 5(1): 71–77.
- Hua ZH, Vierstra RD, 2011. The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 299–334.
- Huang F, Dambly-Chaudière C, Ghysen A, 1991. The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development*, 111(4): 1087–1095.
- Hudson AM, Cooley L, 2010. *Drosophila* Kelch functions with Cullin-3 to organize the ring canal actin cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, 188(1): 29–37.

- Huppert SS, Jacobsen TL, Muskavitch MAT, 1997. Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for *Drosophila* wing vein morphogenesis. *Development*, 124(17): 3283–3291.
- Huppert SS, Huppert KA, 2011. Who lives and who dies: Role of apoptosis in quashing developmental errors. *Communicative & Integrative Biology*, 4(4): 418–421.
- Ikmi A, Netter S, Coen D, 2008. Prepatterning the *Drosophila* notum: The three genes of the iroquois complex play intrinsically distinct roles. *Developmental Biology*, 317(2): 634–648.
- Kaspar M, Schneider M, Chia W, Klein T, 2008. Klumpfuss is involved in the determination of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 324(2): 177–191.
- Kato Y, Fukazawa T, Tanimoto K, Kanawa M, Kojima M, Saeki I, Kurihara S, Touge R, Hirohashi N, Okada S, 2024. Achaete-scute family bHLH transcription factor 2 activation promotes hepatoblastoma progression. *Cancer Science*, 115(3): 847–858.
- Koto A, Kuranaga E, Miura M, 2011. Apoptosis ensures spacing pattern formation of *Drosophila* sensory organs. *Current Biology*, 21(4): 278–287.
- Lai EC, 2003. *Drosophila* tufted is a gain-of-function allele of the proneural gene amos. *Genetics*, 163(4): 1413–1425.
- Le Borgne R, Schweisguth F, 2003. Notch signaling: Endocytosis makes delta signal better. *Current Biology*, 13(7): R273–R275.
- Ligoxygakis P, Bray SJ, Apidianakis Y, Delidakis C, 1999. Ectopic expression of individual E (spl) genes has differential effects on different cell fate decisions and underscores the biphasic requirement for Notch activity in wing margin establishment in *Drosophila*. *Development*, 126(10): 2205–2214.
- Liu J, Vasudevan S, Kipreos ET, 2004. CUL-2 and ZYG-11 promote meiotic anaphase II and the proper placement of the anterior-posterior axis in *C. elegans*. *Development*, 131(15): 3513–3525.
- Marcellini S, Gibert JM, Simpson P, 2005. Achaete, but not scute, is dispensable for the peripheral nervous system of *Drosophila*. *Developmental Biology*, 285(2): 545–553.
- Marcellini S, Simpson P, 2006. Two or four bristles: Functional evolution of an enhancer of scute in *Drosophilidae*. *PLoS Biology*, 4(12): e386.
- Marshall ZD, Heckscher ES, 2022. The role of even-skipped in *Drosophila* larval somatosensory circuit assembly. *eNeuro*, 9(1): ENEURO.0403–21.2021.
- Mehta R, Steinkraus KA, Sutphin GL, Ramos FJ, Shamieh LS, Huh A, Davis C, Chandler-Brown D, Kaerberlein M, 2009. Proteasomal regulation of the hypoxic response modulates aging in *C. elegans*. *Science*, 324(5931): 1196–1198.
- Merlet J, Burger J, Gomes JE, Pintard L, 2009. Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(11): 1924–1938.
- Mistry H, Wilson BA, Roberts IJ, O'Kane CJ, Skeath JB, 2004. Cullin-3 regulates pattern formation, external sensory organ development and cell survival during *Drosophila* development. *Mechanisms of Development*, 121(12): 1495–1507.
- Modolell J, Campuzano S, 1998. The achaete-scute complex as an integrating device. *International Journal of Developmental Biology*, 42(3): 275–282.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58(3): 537–544.
- Neumüller RA, Richter C, Fischer A, Novatchkova M, Neumüller KG, Knoblich JA, 2011. Genome-wide analysis of self-renewal in *Drosophila* neural stem cells by transgenic RNAi. *Cell Stem Cell*, 8(5): 580–593.
- Ou CY, Wang CH, Jiang J, Chien CT, 2007. Suppression of Hedgehog signaling by Cul3 ligases in proliferation control of retinal precursors. *Developmental Biology*, 308(1): 106–119.
- Perrimon N, Ni JQ, Perkins L, 2010. In vivo RNAi: Today and tomorrow. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8): a003640.
- Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S, 1991. Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: Implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell*, 67(4): 687–699.
- Rizvi Z, Lander GC, 2025. Illuminating ubiquitination mechanisms: How cryo-EM has shed light on Cullin RING E3 ligase function. *Current Opinion in Structural Biology*, 92: 103055.
- Sarikas A, Hartmann T, Pan ZQ, 2011. The cullin protein family. *Genome Biology*, 12(4): 220.
- Schweisguth F, 2004. Regulation of Notch signaling activity. *Current Biology*, 14(3): R129–R138.
- Skaer N, Pistillo D, Gibert JM, Lio P, Wülbeck C, Simpson P, 2002. Gene duplication at the achaete-scute complex and morphological complexity of the peripheral nervous system in *Diptera*. *Trends in Genetics*, 18(8): 399–405.
- Song KY, Zhang YF, Zhang Y, Long ST, Peng JJ, Sun YD, Cui XJ, Pan BS, Chai YX, Wang XX, Chen JH, 2026. Pnr cooperate with fred to regulate SOP cell fate both positively and negatively in the medial notum of *Drosophila*. *Hereditas*, 48(1): 87–101. [宋凯月, 张翼飞, 张瑶, 龙淑婷, 彭建军, 孙远东, 崔小娟, 潘本山, 柴语心, 王晓霞, 陈家慧, 2026. pnr 与 fred 协同介导

- 果蝇背板中部 SOP 细胞发生的双重调控. *遗传*, 48(1): 87–101.]
- Sonneville R, Gönczy P, 2004. Zyg-11 and cul-2 regulate progression through meiosis II and polarity establishment in *C. elegans*. *Development*, 131(15): 3527–3543.
- Stuhl G, Adachi A, 1998. Nuclear access and action of Notch *in vivo*. *Cell*, 93(4): 649–660.
- Troost T, Schneider M, Klein T, 2015. A re-examination of the selection of the sensory organ precursor of the bristle sensilla of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 11(1): e1004911.
- Usui K, Goldstone C, Gibert JM, Simpson P, 2008. Redundant mechanisms mediate bristle patterning on the *Drosophila* thorax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51): 20112–20117.
- Usui K, Pistillo D, Simpson P, 2004. Mutual exclusion of sensory bristles and tendons on the notum of dipteran flies. *Current Biology*, 14(12): 1047–1055.
- Van Doren M, Ellis HM, Posakony JW, 1991. The *Drosophila* extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes. *Development*, 113(1): 245–255.
- Vasudevan S, Starostina NG, Kipreos ET, 2007. The *Caenorhabditis elegans* cell-cycle regulator ZYG-11 defines a conserved family of CUL-2 complex components. *EMBO Reports*, 8(3): 279–286.
- Wing JP, Schreder BA, Yokokura T, Wang YQ, Andrews PS, Huseinovic N, Dong CK, Ogdahl JL, Schwartz LM, White K, 2002. *Drosophila* Morgue is an F box/ubiquitin conjugase domain protein important for grim-reaper mediated apoptosis. *Nature Cell Biology*, 4(6): 451–456.
- Yamasaki Y, Lim YM, Niwa N, Hayashi S, Tsuda L, 2011. Robust specification of sensory neurons by dual functions of charlatan, a *Drosophila* NRSF/REST-like repressor of extramacrochaetae and hairy. *Genes to Cells*, 16(8): 896–909.
- Yeh E, Zhou L, Rudzik N, Boulianne GL, 2000. Neuralized functions cell autonomously to regulate *Drosophila* sense organ development. *The EMBO Journal*, 19(14): 3722–3732.
- Zhu SJ, Perez R, Pan M, Lee T, 2005. Requirement of Cul3 for axonal arborization and dendritic elaboration in *Drosophila* mushroom body neurons. *Journal of Neuroscience*, 25(16): 4189–4197.



烟青虫 *Helicoverpa assulta* (Guenée, 1852)

隶属于鳞翅目夜蛾科，成虫夜间活动，产卵于叶芽及心叶背面，取食烟草、棉、麻、玉米、高粱、番茄、辣椒、南瓜等。体长 15-18 mm，翅展 27-35 mm。头部与胸部黄褐色；前翅黄褐色，翅脉褐色。基线双线褐色，止于翅褶。内线双线褐色，波浪形。环纹圆形，黄褐色褐边，中央有一褐色圆斑。肾纹黄褐色褐边，中央有一褐斑。外线双线褐色，内一线锯齿形较显，在第二臀脉处成一较大齿。亚端线褐色锯齿形，在第二中脉处内弯，几乎触到外线。亚端线与外线间颜色较暗。端线褐色；后翅黄褐色，端区有棕黑色宽带，其内侧中部较向内凸（这是与棉铃虫区别的关键特征之一），并有黄褐色锯齿形纹。外缘棕黑色，在中段很明显。

该照片为雌成虫，拍摄于中国科学院动物研究所王琛柱研究员实验室，材料由公信霖博士生提供。

（中国科学院动物研究所 姜春燕）