前沿与综述

丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpins 对昆虫免疫调控作用的研究进展*

周诗敏** 谷启娟 黄健华 时 敏*** 陈学新

（浙江大学昆虫科学研究所，农业部作物病虫分子生物学重点实验室，杭州 310058）

摘 要 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpins 是一类参与调控多种生理过程的蛋白酶抑制剂，广泛存在于所有生命体中。本文以黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、黄粉虫 *Tenebrio molitor*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 为例，阐述 Serpins 在昆虫体内诱导抗菌肽产生的 Toll 信号通路和诱导黑化反应的酚氧化酶酶原（Prophenoloxidase，PPO）激活通路中的调控作用，并以病毒、线虫、细菌和真菌及寄生蜂为例，明确它们产生的 Serpins 对昆虫宿主免疫系统的调控作用，全面总结和综述了近年来具有 Serpin domain 结构域的典型 Serpins 对昆虫免疫的调控作用的研究进展。

关键词 昆虫免疫；丝氨酸蛋白酶抑制剂；Toll 信号通路；PPO 激活通路；昆虫病原生物

Advances in research on serine protease inhibitors (Serpins) and their role in regulating insect immune systems

ZHOU Shi-Min** GU Qi-Juan HUANG Jian-Hua SHI Min*** CHEN Xue-Xin

(Ministry of Agriculture Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insect Pests, Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Serine protease inhibitors (Serpins) are involved in the regulation of various physiological processes common in all living organisms. In this review, we summarize recent published papers on insect serpins involved in the Toll signaling pathway, which produce antimicrobial peptides and regulate the prophenoloxidase (PPO) activation cascade which induces melanogenesis in model insects such as *Drosophila melanoganster*, *Tenebrio molitor* and *Manduca sexta*. In addition, we review research on serpins from entomopathogens, including viruses, nematodes, bacteria, fungi and parasitoids involved in the immuno-regulation of insect hosts.

Key words insect immunity; Serpins; Toll signaling pathway; PPO activation cascade; entomopathogens

丝氨酸蛋白酶抑制剂（Serine protease inhibitors，Serpins）是一类氨基酸序列和空间结构保守而功能高度分化的蛋白酶抑制超家族分子（Silverman *et al.*，2001）。由于 Serpins 多数是丝氨酸蛋白酶的不可逆的抑制剂（负调控因子），所以在抑制丝氨酸蛋白酶级联激活通路、维持生物体内稳态方面发挥着重要的作用，而少部分无抑制活性的 Serpins，则发挥类似于激素前体蛋白、激素转运蛋白、分子伴侣、储藏蛋白等其它方面的作用（Irving *et al.*，2000）。

Serpins 的分布十分广泛，存在于植物、动物、细菌及微生物等几乎所有的生命形式中

*资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（31672079）；浙江省自然科学基金（LZ18C140001，LR18C140001）

**第一作者 First author，E-mail：21616148@zju.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：shimin0623@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2020-02-28；接受日期 Accepted：2020-12-02

（Irving *et al.*，2002）。目前，已经有超过 1 500 种 Serpins 被鉴定出来（Irving *et al.*，2000；Law *et al.*，2006；Liu *et al.*，2015），主要分布在多细胞生物中，在原核生物中则分布较少（Tripathi and Sowdhamini，2008）。有关 Serpins 的研究主要集中于哺乳动物中，如人体（36 个）和小鼠（60 个）的功能性 Serpins 在炎症反应、免疫反应、肿瘤形成与转移、血液凝集、老年痴呆发生等过程中发挥重要调控作用（Heit *et al.*，2013）。对昆虫的 Serpins 基因的关注度虽不如哺乳动物，但因其参与调节昆虫体内如血液凝集、纤维蛋白溶解、配体激活、免疫黑化、生长发育过程中组织重建等多种生理反应和过程（Carrell *et al.*，1993；Kounnas *et al.*，1996；Irving *et al.*，2000；Li *et al.*，2004），所以 Serpins 在昆虫生理调控机理的研究中仍然占着重要地位，特别是在昆虫免疫自发性调节作用和病原生物对昆虫宿主免疫调控作用的研究中。本文针对近年来关于丝氨酸蛋白酶抑制剂参与调控昆虫免疫反应的研究进展进行综述。

1 Serpins 家族的结构与抑制作用机理

1.1 Serpins 家族的结构

Serpins 家族蛋白一般是由 300-500 个氨基酸组成的单链蛋白，存在一个或多个高度保守的 Serpin 结构域（Domain）。典型的 Serpin 结构域通常由一个蛋白主体和一个裸露在蛋白主体外的反应中心环（Reactive central loop，RCL）组成（Huntington *et al.*，2000），蛋白主体通常有 3 个 β-折叠片层（sA-sC）、8 或 9 个 α 螺旋（hA-hI）（图 1：A）（Law *et al.*，2006；Patschull *et al.*，2011）。Serpin 的 RCL 环带有能被靶标蛋白酶特异性识别的氨基酸残基（P1），P1 氨基端相邻的氨基酸残基称为 P2、P1 羧基端相邻的氨基酸残基称为 P1′，以此类推，RCL 环上的氨基酸可以表示为 N-P17-P9-P1-P1′-P9′-P17′-C。一般情况下，P1-P1′位点的氨基酸种类会决定靶酶的种类，且 RCL 上的 P4-P4′位点的氨基酸种类会影响 Serpin 与靶酶之间的亲和力（Sun *et al.*，2001）。

1.2 Serpins 抑制作用机理

在自然状态下，Serpins 呈亚稳定状态（Carrell and Owen，1985），它们能够通过改变构象结合靶酶后转化成稳定状态。Serpins 作用机理不同于传统的锁钥模型，即与靶酶的结合不通过范德华力、疏水作用或静电作用，而是通过与靶酶形成稳定的共价复合物导致靶酶失活，在结合过程中 Serpins 自身的结构也发生不可逆的改变，因此 Serpins 也被称为自杀性蛋白酶抑制剂（Law *et al.*，2006）。

Serpins 抑制靶酶的过程大致可以分为两个步骤。第一步，Serpins 顶部的 RCL 作为诱饵被靶酶识别，靶酶特异性切割 RCL 环上 P1-P1′位点，暴露的 P1 氨基酸与靶酶之间形成共价键，此时形成的共价化合物为米氏复合物（Whisstock and Bottomley，2006）（图 1：B）。一旦形成米氏复合物，Serpins 会释放出多余的能量，进入“紧绷-松弛”（Stressed to Relaxed，S to R）阶段，断裂的 RCL 的 N 端部分向下插入 β 折叠的 A 片层，此时蛋白酶底物则从 Serpins 的头部转移到 Serpins 的底部。最终，Serpins 与靶酶形成稳定的共价复合物（图 1：C），随后所形成的稳定复合物通过结合相关脂蛋白受体类似蛋白而被清除。此时，靶酶的结构已经彻底松散并彻底失去活性，而 Serpins 本身的构象也发生显著变化而失活。然而，在由米氏复合物转变为共价复合物的过程中，可能出现另一种旁支反应，即靶酶在被水解后没有与 Serpin 形成共价键，而是逃离了 Serpin 形成的“陷阱”，此时 Serpin 的构象已经发生改变，这种反应则是典型的酶-底物反应（图 1：D）（Tew and Bottomley，2001）。某些 Serpins 还可以通过辅助因子（Co-factors）的协助更精确的调控对蛋白酶的抑制。如人体内的抗凝血酶Ⅲ（Antithombin Ⅲ）在自然状态下具有较低的抑制活性，而辅助因子肝素（Heparin）存在时其抑制活性会显著提高（Huntington，2011）。

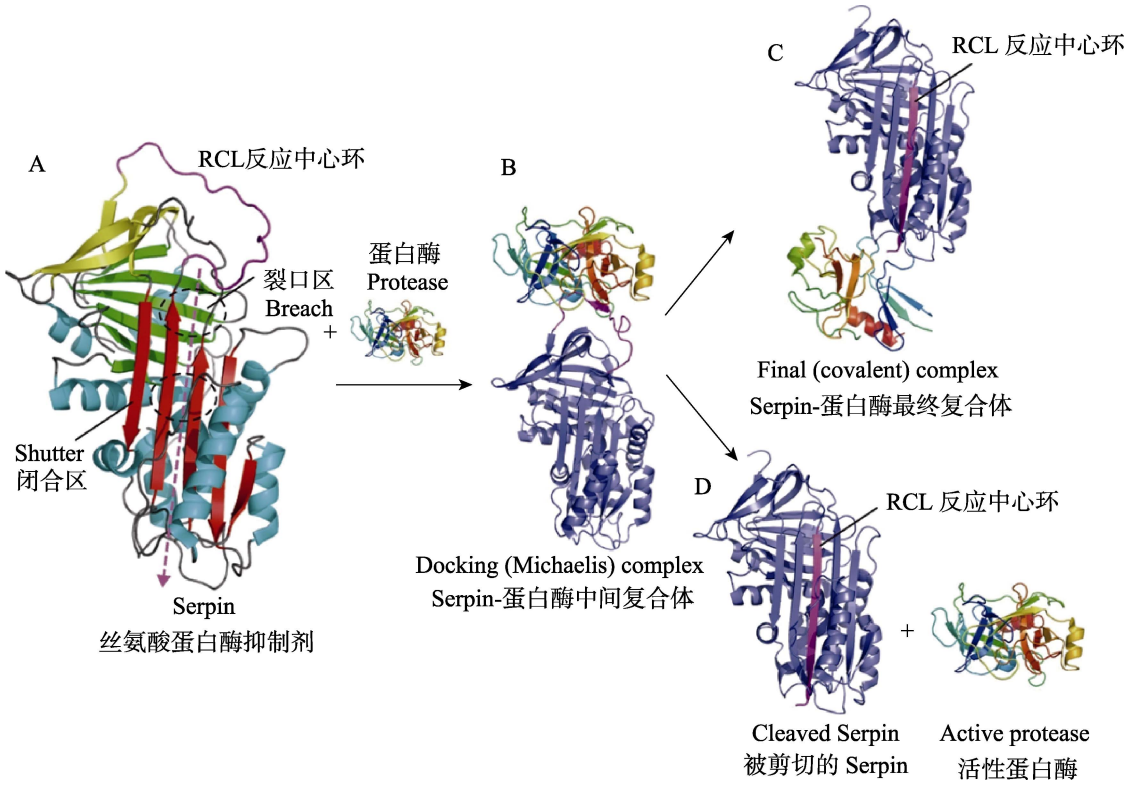

图 1　抑制性 Serpins 的结构及其抑制机制（Law *et al.*，2006）

Fig. 1　The structure and mechanism of inhibitory Serpins (Law *et al.*, 2006)

A. Serpins 在自然状态下的结构。β 片层 A 被标记为红色，β 片层 B 为绿色，β 片层 C 为黄色。螺旋被标记为蓝色，而 RCL 在整个分子的顶端且被标记为紫色；B. Serpin-蛋白酶中间复合体；C. Serpin-蛋白酶最终复合体；D. 被剪切的 Serpin 和有活性的蛋白酶。这种情况发生于蛋白酶逃逸了 Serpin 发生形变时的结构变化。

A. The structure of native Serpins. A sheet is in red, B sheet is green and C sheet is yellow. Helices are in blue and the RCL is at the top of the molecule, in magenta; B. The intermediate Serpin-protease complex; C. The final Serpin-protease complex; D. The cleaved Serpin and actived protease, occur when the protease escaped from the conformational trap or Serpin mutations.

2　Serpins 在宿主昆虫先天免疫信号通路中的作用

2.1　昆虫先天免疫系统

昆虫的免疫系统不同于高等脊椎动物，只有先天免疫系统（包括细胞免疫和体液免疫）能抵御各种病原生物物的侵染和致病。昆虫的细胞免疫指的是主要由血细胞参与的免疫反应，如吞噬、结节和包囊等过程（Strand *et al.*，2008），其中吞噬作用是单个血细胞识别病原体后通过内陷等过程将病原菌吞入并将其破坏杀死的过程，而包囊作用和结节作用则比较相似，都是遇到体积较大的线虫、寄生蜂卵、原生动物等时血细胞在病原物外围形成一层或多层鞘状物质并产生毒醌、氧醌和黑色素以包裹封闭和毒杀死病原物的过程（Nappi and Ottaviani，2000）。

昆虫的体液免疫系统是包含抗菌肽、抗病毒因子、凝集素、溶酶菌、蛋白酶及蛋白酶抑制剂等免疫因子配合多功能血细胞建立的一个开放完整的防御体系（李志强等，2016），其中最主要的是包括两个方面，一是由 Toll 信号通路和 IMD 途径诱导产生的抗菌肽，另一个则是酚氧化酶激活的黑化反应（张明明等，2012）。黑化反应和 Toll 信号通路中都有一系列丝氨酸蛋白酶联反应，因此 Serpins 是体液免疫中重要组成部分，在如免疫调控、防止昆虫过度免疫而对机体产生不利影响等过程中发挥重要功能。

2.2 Serpins 负调控 Toll 信号通路

抗菌肽是昆虫体液免疫的重要组成部分，由两种信号传导途径产生，即由革兰氏阴性菌激活的 IMD 途径和由真菌和革兰氏阳性菌激活的 Toll 途径（张明明等，2012），它们是通过激活不同的转录因子来调控抗菌肽的表达（Aggarwal and Silverman，2008）。IMD 途径是革兰氏阴性菌表面的 DAP 型肽聚糖与细胞跨膜受体 PGRP-LC 结合，然后将信号传导至细胞内诱导抗菌肽的表达；而 Toll 信号通路则是真菌和革兰氏阳性菌等病原体被可溶性肽聚糖识别蛋白 PGRP-SA 和 GNBP1 识别后，信号通过 Modular serine protease（MSP）、Spatzle-processing enzyme-activating enzyme（SAE）以及 Spatzle-processing enzyme（SPE）这 3 种不同的丝氨酸蛋白酶的依次激活向下游传递信号（Kim *et al.*，2008）并激活细胞因子样多肽（Spätzle），使其与细胞膜上 Toll 受体结合，诱导包括 defensin、drosomycin、cecropin 在内的多种抗菌肽的表达。Serpins 对丝氨酸蛋白酶有抑制作用，因此能对胞外丝氨酸蛋白酶激活级联起到负调控作用，从而负调控 Toll 信号通路。

作为模式昆虫的果蝇，其 Toll 信号通路研究比较系统（图 2：B），发现有 Spn43Ac、Spn1、Spn27Ac、Spn77Ba 和 Spn5 这 5 个 Serpins 能参与果蝇中 Toll 通路调控。在 1999 年 Levashina 等（1999）首次发现 Serpin 对果蝇 Toll 通路的负调控作用，即在未受到病原物感染的情况下，Spn43Ac 缺失型突变果蝇体内抗菌肽 drosomycin 也会异常高丰度表达，受到感染时 Necrotic（Spn43Ac 的别称）N 端被切割与底物蛋白酶 Persephone 结合发挥抑制活性（Ligoxygakis *et al.*，2002a）。类似的负调控作用过程还包括：果蝇的 Spn1 蛋白作用于模式识别受体 GNBP3 识别结合真菌细胞壁上 β-1,3-葡聚糖（β-1,3-glucans）后激活的 Toll 通路中，即在 Spätzle 剪切酶和丝氨酸蛋白酶 Grass 的上游对抗菌肽的激活起到负调控作用（Fullaondo *et al.*，2011）；Spn27Ac 能连接果蝇 Toll 信号通路与黑化通路，在免疫诱导引发的黑化反应过程中，Spn27Ac 蛋白的含量由于参与 Toll 通路的激活而在血淋巴中显著减少，从而导致果蝇体内 PO 活性显著上升随后血淋巴发生剧烈黑化反应（Ligoxygakis *et al.*，2002b）；向果蝇中异源转入 Spn77Ba 能

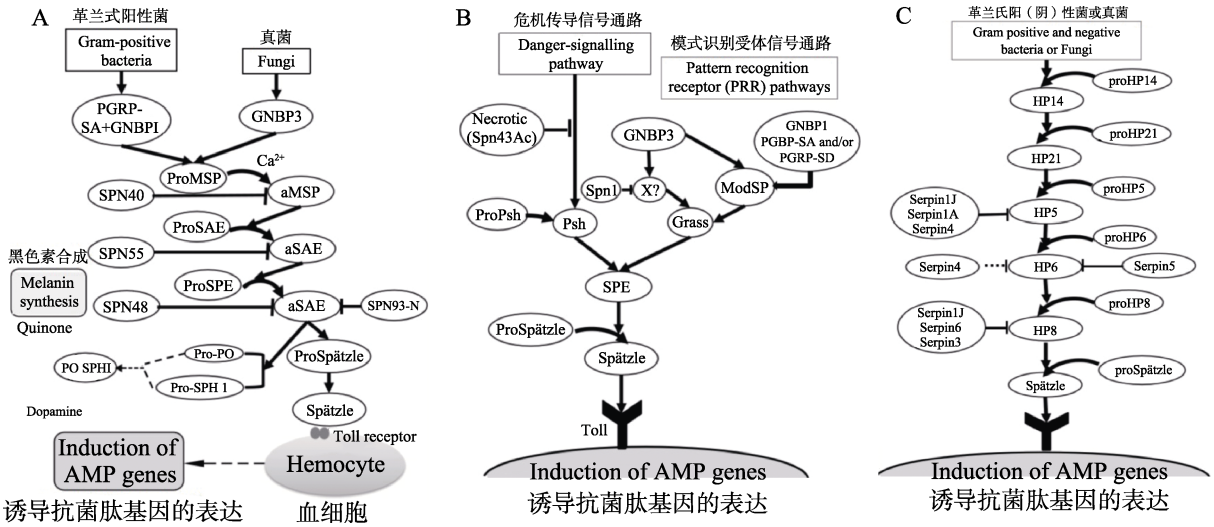

图 2 昆虫中丝氨酸蛋白酶抑制剂对 Toll 信号通路的调控模式
（An *et al.*，2009；An and Kanost，2010；Wang *et al.*，2020）

Fig. 2 Regulation of Toll signaling pathway by serine protease inhibitors (An *et al.*, 2009; An and Kanost, 2010; Wang *et al.*, 2020)

A. 黄粉虫；B. 果蝇；C. 烟草天蛾。

A. *Tenebrio molitor*; B. *Drosophila melanogaster*; C. *Manduca sexta.*

导致果蝇的呼吸系统气管局部黑化并引发系统性 Toll 信号通路的激活（Tang *et al.*，2008）。此外，Spn88Ae（Spn5）也能够负调控 Toll 途径以及系统性的 drosomycin 的表达（Ahmad *et al.*，2009；Mitsuko *et al.*，2018）。更有甚者，丝氨酸蛋白酶 Hayan 和 SP7 能同时调控 Toll 信号通路和黑化通路（Dudzic *et al.*，2019），因此推测还可能存在更多的 Serpins 蛋白同时参与调控两种免疫通路。

非模式昆虫 Serpins 参与 Toll 通路调控的研究主要集中于黄粉虫（图 2：A）和烟草天蛾（图 2：C）。目前，黄粉虫中共发现 4 个 Serpin 蛋白参与负调控 Toll 通路，其中 3 个 Serpin 蛋白（SPN40、SPN55 和 SPN48）能分别与 Toll 通路丝氨酸蛋白酶级联反应上 3 个丝氨酸蛋白酶（MSP、SAE 和 SPE）形成复合体，共同负调控 Toll 信号通路和 β-1,3-glucans 调控的黑色素的形成（Jiang *et al.*，2009）；而 SPN93 有两个完整的 Serpin 结构域，其 N 端的 Serpin 结构域能与 Toll 通路上终端丝氨酸蛋白酶 SPE 形成复合体从而负调控 Toll 信号通路，C 端 Serpin 结构域虽被证明能结合 MSP 和 SAE，但因其结合速率显著慢于 N 端 Serpin 结构域而无明显抑制作用（Jiang *et al.*，2011）。烟草天蛾中参与 Toll 通路的丝氨酸蛋白酶有 HP14、HP21、HP5、HP6 和 HP8，其过程是当细菌或真菌被 β-1,3-glucans 识别蛋白识别后，proHP14 发生切割反应被激活，并依次激活 HP21-HP5-HP6-HP8，HP8 直接激活 pro-Spätzle 从而诱导抗菌肽的表达（Ji *et al.*，2004；Wang and Jiang，2007；Wang *et al.*，2020）。在这个过程中，Serpin1I 能与 HP14 形成稳定复合物（Wang and Jiang，2006），Serpin4 能够与 proHP21 竞争性结合 HP21（Tong and Kanost，2005）。而 HP6 能被 Serpin4、Serpin5 所抑制（An and Kanost，2010），HP5 能被 Serpin1A、Serpin1J 和 Serpin4 抑制（Wang *et al.*，2020），Serpin1J、Serpin6 和 Serpin3 能与 HP8 发生竞争性结合形成稳定复合物，从而阻止 pro-Spätzle 的激活（Zou and Jiang，2005；An *et al.*，2011；Christen *et al.*，2012）。

2.3　Serpins 负调控 PPO 激活途径

黑化反应是昆虫体液免疫的另外一个重要组成部分，昆虫黑化反应过程中产生黑色素对抵御病原物入侵，促进伤口修复、抗炎，以及包囊和结节过程中发挥重要作用（Lavine and Strand，2001，2003；Maria *et al.*，2005；Jiang *et al.*，2010）。酚氧化酶（Phenoloxidase，PO）是黑化反应中的关键酶，酚氧化酶在昆虫血淋巴中通常以酶原（Prophenoloxidase，PPO）的形式存在，需要经过一系列依赖于特异性酶切的丝氨酸蛋白酶级联反应才能被激活（An *et al.*，2009；Jiang *et al.*，2010）。过度激活的体液黑化免疫会对昆虫本身会造成伤害，所以需要负调控因子对体液黑化免疫进行严格的调控，起到平衡的作用（Gonzalez-Santoyo and Cordoba-Aguilar，2012）。Serpins 在这个过程中就作为负调控因子抑制丝氨酸蛋白酶级联反应中丝氨酸蛋白酶的活性，从而对 PPO 的激活途径起到负调控作用（图 3）（An *et al.*，2013）。

目前，烟草天蛾中 Serpins 对 PPO 激活通路的调控作用研究较为深入（图 3：C），共发现有 7 个功能性 Serpins（Serpin 1- Serpin 7）对应 PPO 激活通路 14 个丝氨酸蛋白酶基因发挥作用；其中，Serpin1 可以经过可变性剪切产生 12 个亚型（Serpin1A-SerpinK 和 Serpin1Z）（An *et al.*，2011）。在烟草天蛾中，PPO 激活通路和 Toll 信号通路可由丝氨酸蛋白酶 HP5 连接起来（Wang *et al.*，2020）。与 Toll 通路相同，当病原体被识别后，proHP14 发生切割反应被激活，开始启动酶联反应切割激活下游 proHP21。自此，烟草天蛾的 PPO 激活通路分成两条支路。其中一条支路中，HP21 直接通过酚氧化酶原激活酶 PAP2 和 PAP3 切割激活 PPO 并形成最终产物黑色素，而 PAP3 受到 Serpin3（Zhu *et al.*，2003）、Serpin1J（Jiang *et al.*，2003）负调控。另外一条支路中，被激活的 HP21 切割激活 HP5-HP6，活化的 HP6 通过激活 PPO 的另外一个激活酶 PAP1 完成对 PPO 的激活。其中，HP5 能被 Serpin1A、Serpin1J 和 Serpin4 结合抑制（Wang *et al.*，2020），而 HP6

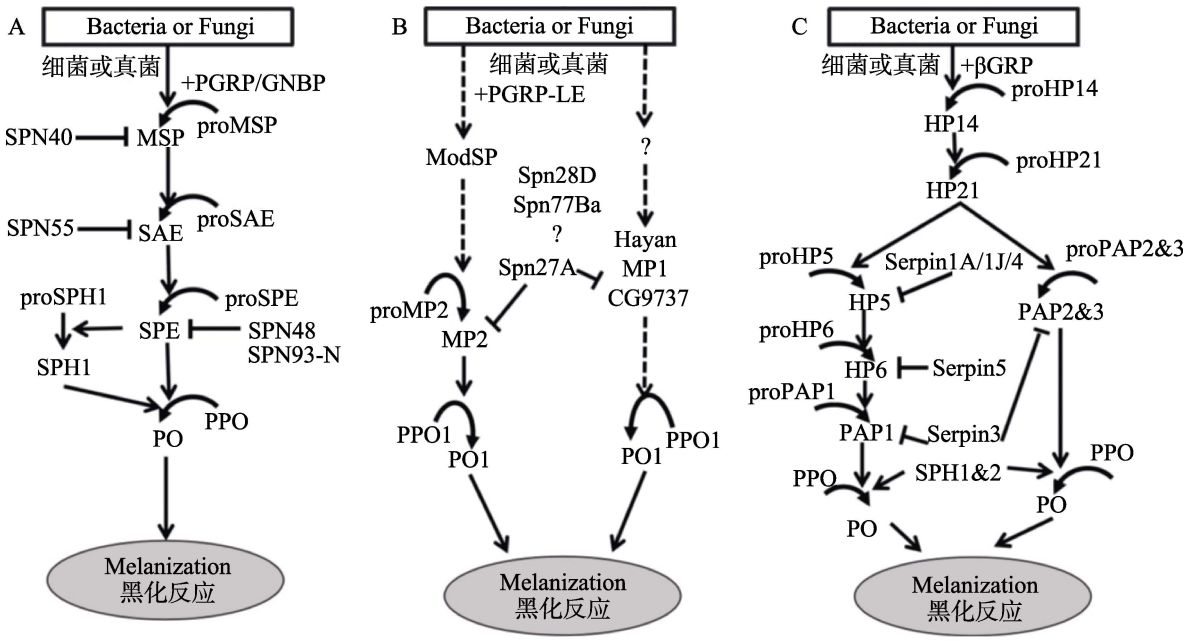

图 3　昆虫中丝氨酸蛋白酶抑制剂对 PPO 激活通路的调控模式（An *et al.*，2013；Wang *et al.*，2020）

Fig. 3　Regulation of PPO activation pathway by serine protease inhibitor (An *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020)

黄粉虫（A）、果蝇（B）和烟草天蛾（C）中部分丝氨酸蛋白酶抑制剂对 PPO 信号通路的调控模式。

Regulation of PPO activation pathway by serine protease inhibitors in *Tenebrio molitor* (A), *Drosophila melanogaster* (B) and *Manduca sexta* (C).

能被 Serpin4 和 Serpin5 结合抑制（An and Kanost，2010）。由于 Serpin3 能同时结合 PAP1 和 PAP3，所以对 PPO 的两个激活支路都有调控作用（Zhu *et al.*，2003）。

果蝇中有 3 个 Serpin 基因参与调控 PPO 激活通路（图 3：B）。其一是 Spn27A，缺失 Spn27A 的果蝇突变体血淋巴中 PO 活性显著上升且发生不可控的黑化和半致死现象（Ligoxygakis *et al.*，2002b），因此证明 Spn27A 能负调控 PPO 激活通路。后来研究表明，Spn27A 是通过与 PPO 激活通路上 MP2 形成稳定复合物从而抑制 MP2 活性，使其不能切割激活下游 PPO1 来调控果蝇体内 PO 活性（An *et al.*，2013）。其二是 Spn28D，Spn28D 能有效抑制微生物诱导后的黑化，而敲除 Spn28D 的果蝇血淋巴会发生自黑化反应（Scherfer *et al.*，2008）。其三是 Spn77Ba 能局部抑制果蝇气管中的黑化反应（Tang *et al.*，2008）。

黄粉虫的 PPO 激活通路与 Toll 信号通路几乎重合（图 3：A），所以参与负调控 Toll 信号通路的 Serpin 蛋白（SPN40、SPN55、SPN48 和 SPN93）分别结合 MSP、SAE 和 SPE，最终抑制下游 pro-Spätzle 激活的同时抑制了 PPO 的切割激活（Jiang *et al.*，2009，2011）。

3　病原生物和寄生蜂 Serpins 在昆虫宿主免疫中的作用

病原生物和寄生蜂在侵染昆虫时也会产生 Serpin 蛋白并分泌到宿主血淋巴中参与昆虫免疫功能调控，多为克服寄主免疫防御、帮助病原生物和寄生蜂成功侵染宿主、增强病原物传染性（Bao *et al.*，2018），或是调控宿主体内环境以促进病原物和寄生蜂的存活。寄生蜂和昆虫体内的病原生物（病毒、线虫、细菌和真菌等）能产生相应的 Serpins 去抑制宿主免疫蛋白的激活、抑制吞噬作用或黑化反应等。目前，病原生物和寄生蜂对宿主的侵染策略也成为研究热点，而弄清病原生物和寄生蜂产生的 Serpin 蛋白在侵染宿主过程的调控机制可能为药剂防治新靶标的

开发、新型生物防治制剂的开发等提供理论基础和材料。

3.1 病毒

病毒是最简单的生物之一，与细菌或真核生物相比，虽然基因组很小，但能稳定维持其独特的生存方式，因此，病毒编码的 Serpins 对病毒入侵宿主和在宿主体内生存一定有重要意义。有研究表明一些病毒感染和传播需要 Serpin 蛋白的参与，如牛痘病毒（Cowpox virus）中的 CrmA、粘液瘤病毒（Myxoma virus）中的 SERP2、杆状病毒（Baculovirus）中的 P35 等（Nathaniel *et al.*，2004）。粘液瘤病毒中的 SERP2 和牛痘病毒的 CrmA 都是多功能蛋白抑制剂，可以抑制促炎症反应和促细胞凋亡的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶的活性（Garcia-Calvo *et al.*，1998；Petit *et al.*，1996）；野生型粘液瘤病毒对兔子的感染可造成 100%的致死率，而 SERP2 突变的粘液瘤病毒株感染的兔子致死率则小于 10%（Macneill *et al.*，2006）。

新天蚕蛾属核多角体病毒（*Hemileuca* sp. nucleopolyhedrovirus，HespNPV）编码的 Hesp018 是第一个被验证的昆虫病毒 Serpin，其可以通过抑制寄主鳞翅目昆虫某种未知丝氨酸蛋白酶来抑制血淋巴的黑化反应，从而在病毒侵染昆虫宿主时抵抗宿主免疫并促进病毒在宿主体内的繁殖（Ardisson-Araujo *et al.*，2015；Rohrmann *et al.*，2013）。大绿丽金龟子昆虫病毒 *Anomala cuprea* entomopoxvirus 基因组中也编码一个 Serpin 基因（ACV086），它与痘病毒中能负调控细胞凋亡的 Serpin 基因（DUKE205）的序列存在部分同源性（Mitsuhashi *et al.*，2014），所以我们推测该 Serpin 也具有类似的功能。深入研究病毒产生的 Serpins 对昆虫宿主的免疫调控将为我们提供利用病毒等手段防治害虫的新思路。

3.2 线虫

线虫编码产生的 Serpins 能通过干扰宿主免疫应答、负调控宿主免疫系统来帮助线虫在宿主体内存活。旋毛虫 *Trichinella pseudospiralis* 由于其宿主范围广、能引起人畜疾病，其致病机制一直是研究热点。目前认为包括 Ts11-1（Mitreva *et al.*，2011）、Ts23-2（Nagano *et al.*，2003）、TspAd5（Zhang *et al.*，2016）和 Tp-Serpin（Xu *et al.*，2017）等在内的一些 Serpin 都能抑制丝氨酸蛋白酶，这些 Serpins 活性的高低可能和旋毛虫的致病性强弱密切相关。体外实验表明，重组的 Tp-Serpin 蛋白可以诱导巨噬细胞只向 M2 型极化，而不向促炎症的 M1 型极化，从而抑制炎症反应（Xu *et al.*，2017）。

昆虫病原性线虫——小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* 是多种农业地下害虫及钻蛀性害虫的重要的天敌，在害虫的生物防治过程中发挥的非常重要的作用（Duarte *et al.*，2013）。对小卷蛾斯氏线虫转录组测定表明其能编码转录的一个 Serpin 基因 sc-srp-6，进一步的功能研究则发现 sc-srp-6 可以抑制大蜡螟 *Galleria mellonella* 的消化酶并破坏大蜡螟伤口处的血液凝集作用（Toubarro *et al.*，2013）。

3.3 细菌和真菌

2008 年，Steenbakkers 等（2008）在厌氧型真菌梨囊鞭菌属 *Piromyces* sp. strain E2 中发现 Serpin 基因的存在并推测其作用可能是抑制植物体内丝氨酸蛋白酶以保护其纤维体，这也是真菌中发现的第一个 Serpin 基因。

目前，虽然有关细菌和真菌侵染昆虫宿主机制的研究较少，尚未有研究证明细菌或真菌直接编码的 Serpin 基因在其入侵昆虫宿主时发挥重要作用。但是，有研究表明细菌和真菌入侵昆虫宿主时可以通过调控宿主体内 Serpin 的表达从而调控寄主免疫（Kausar *et al.*，2017；Gao *et al.*，2018）。当大肠杆菌 *Escherichia coli*、白僵菌 *Beauveria bassiana*、藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 等病原微生物侵染柞蚕 *Antheraea pernyi* 时，会通过上调柞蚕的 ApSerpin-14 基因的表达来抑制柞蚕 PO 活性以及抗菌肽的表达（Kausar *et al.*，2017）。同样，家蚕 *Bombyx mori* 受到 *E. coli*、*B. bassiana*、*M. luteus* 感染时，Serpin28 基因在家蚕体内的表达

也会上调，反之，若干扰 Serpin28 基因的表达则会导致抗菌肽基因的表达升高（Gao *et al.*，2018）。这些实验结果证明细菌或真菌入侵昆虫宿主时可以通过上调宿主体内 Serpin 的表达来帮助对抗宿主的免疫。

3.4 寄生蜂

寄生蜂是多种重要农业昆虫的主要天敌，在寄生蜂与寄主的长期协同进化过程中形成了有效的寄生策略以应对寄主的免疫防御，在成功寄生的基础上进一步调控寄主生理保障寄生蜂子代的发育。寄生蜂在向寄主体内产卵的同时一并注入毒液、多分 DNA 病毒（Polydnavirus，PDV），幼蜂孵化的时候向寄主体内释放畸形细胞，这些寄生因子都能对寄主的免疫，生长发育等进行调控（Lawrence and Lanzrein，1993）。在对寄生蜂毒液蛋白组、毒腺转录组和畸形细胞转录组的研究结果中发现有多个 Serpin 蛋白或基因转录的存在（Colinet *et al.*，2009；Ali *et al.*，2015），这些 Serpins 很可能是参与调控寄主免疫，协助寄生蜂成功寄生从而保障子代寄生蜂的发育。内寄生姬蜂 *Venturia canescens* 毒液中的 Serpin 由于能改变寄主血细胞延展性并抑制寄主血淋巴黑化，所以在寄生前期发挥了帮助寄生蜂突破寄主免疫屏障的作用（Markus *et al.*，2000）。毒液被证明能抑制寄主免疫反应，负调控 PPO 激活通路。果蝇幼虫内寄生蜂布拉迪小环腹瘿蜂 *Leptopilina boulardi* 毒液中存在一个丰度很高、能抑制寄主的 PPO 激活通路以及黑化反应的 Serpin 蛋白（LbSPNy）（Colinet *et al.*，2009）。菜青虫 *Pieris rapae* 蛹期寄生蜂蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 基因组中共有 57 个丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpin 基因，通过序列比对和进化分析表明其中一些 Serpin 可能具有抑制免疫的功能（Yang *et al.*，2017）；其中一个表达丰度较高的 Serpin 蛋白（*Pp*S1V）能通过与寄主血淋巴中酚氧化酶原激活蛋白（*Pr*PAP1）形成复合体而抑制 PPO 激活，从而抑制寄主血淋巴的黑化活性（Yan *et al.*，2016）。菜蛾盘绒茧蜂 *Cotesia vestalis* 畸形细胞转录组中也发现两个序列相似度较高的 Serpin 基因存在，推测可能发挥着类似的作用（Ali *et al.*，2015）。

4 小结及展望

丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpins 分布十分广泛，几乎存在与所有生命形式中，参与调节多种生理反应。过多或过少的丝氨酸蛋白酶都会破坏生物体内的免疫平衡稳态，因此需要丝氨酸蛋白酶抑制剂的准确调控。昆虫基因组中多编码 10-40 个 Serpin 基因，可以通过可变性剪切产生更多的功能性 Serpins（Meekins *et al.*，2016）。Serpins 通常是昆虫免疫应答的重要组成部分，其作用主要是通过抑制丝氨酸蛋白酶级联反应中的丝氨酸蛋白酶负调控 Toll 通路和 PPO 激活通路，是其中重要组成部分，可以保护机体不被过度免疫伤害。但 Serpins 在这些免疫通路的靶标蛋白目前还只是部分被鉴定出来，还有一些很多未知的 Serpin 蛋白-蛋白酶对应关系以及相关免疫调节过程有待后继进一步的研究。此外，Serpins 在病原生物与宿主的互作中也发挥重要作用，病原生物也常常分泌 Serpin 蛋白对宿主生理进行调节，突破宿主免疫屏障，调控宿主体内环境以增强其毒力，帮助其在宿主体内的生长和繁殖。

实际上，我们对 Serpins 在昆虫及病原物生理中所发挥的功能的研究才刚刚起步，更多未知的 Serpins 等待我们去鉴定，对 Serpins 的全面系统发育研究有助于我们根据细胞外丝氨酸蛋白酶的已知调节因子对 Serpins 的功能进行推测。还有一些已知生理效应的 Serpins 仍未找到其靶标蛋白酶，传统上用于研究单个 Serpin 的遗传或生物化学方法比较耗时，可以考虑应用蛋白组学等手段更快确定不同 Serpin 的特定靶标蛋白酶。还有一些非抑制性 Serpins 的功能也有待我们进一步探究。这些研究结果，不仅加深对 Serpins 在昆虫生理调控过程中作用机制的理解，也为利用多种天敌昆虫或病原生物对害虫进行生物防治奠定理论基础，还为新型杀虫生物制剂的研发以及杀虫靶标发掘提供材料。同时，研究昆虫 Serpins 以及病原生物与昆虫互作过程中 Serpins 的作用也有助于人类丝氨酸蛋白酶介导的疾病

研究提供思路，并为的相关疾病提供治疗手段参考。

参考文献 (References)

Aggarwal K, Silverman N, 2008. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *Bmb Reports*, 41(4): 267–277.

Ahmad ST, Sweeney ST, Lee JA, Sweeney NT, Gao FB, 2009. Genetic screen identifies serpin5 as a regulator of the Toll pathway and CHMP2B toxicity associated with frontotemporal dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29): 12168–12173.

Ali MR, Lim J, Kim Y, 2015. Transcriptome of a specialized extra-embryonic cell, teratocyte, and its host immunosuppressive role revealed by ex vivo RNA interference. *Insect Molecular Biology*, 24(1): 13–28.

An CJ, Ishibashi J, Ragan EJ, Jiang HB, Kanost MR, 2009. Functions of *Manduca sexta* hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 284(29): 19716–19726.

An CJ, Kanost MR, 2010. *Manduca sexta* serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the Toll signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(9): 683–689.

An CJ, Ragan EJ, Kanost MR, 2011. Serpin-1 splicing isoform J inhibits the proSpatzle-activating proteinase HP8 to regulate expression of antimicrobial hemolymph proteins in *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(1): 135–141.

An CJ, Zhang MM, Chu Y, Zhao ZW, 2013. Serine protease MP2 activates prophenoloxidase in the melanization immune response of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 8(11): e79533.

Ardisson-Araujo DMP, Rohrmann GF, Ribeiro BM, Clem RJ, 2015. Functional characterization of hesp018, a baculovirus-encoded serpin gene. *Journal of General Virology*, 96(5): 1150–1160.

Bao JL, Pan GQ, Poncz M, Wei JH, Ran MS, Zhou ZY, 2018. Serpin functions in host-pathogen Interactions. *Peer J.*, 6(10): e4557.

Carrell RW, Owen MC, 1985. Plakalbumin, α1-antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis. *Nature*, 317(6039): 730–732.

Carrell RW, Evans DL, Stein PE, 1993. Mobile reactive center of serpins and the control of thrombosis. *Nature*, 364(6439): 737–737.

Christen JM, Hiromasa Y, An CJ, Kanost MR, 2012. Identification of plasma proteinase complexes with serpin-3 in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(12): 946–955.

Colinet D, Dubuffet A, Cazes D, Moreau S, Drezen JM, Poirie M, 2009. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(5): 681–689.

Duarte T, Avila MM, Hao YJ, 2013. A serpin released by an entomopathogen impairs clot formation in insect defense system. *PLoS ONE*, 8(7): e69161.

Dudzic JP, Hanson MA, Latsenko L, Kondo S, Lemaitre B, 2019. More than black or white: Melanization and Toll share regulatory serine proteases in *Drosophila*. *Cell Reports*, 27(4): 1050–1061.

Fullaondo A, Garcia-Sanchez S, Sanz-Parra A, Recio E, Lee SY, Gubb D, 2011. Spn1 regulates the GNBP3-dependent Toll signaling pathway in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 31(14): 2960–2972.

Gao QP, Yang LL, Dai JJ, Yuan GZ, Wang L, Qian C, Zhu BJ, Liu CL, Wei GQ, 2018. Characterization and functional analysis of serpin-28 gene from silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 159(10): 18–27.

Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA, 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49): 32608–32613.

Gonzalez-Santoyo, Cordoba-Aguilar, 2012. A phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142(1): 1–16.

Heit C, Jackson BC, McAndrews M, Wright MW, Thompson DC, Silverman GA, Nebert DW, Vasiliou V, 2013. Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily. *Human Genomics*, 7(1): 22.

Huntington JA, 2011. Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(Suppl. 1): 26–34.

Huntington JA, Read RJ, Carrell RW, 2000. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407(6806): 923–926.

Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC, 2000. Phylogeny of the serpin superfamily: Implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research*, 10(12): 1845–1864.

Irving JA, Steenbakkers PJM, Lesk AM, den Camp HJMO, Pike RN, Whisstock JC, 2002. Serpins in Prokaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 19(11): 1881–1890.

Ji CY, Wang Y, Guo XP, Hartson S, Jiang HB, 2004. A pattern recognition serine proteinase triggers the prophenoloxidase activation cascade in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33): 34101–34106.

Jiang HB, Vilcinskas A, Kanost MR, 2010. Immunity in lepidopteran insects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 708: 181–204.

Jiang HB, Wang Y, Yu XQ, Zhu YF, Kanost MR, 2003. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: A clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(10): 1049–1060.

Jiang R, Kim EH, Gong JH, Kwon HM, Kim CH, Ryu KH, Park JW, Kurokawa K, Zhang JH, Gubb D, Lee BL, 2009. Three pairs of protease-serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses. *Journal of Biological Chemistry*,

284(51): 35652–35658.

Jiang R, Zhang B, Kurokawa K, So YI, Kim EH, Hwang HO, Lee JH, Shiratsuchi A, Zhang JH Nakanishi Y, Lee HS, Lee BL, 2011. 93-kDa twin-domain serine protease inhibitor (Serpin) has a regulatory function on the beetle Toll proteolytic signaling cascade. *Journal of Biological Chemistry,* 286(40): 35087–35095.

Kausar S, Abbas MN, Qian C, Zhu BJ, Sun Y, Sun YX, Wang L, Wei GQ, Maqsood I, Liu CL, 2017. Serpin-14 negatively regulates prophenoloxidase activation and expression of antimicrobial peptides in Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi. Developmental and Comparative Immunology*, 76(2017): 45–55.

Kim CH, Kim SJ, Kan H, Kwon HM, Roh KB, Jiang R, Yang Y, Park JW, Lee HH, Ha NC, Kang HJ, Nonaka M, Soderhall K, Lee BL, 2008. A three-step proteolytic cascade mediates the activation of the peptidoglycan-induced Toll pathway in an insect. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12): 7599–7607.

Kounnas MZ, Church FC, Argraves WS, Strickland DK, 1996. Cellular internalization and degradation of antithrombin III-Thrombin, Heparin cofactor II-Thrombin, and antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271(11): 6523–6529.

Lavine MD, Strand MR, 2001. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology*, 47(9): 965–974.

Lavine MD, Strand MR, 2003. Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple alpha and beta integrin subunits. *Insect Molecular Biology,* 12(5): 441–452.

Law RHP, Zhang QW, Mcgowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC, 2006. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*, 7(5): 216.

Lawrence PO, Lanzrein B, 1993. Hormonal interactions between insect endoparasites and their host insects. *Parasites and Pathogens of Insects*, 1993(1): 59–86.

Levashina EA, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, Reichhart JM, 1999. Constitutive activation of Toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science*, 285(5435): 1917–1919.

Li W, Johnson DJD, Esmon CT, Huntington JA, 2004. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(9): 857–862.

Li ZQ, Chen GS, Wang MS, Wang GX, 2016. Molecular biology of humoral immunity in insects. *Chemistry of Life*, 23(5): 348–351. [李志强, 陈国生, 王茂先, 王国秀, 2016. 昆虫体液免疫的分子生物学. 生命的化学, 23(5): 348–351 .]

Ligoxygakis P, Pelte N, Hoffmann JA, Reichart JM, 2002a. Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, 297(5578): 114–116.

Ligoxygakis P, Pelte N, Ji CY, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, Jiang HB, Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002b. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *EMBO* (*European Molecular Biology Organization*) *Journal*, 21(23): 6330–6337.

Liu DR, Wang L, Yang L, Qian C, Wei GQ, Dai LS, Li J, Zhu BJ, Liu CL, 2015. Serpin-15 from *Bombyx mori* inhibits prophenoloxidase activation and expression of antimicrobial peptides. *Developmental and Comparative Immunology*, 51(1): 22–28.

Macneill AL, Turner PC, Moyer RW, 2006. Mutation of the myxoma virus SERP2 P1-site to prevent proteinase inhibition causes apoptosis in cultured RK-13 cells and attenuates disease in rabbits, but mutation to alter specificity causes apoptosis without reducing virulence. *Virology*, 356(1): 12–22.

Maria MD, Tsakasa S, Theodoroub GL, Lampropoulou M, Marmarasa VJ, 2005. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1744(2): 145–156.

Markus B, Theopold U, Schmidt O, 2000. Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens. Journal of Insect Physiology,* 46(9): 1275–1283.

Meekins DA, Kanost MR, Michel K, 2016. Serpins in arthropod biology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 62(2016): 105–119.

Mitreva M, Jasmer DP, Zarlenga DS, Wang ZY, Abubucker S, Martin J, Taylor CM, Yin Y, Fulton L, Minx P, Yang SP, Warren WC, Fulton RS, Bhonagiri V, Zhang X, Hallsworth-Pepin K, Clifton SW, McCarter JP, Appleton J, Mardis ER, Wilson RK, 2011. The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Nature Genetics*, 43(3): 228–235.

Mitsuhashi W, Miyamoto K, Wada S, 2014. The complete genome sequence of the Alphaentomopoxvirus *Anomala cuprea* entomopoxvirus, including its terminal hairpin loop sequences, suggests a potentially unique mode of apoptosis inhibition and mode of DNA replication. *Virology*, 452/453(2): 95–116.

Mitsuko K, Shizue O, Zhang LN, Yan Y, Igaki T, 2018. Serpin facilitates tumor-suppressive cell competition by blocking Toll-mediated Yki activation in *Drosophila. Current Biology*, 28(11): 1756–1767.

Nagano I, Wu ZL, Nakada T, Boonmars T, Takahashi Y, 2003. Molecular cloning and characterization of a serine proteinase gene of *Trichinella spiralis*. *Journal of Parasitology*, 89(1): 92–98.

Nappi AJ, Ottaviani E, 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays*, 22(5): 469–480.

Nathaniel R, Macneill AL, Wang YX, Turner PC, Moyer RW, 2004. Cowpox virus CrmA, Myxoma virus SERP2 and baculovirus P35 are not functionally interchangeable caspase inhibitors in poxvirus infections. *Journal of General Virology*, 85(Pt 5): 1267–1278.

Patschull AOM, Segu L, Nyon MP, Lomas DA, Nobeli I, Barrett TE,

Gooptu B, 2011. Therapeutic target-site variability in alpha1-antitrypsin characterized at high resolution. *Acta Crystallographica*, 67(12): 1492–1497.

Petit F, Bertagnoli S, Gelfi J, Fassy F, BoucrautBaralon C, Milon A, 1996. Characterization of a myxoma virus-encoded serpin-like protein with activity against interleukin-1β-converting enzyme. *Journal of Virology*, 70(9): 5860–5866.

Rohrmann GF, Erlandson MA, Theilmann DA, 2013. The genome of a baculovirus isolated from *Hemileuca* sp. encodes a serpin ortholog. *Virus Genes*, 47(2): 357–364.

Scherfer C, Tang H, Kambris Z, Lhocine N, Hashimoto C, Lemaitre B, 2008. *Drosophila* Serpin-28D regulates hemolymph phenoloxidase activity and adult pigmentation. *Developmental Biology*, 323(2): 189–196.

Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC, 2001. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36): 33293–33296.

Steenbakkers PJM, Irving JA, Harhangi HR, Swinkels WJC, Akhmanva A, Dijkermana R, Jetten MSM, Van der Drift C, Whisstock JC, Den Camp HJMO, 2008. A Serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Mycological Research*, 112(8): 999–1006.

Strand MR, 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1): 1–14.

Sun J, Whisstock JC, Harriott P, Walker B, Novak A, Thompson PE, Smith AI, Bird PI, 2001. Importance of the P4 residue in human granzyme B inhibitors and substrates revealed by scanning mutagenesis of the proteinase inhibitor 9 reactive center loop. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18): 15177–15184.

Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C, 2008. A Serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of *Drosophila*. *Developmental Cell*, 15(4): 617–626.

Tew DJ, Bottomley SP, 2001. Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of proteinase deformation during serpin inhibition. *FEBS Letters*, 494(1): 30–33.

Tong Y, Kanost MR, 2005. *Manduca sexta* Serpin-4 and Serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15): 14923–14931.

Toubarro D, Avila MM, Hao YJ, Balasubramanian N, Jing YJ, Montiel R, Faria TQ, Brito RM, Simoes N, 2013. A Serpin released by an entomopathogen impairs clot formation in insect defense system. *PLoS ONE*, 8(7): e69161.

Tripathi LP, Sowdhamini R, 2008. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: Analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes. *BMC Genomics,* 9(1): 549.

Wang Y, Jiang HB, 2006. Interaction of beta-1, 3-Glucan with its recognition protein activates hemolymph proteinase 14, an initiation enzyme of the prophenoloxidase activation system in *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14): 9271–9278.

Wang Y, Jiang HB, 2007. Reconstitution of a branch of the *Manduca sexta* prophenoloxidase activation cascade in vitro: Snake-like hemolymph proteinase 21(HP21) cleaved by HP14 activates prophenoloxidase-activating proteinase-2 precursor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(10): 1015–1025.

Wang Y, Yang F, Cao XL, Zou Z, Lu ZQ, Kanost MR, Jiang HB, 2020. Hemolymph protease-5 links the melanization and toll immune pathways in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38): 23581–23587.

Whisstock JC, Bottomley SP, 2006. Molecular gymnastics: Serpin structure, folding and misfolding. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(6): 761–768.

Xu N, Liu X, Tang B, Wang LB, Shi HN, Boireau P, Liu MY, Bai X, 2017. Recombinant *Trichinella pseudospiralis* serine protease inhibitors alter macrophage polarization in Vitro. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1834.

Yan ZC, Fang Q, Liu Y, Xiao S, Yang L, Wang F, An CJ, Werren JH, Ye GY, 2016. A venom serpin splicing isoform of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum* suppresses host prophenoloxidase cascade by forming complexes with host hemolymph proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 292(3): 1038–1051.

Yang L, Mei YT, Fang Q, Wang JL, Yan ZC, Song QS, Lin Z, Ye GY, 2017. Identification and characterization of serine protease inhibitors in a parasitic wasp, *Pteromalus puparum*. *Scientific Reports*, 7(1): 15755.

Zhang MM, Chu Y, Zhao ZW, An CJ, 2012. Progress in the molecular mechanisms of the innate immune responses in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 55(10): 1221–1229. [张明明, 初源, 赵章武, 安春菊, 2012. 昆虫天然免疫反应分子机制研究进展. 昆虫学报，55(10): 1221–1229.]

Zhang ZX, Mao YX, Li D, Zhang Y, Li W, Jia HL, Zheng J, Li L, Lu Y, 2016. High-level expression and characterization of two serine protease inhibitors from *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology*, 219(2016): 34–39.

Zhu YF, Wang Y, Gorman MJ, Jiang HB, Kanost MR, 2003. *Manduca sexta* Serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47): 46556–46564.

Zou Z, Jiang HB, 2005. *Manduca sexta* Serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14): 14341–14348.