



昆虫鞣化激素及其受体研究进展*

弓慧琼^{1**} 赵小明^{2***} 郭东龙¹ 马恩波² 张建珍²

(1. 山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2. 山西大学应用生物学研究所, 太原 030006)

摘 要 昆虫通过多种激素调控蜕皮过程, 以完成生长发育。鞣化激素与其受体结合, 调节昆虫表皮发育及鞣化、翅的伸展和成熟、肌肉收缩、卵子边缘细胞的迁移等, 对昆虫的生长发育具有重要作用。鞣化激素由两个亚基 (BURS 和 PBURS) 构成, 主要在胸腹神经节中合成, 两个亚基在结构及其进化上较为保守, 氨基酸序列中均含有 11 个半胱氨酸残基, 在某些特定的组织中具有独立的生物学活性。鞣化激素受体为 G 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptor, GPCR) 亚家族成员, 富含亮氨酸重复序列, 被命名为 dLGR2。LGR2 的 C 端区域 (含多个丝氨酸残基) 和 N 端区域 (富含亮氨酸重复结构域) 对于其行使正常功能具有重要作用。鞣化激素释放至血淋巴中与 LGR2 结合, 激活 cAMP/PKA 信号, 使酪氨酸羟化酶 (Tyrosinehydroxylase, TH) 磷酸化, 磷酸化的 TH 将酪氨酸 (Tyrosine) 羟化为多巴 (DOPA), 进而引起表皮的黑化和硬化过程。另外, 昆虫鞣化激素亚基形成的同源二聚体可激活转录因子 Relish, 调控免疫反应。本文结合近年来该领域研究成果, 对鞣化激素及其受体的分子结构特性和时空表达进行分析, 同时, 对其在翅的延展和成熟、表皮黑化和硬化以及免疫等方面的功能研究进展进行综述, 为深入认识昆虫鞣化激素及其受体作用机制提供参考。

关键词 昆虫蜕皮, 鞣化激素, G 蛋白偶联受体, 鞣化, 免疫反应

Progress in research on insect bursicon and its receptor

GONG Hui-Qiong^{1**} ZHAO Xiao-Ming^{2***} GUO Dong-Long¹
MA En-Bo² ZHANG Jian-Zhen²

(1. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Research Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Molting in insects is regulated by a variety of hormones that regulate different stages of growth and development. Bursicon binding to its receptor regulates a variety of processes, including the development and hardening of the cuticle, wing expansion and maturation, muscle contraction and migration of the edge of the egg cell, which are of great significance to the growth and development of insects. Bursicon consists of two subunits (BURS and PBURS) and is mainly synthesized in the thoracic and abdominal ganglions, which have independent biological activity in certain situations. The structure and evolution of the two subunits are conserved and their amino acid sequences have 11 cysteine residues. The bursicon receptor is a member of the G protein coupled receptor (GPCR) subfamily, which is rich in repeat leucine sequences and is named dLGR2. The C-terminal (containing multiple serine residues) and N-terminal regions (leucine-rich repetitive structure domain) of LGR2 play an important role in the exercise of normal functions. Bursicon is released into the haemolymph where it combines with LGR2 to activate the cAMP/PKA signal and phosphorylates tyrosine hydroxylase (TH). The activated TH transforms tyrosine into dopamine (DOPA), resulting in insect cuticle sclerotization and maturation. In addition, bursicon subunits can form a homologous dimer that activates the transcription factor Relish to regulate the immune response. This paper summarizes recent

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (31702067, 31640075, 31672364); 山西省青年科学基金 (201601D021102)

**第一作者 First author, E-mail: 1305479425@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: zxming@sxu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-04-18, 接受日期 Accepted: 2018-05-15

research on the molecular structure of bursicon and its receptor, its temporal and spatial expression, and its role in wing expansion and hardening, cuticle sclerotization and maturation, and the immune response. This review will provide a reference for further study of the role of bursicon in insects.

Key words insect molt, bursicon, G-protein-coupled receptor, tanning, immune response

昆虫体壁由表皮、真皮细胞和底膜构成,昆虫通过多种激素调控真皮细胞分泌,并通过蜕皮,更换外骨骼来完成其生长发育。在昆虫每次蜕皮后,都将以柔软的新生表皮代替旧表皮,但新生表皮不利于虫体的保水、防御外来入侵以及对抗机械损伤等,因此,新表皮的迅速鞣化对昆虫极其重要,这一过程是由鞣化激素(Bursicon)所调控的。目前,关于昆虫鞣化激素及其受体的研究主要集中于黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* Meigen、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst、烟草天蛾 *Manduca sexta* Linnaeus 等昆虫中,大多数研究都专注于鞣化激素的功能及分子机制等方面。本文结合近年来国内外昆虫对鞣化激素及其受体的分子结构特性、时空表达、及其在翅的延展和成熟、表皮黑化和硬化、免疫功能等方面的研究进展进行综述。

1 鞣化激素及其受体的分子结构特性

1.1 鞣化激素的分子结构特性

1962 年,鞣化激素由 Fraenkel 和 Hsiao (1962) 及 Cottrell (1962) 在红头丽蝇 *Calliphora erythrocephala* Meigen 中首次被发现并命名,在之后的 40 年里由于技术条件的限制而无大的研究进展。随着 DNA 测序技术的发展以及黑腹果蝇全基因组测序的完成,Adams 等 (2000)、Dewey 等 (2004)、Mendive 等 (2005) 及 Luo 等 (2005) 在黑腹果蝇中发现鞣化激素以异源二聚体的形式存在,由两个胱氨酸结合蛋白 BURS (α 亚基) 和 PBURS (β 亚基) 构成,其中 BURS 由 CG13419 基因编码, PBURS 由 CG15284 基因编码。目前,鞣化激素在棘皮动物海胆纲和节肢动物昆虫纲、甲壳纲、蛛形纲中都有所发现,尤其在昆虫纲的直翅目、双翅目、鞘翅目、鳞翅

目、膜翅目和半翅目中均鉴定出鞣化激素(表 1)。鞣化激素 BURS 和 PBURS 两个亚基的结构具有保守性,均含有 11 个半胱氨酸残基(图 1),其中 C₁-C₇, C₂-C₈, C₃-C₉, C₄-C₁₀ 和 C₅-C₁₁ 之间通过二硫键相连接, C₆ 是 BURS 和 PBURS 之间共价聚合所必需的(Dircksen *et al.*, 1991; Isaacs, 1995; Hearn, 2000; Vitt *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2005)。鞣化激素 BURS 和 PBURS 两个亚基在昆虫类群间进化极其保守(图 2),意味着其在不同的昆虫中可能具有相似的功能。

各物种鞣化激素两个亚基登陆号分别为: DmBurs (NP_650983.1), DmPburs (NP_609712.1), BmBurs (NP_001091845.1), BmPburs (NP_001037289.1), TcBurs (NP_001107779.1), TcPburs (NP_001107780.1), AmBurs (NP_001091704.1), AmPburs (AAZ18443.1), HaBurs (AHM02472.1), HaPburs (AHM02473.1), MsBurs (AAZ04374.1), MsPburs (ABB92831.1)。

1.2 鞣化激素受体的分子结构特性

鞣化激素受体是 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR) 亚家族成员,富含亮氨酸重复序列,在黑腹果蝇中由 *rickets* (*rk*) 编码,又被命名为 dLGR2 (leucine-rich repeat-containing G protein coupled receptor) (Eriksen *et al.*, 2000; Baker and Truman, 2002; Van *et al.*, 2008)。鞣化激素结合并激活由 *rk* 基因编码的 dLGR2 受体,产生相对应的作用机制,才能进一步发挥其功能。已有研究证明, G 蛋白偶联受体的亚家族 LGRs, 含有一个大的富含亮氨酸重复序列的跨膜区,其在动物界中具有高度的保守性(Nishi *et al.*, 2000)。LGRs 亚家族中除了 dLGR2 (黑腹果蝇 LGR2) 和脊椎动物孤儿受体 LGR4, LGR5, LGR6 (Eriksen *et al.*, 2000; Hsu, 2003) 外,还包括脊椎动物糖蛋白激素受体和哺

表 1 鞣化激素的鉴定
Table 1 The identification of bursicon

门 Clade	纲 Class	目 Order	种 Species	参考文献 Reference
节肢动物 Arthropod	昆虫纲 Insecta	直翅目 Orthoptera	飞蝗 <i>Locusta migratoria manilensis</i> Meyen	Dircksen <i>et al.</i> , 1991
		双翅目 Diptera	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i> Giles	Robertson <i>et al.</i> , 2007
			家蝇 <i>Musca domestica</i> Linnaeus	Wang <i>et al.</i> , 2008
			红头丽蝇 <i>C. erythrocephala</i> Meigen	Fraenkel and Hsiao, 1962; Cottrell, 1962
			黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i> Meigen	Mendive <i>et al.</i> , 2005
		鞘翅目 Coleoptera	赤拟谷盗 <i>T. castaneum</i> Herbst	Tribolium Genome Sequencing Consortium <i>et al.</i> , 2008
		鳞翅目 Lepidoptera	家蚕 <i>Bombyx mori</i> Linnaeus	Huang <i>et al.</i> , 2007
			烟草天蛾 <i>M. sexta</i> Linnaeus	Dai <i>et al.</i> , 2008
		膜翅目 Hymenoptera	西方蜜蜂 <i>Apis mellifera</i> Linnaeus	Hauser <i>et al.</i> , 2006
		半翅目 Hemiptera	褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i> Stål	Tanaka <i>et al.</i> , 2014
			桃蚜 <i>Myzus persicae</i> Sulzer	Zhang <i>et al.</i> , 2017
		蜚蠊目 Blattaria	美洲大蠊 <i>Periplaneta Americana</i> Linnaeus	Honegger <i>et al.</i> , 2002
	甲壳纲 Crustacea	十足目 Decapoda	普通滨蟹 <i>Carcinus maenas</i>	Wilcockson and Webster, 2008
			蓝蟹 <i>Callinectes sapidus</i>	Chung <i>et al.</i> , 2012
	蛛形纲 Arachnida	蛛目 Ixodida	肩突硬蛛 <i>Ixodes scapularis</i>	Robertson <i>et al.</i> , 2007
棘皮动物 Echinodermata	海胆纲 Echinoidea	拱齿目 Camaroidea	紫海胆 <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Van <i>et al.</i> , 2007

乳类动物耻骨松弛素 INSL3 受体 (Hsu and Gsuch, 2002; Hsu, 2003)。

值得注意的是, 鞣化激素受体的 N 端区域具有富含亮氨酸的重复结构域, 且富含亮氨酸的重复蛋白质家族可能在鞣化激素功能中起重要作用 (Bai and Pslli, 2010)。已有研究证实, 富含亮氨酸的重复结构域参与蛋白质互作, 在结合配体、细胞粘附和结合细胞外基质方面具有重要的作用 (Eriksen *et al.*, 2000)。已报道的人类受体 LGR5 是 rk 进化上最相关的直系同源物之一 (Snyder *et al.*, 2013a)。rk 和 LGR5 的 C 端区域包括多个丝氨酸残基, 而 LGR5 C 端区域已被证明在脱敏中起重要作用 (Snyder *et al.*, 2013b)。药理学研究表明, GPCR 的持续活化可以触发受体脱敏作用, 从而导致受体介导的信号传导降低 (Magalhaes *et al.*, 2012), 可见, 鞣化激素受体 C 端区域的丝氨酸残基在受体脱敏现象中发挥

重要作用。

2 鞣化激素的合成及其受体基因的时空表达

2.1 鞣化激素的合成

昆虫的中枢神经系统包括脑和腹神经索, 它们以围咽神经相连。脑由前、中、后脑组成, 又合称咽上神经节。腹神经索, 由咽下神经节、体神经节以及纵向连接各神经节的神经连索组成。将这些中枢神经系统分段匀浆并分别注射入刚羽化即颈部结扎的红头丽蝇体内, 发现红头丽蝇表皮均能鞣化, 表明鞣化激素几乎存在于所有的中枢神经系统中 (Miller, 1980; Downer and Laufer, 1983)。在美洲大蠊 *P. americana* Linnaeus、黑腹果蝇 *D. melanogaster* Meigen 和烟草天蛾 *M. sexta* Linnaeus 等昆虫的每个腹部神

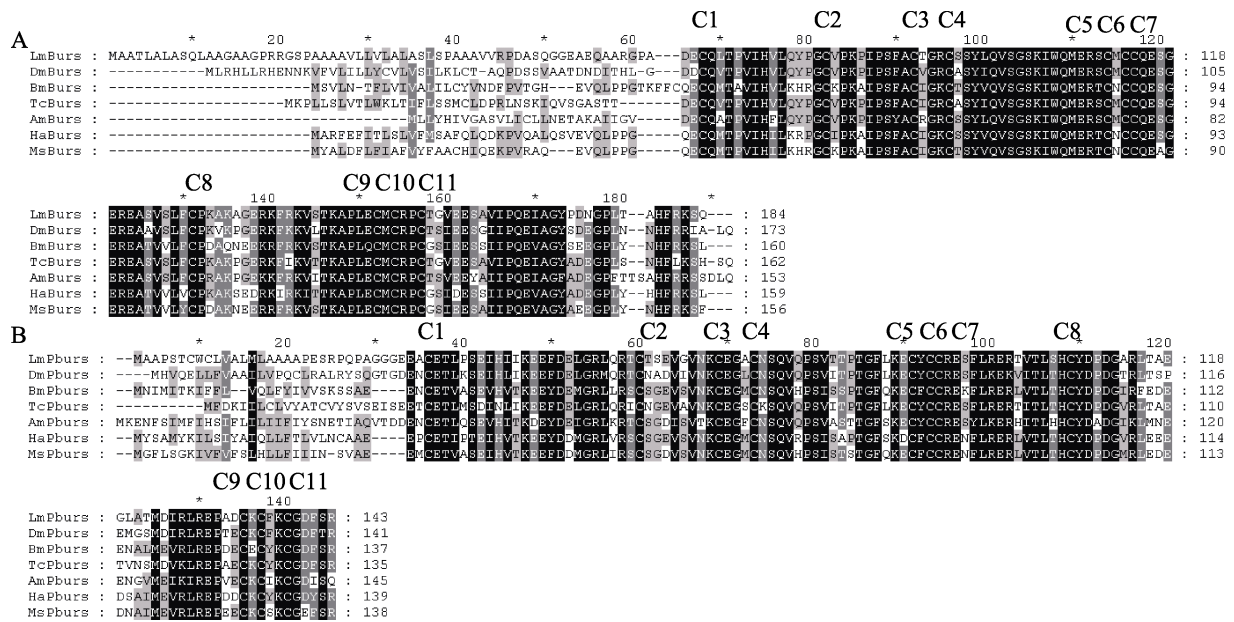


图 1 昆虫鞣化激素 BURS 和 PBURS 两个亚基的序列比对

Fig.1 The alignment of insect bursicon two subunits BURS and PBURS

- A. 鞣化激素 α 亚基 BURS 序列比对；B. 鞣化激素 β 亚基 PBURS 序列比对；LmBurs 和 LmPburs 为飞蝗，DmBurs 和 DmPburs 为黑腹果蝇，BmBurs 和 BmPburs 为家蚕，TcBurs 和 TcPburs 为赤拟谷盗，AmBurs 和 AmPburs 为意大利蜜蜂，HaBurs 和 HaPburs 为棉铃虫，MsBurs 和 MsPburs 为烟草天蛾。
- A. The alignment of insect bursicon BURS subunit; B. The alignment of insect bursicon PBURS subunit; LmBurs and LmPburs belong to *L. migratoria*, DmBurs and DmPburs belong to *D. melanogaster*, BmBurs and BmPburs belong to *B. mori*, TcBurs and TcPburs belong to *T. castaneum*, AmBurs and AmPburs belong to *A. mellifera*, HaBurs and HaPburs belong to *Helicoverpa armigera*, MsBurs and MsPburs belong to *M. sexta*.

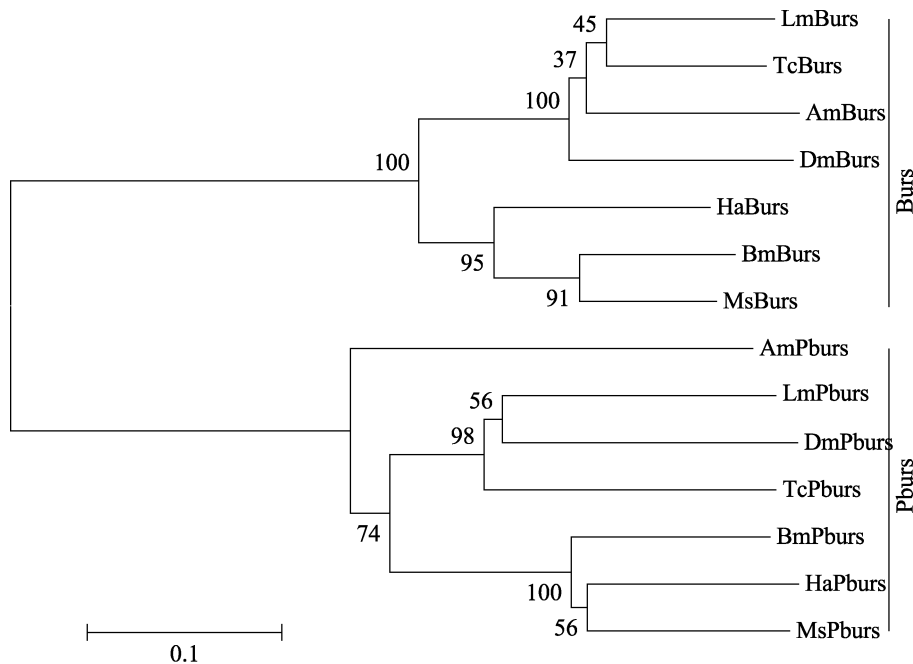


图 2 昆虫鞣化激素 BURS 和 PBURS 两个亚基的聚类分析

Fig.2 The cluster analysis of insect bursicon two subunits BURS and PBURS

经节两侧均有 1 对体积较大的神经细胞(细胞 27)和 1 对体积较小的神经细胞(细胞 IN704), 它们均能合成鞣化激素。其中, 当细胞 27 处于代谢旺盛期时, 细胞体积增大, 从而增强心脏的活动并扩大鞣化激素在昆虫体内的分布(Tublitz and Truma, 1985; Davis *et al.*, 2001; Dulcis *et al.*, 2005)。

Honegger 等(2011)通过检测冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Giles 在不同发育阶段中鞣化激素单体 BURS 或 PBURS 的转录水平, 发现其表达模式大致相同, 表达水平均在幼虫阶段稳定增加, 蛹期达到峰值, 在成虫蜕皮 8 h 后表达水平下降。随后, Honegger 等(2011)通过 TUNEL 标记法和成虫神经系统免疫组织化学法显示, 共同表达鞣化激素和甲壳动物心脏激活肽(CCAP)的神经元在成虫羽化后不久相继凋亡。但在不同发育阶段神经肽基因表达存在差异性, 如在群居型和散居型飞蝗中有 15 个神经肽基因具有表达差异, 其中 PBURS 在胚胎和早期若虫阶段高表达(Hou *et al.*, 2015)。Scopelliti 等(2016)证实果蝇成虫中肠表达 BURS 来调节肠道干细胞的稳态, 而 PBURS 在成虫中肠中没有显著高表达。

2.2 鞣化激素受体基因的时空表达

目前, 大量研究专注于鞣化激素的空间和时间的表达和释放(Peabody *et al.*, 2008, 2009; Lahr *et al.*, 2012), 而对鞣化激素受体的时空表达规律研究相对较少。Chintapalli 等(2007)通过微阵列分析 *rk* 基因在果蝇发育期间几种组织中的转录表达, 发现 *rk* 在幼虫 CNS(中枢神经系统)和脂肪体组织中具有更高的转录水平。Bai 和 Palli(2010)采用 qRT-PCR 分析赤拟谷盗中鞣化激素受体基因 *Tcrk* 的组织 and 时期表达特异性, 结果表明, *Tcrk* mRNA 在蛹期腹部表皮和翅芽组织中比在中肠中具有更高的表达水平, 且雌性组织比雄性组织中的 *Tcrk* mRNA 水平更高。对发育时期表达检测表明, 在未龄幼虫阶段, *Tcrk* 在 0-2 d 表达水平较低, 第 3 天表达增加; 在化蛹后的第 1 天保持较高的 *Tcrk* mRNA 水平,

化蛹后第 2 天表达水平降低, 但到蛹后期 *Tcrk* mRNA 水平又逐渐升高。*Tcrk* 组织和时期表达模式表明, 其可能在表皮结构伸展和发育中具有调控作用。Diao 等(2012)利用绿色荧光蛋白(GFP)在黑腹果蝇中标记受体 *rk*, 结果显示 *rk* 在表皮、CNS 和 periphery 中均有表达。

3 鞣化激素及其受体的功能

3.1 鞣化激素中 BURS 与 PBURS 亚基的生物活性研究

鞣化激素 BURS 和 PBURS 两个亚基在生物体内如何发挥其生物学功能? 针对这一科学问题, Luo 等(2005)对鞣化激素 BURS 和 PBURS 两个亚基在细胞中的生物活性进行了测定, 结果显示, 鞣化激素异源二聚体与 dLGR2 的结合为与 BURS 或 PBURS 同源二聚体竞争, 只有 BURS 和 PBURS 异源二聚体在表皮鞣化中具有生物活性并以高亲和力结合 dLGR2。BURS 和 PBURS 亚基除形成异源二聚体外, 也可在体外形成 BURS-BURS 和 PBURS-PBURS 同源二聚体(Luo *et al.*, 2005; An *et al.*, 2008)。如在黑腹果蝇、烟草天蛾、家蝇 *Musca domestica* Linnaeus 和澳洲黑蟋蟀 *Teleogryllus commodus* Walker 中, 一些神经元只能表达两个亚基中的一个亚基 BURS 或 PBURS(Luo *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2008; Honegger *et al.*, 2008; Peabody *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008)。在甲壳纲蓝色螃蟹 *Callinectes sapidus* 中, PBURS 的转录本是 BURS 的 3 倍以上(Chung *et al.*, 2012)。An 等(2012)在黑腹果蝇中发现同源二聚体可以诱导抗菌肽基因的表达, 参与免疫应答反应。Scopelliti 等(2014)从刚羽化的果蝇中提取血淋巴(内含高滴度的 BURS/PBURS 异源二聚体), 发现其可导致在成虫中肠内脏肌肉中持续产生依赖 dLGR2 的 cAMP。通过荧光定量 RT-qPCR 和免疫标记方法, 证实在中肠中存在成熟(剪接)的 BURS 转录物。Buchon 等(2013)及 Dutta 等(2015)分别通过果蝇中肠表达数据库和人的细胞特异性转录组数据库证实 BURS 在成虫中肠内分泌细胞中表

达, 而 *PBURS* 在成虫中肠中没有显著表达。随后, Scopelliti 等 (2016) 进一步证实, 在成虫中肠中单体 *BURS* 足以激活 *VM* (内脏肌肉) 中的 *dLGR2* 表达, 导致 *cAMP* (环腺苷酸) 活性增加, 而在此过程中 *PBURS* 亚基是非必需的。

总之, 尽管同源二聚体的生物学功能未知, 但可以推测鞣化激素 *BURS* 和 *PBURS* 在某种情况下具有独立的生物学活性, 而在某些特定条件下需以异源二聚体的形式发挥其功能。

3.2 鞣化激素及其受体在翅伸展和成熟方面的功能

鞣化激素及其受体参与了昆虫翅伸展和成熟的过程。成虫羽化时, 摄入空气使昆虫腹部肌肉的强直性收缩导致虫体血压升高, 升高的血压将血淋巴压入翅中, 从而引起翅的伸展 (Baker and Truman, 2002)。相关研究表明, *rk* 和 *BURS* 突变体果蝇在成虫羽化后翅不能伸展, 表明鞣化激素可能调节翅的伸展 (Baker and Truman, 2002; Dewey *et al.*, 2004)。随后 Kimura 等 (2004) 研究证实, 鞣化激素启动翅上皮细胞死亡, 导致表皮的腹侧和背侧层融合。在果蝇翅伸展之前, 翅由上皮细胞组成, 而鞣化激素信号可触发上皮-间充质细胞发生转变 (EMT), 导致翅上皮细胞移除, 使得翅膜展开并变平 (Kiger *et al.*, 2007; Natzle *et al.*, 2008)。相关研究表明, 鞣化激素异源二聚体及其受体 *rk* 对于最初折叠翅内的上皮细胞 EMT 转化具有重要作用 (Baker and Truman, 2002; Dewey *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005; Mendive *et al.*, 2005; Natzle *et al.*, 2008)。鞣化激素经由 *cAMP/PKA* (环腺苷酸/蛋白激酶 A) 信号转导路径, 引起昆虫翅真皮细胞凋亡, 真皮细胞层逐渐退化和消失, 上下两层体壁愈合并膜质化而形成翅 (Honegger *et al.*, 2011) 的结构。

Huang 等 (2007) 使用 RNAi 技术沉默家蚕蛹中 *Burs* 的表达, 同样导致翅伸展的缺陷。Arakane 等 (2008) 在赤拟谷盗中将受体 *Tcrk* dsRNA 注射入赤拟谷盗新蜕皮的蛹中, 沉默受体基因表达, 引起翅基褶皱的表型, 但对表皮鞣

化未产生影响。Bai 和 Palli (2010) 报道了类似的研究结果, 将 *Tcrk* dsRNA 注入幼虫中, 当发育至蛹阶段, 显示出缩短的翅和拉长的腹部等表型; 当将 *Tcrk* dsRNA 注入新蜕皮的蛹时, 待发育到成虫阶段, 未观察到缩短翅和无法羽化的表型, 但在 RNAi 成虫中则检测到皱缩的成虫翅鞘。Harwood 等 (2014) 研究表明肌肉神经末梢区域的 *rk* 基因在果蝇羽化和翅伸展期间起不可或缺的作用。上述研究结果表明, 鞣化激素及其受体在调节昆虫翅的伸展和成熟中发挥着重要作用。

3.3 鞣化激素及其受体在表皮黑化和硬化方面的功能

昆虫表皮的成熟是一个色素沉着和逐渐硬化的过程, 往往在羽化后的前 5 d 内进行, 包括黑化和硬化两个相对独立的过程, 且需要多种酶的参与, 如: 酚氧化酶 (Phenol oxidase, PO)、漆酶 (Laccase)、过氧化物酶 (Peroxidase)、酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH)、多巴脱羧酶 (Dopa decarboxylase, DDC) 和 N-乙酰基转移酶 (Acetyltransferase, aaNAT) 等。其中, TH 可将酪氨酸 (Tyrosine) 羟化为 3, 4-二羟基苯丙氨酸 (DOPA), 进而引起表皮的黑化和硬化过程 (Andersen, 2012)。

目前, 已有学者开展了鞣化激素受体在昆虫表皮硬化和黑化方面的作用机制研究。在赤拟谷盗中, 漆酶 2 (酪氨酸酶, *TcLac2*) 和 TH 是调节表皮硬化过程的两个关键酶 (Arakane *et al.*, 2005; Gorman and Arakane, 2010)。*Tcrk* 可通过调节 *TcLac2* 基因的表达来影响表皮硬化。Bai 和 Palli (2010) 通过微阵列分析, 在赤拟谷盗中分别注射 *Tcrk* dsRNA 和 *malE* dsRNA (对照), 与对照组相比, 只在注射 *Tcrk* dsRNA 的昆虫中检测到 *TcLac2* mRNA 水平显著降低, 而 *TcLac1* mRNA 和 *TcTH* mRNA 表达水平没有显著改变, 进一步证实了 *Tcrk* 通过调节 *TcLac2* 基因的表达而影响表皮硬化。在黑腹果蝇中, 将羽化 20 min 后的野生型黑腹果蝇的鞣化激素或血淋巴注射入 *rk* 基因突变体内, 表皮不能正常黑化, 但当注射 *cAMP* 类似物时, 表皮可迅速黑化 (Baker

and Truman, 2002)。Kimura 等 (2004) 研究表明 *rk* 受体通过提高 cAMP 水平进而激活 PKA。Luo 等 (2005) 通过体外结合实验, 证明重组鞣化激素可结合高亲和力的突变体受体 (*rk* $K_d = 2.5 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。用不同剂量的 cAMP 刺激鞣化激素, 鞣化激素和 cAMP 之间表现出剂量相关性, 而单独的 BURS 或 PBURS 亚基对细胞 cAMP 水平则没有影响 (Luo *et al.*, 2005; Mendive *et al.*, 2005)。Davis 等 (2007) 对黑腹果蝇的研究结果显示, *TH* mRNA 水平在羽化时没有变化, 但 *TH* 蛋白表达水平在昆虫羽化后迅速增加。Davis 等 (2007) 发现, 在 BURS 和 *rk* 基因突变的黑腹果蝇中, 不仅翅伸展和表皮鞣化受到影响, *TH* 也无法被正常磷酸化, 当向突变体果蝇中注射 cAMP 后, 大量 *TH* 被磷酸化, 而当存在 PKA 抑制剂时, *TH* 的磷酸化则受到抑制。因此, 羽化后的表皮鞣化与由 PKA 引起的 *TH* 磷酸化有关, 是激活 *rk* 的结果。Honegger 等 (2008) 在 *Dmrk* 果蝇突变体中, 发现在昆虫羽化后 *TH* mRNA 可正常表达, 但 *TH* 则没有被磷酸化, 表明鞣化激素受体的翻译后修饰 (如磷酸化) 可能在调控表皮黑化中起重要作用。

有研究显示, 鞣化激素通过 *TH* 的磷酸化起作用, 用于催化早期表皮鞣化所需的儿茶酚胺 (Davis *et al.*, 2007)。在赤拟谷盗中, 通过 RNAi 技术干扰 *TcLac2* 的表达, 可以抑制表皮黑化 (Arakane *et al.*, 2005)。这个结果表明, 漆酶与 *TH* 具有相同的代谢途径, 且在果蝇和赤拟谷盗中均存在类似的角质层硬化通路。有关研究报道显示, 利用 RNAi 技术干扰 BURS 在家蚕体内的表达, 未出现明显的黑化表型 (Huang *et al.*, 2007)。表明尽管鞣化通路本身可能是保守的, 但在不同昆虫物种中角质层鞣化的调节机制具有差异。

上述研究结果表明, 鞣化激素异源二聚体与受体结合后, 会促使 cAMP 大量合成, 激活下游 PKA 的活性, 从而使 *TH* 正常磷酸化, 活化后的 *TH* 将 tyrosine 羟化为 DOPA (图 3)。Andersen

等 (2012) 证明, DOPA 在 DDC 的作用下转化为 dopamine (多巴胺), 随后 dopamine 在 aaNAT 的作用下, N 端酰基化形成 NADA (N-乙酰多巴胺) 和 NBAD (N-β-丙酰多巴胺)。NADA 和 NBAD 分泌到表皮后, NADA 可专一性地调控表皮的硬化, 出现无色或淡黄色的表皮; 而对于表皮的黑化, 一方面, NADA 在表皮中交联得越多, 表皮颜色就越深。另一方面, DOPA 通过 5, 6-二羟基吲哚转变为黑色素, 这种不溶的黑色素与颗粒状的蛋白相连接, 分布于整个表皮基质层中, 可使表皮颜色加深。

3.4 鞣化激素及其受体在预防免疫方面的功能

有研究表明, 每个鞣化激素亚基所形成的同源二聚体能够诱导黑腹果蝇的预防性免疫。An 等 (2008) 采用基因芯片分析方法, 鉴定出 87 个受鞣化激素调控的基因, 其中有 7 个与免疫相关的基因, 这 7 个基因中有 3 个来自 *turandot* 基因家族, 分别为 *turandot X*, *turandot F* 和 *turandot C*, 2 个来自抗菌肽基因家族。随后, 为了进一步探究鞣化激素和抗菌肽之间的联系, 研究表明鞣化激素 BURS 亚基或 PBURS 亚基组成的同源二聚体经由 IMD 路径, 通过激活转录因子 Relish, 调控免疫反应。但这两种同源二聚体似乎不是通过连接 DLGR2 来起作用的, 表明这两种同源二聚体可能是通过新的受体来调控抗菌肽的表达 (An *et al.*, 2012)。Zhang 等 (2017) 检测了鞣化激素同源二聚体在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* Linnaeus 中的预防免疫作用, 发现注射重组的鞣化激素同源二聚体或异源二聚体时, 可诱导 5 个抗菌肽基因的 mRNA 水平升高, 其中 *CecA* 和 *DefA* 的 mRNA 水平达到最高。然而, 敲除转录因子 Relish2 后, 对重组鞣化激素同源二聚体或异二聚体诱导的 *CecA* 和 *DefA* 的表达受到影响, 敲除 Relish1 对 *CecA* 和 *DefA* 的表达则没有影响。结果表明, 鞣化激素通过 Relish2 诱导抗菌肽基因的表达, 从而有效地抑制体外细菌的生长, 起到预防性免疫作用 (图 3)。

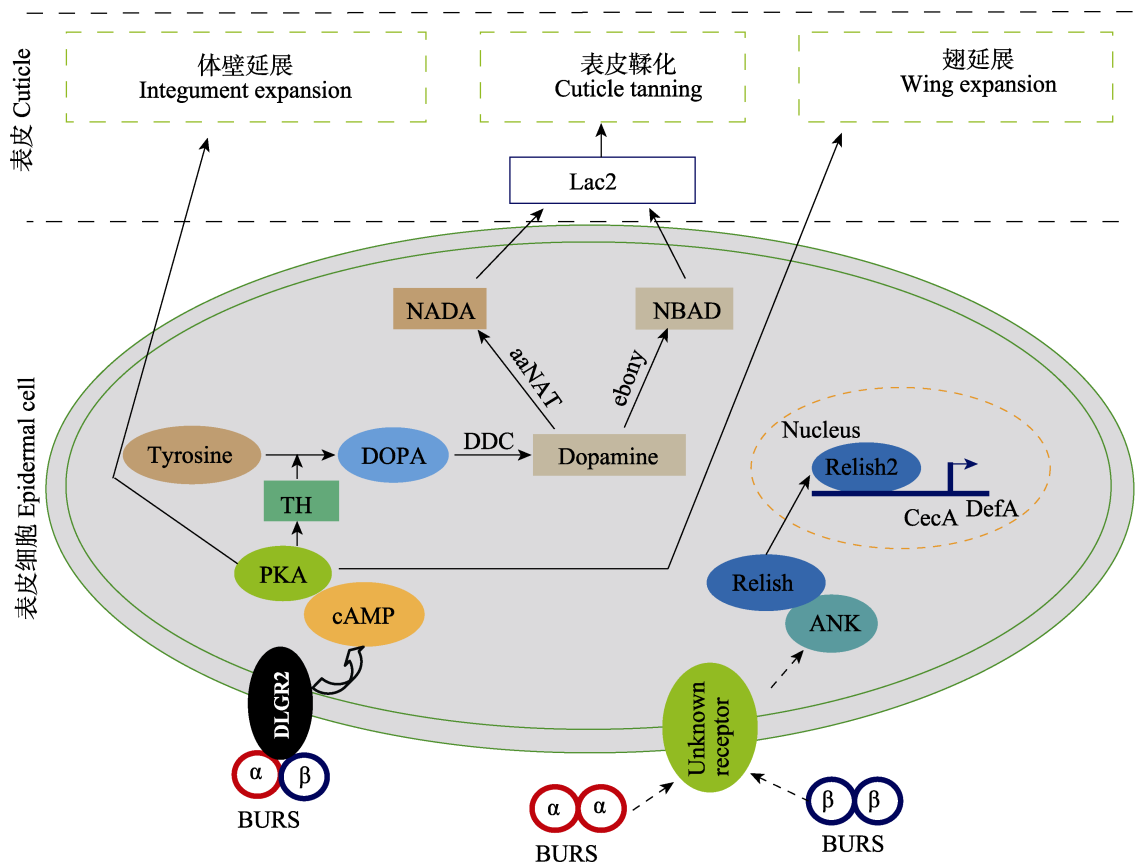


图3 鞣化激素及其受体在昆虫表皮鞣化、翅伸展和免疫反应中的作用机制示意图

Fig.3 The mechanism of bursicon and its receptor in insect cuticle tanning, wing extension and immune response

3.5 鞣化激素受体的其他生物学功能

先前, Baker 和 Truman (2002) 认为 *rk* 只作为羽化后翅的伸展和表皮硬化的触发器。这个假设是基于两个纯合子 *rk* 突变体果蝇 *Rk1* 和 *Rk4* 的相关研究数据,被认为是无效受体。之后, Loveall 和 Deitcher (2010) 使用 *rk* RNAi, 可有效降低 *rk* 转录水平表达, 并出现致死表型, 确定了 *rk* 不是无效受体。Bai 和 Palli (2010) 利用 RNAi 和微阵列分析等方法, 在赤拟谷盗中研究鞣化激素受体的功能, 表明 *Tcrk* 在表皮结构伸展和成虫羽化中也具有作用。发现 *TC004091*, *TC016332* 和 *TC013400* 3 个基因的表达模式与 *Tcrk* 的表达模式显示出相关性。其中, *TC004091* 表达是成虫羽化所必需的, 但 *TC004091* 是否调控表皮结构的伸展尚不清楚; *TC002663* 可能参与蛹发育过程, 但并不参与蛹期的表皮结构发育。关于各个基因的相关性及如何调控昆虫发育尚需要进一步研究。

Loveall 和 Deitcher (2010) 证明 *rk* 是蛹正常形成过程中表皮和成虫盘发育所必需的。研究发现, 在一些 *rk* RNAi 的蛹中, 有的蛹壳柔软且畸形, 而有的蛹壳则具韧性。分析认为 *rk* 可能与蛹化没有直接关联, 但 *rk* 的表达在蛹表皮发育形成中具有重要作用。

早期研究证明在昆虫变态发育期间, 大部分成虫肌肉都是从祖细胞开始形成, 成虫肌肉前体 (Adult muscle precursors, AMPs) 定位于幼虫翅芽和腿芽 (Raghavan *et al.*, 1996)。而肌细胞增强因子-2 (Mef-2) 在成肌细胞融合/体壁肌肉形成中起关键作用 (Olson *et al.*, 1995; Ranganayakulu *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 1997; Cripps *et al.*, 1998; Sandmann *et al.*, 2007; Ciglar and Furlong, 2009; Weitkunat and Webster, 2014)。Arakane 等 (2008) 采用 RNAi 技术, 将 *BURS*、*PBURS* 或 *rk* dsRNA 注射入蜕裂的蛹中, 检测鞣化激素及其受体在赤拟谷盗中的作用, 研究结果

显示,除影响表皮黑化功能外,还会导致蜕皮前肌肉收缩强度下降。Harwood 等(2014)针对在生肌过程的不同阶段的 rickets,使用 RNA 干扰方法发现在 AMPs 中 *rk* 的下调对成虫生存或翅伸展没有影响,这表明早期肌成熟不会因 *rk* 缺失而改变;相反,改变 *rk* 在肌管中的分化(Mef2 阳性细胞),影响成虫的生长和翅的伸展。表明 *rk* 在早期肌成熟中无明显作用,但 *rk* 在肌肉分化中具有重要作用,是成虫羽化的必备条件。

G 蛋白偶联受体除在成虫羽化、翅的延展中具有重要功能外,其介导的信号传导对于卵子边界细胞迁移同样具有重要作用。边缘细胞迁移发生在卵子形成过程中的第 9 阶段,在这一阶段果蝇卵室由 16 个种系细胞(卵母细胞和 15 个营养细胞)组成,被单层体壁衍生的卵泡上皮细胞所包围(Spradling, 1993)。一旦边界细胞簇形成,则会从卵母细胞释放,从前部上皮向后迁移至卵母细胞和营养细胞之间的边界(Duchek *et al.*, 2001; Duchek and Rorth, 2001; McDonald *et al.*, 2003)。边缘细胞迁移通常在卵子形成的第 10 阶段完成,边界细胞的生物学功能是促成卵孔的形成(Montell *et al.*, 1992)。而在果蝇卵子形成过程中,G 蛋白偶联受体介导的信号传导对于其边界细胞的极性,分离和移动具有重要作用(Anllo and Schüpbach, 2016)。

综上所述,鞣化激素受体除了调节昆虫翅的伸展及鞣化外,还在调节表皮结构发育、成虫盘发育、肌肉收缩和成熟、卵子边缘细胞的迁移及其成虫羽化等方面发挥着重要的作用。

4 小结与展望

随着人们对昆虫鞣化激素及其受体的深入研究,其分子结构及其信号传导途径已渐趋明确,其在调节昆虫生长发育等生物学功能方面的研究取得了突破性进展,但尚存在如下问题值得关注和探究:

(1) 目前对于昆虫鞣化激素及其受体的研究主要集中在黑腹果蝇、赤拟谷盗、家蚕等模式昆虫中,而在其他非模式昆虫中的研究相对较少,作

用机制尚不清楚,有待开展深入研究;

(2) 鞣化激素 BURS 或 PBURS 亚基同源二聚体调控昆虫免疫反应机制有待进一步深入研究,其未知受体尚需确认;

(3) 鞣化激素及其受体之间是如何协同作用以调控昆虫发育的分子机制还有待深入研究;

(4) 虽已有研究表明鞣化激素及其受体可能参与昆虫表皮碳氢化合物的合成(Flavenpouchon *et al.*, 2016),但其参与合成途径及其具体作用机制尚有待进一步研究工作进行揭示和阐明。

参考文献 (References)

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacle JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS,

- Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461): 2185–2195.
- An S, Dong S, Wang Q, Li S, Gilbert LI, Stanley D, Song Q, 2012. Insect neuropeptide bursicon homodimers induce innate immune and stress genes during molting by activating the NF- κ B transcription factor relish. *PLoS ONE*, 7 (3): e34510.
- An S, Wang S, Gilbert LI, Beerntsen B, Ellersieck M, Song Q, 2008. Global identification of bursicon-regulated genes in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 9(1): 424.
- Andersen SO, 2012. Cuticular sclerotization and tanning. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry & Molecular Biology*, 4: 167–192.
- Anllo L, Schüpbach T, 2016. Signaling through the G-protein-coupled receptor Rickets is important for polarity, detachment, and migration of the border cells in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 414(2): 193–206.
- Arakane Y, Li B, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kramer KJ, Park Y, 2008. Functional analysis of four neuropeptides, EH, ETH, CCAP and bursicon, and their receptors in adult ecdysis behavior of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mechanisms of Development*, 125(12): 984–995.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ, 2005. Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32): 11337–11342.
- Bai H, Palli SR, 2010. Functional characterization of bursicon receptor and genome-wide analysis for identification of genes affected by bursicon receptor RNAi. *Developmental Biology*, 344(1): 248–258.
- Baker JD, Truman JW, 2002. Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuropeptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program. *Journal of Experimental Biology*, 205(17): 2555–2565.
- Buchon N, Osman D, David FP, Fang HY, Boquete JP, Deplancke B, Lemaitre B, 2013. Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Reports*, 3(5): 1725–1738.
- Chintapalli VR, Wang J, Dow JA, 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature Genetics*, 39(6): 715–720.
- Chung JS, Katayama H, Dirksen H, 2012. New functions of arthropod bursicon: inducing deposition and thickening of new cuticle and hemocyte granulation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *PLoS ONE*, 7(9): 1602–1603.
- Ciglar L, Furlong EE, 2009. Conservation and divergence in developmental networks: a view from *Drosophila* myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6): 754–760.
- Cottrell CB, 1962. The imaginal ecdysis of blowflies. detection of the blood-borne darkening factor and determination of some of its properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 39(1): 67–73.
- Cripps RM, Black BL, Zhao B, Lien CL, Schulz RA, Olson EN, 1998. The myogenic regulatory gene *Mef2* is a direct target for transcriptional activation by Twist during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev.*, 12(3): 422–434.
- Dai L, Dewey EM, Zitnan D, Luo CW, Honegger HW, Adams ME, 2008. Identification, developmental expression, and functions of bursicon in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Neurology*, 506(5): 759–774.
- Davis MM, O'Keefe SL, Primrose DA, Hodgetts RB, 2007. A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 134(24): 4395–4404.
- Davis NT, Dulcis D, Hildebrand JG, 2001. Innervation of the heart and aorta of *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Neurology*, 440(3): 245–260.
- Dewey EM, McNabb SL, Ewer J, Kuo GR, Takanishi CL, Truman JW, Honegger HW, 2004. Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Current Biology*, 14(13): 1208–1213.
- Diao F, White BH, 2012. A novel approach for directing transgene expression in *Drosophila*: T2A-Gal4 in-frame fusion. *Genetics*, 190(3): 1139–1144.
- Dirksen H, Müller A, Keller R, 1991. Crustacean cardioactive peptide (CCAP) in the nervous system of the locust, *Locusta migratoria*. An immunocytochemical study on the ventral nerve cord and peripheral innervation. *Cell & Tissue Research*, 263(3): 439–457.
- Downer RGH, Laufer H, 1983. Endocrinology of insects. *A.R. Liss*, 172(1): 125–126.
- Duchek P, Somogyi K, Jekely G, Beccari S, Rørth P, 2001. Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell*, 107(1): 17–26.
- Duchek P, Rørth P, 2001. Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis. *Science*, 291(5501): 131–133.
- Dulcis D, Levine RB, Ewer J, 2005. Role of the neuropeptide CCAP in *Drosophila* cardiac function. *Developmental Neurobiology*, 64(3): 259–274.
- Dutta, Devanjali, Dobson, Gläßer C, Revah J, Korzelius J, Patel PH, Edgar BA, Buchon N, 2015. Regional cell-specific transcriptome mapping reveals regulatory complexity in the adult *Drosophila* midgut. *Cell Reports*, 12(2): 346–358.
- Eriksen KK, Hauser F, Schiøtt M, Pedersen KM, Søndergaard L,

- Grimmelikhuijzen CJ, 2000. Molecular cloning, genomic organization, developmental regulation, and a knock-out mutant of a novel leu-rich repeats-containing G protein-coupled receptor (DLGR-2) from *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 10(7): 924–938.
- Flavenpouchon J, Farine JP, Ewer J, Ferveur JF, 2016. Regulation of cuticular hydrocarbon profile maturation by *Drosophila* tanning hormone, bursicon, and its interaction with desaturase activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 79: 87–96.
- Fraenkel G, Hsiao C, 1962. Hormonal and nervous control of tanning in the fly. *Science*, 138(3536): 27–29.
- Gorman MJ, Arakane Y, 2010. Tyrosine hydroxylase is required for cuticle sclerotization and pigmentation in *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 40(3): 267–273.
- Harwood BN, Draper I, Kopin AS, 2014. Targeted inactivation of the rickets receptor in muscle compromises *Drosophila* viability. *Journal of Experimental Biology*, 217(22): 4091–4098.
- Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Blenau W, Grimmelikhuijzen CJ, 2006. A review of neurohormone GPCRs present in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and the honey bee *Apis mellifera*. *Progress in Neurobiology*, 80(1): 1–19.
- Hearn MT, Gomme PT, 2000. Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones. *Journal of Molecular Recognition*, 13(5): 223–278.
- Honegger HW, Market D, Pierce LA, Dewey EM, Kostron B, Wilson M, Choi D, Klukas KA, Mesce KA, 2002. Cellular localization of bursicon using antisera against partial peptide sequences of this insect cuticle-sclerotizing neurohormone. *Journal of Comparative Neurology*, 452(2): 163–177.
- Honegger HW, Dewey EM, Ewer J, 2008. Bursicon, the tanning hormone of insects: recent advances following the discovery of its molecular identity. *Journal of Comparative Physiology A Neuroethology Sensory Neural & Behavioral Physiology*, 194(12): 989–1005.
- Honegger HW, Estévez-Lao TY, Hillyer JF, 2011. Bursicon-expressing neurons undergo apoptosis after adult ecdysis in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Insect Physiology*, 57(7): 1017–1022.
- Hou L, Jiang F, Yang P, Wang X, Kang L, 2015. Molecular characterization and expression profiles of neuropeptide precursors in the migratory locust. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 63: 63–71.
- Hsu SY, 2003. New insights into the evolution of the relaxin-LGR signaling system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(7): 303–309.
- Hsu SY, Hsueh AJW, 2002. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science*, 295(5555): 671–674.
- Huang J, Zhang Y, Li M, Wang S, Liu W, Couble P, Zhao G, Huang Y, 2007. RNA interference-mediated silencing of the bursicon gene induces defects in wing expansion of silkworm. *Febs Letters*, 581(4): 697–701.
- Isaacs NW, 1995. Cystine knots. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(3): 391–395.
- Kimura K, Kodama A, Hayasaka Y, Ohta T, 2004. Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for post-ecdysial cell death in wing epidermal cells of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 131(7): 1597–1606.
- Kiger JA Jr, Natzle JE, Kimbrell DA, Paddy MR, Kleinhesselink K, Green MM, 2007. Tissue remodeling during maturation of the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.*, 301(1): 178–191.
- Lahr EC, Dean D, Ewer J, 2012. Genetic analysis of ecdysis behavior in *Drosophila* reveals partially overlapping functions of two unrelated neuropeptides. *Journal of Neuroscience*, 32(20): 6819–6829.
- Loveall BJ, Deitcher DL, 2010. The essential role of bursicon during *Drosophila* development. *BMC Developmental Biology*, 10(1): 92.
- Luo CW, Dewey EM, Sudo S, Ewer J, Hsu SY, Honegger HW, Hsueh AJ, 2005. Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8): 2820–2825.
- Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS, 2012. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *British Journal of Pharmacology*, 165(6): 1717–1736.
- McDonald JA, Pinheiro EM, Montell DJ, 2003. PVF1, a PDGF/VEGF homolog, is sufficient to guide border cells and interacts genetically with Taiman. *Development*, 130(15): 3469–3478.
- Mendive FM, Van LT, Claeyens S, Poels J, Williamson M, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJ, Vassart G, Vanden Broeck J, 2005. *Drosophila* molting neurohormone bursicon is a heterodimer and the natural agonist of the orphan receptor DLGR2. *Febs Letters*, 579(10): 2171–2176.
- Miller TA, 1980. Neurohormonal Techniques in Insects. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 154–178.
- Montell DJ, Rorth P, Spradling AC, 1992. slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* CEBP. *Cell*, 71(1): 51–62.
- Natzle JE, Kiger JA, Green MM, 2008. Bursicon signaling mutations separate the epithelial-mesenchymal transition from programmed cell death during *Drosophila melanogaster* wing maturation. *Genetics*, 180(2): 885–893.
- Nishi S, Hsu SY, Zell K, Hsueh AJ, 2000. Characterization of two

- fly LGR (leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor) proteins homologous to vertebrate glycoprotein hormone receptors: constitutive activation of wild-type fly LGR1 but not LGR2 in transfected mammalian cells. *Endocrinology*, 141(11): 4081–4090.
- Olson EN, Perry M, Schulz RA, 1995. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Developmental Biology*, 172(1): 2–14.
- Peabody NC, Diao F, Luan H, Wang H, Dewey EM, Honegger HW, White BH, 2008. Bursicon functions within the *Drosophila* CNS to modulate wing expansion behavior, hormone secretion, and cell death. *Journal of Neuroscience*, 28(53): 14379–14391.
- Peabody NC, Pohl JB, Diao F, Vreede AP, Sandstrom DJ, Wang H, Zelensky PK, White BH, 2009. Characterization of the decision network for wing expansion in *Drosophila* using targeted expression of the TRPM8 channel. *Journal of Neuroscience*, 29(11): 3343–3353.
- Raghavan KV, Gendre N, Stocker RF, 1996. Transplanted wing and leg imaginal discs in *Drosophila melanogaster* demonstrate interactions between epidermis and myoblasts in muscle formation. *Development Genes & Evolution*, 206(1): 46–53.
- Ranganayakulu G, Zhao B, Dokidis A, Molkentin JD, Olson EN, Schulz RA, 1995. A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 171(1): 169–181.
- Robertson HM, Navik JA, Walden KK, Honegger HW, 2007. The bursicon gene in mosquitoes: an unusual example of mRNA trans-splicing. *Genetics*, 176(2): 1351–1353.
- Sandmann T, Girardot C, Brehme M, Tongprasit W, Stolz V, Furlong EE, 2007. A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development*, 21(4): 436–449.
- Scopelliti A, Cordero JB, Diao F, Strathdee K, White BH, Sansom OJ, Vidal M, 2014. Local Control of Intestinal Stem Cell Homeostasis by Enteroendocrine Cells in the Adult *Drosophila* Midgut. *Current Biology*, 24(11): 1199–1211.
- Scopelliti A, Bauer C, Cordero JB, 2016. Bursicon- α subunit modulates dLGR2 activity in the adult *Drosophila melanogaster* midgut independently to Bursicon- β . *Cell Cycle*, 15(12): 1538–1544.
- Snyder JC, Rochelle LK, Lysterly HK, Caron MG, Barak LS, 2013a. Constitutive Internalization of the Leucine-rich G Protein-coupled Receptor-5 (LGR5) to the Trans-Golgi Network. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15): 10286–10297.
- Snyder JC, Rochelle LK, Barak LS, Caron MG, 2013b. The stem cell-expressed receptor LGR5 possesses canonical and functionally active molecular determinants critical to β -arrestin-2 recruitment. *PLoS ONE*, 8(12): e84476.
- Spradling AC, 1993. Developmental genetics of oogenesis// Bate M, Martinez-Arias A (eds.). *The Development of Drosophila melanogaster*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1–70.
- Tanaka Y, Suetsugu Y, Yamamoto K, Noda H, Shinoda T, 2014. Transcriptome analysis of neuropeptides and G-protein coupled receptors (GPCRs) for neuropeptides in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Peptides*, 53(2): 125–133.
- Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190): 949–955.
- Tublitz NJ, Truman JW, 1985. Insect cardioactive peptides. II. Neurohormonal control of heart activity by two cardioacceleratory peptides in the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*. *Journal of Experimental Biology*, 114: 381–395.
- Van LT, Vandersmissen HP, Van Hiel MB, Poels J, Verlinden H, Badisco L, Vassart G, Vanden Broeck J, 2008. Comparative genomics of leucine-rich repeats containing G protein-coupled receptors and their ligands. *General & Comparative Endocrinology*, 155(1): 14–21.
- Van LT, Van Hiel MB, Vandersmissen HP, Poels J, Mendive F, Vassart G, Vanden Broeck J, 2007. Evolutionary conservation of bursicon in the animal kingdom. *General & Comparative Endocrinology*, 153(1/3): 59–63.
- Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJ, 2001. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Molecular Endocrinology*, 15(5): 681–694.
- Wang S, An S, Song Q, 2008. Transcriptional expression of bursicon and novel bursicon-regulated genes in the house fly *Musca domestica*. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 68(2): 100–112.
- Weitkunat M, Schnorrer F, 2014. A guide to study *Drosophila* muscle biology. *Methods*, 68(1): 2–14.
- Wilcockson DC, Webster SG, 2008. Identification and developmental expression of mRNAs encoding putative insect cuticle hardening hormone, bursicon in the green shore crab *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 156(1): 113–125.
- Yin Z, Xu XL, Frasch M, 1997. Regulation of the twist target gene tinman by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. *Development*, 124(24): 4971–4982.
- Zhang H, Dong S, Chen X, Stanley D, Beerntsen B, Feng Q, Song Q, 2017. Relish2 mediates bursicon homodimer-induced prophylactic immunity in the mosquito *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.*, 7: 43163.