

分类号: Q78

单位代码: 10422

密 级:

学 号: 201720251



山东大学

SHANDONG UNIVERSITY

博士学位论文

Dissertation for Doctoral Degree

论文题目: 20-羟基蜕皮激素调控G蛋白偶联受体及胰岛素途径促进昆虫变态发育的研究

20-hydroxyecdysone regulates G protein-coupled receptors
and insulin pathway to promote insect metamorphosis

作 者 姓 名	李艳丽
培 养 单 位	生命科学学院
专 业 名 称	生物化学与分子生物学
指 导 教 师	赵小凡 教授
合 作 导 师	

2021 年 5 月 26 日

分类号: Q78

单位代码: 10422

密 级:

学 号: 201720251



山东大学

SHANDONG UNIVERSITY

博士学位论文

Dissertation for Doctoral Degree

论文题目: 20-羟基蜕皮激素调控G蛋白偶联受体及胰岛素
途径促进昆虫变态发育的研究

20-hydroxyecdysone regulates G protein-coupled receptors
and insulin pathway to promote insect metamorphosis

作 者 姓 名 李艳丽
培 养 单 位 生命科学学院
专 业 名 称 生物化学与分子生物学
指 导 教 师 赵小凡 教授
合 作 导 师 _____

2021 年 5 月 26 日

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：李艳丽 日期：2021.05.29

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解山东大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名：李艳丽 导师签名：赵小凡 日期：2021.05.29

目录

摘要 I

ABSTRACT IV

符号说明 VII

第一章 前言 1

 1 激素调控昆虫的变态发育 1

 2 20E 作用机制及 20E 信号途径 2

 2.1 蜕皮激素概述 2

 2.2 20E 的基因组信号途径 3

 2.3 20E 的非基因组信号途径 6

 3 胰岛素及胰岛素信号途径 10

 3.1 胰岛素概述 10

 3.2 胰岛素信号途径 10

 4 胰岛素与 20E 信号通路的相互作用关系 12

 5 存在的科学问题和研究方案 12

第二章 GPCRs 在 20E 信号通路中调节不同基因的表达 14

 1 引言 14

 2 实验材料与方法 15

 2.1 实验材料 15

 2.2 实验方法 16

 3 实验结果 22

 3.1 棉铃虫 GPCRs 的鉴定 22

 3.2 20E 信号通路中的 GPCRs 筛选 23

 3.3 20E 途径中不同的 GPCR 在调节幼虫生长发育中发挥不同的功能 28

 3.4 不同的 GPCRs 在 20E 信号传导中调节不同的基因表达 35

 3.5 PRRPR 与 20E 结合而 SMO 不与 20E 结合 39

 4. 讨论 42

 4.1 棉铃虫基因组 GPCR 的鉴定和分类 42

 4.2 不同的 GPCR 在不同的组织中传递 20E 信号和基因表达 42

 4.3 无论是否与 20E 结合 GPCR 都可以传递 20E 信号 44

第三章 20E 通过使胰岛素受体去磷酸化拮抗胰岛素信号通路	46
1 引言	46
2 实验材料与方法	47
2.1 实验材料	47
2.2 实验方法	48
3 实验结果	52
3.1 INSR β 蛋白的表达水平及磷酸化水平均在变态期下降	52
3.2 20E 抑制 INSR β 的表达和磷酸化	55
3.3 高浓度 20E 抑制 INSR β 表达和磷酸化的机制	56
3.4 PTP1B 使 INSR β 去磷酸化	60
3.5 PTEN 通过调节 FoxO 核定位上调 PTP1B 表达参与 INSR β 去磷酸化并抑制 INSR β 表达	62
3.6 敲降幼虫体内的 <i>Ptpn1</i> 维持 INSR β 磷酸化状态导致 20E 滴度升高促使幼虫提前化蛹并化小蛹	67
3.7 敲降幼虫体内的 <i>Insr</i> 导致化小蛹，延迟化蛹，并通过降低 20E 滴度升高血淋巴葡萄糖	68
3.8 在变态期 20E 升高血淋巴葡萄糖水平	70
4. 讨论	71
4.1 临界滴度的 20E 阻断胰岛素途径，使幼虫停止生长并决定昆虫个体大小	72
4.2 20E 升高血淋巴葡萄糖水平和 ILP 的表达	72
4.3 FoxO 抑制 INSR 表达	73
5. 结论	74
第四章 论文创新点总结及意义	76
一、GPCRs 在 20E 信号通路中参与不同基因的表达	76
二、20E 通过使胰岛素受体去磷酸化拮抗胰岛素信号通路	76
参考文献	77
致谢	87
攻读学位期间已发表和准备发表的学术论文	88

20-羟基蜕皮激素调控 G 蛋白偶联受体及胰岛素途径促进昆虫变态发育的研究

摘要

研究背景及存在的科学问题

昆虫的变态类型分为完全变态和不完全变态，我们所研究的重要农业害虫棉铃虫属于完全变态类昆虫的一种，其组织形态变化极为显著，在昆虫生长发育过程中，蜕皮激素（20E）和胰岛素样肽（ILPs）发挥着重要作用。昆虫的 20E 信号途径和胰岛素 insulin/胰岛素样生长因子信号（IIS）途径（简称胰岛素途径）存在拮抗作用。

类固醇激素 20E 启动昆虫的蜕皮和变态，20E 进入细胞内可以与其核受体 EcR 结合起始下游基因的转录，起始 20E 的基因组途径。目前研究发现，类固醇激素可以结合细胞膜上的受体起始某些非基因组途径如蛋白质快速修饰， Ca^{2+} 水平的快速变化等快速的细胞效应。且在哺乳动物、家蚕、果蝇中已经得到证实。细胞膜上的 G 蛋白偶联受体（GPCR）属于 7 次跨膜结构的蛋白家族，在细胞膜上转导包括神经递质，激素等各种信号。人体内有多个 GPCRs，是人类中最庞大的膜蛋白家族。已有研究发现在昆虫体内也存在多个 GPCRs，我们实验室已经发现有多数 GPCRs 参与 20E 的信号转导过程，多个 GPCRs 共同参与同一配体 20E 的信号转导，其机制尚未阐明。

胰岛素受体（INSR）结合胰岛素来促进幼虫生长和维持正常的血淋巴葡萄糖水平，虽然已知类固醇激素如雌激素和 20E 均会拮抗胰岛素的功能，但导致这种拮抗作用的分子机制仍不清楚。此外，胰岛素途径的改变会导致糖尿病的发生，胰岛素能维持正常血糖水平而类固醇激素会拮抗胰岛素的功能增加血糖，甚至诱发糖尿病，然而这些机制还没有完全阐明。

研究结果

在棉铃虫基因组中鉴定了 122 个基因编码经典的 GPCRs，并对它们进行分类，基因组中未注释分类的 GPCRs 也进行了重新归类。分析了幼虫中肠转录组中变态期较取食期差异表达的 GPCRs，并从中检查了变态期上调表达的 11 个 GPCRs 及 2 个下调表达的 GPCRs 的表达谱，发现它们在虫体的各组织和发育阶段中的表达具有很大差异。进一步证实了 6 个 GPCRs 参与类固醇激素 20E 信号

通路, 通过 RNA 干扰 (RNAi) 敲降这些 GPCRs, 幼虫出现不同的表型及延迟化蛹或化小蛹等。敲降这些 GPCRs 会降低 20E 信号通路下游基因 *HHR3* 的表达, 但只有敲降 GPCR-催乳素释放肽受体 (*PrRPR*) 和 *Smoothened* (*Smo*) 才会导致在 20E 调控变态过程中起作用的双功能磷酸酶 (*Pten*) 和转录因子 *Forkhead box O* (*FoxO*) 的表达下降, 敲降 *PrRPR* 和 *Smo* 同时降低了转录因子 *BrZ7* 的表达水平, 敲降脂动激素受体 *Akhr* 和 5-羟色胺受体 *Htr* 上调转录因子 *Krüppel homolog 1* (*Kr-h1*) 的表达, 敲降以上这四个 GPCR 后均导致化蛹延迟。敲降 *Frizzled 7* (*Fzd7*) 下调 *Wnt* 及 *cMyc* 的表达水平, 导致化蛹体重减轻, 敲降速激肽受体 *TkR86C* 没有引起表型的差异变化。通过 20E 酶联免疫检测 (20E-EIA) 方法证实了 *PRRPR* 可以结合 20E。这些结果解释了多个 GPCRs 通过不同的表达谱以及对不同基因表达的调控来传递 20E 信号的机制。

20E 诱导 INSR 去磷酸化以拮抗胰岛素信号途径的功能。我们观察到 INSR 在幼虫取食期表达量及磷酸化水平均较高, 但在蜕皮变态期其表达量和磷酸化水平较低。胰岛素使 INSR 的表达及磷酸化水平均上调, 而高滴度的 20E 则使 INSR 的表达下调并且诱导了 INSR 的去磷酸化。20E 能上调蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B, 由 *Ptpn1* 编码) 的表达, 使 INSR 去磷酸化。同时, 20E 上调 PTEN 表达, 维持转录因子 FoxO 的核定位, 定位于细胞核的 FoxO 促进 *Ptpn1* 的表达并抑制 *Insr* 的表达。采用 RNA 干扰技术敲降 *Ptpn1* 维持了 INSR 的磷酸化, 并增加了 20E 滴度导致虫体提前化蛹并化小蛹。而敲降 *Insr* 抑制了幼虫的生长, 减少了 20E 的产生导致延迟化蛹并化小蛹, 敲降 *Insr* 还导致血淋巴葡萄糖的积累。综上所述, 这些结果表明, 20E 通过去磷酸化 INSR 拮抗胰岛素途径, 阻止幼虫生长, 积累血淋巴葡萄糖。

结论及科学意义

1. 本论文鉴定了棉铃虫基因组中的全部经典 GPCR, 并进行归类, 对棉铃虫 GPCR 的研究提供了参考, 并发现了 20E 的另一个受体 *PRRPR*。20E 可以通过结合 *PRRPR* 或不结合 20E 的 *SMO* 调控 *Pten* 和 *FoxO* 的表达。以及 20E 还可以通过其他的 GPCR 调控其他基因的表达。这进一步揭示了多个 GPCRs 通过组织差异表达和调控不同基因表达来传递 20E 信号, 为类固醇激素信号途径的研究提供新的理论依据, 为害虫防治提供新的 GPCR 靶标。
2. 胰岛素促进幼虫生长, 并在幼虫取食阶段促使 20E 达到临界滴度, 临界滴

度的 20E 上调 PTEN 的表达,使 FoxO 定位于细胞核中,核定位的 FoxO 上调磷酸酶 PTP1B 的表达,使 INSR 去磷酸化,同时 FoxO 抑制 INSR 的表达,从而拮抗胰岛素途径。临界滴度的 20E 阻止幼虫生长,启动变态过程,诱导血淋巴葡萄糖的积累。这为进一步研究类固醇激素与胰岛素之间的相互作用提供新的思路 and 依据,为害虫防治提供了新的靶标,同时为血糖代谢的研究提供理论知识,也可以为人类糖尿病的研究提供新的实验模型。

关键词: 棉铃虫; 20E; G 蛋白偶联受体; 胰岛素; 胰岛素受体; PTEN; FoxO; 血淋巴葡萄糖

20-hydroxyecdysone regulates G protein-coupled receptors and insulin pathway to promote insect metamorphosis

ABSTRACT

Background and unsolved questions

Insects can be divided into complete metamorphic insects and incomplete metamorphic insects. The important agricultural pest *Helicoverpa armigera* we studied belongs to a kind of completely metamorphic insect. The tissue morphology changes extremely significantly. 20-hydroxyecdysone (20E) and insulin like peptides (ILPs) play important roles in the growth and development of insects. Insect 20E signaling pathway and insulin/insulin-like growth factor signaling (IIS) pathway (abbreviated as insulin pathway) have antagonistic effects.

The steroid hormone 20E initiates the molting and metamorphosis of insects. 20E enters the cells and binds to the nuclear receptor EcR to initiate the transcription of downstream genes and initiate the genomic pathway of 20E. Current studies have found that steroid hormones can bind to receptors on the cell membrane to initiate certain non-genomic pathways such as rapid protein modification, rapid changes in calcium ion levels and other rapid physiological effects, which has been confirmed in mammals, *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*. The G protein-coupled receptor (GPCR) on the cell membrane belongs to a family of proteins with a seven-times transmembrane structure, which transduces various signals including neurotransmitters and hormones on the cell membrane. GPCRs are the largest membrane protein family in humans. Studies have found that there are also multiple GPCRs in insects. Our laboratory has identified multiple GPCRs involved in the non-genomic pathway of 20E. Multiple GPCRs are involved in the signal transduction of the same ligand 20E. The mechanism has not yet been fully elucidated.

Insulin receptor (INSR) binds insulin to promote larval growth and maintain normal blood glucose levels. Although steroid hormones such as estrogen and 20E are known to antagonize the function of insulin, the molecular mechanism leading to this antagonism is still unclear. In addition, changes in the insulin pathway can lead to diabetes. Insulin can maintain normal blood glucose levels and steroid hormones can antagonize the function of insulin to increase blood glucose and even induce diabetes. However, these mechanisms have not been fully elucidated.

Results

In the genome of *H. armigera*, 122 genes encoding classic GPCRs that can act as guanine nucleotide exchange factors (GEF) were identified and classified. And the unannotated GPCRs in the genome were also reclassified. We analyzed the GPCRs differentially expressed in the larval midgut transcriptome during metamorphosis stage compared with the feeding stage, and examined the expression profiles of 11 GPCRs with upregulated expression and 2 GPCRs with downregulated expression during the metamorphic stage in the transcriptome. The results showed that there were great differences in their expression in various tissues and developmental stages. The results showed that their expressions were very different in various tissues and in developmental stages. It was further confirmed that the 6 GPCRs involved in the steroid hormone 20E signal pathway were knockdown by RNA interference, and the larvae showed different phenotypes and delayed pupation or formed small pupae. Knockdown of these GPCRs down regulated the expression of *HHR3* in 20E signaling pathway. However, only knockdown of GPCR-*PrRPR* and *Smo* reduced the expression of the bifunctional phosphatase (*Pten*) and the transcription factor Forkhead box O (*FoxO*), which play roles in the process of 20E regulating metamorphosis. Knockdown of adipokinetic hormone receptor *Akhr* and 5-hydroxytryptamine receptor *Htr* upregulated transcription factor Krüppel homolog 1 (*Kr-h1*) expression. Knockdown of these four GPCRs all led to delayed pupation. Knockdown of Frizzled 7 (*Fzd7*) downregulated the expression levels of *Wnt* and *cMyc*, resulting in weight loss during pupation. Knockdown of the tachykinin receptor *TkR86C* did not cause a difference in phenotype. The 20E enzyme immunoassay (20E-EIA) analysis confirmed that *PRRPR* can bind 20E. These results explain the mechanism by which multiple GPCRs transmit 20E signals through different expression profiles and regulation of different gene expression.

20E induces the dephosphorylation of INSR to antagonize the function of the insulin signal pathway. The expression and phosphorylation level of INSR were higher during larval feeding stages, but lower during molting metamorphosis stages. Insulin upregulated INSR expression and phosphorylation, while 20E inhibited INSR expression and induced INSR dephosphorylation. 20E upregulated the expression of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B, encoded by *Ptpn1*), which dephosphorylated INSR. At the same time, 20E upregulated the expression of PTEN and maintained the nuclear localization of the transcription factor FoxO. FoxO located in the nucleus promoted the expression of *Ptpn1* and inhibited the expression of *Insr*. Using RNA

interference technology to knock down *Ptpn1* resulted in maintaining the phosphorylation of INSR and leading to small pupae and earlier pupation by increasing the 20E titer. Knock down of *Insr* inhibited the growth of larvae and reduced the production of 20E, which led to delayed pupation and the small pupae. Knockdown of *Insr* also led to accumulation of hemolymph glucose. Taken together, these results indicated that 20E counteracts the insulin pathway by dephosphorylating INSR to stop larval growth and accumulate glucose in the hemolymph.

Conclusions and scientific significances

1. We identified all classic GPCRs in the genome of *H. armigera* and classified them to provide a reference for the research on the GPCRs of *H. armigera*. We found that PRRPR is another receptor of 20E. 20E regulated the expression of *Pten* and *FoxO* by binding to PRRPR or SMO that cannot bind 20E. This further revealed the mechanism that multiple GPCRs transmit 20E signals through different expressions in tissues and the regulation of different gene expressions. It provided a new target for the research of steroid hormone signal pathway and a new theoretical basis for the control of pests.
2. INSR functions to promote insect larval growth and 20E production to reach a high titer during the larval feeding stages. The high 20E titer counteracts INSR function by upregulating PTEN expression, which maintains FoxO's nuclear localization to promote PTP1B expression, resulting in INSR dephosphorylation and repressed INSR expression. The critical titer of 20E stops larval growth, determines the body size, triggers metamorphosis, and causes accumulation of hemolymph glucose for imaginal disc growth. This provides new ideas and basis for further research on the interaction between steroid hormones and insulin, and provides a new target for the control of pests. At the same time, it provides theoretical support for the study of blood glucose metabolism, and can also provide a new experimental model for the study of human diabetes.

Keywords: *Helicoverpa armigera*; 20-hydroxyecdysone; G protein-coupled receptor; insulin; insulin receptor; PTEN; FoxO; hemolymph glucose.

符号说明

缩略语	英文全称	中文全称
20E	20-hydroxyecdysone	20-羟基蜕皮酮
20E-EIA	20E Enzyme Immunoassay	20E 酶联免疫检测
AChE	acetyl cholinesterase	乙酰胆碱酯酶
ANOVA	analysis of variance	方差分析
BLAST	Basic local alignment search tool	序列比对工具
Br	Broad	变态起始因子
CA	corpus allatum	咽侧体
CDK10	cyclin-dependent kinase 10	周期蛋白依赖性激酶 10
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation	染色质免疫沉淀
Co-IP	co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
CRE	cAMP response element	环磷酸腺苷反应元件
CREB	cAMP response element-binding protein	环腺苷酸响应元件结合蛋白
DAPI	4'-6-diamidion-2-phenylindole dihydrochloride	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DopEcR	Dopamine/Ecdysteroid receptor	多巴胺/蜕皮激素受体
dsRNA	double-stranded RNA	双链 RNA
DPBS	dulbecco's phosphate buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
E20MO	ecdysone 20-monooxygenase	蜕皮激素 20-单加氧酶
E75B	Ecdysone inducible transcription factor 75B	蜕皮激素诱导的转录因子 75B
EcR	ecdysone receptor	蜕皮激素受体
EcRE	ecdysone response element	蜕皮激素应答元件
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清

FoxO	Forkhead box O	叉头框蛋白 O
FoxOBE	FoxO binding element	FoxO 结合元件
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GLUT4	glucose transporter 4	葡萄糖转运蛋白 4
GPCR	G protein-coupled receptor	G 蛋白偶联受体
GRK	G protein-coupled receptor kinase	G 蛋白偶联受体激酶
h	hour	小时
HaEpi	<i>H. armigera</i> epidermal cell line	棉铃虫表皮细胞系
HE	hematoxylin-eosin	苏木精-伊红
HR3	hormone receptor 3	激素受体 3
HHR3	<i>H. armigera</i> hormone receptor 3	棉铃虫激素受体 3
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
Hsp90	heat shock protein 90	热休克蛋白 90
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
INSR	insulin receptor	胰岛素受体
INSR β	insulin receptor β	胰岛素受体 β
IIS	insulin/insulin-like growth factor signaling	胰岛素样生长因子信号
ILPs	insulin like peptides	胰岛素样肽
JH	Juvenile hormone	保幼激素
JHE	Juvenile hormone esterase	保幼激素酯酶
mNSCs	medial neurosecretory cells	中间神经分泌细胞
min	minute	分钟
ORF	open reading frame	开放阅读框
PBS	phosphate-buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
PCD	programmed cell death	细胞程序性死亡
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase-1	磷酸肌醇依赖性激酶-1
PG	prothoracic gland	前胸腺

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	磷酸肌醇 3 激酶
PIP2	phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate	磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate	磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸
p-INSR β	phospho-INSR β	磷酸化的胰岛素受体 β
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-3 phosphatase	磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 3-磷酸酶
PTP1B	Protein Tyrosine Phosphatase 1B	蛋白酪氨酸磷酸酶 1B
PTPase	tyrosine-protein phosphatase	蛋白酪氨酸磷酸酶
PTTH	prothoracico tropic hormone	促前胸腺激素
PKAC1	protein kinase A catalytic subunit 1	蛋白激酶 A 催化亚基 1
PKB	protein kinase B	蛋白激酶 B
PLCG1	phospholipase C Gamma 1	磷脂酶 C γ 1
qRT-PCR	quantitative real-time reverse transcription PCR	实时定量 PCR
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
rpm	revolutions per minute	转每分钟
RFP	red fluorescent protein	红色荧光蛋白
s	second	秒
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
SMART	simple modular architecture research tool	简单分子结构分析工具
T2D	Type 2 diabetes	2 型糖尿病
USP	Ultraspiracle	超气门蛋白
WGA	wheat germ agglutinin	麦胚凝集素
λ PPase	lambda protein phosphatase	λ 磷酸酶

第一章 前言

1 激素调控昆虫的变态发育

昆虫属于无脊椎动物中的节肢动物，几乎遍布世界的每个角落，在动物界中其种类最多，数量最大，对农作物的生产造成重大影响，与人类关系密切。昆虫在其生长发育过程中存在明显的形态上的变化，依据形态变化的不同情况，可将昆虫分为完全变态类昆虫和不完全变态类昆虫。完全变态类昆虫的一生要经历卵、幼虫、蛹、成虫四个发育阶段，各阶段的形态变化较为显著，包括鳞翅目、膜翅目和双翅目等。不完全变态类昆虫的幼虫和成虫在体型和生活习性以及栖息环境方面都有着相似之处，包括直翅目、蜻蜓目和同翅目等。

昆虫的变态发育过程受多种激素的共同调节 (Kostal et al., 2017; Truman and Riddiford, 2019)。蜕皮激素的活性形式 20-羟基蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 可以起始幼虫的蜕皮过程以及幼虫-蛹-成虫的变态过程 (Zitnan et al., 2007)，在变态期间，20E 诱导细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)，包括凋亡和自噬，以及幼虫组织的重塑和成虫组织的形成 (Hay and Guo, 2006; Ryoo and Baehrecke, 2010; Yin and Thummel, 2005)。保幼激素 Juvenile Hormone (JH) 可以调控幼虫响应 20E 滴度，但是其抑制变态相关基因的激活，保持幼虫状态 (Riddiford, 1996)。胰岛素/胰岛素样生长因子信号 (insulin-like growth factor signaling, IIS) 控制细胞生长速率，细胞及身体大小等 (Edgar, 2006)。在黑腹果蝇的生长发育中，进食的营养物质可以促进全身组织的生长，还可以刺激大脑的中间神经分泌细胞 (medial neurosecretory cells, mNSCs) 产生胰岛素样肽 (insulin-like peptides, ILPs)，ILPs 激活 IIS-Target of rapamycin (IIS-TOR) 系统进而促进生长 (Das and Dobens, 2015; Koyama et al., 2013)。IIS 促进前胸腺 (prothoracic gland, PG) 中 20E 的合成负反馈调节细胞生长，最终使虫体停止摄食并开始变态 (Colombani et al., 2005; Layalle et al., 2008)。保幼激素 (JH)、保幼激素酯酶 (juvenile hormone esterase, JHE) 和促前胸腺激素 (prothoracicotrophic hormone, PTTH) 形成另一个负反馈环。幼虫的咽侧体 (corpora allata, CA) 产生 JH (Richard et al., 1989)，通过抑制 PTTH 的释放来抑制 20E 水平。当虫体生长达到临界体重时，由脂肪体和其他器官产生的 JHE

水平上升并降解 JH，进而释放 PTTH，引发蜕皮激素的产生，这反过来又抑制生长，停止进食导致变态发生（图 1.1） (Edgar, 2006)。因此，果蝇的生长及变态发育过程受到 20E，Insulin 和 JH 等多种激素的共同调控，各信号通路之间发生串扰，以调节生长和代谢 (Spindler et al., 2009)。

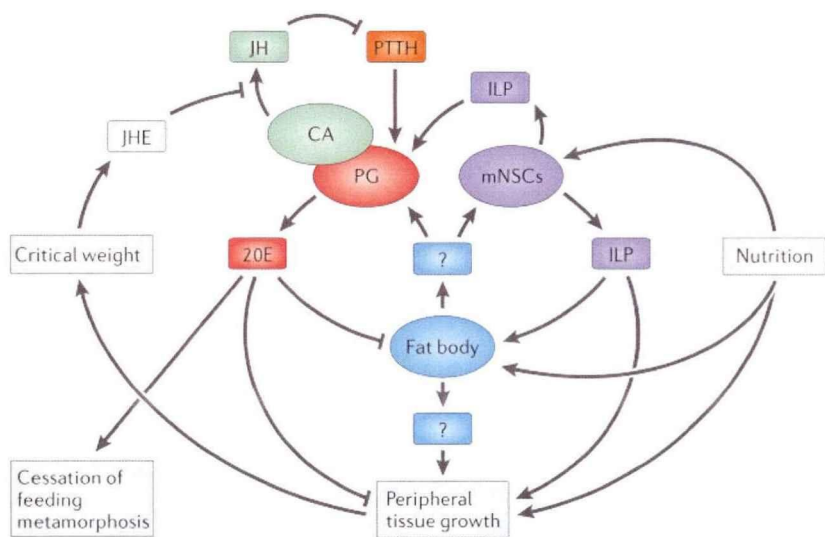


图 1.1 多种激素共同调控果蝇的生长发育 (Edgar, 2006)。
Figure 1.1 Multiple hormones involved in regulating growth and development in *D. melanogaster* (Edgar, 2006).

2 20E 作用机制及 20E 信号途径

2.1 蜕皮激素概述

类固醇是具有四环结构的亲脂性有机小分子，存在于植物、动物和真菌中。类固醇胆固醇是动物细胞膜的重要组成部分，在细胞膜上利于保持膜结构和流动性。大多数的类固醇起信号分子的作用，如激素 (Moss, 1989)。动物的类固醇激素有雌激素、雄激素、糖皮质激素、盐皮质激素以及孕激素。类固醇激素在人类和动物的各种生理过程中起着至关重要的作用，因此，了解类固醇激素的信号通路非常重要 (Zhao, 2020)。

昆虫的蜕皮激素属于类固醇激素，通常是由前胸腺（PG）合成，主要在两种脑神经分泌细胞分泌的促前胸腺激素（PTTH）和昆虫 ILPs 作用下影响其分泌 (Yamanaka et al., 2013)。分泌的蜕皮激素（Ecdysone, E）在周围组织中被蜕皮激素 20 单加氧酶（Ecdysone 20 monooxygenase, E20MO）在第 20 位碳原子上加羟基转化为活性 20E (Smith et al., 1983)。蜕皮激素的控制幼虫变态功能和甲状

腺激素能控制两栖动物的变态过程的功能有着许多的相似之处 (Brown and Cai, 2007; Tata, 2000), 如图 1.2A 所示, 蜕皮激素的水平在整个蜕皮期都很低, 但是在每个蜕皮期都有一个主要的峰值。由于蜕皮激素 20-单加氧酶在蜕皮期间被上调 (Tata, 2000), 因此蜕皮激素在峰值开始时占优势, 而 20E 在后来占优势。

蜕皮激素的脉冲对于新角质层的沉积是必需的。在蝗虫体内产生的三个胚胎角质层都与蜕皮激素的脉冲相关 (Lagueux et al., 1979)。缺失蜕皮激素生物合成酶的果蝇胚胎可以经历胚胎发生, 但是无法形成幼虫的表皮 (Rewitz et al., 2007)。

2.2 20E 的基因组信号途径

蜕皮激素 20E 可以通过自由扩散作用进入细胞, 进而与其核受体 EcR 结合, 激活 EcR 与超气门蛋白 USP 形成异源二聚体受体复合物 (Koelle et al., 1991; Yao et al., 1993; Yao et al., 1992)。这种异源二聚体复合物与蜕皮激素应答元件 (ecdysone response elements, EcRE) 的特定启动子序列结合来调节蜕皮激素应答基因如 Hormone receptor (HR3)、Broad 等的表达, 起始下游级联反应 (Zhao et al., 2004)。

2.2.1 20E 的核受体

动物类固醇激素通过与细胞内核受体结合来发挥作用 (Weigel and Moore, 2007), 例如, 雌激素与其核受体 ER α 和 ER β 结合, 蜕皮激素受体 EcR 和超气门蛋白 USP 均为核受体超家族的成员 (图 1.2B), 有典型的核受体结构特征-具有作为转录激活区的 N 末端 A/B 结构域、作为 DNA 结合区的 C 结构域、包含核定位信号的 D 结构域、作为配体结合区的 E 结构域和存在于 EcR 中的 F 结构域 (Moras and Gronemeyer, 1998)。DNA 结合区的保守性很高, 在 N 端 α 螺旋的内部, 存在由两个锌原子和四个半胱氨酸残基组成的锌指结构, 能够特异性识别蜕皮激素的效应元件 (EcRE)。EcR 存在不同的异构体, 其结构具有一定的相似性, 如都具有相同的 DNA 结合区以及配体的结合区, 但 EcR 不同异构体的 N 末端是不同的。在果蝇中, 存在 EcR 的三种异构体: EcRA、EcRB1 和 EcRB2, 这三种异构体有不同的表达模式, 例如: EcRB1 在果蝇幼虫发育的各阶段均有表达, 而 EcRA 则在即将进入变态期的末龄幼虫中表达 (Sullivan and Thummel, 2003; Talbot et al., 1993)。三种异构体发挥不同的功能, EcRA 可通过诱导 EcR-USP 结合的局部染色质重塑, 进而驱动变态的发生 (Uyehara and McKay, 2019)。

20E 能通过果蝇的三种 EcR 异构体调控其神经系统的凋亡 (Robinow et al., 1993)。在家蚕中, 存在 EcR 的三种异构体-EcRA、EcRB1 和 EcRB2 (Kamimura et al., 1997), 20E 可通过 EcRB1 诱导家蚕丝腺细胞的程序性死亡(Goncu and Parlak, 2009); 在烟草天蛾中, 有两种 EcR 的异构体-EcRA 和 EcRB1 (Fujiwara et al., 1995; Jindra et al., 1996), 20E 可以通过 PKC δ 磷酸化棉铃虫中的 EcRB1 第 468 位苏氨酸 (Chen et al., 2017), 促使 EcRB1 与 USP1 形成异源二聚体, 结合到 *HHR3* 启动子区域的效应元件 EcRE 上启动基因转录 (Liu et al., 2014a)。

昆虫超气门蛋白 USP 的序列与脊椎动物视黄醇类受体 (RXR) 序列相似, 具有与配体结合的残基, 可以与 RXR 类配体结合 (Bonneton et al., 2003)。EcR-USP 异源二聚体在细胞核中与 DNA 结合 (图 1.2C) (Riddiford et al., 2001), 介导蜕皮激素信号转导 (Yao et al., 1992)。在果蝇中只存在着一种 USP (Henrich et al., 1990), 烟草天蛾中有两种 USP 分别为 USP1 和 USP2 (Jindra et al., 1997), 在赤拟谷盗 (Tan and Palli, 2008)和埃及伊蚊 (Wang et al., 2000)中均存在两种 USP。在昆虫的生长发育过程中, USP 对于 EcR 发挥其生物学功能是必需的 (Hegstrom et al., 1998), 20E 通过诱导 USP 第 35 位丝氨酸磷酸化调控信号通路中基因的转录 (Wang et al., 2012)。在果蝇中, 突变 USP 后, 20E 信号通路受阻, 虫体不能正常蜕皮 (Oro et al., 1992), 并且抑制了 20E 信号通路中的基因转录, 导致幼虫中肠和唾液腺均不发生凋亡 (Hall and Thummel, 1998)。在棉铃虫中, 克隆到超气门蛋白 USP1 参与 20E 信号转导, EcRB1 与 USP1 能通过热休克蛋白与磷酸化的周期蛋白依赖性激酶 10 (CDK10) 形成转录复合体, 参与 20E 信号通路下游基因转录 (Liu et al., 2014a; Liu et al., 2013b)。

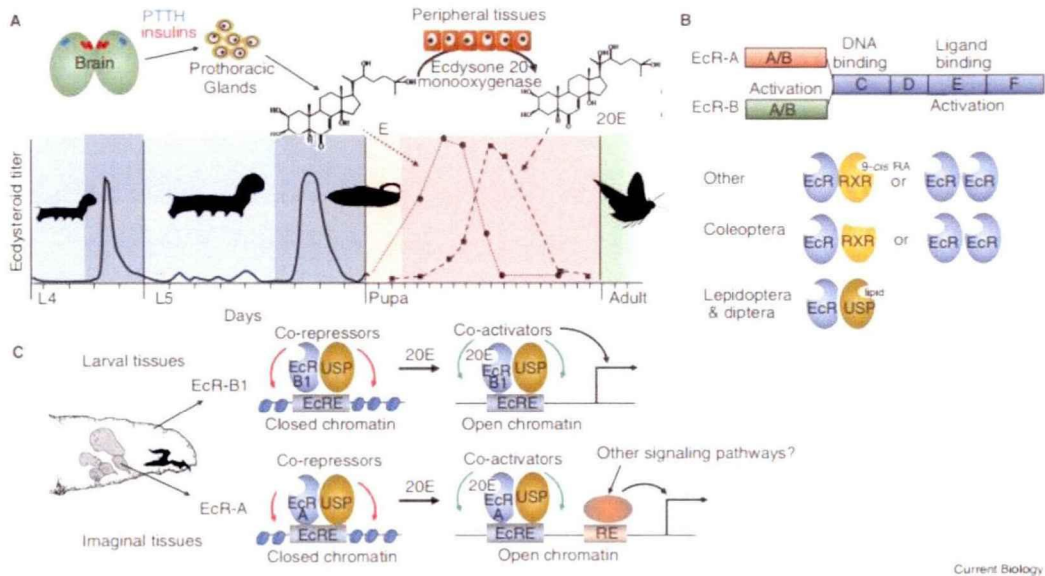


图 1.2 昆虫的蜕皮系统 (Truman, 2019)。(A) 蜕皮激素的合成与分泌及滴度变化, *Manduca sexta* 从幼虫到蛹的蜕皮激素滴度变化 (Bollenbacher et al., 1981; Warren and Gilbert, 1986)。(B) 蜕皮激素的核受体 EcR 以及 USP 的结构。(C) 果蝇中存在的两种 EcR 亚型; EcR-USP 复合物与其应答元件 (EcRE) 结合。

Figure 1.2 The ecdysteroid system of insects (Truman, 2019). (A) The synthesis and secretion of ecdysone (E) and the ecdysteroid titer from larva to pupae of *Manduca sexta* (Bollenbacher et al., 1981; Warren and Gilbert, 1986). (B) The structure of ecdysone nuclear receptor EcR and USP. (C) Two different EcR isoforms of *Drosophila*; the EcR-USP complex can bind to its response element (EcRE).

2.2.2 蜕皮激素的信号级联反应

昆虫的 20E 启动昆虫幼虫从一个龄期到下一龄期的蜕皮, 或从幼虫到成虫的变态蜕皮 (Gilbert et al., 2000; Riddiford et al., 2003)。与其他动物的类固醇激素类似, 属于脂溶性分子的 20E 可以自由扩散到细胞中, 然后与其核受体 EcR 结合, 在经典的基因组途径中发挥其对基因转录的作用, EcR 必须与 USP 相互作用, 形成异源二聚体转录复合物-EcR/USP (Oro et al., 1990)。这种复合物与蜕皮激素反应元件 EcRE 结合, 调节下游基因如 *HHR3*、*Broad* 等的转录 (Liu et al., 2014a; Riddiford et al., 2003)。

HR3 属于核受体超家族的成员, 20E 可以通过 EcR/USP 复合体结合到 *HR3* 启动子区域的 EcRE 序列调控其表达 (Liu et al., 2014a)。目前, 在多种昆虫中均发现 *HR3* 的存在。20E 依赖浓度变化调控果蝇 *DHR3* 的表达 (Koelle et al., 1992), 果蝇的 *DHR3* 还可以抑制转录因子 *Broad* 的转录过程 (Lam et al., 1997), 还可以上调转录因子 β -FTZ-F1 的表达调控昆虫的蜕皮变态, 蜕皮激素诱导的转录因子 *75B* (*E75B*) 又可以结合 *DHR3* 抑制 β -FTZ-F1 的转录 (Horner et al., 1995)。烟

草天蛾的 MHR3 与果蝇的 DHR3 有较高的序列相似性, MHR3 受 20E 的调控, 参与烟草天蛾蜕皮过程中 20E 引起的基因的激活和失活的级联反应 (Palli et al., 1992)。HHR3 对 20E 的功能很好地进行调控, 既可与 20E 结合进行正反馈调控, 促进基因转录和虫体变态发育, 又可以与 20E 结合进行负反馈调控从而终止 20E 信号转导。在棉铃虫中发现存在五种 HHR3 的异构体, 其中有四种可在蜕皮变态期发挥作用, 另外一种 HHR3 异构体的表达则在幼虫生长发育过程中没有显著变化 (Zhao et al., 2004)。

Broad 是一种具有锌指结构的转录因子, 它的 N 端区域具有一保守的氨基酸末端基序 (BTB 或 POZ 结构域), C 端有锌指结构域, 能结合 DNA (Bayer et al., 1997)。在多种昆虫中鉴定到 Broad 存在多种亚型, 如果蝇中有 6 种 (Moussian, 2010), 蜚蠊中有六种 (Dhadialla et al., 1998), 烟草天蛾中有 4 种 (Riddiford, 1976), 赤拟谷盗中有 5 种 (White and Ewer, 2014), 不同的亚型在虫体的不同发育阶段和组织中存在特异性表达 (Mugat et al., 2000)。在果蝇中, Broad 既可以激活蛹期特异表达的基因, 又可以抑制幼虫期和成虫期程序的发生 (Champlin and Truman, 1998; Moussian, 2010)。其中 Br-C 在表皮中特异表达促进多巴胺合成从而调控蛹期表皮的生长发育 (Sandstrom and Restifo, 1999), Brz-4 与幼虫期外表皮的形成相关 (Zhou and Riddiford, 2001)。Br-C 在烟草天蛾的变态时期应答 20E 的信号, 参与昆虫变态发育过程 (Zhou and Riddiford, 2001)。Br-C 在雌性成年蚊子的繁殖过程中发挥至关重要的作用 (Chen et al., 2004; Zhu et al., 2007)。埃及伊蚊中鉴定到 BrC 的四种异构体在卵黄发生中发挥着不同的功能 (Chen et al., 2004), BrC 的异构体能促进细胞凋亡, 并显著阻止卵黄发生 (Terashima and Bownes, 2006)。我们实验室鉴定到棉铃虫中的 BrZ7 参与 20E 信号通路, 20E 促进变态时期 BrZ7 的表达并使其维持非磷酸化状态, 从而促进昆虫的变态发育 (Cai et al., 2014c), 并且 BrZ7 能与热休克蛋白 90 (Hsp90) 相互作用调节 BrZ7 的稳定性并调控其在 20E 和 JH 信号通路中的功能 (Cai et al., 2014b)。

2.3 20E 的非基因组信号途径

动物类固醇激素可以通过与细胞内核受体结合发挥作用, 除此之外, 有研究发现动物类固醇还可以通过激活细胞膜上的受体引发胞内第二信使的快速变化, 这些快速的细胞反应不依赖于基因表达, 因此被称为非基因组反应, 以区

别于基于基因转录的基因组反应。例如，雌激素激活磷酸肌醇 3 激酶（PI3K），通过一种独立于激素基因组作用的机制将蛋白激酶 B（AKT/PKB）募集到哺乳动物的细胞膜上（Aronica et al., 1994）。孕烯醇酮是雄激素、雌激素、孕酮、盐皮质激素和糖皮质激素的前体（Nilius and Voets, 2008），通过核受体介导的基因组途径和瞬时受体电位（TRP）阳离子通道介导的非基因组途径调节基因表达（Aquila et al., 2004）。有研究证明有些 G 蛋白偶联受体（GPCRs）是孕酮受体（mPR α 、mPR β 、mPR γ 、mPR δ 和 mPR ϵ ）（Kasubuchi et al., 2017）。孕激素的细胞膜受体已经在脊椎动物中得到鉴定（Kasubuchi et al., 2017; Zhu et al., 2003）。雄激素通过细胞膜受体传递信号（Michels and Hoppe, 2008）。睾丸素通过一个可感应钙和氨基酸的 GPCR（GPRC6A）介导非基因组效应（Pi et al., 2010），雌激素受体 GPCR（GPR30）（Revankar et al., 2005），现被重命名为 G 蛋白偶联雌激素受体 1（GPER1）在细胞膜上传递雌激素信号（Maggiolini and Picard, 2010; Prossnitz and Maggiolini, 2009）。雌激素通过 GPERs 传递信号，激活表皮生长因子受体，促进女性生殖性癌症细胞的增殖（Filardo and Thomas, 2012）。

20E 还可以结合细胞膜上的受体起始某些非基因组信号途径，引起胞内一系列的生理效应例如胞内 Ca^{2+} 水平的快速变化以及蛋白质的快速修饰等（Kang et al., 2019; Losel et al., 2003）。20E 在基因转录前引发这些快速的非基因组作用的早期证据是在对家蚕前丝腺的研究中获得的。细胞质膜可以结合 [^3H] Pon A，这意味着有未知的膜受体存在（Elmogly et al., 2004），20E 通过未知的 GPCR 诱导家蚕丝腺细胞内 Ca^{2+} 的快速增加（Gorelick-Feldman et al., 2010）。在果蝇中鉴定到一种细胞膜受体 GPCR（dopamine/ecdy steroid receptor, DmDopEcR）可以传递 20E 信号，过表达 DmDopEcR 的 Sf9 细胞膜可以结合 [^3H] Pon A，20E 触发细胞内 Ca^{2+} 和环磷酸腺苷（cAMP）的快速增加，并诱导 ERK 的磷酸化（Srivastava et al., 2005）。*Agrotis ipsilon* 的 DopEcR 主要在神经系统中表达，AipsDopEcR 的表达与雄蛾性的行为有关（Abrieux et al., 2013）。20E 和多巴胺（DA）通过 AipsDopEcR 控制感知中枢神经系统的性信息素（Abrieux et al., 2014）。在棉铃虫中鉴定到 ErGPCR-1（Cai et al., 2014a）、ErGPCR-2（Wang et al., 2015）和 ErGPCR-3（Kang et al., 2021）参与 20E 的信号转导。在 20E 调控下，ErGPCR-1 的表达水平在蜕皮和变态期增加，ErGPCR-1 对 20E 途径基因的表达和幼虫的形态转变至关重要。ErGPCR-1 在棉铃虫表皮细胞系（HaEpi cells）中

的过度表达增加了 20E 途径相关基因的表达。20E 通过 ErGPCR-1 诱导 Ca^{2+} 水平的快速增加, 并促进钙调蛋白的核易位和磷酸化 (Cai et al., 2014a)。ErGPCR-2 具有和 ErGPCR-1 相似的功能, 例如调节细胞内 Ca^{2+} 水平的快速增加和 USP 的磷酸化 (Wang et al., 2015)。两者的主要区别是 20E 诱导 GRK2 的磷酸化并上膜, 使得 ErGPCR-2 磷酸化内吞从而脱敏 20E 信号 (Wang et al., 2015)。ErGPCR-3 通过结合 20E 并促进其进入棉铃虫细胞来传递 20E 信号。在幼虫中敲除 ErGPCR-3 导致延迟和异常化蛹, 抑制幼虫中肠和脂肪体的重塑, 并抑制 20E 诱导的基因表达。此外, 20E 诱导 ErGPCR-3 与 G 蛋白的相互作用以及细胞内 Ca^{2+} 、cAMP 和蛋白质磷酸化等的快速变化。ErGPCR-3 被 GPCR 激酶 2 介导的磷酸化作用而发生内吞, 并与 β -arrestin-1 和网格蛋白相互作用, 在 20E 诱导下终止 20E 信号。此外 20E 与 ErGPCR-3 结合并诱导 ErGPCR-3 同源二聚体形成同源四聚体, 增加 20E 进入细胞的量 (Kang et al., 2021)。使用 20E 酶联免疫分析 (20E-EIA) 证明棉铃虫细胞膜上的 ErGPCR-2 和 DopEcR 可以结合 20E。该研究还证明 20E 通过与多巴胺竞争结合 DopEcR, 阻断多巴胺信号途径, 并启动 20E 途径, 抑制幼虫取食促进变态的发生 (Kang et al., 2019)。

2.3.1 G 蛋白偶联受体家族

G 蛋白偶联受体家族是一大类膜蛋白受体家族的统称, 这些受体可感知神经递质、激素、生物胺、生长因子、光和气味等多种配体 (Bjarnadottir et al., 2006)。GPCR 感知外界刺激并将其传递到细胞内, 以调节各种生理过程包括认知、代谢、炎症、免疫力和细胞增殖 (Rasmussen et al., 2011)。根据序列和功能的相似性, G 蛋白偶联受体家族被分为六大类: A 类-类视紫红质受体; B 类-分泌素受体; C 类-代谢型谷氨酸/信息素受体; D 类-真菌性信息素受体; E 类-环 AMP 受体; F 类-Frizzled 受体 (Sadowski and Parish, 2003)。其中 A 类受体的种类数量繁多, 所以又可以被分为 19 个子类。2005 年, 有人提出一个新的 GRAFS 分类系统, 该分类系统将 GPCR 家族分为五大类: 代谢型谷氨酸受体, 类视紫红质受体, 粘连蛋白受体, 分泌素受体以及 Frizzled/味觉受体 (Schioth and Fredriksson, 2005)。在人类中, G 蛋白偶联受体家族分为四类: A、B、C 和 Frizzled (Lebon, 2020)。

经典的 GPCR 可充当鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEF), GEF 激活 G 蛋白触发核苷酸交换和水解, 从无活性的鸟苷二磷酸 (GDP) 结合形式依次转变为无核

苷酸的中间状态，然后到与 G 蛋白结合的有活性的鸟苷三磷酸（GTP）的连续构象状态转变过程中激活下游信号转导 (Lebon, 2020)。

2.3.2 G 蛋白偶联受体介导的 20E 信号转导

在棉铃虫中，ErGPCR-1、ErGPCR-2 和 ErGPCR-3 都属于 B 类分泌素受体，定位于细胞膜上，均可传递 20E 信号 (Wang et al., 2015)。相比之下，DopEcR 显示出与脊椎动物 GPCR A 类中的 ARs 的同源性 (Srivastava et al., 2005)。研究表明，ErGPCR-1、ErGPCR-2、ErGPCR-3 和 DopEcR 在组织中的差异表达和分布不同，均参与 20E 信号传导 (Kang et al., 2019)。

G 蛋白可以直接传递 GPCR 的信号 (Preininger et al., 2013)。在棉铃虫中，20E 可以诱导 G 蛋白的 α_q 亚基 ($G\alpha_q$) 发生磷酸化 (Ren et al., 2014)。 $G\alpha_q$ 位于棉铃虫的表皮细胞的细胞质内，在 20E 的诱导下，其向细胞膜迁移。20E 还可诱导 $G\alpha_q$ 蛋白激酶 C (PKC) 的磷酸化和膜转运。 $G\alpha_q$ 参与 20E 诱导的 Ca^{2+} 水平增加，并且在幼虫生长发育、变态以及 20E 信号途径基因表达过程中发挥着必不可少的作用 (Ren et al., 2014)。20E 通过 $G\alpha_q$ 、ErGPCR-1 和 Src 家族激酶介导磷脂酶 $C\gamma 1$ (PLCG1) 在 20E 信号通路中发挥功能。20E 介导 PLCG1 SH2 结构域的酪氨酸磷酸化，活化的 PLCG1 向细胞膜迁移，启动细胞内 Ca^{2+} 信号传导和钙通道控制的 Ca^{2+} 内流，从而触发 PKC 介导的 USP 磷酸化来调节 USP 与 EcRE 的结合，进而进行下游基因转录。这些发现说明 20E 通过 ErGPCR-1/ $G\alpha_q$ /PLCG1/ Ca^{2+} /PKC 非基因组信号途径调节基因组信号途径。

GPCRs 参与 20E 诱导的细胞内 Ca^{2+} 释放，导致 Ca^{2+} 感受器 STIM1 磷酸化和聚集。聚集的 STIM1 向质膜移动，与 Ca^{2+} 通道蛋白 Orail 相互作用，促使 Ca^{2+} 穿过细胞膜进入细胞质 (Chen et al., 2019)。20E 通过 ErGPCR-2 调节蛋白激酶 A 催化亚基 1 (PKAC1) 的磷酸化及其核易位，PKAC1 诱导环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (CREB) 磷酸化，使其结合环磷酸腺苷反应元件 (CRE) 以增强响应 20E 的基因转录 (Jing et al., 2016)。

GPCR 与其作用配体结合后被激活，而后又快速失活，此过程即为 GPCR 的脱敏过程，GPCR 的脱敏是一种反馈调节机制，以防止刺激过度引起的细胞信号紊乱 (Krupnick and Benovic, 1998)。棉铃虫中的三种 GPCR 脱敏机制有所不同，20E 诱导 β -arrestin 的磷酸化和细胞膜移位，迁移到细胞膜的 β -arrestin 与 ErGPCR-1 相互作用从而阻断 20E 信号传导 (Zhang et al., 2015)。20E 通过 PKC

诱导 G 蛋白偶联受体激酶 (GRK) 的磷酸化从而导致 GRK 向细胞膜移位, GRK 与 ErGPCR-2 相互作用, 磷酸化 ErGPCR-2 使其内吞, 终止 20E 信号传导 (Zhao et al., 2016)。ErGPCR-3 同源四聚体通过 GRK2 介导的磷酸化以及 β -arrestin-1 和网格蛋白的参与而发生内吞并降解从而使 GPCR 脱敏, 终止 20E 信号 (Kang et al., 2021)。

3 胰岛素及胰岛素信号途径

3.1 胰岛素概述

胰岛素是调节机体代谢过程的必不可少的激素, 在人中, 胰岛素由胰岛 B 细胞分泌, 是机体内唯一降血糖的激素, 能够促进细胞对葡萄糖的摄取和利用, 促进糖原合成, 抑制糖异生, 从而降低血糖。有研究发现, 胰岛素样肽也存在于多种昆虫中, 对于昆虫胰岛素样肽的研究始于家蚕, 在家蚕中发现的类胰岛素样肽-家蚕素, 是一种神经激素, 其与人类的胰岛素有着相似的结构 (Kondo et al., 1996)。胰岛素样肽是调节生长、繁殖、代谢和寿命等的较为保守的蛋白 (Bai et al., 2012)。果蝇中发现的胰岛素样肽 (DILPs), 分别在果蝇不同发育阶段及组织中发挥不同的功能 (Brogiolo et al., 2001)。在果蝇蛹期干扰胰岛素样肽, 导致成虫体重下降, 而过表达胰岛素样肽, 成虫体重显著上升, 这表明胰岛素样肽能促进虫体的生长 (Slaidina et al., 2009)。胰岛素及胰岛素生长因子信号通路与昆虫个体的生长速度息息相关 (Oldham and Hafen, 2003)。

3.2 胰岛素信号途径

胰岛素首先要与其受体胰岛素受体 (insulin receptor, INSR) 相结合才能发挥其生物学活性, INSR 结合胰岛素后发生自我磷酸化, 磷酸化的 INSR 使胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate, IRS) 磷酸化, 磷酸化的 IRS 与 PI3K (phosphoinositide 3-kinase) 相结合, 将磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 (phosphatidylinositol 4,5-diphosphate, PIP₂) 磷酸化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PIP₃)。PIP₃ 招募 AKT/PKB (protein kinase B) 和磷酸肌醇依赖性激酶-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1, PDK1) 上膜, PDK1 进而使 AKT 磷酸化, 磷酸化的 AKT 促进葡萄糖转运蛋白 (glucose transporter 4, GLUT4) 的质膜易位, 促进葡萄糖代谢 (Tilg and Moschen, 2008) (图 1.3)。

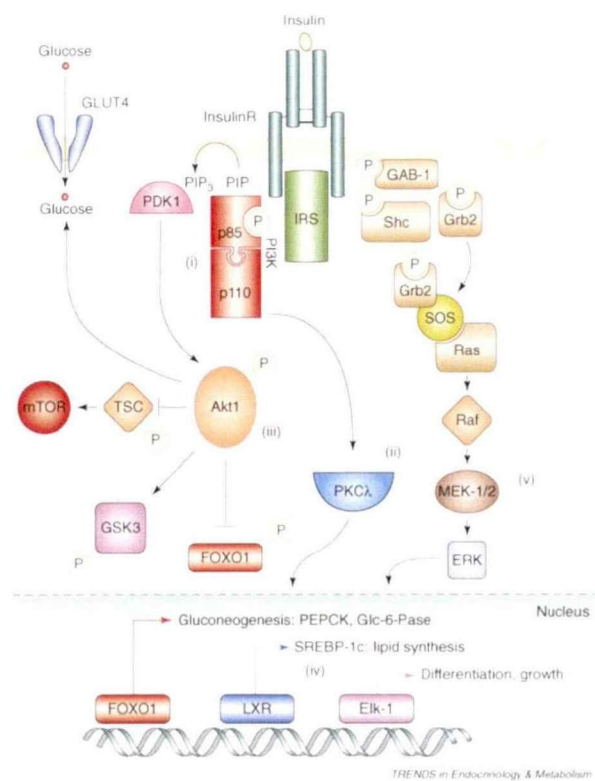


图 1.3 胰岛素信号通路 (Tilg and Moschen, 2008)。
Figure 1.3 Insulin signaling pathway (Tilg and Moschen, 2008).

3.2.1 胰岛素受体（INSR）

INSR 是一种受体酪氨酸激酶，通过与配体结合，调节葡萄糖、脂肪酸和蛋白质代谢以促进生长，在胰岛素途径中发挥重要作用 (Gabbouj et al., 2019)。INSR 是一种由二硫键连接的两个 α 亚基和两个 β 亚基组成的跨膜糖蛋白 (Mohammadiarani and Vashisth, 2016; Tatulian, 2015)。INSR 由 *Insr* 基因编码的蛋白质，在蛋白酶 furin 的作用下，将蛋白质切割成 α 亚基和 β 亚基，分别命名为 INSR α 和 INSR β (Bass et al., 2000)。INSR α 具有胰岛素结合位点，位于细胞膜外，INSR β 包含一个跨膜结构域和细胞内酪氨酸激酶元件 (Ebina et al., 1985)。胰岛素结合区位于 α 亚基而发挥酪氨酸激酶活性的活力区位于 β 亚基。

有研究表明，INSR 在生物体中的进化较为保守 (Petruzzelli et al., 1985)，在同翅目昆虫褐飞虱中发现了两种 INSR，它们控制着长翅和短翅的发育，INSR1 通过激活 PI3K/AKT 信号通路控制长翅表型，而 INSR2 则作为 INSR1/PI3K/AKT 信号通路的负调节因子发挥作用，调控短翅的发育 (Xu et al., 2015)。但在鳞翅目昆虫如家蚕，烟草天蛾及棉铃虫中仅比对到一种 INSR，调控虫体生长发育。

3.2.2 磷酸酶和张力蛋白同源物（PTEN）

PTEN 也称为 MMAC1 (mutated in multiple advanced cancer 1) 或 TEP1 (TGF-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) 是 PI3K/AKT 信号途径的负调节因子 (Goberdhan et al., 1999)。PTEN 作为一种双功能磷酸酶, 既具有脂质磷酸酶的活性又具有蛋白质磷酸酶的活性, 其脂质磷酸酶的功能可将 PIP3 去磷酸化为 PIP2, 进而阻断 PI3K/AKT 信号通路 (Chalhoub and Baker, 2009)。

3.2.3 FoxO (forkhead box O)

FoxO 在 IIS/PI3K/AKT 信号通路中发挥重要作用 (Brunet et al., 1999), 有研究发现, FoxO 可以通过升高氧化压力进而促进细胞凋亡 (Jacobs et al., 2003)。入核的 FoxO 在果蝇中能通过促进翻译抑制因子的表达进而抑制翻译的起始, 从而抑制虫体的生长 (Puig et al., 2003)。在棉铃虫中, 20E 诱导 FoxO 入核, 进而与其结合元件 FoxOBE 结合, 调控下游基因转录 (Cai et al., 2016)。

4 胰岛素与 20E 信号通路的相互作用关系

在昆虫中, 胰岛素样肽和 20E 相互作用共同调控虫体发育, 胰岛素样肽促进昆虫生长使虫体达到临界体重来促进 20E 的产生, 前胸腺变大, 产生更多的 20E 启动变态 (McBrayer et al., 2007; Mirth and Riddiford, 2007)。在果蝇的 PGs 中过表达 FoxO 延迟了蜕皮激素的生物合成和临界体重 (Koyama et al., 2014)。在棉铃虫中, 胰岛素样肽诱导 AKT 的磷酸化, 从而诱导 FoxO 的磷酸化, 磷酸化的 FoxO 定位于细胞质中, 然而, 20E 则抑制 AKT 的磷酸化, 从而导致 FoxO 不能被磷酸化并进入细胞核中诱导 20E 途径中下游基因的转录 (Cai et al., 2016)。此外, 高滴度的 20E 抑制 *Pdk1* 表达并抑制 AKT 和 FoxO 的磷酸化, 导致 FoxO 核定位以诱导自噬并抑制棉铃虫细胞增殖 (Pan et al., 2018)。这些研究表明, 胰岛素样肽途径与 20E 信号通路存在拮抗作用。

5 存在的科学问题和研究方案

GPCRs 是最大的细胞跨膜受体超家族, GPCRs 感知外部刺激并将其传递到细胞中以调节多种生理过程。已经发现 GPCR 在细胞膜上传递动物类固醇激素信号, 这在哺乳动物 (Maggiolini and Picard, 2010)、果蝇 (Srivastava et al., 2005)、家蚕 (Elmogy et al., 2004) 中均已得到证实。棉铃虫中鉴定到 ErGPCR-1 (Cai et al., 2014a), ErGPCR-2 (Wang et al., 2015), ErGPCR-3 (Kang et al., 2021) 以及 DopEcR (Kang et al., 2019) 均可以在 20E 信号传导中传递信号。这些研究表明, 多个 GPCRs 可以作为类固醇激素受体起作用, 然而, 除了已知的 GPCRs 外, 还有多

少 GPCRs 参与了 20E 信号传导尚不清楚。在 GPCR 介导的信号传导中有一个非常有趣的现象：多个 GPCRs 为同一配体传递信号 (Hauser et al., 2017)。为什么多个 GPCRs 共同参与同一信号通路，可能的假设是 GPCRs 在不同组织中发挥作用，诱导不同基因的表达。我们以世界性分布的重要鳞翅目农业害虫棉铃虫为研究对象，通过探究多个 GPCRs 的表达谱以及对 20E 途径中的下游基因 *HHR3*、*Pten*、*FoxO* 和调控昆虫生长发育的基因如 *BrZ7*、*Wnt*、*cMyc* 和 *Kr-h1* 的表达调控来验证这一假设，可以更好地揭示多种 GPCRs 参与 20E 信号途径的现象，丰富类固醇激素信号传导的新理论，为害虫防治提供新的理论依据和靶标基因。

胰岛素样肽促进前胸腺的生长和 20E 的产生，20E 反过来拮抗胰岛素样肽的功能，促进昆虫变态 (Mirth et al., 2005)。20E 可以通过调控一系列基因表达拮抗胰岛素途径，然而，20E 能否从源头上通过抑制胰岛素样肽的受体 INSR 的表达和磷酸化水平来拮抗胰岛素途径尚不清楚。为深入了解 20E 拮抗胰岛素途径的作用机制，我们利用鳞翅目昆虫棉铃虫作为模型，并结合本实验室所特有的表皮细胞系 HaEpi，采用各种分子生物学及细胞生物学技术，探究 INSR 在虫体不同发育时期的表达模式及翻译后修饰水平变化，并探索 20E 通过 INSR 拮抗胰岛素途径的分子机制，为进一步揭示胰岛素样肽和 20E 之间的相互作用关系提供新的理论支持。

第二章 GPCRs 在 20E 信号通路中调节不同基因的表达

1 引言

G 蛋白偶联受体 GPCRs 属于七次跨膜结构的受体家族, 这些受体可感知多种配体 (Bjarnadottir et al., 2006), 并将信号传递到胞内, 调节各种生理过程 (Rasmussen et al., 2011)。人类基因组中编码的 GPCR 序列有 1000 条左右 (Fredriksson and Schioth, 2005), 小鼠中的 GPCR 超过 1300 种, 除嗅觉受体和味觉受体外, 果蝇中存在 116 种经典的 GPCR (Hanlon and Andrew, 2015), 冈比亚按蚊中有 276 种经典 GPCR (Hill et al., 2002)。在细胞膜上传递信号调节机体内多种重要生理过程 (Marinissen and Gutkind, 2001)。因其在细胞信号转导中的重要作用, 约 34% 的药物靶向 108 种特定的 GPCR (Hauser et al., 2017)。GPCR 也被建议作为下一代杀虫剂的目标 (Audsley and Down, 2015)。

GPCR 可以在细胞膜上传递动物的类固醇激素信号。例如, GPCR30 (GPR30) 可以介导哺乳动物对雌激素的多种细胞反应 (Maggiolini and Picard, 2010)。DmDopEcR 介导果蝇 20E 的非基因组信号传导 (Srivastava et al., 2005), 其机制是 20E 与多巴胺竞争结合 DopEcR 使幼虫停止取食并促进变态的发生 (Kang et al., 2019)。在棉铃虫中, 可以响应 20E 信号的 ErGPCR-1 (Cai et al., 2014a)、ErGPCR-2 (Wang et al., 2015)、ErGPCR-3 (Kang et al., 2021) 以及 DopEcR (Kang et al., 2019) 在 20E 的非基因组信号传导中起重要作用。这些研究表明, 多个 GPCRs 起类固醇激素受体的作用, 除了已知的这些 GPCRs 外, 其他参与 20E 信号传导的 GPCRs 尚不清楚。

另外, 多个 GPCRs 可以传递同一配体的信号, 例如, 有九个 GPCRs 作为肾上腺素受体起作用, 五个 GPCRs 作为多巴胺受体起作用 (Hauser et al., 2017), 有三个 GPCRs 已被证实在棉铃虫 20E 信号通路中传递信号 (Zhao, 2020)。这些研究表明, 在同一信号转导途径中可以有多个 GPCRs 共同参与, 这可能是由于 GPCR 存在组织差异性表达, 或可以在同一信号途径中诱导不同基因的表达, 然而, 很少有证据支持这一假设。棉铃虫, 属于一种重要的鳞翅目农业害虫 (Wu et al., 2008)。我们以棉铃虫为研究对象, 通过从基因组中鉴定全部的 GPCRs, 并对它们进行分类, 探究不同类别中的 GPCRs 的表达谱以及对 20E 途径中的下游基因如 *HHR3*、*Pten*、*FoxO* 和调控昆虫生长发育的重要基因如 *BrZ7*、*Wnt*、*cMyc* 和 *Kr-h1* 的表达来验证这一假设。

我们在棉铃虫基因组中鉴定了 122 个编码经典 GPCRs 的基因（不包括不完整的基因序列），进一步研究确定了 6 个 GPCRs 传递 20E 信号转导，但这 6 个 GPCRs 对基因的表达调控不同，它们均参与 *HHR3* 的表达，其中有 4 个 GPCRs 参与幼虫化蛹，有 2 个 GPCRs- *PrRPR* 和 *Smo* 参与 20E-上调的 *Pten* 和转录因子 *FoxO* 的表达以及 *BrZ7* 的表达，*Htr* 和 *Akhr* 参与 *Kr-h1* 表达，*Fzd7* 调节 *Wnt* 和 *cMyc* 的表达从而调控幼虫生长，其中 *PRRPR* 能结合 20E。本研究对棉铃虫的 GPCR 进行了分类，并揭示了多个 GPCRs 传递 20E 信号的机制。

2 实验材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

本研究以重要的农业害虫鳞翅目昆虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 为研究对象，棉铃虫的幼虫在本实验室专业动物饲养室进行人工饲养，定期更换饲料，培养温度为 $26\pm1^{\circ}\text{C}$ ，湿度为 50% 左右，光照周期为 14 h 的光照/10 h 的黑暗。

2.1.2 实验细胞

将邵等人从棉铃虫的表皮组织中分离并传代培养的棉铃虫表皮细胞系 HaEpi (Shao et al., 2008)，置于含有 1/10 胎牛血清（FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国）的昆虫 Grace's 培养基中培养，静置于 27 度恒温培养箱中，定期为细胞更换培养基并及时传代培养，定期观察细胞状态包括有无细菌或支原体污染等。

2.1.3 实验试剂

20-羟基蜕皮酮（20E）（Caymanchem，密歇根州，美国），二甲基亚砜 DMSO（索莱宝，北京，中国），TRIzol RNA 提取试剂（全式金，北京，中国），5×All-In-One RT MasterMix 反转录试剂盒（abm，列治文，加拿大），2×SYBR real-time PCR pre-mixture（全式金，北京，中国），昆虫 Grace 培养基（Gibico，纽约，美国），胎牛血清（Biological Industries，以色列），氨苄青霉素（生工生物，上海，中国），4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）（西格玛公司，美国），Alexa Fluor594 标记的小麦胚芽凝集素（WGA）（Invitrogen，卡尔斯巴德，美国），20-Hydroxyecdysone Enzyme Immunoassay kit（20E-EIA kit，20-羟基蜕皮激素酶联免疫分析试剂盒）（贝尔坦制药，法国），其他试剂均购自于国药的分析纯试剂。NTPs、T7 RNA 聚合酶以及 RNA 酶抑制剂（赛默飞世尔，德克萨斯，美国），转染试剂 QuickShuttle-enhanced（博奥龙，北京，中国），T4 DNA

连接酶 (NewEngland Biolabs, 英国)。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G (IgG) (中杉, 北京, 中国), ACTB 单克隆抗体 (Cat. AC026, ABclonal, 武汉, 中国), GFP 单克隆抗体 (Cat. AE012, ABclonal, 武汉, 中国), 引物合成 (生工生物, 上海, 中国)。

2.1.4 实验仪器

PCR 仪 (北京君易仪器公司), 电泳仪 (北京六一仪器公司), Infinite M200PRO NanoQuant 分光光度计 (奥地利 Tecan 公司), 荧光定量 PCR 仪与 Gel Doc XR 凝胶成像仪 (美国伯乐公司), 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), 倒置荧光显微镜 (日本尼康公司), Olympus BX51 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 棉铃虫 GPCRs 的鉴定和系统发育分析

通过以下四个步骤鉴定棉铃虫的 GPCRs: 第一步, 依据文献中报道的果蝇和家蚕的全部 GPCRs, 分别从 FlyBase (<http://www.flybase.org/>)和 NCBI 序列库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取了果蝇 116 个经典 GPCRs 以及家蚕 90 个经典 GPCRs 的氨基酸序列。第二步, 分别将果蝇和家蚕的每个 GPCR 序列在棉铃虫蛋白质组中 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=OGP__29058__158185&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastn)进行 BLAST 比对并选择得分最高的氨基酸序列。第三步, 将这些得分最高的氨基酸序列再重新作为查询序列在棉铃虫蛋白质组中进行搜索, 以获得第二步中未找到的其他 GPCR 序列。第四步, 去除上述步骤中获得的蛋白序列中的重复序列, 最后通过 NCBI CD search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)及 SMART 在线软件 (https://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)预测这些蛋白质的结构, 获得包含七次跨膜结构域的蛋白质, 即为棉铃虫的 GPCRs。以人和果蝇不同类别的 GPCR 为路标, 利用 MEGA 6.0 软件构建 NJ 系统发育树。

2.2.2 RNA 提取

用解剖剪剪开棉铃虫的腹足并收集血细胞, 在体式显微镜下, 用解剖剪及镊子分离出棉铃虫的表皮、中肠、脂肪体和翅芽, 并于 $1 \times \text{PBS}$ (1.8 mM

KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl) 中漂洗干净。每 1 mL 提取剂 TRIzol 中加入 50 mg 组织并于冰上研磨, 12, 000 rpm 4℃离心 10 min。收集上清于新无 RNAase 的离心管中, 室温放置 5 min。提取细胞培养板中细胞的 RNA 时, 用 1×PBS 洗涤细胞, 每孔加入 1 mL TRIzol 置于冰上充分裂解细胞, 10 min 后吹吸裂解细胞并转移至新的无 RNAase 的离心管中。加入 200 μL 氯仿后剧烈震荡 15 s, 室温下静置 2 min, 12, 000 rpm 4℃离心 15 min, 将上层水相转移至新的无 RNAase 的离心管中, 后加入等量的提前预冷的异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温下放置 10 min 以沉淀 RNA, 12, 000 rpm 4℃离心 10 min, 弃上清, 用 1 mL DEPC 水配制的 75%的乙醇洗涤 RNA 沉淀, 7,500 rpm 4℃离心 5 min, 弃上清, 用无 RNAase 的枪尖吸干残留乙醇, 室温风干, 以彻底除去乙醇, 加入适量的 DEPC 水于 60℃金属浴中孵育 10 min 溶解 RNA, 用 Infinite M200PRO NanoQuant 分光光度计检测提取的 RNA 浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和纯度。

2.2.3 反转录合成 cDNA

利用 5×All-In-One RT MasterMix 反转录试剂盒 (abm 公司) 进行反转录合成 cDNA。反应体系如下:

RNA	2 μg
AccuRT Reaction Mix (4×)	2 μL
无 RNAase 的水	补至 8 μL
混匀 42℃孵育 2 min	
AccuRT Reaction Stopper (5×)	2 μL
5×All-In One RT MasterMix	4 μL
无 RNAase 的水	6 μL

25℃孵育 10 min, 然后 42℃孵育 30 min, 最后 85℃孵育 5 min。-20℃保存。

2.2.4 实时定量 PCR (qRT-PCR)

将稀释 6~8 倍后的反转录 cDNA 模板作为实时定量 PCR 模板, 引物见表 2.1, 反应体系如下:

引物 F (1 μM)	2 μL
引物 R (1 μM)	2 μL
2×SYBR real-time PCR pre-mixture	5 μL

稀释的 cDNA 模板

1 μ L

反应条件: 95°C 15 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 78°C 读板 2 s, 共 40 个循环, 65°C-95°C 分析熔解曲线, 间隔 0.5°C, 获取 Ct 值, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式 ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{T_{\text{实验组}}} - \Delta C_{T_{\text{对照组}}}$, $\Delta C_t = C_{T_{\text{基因}}} - C_{T_{\text{Actb}}}$, 棉铃虫 *Actb* 基因作为对照) 计算 mRNA 相对表达量。

2.2.5 双链 RNA (*dsRNA*) 的合成

RNA 干扰 (RNAi) 被广泛地用于蛾科的多个物种中 (Xu et al., 2016)。长片段的 *dsRNA* 在昆虫体内被分解成较小的片段 (Zamore et al., 2000), 并成功抑制了蠕虫中靶基因的表达 (Fire et al., 1998)。将 T7 启动子序列添加至引物序列的 5' 端 (表 2.1), 以 cDNA 为模板, 扩增相应的靶基因片段, 然后以带有 T7 启动子的靶基因片段为模板来合成 *dsRNA*。在 2 μ g cDNA 模板中加入 80 U T7 RNA 聚合酶, 2.4 μ L 10 mM 的 ATP/UTP/CTP/GTP 和 120 U RNasin (TaKaRa), 用无 RNase 的水补齐至 50 μ L, 在 37°C 水浴中孵育过夜, 加入 10 μ L DNaseI 及 10 μ L DNaseI Buffer, 用无 RNase 的水补齐至总体积 100 μ L, 37°C 水浴中孵育 1 h 降解 DNA, 用苯酚/氯仿萃取 RNA, 混合物用无 RNase 的水补齐至总体积 200 μ L, 加入相同体积的苯酚/氯仿饱和水, 9,000 $\times$ g 4°C 离心 15 min, 将上层水相转移到含有等体积氯仿的新离心管中, 再次离心, 将上清液转移到另一个新的离心管中, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 M 乙酸钠 (pH 4.0), -20°C 混合过夜, 收集沉淀, 用 DEPC 水配制的 75% 乙醇洗涤 *dsRNA* 沉淀, 7,500 rpm 4°C 离心 5 min, 弃上清, 风干, 以彻底去除残留的乙醇, 最后加入 50 μ L 的无 RNase 的水溶解。用 Infinite M200PRO NanoQuant 分光光度计检测 *dsRNA* 的浓度, *dsRNA* 的质量用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.2.6 虫体 RNA 干扰

用 1 $\times$ PBS 稀释 *dsRNA* 至 200 ng/ μ L, 取六龄 6 h 的幼虫置于冰上约 15 min 直到虫体不动为止, 用显微注射器从幼虫腹部第三腹足向前将 1 μ g *dsRNA* 注入幼虫体内 (小心操作, 不要碰到中肠), 间隔 24 h 注射一次, 第三次注射时, 将 1 μ g *dsRNA* 和 500 ng 20E 一起注入幼虫体内。每个实验组和对照组均不少于 30 只幼虫, 并进行三次生物学重复, 等量的 *dsGFP* 作为对照组。

2.2.7 虫体及细胞激素诱导

首先用 DMSO 将 20E (Cayman chemical) 溶解至 10 mg/mL, 用 PBS 稀释

胰岛素 (P3376-400IU, 碧云天) 至 100 ng/ μ L, 然后将不同浓度的 20E 和胰岛素分别注射到六龄 6 h 幼虫体内, 分别以 DMSO 和 PBS 作为对照。20E 的浓度梯度设置为 100, 200 和 500 ng, 胰岛素的浓度梯度设置为 1, 2 和 5 μ g。分别于 1, 3, 6, 12 和 24 h 注射 500 ng 20E 或 5 μ g 胰岛素。提取总 RNA 或总蛋白质进行 qRT-PCR 或蛋白质免疫印迹检测。用 5 μ M 20E 和 5 μ g 胰岛素分别处理棉铃虫表皮细胞 1, 3, 6, 12 和 24 h, 分别以 DMSO 和 PBS 作为对照。用不同浓度的 20E 和胰岛素处理细胞并培养 6 h, 以进一步在细胞系上证明 20E 和胰岛素对 INSR 的调控。

2.2.8 苏木精-伊红 (HE) 染色

用 PBS 漂洗幼虫中肠, 置于 4%多聚甲醛中, 在 4°C条件下固定过夜。将固定的组织交给专业公司 (中国武汉的 Servicebio) 进行 HE 染色。

2.2.9 过表达载体构建

将 *PrRPR* 和 *Smo* 基因的开放阅读框 (ORF) 序列插入到带有 IE 启动子的重组过表达载体 pIEx-4-GFP-His 中构建过表达质粒。用设计的特异性引物 (见表 2.1) 通过 PCR 扩增出 *PrRPR* 和 *Smo* 基因的 ORF 片段, 经酶切、连接后插入载体中, 通过细胞系过表达和测序验证构建的质粒 PRRPR-GFP 和 SMO-GFP。

2.2.10 细胞系过表达

提取大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 中的重组过表达质粒, 细胞经传代培养至六孔板中, 待六孔板的细胞密度达到 80%时进行转染。以其中一个孔为例, 在无菌离心管中加入 200 μ L 0.9%的 NaCl 溶液, 10 μ L QuickShuttle-enhanced 转染试剂, 3-5 μ g 过表达质粒, 混匀, 悬空滴加至六孔板中, 在 27°C培养箱中静置培养 48-72 h, 倒置荧光显微镜下观察发光效率, 进行后续实验。

2.2.11 免疫细胞化学

将在 24 孔板中培养的过表达 PRRPR-GFP 和 SMO-GFP 的 HaEpi 细胞用 1 $\times$ DPBS 洗涤三次, 避光条件下加入 4%多聚甲醛室温静置 10 min 固定细胞。弃掉多聚甲醛, 用 1 $\times$ DPBS 洗涤 3 次, 每次 3 min, 每孔加入 300 μ L 稀释的 Alexa Fluor 594 偶联 WGA 溶液 (1 $\times$ PBS 稀释 1000 倍), 避光条件下进行细胞膜染色, 静置 4 min 后, PBS 洗涤 6 次, 每次 5 min。加入终浓度为 1 μ g/mL 的 DAPI 溶液, 避光条件下进行细胞核染色, 静置 10 min 后, PBS 洗涤 6 次, 每次 5 min。用 80%的甘油进行封片, 用 Olympus BX51 倒置荧光显微镜 (Olympus Optical

Co., 东京, 日本) 观察图像。

2.2.12 20-羟基蜕皮激素酶免疫测定 (20E-EIA)

20E-EIA的原理是无标记物标记的游离的20E和Tracer (乙酰胆碱酯酶 (AChE) 所标记的20E) 对有限的20E抗体进行竞争性结合, 进而进行20E的检测。兔抗的20E抗血清和鼠抗兔的抗体包被的平板结合, 用20E-EIA试剂盒 (Bertin Pharma, 巴黎, 法国) 中的Wash Buffer洗涤包被板, 将Tracer和样品中的20E加入孔中, 4°C孵育过夜, Wash Buffer洗涤三次后, 加入Ellman试剂 (AChE和色原的酶促底物), 于室温振荡器上孵育1.5 h。Ellman试剂中的底物与Tracer相互作用, 形成黄色的化合物, 可吸收405 ~ 414 nm的光。通过分光光度计 (Infinite M200PRO NanoQuant) 检测颜色强度, 得到的光密度与结合到的AChE所标记的20E滴度成正比, 但与样品中的20E滴度成反比, 此方法用于检测细胞膜上的GPCR结合20E的滴度。

2.2.13 HaEpi细胞膜结合20E滴度检测

在HaEpi细胞系中分别过表达PRRPR-GFP和SMO-GFP, 用1×DPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄和8 mM Na₂HPO₄, pH7.4) 洗涤两次, 将细胞培养在1 μM 20E的Grace培养基中, 于27°C静置培养5 min, 收集细胞, 于1700×g 4°C离心5 min, 将细胞沉淀用500 μL EIA缓冲液进行重悬, 并超声处理5 min, 将破碎的细胞膜在4°C下, 以48, 000×g离心1 h, 用100 μL EIA缓冲液重悬沉淀。用50 μL EIA缓冲液溶解50 μg膜蛋白, 用20E-EIA试剂盒检测HaEpi细胞膜上结合的20E滴度。

2.2.14 统计方法

所有的数据来自至少三次的生物学独立重复实验。采用双尾 *t* 检验统计方法分析两个实验组之间的显著差异, * $p < 0.05$ 代表显著性差异, ** $p < 0.01$ 代表极显著差异, 三个及三个以上实验组之间的显著差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 不同的字母代表存在显著性差异 ($p < 0.05$)。

表 2.1 实验所用引物列表
Table 2.1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences 5'-3'
qRT-PCR	
<i>GPCR4</i> -F	tgactaacgctgaacccg
<i>GPCR4</i> -R	tcgttggtgtccgattgg
<i>Fshr</i> -F	gtgaacaatacgtcggttc
<i>Fshr</i> -R	cgtcttcgcacggattcagc
<i>Fzd7</i> -F	tactgtttaccctgggtatacttt
<i>Fzd7</i> -R	cgtcttctgttttagcgtgat
<i>Htr</i> -F	gaggaaagcggcgaataa
<i>Htr</i> -R	gtagcccagccacagcgag
<i>PrRPR</i> -F	gtcgtcttgacatccacag
<i>PrRPR</i> -R	ctccatcgtcttcatacacc
<i>Rya</i> -R-F	cgccaacgcgcatcactat
<i>Rya</i> -R-R	cacgccttcaggaaactc
<i>NPFR</i> -F	tccgctcctatacgggtggtt
<i>NPFR</i> -R	tcttctgctctttatcctc
<i>Smo</i> -F	ggtccgtgctttgggtaa
<i>Smo</i> -R	gccatcgtcgtatcgtga
<i>Akhr</i> -F	gacgaactgcctctggacat
<i>Akhr</i> -R	agcaccgtcaagttccctgt
<i>Galr3</i> -F	tcaacgctccgctccagacg
<i>Galr3</i> -R	cctaatagcacccgccaccac
<i>TkR86C</i> -F	gagaaaggtggtgaggatgt
<i>TkR86C</i> -R	gccaatagaagaagaggtag
<i>Fzd4</i> -F	cagtttggtgggtggtggtga
<i>Fzd4</i> -R	agtgaggagtggcggttgtt
<i>Opsin</i> -F	atcgcaaatccccttcccca
<i>Opsin</i> -R	tccttgcaacgccaatcact
<i>HHR3</i> -F	tcaagcacctcaacagcagcccta
<i>HHR3</i> -R	gactttgctgatgtcacctccgc
<i>Pten</i> -F	tctccacttctggttca
<i>Pten</i> -R	gtgtttatgctgcttatcc
<i>β-actin</i> -F	cctggattgctgaccgtatgc
<i>β-actin</i> -R	ctgttggaaggtggagaggga
<i>FoxO</i> -F	tcattaccaagccagcac
<i>FoxO</i> -R	tccatccagccgaagagt
RNAi	
<i>GFP</i> -RNAi-F	gcgtaatacgactcactatagggtggtcccaattctcgtggaac
<i>GFP</i> -RNAi-R	gcgtaatacgactcactataggcttgaagttgaccttgatgcc
<i>Fzd7</i> -RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggatacagttcaaggtgccg
<i>Fzd7</i> -RNAi-R	gcgtaatacgactcactataggatgaccaccaaagtctc
<i>Htr</i> -RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggcacctctgctgggatgg

<i>Htr</i> -RNAi-R	gcgtaatacgactcactataggaatgttttcgccgcttc
<i>PrRPR</i> -RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggacattcagcacaaccagc
<i>PrRPR</i> -RNAi-R	gcgtaatacgactcactataggcgaacgccttacggatt
<i>Smo</i> -RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggggaatctgttcgtgggt
<i>Smo</i> -RNAi-R	gcgtaatacgactcactataggcatcagggtagtcagtaggc
<i>Akhr</i> -RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggcataccgttgctgtccact
<i>Akhr</i> -RNAi-R	gcgtaatacgactcactatagggaagtcttgaaccacgcctc
<i>TkR86C</i> -RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggagtcgtgggaccatctca
<i>TkR86C</i> -RNAi-R	gcgtaatacgactcactatagggtatgtcacagccaggaac
Overexpression	
<i>PRRPR</i> -oex-F	tactcagagctcatgaccgacctatgggtt
<i>PRRPR</i> -oex-R	tactcagtcgaccagcgcagacacgatagg
<i>SMO</i> -oex-F	tactcacaattggatgaccccttggcgatgg
<i>SMO</i> -oex-R	tactcagtcgacgtcgaagctgaacttgac

3 实验结果

3.1 棉铃虫 GPCRs 的鉴定

为了探究 GPCRs 在传递 20E 信号中的作用，我们鉴定了棉铃虫基因组中的全部 GPCRs。分别用果蝇和家蚕的全部经典 GPCRs 在 NCBI 棉铃虫基因组数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=29058>)中一一进行 BLAST 比对，除不完整的基因序列外，共找到在棉铃虫基因组中注释的 122 个基因编码经典 GPCRs。除去 4 个具有较大序列差异的 GPCRs，用剩下的 118 个 GPCRs 构建系统发育树。通过系统发育分析，以人和果蝇的 GPCRs 为路标，根据 GPCRs 的分类 (Sadowski and Parish, 2003)，这些在基因组中命名的经典 GPCRs 分成三个大支：A 类（73 条序列）、B 类（24 条序列）和 C 类或 F 类（11 条序列）（图 2.1）。部分在基因组中注释并归类于 A、B、C 或 F 的 GPCRs，根据氨基酸序列构建的系统发育分析被重新归类为不同的类别。根据我们的系统发育分析，一些未在基因组中分类的 GPCRs 现在可被归为不同的类别。棉铃虫中传递 20E 信号的 DopEcR 属于 A 类，ErGPCR-1、ErGPCR-2 和 ErGPCR-3 属于 B 类。

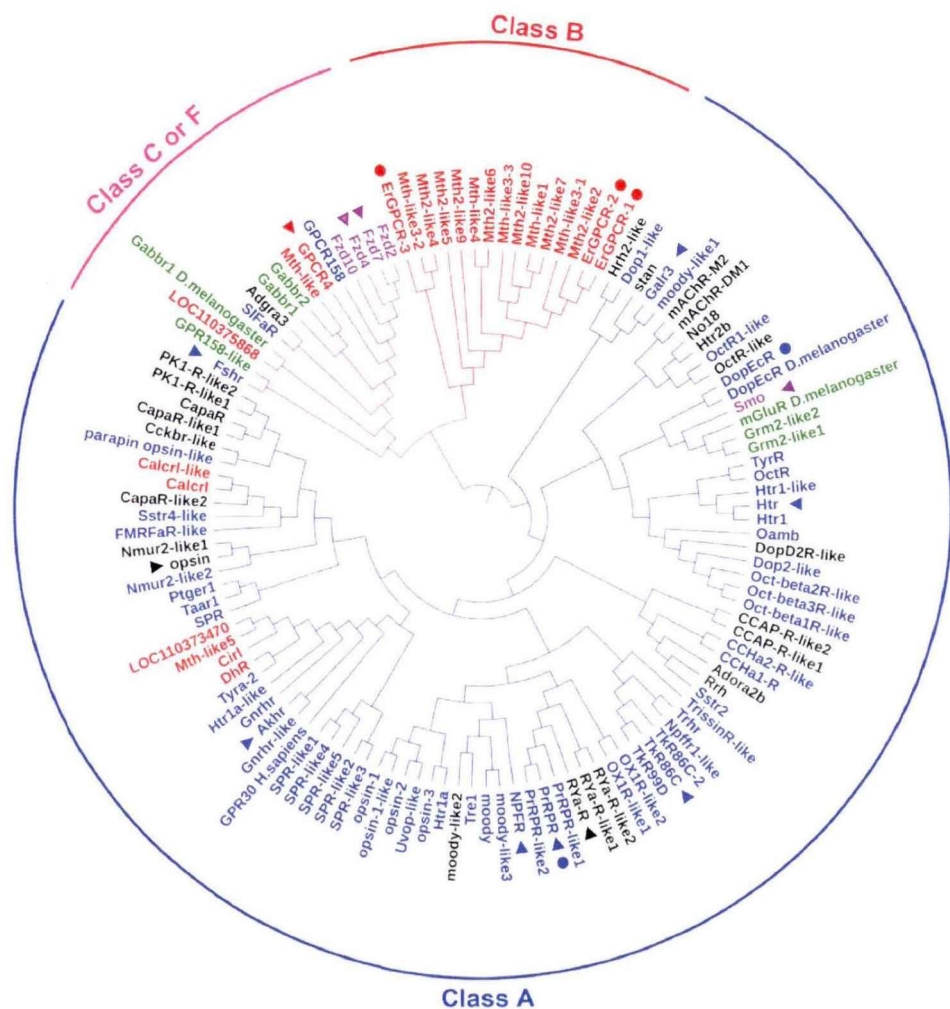


图 2.1 通过 MEGA 6.0 对棉铃虫经典 GPCRs 进行系统发育分析。蓝色名称表示已经在基因组中鉴定的属于 A 类的 GPCRs。红色名称表示在基因组中已鉴定的属于 B 类的 GPCRs。绿色名称表示在基因组中已鉴定的属于 C 类的 GPCRs。紫色名称表示在基因组中已鉴定的属于 F 类的 GPCRs。黑色名称表示在基因组中尚未鉴定分类的 GPCRs。三角形代表本研究所涉及的 GPCRs，圆圈表示我们实验室之前研究过的 GPCRs。

Figure 2.1 The phylogenetic analysis of classical GPCRs of *H. armigera* by MEGA 6.0 software. Names in blue color indicate GPCRs belonging to class A that has been identified in the genome. Names in red color indicate GPCRs belonging to class B that has been identified in the genome. Names in green color indicate GPCRs belonging to class C that has been identified in the genome. Names in purple color indicate GPCRs belonging to class F that has been identified in the genome. Names in black color indicate GPCRs that has not been identified in the genome. The triangle represents the GPCRs involved in this article, and the circle represents the GPCRs we studied before.

3.2 20E 信号通路中的 GPCRs 筛选

为筛选参与 20E 信号转导的 GPCRs，我们从本实验室测定的中肠转录组数据库变态期六龄 72 h 幼虫与取食期六龄 24 h 幼虫两倍差异表达的基因中筛选出 31 个 GPCRs。其中有 24 个 GPCRs 在变态期上调表达，有 7 个 GPCRs 在变态期下调表达（图 2.2）。

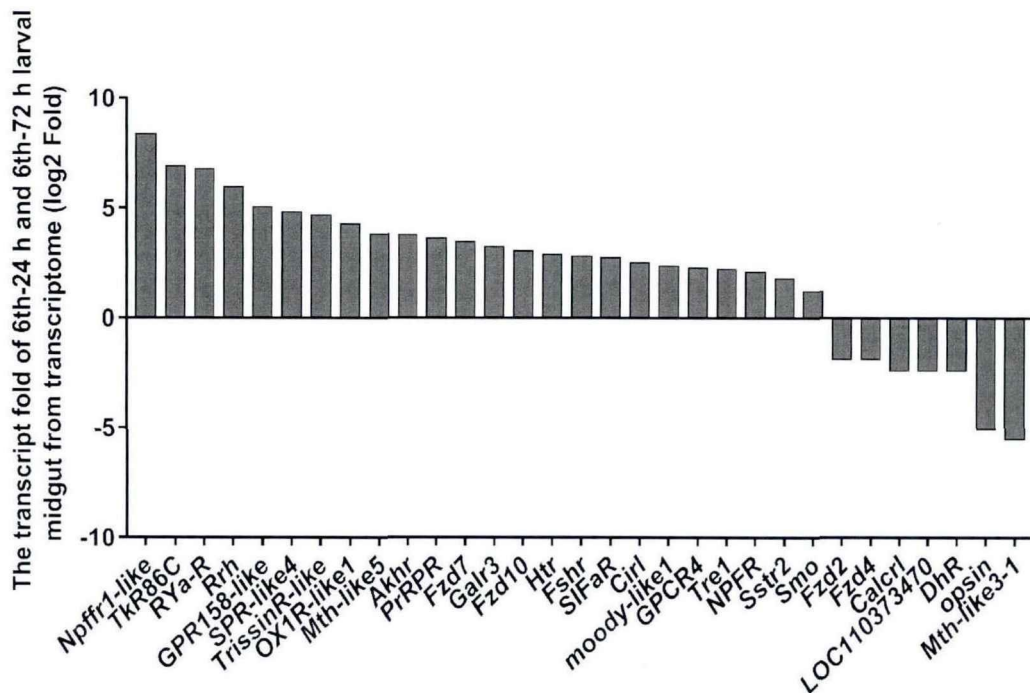


图 2.2 六龄 24 h 和六龄 72 h 幼虫转录组中 GPCRs 的转录倍数。纵坐标表示 log2 (六龄 72 h/ 六龄 24 h)。Npffr1-like (XP_021190007.1); Tkr86C (XP_021196600.1); RYa-R (XP_021201003.1); Rrh (XP_021185923.1); GPR158-like (XP_021190148.1); SPR-like4 (XP_021190551.1); TrissinR-like (XP_021196001.1); OX1R-like1 (XP_021190844.1); Mth-like5 (XP_021194305.1); Akhr (XP_021200810.1); PrRPR (XP_021184170.1); Fzd7 (XP_021189247.1); Galr3 (XP_021192151.1); Fzd10 (XP_021199754.1); Htr (XP_021189580.1); Fshr (XP_021199987.1); SIFaR (XP_021193313.1); Cirl (XP_021184781.1); moody-like1 (XP_021201565.1); GPCR4 (XP_021188434.1); Tre1 (XP_021189408.1); NPFR (XP_021189907.1); Sstr2 (XP_021194801.1); Smo (XP_021189185.1); Fzd2 (XP_021189976.1); Fzd4 (XP_021192380.1); Calcr1 (XP_021188050.1); LOC110373470 (XP_021186425.1); DhR (XP_021182085.1); opsin (XP_021189735.1); Mth-like3-1 (XP_021199338.1)。

Figure 2.2 The fold of GPCRs transcripts from the transcriptome of 6th-24 h larvae and 6th-72 h larvae. The ordinate indicates log2 (6th-72 h/6th-24 h). Npffr1-like (XP_021190007.1); Tkr86C (XP_021196600.1); RYa-R (XP_021201003.1); Rrh (XP_021185923.1); GPR158-like (XP_021190148.1); SPR-like4 (XP_021190551.1); TrissinR-like (XP_021196001.1); OX1R-like1 (XP_021190844.1); Mth-like5 (XP_021194305.1); Akhr (XP_021200810.1); PrRPR (XP_021184170.1); Fzd7 (XP_021189247.1); Galr3 (XP_021192151.1); Fzd10 (XP_021199754.1); Htr (XP_021189580.1); Fshr (XP_021199987.1); SIFaR (XP_021193313.1); Cirl (XP_021184781.1); moody-like1 (XP_021201565.1); GPCR4 (XP_021188434.1); Tre1 (XP_021189408.1); NPFR (XP_021189907.1); Sstr2 (XP_021194801.1); Smo (XP_021189185.1); Fzd2 (XP_021189976.1); Fzd4 (XP_021192380.1); Calcr1 (XP_021188050.1); LOC110373470 (XP_021186425.1); DhR (XP_021182085.1); opsin (XP_021189735.1); Mth-like3-1 (XP_021199338.1).

因转录组数据库仅测序一次，为验证转录组测序的结果，我们在虫体上进行进一步验证。从棉铃虫不同 GPCR 家族的在转录组变态期中肠高表达的这些 GPCRs 中选择了 11 个 GPCRs，以及两个变态期下调表达的 GPCRs (*Opsin* 和 *Fzd4*) 做对照，通过 qRT-PCR 探究它们在虫体不同发育阶段的表达模式，以找

出在变态期高表达的 GPCRs。qRT-PCR 结果显示，在表皮、中肠、脂肪体和翅四种组织中，GPCRs-F 家族的 *frizzled-7* (*Fzd7*)，A 家族的脂动激素受体 (*Akhr*) 和催乳素释放肽受体 (*PrRPR*) 均在变态期高表达 (图 2.3)。

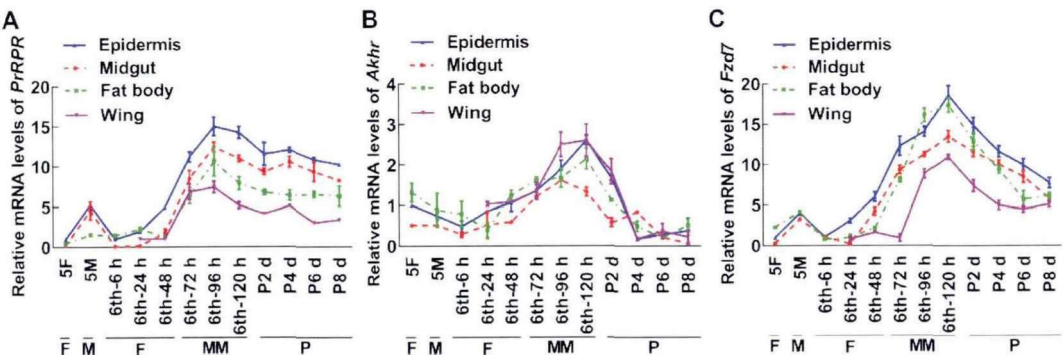


图 2.3 qRT-PCR 显示可能参与 20E 信号通路的 GPCRs 的表达谱。棉铃虫幼虫组织中 GPCRs 的 mRNA 水平。5F：五龄取食期的幼虫；5M：五龄蜕皮期的幼虫；6th-6 h 至 6th-120 h：六龄 6 小时到六龄 120 小时幼虫；P2 d-P8 d：蛹期第 2 天至第 8 天的蛹；F：取食；M：幼虫蜕皮；MM：蜕皮变态；P：蛹期。(A-C) *Fzd7*、*Akhr* 和 *PrRPR* 的 mRNA 相对表达量。以 β -actin 作为对照，误差线代表着三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.3 qRT-PCR showing the expression profiles of GPCRs probably involved in 20E signaling pathway. The mRNA levels of GPCRs in *H. armigera* larval tissues. 5F: fifth instar feeding larvae; 5M: fifth instar molting larvae; 6th-6 h to 6th-120 h: time stages of sixth instar larvae; P2 d-P8 d: 2 day to 8-day-old pupae; F, feeding; M, larval molting; MM, metamorphic molting; P, pupae stage. (A-C) The relative mRNA levels of *Fzd7*, *Akhr* and *PrRPR*. β -actin was regarded as control. All the experiments were performed in triplicate, and the bars indicate mean $\pm$ SD.

GPCR-F 家族的 *Smoothened* (*Smo*)、A 家族的 5 羟色胺受体 (*Htr*)、速激肽受体 (*Tkr86C*)、卵泡刺激素受体 (*Fshr*)、RYamide 受体 (*Rya-R*) 和神经肽 F 受体 (*NPFR*) 分别在某些组织的变态过程中高表达 (图 2.4)

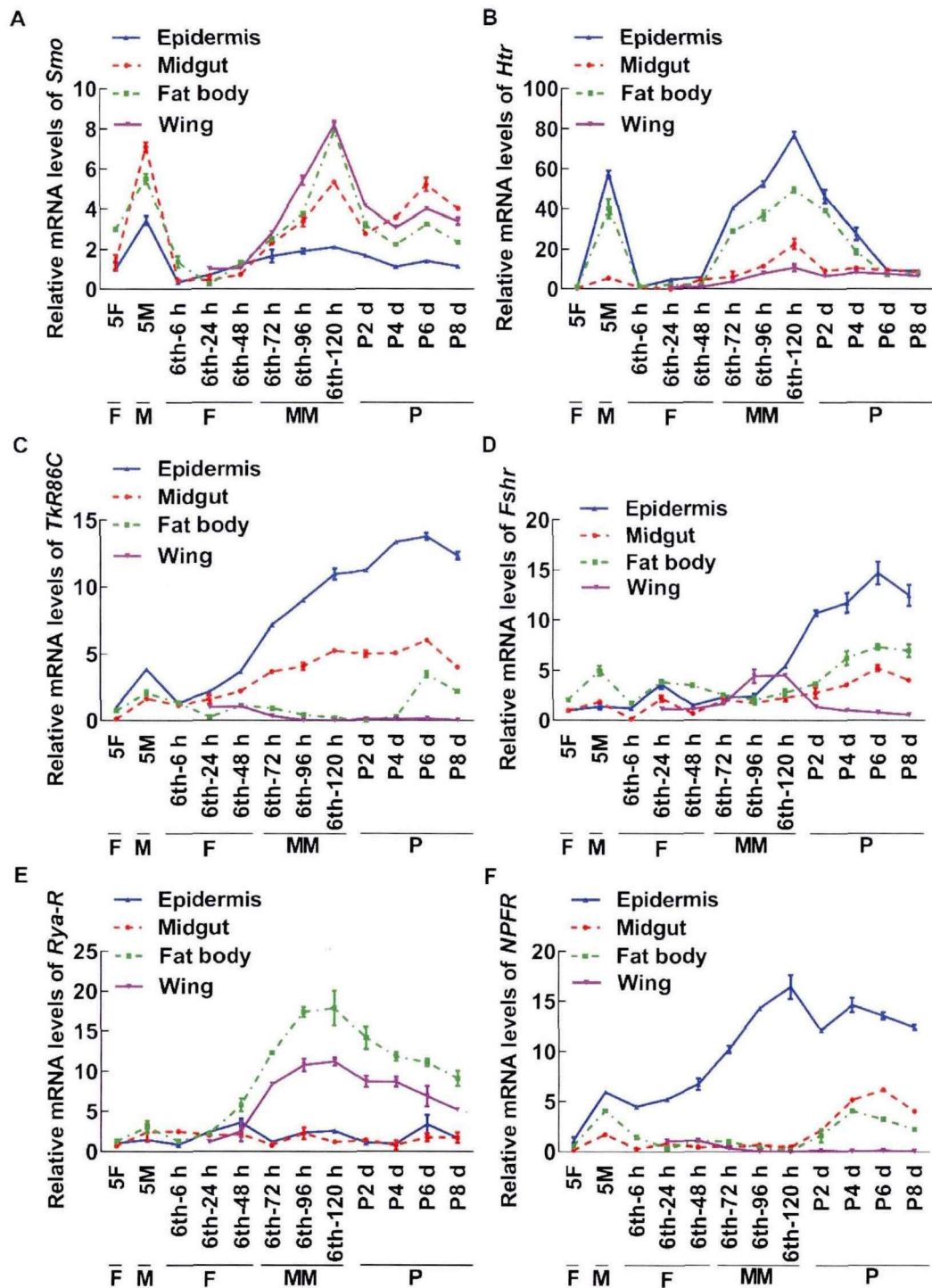


图 2.4 qRT-PCR 分析在各组织中差异表达的 GPCRs 的表达谱。棉铃虫幼虫中 GPCR 的 mRNA 水平。(A-F) *Smo*, *Htr*, *TrR86C*, *Fshr*, *Rya-R* 和 *NPFR* 的 mRNA 相对水平。以 β -*actin* 作为对照。误差线代表着三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.4 qRT-PCR showing the expression profiles of GPCRs differentially expressed in tissues. The mRNA levels of GPCRs in *H. armigera* larval tissues. (A-F) The relative mRNA levels of *Smo*, *Htr*, *TrR86C*, *Fshr*, *Rya-R* and *NPFR*. β -*actin* was regarded as control. All the experiments were performed in triplicate and the bars indicate mean $\pm$ SD.

A 家族中的甘丙肽受体 3 (*Galr3*) 在幼虫取食期 (六龄 6 小时到六龄 48 小时) 表达量较高 (图 2.5A), 归类于 B 家族中的基因组中未命名的蛋白 LOC110374861 (*GPCR4*) 没有表现出特殊的发育模式及组织差异的表达 (图 2.5B)。变态期下调表达的视紫红蛋白 Opsin (*Opsin*) 以及 F 家族中的 *Frizzled-4* (*Fzd4*) 均在幼虫取食期表达量较高 (图 2.5C 和 D)。

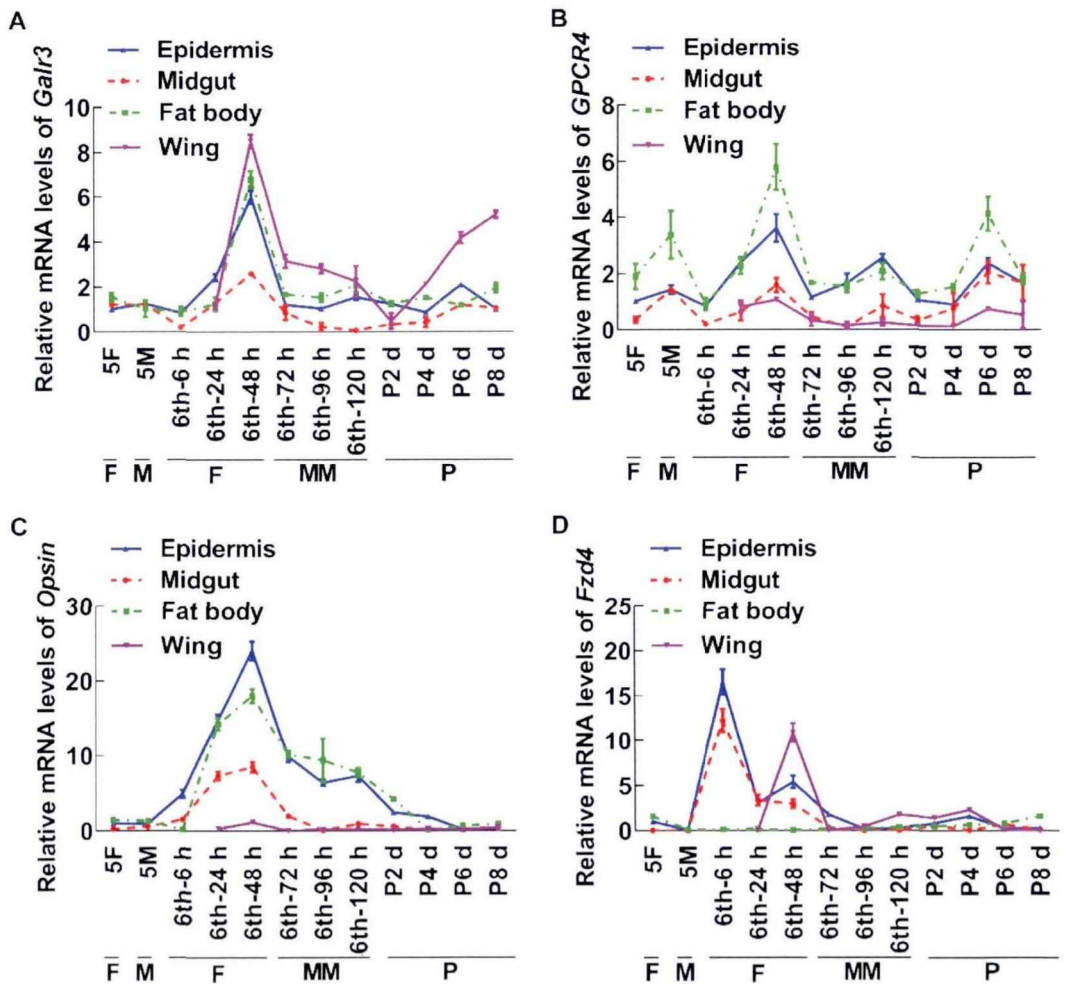


图 2.5 qRT-PCR 分析不在蜕皮变态期高表达的 GPCR 的表达模式。棉铃虫幼虫中 GPCR 的 mRNA 水平。(A-D) *Galr3*, *GPCR4*, *Opsin* 和 *Fzd4* 的 mRNA 相对水平。以 β -actin 作为对照。误差线代表着三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.5 qRT-PCR showing the expression profile of GPCRs that are not highly expressed during molting metamorphosis. The mRNA levels of GPCRs in *H. armigera* larval tissues. (A-D) The relative mRNA levels of *Galr3*, *GPCR4*, *Opsin* and *Fzd4*. β -actin was regarded as control. All the experiments were performed in triplicate and the bars indicate mean $\pm$ SD.

这些结果说明, 在中肠转录组变态期上调表达的 11 个 GPCRs 中检测到有 9 个 GPCRs 在蜕皮变态期的表达量较高, 并且有些 GPCRs 存在组织差异表达, 而另外两个并没有验证到它们在变态期的上调表达。在转录组变态期下调表达的两个 GPCRs 均在变态期下调表达。

3.3 20E 途径中不同的 GPCR 在调节幼虫生长发育中发挥不同的功能

针对变态期高表达的 6 个 GPCRs-PrRPR、Smo、Akhr、Htr、Fzd7 和 TkR86C，通过注射相应靶标基因的 *dsRNA* 进行 RNAi，进一步检测它们在调节幼虫生长和发育中的作用。首先注射 500 ng 20E 12 h 建立提前化蛹的模型（从六龄 0 h 到化蛹需要 111-115 h，比正常的化蛹时间 140 h 提前大约 24~30 h）。与注射 *dsGFP* 加 20E 的对照组相比，注射 *dsPrRPR* 加 20E 的实验组导致 63.3% 的幼虫延迟化蛹约 36 h（图 2.6A-C）。此外，实验组的中肠没有变红而对照组的虫体中肠变成红色（图 2.6D），变红的中肠代表细胞的程序性死亡（Hakim et al., 2010; Wang et al., 2007）。苏木精-伊红染色（HE 染色）显示注射 *dsGFP* 加 20E 的对照组的幼虫发生了中肠重塑，出现了成虫中肠，而注射 *dsPrRPR* 加 20E 的实验组未形成成虫中肠（图 2.6E）。

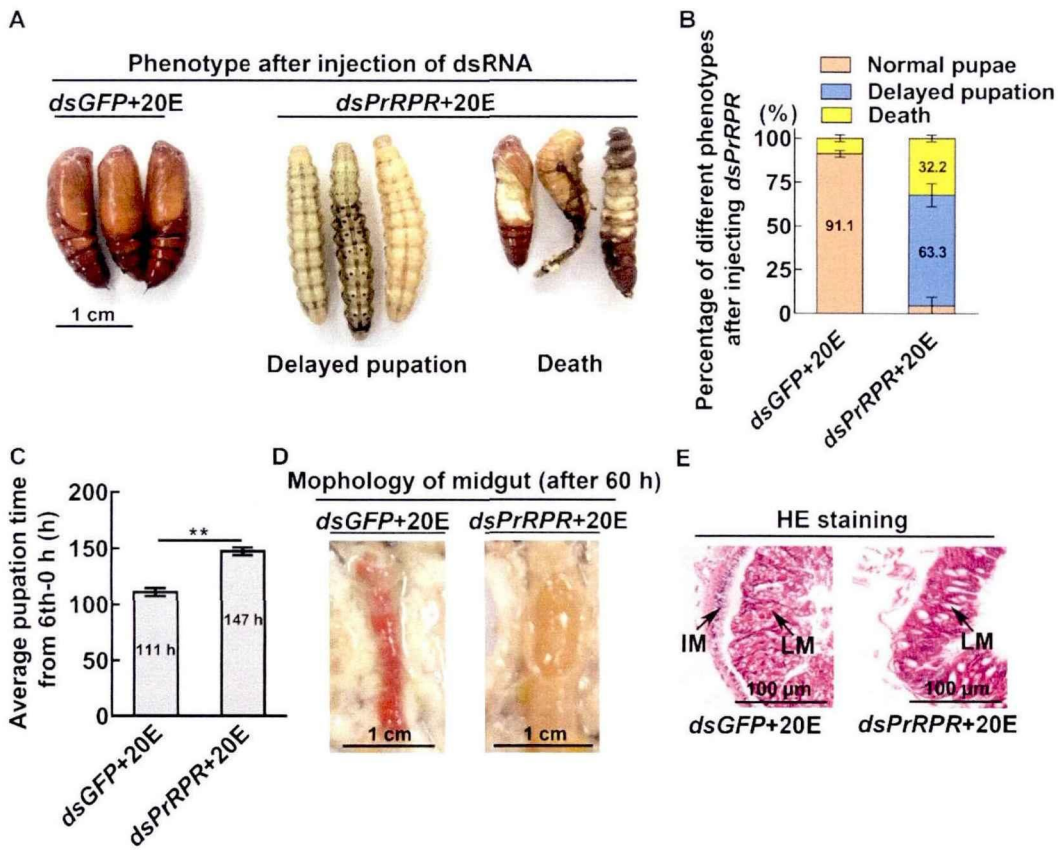


图 2.6 敲降 *PrRPR* 延缓了幼虫到蛹的转变。(A) 注射 *dsPrRPR* 或 *dsGFP* 后虫体的表型（第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中，间隔 24 h 注射一次，共注射三次，1 μ g *dsRNA*/幼虫），20E（500 ng/幼虫）。表型是在第一次注射 *dsRNA* 120 h 后获得的。比例尺=1 cm。(B) A 中虫体不同表型的百分比。(C) 从六龄 0 h 的幼虫发育至化蛹所需的化蛹时间的统计分析。(D) 第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察中肠的形态。(E) 第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察敲降 *PrRPR* 后中肠的 HE 染色。LM: 幼虫中肠；IM: 成虫中肠。HE 染色分析中肠横切面的形态。比例尺=100 μ m。用 *t* 检验进行显著性差异分析 (***p* < 0.01)。误差线代表着三次

生物学重复的平均值± SD。
Figure 2.6 Knockdown of *PrRPR* delayed larval-pupal transition. (A) Phenotypes after *dsPrRPR* or *dsGFP* injection (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1 μg *dsRNA*/larva), 20E (500 ng/larva). Images were obtained at 120 h after the first injection of *dsRNA*. Scale bar = 1 cm. (B) Percentages of the phenotype in A. (C) Statistical analysis of pupation time from 6th instar 0 h larvae developing to pupae. (D) The morphology of midgut was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. (E) HE-stained midgut after *PrRPR* knockdown was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. LM: larval midgut; IM: imaginal midgut. HE staining showed the morphology of the midgut. The bars represent 100 μm. The significant differences were calculated by Student's *t*-test (***p* < 0.01). The bars represent mean ± SD.

敲降*Smo*、*Akhr*、*Htr*后得到了类似的结果。与*dsGFP*+20E的对照组相比，有 53-65%的幼虫延迟化蛹约 24-43 h，在*dsGFP*+20E 的对照组幼虫发生重塑时，实验组中肠没有变红及重塑（图 2.7，2.8 和 2.9）。这些结果说明这些 GPCRs 在 20E 促进化蛹的过程中发挥作用。

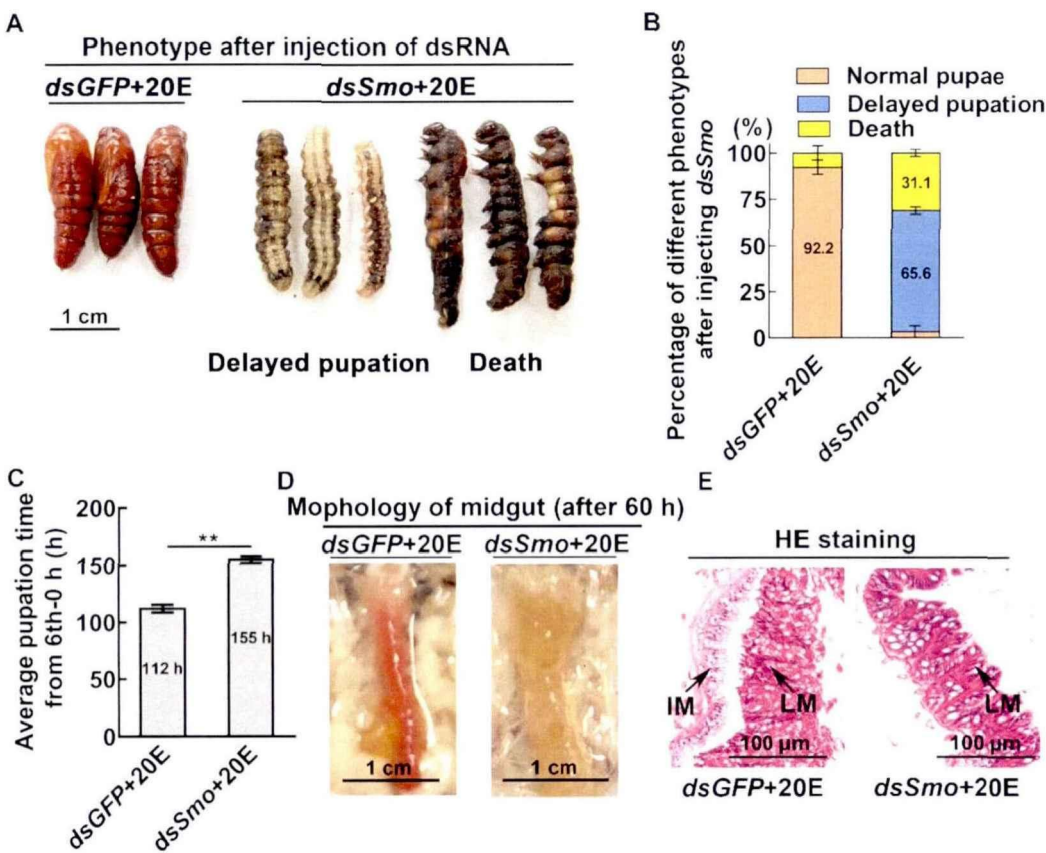


图 2.7 敲降 *Smo* 延缓了幼虫到蛹的转变。 (A) 注射 *dsSmo* 或 *dsGFP* 后虫体的表型（第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中，间隔 24 h 注射一次，共注射三次，1 μg *dsRNA*/幼虫），20E（500 ng/幼虫）。表型是在第一次注射 *dsRNA* 120 h 后获得的。比例尺=1 cm。 (B) A 中虫体不同表型的百分比。 (C) 从六龄 0 h 的幼虫发育至化蛹所需的化蛹时间的统计分析。 (D) 第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察中肠的形态。 (E) 第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察敲降 *PrRPR* 后中肠的 HE 染色。比例尺=100 μm。用 *t* 检验进行显著性差异分析 (***p* < 0.01)。误差线代表着三次生物学重复的平均值± SD。

Figure 2.7 Knockdown of *Smo* delayed larval-pupal transition. (A) Phenotypes after *dsSmo* or *dsGFP* injection (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1

μg *dsRNA*/larva), 20E (500 ng/larva). Images were obtained at 120 h after first *dsRNA* injection. Scale bar = 1 cm. (B) Percentages of the phenotype in A. (C) Statistical analysis of pupation time from 6th instar 0 h larvae developing to pupae. (D) The morphology of midgut was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. (E) HE-stained midgut after *PrRPR* knockdown was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. The bars represent 100 μm . The significant differences were calculated by Student's *t*-test (** $p < 0.01$). The bars represent mean $\pm$ SD.

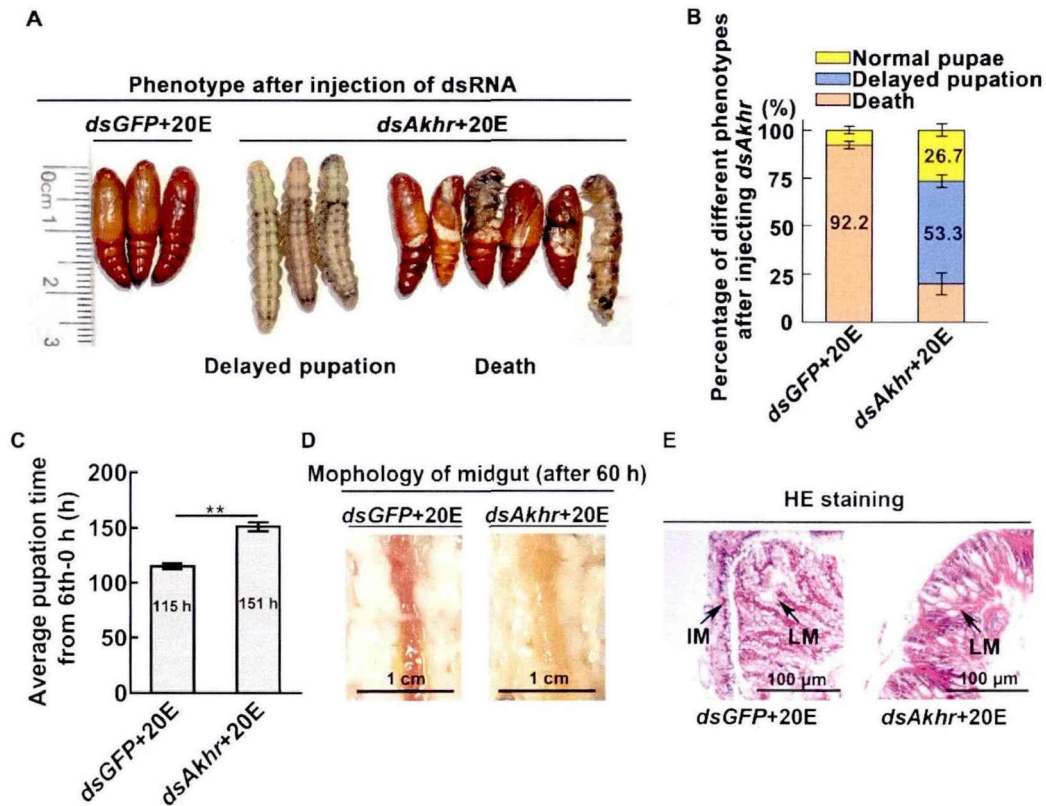


图 2.8 敲降 *Akhr* 延缓了幼虫到蛹的转变。 (A) 注射 *dsAkhr* 或 *dsGFP* 后虫体的表型 (第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中, 间隔 24 h 注射一次, 共注射三次, 1 μg *dsRNA*/幼虫), 20E (500 ng/幼虫)。表型是在第一次注射 *dsRNA* 120 h 后获得的。(B) A 中虫体不同表型的百分比。(C) 从六龄 0 h 的幼虫发育至化蛹所需的化蛹时间的统计分析。(D) 第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察中肠的形态。(E) 第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察敲降 *Akhr* 后中肠的 HE 染色。比例尺=100 μm 。用 *t* 检验进行显著性差异分析 (** $p < 0.01$)。误差线代表着三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.8 Knockdown of *Akhr* delayed larval-pupal transition. (A) Phenotypes after *dsAkhr* or *dsGFP* injection (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1 μg *dsRNA*/larva), 20E (500 ng/larva). Images were obtained at 120 h after first *dsRNA* injection. (B) Percentages of the phenotype in A. (C) Statistical analysis of pupation time from 6th instar 0 h larvae developing to pupae. (D) The morphology of midgut was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. (E) HE-stained midgut after *Akhr* knockdown was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. The bars represent 100 μm . The significant differences were calculated by Student's *t*-test (** $p < 0.01$). The bars represent mean $\pm$ SD.

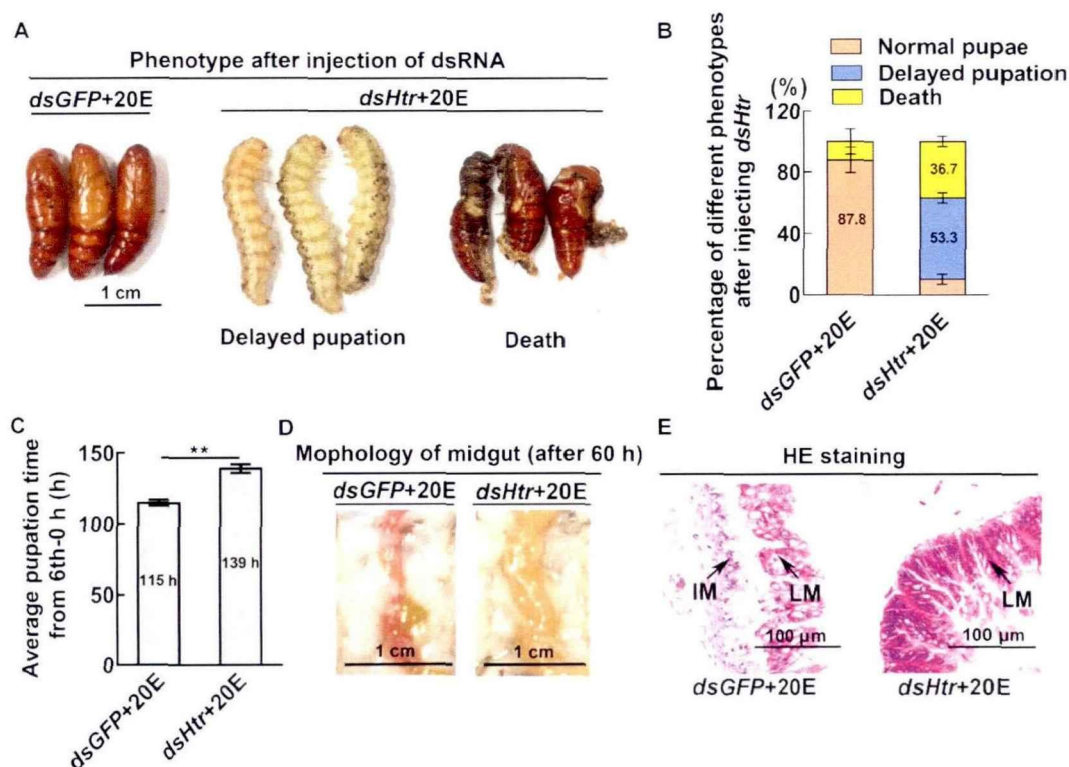


图 2.9 敲降 *Htr* 延缓了幼虫到蛹的转变并形成不正常的蛹。（A）注射 *dsHtr* 或 *dsGFP* 后虫体的表型（第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中，间隔 24 h 注射一次，共注射三次，1 μ g *dsRNA*/幼虫），20E（500 ng/幼虫）。表型是在第一次注射 *dsRNA* 120 h 后获得的。比例尺=1 cm。（B）A 中虫体不同表型的百分比。（C）从六龄 0 h 的幼虫发育至化蛹所需的化蛹时间的统计分析。（D）第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察中肠的形态。（E）第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察敲降 *Htr* 后中肠的 HE 染色。比例尺=100 μ m。用 *t* 检验进行显著性差异分析（***p* < 0.01）。误差线代表着三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.9 Knockdown of *Htr* delayed larval-pupal transition and induced abnormal pupae. (A) Phenotypes after *dsHtr* or *dsGFP* injection (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1 μ g *dsRNA*/larva), 20E (500 ng/larva). Images were obtained at 120 h after first *dsRNA* injection. Scale bar = 1 cm. (B) Percentages of the phenotype in A. (C) Statistical analysis of pupation time from 6th instar 0 h larvae developing to pupae. (D) The morphology of midgut was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. (E) HE-stained midgut after *Htr* knockdown was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. The bars represent 100 μ m. The significant differences were calculated by Student's *t*-test (***p* < 0.01). The bars represent mean $\pm$ SD.

然而，敲降 *Fzd7* 导致 57.8%的幼虫形成小蛹（图 2.10A 和 B）。*dsGFP+20E* 对照组的化蛹重量为 0.43 g，而 *dsFzd7+20E* 的实验组蛹的重量减轻至 0.29 g（图 2.10C）。与对照组相比，化蛹时间无显著差异（图 2.10D）。这些结果表明 *Fzd7* 对幼虫生长至关重要。此外，敲降 *TkR86C* 无异常表型的出现（图 2.11）。

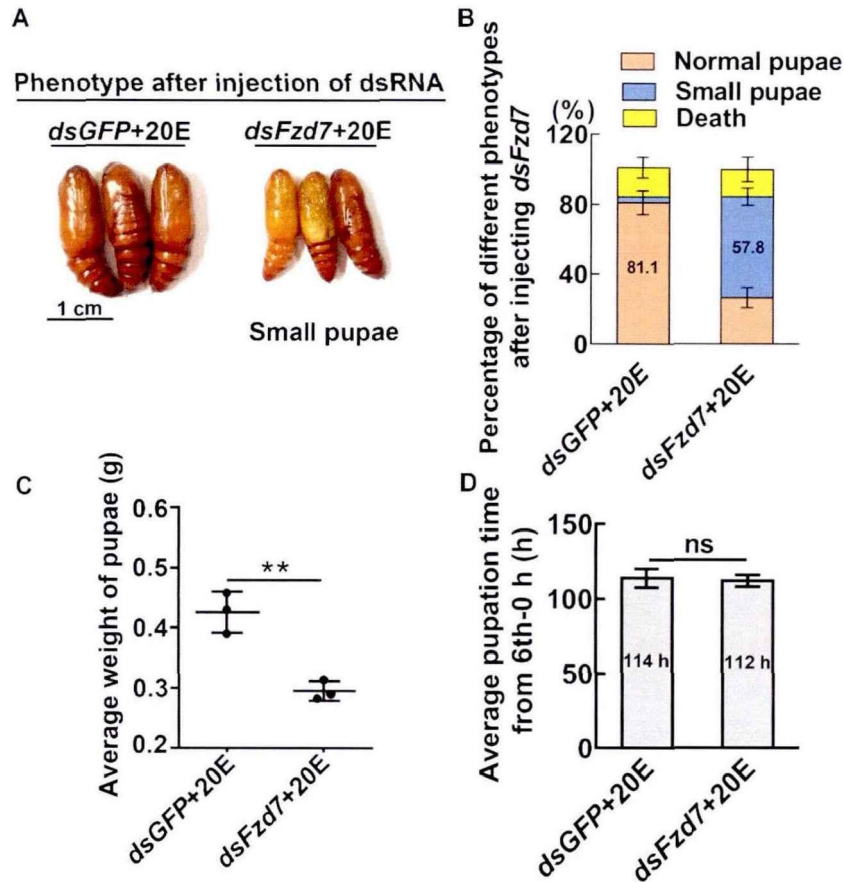


图 2.10 敲降 *Fzd7* 减轻了化蛹重量。(A) 注射 *dsFzd7* 或 *dsGFP* 后虫体的表型 (第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中, 间隔 24 h 注射一次, 共注射三次, 1 μ g *dsRNA*/幼虫), 20E (500 ng/幼虫)。表型是在第一次注射 *dsRNA* 120 h 后获得的。比例尺=1 cm。(B) A 中虫体不同表型的百分比。(C) 通过注射 *dsFzd7* 敲降 *Fzd7* 后, 对化蛹第一天的虫体进行单独称重计算平均重量, 并进行统计分析。(D) 从六龄 0 h 的幼虫发育至化蛹所需的化蛹时间的统计分析。用 *t* 检验进行显著性差异分析 (***p* < 0.01)。误差线代表着三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.10 Knockdown of *Fzd7* decreased body weight. (A) Phenotypes after *dsFzd7* or *dsGFP* injection (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1 μ g *dsRNA*/larva), 20E (500 ng/larva). Images were obtained at 120 h after first *dsRNA* injection. Scale bar = 1 cm. (B) Percentages of the phenotype in A. (C) Statistical analysis of average weight of a pupa at day one, by individually weighed, after *Fzd7* knockdown by injection with *dsFzd7*. (D) Statistical analysis of pupation time from 6th instar 0 h larvae developing to pupae. The significant differences were calculated by Student's *t*-test (***p* < 0.01). The bars represent mean $\pm$ SD.

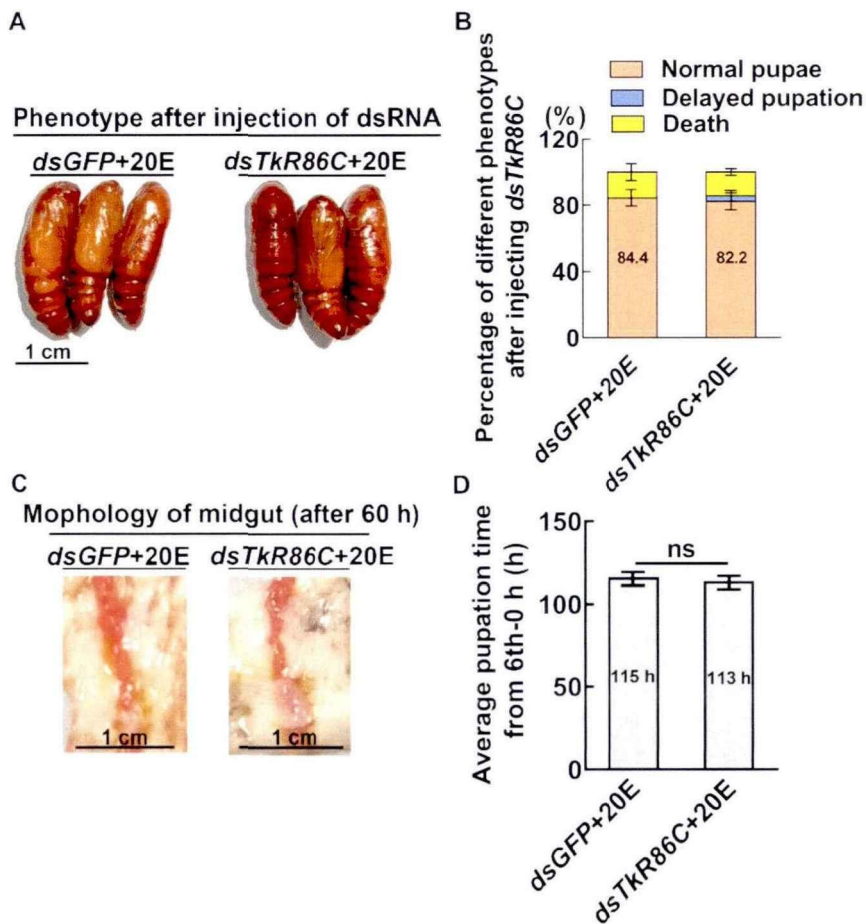


图 2.11 敲降 *TkR86C* 没有导致表型变化。(A) 注射 *dsTkR86C* 或 *dsGFP* 后虫体的表型 (第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中, 间隔 24 h 注射一次, 共注射三次, 1 μ g *dsRNA*/幼虫), 20E (500 ng/幼虫)。表型是在第一次注射 *dsRNA* 120 h 后获得的。比例尺=1 cm。(B) A 中虫体不同表型的百分比。(C) 第一次注射 *dsRNA* 60 h 后观察中肠的形态。(D) 从六龄 0 h 的幼虫发育至化蛹所需的化蛹时间的统计分析。用 *t* 检验进行显著性差异分析 (***p* < 0.01)。误差线代表着三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.11 Knockdown of *TkR86C* induced no changes in phenotype. (A) Phenotypes after *dsTkR86C* or *dsGFP* injection (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1 μ g *dsRNA*/larva), 20E (500 ng/larva). Images were obtained at 120 h after first *dsRNA* injection. Scale bar = 1 cm. (B) Percentages of the phenotype in A. (C) The morphology of midgut was observed 60 h after the first injection of *dsRNA*. (D) Statistical analysis of pupation time from 6th instar 0 h larvae developing to pupae. The significant differences were calculated by Student's *t*-test (***p* < 0.01). The bars represent mean $\pm$ SD.

对这些 GPCRs 的 RNAi 效率及脱靶效应进行检测发现, 除了敲降 *Htr* 降低了 *Smo* 和 *Fzd7* 的表达水平外, 其他的 GPCRs 均未出现脱靶效应 (图 2.12)。总之, 20E 信号通路中不同的 GPCRs 在调节幼虫生长和发育中发挥着不同的作用。

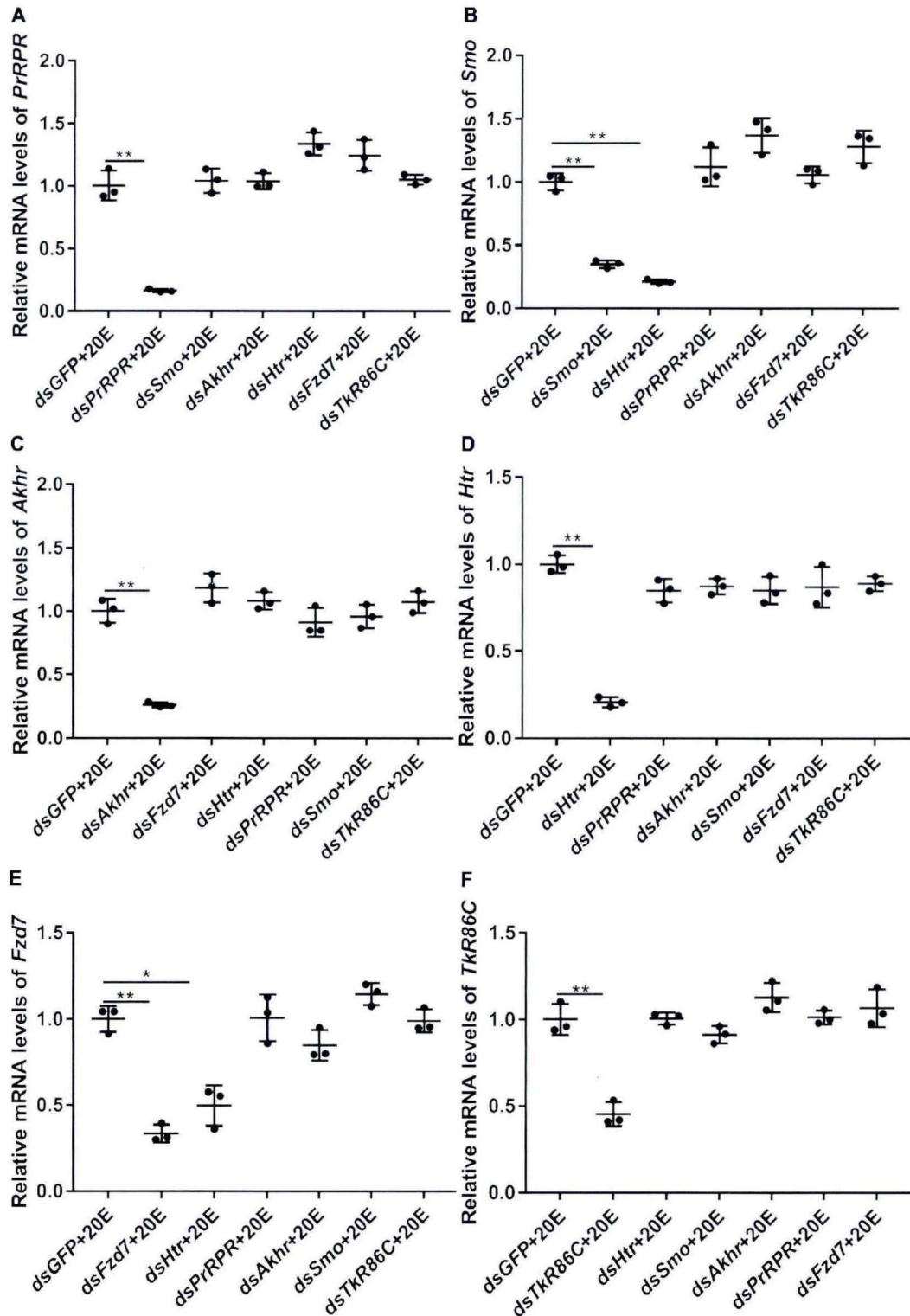


图 2.12 qRT-PCR 分析敲降 GPCR 后的脱靶检测。(A-E) 敲降 *PrRPR*、*Smo*、*Akhr*、*Htr*、*Fzd7* 和 *TkR86C* 后这 6 个 GPCRs 的相对 mRNA 水平。实验进行了三次生物学重复，用 *t* 检验进行显著性差异分析 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。误差线代表三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.12 qRT-PCR showing the off-target examination after knocking down GPCRs. (A-E) The relative mRNA levels of *PrRPR*, *Smo*, *Akhr*, *Htr*, *Fzd7* and *TkR86C* after knocking down the 6 GPCRs. The experiments were performed in triplicate and the significant differences were calculated by Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). The bars represent mean $\pm$ SD.

3.4 不同的 GPCRs 在 20E 信号传导中调节不同的基因表达

为了探究在相同的配体（20E）信号传导中多个 GPCRs 的差异，我们进一步分析了 6 个 GPCRs 在 20E 调节 *HHR3*、*Pten* 和 *FoxO* 表达中的作用。qRT-PCR 结果显示在幼虫中肠中这 6 个 GPCRs 被 20E 上调。*HHR3*、*Pten* 和 *FoxO* 也被 20E 上调。RNAi 敲除幼虫的 GPCRs 后，*HHR3* 的 mRNA 水平下降，这说明这些 GPCRs 在 20E 信号传导中起作用。然而 *Pten* 和 *FoxO* 的表达水平仅在 *PrRPR* 和 *Smo* 敲除后下降（图 2.13A 和 B），而在 *Akhr*、*Htr*、*Fzd7* 和 *TkR86C* 敲除后与对照组 *dsGFP*+20E 相比没有变化（图 2.13C-F）。这些结果表明 20E 通过不同的 GPCR 调控不同的基因表达。

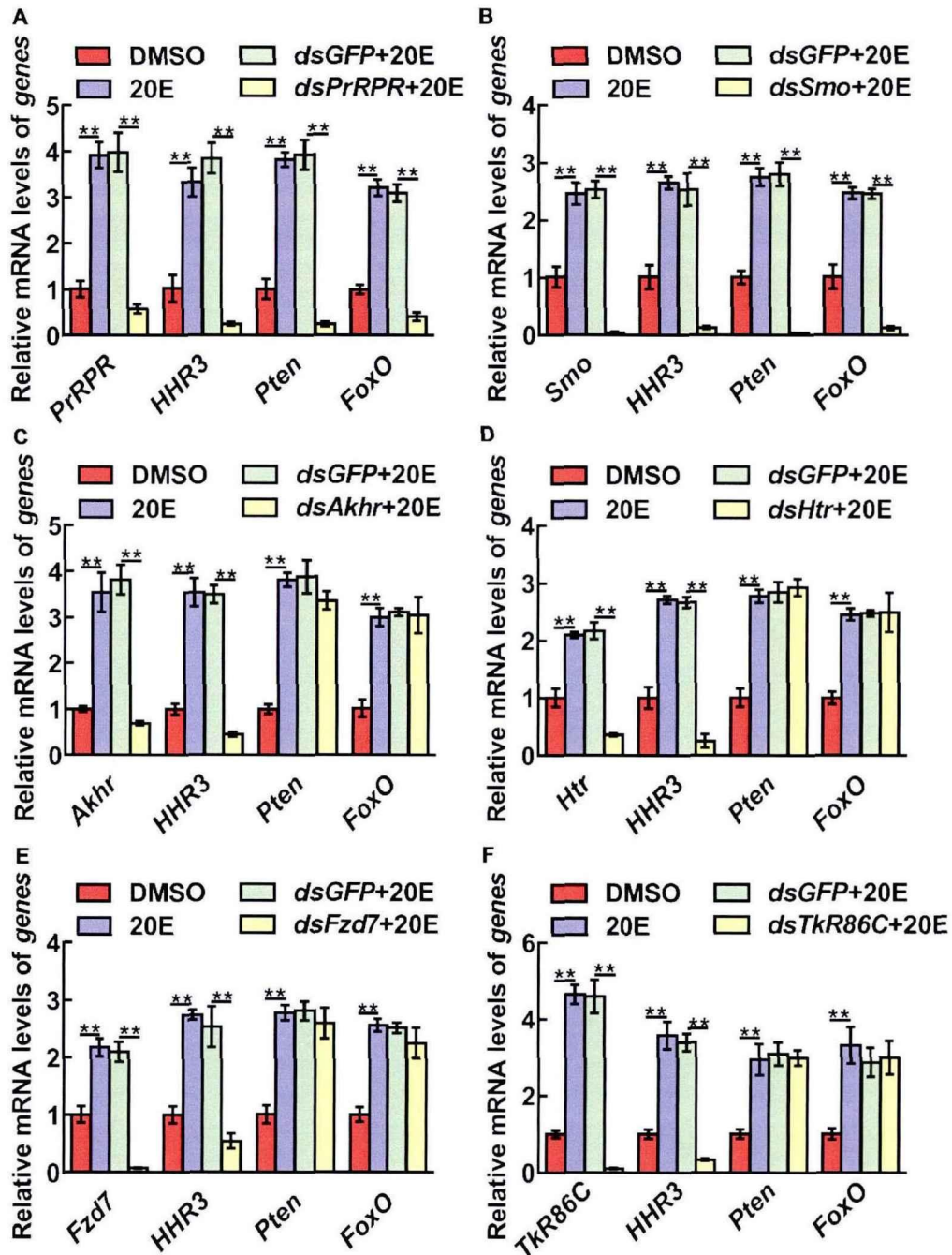


图 2.13 qRT-PCR 分析敲降 GPCR 后基因的 mRNA 水平。(A-F) *PrRPR*、*Smo*、*Akhr*、*Htr*、*Fzd7* 和 *TkR86C* 的干扰效率以及在六龄 72 h 幼虫中肠中 *HHR3*、*Pten* 和 *FoxO* 的转录水平（第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中，每隔 24 h 注射一次，共注射三次，1 μ g *dsRNA*/幼虫）。500 ng 20E 刺激 12 h，DMSO 作为溶剂对照。实验重复了三次，用 *t* 检验进行显著性差异分析（**p* < 0.05；***p* < 0.01）。误差线代表三次生物学重复的平均值 ± SD。

Figure 2.13 qRT-PCR showing the relative mRNA levels of genes after knocking down GPCRs. (A-F) The efficacy of GPCRs-*PrRPR*, *Smo*, *Akhr*, *Htr*, *Fzd7* and *TkR86C* knockdown and transcript levels of *HHR3*, *Pten* and *FoxO* in 6th-72 h larval midgut after these GPCRs knockdown (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1 μ g *dsRNA*/larva). 20E (500 ng/larva) for 12 h. DMSO was used as the solvent control. All the experiments were performed in triplicate, and significant differences were calculated by Student's *t*-test (***p* < 0.01). The bars indicate mean ± SD.

为了进一步验证这一结论，我们也检测了之前报道的传递20E信号的GPCR，ErGPCR-1、ErGPCR-2、ErGPCR-3 和 DopEcR 对于不同基因表达的调节作用。结果表明，在敲降 *ErGPCR-1*、*ErGPCR-2*、*ErGPCR-3* 和 *DopEcR* 后，*HHR3* 的表达均下降，而 *Pten* 和 *FoxO* 在 *ErGPCR-1* 敲降后表达量下降而在 *ErGPCR-2*、*ErGPCR-3* 和 *DopEcR* 敲降后表达量没有下降（图 2.14A）。这进一步证实了不同的 GPCR 在 20E 信号通路中调节不同基因表达这一结论。图 2.14B-E 显示这四种 GPCR 的干扰效率。

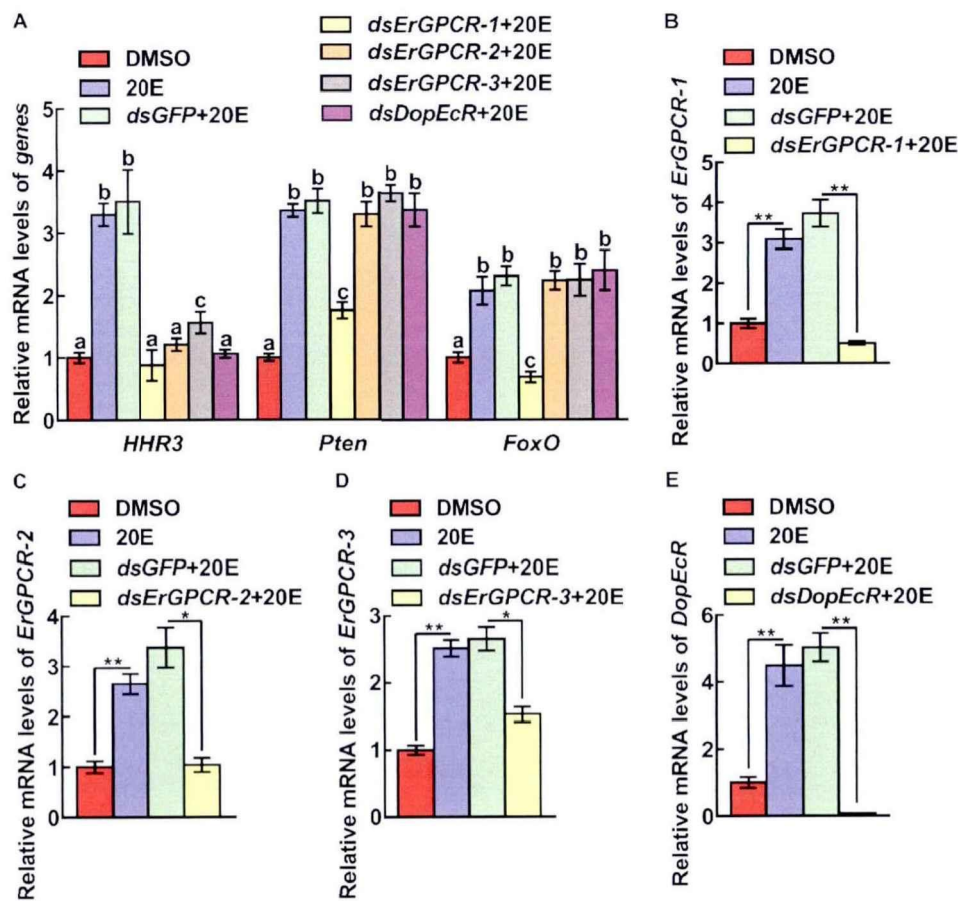


图 2.14 qRT-PCR 分析敲降 *ErGPCR-1*、*ErGPCR-2*、*ErGPCR-3* 和 *DopEcR* 后基因的相对 mRNA 水平。(A) 敲降 *ErGPCR-1*、*ErGPCR-2*、*ErGPCR-3* 和 *DopEcR* 后在六龄 72 h 幼虫中肠中 *HHR3*、*Pten* 和 *FoxO* 的 mRNA 表达水平（第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中，每隔 24 h 注射一次，共注射三次，1 μ g *dsRNA*/幼虫）。500 ng 20E 刺激 12 h。DMSO 作为溶剂对照。 β -actin 作为基因对照，用 ANOVA 进行数据分析，不同的字母代表显著性差异（ $p < 0.05$ ）。误差线代表三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。(B-E) *ErGPCR-1*、*ErGPCR-2*、*ErGPCR-3* 和 *DopEcR* 的干扰效率检测。实验重复了三次，用 t 检验进行显著性差异分析（ $*p < 0.05$ ； $**p < 0.01$ ）。误差线代表三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.14 qRT-PCR showing the relative mRNA levels of genes after knocking down *ErGPCR-1*, *ErGPCR-2*, *ErGPCR-3* and *DopEcR*. (A) The mRNA expression levels of *HHR3*, *Pten* and *FoxO* in 6th-72 h larval midgut after *ErGPCR-1*, *ErGPCR-2*, *ErGPCR-3* and *DopEcR*

knockdown (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1 μ g *dsRNA*/larva). 20E (500 ng/larva) for 12 h. DMSO was used as the solvent control. β -actin was regarded as control. Statistical analysis was conducted using ANOVA, different letters represented significant differences ($p < 0.05$). The bars indicate the mean $\pm$ SD of three times repetition. (B-E) The efficacy of *ErGPCR-1*, *ErGPCR-2*, *ErGPCR-3* and *DopEcR* knockdown. The experiments were performed in triplicate and significant differences were calculated by Student's *t*-test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$). The bars indicate mean $\pm$ SD.

为了探究 *PrRPR*、*Smo*、*Akhr*、*Htr* 对 *Pten* 和 *FoxO* 的调控不同但敲降后虫体却出现相似的延迟化蛹表型的原因，我们进一步检测了敲降这些 GPCRs 后对昆虫生长发育起重要作用的 *BrZ7*、*Kr-h1*、*cMyc* 和 *Wnt* 的调控，发现：敲降 *PrRPR* 和 *Smo* 下调了 *BrZ7* 的表达水平，敲降 *Akhr* 和 *Htr* 上调了 *Kr-h1* 的表达水平，敲降 *Fzd7* 下调了 *cMyc* 和 *Wnt* 的表达水平（图 2.15）。这说明不同的 GPCR 在 20E 信号通路中通过调节不同基因的表达影响昆虫化蛹或生长发育。

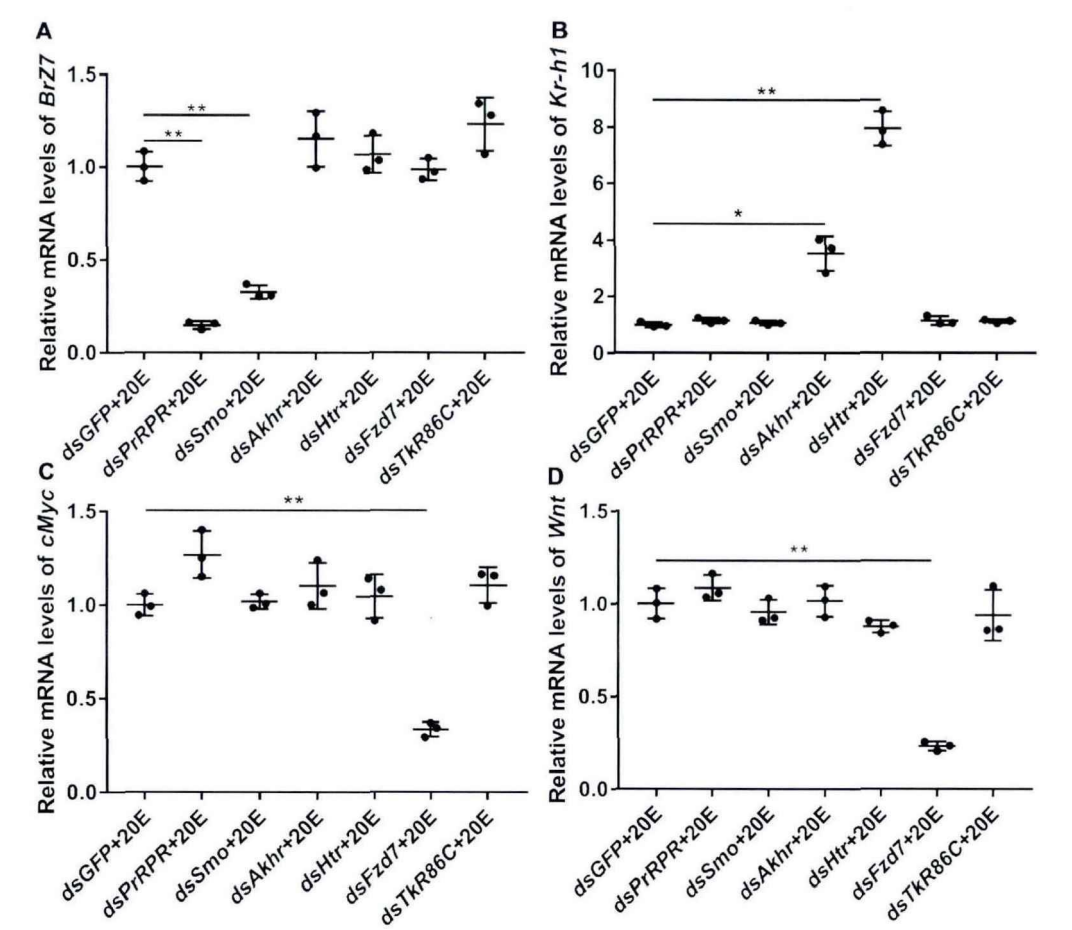


图 2.15 qRT-PCR 分析敲降 GPCRs 后其他基因的 mRNA 水平。(A-D) 敲降 *PrRPR*、*Smo*、*Akhr*、*Htr*、*Fzd7* 和 *TkR86C* 后，幼虫中肠中 *BrZ7*、*Kr-h1*、*cMyc* 和 *Wnt* 的转录水平（第一次注射 *dsRNA* 于六龄 6 h 幼虫中，每隔 24 h 注射一次，共注射三次，1 μ g *dsRNA*/幼虫）。500 ng 20E 刺激 12 h，DMSO 作为溶剂对照。实验重复了三次，用 *t* 检验进行显著性差异分析 ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$)。误差线代表三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。

Figure 2.15 qRT-PCR showing the relative mRNA levels of other genes after knocking down GPCRs. (A-D) The transcript levels of *BrZ7*, *Kr-h1*, *cMyc* and *Wnt* in larval midgut after GPCRs-*PrRPR*, *Smo*, *Akhr*, *Htr*, *Fzd7* and *Tkr86C* knockdown (sixth instar 6 h larvae for the first injection of *dsRNA*, thrice at a 24 h interval, 1 μ g *dsRNA*/larva). 20E (500 ng/larva) for 12 h. DMSO was used as the solvent control. All the experiments were performed in triplicate, and significant differences were calculated by Student's *t*-test (***p* < 0.01). The bars indicate mean $\pm$ SD.

3.5 PRRPR 与 20E 结合而 SMO 不与 20E 结合

为了确定参与 20E 信号途径并调控 *Pten* 和 *FoxO* 表达的 PRRPR 和 SMO 是否为 20E 的受体，首先用 SYBYL X2.0 软件（Certara, Princeton, New Jersey, USA）中的 Surflex-Dock（SFXC）程序预测 20E 分别与 PRRPR 和 SMO 结合的可能性（图 2.16A 和 B）。20E 可以与 PRRPR 的 Ala-61、Gly-64 和 Pro-316 以及 SMO 的 Gln-314 和 Glu-219 形成氢键（图 2.16C 和 D）。PRRPR 和 SMO 与 20E 结合的得分分别是 2.96 和 -0.78，其中得分越高，结合能力越强。这些结果表明，PRRPR 比 SMO 具有更高的对 20E 的结合能力。

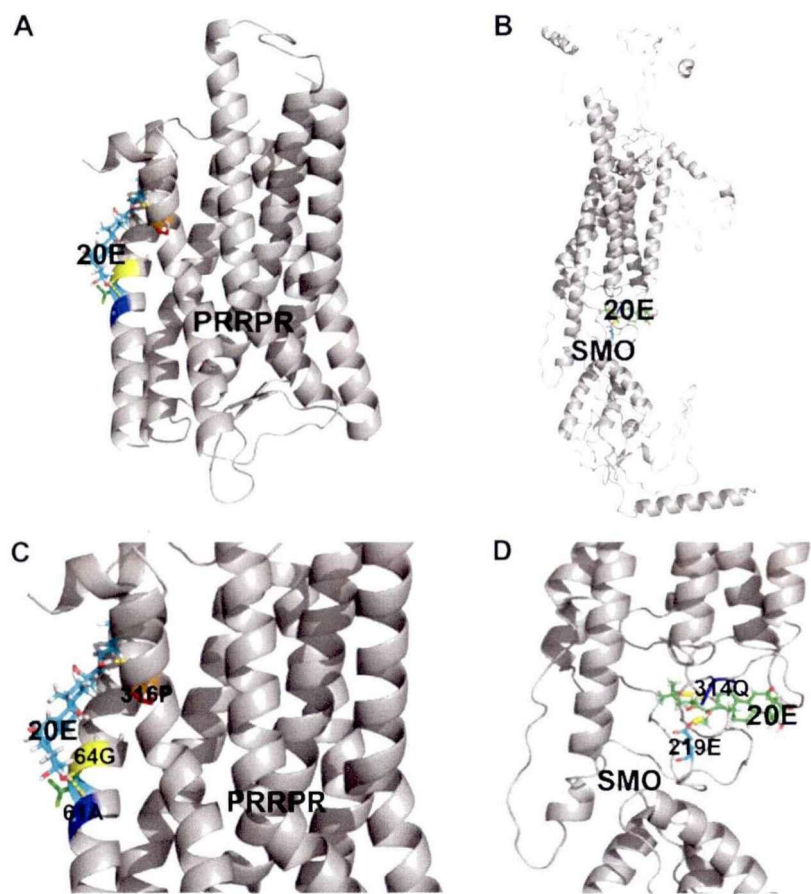


图 2.16 PRRPR 和 SMO-配体结合复合物模型。 SYBYL X2.0 软件中的 Surflex-Dock（SFXC）程序预测获得模型。(A-B) PRRPR 和配体 20E 以及 SMO 和配体 20E 的整体结构。(C-D) PRRPR-20E 和 SMO-20E 结合复合物模型近距离观察图。20E 与可以形成氢键的氨基酸残基如图所示。

Figure 2.16 Modeling of the ligand-binding complex of PRRPR and SMO. Prediction of the Surflex-Dock (SFXC) program from the SYBYL X2.0 software. (A-B) Whole structures of PRRPR and docked 20E, Smo and docked 20E, respectively. (C-D) A closer view of the docking model pockets of PRRPR-20E and SMO-20E complex. The amino acid residues with which 20E can form hydrogen bonds were shown in the figures.

为了验证 PRRPR 和 SMO 与 20E 的结合, 在 HaEpi 细胞系中过表达了 PRRPR-GFP 及 SMO-GFP, GFP 作为过表达的标签对照。过表达的 PRRPR-GFP 和 SMO-GFP 均定位于细胞膜上 (图 2.17A)。通过 20E-EIA 进行结合分析发现, 与过表达 GFP 的细胞相比, 过表达 PRRPR-GFP 的细胞细胞膜结合更多的 20E, 而过表达 SMO-GFP 的细胞细胞膜结合的 20E 与过表达 GFP 的细胞相比并没有显著增加 (图 2.17B)。这些结果说明 PRRPR 可以结合细胞膜上的 20E。通过 20E-EIA 构建饱和结合曲线, 进一步计算过表达 PRRPR-GFP 细胞的细胞膜与 20E 结合的解离常数 (K_d)。过表达 PRRPR-GFP 细胞的细胞膜与 20E 的 B_{max} 为 $2.096 \pm 0.1037 \text{ nmol/mg}$, K_d 为 $12.76 \pm 2.192 \text{ nM}$ 。相比之下, 过表达 GFP 细胞的细胞膜与 20E 的 B_{max} 为 $1.195 \pm 0.1007 \text{ nmol/mg}$, K_d 为 $30.2 \pm 6.452 \text{ nM}$ (图 2.17C)。这些数据进一步证明了 PRRPR 可以结合 20E。

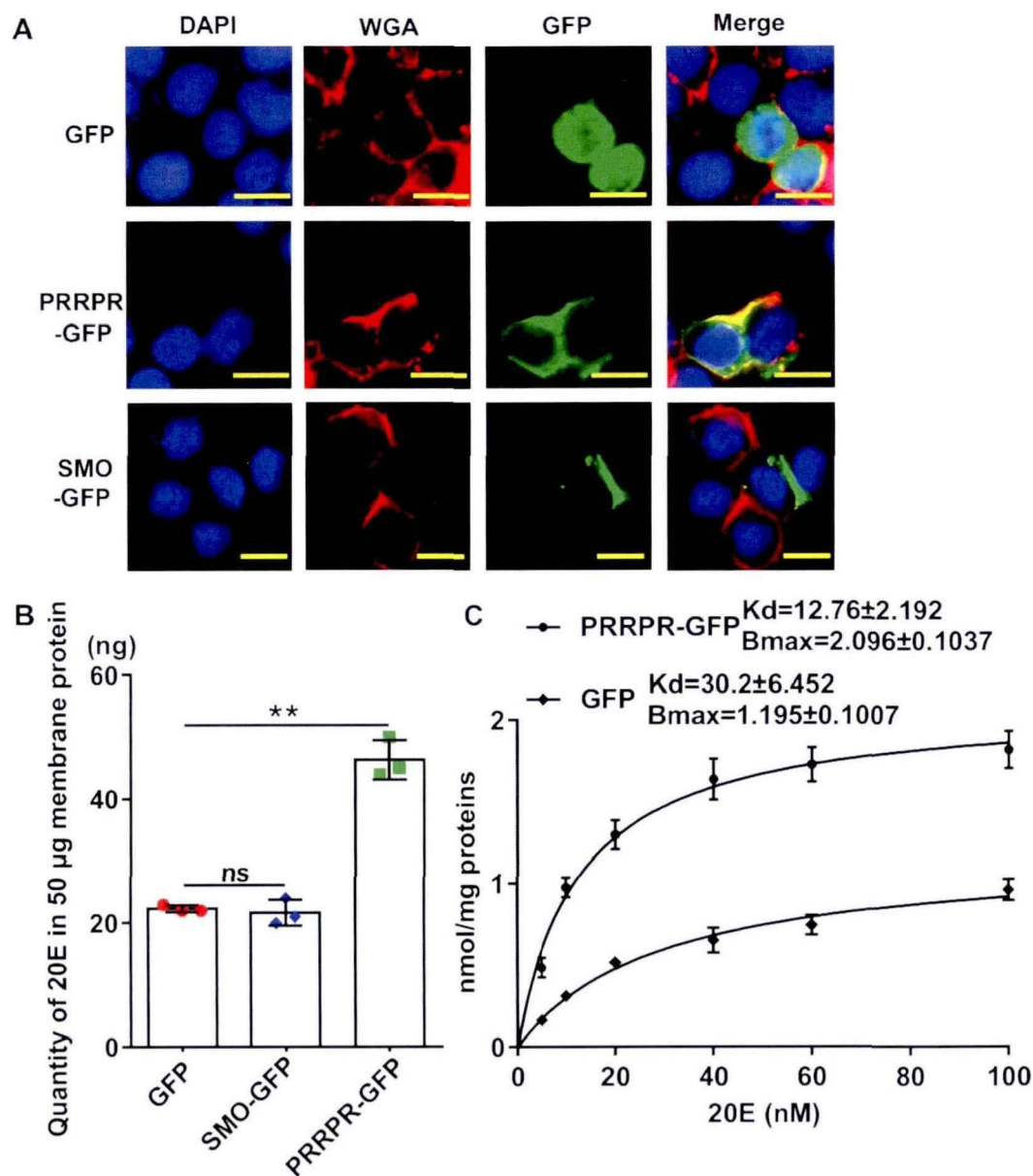


图 2.17 检测细胞系过表达 GPCR 的细胞膜蛋白结合的 20E。(A) 过表达的 GFP 和 PRRPR、SMO 的亚细胞定位。蓝色：DAPI 标记的细胞核。红色：麦胚凝集素 WGA 标记的细胞膜。绿色：GFP 和不同的 GPCR 融合 GFP 的绿色荧光。比例尺=20 μ m。(B) 过表达 GFP 和 PRRPR-GFP 以及 SMO-GFP 的 HaEpi 细胞的 50 μ g 膜蛋白所结合的 20E 的量。(C) 过表达 GFP 和 PRRPR-GFP 以及 SMO-GFP 的 HaEpi 细胞膜与 20E 结合的饱和结合曲线。误差线代表三次生物学重复的 SD，用 *t* 检验进行显著性差异分析 (**p* < 0.05; ***p* < 0.01)。

Figure 2.17 Detection of 20E that was bound by the cell membrane proteins from HaEpi cells that was overexpressing GPCRs. (A) Cell membrane localization of overexpressed GFP and PRRPR, SMO. Blue: nucleus stained with DAPI. Red: the cell membrane was marked by wheat germ agglutinin (WGA). Green: green fluorescence from GFP and various GPCRs fused with GFP. Scale bar = 20 μ m. (B) Quantity of 20E bound by 50 μ g membrane proteins from HaEpi cells that was overexpressing GFP, PRRPR-GFP, SMO-GFP. (C) Saturation binding curves of HaEpi cells membrane that was overexpressing GFP, PRRPR-GFP, SMO-GFP to 20E. Error bars represent the SD of three replicates. Asterisks indicate significant differences according to Student's *t*-tests (**p* < 0.05; ***p* < 0.01).

4. 讨论

已知 GPCR 可传递多种信号, 然而多个 GPCRs 传输同一信号的机制尚不清楚。本研究对棉铃虫基因组中的所有 GPCRs 进行了鉴定和分类, 通过探究一些 GPCRs 的表达模式及其参与 20E 上调基因表达的调控以及对虫体变态发育的影响, 我们发现 20E 可以上调多个 GPCRs 表达, 不同的 GPCR 在组织表达和发育阶段表现出不同的表达谱, 并在 20E 信号传导中介导不同的基因表达, 最终决定变态的发生。这些数据解释了多个 GPCRs 参与同一信号的机制。

4.1 棉铃虫基因组 GPCR 的鉴定和分类

在棉铃虫基因组中鉴定到有 122 个完整的基因编码经典的 GPCR。这些经典的 GPCR 分为多个家族: A 类、B 类、C 类和 F 类, 这与果蝇 GPCR 的分类一致 (Hanlon and Andrew, 2015)。大部分基因与基因组中注释的家族分类一致, 但有些基因混在了不同的类别中, 这种差异的产生可能是由于我们用完整的开放阅读框构建系统发育树导致的, 但这与在基因组中基于 motif 进行的分类并不矛盾, 例如 mth 样 GPCR。

在棉铃虫基因组中有 19 个 mth 样 GPCR, 与黑腹果蝇的 16 个 mth 样 GPCR 基因数相近 (Patel et al., 2012), 埃及伊蚊中有 7 个, 家蚕中仅有 2 个 mth 样 GPCR (Fan et al., 2010)。在本研究中, 15 个 mth 样 GPCR 在系统发育树中聚集在 B 类, 然而有 2 个 mth 样 GPCR, 根据全序列系统发育分析, 被混到 A 类和 C 或 F 类中, 由于 Mth2-like3 (基因序列号: LOC110383697) 和 Mth2-like8 (基因序列号: LOC110374712) 的序列与其他序列差异很大, 所以这两个 GPCR 在进化树中没有涉及。Secretin 受体家族即 B 类受体家族, 均为多肽类激素受体, 其特征是具有长的 N 末端结构域, 用于识别肽类配体, 如激素和神经肽 (Cardoso et al., 2005; Cardoso et al., 2010)。Mth 亚家族属于 Secretin 受体家族的一类, 这类受体有一个重要的特征是存在 10 个半胱氨酸残基, 形成 5 个二硫键 (West et al., 2001)。

4.2 不同的 GPCR 在不同的组织中传递 20E 信号和基因表达

ErGPCR-1 (Cai et al., 2014a)、ErGPCR-2 (Wang et al., 2015)、ErGPCR-3 (Kang et al., 2021) 和 DopEcR (Kang et al., 2019) 均能传递 20E 信号, 在多个组织中表达并在变态期上调表达。除了 A 类中的 DopEcR、ErGPCR-1、ErGPCR-2 和 ErGPCR-3 均属于 B 类中的 mth 样 GPCR。Mth 样 GPCR 不存在于脊椎动物

中,但在节肢动物中较为丰富 (Araujo et al., 2013; de Mendoza et al., 2016; Patel et al., 2012)。Mth 在调节新陈代谢、衰老和对高温、饥饿、干燥、氧化损伤的自我平衡中均发挥作用 (Friedrich and Jones, 2016)。在昆虫中,已知 mth 在生物钟的设定 (Mertens et al., 2007), 体液调节 (Reagan, 1994) 以及应激反应和寿命中起作用 (Lin et al., 1998)。Mth 样 GPCR 的配体是肽分泌素, 因此这些 GPCRs 也被称为分泌素受体 (Cvejic et al., 2004; Ja et al., 2009)。

这些 GPCRs 均传递 20E 信号, 但其诱导的下游效应不同, ErGPCR-1 诱导 Ca^{2+} -PKC 途径。ErGPCR-2 诱导 GPCR-cAMP-PKA 和 GPCR- Ca^{2+} -PKC 途径, 增加 20E 的进入, 并通过 20E 诱导其内吞。ErGPCR-3 激活 PKA 和 PKC 途径。棉铃虫的 DopEcR 在 20E 诱导下可直接与 Gas 和 Gαq 相互作用以增加 cAMP 和 Ca^{2+} 水平 (Zhao, 2020)。但是 cAMP 和 Ca^{2+} 水平的变化属于早期细胞应答反应, 这对于传递信号的 GPCR 而言很普遍, 可能无法很好地区分 GPCR 传递信号的差异。在本研究中, 我们进一步探究了 A 类以及 C 或 F 类中的 6 个 GPCRs, 参与 20E 信号转导。这些 GPCRs 在组织和虫体的各发育阶段有着不同的表达谱, 此外, 这些 GPCRs 调控不同的基因表达, 虽然 6 个 GPCRs 均参与了 20E 诱导的 *HHR3* 的表达, 但只有 PrRPR 和 Smo 参与了 20E 调控的 *Pten* 和 *FoxO* 的表达。此外, ErGPCR-1 也参与了 20E 介导的 *Pten* 和 *FoxO* 的表达, 但 ErGPCR-2、ErGPCR-3 和 DopEcR 不调控 *Pten* 和 *FoxO* 表达, 这些发现首次揭示了多个 GPCRs 通过调节不同基因表达参与相同的 20E 信号转导的机制, 不同 GPCR 诱导的不同基因表达通过细胞内各基因形成的网络调控放大, 进而调控不同的生理过程, 这可能区分这么多 GPCRs 存在的不同作用。

这 6 个 GPCRs 在基因组中分别被命名为 *PrRPR*、*Smo*、*Akhr*、*Htr*、*Fzd7* 和 *TkR86C*。在哺乳动物中, PrRPR 是人类神经肽催乳素受体 (Dodd and Luckman, 2013), Smo 参与 Hedgehog (Hh) 信号转导促进细胞分化、增殖和存活 (Wu et al., 2017)。Fzd7 是参与哺乳动物癌症发生和扩散的 Wnt 的受体 (Schulte, 2010)。在昆虫中, Akhr 结合脂动激素 (AKH) 促进脂肪体中的脂肪分解, 糖原分解和海藻糖的产生 (Baumbach et al., 2014; Bednarova et al., 2013; Van der Horst et al., 2001)。Htr (5 羟色胺受体) 在昆虫神经系统的形态发生中起关键作用 (Blenau and Thamm, 2011)。TkR86C 是黑腹果蝇的神经激肽 K 受体, 在中枢神经系统的神经调节中起作用, 参与信息的感知和运动的调控 (Vanden

Broeck et al., 1999)。但是这些 GPCRs 在昆虫中的真正功能尚不清楚。我们的研究发现, PrRPR 可以作为 20E 的受体结合 20E 并参与 20E 信号转导, Smo 也可以传递 20E 信号, 但不与 20E 结合。Akhr 和 Htr 参与 20E 诱导的促进幼虫化蛹的过程, 但 Fzd7 和 Tkr86C 并不参与其中。这些表型是体内信号网络整合的结果。20E 和其他配体诱导的信号转导之间的相互作用需要进一步探究。

4.3 无论是否与 20E 结合 GPCR 都可以传递 20E 信号

在我们之前的研究发现, ErGPCR-1、ErGPCR-2、ErGPCR-3 和 DopEcR 均在棉铃虫体内传递 20E 信号。ErGPCR-2、ErGPCR-3 和 DopEcR 能结合 20E, 但 ErGPCR-1 不能结合 20E (Kang et al., 2019)。在果蝇 (Srivastava et al., 2005) 和哺乳动物 (Maggiolini and Picard, 2010) 中, 过表达 GPCR 的细胞或细胞膜可以结合类固醇激素, 利用该方法, 我们发现 PrRPR 能结合 20E, 其与 20E 结合的 Kd 值为 12.76 ± 2.192 nM, Bmax 为 2.096 ± 0.1037 nmol/mg 蛋白。尽管 Smo 传递 20E 信号并参与 20E 诱导的化蛹过程, 但 Smo 不能与 20E 结合。这些数据进一步证明了 GPCR 是否与 20E 结合均可传递 20E 信号, 这可能是由于 GPCR 与配体之间存在松散或动态的结合 (Nygaard et al., 2013; Strasser et al., 2017)。所以, GPCR 的转录起着决定性作用, 20E 通过 PKC δ 使 EcRB1 的 Thr468 位点磷酸化, 从而形成 EcRB1/USP1 转录复合体并结合 EcRE 起始基因转录 (Chen et al., 2017)。GPCR 与其配体结合后与, 可以与 G 蛋白相互作用从而增加胞内 cAMP 和 Ca²⁺水平, 并分别激活 PKA 和 PKC 途径 (Marinissen and Gutkind, 2001)。GPCR-cAMP-PKA 和 GPCR-Ca²⁺-PKC 途径在动物类固醇激素非基因组途径的信号传导中发挥重要作用 (Marino et al., 2006)。在棉铃虫中 ErGPCR-1 诱导 Ca²⁺-PKC 信号途径 (Liu et al., 2014b), ErGPCR-2 诱导 GPCR-cAMP-PKA 和 GPCR-Ca²⁺-PKC 信号途径 (Jing et al., 2016)。20E 通过 ErGPCR-3 调节与 EcRB1-USP1 转录复合物形成相关的蛋白 USP1、CDK10、PKAC1 和 CREB 的磷酸化 (Kang et al., 2021)。通过 DopEcR 增加 cAMP 和 Ca²⁺水平 (Kang et al., 2019)。20E 通过 EcR/USP1 转录复合体与 EcRE 结合上调 20E 途径基因以及 GPCR 的表达 (Kang et al., 2021), 是否存在其他转录调控机制值得进一步探究。

5. 结论

我们在棉铃虫基因组中鉴定出 122 个经典的 GPCR, 其中鉴定到 6 个 GPCRs 在变态期的表达量增加, 并且在组织中以不同的表达方式传递 20E 信号。这 6

个 GPCRs 对基因表达的调节不同，它们均能调节 *HHR3* 的表达；无论是否结合 20E，PrRPR 和 Smo 均调节 *Pten* 和 *FoxO* 的表达，进而调节 *BrZ7* 表达；敲降 20E 途径中的 *Htr* 和 *Akhr* 上调 *Kr-h1* 表达；20E 通过 *Fzd7* 上调 *Wnt* 和 *cMyc* 的表达，这些 GPCRs 通过调控不同基因表达进而调控化蛹或生长过程。PRRPR 可以结合 20E 并作为一种新的 20E 受体发挥作用（图 2.18）。

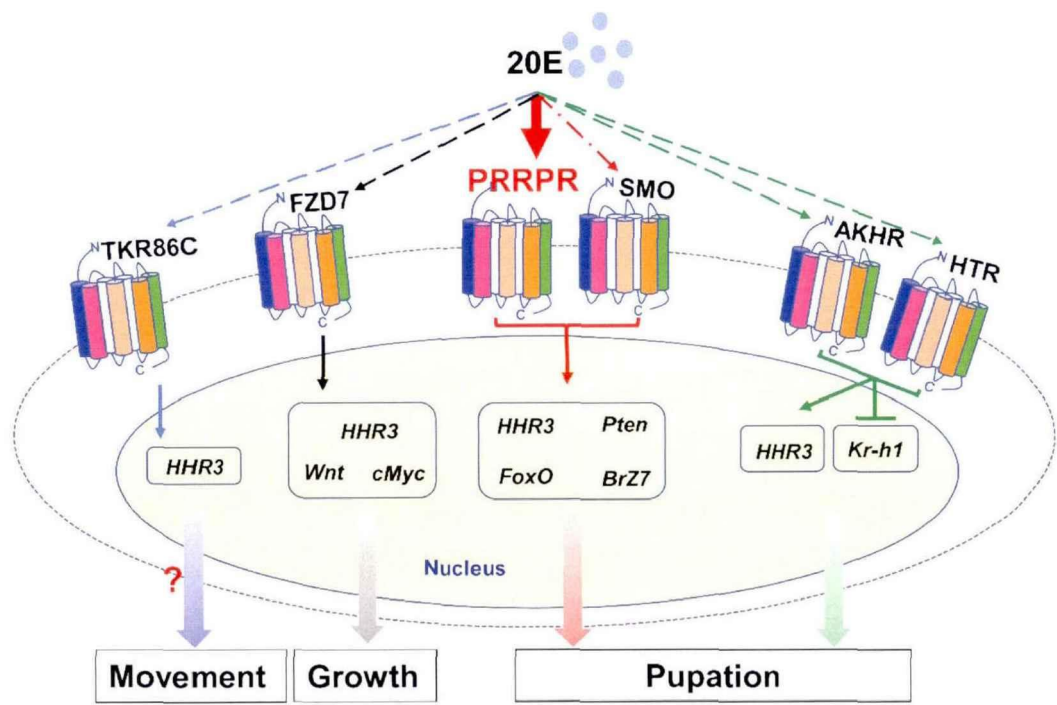


图 2.18 20E 通过不同 GPCR 调控不同基因表达进而调控昆虫化蛹。20E 通过 PRRPR、SMO、AKHR、HTR、FZD7 和 TKR86C 调控 *HHR3* 的表达，可以与 20E 结合的 PRRPR 以及不与 20E 结合的 SMO 均调控 *Pten* 和 *FoxO* 的表达，进而调控 *BrZ7* 表达。20E 通过 AKHR 和 HTR 调控 *Kr-h1* 的表达，通过 FZD7 调控 *Wnt* 和 *cMyc* 表达。这些 GPCRs 通过调控不同基因表达进而调控化蛹或生长。

Figure 2.18 20E regulates the expression of different genes through different GPCRs to regulate pupation. 20E regulates the expression of *HHR3* through PRRPR, SMO, AKHR, HTR, FZD7 and TKR86C. PRRPR that can bind 20E and SMO that does not bind 20E both regulate the expression of *Pten* and *FoxO*, thereby regulating the expression of *BrZ7*. 20E regulates the expression of *Kr-h1* through AKHR and HTR, and regulates the expression of *Wnt* and *cMyc* through FZD7. These GPCRs regulate pupation or growth by regulating the expression of different genes.

第三章 20E 通过使胰岛素受体去磷酸化拮抗胰岛素信号通路

1 引言

胰岛素 (insulin), 胰岛素样生长因子 (IGFs) 和胰岛素样肽 (ILPs) 通过胰岛素/IGF 信号传导促进生长 (Nassel and Vanden Broeck, 2016)。在人中, 类固醇激素雌激素拮抗胰岛素使生长速率减慢, 在果蝇中, 类固醇激素 20E 拮抗胰岛素信号途径控制生长 (Hyun, 2013)。胰岛素样肽和 20E 是昆虫生长的主要调节剂 (Nijhout et al., 2014), 胰岛素样肽决定生长速率而 20E 决定生长持续时间 (Lin and Smaghe, 2019)。然而, 动物如何通过胰岛素和类固醇激素之间的相互作用来调节生长和终止生长仍不清楚。

此外, 胰岛素不足 (1 型糖尿病) 或胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能障碍 (2 型糖尿病) 导致糖尿病 (Elena et al., 2018; Kahn et al., 2014)。胰岛素维持正常的血糖水平, 而类固醇激素则会抵消胰岛素的功能, 升高血糖水平甚至导致糖尿病 (Hwang and Weiss, 2014), 如糖皮质激素可产生胰岛素抵抗诱发高血糖 (Schultz et al., 2018), 然而这些机制还没有完全解释清楚。20E 对血糖的调节及其生理意义也不清楚。

胰岛素受体 (INSR) 是一种受体酪氨酸激酶, 通过结合其配体 (胰岛素) 调节葡萄糖、脂肪酸和蛋白质代谢以促进生长, 在胰岛素途径中发挥重要作用 (Gabbouj et al., 2019)。INSR 作为跨膜糖蛋白, 由二硫键连接的两个 α 亚基和两个 β 亚基组成 (Tatulian, 2015), 是由 *Insr* 基因编码的蛋白质, 蛋白酶 furin 将其切割为 α 和 β 亚基, 分别命名为 INSR α 和 INSR β (Bass et al., 2000)。INSR α 位于细胞膜外具有胰岛素的结合位点, INSR β 包含一个跨膜区和存在与细胞内的酪氨酸激酶元件 (Ebina et al., 1985)。INSR 与胰岛素结合后导致其自身构象改变并发生自我磷酸化, 进而致使 PI3K 磷酸化, 磷酸化的 PI3K 将 PIP2 磷酸化为 PIP3。PIP3 招募 AKT 上膜, 使 PDK1 发生磷酸化, AKT 磷酸化 AS160 蛋白, 促进葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 膜易位, 促进细胞吸收葡萄糖 (Gabbouj et al., 2019)。AKT 还能使胰岛素途径的负调节因子 FoxO 磷酸化, 使 FoxO 定位于细胞质中, 从而阻断其在细胞核中的转录活性 (Verdu et al., 1999)。上述胰岛素诱导的过程可以通过途径的负调节因子, 一种双功能磷酸酶 PTEN 来逆转 (Goberdhan et al., 1999)。在从蠕虫到哺乳动物的整个进化过程中, INSR 介导的胰岛素信号通路

及其下游信号分子在结构和功能上都是保守的 (Das and Arur, 2017)。

胰岛素样肽促进前胸腺的生长和 20E 的产生, 20E 又能拮抗胰岛素途径, 促进昆虫变态 (Mirth et al., 2005)。在果蝇中, 20E 诱导转录因子 FoxO 核定位, 拮抗胰岛素途径 (Colombani et al., 2005)。在棉铃虫中, 20E 上调 *Pten* 的表达以抑制 AKT 磷酸化, 进而 FoxO 不能被 AKT 磷酸化并进入细胞核诱导 20E 途径下游基因的转录 (Cai et al., 2016)。此外, 在棉铃虫中, 高浓度的 20E 抑制 *Pdk1* 的表达并抑制 AKT 和 FoxO 的磷酸化, 导致 FoxO 核定位, 诱导自噬并抑制细胞增殖 (Pan et al., 2018)。这些研究表明, 20E 可以拮抗胰岛素途径, 然而 20E 能否通过抑制 INSR 的表达和磷酸化来从源头拮抗胰岛素通路尚不清楚。为进一步深入了解类固醇激素拮抗胰岛素途径的机制, 我们以鳞翅目昆虫棉铃虫为研究对象, 以胰岛素途径中的关键因子作为靶标, 结果发现, INSR 在昆虫幼虫生长中发挥重要作用, 在幼虫摄食阶段促进 20E 的产生, 使其达到临界滴度, 20E 诱导 INSR 去磷酸化, 抑制胰岛素途径。类固醇激素 20E 拮抗胰岛素途径使幼虫停止生长并积累血淋巴葡萄糖。

2 实验材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

以鳞翅目昆虫棉铃虫为研究材料, 同第二章

2.1.2 实验细胞

同第二章

2.1.3 实验试剂

抗 INSR β 的多克隆兔抗 (Cat. WL02857) 和抗 P-AKT1 (Ser473) 的兔抗 (Cat. WLP001) (万类生物公司, 沈阳, 中国); 抗磷酸化的 INSR β (p-INSR β) (Tyr1150/1151) 的单克隆兔抗 (Cat. 3024) (Cell Signaling Technology, 丹弗斯, 美国); 抗 ACTB 的兔单克隆抗体 (Cat. AC026)、抗 GFP 的鼠单克隆抗体 (Cat. AE012) 和抗 His 标签的鼠单克隆抗体 (Cat. AE003) (ABclonal, 武汉, 中国); High-sig ECL Western Blotting Substrate (天能科技有限公司, 上海, 中国); 染色质免疫沉淀 (ChIP) 试剂盒 (P2078) 和 RIPA 裂解液 (碧云天, 北京, 中国); 葡萄糖检测试剂盒 (酶联生物, 上海, 中国); N-苯基硫脲 (阿拉丁, 上海, 中国), 其他同第二章。

2.1.4 实验仪器

蛋白电泳槽（美国伯乐公司）；化学发光成像系统5200（天能科技有限公司，上海，中国），Bioruptor Pico 超声波破碎仪（Diagenode, 列日，比利时）其他同第二章。

2.2 实验方法

2.2.1 蛋白质免疫印迹（Western blot）

从细胞或虫体中提取总蛋白，用 50 μg 蛋白进行 7.5%或 12.5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）。通过转膜仪将蛋白质转移到 0.22 μm 的硝酸纤维素膜上。在室温下，用封闭缓冲液（5% TBST 配制的脱脂奶粉）将膜封闭一小时后，加入一抗（抗体稀释比例 1:1000，除 anti-p-INSR β 用 5%的牛血清白蛋白 BSA 稀释外，其余抗体均用 5% TBST 配制的脱脂奶粉稀释），4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜三次，每次 10 min，加入山羊抗兔/小鼠 IgG-辣根过氧化物酶偶联的二抗（二抗稀释比例 1:7000），室温孵育一小时。TBST 洗膜两次，再用 TBS 洗膜一次，每次 10 min。将膜浸润在检测辣根过氧化物酶的化学发光底物 High-sig ECL Western Blotting Substrate 中，用化学发光成像系统 5200 检测，曝光后，膜上的条带使用 ImageJ 软件计算并通过 GraphPad Prism7 软件分析得到的数据。

2.2.2 RNA 提取

同第二章方法

2.2.3 反转录合成 cDNA

同第二章方法

2.2.4 实时定量 PCR（qRT-PCR）

同第二章方法

2.2.5 λ 磷酸酶（ λPPase ）处理

冰上快速提取六龄 48 h 和六龄 120 h 幼虫的表皮蛋白（提取蛋白过程中不加磷酸酶抑制剂以免影响 λPPase 的活性）。然后，取 40 μL 蛋白样品（2.5 mg/mL）加入 0.5 μL λPPase ，5 μL MnCl_2 和 5 μL 缓冲液，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 30 min。使用 7.5%的 SDS/PAGE 凝胶进行蛋白质免疫印迹分析，观察蛋白质分子量的变化。

2.2.6 INSR β 蛋白的富集

将幼虫组织置于含 500 μL Tris-HCL 缓冲液（40 mM, pH 7.5）和 5 μL 蛋白

酶抑制剂 (PMSF, 17.4 mg/mL) 的混合液中冰上匀浆, 混合物于 $12,000 \times g$ 4°C 离心 15 min, 取上清于新的离心管中并测定浓度, 取 300 μg 组织蛋白样品, 加入 2 μL INSR β 的抗体及 50 μL protein A 琼脂糖珠在 4°C 孵育过夜。离心后, 用 50 μL PBS 悬浮沉淀, 用相同浓度的 INSR β 蛋白进行蛋白质免疫印迹检测。

2.2.7 虫体及细胞激素诱导

同第二章方法

2.2.8 双链 RNA (*dsRNA*) 的合成

同第二章方法

2.2.9 虫体 RNA 干扰

同第二章方法

2.2.10 过表达载体构建

同第二章方法

2.2.11 细胞系过表达

同第二章方法

2.2.12 免疫共沉淀 (Co-IP)

将构建的重组质粒 pIEx-4-PTEN-GFP-His 或 pIEx-4-PTP1B-GFP-His 转染至 HaEpi 细胞系中, 48 h 后用 2 μM 20E 处理 1 h, DMSO 作对照。加入 5 μg 胰岛素处理 1 h, 随后使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取相应蛋白质, 冰上裂解 30 min, 于 $12,000 \times g$ 4°C 离心 30 min。取少量上清做蛋白质免疫印迹检测, 用适量缓冲液洗涤 protein A 琼脂糖珠三次, 每次 3 min。将洗涤好的 protein A 琼脂糖珠加入至上清液中孵育 1 h 去除非特异性结合, $3,000 \times g$ 4°C 离心 3 min 收集沉淀, 用适量缓冲液洗涤三次, 加入适量 RIPA 裂解液及 SDS-PAGE 上样缓冲液处理沉淀, 煮沸 10 min, 离心后, 进行蛋白质免疫印迹检测, 用抗 GFP 的单克隆鼠抗和抗 INSR β 的多克隆兔抗检测目的蛋白。

2.2.13 免疫细胞化学

同第二章方法

2.2.14 染色质免疫沉淀 (ChIP)

待六孔板中的细胞长至密度约为 80% 时转染 pIEx-4-FoxO-GFP-His 质粒, 48 h 后加入 20E 处理细胞 6 h, DMSO 作对照。用染色质免疫沉淀 (ChIP) 试剂盒进行检测。首先用 1% 的甲醛交联细胞, 置于 37°C 培养箱中避光孵育 10 min, 加入

0.125 M的甘氨酸，孵育10 min，终止交联，用PBS洗涤细胞两次后，加入SDS裂解缓冲液（1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1）重悬细胞，用Bioruptor Pico超声波破碎仪将DNA剪切成200-1000 bp的片段，4℃离心15 min，在上清液中加入50 μ L 洗涤好的protein A琼脂糖珠，4℃孵育1 h以便去除protein A的非特异性结合，离心取适量上清液置于4℃作为qRT-PCR中的Input样品，其他上清液与抗GFP的单克隆鼠抗（IgG鼠抗作为阴性对照）在4℃孵育过夜。加入50 μ L 洗涤好的protein A 琼脂糖珠4℃孵育2 h。混合物用低盐洗涤缓冲液（0.1% SDS, 1.0% Triton X-100, 2 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl）洗涤一次，随后用高盐洗涤缓冲液（0.1% SDS, 1.0% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl）洗涤一次，LiCl洗涤缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH 8.1, 0.25 M LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% 胆酸盐）洗涤一次，用TE缓冲液（10 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM EDTA）洗涤两次，最后用洗脱缓冲液（1% SDS, 0.1 M NaHCO₃）洗脱，DNA-蛋白质复合物在65℃水浴中孵育过夜，后进行RNase A 和蛋白酶K处理，用苯酚/氯仿法纯化DNA，随后进行qRT-PCR检测。

2.2.15 20E 滴度检测

在最后一次注射 *dsRNA* 66 h 后，取至少三只虫收集血淋巴，向每个样品中加入 10^{-5} μ M 的 N-苯基硫脲防止血淋巴黑化，3,000 rpm 4℃离心 5 min。加入80%的甲醇提取 20E，于 4℃干燥机中使样品完全干燥，用 100 μ L EIA 缓冲液溶解沉淀，取每个样品用 EIA 缓冲液稀释，从中取 50 μ L 样品进行检测。20E 的摩尔浓度通过公式 $c = \rho / M$ （ c 表示 20E 的摩尔浓度； ρ 表示 100 μ L 血淋巴中 20E 的质量； M 表示 20E 的摩尔质量，480.63 g/mol）计算。

2.2.16 血淋巴葡萄糖的测定

分别取不同发育阶段的幼虫、蛹或成虫三只以上，每个样品收集约 30 μ L 的血淋巴，向每个样品中加入 10^{-5} μ M 的 N-苯基硫脲防止血淋巴黑化，3,000 rpm 4℃离心 5 min，取 10 μ L 上清，利用葡萄糖检测试剂盒，将样本与工作液充分混匀后，置于 37℃水浴 15 min，显色后，通过分光光度法在 505 nm 处检测颜色强度。

表 3.1 实验所用引物列表
Table 2.1 Primers used in this study

Primer names	Sequence (5'-3')
Overexpression	
PTEN-oex-F	tactcacaattggatgggtatttcggtgagc
PTEN-oex-R	tactcaggcgcgccgatactcctgtggcgtggtg
FoxO-oex-F	tactcatactcagagctcatgtctatacggggcagc
FoxO-oex-R	tactcatactcaagatctggaggaccagggggggc
PTP1B-oex-F	tactcagagctcatgagtcaaaacaacgtc
PTP1B-oex-R	tactcacaattgggcctaatttcctcagtctc
INSR-oex-F	tactcaggatccctcggctcgacgacagcctg
INSR-oex-R	tactcaggcgcgccgagcagccggcggcgagggg
RNAi	
GFP-RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggtgggtcccaattctcgtggaac
GFP-RNAi-R	gcgtaatacgactcactataggcttgaagttgaccttgatgcc
RFP-RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggcttcgcctgggacatcct
RFP-RNAi-R	gcgtaatacgactcactatagggtgtagtcctcgttggtggg
Insr-RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggctttcaacaccttccgcacta
Insr-RNAi-R	gcgtaatacgactcactataggcaccaggactaagaacattatcat
Pten-RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggcggctgactccagaaatg
Pten-RNAi-R	gcgtaatacgactcactatagggtatcatccaaggcaggta
FoxO-RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggcaagacaacagactcacg
FoxO-RNAi-R	gcgtaatacgactcactatagggtgtccgaagtcggttg
Ptpn1-RNAi-F	gcgtaatacgactcactatagggtggcaacctgaatctgtc
Ptpn1-RNAi-R	gcgtaatacgactcactatagggtctttcttctatcgtcctcc
Mtmr6-RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggagcgttctcccgtcttcac
Mtmr6-RNAi-R	gcgtaatacgactcactatagggtgttcttccgccttcttac
Ptprn2-RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggcctgaaccaagggtctacatt
Ptprn2-RNAi-R	gcgtaatacgactcactataggcggctcctatcaccaacactaac
E20MO-RNAi-F	gcgtaatacgactcactataggaccatcttcgtcgccacct
E20MO-RNAi-R	gcgtaatacgactcactatagggcagccttctgtccctca
qRT-PCR	
Insr-F	tcttggtacaccgtgaacatc
Insr-R	actacgaagccgttggggttctgag
Pi3k-F	tggaggagttcacgatga
Pi3k-R	cccttctgtcccttattg
Akt-F	gcaacaaacagcgacaggc
Akt-R	ccgtcaatcgggtctaca
B10-like-F	ggttctcgctatcgtagg
B10-like-R	ggtttgtagcagcactcg
B2-like-F	tgattctcattgtcgctgtc
B2-like-R	gcttgccacgcatacc
C1-like-F	gctgctgtagtagtgctg
C1-like-R	aggcagcactcgcca

<i>Peptide A-F</i>	gttatggctccgactatg
<i>Peptide A-R</i>	aggtttgaggcagcac
<i>G1-like 1-F</i>	cgccaagttcgctatt
<i>G1-like 1-R</i>	cagacggtaaatacctaatac
<i>G1-like 2-F</i>	gtaggaggcgactgggt
<i>G1-like 2-R</i>	cagcagtttcgcatcg
<i>A1-homolog-F</i>	tgtgccctgatgacggag
<i>A1-homolog-R</i>	tgacgacgaacctcttgc
<i>G1-like 3-F</i>	acaaggcagttcagttcg
<i>G1-like 3-R</i>	gtcagcaataaccgtttcc
<i>Pten-F</i>	tcttccacttctggttca
<i>Pten-R</i>	gtgtttatgctgcttatcc
<i>β-actin-F</i>	cctggtattgctgaccgtatgc
<i>β-actin-R</i>	ctgttggaaggtggagagggaa
<i>FoxO-F</i>	tcattaccaagccagcac
<i>FoxO-R</i>	tccatccagccgaagagt
<i>Ptpn1-F</i>	tcaacatccaggagacgctt
<i>Ptpn1-R</i>	atgacggcttggtagcagaa
<i>Mtmr6-F</i>	cagagaatgaatgtgcctaacg
<i>Mtmr6-R</i>	ctcgcttgggtatgtgtcg
<i>Ptpn2-F</i>	acaaccacccctaacacca
<i>Ptpn2-R</i>	cttctgggcaaggattcgtt
<i>E20MO-F</i>	ggaggtgcttctgtgtgtgt
<i>E20MO-R</i>	cgtatctgtcgggtctgct
CHIP	
<i>FoxOBE-Ptpn1-F</i>	cgaacggagcgacatatctaa
<i>FoxOBE-Ptpn1-R</i>	tccaccaatgggaggttact
<i>FoxOBE-Insr-F</i>	ctaaaccaacgaggcattcaagt
<i>FoxOBE-Insr-R</i>	gtattaccgatagcaaatccaag

2.2.17 统计方法

使用 ImageJ 软件 (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>) 分析蛋白质印迹的结果，数据来自三个独立的生物学重复实验。其他统计方法与第二章相同。

3 实验结果

3.1 INSRβ 蛋白的表达水平及磷酸化水平均在变态期下降

棉铃虫在大约一个月内完成幼虫、蛹和成虫阶段的发育，为了探究 INSR 的功能，我们研究了其在棉铃虫各发育阶段的表达和磷酸化水平的变化。抗 INSRβ 的多克隆抗体和抗磷酸化的 INSRβ (p-INSRβ) (Tyr1150/1151) 的单克隆抗体用于蛋白质免疫印迹，以检测 INSRβ 蛋白水平及磷酸化水平的变化，使用

这两种抗体均在虫体中检测到单一的条带，在 HaEpi 细胞系中过表达 INSR β ，用抗 INSR β 的抗体也特异性识别 HaEpi 细胞系中的 INSR β -His，较低分子量的条带代表内源性的 INSR β （图 3.1A）。使用抗 INSR β 的抗体检测 INSR β 在虫体不同发育阶段和不同组织中的表达情况，发现 INSR β 在取食期（6th-6 h 至 6th-48 h）表达量较高，而在 6th-72 h 至成虫的表达量较低（图 3.1B 和 C）。这些数据说明，INSR β 在变态期的表达量降低。

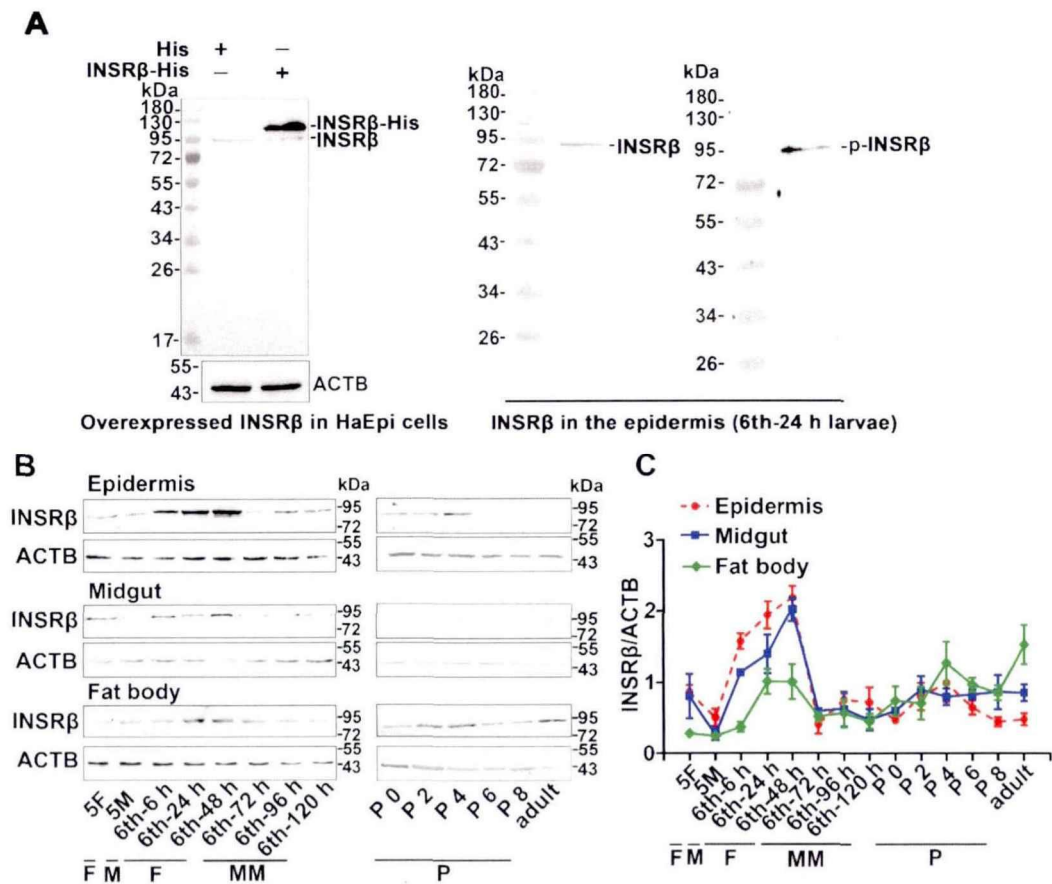


图 3.1 蛋白质免疫印迹分析变态期 INSR β 表达水平降低。(A) 蛋白质免疫印迹检测抗体的特异性。在 HaEpi 细胞系中过表达 INSR β -His 和 His 质粒 48 h。在虫体中取六龄 24 h 幼虫表皮检测抗体特异性。分别用抗 INSR β 的抗体检测 INSR β 和 p-INSR β 的抗体检测 p-INSR β （用 5%BSA 1:1000 稀释抗体）。二抗为 HRP 标记的山羊抗兔的抗体，12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。(B) INSR β 在组织中的表达水平。5F：五龄幼虫；5M：五龄蜕皮期幼虫；6th-6 h 至 6th-120 h：六龄幼虫的各阶段；P 0-P 8：0 天至 8 天大的蛹；F：取食期；M：蜕皮期；MM：蜕皮变态期；P：蛹期。用抗 ACTB 的单克隆兔抗检测 ACTB 作为对照。加样量为 50 μ g 蛋白质。(C) ImageJ 软件对 INSR β 的表达量进行定量分析。12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。
Figure 3.1 Western blot showing the decrease in INSR β levels during metamorphosis. (A) The western blot analysis of the antibody-specific detection. The INSR β -His and His tag were overexpressed in the HaEpi cells for 48 h, respectively. Antibody specificity in the epidermis (6th-24 h larvae). INSR β was detected by rabbit pAb anti-insulin receptor β (INSR β), and p-INSR β was detected by rabbit mAb anti-Phospho-insulin receptor β (the antibody diluted with 5% BSA in 1:1,000) as primary antibody. The secondary antibody was HRP labeled-Goat anti-rabbit. 12.5% SDS-PAGE gel. (B) The expression levels of INSR β in tissues. 5F: fifth instar feeding larvae; 5M:

fifth instar molting larvae; 6th-6 h to 6th-120 h: time stages of sixth instar larvae; P 0-P 8: 0 day to 8-day-old pupae; F, feeding; M, molting; MM, metamorphic molting; P, pupae stage. ACTB was detected by the rabbit monoclonal antibody ACTB Rabbit mAb as the internal control. The loading quantity for each lane is 50 μ g proteins. (C) Quantitative analysis of the INSR β expression using ImageJ software. 12.5% SDS-PAGE gel.

为了探究 INSR β 磷酸化水平的变化，我们富集等量的 INSR β 以克服变态期 INSR β 表达量的下降导致的磷酸化水平降低的现象，用抗 p-INSR β 的抗体检测发现，INSR β 的磷酸化水平也在取食期较高而在蜕皮变态期（5F 和 6th-6 h 至 6th-120 h）较低（图 3.2A），用抗 INSR β 的抗体及低浓度 7.5% 的 SDS-PAGE 凝胶检测发现出现两条带（图 3.2B）， λ 磷酸酶处理降低了 p-INSR β 的条带，这说明，上面的条带即为 p-INSR β 的条带，即 INSR β 的磷酸化形式（图 3.2C）。这些结果表明，在变态期 INSR β 的磷酸化水平较低。

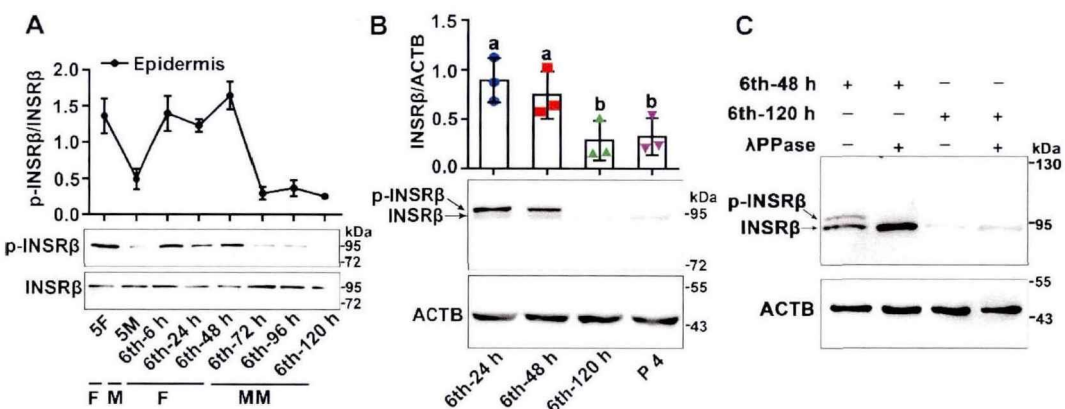


图 3.2 蛋白质免疫印迹分析变态期 INSR β 磷酸化水平降低。(A) 在幼虫表皮发育过程中 INSR β 磷酸化水平的变化。富集等量的 INSR β 蛋白，使用 ImageJ 软件对 INSR β 的磷酸化水平进行定量分析。误差线基于三次生物学重复。12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶。(B) 从六龄 24 h 幼虫到第四天的蛹表皮中 INSR β 的表达和磷酸化水平的变化。P-INSR β 是 INSR β 的磷酸化形式。使用抗 INSR β 的抗体，ACTB 作内参对照。7.5% 的 SDS-PAGE 凝胶。使用 ANOVA 进行统计分析，不同字母代表显著性差异 ($p < 0.05$)，误差线代表着三次重复的平均值 $\pm$ SD。(C) λ -PPase 处理减弱了 p-INSR β 条带。六龄 48 h 和六龄 120 h 的表皮蛋白与 λ -PPase (50 μ L 缓冲液中加入 0.5 μ L λ -PPase 于 30 $^{\circ}$ C 孵育 30 min) 一起孵育。7.5% 的 SDS-PAGE 凝胶。用抗 INSR β 的抗体进行蛋白质免疫印迹检测，ACTB 作内参对照。

Figure 3.2 Western blot showing the decrease in INSR β phosphorylation during metamorphosis. (A) Variation of INSR β phosphorylation levels in epidermis during larval development. The amount of INSR β was affinity-enriched using the antibody to same as the method described. Quantitative analysis of the INSR β phosphorylation using ImageJ software. Error bar was based three biological replicates. 12.5% SDS-PAGE gel. (B) The variation of expression and phosphorylation levels of INSR β in epidermis from sixth instar 24 h larvae to 4-day-old pupae. P-INSR β was the phosphorylated form of INSR β . The antibody against INSR β was used. ACTB was used as the internal reference. 7.5% SDS-PAGE gel. Statistical analysis was conducted using ANOVA, different letters represented significant differences ($p < 0.05$). The bars indicate the mean $\pm$ standard deviations (SD) of three times repetition. (C) λ -PPase decreased the intensity of the p-INSR β band. 6th-48 h and 6th-120 h epidermis proteins were incubated with λ -PPase (0.5 μ L λ -PPase in 50 μ L buffer for 30 min at 30 $^{\circ}$ C). SDS-PAGE gel in western blot was 7.5%. The polyclonal

antibody against INSR β was used for western blotting analysis. ACTB was used as the protein quantity control.

3.2 20E 抑制 INSR β 的表达和磷酸化

棉铃虫幼虫生长至变态期，体内 20E 的滴度从 0.5 μ M 增加至 10 μ M (Di et al., 2020)。为了阐明变态过程中 INSR β 较低的表达量和磷酸化水平的机制，我们首先向六龄 6 h 的幼虫体内分别注射胰岛素和 20E 来探究这些激素对 INSR β 的作用，结果发现：增加胰岛素的浓度，幼虫表皮中的 INSR β 表达水平和磷酸化水平均上升（图 3.3A）。用抗 INSR β 的抗体富集 INSR β 蛋白使 INSR β 蛋白水平均一后，使用抗 p-INSR β 的抗体检测到 INSR β 的磷酸化水平也随胰岛素浓度梯度的增加而增大（图 3.3B）。相反，高浓度的 20E（500 ng）则降低了 INSR β 的表达水平（图 3.3C）以及 INSR β 蛋白富集后的磷酸化水平（图 3.3D），这些结果说明，高浓度的 20E 抑制 INSR β 的表达和磷酸化。

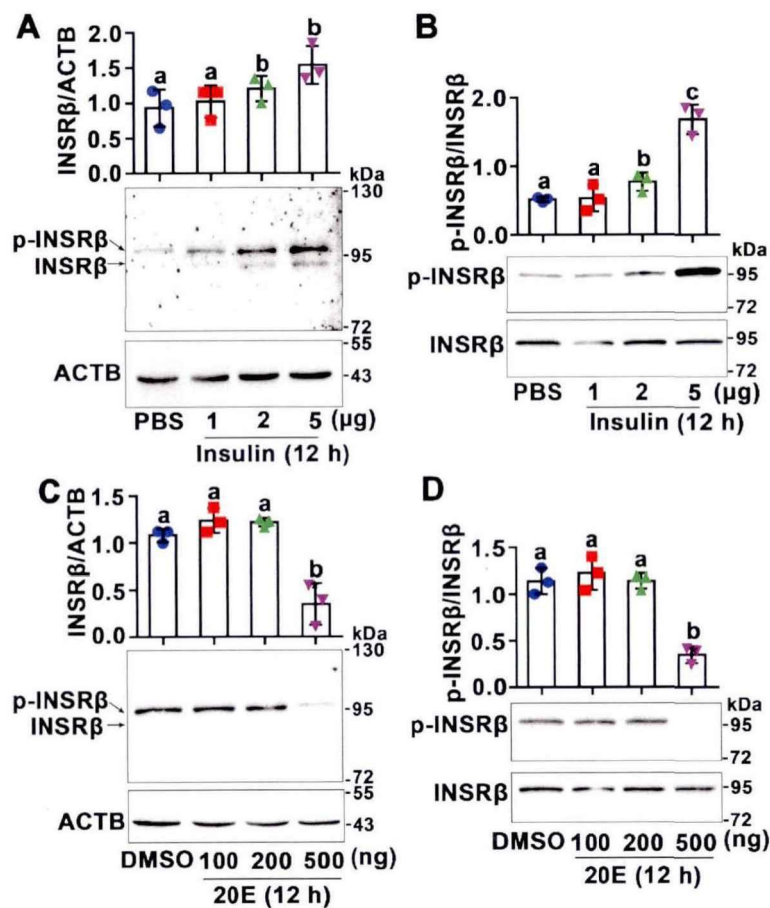


图 3.3 胰岛素和 20E 相互拮抗调控 INSR β 的表达和磷酸化。除特殊说明外，本实验所用凝胶为 7.5% 的 SDS-PAGE 凝胶。（A）胰岛素对幼虫表皮 INSR β 表达量的调节（为与本实验中使用的棉铃虫表皮细胞系保持一致，本文多处使用表皮这种组织做研究）。使用抗 INSR β 抗体。ACTB 作为内参对照。（B）胰岛素对 INSR β 磷酸化的调节。12.5% 的 SDS-PAGE 凝

胶。分别使用抗 INSR β 的抗体和抗 p-INSR β 的抗体。(C) 20E 对幼虫表皮 INSR β 表达量的调节, 使用抗 INSR β 的抗体。ACTB 作为内参对照。(D) 20E 对 INSR β 磷酸化的调节。12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。分别使用抗 INSR β 的抗体和抗 p-INSR β 的抗体。20E 500 ng 相当于体内的 5 μ M, 公式如下: $c = m/MV$, $m = 500 \text{ ng}$, $M = 480 \text{ g/mol}$, $V \approx 200 \text{ }\mu\text{L}$ (六龄 6 h 幼虫)。

Figure 3.3 Insulin and 20E counteractively regulated the abundance and phosphorylation of INSR β . 7.5% SDS-PAGE gel for the experiments in addition to indication. (A) Insulin regulation in the expression of INSR β in the larval epidermis (The purpose of using epidermis in many places in this article is to keep it consistent with our HaEpi cells). The antibody against INSR β was used. ACTB was used as the internal reference. (B) Insulin regulation on the phosphorylation of INSR β after affinity-enrichment of INSR β . 12.5% gel. Antibodies against p-INSR β and INSR β were used, respectively. (C) 20E regulation in the abundance of INSR β in the larval epidermis. The antibody against INSR β was used. ACTB was used as the internal reference. (D) 20E regulation of the phosphorylation of INSR β in the larval epidermis after enrichment of INSR β . 12.5% gel. Antibodies against p-INSR β and INSR β were used, respectively. 500 ng 20E was calculated as 5 μ M 20E *in vivo* by the formula: $c = m/MV$, $m = 500 \text{ ng}$, $M = 480 \text{ g/mol}$, $V \approx 200 \text{ }\mu\text{L}$ of a 6th-6 h larva.

3.3 高浓度 20E 抑制 INSR β 表达和磷酸化的机制

INSR β 结合胰岛素后发生自身磷酸化 (Czech et al., 1985), 因此, 胰岛素缺乏可能是 INSR β 磷酸化水平降低的原因。然而, 通过 38 个家蚕的 ILPs, 8 个果蝇 ILPs (Lin et al., 2017)以及 10 个人的 ILPs 在棉铃虫基因组数据库中比对到 8 个 ILPs (图 3.4)。

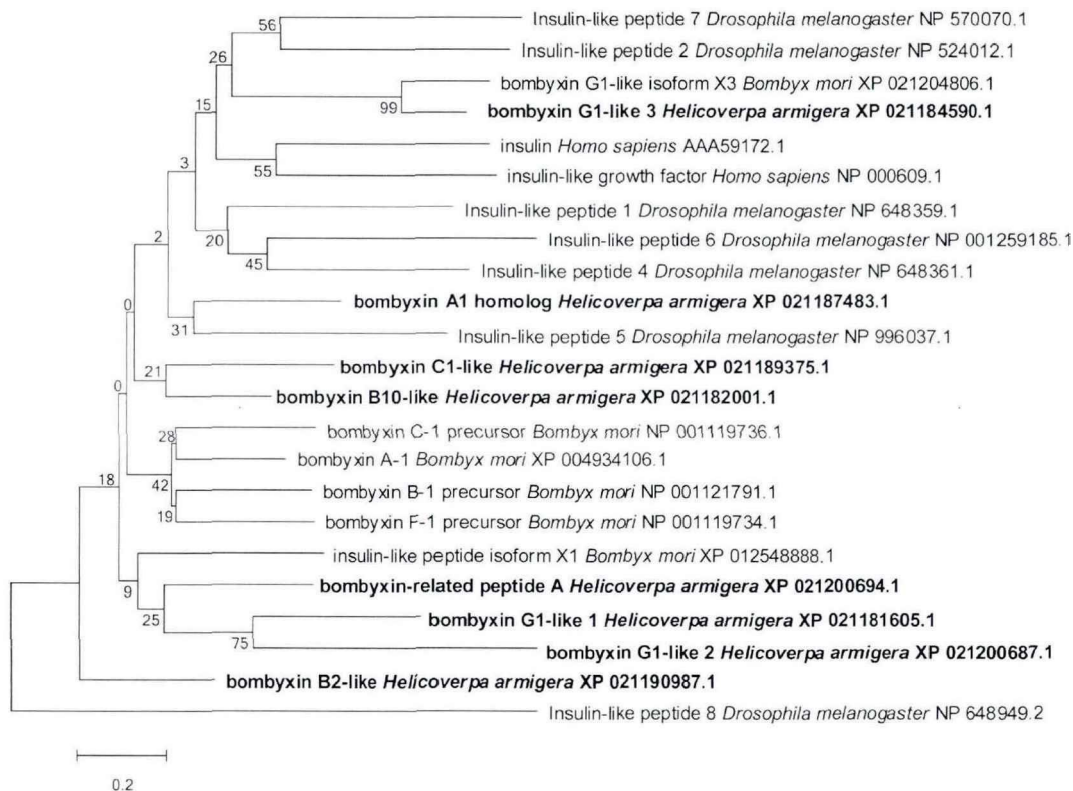


图 3.4 通过 MEGA 6.0 对棉铃虫和其他生物的 ILPs 进行系统发育分析。 图中数字代表亲缘关系水平。XP021200687.1 和 XP021184590.1 是在基因组中未命名的蛋白质, 我们分别将其命名为 bombyxin G1-like 2 和 bombyxin G1-like 3。

Figure 3.4 The phylogenetic analysis of ILPs of *H. armigera* and other organisms by MEGA 6.0 software. The numbers in the picture represent kinship levels. XP 021200687.1 and XP 021184590.1 were uncharacterized proteins in the genome and were identified as bombyxin G1-like 2 and bombyxin G1-like 3 here, respectively.

但这 8 个 ILP 中的哪个 ILP 可以与 INSR 结合是未知的，因此，我们检测了这 8 个 ILP 的基因表达水平。qRT-PCR 结果发现，8 个 ILP 基因的 mRNA 水平均在变态期到蛹期的表皮、中肠和脂肪体中表达量增加（图 3.5A-H），在脑组织中除 *B10-like* 外其他 ILP 的表达水平均在变态期（六龄 96 h）增加（图 3.5I）。与注射 DMSO 的对照组相比向幼虫中注射的 20E 依赖浓度和时间梯度上调 *B2-like*、*B10-like* 和 *C1-like* 的表达（图 3.5J-O）。这些数据表明，大多数 ILP 在变态期表达水平较高，因此，这不是 INSR β 磷酸化水平降低的原因。

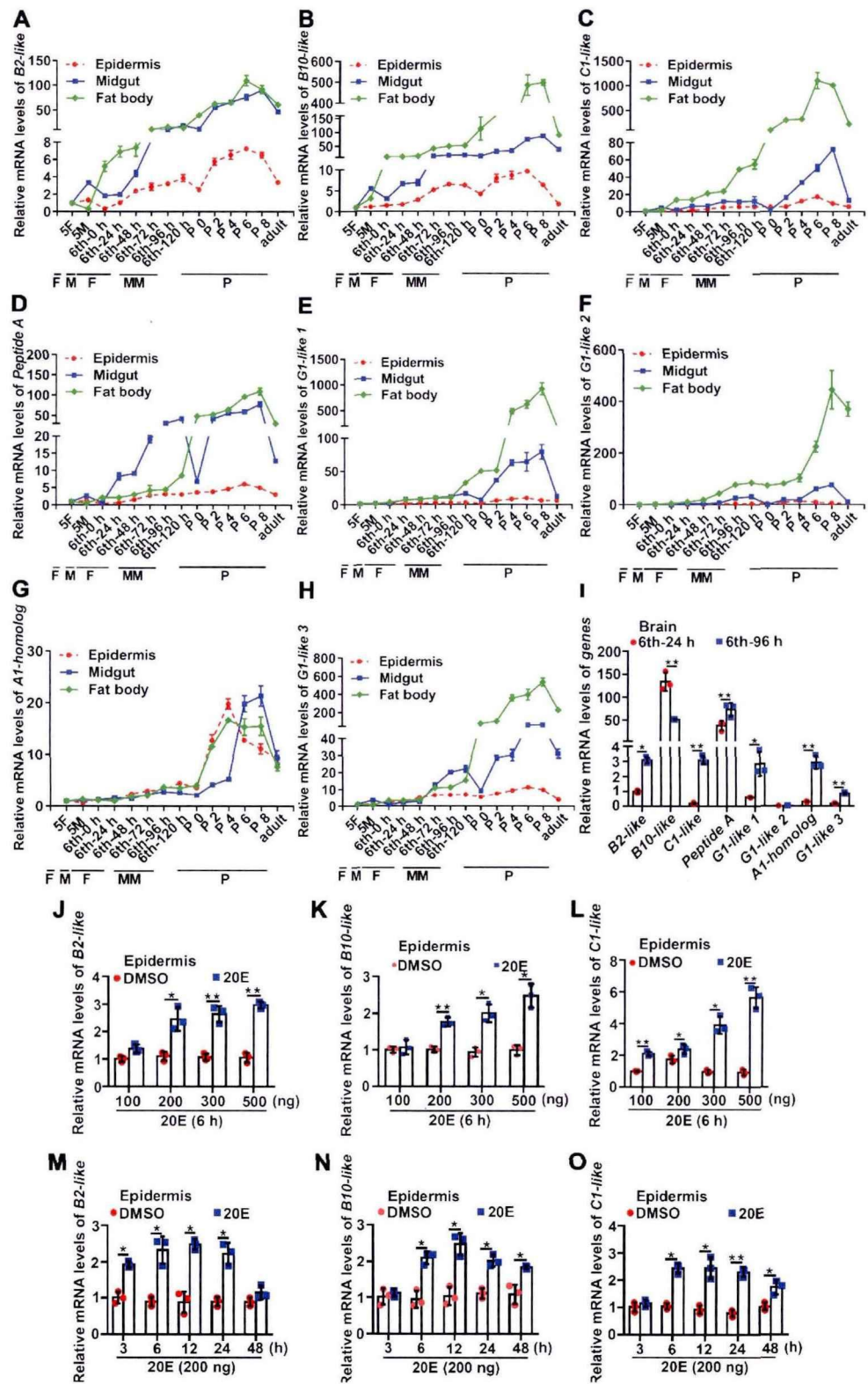


图3.5 qRT-PCR显示ILPs在虫体不同发育阶段及在20E诱导下的表达谱。(A)至(H) qRT-PCR显示幼虫发育过程中8个ILP在表皮, 中肠和脂肪体中的表达情况, ILP的NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 序列号与图3.4一致。误差线表示三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。(I) qRT-PCR显示8个ILP在六龄24h和六龄96h脑中的表达情况。(J)至(O) 20E依赖浓度及时间梯度对表皮中ILPs-B2-like, B10-like和C1-like表达的影响。

用同比稀释的 DMSO 作对照。均通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算所有相对 mRNA 水平，误差线表示三次生物学重复的平均值 $\pm$ SD。(I) 至 (O) 用 t 检验进行显著性差异分析 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$)。

Figure 3.5 qRT-PCR showing the expression profiles of *ILPs* and 20E induction. (A) to (H) qRT-PCR showing the expression profiles of eight *ILPs* in epidermis, midgut and fat body during larval development. The NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) reference sequence numbers of all *ILPs* are same as Fig 3.4. The bars indicate the mean $\pm$ SD of three biological replicates. (I) qRT-PCR showing the expression profiles of eight *ILPs* in brain at 6th-24 h and 6th-96 h. (J) to (O) Effect of 20E on the expression of *ILPs-B2-like*, *B10-like* and *C1-like* in epidermis by dose and time. Equal diluted DMSO was used as a control. All the relative mRNA levels were calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$, and the bars indicate the mean $\pm$ SD of three biological replicates. Significant differences were calculated using Student's t -test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) according to three replicates in all qRT-PCRs in (I) to (O).

我们推测 20E 可能通过某种蛋白磷酸酶使 *INSR* β 去磷酸化。用蛋白质合成抑制剂-环己酰亚胺 (CHX) 验证这一假设，结果发现，与 PBS 相比，胰岛素诱导 *INSR* β 磷酸化；与 DMSO 相比，20E 则抑制 *INSR* β 磷酸化。然而，在用 CHX 培养细胞后，20E 不能抑制 *INSR* β 磷酸化 (图 3.6A 和 B)，这说明 20E 通过促进某些蛋白质的合成来抑制了 *INSR* β 的磷酸化。进一步的实验表明，添加磷酸酶抑制剂抑制了 20E 诱导的 *INSR* β 的去磷酸化 (图 3.6C 和 D)，这意味着 20E 通过蛋白磷酸酶使 *INSR* β 去磷酸化。

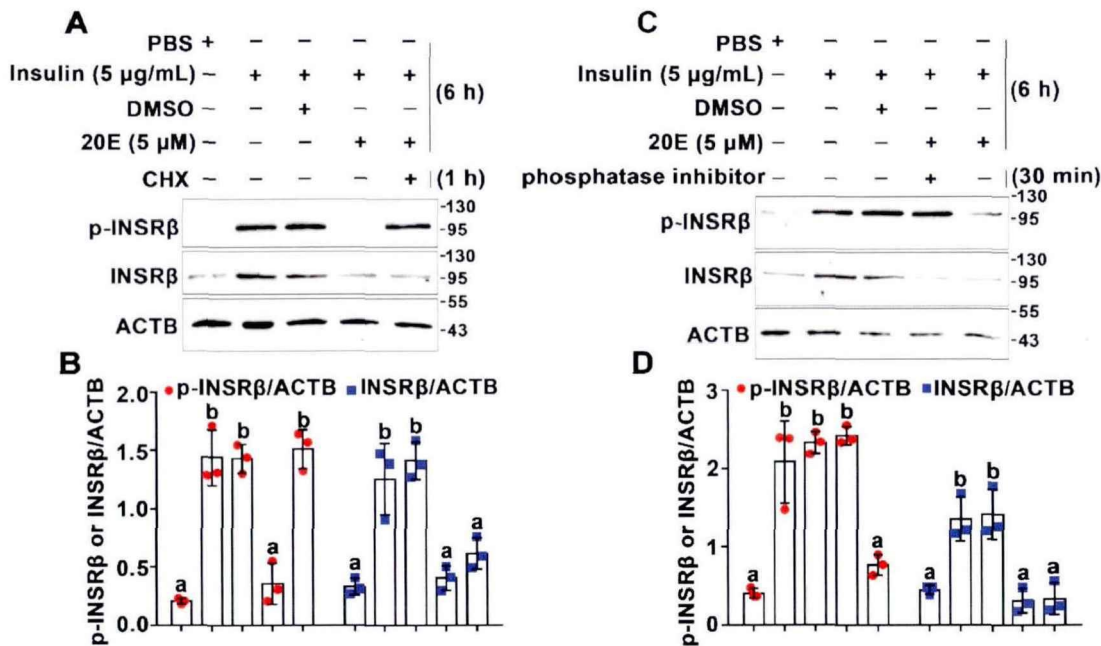


图 3.6 CHX 和磷酸酶抑制剂均抑制了 20E 诱导的 *INSR* β 去磷酸化。 (A) 50 μ M CHX 处理 HaEpi 细胞 1 h 对 20E 诱导的 *INSR* β 去磷酸化的影响。(B) 用 ANOVA 对 (A) 的统计分析。(C) 磷酸酶抑制剂处理 HaEpi 细胞对 20E 诱导的 *INSR* β 去磷酸化的影响。(D) 用 ANOVA 对 (C) 的统计分析，不同的字母代表显著性差异 ($p < 0.05$)，误差线代表三次重复的平均值 $\pm$ SD。使用 ImageJ 软件进行图像数据转换。

Figure 3.6 20E-induced dephosphorylation of INSR β was repressed by cycloheximide and a phosphatase inhibitor cocktail. (A) The effect of cycloheximide on 20E-induced dephosphorylation of INSR β in HaEpi cells (50 μ M for 1 h). **(B)** Statistical analysis of (A) using ANOVA. **(C)** The effect of a phosphatase inhibitor cocktail on 20E-induced dephosphorylation of INSR β in HaEpi cells. 12.5% gel. **(D)** Statistical analysis of (C) using ANOVA, different letters represented significant differences ($p < 0.05$). The bars indicate the mean $\pm$ SD of three times repetition. ImageJ software was used to transform the image data.

3.4 PTP1B 使 INSR β 去磷酸化

为了确定使 INSR β 去磷酸化的磷酸酶，我们从本实验室测定的六龄 24 h（取食期）和六龄 72 h（变态期）幼虫中肠的转录组数据库中鉴定出三个在变态期高表达的蛋白酪氨酸磷酸酶（PTPase）基因，*Ptpn1*、*Mtmr6* 和 *Ptprn2*。因转录组数据仅测一次，我们用 qRT-PCR 进一步进行了验证，检测这些磷酸酶在各发育阶段及各组织中的表达谱发现，与取食期相比，三种蛋白磷酸酶的转录水平在变态期幼虫中肠中的表达量显著增加（图 3.7A）并且 20E 上调了它们的表达（图 3.7B），这表明它们可能参与了 20E 诱导的 INSR β 去磷酸化。为了确定这三个磷酸酶中具体是哪个发挥作用使得 INSR β 去磷酸化，我们采用 RNAi 技术在 HaEpi 细胞系中分别敲降了这三种磷酸酶的表达。与 PBS 的对照组相比，胰岛素诱导 INSR β 磷酸化；与 DMSO 对照组相比，20E 诱导 INSR β 去磷酸化，然而敲降 *Ptpn1* 维持了 INSR β 的磷酸化状态，敲降 *Mtmr6* 和 *Ptprn2*，与 *dsGFP* 的对照组相比，20E 仍然能诱导 INSR β 去磷酸化（图 3.7C 和 D）。用抗 INSR β 的抗体进行免疫共沉淀（Co-IP）发现，过表达的 PTP1B-GFP-His 蛋白可以在 20E 的诱导下与 INSR β 直接相互作用（图 3.7E）。这些数据说明由 *Ptpn1* 编码的 PTP1B 使 INSR β 去磷酸化。

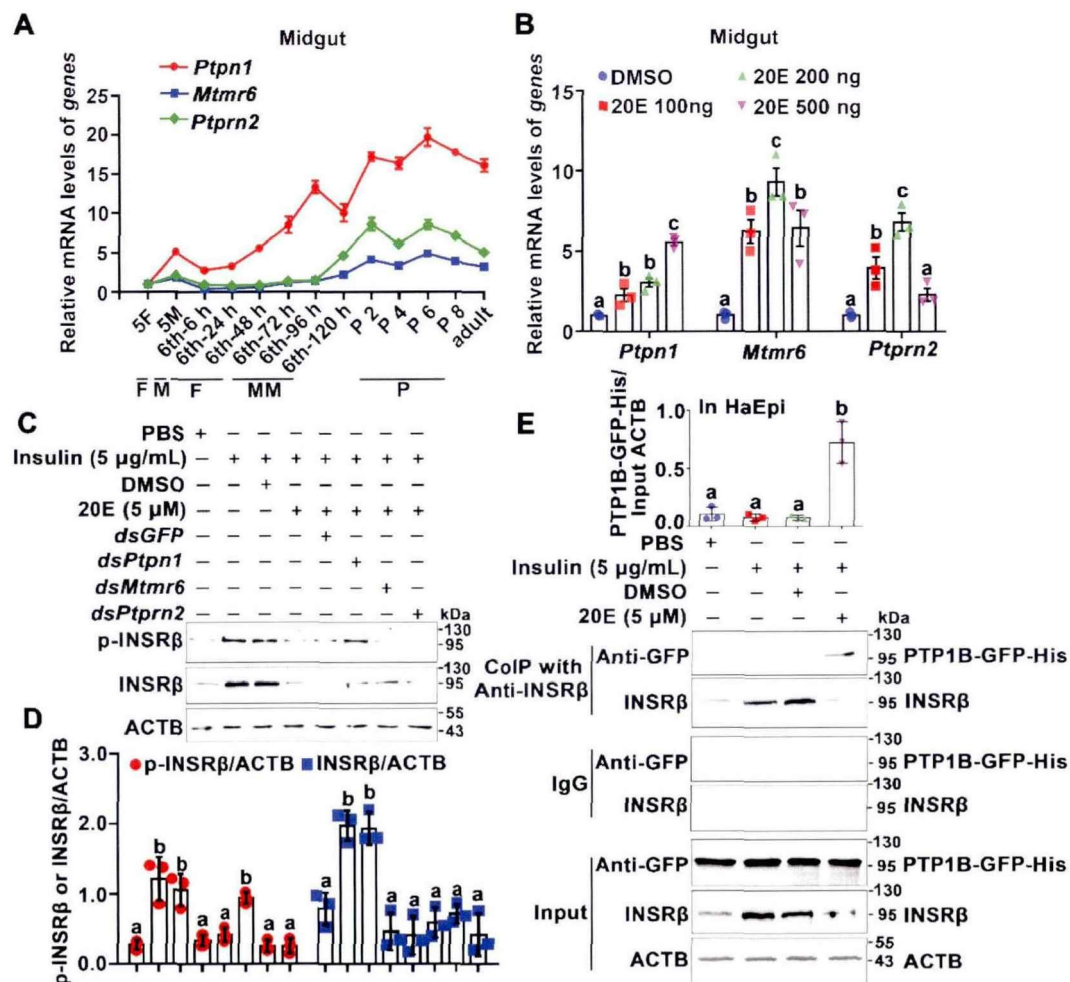


图 3.7 PTP1B 参与 20E 诱导的 INSR β 去磷酸化。(A) qRT-PCR 分析基于三次重复的棉铃虫中肠中 *Ptpn1*、*Mtmr6* 和 *Ptpn2* 的表达谱。(B) 20E 上调幼虫中肠中三个磷酸酶的表达。向六龄 6h 幼虫体内注射不同浓度的 20E，以等体积的 DMSO 作为对照。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 mRNA 的水平。误差线代表着三次重复的平均值 $\pm$ SD。用 ANOVA 进行统计分析，不同的字母代表着显著性差异 ($p < 0.05$)。(C) 敲降 *Ptpn1* 20E 不能诱导 INSR β 去磷酸化。用 4 μ g dsGFP 或 dsPTPases 转染细胞静置 48 h，加入 20E (5 μ M) 和胰岛素 (5 μ g/mL) 刺激 6 h。12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶，ACTB 做对照。(D) 用 ANOVA 对 (C) 的统计分析，不同的字母代表着显著性差异 ($p < 0.05$)，误差线代表着三次重复的平均值 $\pm$ SD。使用 ImageJ 软件对图像数据进行转换。(E) Co-IP 显示 INSR β 和 PTP1B-GFP-His 之间的相互作用。PTP1B-GFP-His 转染 48 h 后，用 PBS，胰岛素 (5 μ g/mL)，胰岛素加 DMSO 或胰岛素加 20E (5 μ M) 处理细胞 6 h，蛋白质免疫印迹检测 HaEpi 细胞中的 INSR β 、PTP1B-GFP-His 和 ACTB 蛋白表达水平，用抗 INSR β 的抗体免疫沉淀 INSR β ，用抗 GFP 的抗体检测共沉淀的 PTP1B-GFP-His，IgG 兔抗作为抗体的阴性对照。12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶。用 ANOVA 进行统计分析，不同的字母代表着显著性差异 ($p < 0.05$)，误差线代表着三次重复的平均值 $\pm$ SD。使用 ImageJ 软件对图像数据进行转换。

Figure 3.7 PTP1B was identified as being involved in 20E-induced dephosphorylation of INSR β . (A) qRT-PCR showing the mRNA expression profiles of *Ptpn1*, *Mtmr6* and *Ptpn2* in *H. armigera* midgut during development based three repeats. (B) 20E upregulated the expression of three PTPases in the larval midgut. The 6th instar 6 h larvae were injected different concentrations of 20E for 6 h. Equal volume DMSO was used as a control. All the relative mRNA levels were calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$. The bars indicate the mean $\pm$ SD of three times repetition. Statistical analysis was conducted using ANOVA, different letters represented significant differences ($p < 0.05$). (C) Knockdown of *Ptpn1*, INSR β could not be dephosphorylated by 20E induction. The cells were

transfected with 4 μg of *dsGFP* or *dsPTPases* for 48 h. 20E (5 μM) and insulin (5 $\mu\text{g/mL}$) were added to the cells for 6 h. 12.5% SDS-PAGE. ACTB as the control. (D) Statistical analysis of (C) using ANOVA, different letters represented significant differences ($p < 0.05$). The bars indicate the mean $\pm$ SD of three replicates. ImageJ software was used to transform the image data. (E) Co-IP showed the interaction between INSR β and PTP1B-GFP-His. The cells were treated with PBS, insulin (5 $\mu\text{g/mL}$), insulin plus DMSO, or insulin plus 5 μM 20E for 6 h after transfected with PTP1B-GFP-His for 48 h. The protein expression levels of INSR, PTP1B-GFP-His and ACTB in HaEpi cells were detected via western blotting following 12.5% SDS-PAGE. INSR was immunoprecipitated with anti-INSR β , and the co-precipitated PTP1B-GFP-His was detected via western blotting analysis using an anti-GFP mAb. Rabbit IgG was used as negative control of the antibody. Statistical analysis was conducted using ANOVA, different letters represented significant differences ($p < 0.05$). The bars indicate the mean $\pm$ SD of three replicates. ImageJ software was used to transform the image data.

3.5 PTEN 通过调节 FoxO 核定位上调 PTP1B 表达参与 INSR β 去磷酸化并抑制 INSR β 表达

PTEN 是一种双功能磷酸酶，既有蛋白质磷酸酶的活性又具有脂质磷酸酶的活性 (Jamaspishvili et al., 2018)。在变态期 PTEN 能被 20E 上调 (Cai et al., 2016)。因此，我们也对其是否参与 INSR β 去磷酸化进行了探究。从棉铃虫变态期到蛹期的表皮，中肠和脂肪体中，*Pten* 的 mRNA 水平增加 (图 3.8A)。用 JASPAR 在线软件 (<http://jaspardev.genereg.net/>) 预测到 *Pten* 的启动子区域存在 20E 的受体 EcR 的结合元件 (EcRE) 5'-AATGGCAATGACTAC -3' (相对于 ATG 的-1060 到-1074 bp)。在 HaEpi 细胞系中，20E 诱导 INSR β 去磷酸化，而敲降 *Pten* 阻断了 20E 诱导的 INSR β 去磷酸化。相对而言，与过表达 GFP 的细胞相比，在没有 20E 诱导的情况下过表达 *Pten* 降低了 INSR β 的磷酸化水平 (图 3.8B)。统计分析数据进一步证实了这一结果 (图 3.8C)。

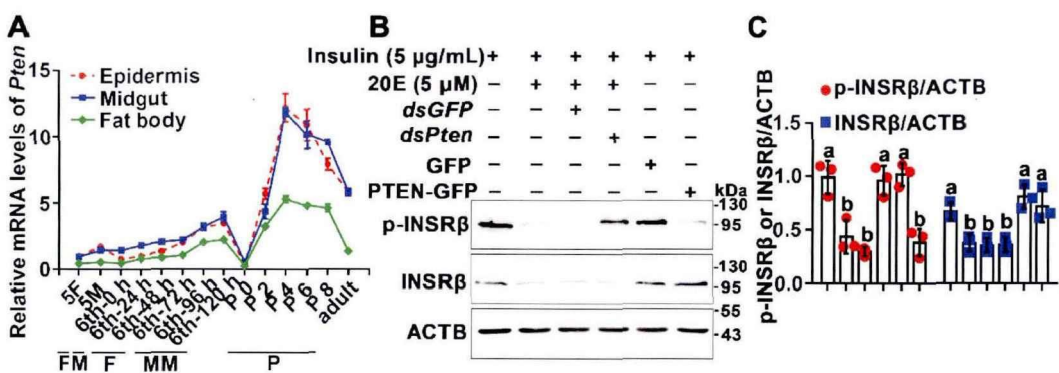


图 3.8 PTEN 参与 20E 诱导的 INSR β 去磷酸化。(A) qRT-PCR 分析在不同发育阶段各组织中 *Pten* 的表达谱，*Actb* 作为对照。(B) 蛋白质免疫印迹分析敲降 *Pten* 或过表达 *Pten* 对 INSR β 的影响。12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。(C) 用 ANOVA 对 (B) 的统计分析，不同的字母代表显著性差异 ($p < 0.05$)，误差线表示三次重复的平均值 $\pm$ SD。使用 ImageJ 软件进行图像数据转换。

Figure 3.8 PTEN is involved in 20E-induced dephosphorylation of INSR β . (A) qRT-PCR

showing the expression profiles of *Pten* in various tissues during development, with *Actb* as the quantity and quality control. (B) Western blotting showing the effect of knockdown of *Pten* or overexpression of *Pten* in HaEpi cells on INSR β . 12.5% SDS-PAGE. (C) Statistical analysis of (B) using ANOVA, different letters represented significant differences ($p < 0.05$). The bars indicate the mean $\pm$ SD of three times repetition. ImageJ software was used to transform the image data.

与 DMSO 对照组相比，20E 依赖浓度梯度和时间梯度增加了 *Pten* 的 mRNA 水平（图 3.9A 和 B）。qRT-PCR 进一步验证了上述实验中 *Pten* 的干扰效率（图 3.9C）以及蛋白质免疫印迹验证 *Pten* 的过表达（图 3.9D）。然而，Co-IP 实验没有检测到 PTEN 和 INSR β 之间的相互作用（图 3.9E）。这些结果说明 PTEN 参与了 INSR β 的去磷酸化，但不能与 INSR β 直接相互作用。

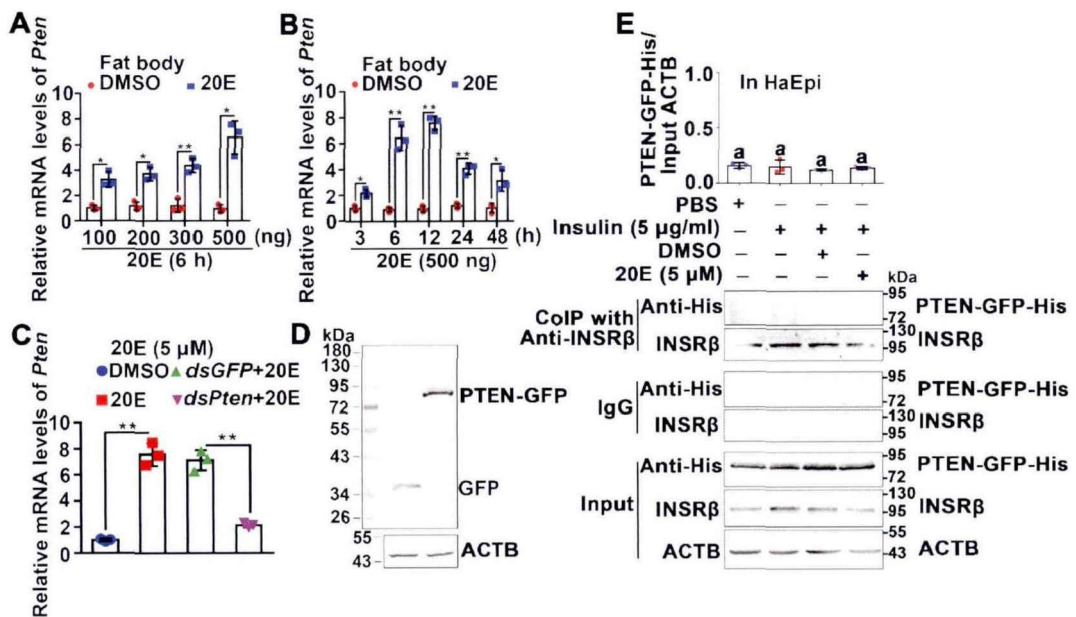


图 3.9 20E 不能诱导 PTEN 与 INSR β 直接相互作用。 (A) 和 (B) qRT-PCR 分析在幼虫表皮中 20E 依赖浓度和时间梯度调控 *Pten* 的表达。注射等量的 DMSO 作为对照。(C) qRT-PCR 分析 *Pten* 的干扰效率。DMSO 作为 20E 的溶剂对照，*dsGFP* 作为 *dsPten* 的对照。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 mRNA 的水平。用 *t* 检验进行显著性差异分析 ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$)，误差线代表着三次重复的平均值 $\pm$ SD。(D) 表皮细胞中过表达 PTEN 的蛋白质免疫印迹分析。12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。(E) Co-IP 检测 PTEN 和 INSR β 的结合。PTEN-GFP-His 质粒转染细胞培养 48 h 后加入激素继续培养 6 h。蛋白质免疫印迹检测 HaEpi 细胞中的 INSR β ，PTEN-GFP-His 和 ACTB 蛋白表达水平，用抗 INSR β 的抗体免疫沉淀 INSR β ，用抗 GFP 的抗体检测共沉淀的 PTEN-GFP-His，IgG 兔抗作为抗体的阴性对照。12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。用 ANOVA 进行统计分析，不同的字母代表着显著性差异 ($p < 0.05$)，误差线代表着三次重复的平均值 $\pm$ SD。使用 ImageJ 软件进行图像数据转换。

Figure 3.9 PTEN cannot interact with INSR β by 20E induction. (A) and (B) qRT-PCR analysis of 20E regulation on *Pten* mRNA in larval epidermis by dose and time. Equal volume of diluted DMSO was injected as control. (C) The efficacy of *Pten* knockdown by qRT-PCR analysis. DMSO was a solvent control for 20E. *dsGFP* was the control of *dsPten*. The relative mRNA level was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$. The statistical analysis was performed using three times repetition by Student's *t*-test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) and the bars indicate the mean $\pm$ SD. (D) Efficacy of PTEN overexpression in HaEpi cells. 12.5% SDS-PAGE. (E) Co-IP of INSR β and PTEN. The cells, after transfected with PTEN-GFP-His plasmid for 48 h, were incubated for 6 h with various reagents. The protein levels of INSR β , PTEN-GFP-His and ACTB in HaEpi cells were detected via western

blotting with 12.5% SDS-PAGE. INSR was immunoprecipitated with anti-INSR β , and PTEN-GFP-His was detected using an anti-His mAb. Rabbit IgG was used as negative control of the antibody. Statistical analysis was conducted using ANOVA, different letters represented significant differences ($p < 0.05$). The bars indicate the mean $\pm$ SD of three replicates. ImageJ software was used to transform the image data.

先前的研究发现, 在 20E 诱导下, PTEN 可通过抑制棉铃虫体内 AKT 和 FoxO 的磷酸化来诱导 FoxO 核定位 (Cai et al., 2016)。因此, PTEN 可能通过调节 FoxO 核定位来促进 *Ptpn1* 的表达进而在 20E 诱导的 INSR β 去磷酸化中发挥作用。我们在细胞系上过表达带 GFP 标签的 FoxO 蛋白来探究 PTEN 参与 20E 诱导的 INSR β 去磷酸化过程的机制, GFP 蛋白表达后的绿色荧光可以显示 FoxO 的亚细胞定位。过表达 FoxO-GFP 的蛋白在 PBS 处理下定位于细胞核中, 胰岛素诱导使其定位于细胞质中, 20E 则与胰岛素作用相反, 使得 FoxO-GFP 入核。然而, 与 *dsRFP* 加胰岛素和 20E 的对照组相比, 敲降 *Pten* 后, 20E 则不能使 FoxO-GFP 定位于细胞核中 (图 3.10A)。这证明 PTEN 决定了 FoxO-GFP 的核定位。

我们探究了 FoxO-GFP 的核定位对于 PTP1B 表达的影响。用 JASPAR 在线软件预测到 *Ptpn1* 的启动子区域存在 FoxO 的结合元件 (FoxOBE) 5'-TTGTTAAC-3' (相对于 ATG 的-980 到-973 bp), 这与棉铃虫 BrZ7 启动子区域的 FoxOBE 序列 (5'-TTGTTTAC-3') 非常相似 (Cai et al., 2016)。在过表达 FoxO-GFP 的细胞中, *Ptpn1* 的表达水平与过表达 GFP 的对照组相比显著增加 (图 3.10B), 表明过表达 FoxO-GFP 能上调 *Ptpn1* 的表达。ChIP 分析表明, 与 DMSO 的对照组相比, 在 20E 处理下, FoxO-GFP 结合更多 *Ptpn1* 启动子区域的 FoxOBE (引物 FoxOBE-*Ptpn1*-F/FoxOBE-*Ptpn1*-R 指 *Ptpn1* 基因启动子区包含 FoxOBE 的片段所设计的引物, 如表 3.1 所示)。IgG 阴性对照和 *Ptpn1* 基因的引物 (*Ptpn1*-F/R 位于 *Ptpn1* 的开放阅读框中) 没有出现相同的结果 (图 3.10C)。这些结果说明 20E 通过 FoxO 促进 *Ptpn1* 的转录。

在 *Insr* 基因的启动子区预测到另一个 FoxOBE 5'-TGTTTAC-3' (相对于 ATG 的-1835 到-1829 bp), 因此我们探究了 FoxO-GFP 的核定位对 INSR β 表达水平的影响。在过表达 FoxO-GFP 的细胞中, PTP1B 不仅能降低 INSR β 的磷酸化水平, 其蛋白表达水平也有所下降 (图 3.10D)。这表明过表达 FoxO-GFP 抑制 INSR β 的表达。ChIP 结果进一步说明了与 GFP 对照组相比, FoxO-GFP 结合更多 *Insr* 启动子区域的 FoxOBE (引物 FoxOBE-*Insr*-F/FoxOBE-*Insr*-R 指 *Insr* 基因启动子

区包含 FoxOBE 的片段所设计的引物, 如表 3.1 所示)。IgG 阴性对照和 *Insr* 基因的引物 (*Insr*-F/R 位于 *Insr* 的开放阅读框中) 没有出现相同的结果 (图 3.10E)。这些结果说明 FoxO 抑制 *Insr* 的转录。

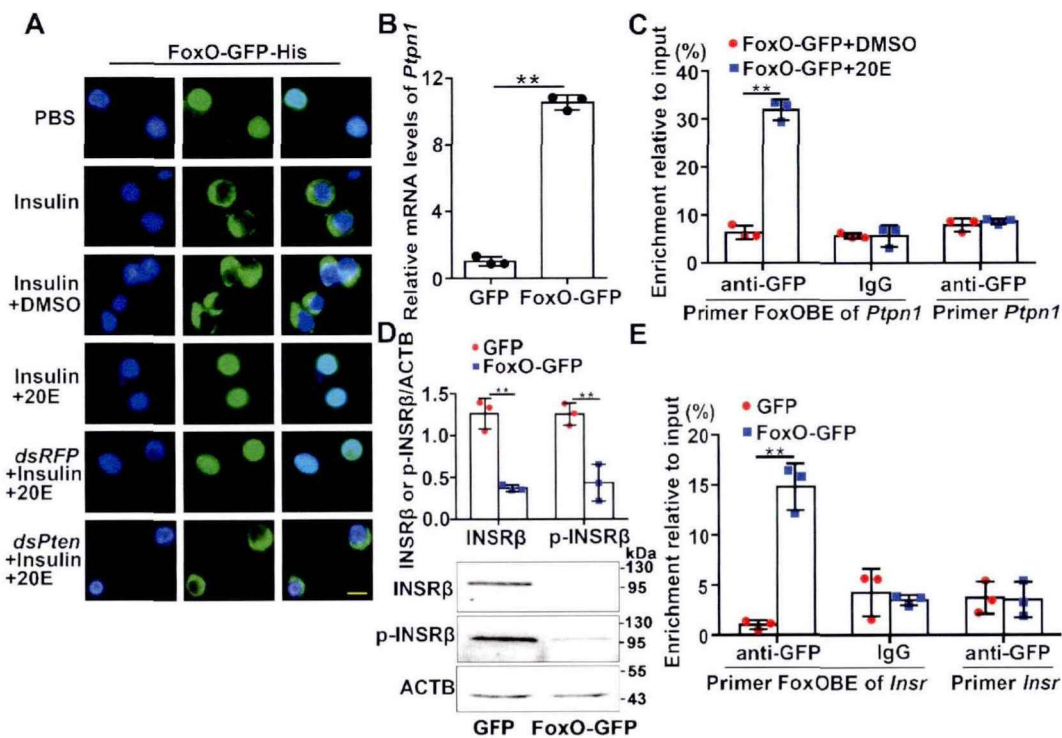


图 3.10 PTEN 决定 FoxO 的核定位以及 FoxO 在 20E 和胰岛素途径中相反的转录功能。 (A) 在没有 FBS 的不同激素处理条件下 (胰岛素 5 μg/mL, 20E 5 μM 刺激 6 h, 细胞系中添加 4 μg dsRNA 培养 48 h) FoxO-GFP-His 的亚细胞定位。绿色: FoxO-GFP 的绿色荧光。蓝色: DAPI 标记的细胞核。标尺=20 μm。 (B) qRT-PCR 分析在 HaEpi 中过表达 FoxO-GFP 上调了 *Ptpn1* 的表达水平。 (C) ChIP 分析 20E 诱导的 FoxO 与 *Ptpn1* 启动子区域的 FoxOBE 结合。在 HaEpi 细胞系过表达 FoxO-GFP-His 48 h 后加 5μM 20E 或 DMSO 处理 6 h。Input: 未经免疫沉淀的染色质; IgG: 非特异性兔抗 IgG; Primer FoxOBE of *Ptpn1*: *Ptpn1* 基因启动子区包含 FoxOBE 的序列引物; Primer *Ptpn1*: 针对 *Ptpn1* 开放阅读框序列设计的引物。 (D) 蛋白质免疫印迹检测过表达 FoxO-GFP 抑制 INSRβ 的表达和磷酸化水平。12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。使用抗 INSRβ 的抗体和抗 p-INSRβ 的抗体分别检测 INSRβ 的表达和磷酸化水平。使用 ImageJ 软件进行图像数据转换。 (E) ChIP 分析 FoxO 与 *Insr* 启动子区域的 FoxOBE 结合。在 HaEpi 细胞系过表达 FoxO-GFP-His 48 h。Input: 未经免疫沉淀的染色质; IgG: 非特异性兔抗 IgG; Primer FoxOBE of *Insr*: *Insr* 基因启动子区包含 FoxOBE 的序列引物; Primer *Insr*: 针对 *Insr* 开放阅读框序列设计的引物。所有实验均重复三次, 用 *t* 检验进行显著性差异分析 (***p* < 0.01), 误差线表示三次重复的平均值±SD。

Figure 3.10 PTEN determined FoxO nuclear localization and its opposite transcriptional functions in the 20E and insulin pathway. (A) The subcellular localization of FoxO-GFP-His in the cells in various conditions (insulin 5 μg/mL, 20E 5 μM for 6 h, 4 μg of dsRNA for 48 h) without FBS. Green: green fluorescence from FoxO-GFP. Blue: nucleus stained with DAPI. Scale bars: 20 μm. (B) qRT-PCR showing the increased *Ptpn1* expression levels after overexpression of FoxO-GFP in HaEpi cells. (C) ChIP analysis of 20E-induced FoxO binding to the FoxOBE in the *Ptpn1* promoter region. FoxO-GFP-His was overexpressed in HaEpi cells for 48 h followed by inducing of 5 μM 20E or DMSO for 6 h. Input: non-immunoprecipitated chromatin. IgG: nonspecific rabbit IgG. Primer FoxOBE of *Ptpn1*: primers targeted the *Ptpn1* FoxOBE-containing sequence. Primer *Ptpn1*: primers targeted to *Ptpn1* ORF. (D) Western blotting showing the repression of INSRβ

expression and phosphorylation by the overexpression of FoxO-GFP. 12.5% SDS-PAGE gel. Antibodies against INSR β and p-INSR β were used to detect the INSR β expression and phosphorylation levels. All statistical analyses of the density of western blotting bands were performed with ImageJ software. (E) ChIP analysis of FoxO binding to the FoxOBE in the *Insr* promoter region. FoxO-GFP-His or GFP-His were overexpressed in HaEpi cells for 48 h. Input: non-immunoprecipitated chromatin. IgG: nonspecific rabbit IgG. Primer FoxOBE of *Insr*: primers targeted the *Insr* FoxOBE-containing sequence. Primer *Insr*: primers targeted to *Insr* ORF. All the experiments were performed in triplicate, and statistical analysis was conducted using Student's *t*-test (***p* < 0.01). The bars indicate mean $\pm$ SD.

通过蛋白质印迹证实了 FoxO-GFP 和 GFP 在 HaEpi 细胞系中的过表达（图 3.11A）。过表达 GFP 的对照组没有出现类似 FoxO-GFP 的亚细胞定位变化（图 3.11B）。这进一步证实了 PTEN 决定 FoxO-GFP 的核定位。

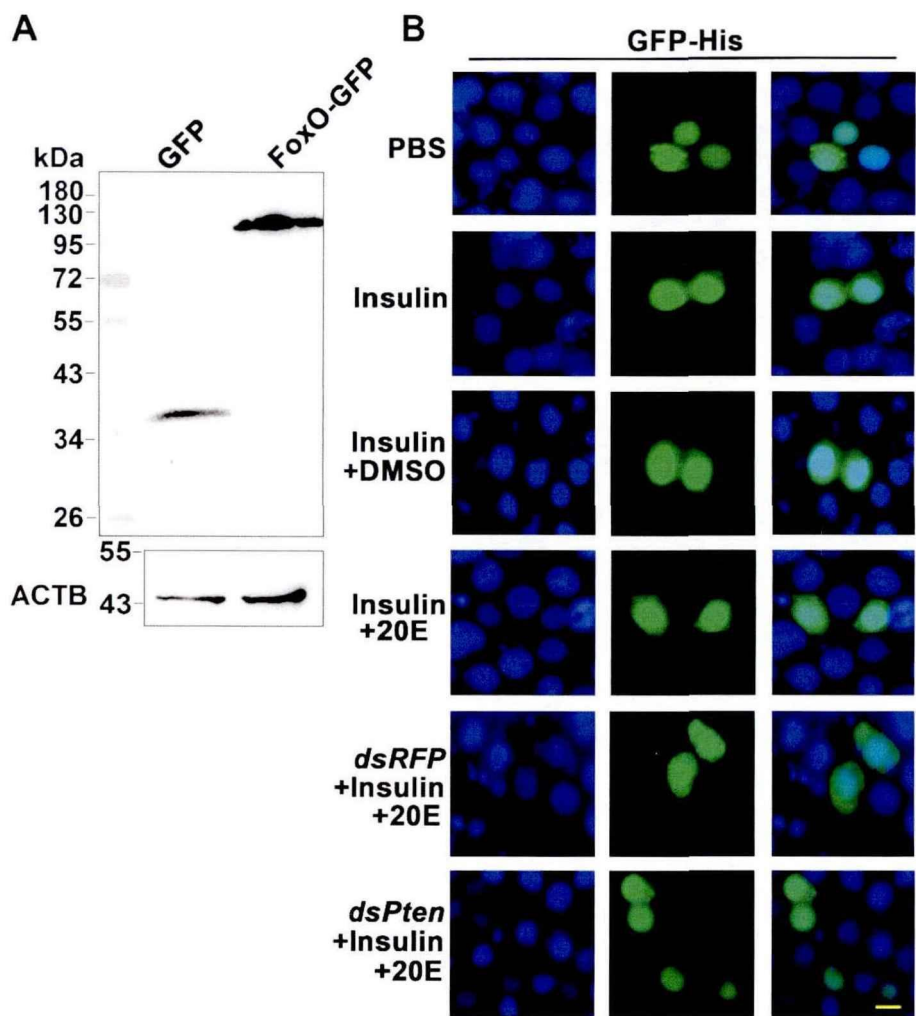


图 3.11 PTEN 不影响 GFP-His 的亚细胞定位。(A) 在 HaEpi 细胞系中过表达 FoxO-GFP 和 GFP 标签蛋白培养 48 h。抗 GFP 的抗体作为一抗，HRP 标记的山羊抗小鼠的抗体作为二抗。(B) 在没有 FBS 的不同激素处理条件下（胰岛素 5 μ g/mL, 20E 5 μ M 刺激 6 h，细胞系中添加 4 μ g *dsRNA* 培养 48 h）GFP-His 的亚细胞定位。绿色： GFP 蛋白的绿色荧光。蓝色： DAPI 标记的细胞核。标尺=20 μ m。

Figure 3.11 The subcellular localization of GFP-His tag was not affected by PTEN. (A) Overexpression of FoxO-GFP and the GFP tag in HaEpi cells for 48 h. Anti-GFP was used as

primary antibody. The secondary antibody was HRP labeled-Goat anti-mouse. **(B)** The subcellular localization of GFP-His tag in the cells in various conditions (insulin 5 $\mu\text{g/mL}$, 20E 5 μM for 6 h, 4 μg of dsRNA for 48 h) without FBS. Green: green fluorescence from GFP. Blue: nucleus stained with DAPI. Scale bars: 20 μm .

3.6 敲降幼虫体内的 *Ptpn1* 维持 INSR β 磷酸化状态导致 20E 滴度升高促使幼虫提前化蛹并化小蛹

为了检测 PTP1B 在虫体内的功能，通过向六龄幼虫体内注射 *dsRNA* 来敲降 *Ptpn1*。qRT-PCR 结果显示 *Ptpn1* 的表达量在幼虫表皮中被成功敲降（图 3.12A）。注射 *dsPtpn1* 后，INSR β 的磷酸化水平显著高于 *dsGFP* 对照组（图 3.12B），这证实了体内的 PTP1B 使 INSR β 去磷酸化的作用。结果发现，敲降 *Ptpn1* 后最主要的表型是形成了小蛹（图 3.12C-E）并且与对照组相比延迟化蛹（图 3.12F）。此外，在 *dsPtpn1* 的实验组中，幼虫中肠呈现红色，这通常发生在变态期代表幼虫中肠细胞的程序性死亡（Hakim et al., 2010; Wang et al., 2007），但在注射 *dsGFP* 的对照组并没有出现中肠变红的现象（图 3.12G）。这表明 *dsPtpn1* 的实验组幼虫比对照组更早进入变态时期。血淋巴中 20E 的滴度约为 5 μM ，显著高于对照组的 20E 滴度（约 2.5 μM ）（图 3.12H）。这表明维持 INSR β 的磷酸化水平增加了 20E 的滴度，导致提前化蛹。

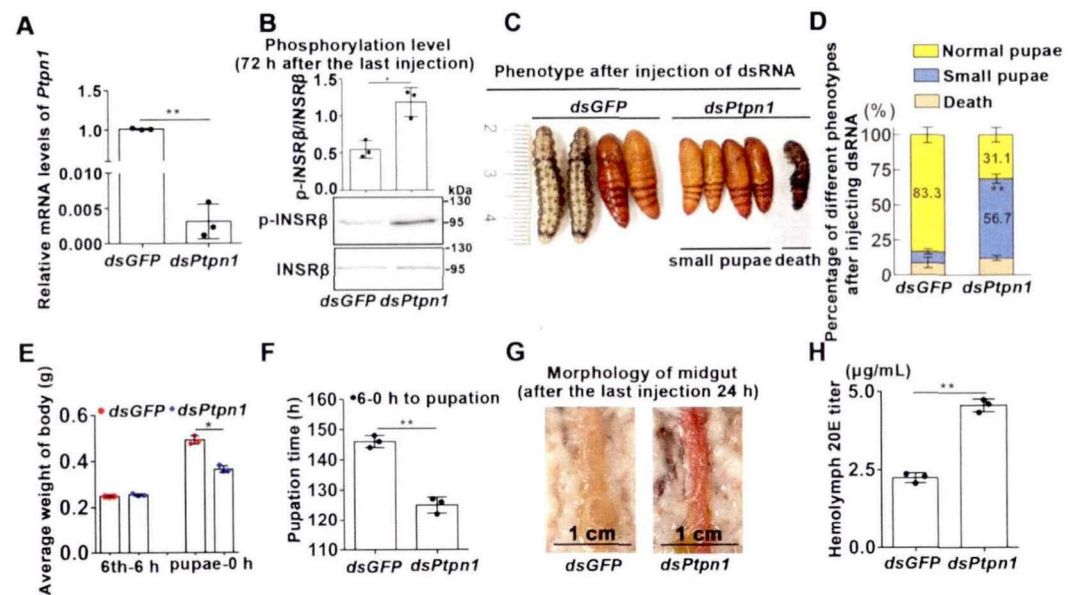


图 3.12 通过 RNAi 在幼虫中敲降 *Ptpn1* 缩短了虫体化蛹时间，化小蛹，增加 20E 滴度。
(A) qRT-PCR 分析 *Ptpn1* 的干扰效率（首次注射 *dsPtpn1* 或 *dsGFP* 于六龄 6 h 幼虫中，24 h 后再注射一次，1.5 μg *dsRNA*/幼虫）。(B) 蛋白质免疫印迹结果显示，与 *dsGFP* 对照组相比，最后一次注射 *dsPtpn1* 后 72 h，INSR β 仍维持磷酸化状态，分别使用抗 INSR β 的抗体和抗 p-INSR β 的抗体。12.5%的 SDS-PAGE 凝胶。使用 ImageJ 软件进行图像数据转换。(C) 首次注射 *dsRNA* 114 h 至 138 h 观察敲降 *Ptpn1* 的表型。(D) 基于对照组和实验组的不同表型百分比的统计分析，每组包含 30 只幼虫。用 *t* 检验对三个独立的生物学重复样本进行统

计分析。(E)和(F)蛹重量和化蛹时间的统计分析。(G)最后一次注射 *dsRNA* 24 h 后观察到的中肠形态。(H)最后一次注射 *dsRNA* 后 66 h 时血淋巴中 20E 滴度检测。用 *t* 检验对三个独立的生物学重复样本进行统计分析 (**p* < 0.05; ***p* < 0.01), 误差线代表着平均值±SD。

Figure 3.12 *Ptpn1* knockdown via RNAi in larvae accelerated pupation time, formed small pupae, and increased the 20E titer. (A) Efficacy of *Ptpn1* knockdown in the epidermis of larvae by qRT-PCR analysis (sixth instar 6 h larva for the first *dsPtpn1* or *dsGFP* injection, 24 h later for the second injection, 1.5 μg *dsRNA*/larva each time). (B) Western blot showed the maintained phosphorylation of INSRβ 72 h after the last injection of *dsPtpn1*, compared with the *dsGFP* at the same time. INSRβ and P-INSRβ antibodies were used, respectively. 12.5% SDS-PAGE gel. ImageJ software was used to transform the image data. (C) Phenotypes after *Ptpn1* knockdown observed from 114 h to 138 h after first *dsRNA* injection. (D) The statistical analysis of percentage of different phenotypes based the experimental group and control group. Each group contains 30 larvae. The statistical analysis was performed using three independent replicates by Student's *t*-test. (E) and (F) Statistical analysis of pupation weight and pupation time. (G) Midgut morphology observed after the last injection 24 h. (H) The 20E titer detection in the hemolymph after the last injection of *dsRNA* for 66 h. The statistical analysis was performed using three times repetition by Student's *t*-test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01). The bars indicate the mean ± SD.

3.7 敲降幼虫体内的 *Insr* 导致化小蛹，延迟化蛹，并通过降低 20E 滴度升高血淋巴葡萄糖

为了探究 INSR 在昆虫生长和胰岛素途径中的作用，在五龄 24 h 幼虫体内注射 *dsInsr* 敲降 *Insr*。蛋白质印迹显示 INSRβ 蛋白水平降低 (图 3.13A)。敲降 *Insr* 导致幼虫 30.9% 的死亡率，59.5% 的虫体化小蛹 (图 3.13B 和 C)。 *dsInsr* 处理组的蛹重降低至 0.26 g， *dsGFP* 对照组的蛹重为 0.37 g (图 3.13D)。敲降 *Insr* 后化蛹时间由对照组的 140 h 延迟至 190 h (图 3.13E)，中肠变红色的时间晚于 *dsGFP* 对照组 (图 3.13F)，表明 INSR 在幼虫生长和化蛹中发挥重要作用。延迟化蛹的主要原因可能是血淋巴中 20E 滴度的不足 (图 3.13G) 以及 *Insr* 敲降后导致的幼虫生长的延迟。同时，敲降 *Insr* 胰岛素途径基因 *Insr*， *Pi3k* 和 *Akt* 的 mRNA 水平下降 (图 3.13H)，蛋白质印迹分析显示在 *Insr* 敲降后 AKT 的磷酸化水平也下降 (图 3.13I)，表明敲降 *Insr* 阻断了胰岛素信号通路。注射 *dsInsr* 的幼虫血淋巴葡萄糖水平明显高于 *dsGFP* 对照组 (图 3.13J)。这些结果表明 INSR 在幼虫生长，20E 产生，葡萄糖代谢和幼虫变态过程中发挥作用。

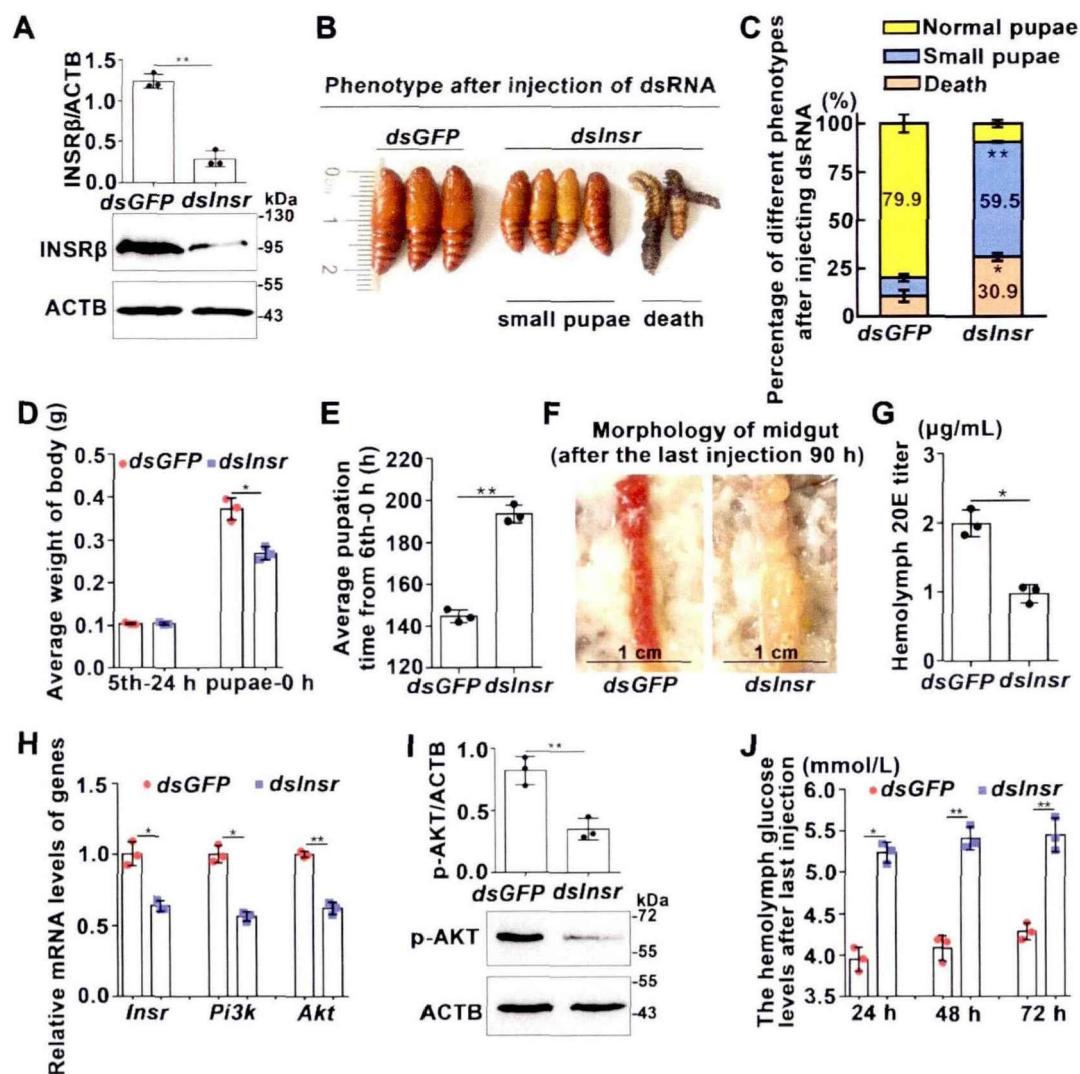


图 3.13 通过在五龄幼虫中注射 *dsRNA* 敲降 *Insr* 延长虫体化蛹时间，化小蛹，降低 20E 滴度。 (A) 蛋白印迹显示 *Insr* 的干扰效率。最后一次注射 24 h 后提取的幼虫表皮蛋白。12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶。使用 ImageJ 软件进行图像数据的转换。(B) 注射三次 *dsInsr* 或 *dsGFP* 后虫体的表型 (1.5 μ g/幼虫，五龄 24 h，五龄 48 h 和六龄 6 h)。最后一次注射 *dsRNA* 90 h 至 144 h 观察表型。(C) 基于对照组和实验组的不同表型百分比的统计分析，每组包含 30 只幼虫。用 *t* 检验对三个独立的生物学重复样本进行统计分析。(D) 和 (E) 蛹重量和化蛹时间的统计分析。(F) 最后一次注射 90 h 后观察到的中肠形态。(G) 最后一次注射 *dsRNA* 后 90 h 时血淋巴中 20E 滴度检测。(H) qRT-PCR 检测最后一次注射 *dsRNA* 后 24 h 的 *Insr*，*Pi3k* 和 *Akt* 的 mRNA 水平。(I) 蛋白印迹显示最后一次注射 *dsRNA* 后 24 h 的 AKT 磷酸化水平。使用抗 p-AKT 的抗体检测。(J) 最后一次注射 *dsRNA* 后 24 h、48 h 和 72 h 的血淋巴葡萄糖水平检测。用 *t* 检验对三个独立的生物学重复样本进行统计分析 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)，误差线表示平均值 $\pm$ SD。

Figure 3.13 Knockdown of *Insr* in 5th instar larvae via *dsRNA* injection delayed pupation time, produced small pupae, and decreased the 20E titer. (A) Western blotting showing the efficacy of *Insr* knockdown. The larvae epidermis protein was extracted after the last injection 24 h. 12.5% gel. ImageJ software was used to transform the image data. (B) Insect phenotypes after three times injection of *dsInsr* or *dsGFP* into the larval hemocoel (1.5 μ g/larva, in fifth instar-24 h, 48 h, and in sixth instar-6 h). Phenotypes were observed from 90 h to 144 h after the third injection. (C) The statistical analysis of percentage of different phenotypes based the experimental group and control group. Each group contains 30 larvae. The statistical analysis was performed using three

independent replicates by Student's *t*-test. (D) and (E) Statistical analysis of body weight and pupation time. (F) Midgut morphology observed 90 h after the last injection. (G) The 20E titer detection in the hemolymph after the last injection of *dsRNA* for 90 h. (H) qRT-PCR detected the mRNA levels of *Insr*, *Pi3k* and *Akt* after the last injection of *dsRNA* for 24 h. (I) Western blotting showing the phosphorylation level of AKT after the last injection of *dsRNA* for 24 h. The antibody against p-AKT was used. (J) The hemolymph glucose levels detection after the last injection of *dsRNA* for 24 h, 48 h, 72 h. The statistical analyses were conducted using Student's *t*-test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01) based triplicate. Error bars indicate the mean ± SD.

3.8 在变态期 20E 升高血淋巴葡萄糖水平

在变态期, *INSRβ* 的表达和磷酸化水平的减少可能会导致血淋巴葡萄糖水平的升高, 因此我们检测了虫体不同发育阶段的血淋巴葡萄糖水平发现, 幼虫的血淋巴葡萄糖水平不断升高至化蛹, 甚至在幼虫停止取食后 (六龄 72 h) 其血淋巴葡萄糖水平也依然在升高, 化蛹过后血淋巴葡萄糖水平逐渐下降至成虫期 (图 3.14A)。这说明血淋巴葡萄糖水平不仅随 *INSRβ* 的不足而逐渐积累, 而且在变态期间高滴度的 20E 可能通过促进糖异生使血淋巴葡萄糖上升。与 DMSO 的对照组相比, 注射 500 ng (相当于体内 5 μM) 以及更高浓度的 20E 后, 幼虫血淋巴葡萄糖水平增加 (图 3.14B 和 C)。为了证实 20E 诱导了血淋巴葡萄糖的增加, 我们向五龄 24 h 的幼虫体内注射了 *dsE20MO* 以敲降编码蜕皮激素 20-单加氧酶 (E20MO) 的基因表达。注射 *dsE20MO* 的幼虫血淋巴葡萄糖水平显著降低 (图 3.14D)。这些结果表明, 高滴度的 20E 在幼虫变态期间升高了血淋巴葡萄糖水平。

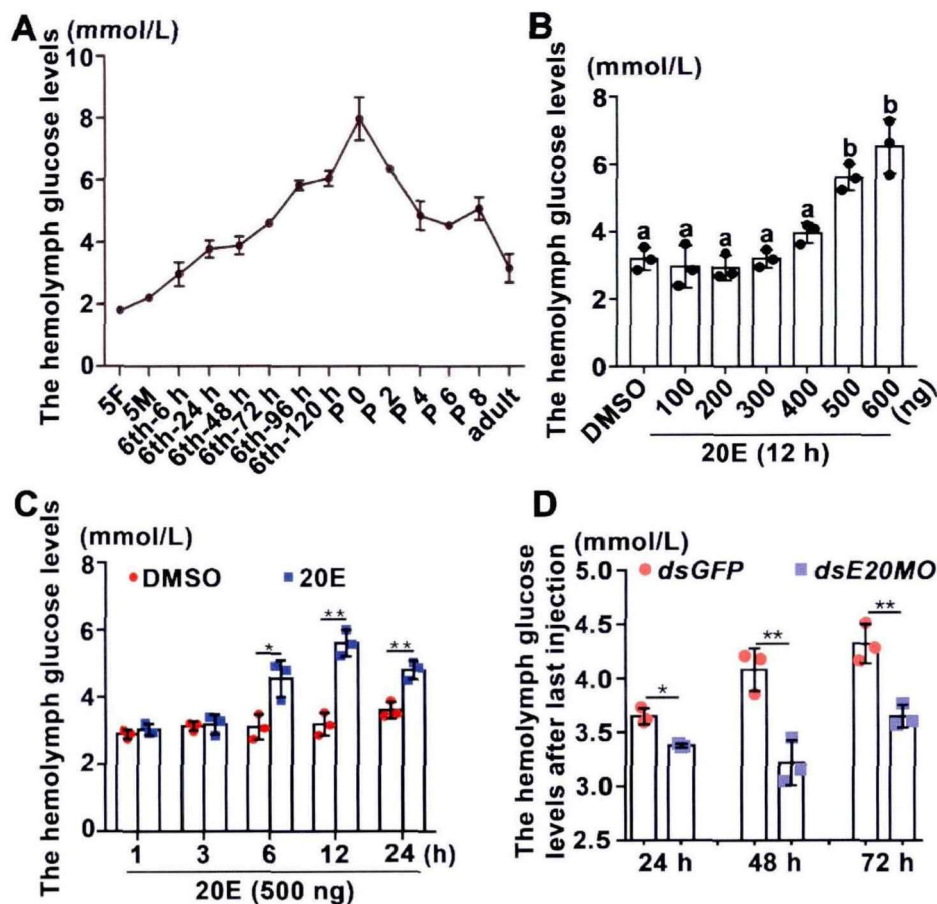


图 3.14 在变态期间 20E 升高血淋巴葡萄糖水平。(A) 各发育阶段虫体血淋巴葡萄糖水平。三次独立重复实验计算得误差线。(B) 和 (C) 20E 依赖浓度和时间梯度引起血淋巴葡萄糖水平的增加。DMSO 作为溶剂对照。(D) 最后一次注射 *dsRNA* 后 24 h、48 h、72 h 的血淋巴葡萄糖水平检测。通过 ANOVA 对 (B) 的数据进行统计分析，不同字母代表显著性差异 ($p < 0.05$)。使用 *t* 检验从三次独立生物学实验中分别对 (C) 和 (D) 进行统计分析 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)，误差线表示平均值 $\pm$ SD。

Figure 3.14 20E increased hemolymph glucose levels during metamorphosis. (A) The hemolymph glucose levels during development. The error bars were calculated from three independent repeats. (B) and (C) The increase of the hemolymph glucose levels by 20E induction in dose and time. DMSO was used as the solvent control. (D) The hemolymph glucose levels detection after the last injection of *dsRNA* for 24 h, 48 h, 72 h. Statistical analysis was conducted using ANOVA for (B), different letters represented significant differences ($p < 0.05$). Statistical analysis of the data in (C) and (D) by Student's *t*-test from three biological repeats (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). The bars indicate the mean $\pm$ SD of three times repetition.

4. 讨论

在本研究中，我们发现 INSR 在促进昆虫生长的胰岛素途径中发挥重要作用，促使在幼虫摄食阶段产生更多的类固醇激素 20E。增加的 20E 促进 PTEN 表达，使 FoxO 定位于细胞核中以促进 PTP1B 的表达并抑制 INSR 的表达，PTP1B 使得 INSR 去磷酸化以阻断胰岛素途径，导致幼虫生长停止。在血淋巴中，葡萄糖因胰岛素途径的阻断而逐渐积累。这些发现揭示了 20E 拮抗胰岛素以阻止幼虫

生长并导致血淋巴中葡萄糖积累的机制之一。

4.1 临界滴度的 20E 阻断胰岛素途径，使幼虫停止生长并决定昆虫个体大小

昆虫的个体大小由多种因素决定 (Hyun, 2013)，包括营养 (Mirth et al., 2005)，胰岛素和类固醇激素 (Nijhout et al., 2014)。在果蝇 (Zhou et al., 2004) 和烟草天蛾 (Nijhout, 1975) 中，幼虫必须超过临界体重才能进入变态期。果蝇蜕皮至三龄后 8-12 h (比游走期早 20 h) 达到临界体重 (Mirth et al., 2005)。INSR 信号通路在生长和代谢中发挥不可或缺的功能 (Giannakou and Partridge, 2007; Kannan and Fridell, 2013)。我们的研究表明，敲降 *Ptpn1* 缩短了幼虫到蛹的化蛹时间并产生小蛹。这是因为 INSR 的磷酸化得以维持，20E 滴度比对照组更早地达到临界滴度。然而，敲降 *Insr* 导致延迟化蛹并且使虫体生长缓慢，导致 20E 滴度不足而化小蛹。综上所述，INSR 在胰岛素途径中发挥作用，以确保幼虫在取食期生长至临界体重，产生临界 20E 滴度，触发变态，决定虫体个体大小。幼虫停止取食后的 20E 滴度的增加也可能来自性腺 (Brown et al., 1998; Tawfik et al., 1997)。

幼虫体内的 20E 滴度从幼虫生长到变态各不相同 (Riddiford et al., 2003)：烟草天蛾为 1-4 $\mu\text{g/mL}$ (2-9 μM) (Langelan et al., 2000)，印度柞蚕血淋巴中 20E 滴度范围为 0.5-5 $\mu\text{g/mL}$ (1-10 μM) (Kumar et al., 2008)，棉铃虫血淋巴中为 0.5-10 μM (Di et al., 2020)，整只虫体检测为 0.2-6 μM (Kang et al., 2019)。多项研究表明，不同浓度的 20E 发挥不同的生理功能，如在烟草天蛾中，低浓度的 20E 促进细胞增殖 (Nijhout et al., 2007)，但在棉铃虫中高浓度的 20E 则促进细胞凋亡 (Liu et al., 2013a)。低浓度的 20E 能刺激家蚕的翅细胞进行快速增殖 (Koyama et al., 2004)，而高浓度的 20E 抑制细胞增殖并阻止周围组织生长 (Edgar, 2006)。这其中的机制包括 20E 以浓度依赖的方式增加了细胞 Ca^{2+} 水平 (Wang et al., 2016)，根据不同的 Ca^{2+} 浓度诱导自噬和凋亡 (Li et al., 2016)。

4.2 20E 升高血淋巴葡萄糖水平和 ILP 的表达

在果蝇中，20E 上调胰岛素样肽 6 (DILP6) 的表达以促进取食后虫体的生长 (Okamoto et al., 2009)。我们检测到在 20E 调控下，在变态过程中 ILP 表达上调。20E 与多巴胺竞争性结合 DopEcR，导致变态期间幼虫停止取食 (Kang et al., 2019)，因此，ILP 的表达增加并不是由变态期间的食物摄入诱导的。已经发现葡萄糖可以促进人 (Henquin, 2000) 和果蝇 (Alvarez-Rendon et al., 2018) 胰岛素的

产生。变态期间血淋巴葡萄糖水平的增加是否诱导 ILP 的表达需要进一步研究。另一种可能是当受体不足时,配体会补偿性增加 (Nussey and Whitehead, 2001)。Bombyxin, 是在家蚕中发现的第一个 ILP, 能促进翅的发育 (Nijhout and Grunert, 2002)。我们的研究表明,不同的 ILPs 可能通过结合 INSR 或其他受体来促进幼虫或成虫组织的生长。

令人惊讶的是,在变态期 ILP 基因表达充足时,20E 诱导血淋巴葡萄糖水平的增加,ILP 蛋白水平的变化还需进一步进行探究。血淋巴葡萄糖水平的升高可能是因为变态期 20E 的调节下,INSR 的表达和磷酸化水平不足,葡萄糖不能被细胞吸收,不能合成糖原,也不能用来产生能量。幼虫停止进食后,变态期的血淋巴葡萄糖水平持续升高,这表明在 20E 抑制葡萄糖利用的条件下,存在糖原分解和糖异生。这些假设需要在未来的研究中进一步进行验证。

血液中胰岛素水平充足时血糖异常升高是人类 2 型糖尿病 (T2D) 的典型特征,然而,其机制尚不清楚 (Ashcroft and Rorsman, 2012)。根据世界卫生组织规定,空腹血糖水平 ≥ 7.0 mmol/L 是人类糖尿病的临床指征 (Organization, 2011)。我们的研究表明,高浓度的 20E 通过抑制 INSR 的表达和磷酸化来增加血淋巴葡萄糖水平。20E 诱导的棉铃虫血淋巴葡萄糖水平小于 7.0 mmol/L,但在变态期间化蛹时 (P0 期) 达到 8 mmol/L; 因此,高水平的血淋巴葡萄糖应该对停止取食后的组织发育具有生理意义。

在哺乳动物中,糖皮质激素可以抑制大鼠骨骼肌中 INSR 的磷酸化 (Giorgino et al., 1993)。糖皮质激素类似物地塞米松抑制胰岛素信号并抑制 INSR 的磷酸化 (Lowenberg et al., 2006), PTP1B 在这一过程中发挥作用 (Herrera et al., 2020)。地塞米松还改变了总的 INSR 水平 (de Franca et al., 2018)。果蝇的胰岛素途径与人的胰岛素途径非常相似,因此果蝇可以作为研究糖尿病的模式生物 (Alvarez-Rendon et al., 2018)。棉铃虫代表了另一个研究类固醇调节血糖水平以及幼虫组织的凋亡及成虫组织形成之间关系的模型。

4.3 FoxO 抑制 INSR 表达

目前因胰岛素途径促进基因转录的调节因子仍未知,所以胰岛素途径基因的转录调节仍不清楚。在哺乳动物和果蝇中,在低营养水平条件下, FoxO1 可通过反馈调节机制导致 INSR 蛋白水平的增加 (Puig and Tjian, 2005)。然而,在棉铃虫变态期, FoxO 的表达量增加并定位于细胞核中,在 20E 调节下发挥转录

因子的作用 (Cai et al., 2016)。相反, 在 20E 诱导下, INSR 的表达在变态期减少, 因此 FoxO 不能增加棉铃虫 INSR 的表达, 在 *Insr* 的启动子区域发现一个 FoxOBE 序列, ChIP 实验验证了 FoxO 能与之结合; 然而过表达 FoxO 抑制了 *Insr* 的表达。我们的研究揭示 FoxO 作为 *Insr* 转录抑制因子发挥作用, 说明 FoxO 可通过其亚细胞定位调节胰岛素途径基因的转录。这些研究出现的不同结果可能是由于在不同的条件下或不同物种中 FoxO 的作用是不同的, 此外可能参与 FoxO 与 FoxOBE 结合的其他因子的作用也需要进一步探究。

5. 结论

INSR 能促进昆虫幼虫生长促使 20E 在幼虫取食期达到临界滴度, 达到临界滴度的 20E 通过上调 PTEN 的表达从而诱导 FoxO 核定位, 抑制 INSR 的表达, 并且核定位的 FoxO 促进 PTP1B 表达, 导致 INSR 去磷酸化拮抗胰岛素信号通路。临界滴度的 20E 使幼虫终止生长, 决定个体大小, 触发变态, 引起血淋巴葡萄糖积累以利于组织生长 (图 3.15)。

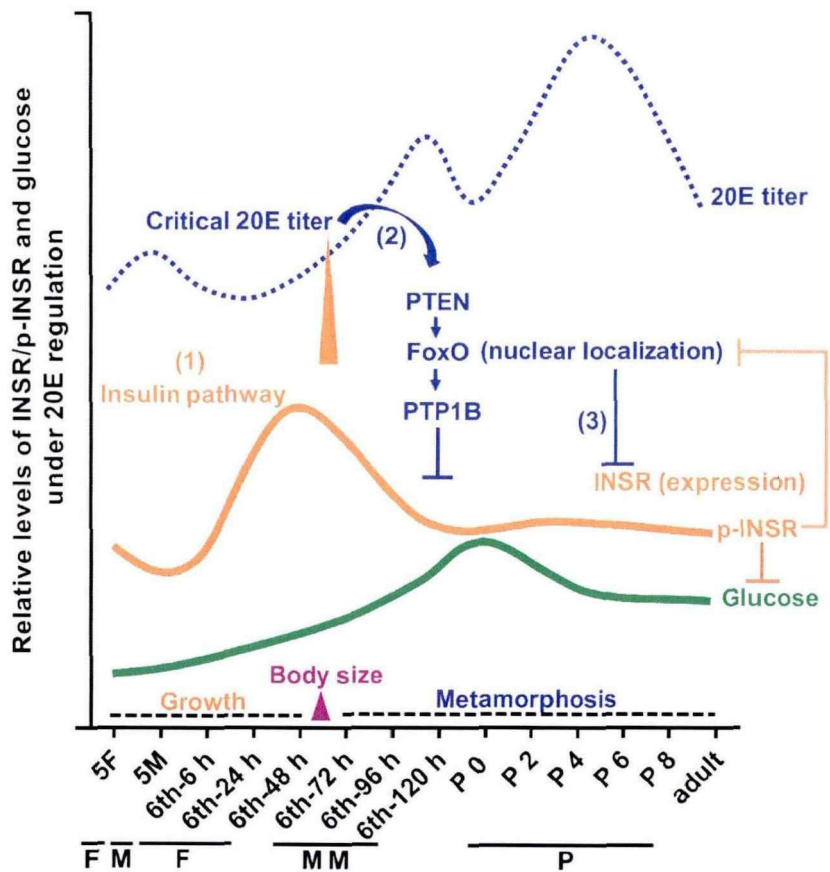


图 3.15 20E 拮抗胰岛素途径阻止幼虫生长并决定虫体大小的机制图。在棉铃虫变态过程中 20E 滴度增加 (Di et al., 2020; Kang et al., 2019)。INSR 通过抑制取食期 FoxO 的核定位来促进昆虫幼虫生长并使 20E 达到临界滴度 (1)。临界滴度的 20E 可上调 PTEN 表达以保持

FoxO 的核定位，从而上调 PTP1B 表达使 INSR 去磷酸化 (2)，并抑制 INSR 表达 (3)。INSR 表达和磷酸化水平的降低减弱了其对 FoxO 核定位的抑制作用。因此 20E 拮抗胰岛素途径，使幼虫停止生长，起始变态 (幼虫细胞凋亡和成虫组织生长)，为组织生长积累血淋巴葡萄糖。5F: 五龄取食期幼虫 (大约五龄 0 h-36 h); 5M: 五龄蜕皮期幼虫 (约五龄 36 - 56 h); 6th-6 h 至 6th-120 h: 六龄幼虫的阶段; P 0-P 8: 0 天至 8 天大的蛹; F: 取食期; M: 幼虫蜕皮期; MM: 蜕皮变态期; P: 蛹期。

Figure 3.15 Chart explaining the possible mechanism of 20E counteracting insulin pathway to stop larval growth and determine body size. The 20E titer increased during metamorphosis in *H. armigera* (Di et al., 2020; Kang et al., 2019). INSR played roles to promote insect larval growth and 20E production to the critical titer by repressing FoxO nuclear localization during larval feeding stages (1). The critical 20E titer upregulated PTEN expression to keep FoxO nucleus localization, which initiated PTP1B expression to dephosphorylate INSR β (2), and repressed INSR β expression (3). The decrease in INSR levels and phosphorylation weakened its inhibition on FoxO nuclear localization. Thereby 20E counteracted insulin pathway, stopped growth, initiated metamorphosis (larval cells apoptosis and adult tissues proliferation), and accumulated hemolymph glucose levels for imaginal discs growth. 5F: fifth instar feeding larvae (about fifth instar 0 h-36 h); 5M: fifth instar molting larvae (about fifth instar 36 h-56 h); 6th-6 h to 6th-120 h: time stages of sixth instar larvae; P 0-P 8: 0 day to 8-day-old pupae; F, feeding; M, larval molting; MM, metamorphic molting; P, pupae.

第四章 论文创新点总结及意义

类固醇激素和胰岛素在动物体的生长发育过程中发挥至关重要的作用，我们利用鳞翅目昆虫棉铃虫为材料探究了类固醇激素 20E 信号通路及其与胰岛素信号通路的拮抗作用，阐明了多个 GPCRs 在 20E 信号途径中发挥作用的机制，以及 20E 通过抑制胰岛素受体拮抗胰岛素途径的新机制。该研究丰富了激素调控昆虫生长发育的知识，为其他物种中类固醇激素与胰岛素间的互作关系提供了思路，为棉铃虫防治提供了新的靶标基因。本研究有以下几方面的创新：

一、GPCRs 在 20E 信号通路中参与不同基因的表达

1. 鉴定了棉铃虫基因组中 122 个基因编码经典 GPCR，并对它们进行了分类。
2. 证明了 6 个 GPCRs 参与 20E 信号途径，它们分别对 20E 信号通路中的不同基因的表达有不同的调控，并且这些 GPCRs 在虫体不同发育阶段及组织中的表达不同，对虫体生长发育有不同的作用，这阐明了多个 GPCRs 在 20E 信号途径中发挥作用的机制。
3. 找到 20E 调控 *Pten* 和 *FoxO* 表达的 GPCRs，*PRRPR* 和 *SMO*，并用 20E-EIA 方法证明了 *PRRPR* 与 20E 的结合，*SMO* 虽传递 20E 信号但不能与 20E 结合。这说明这两种 GPCR 无论和 20E 结合与否，均可以传递 20E 信号。丰富了 GPCR 参与 20E 信号转导的分子机制。

二、20E 通过使胰岛素受体去磷酸化拮抗胰岛素信号通路

1. 20E 通过降低胰岛素受体 *INSR* 表达和磷酸化水平从而拮抗胰岛素信号通路，这为研究 20E 和胰岛素的拮抗作用提供新的思路和依据。
2. 20E 上调 *PTEN* 的表达从而诱导 *FoxO* 核定位，定位于细胞核的 *FoxO* 抑制了胰岛素受体的表达，并促进了 *PTP1B* 的表达，使得 *PTP1B* 去磷酸化 *INSR*。这丰富了 *FoxO* 在不同的信号途径中发挥作用的分子机制。
3. 胰岛素信号通路促使 20E 达到临界滴度，达到临界滴度的 20E 又抑制 *INSR* 的表达，最终使幼虫停止生长，决定虫体大小。这丰富了昆虫的变态发育以及幼虫的组织凋亡和成虫组织形成的分子机制。
4. 类固醇激素拮抗胰岛素途径，胰岛素受体不足使血淋巴葡萄糖升高，这与人二型糖尿病的机制相似，这可能为研究糖尿病的发生及控制提供新的模型。

参考文献

- Abrieux, A., Debernard, S., Maria, A., Gaertner, C., Anton, S., Gadenne, C., Duportets, L., 2013. Involvement of the G protein-coupled dopamine/ecdysteroid receptor DopEcR in the behavioral response to sex pheromone in an insect. *PLoS One* 8, e72785.
- Abrieux, A., Duportets, L., Debernard, S., Gadenne, C., Anton, S., 2014. The GPCR membrane receptor, DopEcR, mediates the actions of both dopamine and ecdysone to control sex pheromone perception in an insect. *Front Behav Neurosci* 8, 312.
- Alvarez-Rendon, J.P., Salceda, R., Riesgo-Escovar, J.R., 2018. *Drosophila melanogaster* as a model for diabetes type 2 progression. *Biomed Res Int* 2018, 1417528.
- Aquila, S., Sisci, D., Gentile, M., Middea, E., Catalano, S., Carpino, A., Rago, V., Ando, S., 2004. Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/akt pathway. *J Clin Endocr Metab* 89, 1443-1451.
- Araujo, A.R., Reis, M., Rocha, H., Aguiar, B., Morales-Hojas, R., Macedo-Ribeiro, S., Fonseca, N.A., Reboiro-Jato, D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F., Vieira, C.P., Vieira, J., 2013. The *Drosophila melanogaster* methuselah gene: a novel gene with ancient functions. *PLoS One* 8, e63747.
- Aronica, S.M., Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S., 1994. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 8517-8521.
- Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 2012. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* 148, 1160-1171.
- Audsley, N., Down, R.E., 2015. G protein-coupled receptors as targets for next generation pesticides. *Insect Biochem Mol Biol* 67, 27-37.
- Bai, H., Kang, P., Tatar, M., 2012. *Drosophila* insulin-like peptide-6 (dIlp6) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell* 11, 978-985.
- Bass, J., Turck, C., Rouard, M., Steiner, D.F., 2000. Furin-mediated processing in the early secretory pathway: sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 11905-11909.
- Baumbach, J., Xu, Y., Hehlert, P., Kuhnlein, R.P., 2014. Gαq, Gγ1 and Plc21C control *Drosophila* body fat storage. *J Genet Genomics* 41, 283-292.
- Bayer, C.A., vonKalm, L., Fristrom, J.W., 1997. Relationships between protein isoforms and genetic functions demonstrate functional redundancy at the broad-complex during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* 187, 267-282.
- Bednarova, A., Kodrik, D., Krishnan, N., 2013. Unique roles of glucagon and glucagon-like peptides: parallels in understanding the functions of adipokinetic hormones in stress responses in insects. *Comp Biochem Phys A* 164, 91-100.
- Bjarnadottir, T.K., Gloriam, D.E., Hellstrand, S.H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., Schioth, H.B., 2006. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* 88, 263-273.
- Blenau, W., Thamm, M., 2011. Distribution of serotonin (5-HT) and its receptors in the insect brain with focus on the mushroom bodies: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arthropod Struct Dev* 40, 381-394.
- Bollenbacher, W.E., Smith, S.L., Goodman, W., Gilbert, L.I., 1981. Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocr* 44, 302-306.
- Bonneton, F., Zelus, D., Iwema, T., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V., 2003. Rapid divergence of the ecdysone receptor in diptera and lepidoptera suggests coevolution between EcR and USP-RXR. *Mol Biol Evol* 20, 541-553.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., Hafen, E., 2001. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11, 213-221.
- Brown, D.D., Cai, L., 2007. Amphibian metamorphosis. *Dev Biol* 306, 20-33.
- Brown, M.R., Graf, R., Swiderek, K.M., Fendley, D., Stracker, T.H., Champagne, D.E., Lea, A.O., 1998. Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. *J Biol Chem* 273,

- 3967-3971.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Cai, M.J., Dong, D.J., Wang, Y., Liu, P.C., Liu, W., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2014a. G protein-coupled receptor participates in 20-hydroxyecdysone signaling on the plasma membrane. *Cell Commun Signal* 12, 9.
- Cai, M.J., Li, X.R., Pei, X.Y., Liu, W., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2014b. Heat shock protein 90 maintains the stability and function of transcription factor broad z7 by interacting with its broad-complex-tramtrack-bric-a-brac domain. *Insect Mol Biol* 23, 720-732.
- Cai, M.J., Liu, W., Pei, X.Y., Li, X.R., He, H.J., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2014c. Juvenile hormone prevents 20-hydroxyecdysone-induced metamorphosis by regulating the phosphorylation of a newly identified broad protein. *J Biol Chem* 289, 26630-26641.
- Cai, M.J., Zhao, W.L., Jing, Y.P., Song, Q., Zhang, X.Q., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2016. 20-hydroxyecdysone activates forkhead box O to promote proteolysis during *Helicoverpa armigera* molting. *Development* 143, 1005-1015.
- Cardoso, J.C., Clark, M.S., Viera, F.A., Bridge, P.D., Gilles, A., Power, D.M., 2005. The secretin G protein-coupled receptor family: teleost receptors. *J Mol Endocrinol* 34, 753-765.
- Cardoso, J.C., Vieira, F.A., Gomes, A.S., Power, D.M., 2010. The serendipitous origin of chordate secretin peptide family members. *BMC Evol Biol* 10, 135.
- Chalhoub, N., Baker, S.J., 2009. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4, 127-150.
- Champlin, D.T., Truman, J.W., 1998. Ecdysteroids govern two phases of eye development during metamorphosis of the moth, *Manduca sexta*. *Development* 125, 2009-2018.
- Chen, C.H., Di, Y.Q., Shen, Q.Y., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2019. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone induces phosphorylation and aggregation of stromal interacting molecule 1 for store-operated calcium entry. *J Biol Chem* 294, 14922-14936.
- Chen, C.H., Pan, J., Di, Y.Q., Liu, W., Hou, L., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2017. Protein kinase C delta phosphorylates ecdysone receptor B1 to promote gene expression and apoptosis under 20-hydroxyecdysone regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 7121-7130.
- Chen, L., Zhu, J., Sun, G., Raikhel, A.S., 2004. The early gene *broad* is involved in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. *J Mol Endocrinol* 33, 743-761.
- Colombani, J., Bianchini, L., Layalle, S., Pondeville, E., Dauphin-Villemant, C., Antoniewski, C., Carre, C., Noselli, S., Leopold, P., 2005. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* 310, 667-670.
- Cvejic, S., Zhu, Z., Felice, S.J., Berman, Y., Huang, X.Y., 2004. The endogenous ligand stunted of the GPCR methuselah extends lifespan in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 6, 540-546.
- Czech, M.P., Yu, K.T., Lewis, R.E., Davis, R.J., Mottola, C., MacDonald, R.G., Necessary, P.C., Corvera, S., 1985. Insulin receptor kinase and its mode of signaling membrane components. *Diabetes Metab Rev* 1, 33-58.
- Das, D., Arur, S., 2017. Conserved insulin signaling in the regulation of oocyte growth, development, and maturation. *Mol Reprod Dev* 84, 444-459.
- Das, R., Dobens, L.L., 2015. Conservation of gene and tissue networks regulating insulin signalling in flies and vertebrates. *Biochem Soc T* 43, 1057-1062.
- de Franca, I.R., Meneses-Santos, D., Moreira, G.V., Lima, F.B., Carvalho, C.R.O., Marcal, A.C., 2018. Insulin signaling pathway in the masseter muscle of dexamethasone-treated rats. *Interv Med Appl Sci* 10, 226-232.
- de Mendoza, A., Jones, J.W., Friedrich, M., 2016. Methuselah/methuselah-like G protein-coupled receptors constitute an ancient metazoan gene family. *Sci Rep-Uk* 6, 21801.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R., Le, D.P., 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu Rev Entomol* 43, 545-569.
- Di, Y.Q., Han, X.L., Kang, X.L., Wang, D., Chen, C.H., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2021. Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis. *Autophagy* 17, 1170-1192.
- Dodd, G.T., Luckman, S.M., 2013. Physiological roles of GPR10 and PrRP signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 20.

- Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.H., Masiarz, F., Kan, Y.W., Goldfine, I.D., et al., 1985. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 40, 747-758.
- Edgar, B.A., 2006. How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat Rev Genet* 7, 907-916.
- Elena, C., Chiara, M., Angelica, B., Chiara, M.A., Laura, N., Chiara, C., Claudio, C., Antonella, F., Nicola, G., 2018. Hyperglycemia and diabetes induced by glucocorticoids in nondiabetic and diabetic patients: revision of literature and personal considerations. *Curr Pharm Biotechnol* 19, 1210-1220.
- Elmogy, M., Iwami, M., Sakurai, S., 2004. Presence of membrane ecdysone receptor in the anterior silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur J Biochem* 271, 3171-3179.
- Fan, Y., Sun, P., Wang, Y., He, X., Deng, X., Chen, X., Zhang, G., Chen, X., Zhou, N., 2010. The G protein-coupled receptors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 40, 581-591.
- Filardo, E.J., Thomas, P., 2012. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology* 153, 2953-2962.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fredriksson, R., Schioth, H.B., 2005. The repertoire of G protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 67, 1414-1425.
- Friedrich, M., Jones, J.W., 2016. Gene ages, nomenclatures, and functional diversification of the methuselah/methuselah-like GPCR family in *Drosophila* and *Tribolium*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 326, 453-463.
- Fujiwara, H., Jindra, M., Newitt, R., Palli, S.R., Hiruma, K., Riddiford, L.M., 1995. Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its messenger-RNA in wings. *Insect Biochem Mol Biol* 25, 845-856.
- Gabbouj, S., Ryhanen, S., Marttinen, M., Wittrahm, R., Takalo, M., Kemppainen, S., Martiskainen, H., Tanila, H., Haapasalo, A., Hiltunen, M., Natunen, T., 2019. Altered insulin signaling in alzheimer's disease brain-special emphasis on PI3K-Akt pathway. *Front Neurosci* 13, 629.
- Giannakou, M.E., Partridge, L., 2007. Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends Biochem Sci* 32, 180-188.
- Gilbert, L.I., Granger, N.A., Roe, R.M., 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 617-644.
- Giorgino, F., Almahfouz, A., Goodyear, L.J., Smith, R.J., 1993. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle *in vivo*. *J Clin Invest* 91, 2020-2030.
- Goberdhan, D.C., Paricio, N., Goodman, E.C., Mlodzik, M., Wilson, C., 1999. *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* 13, 3244-3258.
- Goncu, E., Parlak, O., 2009. Morphological changes and patterns of ecdysone receptor B1 immunolocalization in the anterior silk gland undergoing programmed cell death in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Histochem* 111, 25-34.
- Gorelick-Feldman, J., Cohick, W., Raskin, I., 2010. Ecdysteroids elicit a rapid Ca²⁺ flux leading to akt activation and increased protein synthesis in skeletal muscle cells. *Steroids* 75, 632-637.
- Hakim, R.S., Baldwin, K., Smagghe, G., 2010. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annu Rev Entomol* 55, 593-608.
- Hall, B.L., Thummel, C.S., 1998. The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development* 125, 4709-4717.
- Hanlon, C.D., Andrew, D.J., 2015. Outside-in signaling--a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *J Cell Sci* 128, 3533-3542.
- Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schioth, H.B., Gloriam, D.E., 2017. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829-842.
- Hay, B.A., Guo, M., 2006. Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 623-650.
- Hegstrom, C.D., Riddiford, L.M., Truman, J.W., 1998. Steroid and neuronal regulation of ecdysone receptor expression during metamorphosis of muscle in the moth, *Manduca sexta*. *J Neurosci*

- 18, 1786-1794.
- Henquin, J.C., 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-1760.
- Henrich, V.C., Sliter, T.J., Lubahn, D.B., Macintyre, A., Gilbert, L.I., 1990. A steroid thyroid-hormone receptor superfamily member in *Drosophila melanogaster* that shares extensive sequence similarity with a mammalian homolog. *Nucleic Acids Res* 18, 4143-4148.
- Herrera, N.A., Duchatsch, F., Kahlke, A., Amaral, S.L., Vasquez-Vivar, J., 2020. *In vivo* vascular rarefaction and hypertension induced by dexamethasone are related to phosphatase PTP1B activation not endothelial metabolic changes. *Free Radic Biol Med* 152, 689-696.
- Hill, C.A., Fox, A.N., Pitts, R.J., Kent, L.B., Tan, P.L., Chrystal, M.A., Cravchik, A., Collins, F.H., Robertson, H.M., Zwiebel, L.J., 2002. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 176-178.
- Horner, M.A., Chen, T.H., Thummel, C.S., 1995. Ecdysteroid regulation and DNA-binding properties of *Drosophila* nuclear hormone-receptor superfamily members. *Dev Biol* 168, 490-502.
- Hwang, J.L., Weiss, R.E., 2014. Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment. *Diabetes Metab Res Rev* 30, 96-102.
- Hyun, S., 2013. Body size regulation and insulin-like growth factor signaling. *Cell Mol Life Sci* 70, 2351-2365.
- Ja, W.W., Carvalho, G.B., Madrigal, M., Roberts, R.W., Benzer, S., 2009. The *Drosophila* G protein-coupled receptor, methuselah, exhibits a promiscuous response to peptides. *Protein Sci* 18, 2203-2208.
- Jacobs, F.M., van der Heide, L.P., Wijchers, P.J., Burbach, J.P., Hoekman, M.F., Smidt, M.P., 2003. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* 278, 35959-35967.
- Jamaspishvili, T., Berman, D.M., Ross, A.E., Scher, H.I., De Marzo, A.M., Squire, J.A., Lotan, T.L., 2018. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 15, 222-234.
- Jindra, M., Huang, J.Y., Malone, F., Asahina, M., Riddiford, L.M., 1997. Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*. *Insect Mol Biol* 6, 41-53.
- Jindra, M., Malone, F., Hiruma, K., Riddiford, L.M., 1996. Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 180, 258-272.
- Jing, Y.P., Wang, D., Han, X.L., Dong, D.J., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2016. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone enhances gene transcription through the cAMP response element-binding protein (CREB) signaling pathway. *J Biol Chem* 291, 12771-12785.
- Kahn, S.E., Cooper, M.E., Del Prato, S., 2014. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 383, 1068-1083.
- Kamimura, M., Tomita, S., Kiuchi, M., Fujiwara, H., 1997. Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms-ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. *Eur J Biochem* 248, 786-793.
- Kang, X.L., Li, Y.X., Li, Y.L., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2021. The homotetramerization of a GPCR transmits the 20-hydroxyecdysone signal and increases its entry into cells for insect metamorphosis. *Development* 148, e196667.
- Kang, X.L., Zhang, J.Y., Wang, D., Zhao, Y.M., Han, X.L., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2019. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone binds to dopamine receptor to repress lepidopteran insect feeding and promote pupation. *PLoS Genet* 15, e1008331.
- Kannan, K., Fridell, Y.W., 2013. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Front Physiol* 4, 288.
- Kasubuchi, M., Watanabe, K., Hirano, K., Inoue, D., Li, X., Terasawa, K., Konishi, M., Itoh, N., Kimura, I., 2017. Membrane progesterone receptor beta (mPR β /Paqr8) promotes progesterone-dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling. *Sci Rep-Uk* 7, 5168.
- Koelle, M.R., Segreaves, W.A., Hogness, D.S., 1992. Dhr3: a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6167-6171.
- Koelle, M.R., Talbot, W.S., Segreaves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P., Hogness, D.S., 1991. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid-receptor

- superfamily. *Cell* 67, 59-77.
- Kondo, H., Ino, M., Suzuki, A., Ishizaki, H., Iwami, M., 1996. Multiple gene copies for bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*: structural signs for gene rearrangement and duplication responsible for generation of multiple molecular forms of bombyxin. *J Mol Biol* 259, 926-937.
- Kostal, V., Stetina, T., Poupardin, R., Korbelova, J., Bruce, A.W., 2017. Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 8532-8537.
- Koyama, T., Iwami, M., Sakurai, S., 2004. Ecdysteroid control of cell cycle and cellular commitment in insect wing imaginal discs. *Mol Cell Endocrinol* 213, 155-166.
- Koyama, T., Mendes, C., Mirth, C.K., 2013. Mechanisms regulating nutrition-dependent developmental plasticity through organ-specific effects in insects. *Front Physiol* 4, 263.
- Koyama, T., Rodrigues, M.A., Athanasiadis, A., Shingleton, A.W., Mirth, C.K., 2014. Nutritional control of body size through FoxO-ultraspiracle mediated ecdysone biosynthesis. *Elife* 3, e03091.
- Krupnick, J.G., Benovic, J.L., 1998. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol* 38, 289-319.
- Kumar, D., Subrahmanyam, B., Sharan, S.K., Mishra, P.K., Singh, B.M.K., Suryanarayana, N., 2008. Endogenous 20-hydroxyecdysone levels in the haemolymph of non-diapause-destined and diapause-destined generations of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae) and associated developmental changes. *Eur J Entomol* 105, 591-598.
- Lagueux, M., Hetru, C., Goltzene, F., Kappler, C., Hoffmann, J.A., 1979. Ecdysone titer and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* 25, 709-723.
- Lam, G.T., Jiang, C.A., Thummel, C.S., 1997. Coordination of larval and prepupal gene expression by the Dhr3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 1757-1769.
- Langelan, R.E., Fisher, J.E., Hiruma, K., Palli, S.R., Riddiford, L.M., 2000. Patterns of MHR3 expression in the epidermis during a larval molt of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev Biol* 227, 481-494.
- Layalle, S., Arquier, N., Leopold, P., 2008. The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in *Drosophila*. *Dev Cell* 15, 568-577.
- Lebon, G., 2020. Fine-tuning receptor-G protein activation and signaling. *Science* 369, 507-508.
- Li, Y.B., Li, X.R., Yang, T., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2016. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes switching from autophagy to apoptosis by increasing intracellular calcium levels. *Insect Biochem Mol Biol* 79, 73-86.
- Lin, F., Hossain, M.A., Post, S., Karashchuk, G., Tatar, M., De Meyts, P., Wade, J.D., 2017. Total solid-phase synthesis of biologically active *Drosophila* insulin-like peptide 2 (DILP2). *Aust J Chem* 70, 208-212.
- Lin, X., Smagghe, G., 2019. Roles of the insulin signaling pathway in insect development and organ growth. *Peptides* 122, 169923.
- Lin, Y.J., Seroude, L., Benzer, S., 1998. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science* 282, 943-946.
- Liu, C.Y., Liu, W., Zhao, W.L., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2013a. Upregulation of the expression of prodeath serine/threonine protein kinase for programmed cell death by steroid hormone 20-hydroxyecdysone. *Apoptosis* 18, 171-187.
- Liu, W., Cai, M.J., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2014a. In a nongenomic action, steroid hormone 20-hydroxyecdysone induces phosphorylation of cyclin-dependent kinase 10 to promote gene transcription. *Endocrinology* 155, 1738-1750.
- Liu, W., Cai, M.J., Zheng, C.C., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2014b. Phospholipase Cyl connects the cell membrane pathway to the nuclear receptor pathway in insect steroid hormone signaling. *J Biol Chem* 289, 13026-13041.
- Liu, W., Zhang, F.X., Cai, M.J., Zhao, W.L., Li, X.R., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2013b. The hormone-dependent function of Hsp90 in the crosstalk between 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone signaling pathways in insects is determined by differential phosphorylation and protein interactions. *Bba-Gen Subjects* 1830, 5184-5192.
- Losel, R.M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H.C., Rossol-Haseroth, K., Wehling, M., 2003. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol*

- Rev* 83, 965-1016.
- Lowenberg, M., Tuynman, J., Scheffer, M., Verhaar, A., Vermeulen, L., van Deventer, S., Hommes, D., Peppelenbosch, M., 2006. Kinome analysis reveals nongenomic glucocorticoid receptor-dependent inhibition of insulin signaling. *Endocrinology* 147, 3555-3562.
- Maggiolini, M., Picard, D., 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol* 204, 105-114.
- Marinissen, M.J., Gutkind, J.S., 2001. G protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22, 368-376.
- Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P., 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 7, 497-508.
- McBrayer, Z., Ono, H., Shimell, M., Parvy, J.P., Beckstead, R.B., Warren, J.T., Thummel, C.S., Dauphin-Villemant, C., Gilbert, L.I., O'Connor, M.B., 2007. Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Dev Cell* 13, 857-871.
- Mertens, I., Husson, S.J., Janssen, T., Lindemans, M., Schoofs, L., 2007. PACAP and PDF signaling in the regulation of mammalian and insect circadian rhythms. *Peptides* 28, 1775-1783.
- Michels, G., Hoppe, U.C., 2008. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrin* 29, 182-198.
- Mirth, C., Truman, J.W., Riddiford, L.M., 2005. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 15, 1796-1807.
- Mirth, C.K., Riddiford, L.M., 2007. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays* 29, 344-355.
- Mohammadiani, H., Vashisth, H., 2016. All-atom structural models of the transmembrane domains of insulin and type 1 insulin-like growth factor receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7, 68.
- Moras, D., Gronemeyer, H., 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10, 384-391.
- Moss, G.P., 1989. The nomenclature of steroids: recommendations 1989. *Eur J Biochem* 186, 429-458.
- Moussian, B., 2010. Recent advances in understanding mechanisms of insect cuticle differentiation. *Insect Biochem Mol Biol* 40, 363-375.
- Mugat, B., Brodu, V., Kejzlarova-Lepesant, J., Antoniewski, C., Bayer, C.A., Fristrom, J.W., Lepesant, J.A., 2000. Dynamic expression of broad-complex isoforms mediates temporal control of an ecdysteroid target gene at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* 227, 104-117.
- Nassel, D.R., Vanden Broeck, J., 2016. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cell Mol Life Sci* 73, 271-290.
- Nijhout, H.F., 1975. A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Biol Bull* 149, 214-225.
- Nijhout, H.F., Grunert, L.W., 2002. Bombyxin is a growth factor for wing imaginal disks in Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15446-15450.
- Nijhout, H.F., Riddiford, L.M., Mirth, C., Shingleton, A.W., Suzuki, Y., Callier, V., 2014. The developmental control of size in insects. *Wires Dev Biol* 3, 113-134.
- Nijhout, H.F., Smith, W.A., Schachar, I., Subramanian, S., Tobler, A., Grunert, L.W., 2007. The control of growth and differentiation of the wing imaginal disks of *Manduca sexta*. *Dev Biol* 302, 569-576.
- Nilius, B., Voets, T., 2008. A TRP channel-steroid marriage. *Nat Cell Biol* 10, 1383-1384.
- Nussey, S., Whitehead, S., 2001. *Endocrinology: an integrated approach*, Oxford.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Shaw, D.E., Mueller, L., Prosser, R.S., Kobilka, B.K., 2013. The dynamic process of $\beta(2)$ -adrenergic receptor activation. *Cell* 152, 532-542.
- Okamoto, N., Yamanaka, N., Yagi, Y., Nishida, Y., Kataoka, H., O'Connor, M.B., Mizoguchi, A., 2009. A fat body-derived IGF-like peptide regulates postfeeding growth in *Drosophila*. *Dev Cell* 17, 885-891.
- Oldham, S., Hafen, E., 2003. Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol* 13, 79-85.
- Organization, W.H., 2011. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes

- mellitus. *Diabetes Res Clin Pr* 93, 299-309.
- Oro, A.E., Mckeown, M., Evans, R.M., 1990. Relationship between the product of the *Drosophila*-ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid x-receptor. *Nature* 347, 298-301.
- Oro, A.E., Mckeown, M., Evans, R.M., 1992. The *Drosophila* retinoid-x receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis. *Development* 115, 449-462.
- Palli, S.R., Hiruma, K., Riddiford, L.M., 1992. An ecdysteroid-inducible *Manduca* gene similar to the *Drosophila* *Dhr3* gene, a member of the steroid hormone receptor superfamily. *Dev Biol* 150, 306-318.
- Pan, J., Di, Y.Q., Li, Y.B., Chen, C.H., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2018. Insulin and 20-hydroxyecdysone oppose each other in the regulation of phosphoinositide-dependent kinase-1 expression during insect pupation. *J Biol Chem* 293, 18613-18623.
- Patel, M.V., Hallal, D.A., Jones, J.W., Bronner, D.N., Zein, R., Caravas, J., Husain, Z., Friedrich, M., Vanberkum, M.F., 2012. Dramatic expansion and developmental expression diversification of the methuselah gene family during recent *Drosophila* evolution. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 318, 368-387.
- Petrucelli, L., Herrera, R., Garcia-Arenas, R., Rosen, O.M., 1985. Acquisition of insulin-dependent protein tyrosine kinase activity during *Drosophila* embryogenesis. *J Biol Chem* 260, 16072-16075.
- Pi, M., Parrill, A.L., Quarles, L.D., 2010. GPRC6A mediates the non-genomic effects of steroids. *J Biol Chem* 285, 39953-39964.
- Preininger, A.M., Meiler, J., Hamm, H.E., 2013. Conformational flexibility and structural dynamics in GPCR-mediated G protein activation: a perspective. *J Mol Biol* 425, 2288-2298.
- Prossnitz, E.R., Maggiolini, M., 2009. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol* 308, 32-38.
- Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L., Tjian, R., 2003. Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev* 17, 2006-2020.
- Puig, O., Tjian, R., 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* 19, 2435-2446.
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., Kobilka, B.K., 2011. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
- Reagan, J.D., 1994. Expression cloning of an insect diuretic hormone receptor. A member of the calcitonin/secretin receptor family. *J Biol Chem* 269, 9-12.
- Ren, J., Li, X.R., Liu, P.C., Cai, M.J., Liu, W., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2014. G protein α participates in the steroid hormone 20-hydroxyecdysone nongenomic signal transduction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144, 313-323.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630.
- Rewitz, K.F., O'Connor, M.B., Gilbert, L.I., 2007. Molecular evolution of the insect halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochem Mol Biol* 37, 741-753.
- Richard, D.S., Applebaum, S.W., Sliter, T.J., Baker, F.C., Schooley, D.A., Reuter, C.C., Henrich, V.C., Gilbert, L.I., 1989. Juvenile hormone bisepoxide biosynthesis *in vitro* by the ring gland of *Drosophila melanogaster*: a putative juvenile hormone in the higher diptera. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1421-1425.
- Riddiford, L.M., 1976. Hormonal control of insect epidermal cell commitment *in vitro*. *Nature* 259, 115-117.
- Riddiford, L.M., 1996. Juvenile hormone: the status of its "status quo" action. *Arch Insect Biochem* 32, 271-286.
- Riddiford, L.M., Cherbas, P., Truman, J.W., 2001. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam Horm* 60, 1-73.
- Riddiford, L.M., Hiruma, K., Zhou, X.F., Nelson, C.A., 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 1327-1338.

- Robinow, S., Talbot, W.S., Hogness, D.S., Truman, J.W., 1993. Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development* 119, 1251-1259.
- Ryoo, H.D., Baehrecke, E.H., 2010. Distinct death mechanisms in *Drosophila* development. *Curr Opin Cell Biol* 22, 889-895.
- Sadowski, M.I., Parish, J.H., 2003. Automated generation and refinement of protein signatures: case study with G protein-coupled receptors. *Bioinformatics* 19, 727-734.
- Sandstrom, D.J., Restifo, L.L., 1999. Epidermal tendon cells require broad complex function for correct attachment of the indirect flight muscles in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 112, 4051-4065.
- Schioth, H.B., Fredriksson, R., 2005. The GRAFS classification system of G protein-coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol* 142, 94-101.
- Schulte, G., 2010. International union of basic and clinical pharmacology, LXXX, the class frizzled receptors. *Pharmacol Rev* 62, 632-667.
- Schultz, H., Rasmussen, B.K., Kristensen, P.L., Jensen, A.K., Pedersen-Bjergaard, U., 2018. Early incidence of glucocorticoid-induced diabetes in patients with brain tumors: a retrospective study of the first 7 days of treatment. *Neurooncol Pract* 5, 170-175.
- Shao, H.L., Zheng, W.W., Liu, P.C., Wang, Q., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2008. Establishment of a new cell line from lepidopteran epidermis and hormonal regulation on the genes. *PLoS One* 3, e3127.
- Slaidina, M., Delanoue, R., Gronke, S., Partridge, L., Leopold, P., 2009. A *Drosophila* insulin-like peptide promotes growth during nonfeeding states. *Dev Cell* 17, 874-884.
- Smith, S.L., Bollenbacher, W.E., Gilbert, L.I., 1983. Ecdysone 20-monooxygenase activity during larval-pupal development of *Manduca sexta*. *Mol Cell Endocrinol* 31, 227-251.
- Spindler, K.D., Honl, C., Tremmel, C., Braun, S., Ruff, H., Spindler-Barth, M., 2009. Ecdysteroid hormone action. *Cell Mol Life Sci* 66, 3837-3850.
- Srivastava, D.P., Yu, E.J., Kennedy, K., Chatwin, H., Reale, V., Hamon, M., Smith, T., Evans, P.D., 2005. Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G protein-coupled receptor. *J Neurosci* 25, 6145-6155.
- Strasser, A., Wittmann, H.J., Seifert, R., 2017. Binding kinetics and pathways of ligands to GPCRs. *Trends Pharmacol Sci* 38, 717-732.
- Sullivan, A.A., Thummel, C.S., 2003. Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol Endocrinol* 17, 2125-2137.
- Talbot, W.S., Swyryd, E.A., Hogness, D.S., 1993. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73, 1323-1337.
- Tan, A., Palli, S.R., 2008. Ecdysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mol Cell Endocrinol* 291, 42-49.
- Tata, J.R., 2000. Autoinduction of nuclear hormone receptors during metamorphosis and its significance. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 645-651.
- Tatulian, S.A., 2015. Structural dynamics of insulin receptor and transmembrane signaling. *Biochemistry* 54, 5523-5532.
- Tawfik, A.I., Vedrova, A., Li, W.W., Sehnal, F., ObengOfori, D., 1997. Haemolymph ecdysteroids and the prothoracic glands in the solitary and gregarious adults of *Schistocerca gregaria*. *J Insect Physiol* 43, 485-493.
- Terashima, J., Bownes, M., 2006. E75A and E75B have opposite effects on the apoptosis/development choice of the *Drosophila* egg chamber. *Cell Death Differ* 13, 454-464.
- Tilg, H., Moschen, A.R., 2008. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrin Met* 19, 371-379.
- Truman, J.W., 2019. The evolution of insect metamorphosis. *Curr Biol* 29, 1252-1268.
- Truman, J.W., Riddiford, L.M., 2019. The evolution of insect metamorphosis: a developmental and endocrine view. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 374, 20190070.
- Uyehara, C.M., McKay, D.J., 2019. Direct and widespread role for the nuclear receptor EcR in mediating the response to ecdysone in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 9893-9902.
- Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, W.J., Diederens, J.H., 2001. Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses. *Int Rev Cytol* 211, 179-240.
- Vanden Broeck, J., Torfs, H., Poels, J., Van Poyer, W., Swinnen, E., Ferket, K., De Loof, A., 1999.

- Tachykinin-like peptides and their receptors-a review. *Ann Ny Acad Sci* 897, 374-387.
- Verdu, J., Buratovich, M.A., Wilder, E.L., Birnbaum, M.J., 1999. Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nat Cell Biol* 1, 500-506.
- Wang, D., Pei, X.Y., Zhao, W.L., Zhao, X.F., 2016. Steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes higher calcium mobilization to induce apoptosis. *Cell Calcium* 60, 1-12.
- Wang, D., Zhao, W.L., Cai, M.J., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2015. G protein-coupled receptor controls steroid hormone signaling in cell membrane. *Sci Rep-Uk* 5, 8675.
- Wang, J.L., Jiang, X.J., Wang, Q., Hou, L.J., Xu, D.W., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2007. Identification and expression profile of a putative basement membrane protein gene in the midgut of *Helicoverpa armigera*. *BMC Dev Biol* 7, 76.
- Wang, S., Wang, J.W., Sun, Y.N., Song, Q.S., Li, S., 2012. PKC-mediated USP phosphorylation at Ser35 modulates 20-hydroxyecdysone signaling in *Drosophila*. *J Proteome Res* 11, 6187-6196.
- Wang, S.F., Li, C., Zhu, J.S., Miura, K., Miksicek, R.J., Raikhel, A.S., 2000. Differential expression and regulation by 20-hydroxyecdysone of mosquito ultraspiracle isoforms. *Dev Biol* 218, 99-113.
- Warren, J.T., Gilbert, L.I., 1986. Ecdysone metabolism and distribution during the pupal adult development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 16, 65-82.
- Weigel, N.L., Moore, N.L., 2007. Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action. *Nucl Recept Signal* 5, e005.
- West, A.P., Jr., Llamas, L.L., Snow, P.M., Benzer, S., Bjorkman, P.J., 2001. Crystal structure of the ectodomain of methuselah, a *Drosophila* G protein-coupled receptor associated with extended lifespan. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3744-3749.
- White, B.H., Ewer, J., 2014. Neural and hormonal control of postecdysial behaviors in insects. *Annu Rev Entomol* 59, 363-381.
- Wu, F., Zhang, Y., Sun, B., McMahon, A.P., Wang, Y., 2017. Hedgehog signaling: from basic biology to cancer therapy. *Cell Chem Biol* 24, 252-280.
- Wu, K.M., Lu, Y.H., Feng, H.Q., Jiang, Y.Y., Zhao, J.Z., 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in china in areas with bt toxin-containing cotton. *Science* 321, 1676-1678.
- Xu, H.J., Xue, J., Lu, B., Zhang, X.C., Zhuo, J.C., He, S.F., Ma, X.F., Jiang, Y.Q., Fan, H.W., Xu, J.Y., Ye, Y.X., Pan, P.L., Li, Q., Bao, Y.Y., Nijhout, H.F., Zhang, C.X., 2015. Two insulin receptors determine alternative wing morphs in planthoppers. *Nature* 519, 464-467.
- Xu, J., Wang, X.F., Chen, P., Liu, F.T., Zheng, S.C., Ye, H., Mo, M.H., 2016. RNA interference in moths: mechanisms, applications, and progress. *Genes (Basel)* 7, 88.
- Yamanaka, N., Rewitz, K.F., O'Connor, M.B., 2013. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annu Rev Entomol* 58, 497-516.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z.Y., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P., Evans, R.M., 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476-479.
- Yao, T.P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M., Evans, R.M., 1992. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71, 63-72.
- Yin, V.P., Thummel, C.S., 2005. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* 16, 237-243.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zhang, X.Q., Li, X.R., Ren, J., Li, Y.B., Cai, M.J., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2015. Beta-arrestin1 interacts with G protein-coupled receptor to desensitize signaling of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone in the lepidopteran insect *Helicoverpa armigera*. *Cell Signal* 27, 878-886.
- Zhao, W.L., Wang, D., Liu, C.Y., Zhao, X.F., 2016. G protein-coupled receptor kinase 2 terminates G protein-coupled receptor function in steroid hormone 20-hydroxyecdysone signaling. *Sci Rep-Uk* 6, 29205.
- Zhao, X.F., 2020. G protein-coupled receptors function as cell membrane receptors for the steroid hormone 20-hydroxyecdysone. *Cell Commun Signal* 18, 146.
- Zhao, X.F., Wang, J.X., Xu, X.L., Li, Z.M., Kang, C.J., 2004. Molecular cloning and expression patterns of the molt-regulating transcription factor HHR3 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol Biol* 13, 407-412.
- Zhou, B.H., Riddiford, L.M., 2001. Hormonal regulation and patterning of the broad-complex in the epidermis and wing discs of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol* 231, 125-

- 137.
- Zhou, X.F., Zhou, B.H., Truman, J.W., Riddiford, L.M., 2004. Overexpression of broad: a new insight into its role in the *Drosophila* prothoracic gland cells. *J Exp Biol* 207, 1151-1161.
- Zhu, J.S., Chen, L., Raikhel, A.S., 2007. Distinct roles of broad isoforms in regulation of the 20-hydroxyecdysone effector gene, vitellogenin, in the mosquito *Aedes aegypti*. *Mol Cell Endocrinol* 267, 97-105.
- Zhu, Y., Bond, J., Thomas, P., 2003. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2237-2242.
- Zitnan, D., Kim, Y.J., Zitnanova, I., Roller, L., Adams, M.E., 2007. Complex steroid-peptide-receptor cascade controls insect ecdysis. *Gen Comp Endocrinol* 153, 88-96.

致谢

值此博士学位论文完成之际，我向国家对于我们博士研究生的资助和培养表示衷心地感谢！向求学这么多年来曾帮助、指导、教育过我的老师表示深深的感谢，向我的师兄师姐，师弟师妹，同学们真诚道一声谢谢！

首先感谢我的导师赵小凡教授，在我博士求学历程中，赵老师正直善良的人格，永不怕输的做事风格，科研上兢兢业业的态度都深深地感染着我。赵老师学识渊博，治学严谨，视野开阔，为我们营造了一个很好的精神氛围，博士求学期间，赵老师亦师亦母般的耐心指导和鼓励，使我在科研上遇到挫折时也不畏缩，静心思考科研思路，攻克难关。其次，由衷感谢王金星教授，感谢王老师的点评和指导，才使得研究课题更加完善。非常感谢两位老师的悉心栽培，培养了我浓厚科研兴趣以及很好的科研能力。本论文从选题到实验到撰写都离不开两位老师精心的指导，再次向两位老师表示衷心的感谢！

感谢实验室的董杜鹃师姐，总能在我遇到科研困难及生活困惑的时候耐心倾听和解答，感谢实验室的康翠洁老师，石秀贞老师，王显伟老师在我学习和生活上的帮助。

感谢已经毕业的李永波师兄，陈才华师兄，康新乐师兄，牛国娟师姐以及姚友香师妹，韩晓林师弟，潘静师妹，张俊英师妹，李雨师妹对我实验上的指导和帮助，让我更好地融入实验室的科研氛围。

感谢实验室的小伙伴李艳雪、邸宇琴、王晓培、李苍、刘晨飞、高杰、赵宝瑞、刘天文、赵雨濛、司伟烨、朱小旭、张小娣、吕丽霞、高林、金科谚、闫俏、邵斌岩、洪盼盼、付海晶、刘萍萍、黄真、朱彤、孙淑鹏等的帮助，你们既是我的师弟师妹，也是我的兄弟姐妹，亲同一家人的实验室氛围让我们彼此互帮互助，祝愿你们实验顺利，前程似锦！

感谢我的爸爸、妈妈、姐姐对我的大力支持和付出，感谢老公对我实验的指导和生活上的帮助，你们是我学习及生活的坚强后盾。祝愿你们身体健康、我们阖家欢乐！

感谢国家自然科学基金重点项目（31730083）在经费上对本论文的大力支持，在此深表谢意。

攻读学位期间已发表和准备发表的学术论文

1. Li, Y.L., Yao, Y.X., Zhao, Y.M., Di, Y.Q., Zhao, X.F., 2021. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone counteracts insulin signaling via insulin receptor dephosphorylation. *J Biol Chem* 296, 100318.
2. Kang, X.L., Li, Y.X., Li, Y.L., Wang, J.X., Zhao, X.F., 2021. The homo-tetramerization of a GPCR transmits the 20-hydroxyecdysone signal and increases 20E entry into cells for insect metamorphosis. *Development* 148(5): dev196667.
3. Li, Y.X., Wang, D., Zhao, W.L., Zhang, J.Y., Kang, X.L., Li, Y.L., 2021. Juvenile hormone induces Methoprene-tolerant 1 phosphorylation to increase interaction with Taiman in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem Mol Biol* 130, 103519.
4. Li, Y.L., Wang, X.P., Li, Y.X., Kang, X.L., Guo K.Q., Dong D.J., Wang, J.X., Zhao, X.F., Multiple G protein-coupled receptors transmit 20-hydroxyecdysone signaling by regulating different gene expression. (投稿中)
5. Li, Y.X., Kang, X.L., Li, Y.L., Wang, X.P., Yan Q., Wang, J.X., Zhao, X.F., Identification of the cell membrane receptor of juvenile hormone. (投稿中)

学位论文评阅及答辩情况表

论文评阅人	姓 名		专业技术 职 务	是否博导 (硕导)	所 在 单 位		总体评价 ※
	匿名评阅						优秀
	匿名评阅						优秀
	匿名评阅						优秀
答辩委员会成员	姓 名		专业技术 职 务	是否博导 (硕导)	所 在 单 位		
	主席	刘国先	教授	博导	青岛农业大学		
	委 员	聂品	教授	博导	中科院水生生物研究所		
		王金星	教授	博导	山东大学		
		康翠洁	教授	博导	山东大学		
		王显伟	教授	博导	山东大学		
答辩委员会对论文的 总体评价※			A	答辩秘书	董杜鹃	答辩日期	2021.05.22
备注							

※优秀为“A”；良好为“B”；合格为“C”；不合格为“D”。