昆虫表皮蛋白及其基因表达调控机理的研究进展*

刘清明** 苑园园 林健荣 钟杨生***

(华南农业大学 动物科学学院 蚕丝科学系 广州 510642)

Advance of researches on insect cuticular proteins and the regulation mechanism of their gene expression. LIU Qing-Ming**, YUAN Yuan-Yuan, LIN Jian-Rong, ZHONG Yang-Sheng*** (*Department of Sericulture, College of Animal Science, South China Agriculture University*, Guangzhou 510642, China)

Abstract Insect cuticular proteins (ICP) are structural proteins, which form the insect cuticle together with chitin and serve as a barrier to the external environment. According to the different motif, ICPs are divided into five families, i. e. CPR, CPT, CPG, CPF and CPFL, in which there are unique structure and distinguishing characteristics. Environment factors, hormones, transcription factors and introns may influence the expression of ICP genes (ICPG), and consequently result in the stage - and tissue - specific expression of ICPG. ICP and ICPG have been considered as excellent models for the studies on regulation of insect molting and metamorphosis, and for the understanding of the biochemical, physicochemical and structural modifications occurring in the cuticle during insect development, so that more and more attentions have been paid for. In this review, we described the recent progresses in the classification of ICP and the regulation mechanism under environment factors, hormones, transcription factors and introns during expression of ICPG.

Key words insect, cuticular proteins, classification, regulated mechnism

摘 要 昆虫表皮蛋白(insect cuticular proteins, ICP)是结构蛋白,它和几丁质一起组成昆虫抵御外界环境的屏障——角质层。根据保守性基序的不同,ICP 可分为 CPR、CPF、CPFL、CPG 和 CPT 5 家族。它们都有独特的结构与性质。环境、激素、转录因子和内含子等共同影响昆虫表皮蛋白基因(insect cuticular protein genes, ICPG)的表达,进而使 ICPG 具有时期和组织特异性。ICP 和 ICPG 被认为是研究昆虫蜕皮与变态的调控机理和理解昆虫发育期角质层在生物化学、物理化学以及结构上的修饰的重要模型,受到越来越多的重视。本文综述了 ICP 的分类以及环境、激素、转录因子和内含子等对 ICPG 表达的调控。

关键词 昆虫,表皮蛋白,分类,调控机理

昆虫角质层的主要功能是组成外骨骼,对保持身体结构,抑制水分蒸发和抵御外界不良环境的影响有重要的作用。昆虫角质层由几丁质和表皮蛋白(insect cuticular proteins, ICP)组成[1,2]。几丁质是 N-乙酰葡萄糖胺聚合而成,结构明晰,而 ICP 的结构和特征具有多样性,在不同昆虫中差别很大[3]。角质层的结构、物理性质和功能具有多样性及复杂性,并且角质层的分泌物大都交联在一起使得 ICP 纯化困难,此外 ICP 的氨基酸保守性差[1]。因此,人们对昆虫角质层中的表皮蛋白的功能作用还知之甚少,需要进一步深入研究。

随着按蚊、家蚕、蜜蜂 *Apis mellifera*、果蝇和赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等昆虫全基因组测序相继完成,ICP 的鉴定也随之展开。比对

* 资助项目:国家自然科学基金(30771634,30840023);广东省自然科学基金(8451064201000953)。

** E-mail: qmliu2008@qq.com

*** 通讯作者, E-mail: zhongyangsh@scau.edu.cn

收稿日期:2009-09-02,修回日期:2009-12-06

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

各种昆虫全基因组序列，在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*[3]、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*[4]、蜜蜂[5]和赤拟谷盗[6]等昆虫基因组中分别检索到 101、156、28 和 102 个属于 CPR（cuticular protein with Rebers & Riddiford Consensus）家族的表皮蛋白。而在家蚕基因组中则发现了 220 个候选 ICP，其中属于 CPR 的 RR-1、RR-2 和 RR-3 亚族的分别有 56、89 和 3 个，CPG、CPT、CPFL 和 CPF 其它家族内则相应发现 29、4、4 和 1 个，还有 34 个其它结构的 ICP[7]。目前，已在 7 个目的 24 种昆虫中发现超过 450 个表皮蛋白，大多数分离自双翅目、鳞翅目、鞘翅目、半翅目、直翅目[2]和膜翅目[8]。

昆虫表皮蛋白基因（insect cuticular protein genes，ICPG）有许多相似特征：（1）内含子 1 的位置保守，通常位于信号肽中，阻断信号肽；（2）保守基序不被内含子间隔；（3）大多成簇存在，形成基因簇，进行协同表达。这些特征已经被鳞翅目[7]、双翅目[4]和鞘翅目[6]等的 ICPG 证实。昆虫角质层的性质，主要由表皮蛋白性质所决定，故解明 ICPG 的性质是理解角质层性质的基础[9]。ICPG 数量多，并且特异性表达时期比较集中[10]，是研究昆虫海量序列信息的重要载体。此外，ICP 和 ICPG 被认为是研究昆虫蜕皮与变态的调控机理和理解昆虫发育期角质层在生物化学、物理化学以及结构上的修饰的重要模型，受到越来越多的重视。本文主要从 ICP 分类和 ICPG 的表达调控进行综述。

1 ICP 的分类

ICP 的命名主要是由首次测定其序列的研究者给出，命名差异比较大，有以下几种情况[11]：（1）根据蛋白质的分子量或者蛋白质发现时的次序而命名，如 LCP-14（Larval Cuticular Protein 14；其中 14 就是该蛋白质的分子量），EDG-91（Ecdysone Dependant Gene，其中 91 就是该表皮蛋白质发现时的次序）；（2）根据表皮蛋白所在昆虫种和属以及组织的第 1 个字母命名，如 Bmwcp3（该表皮蛋白来自家蚕的翅原基，“Bmw”是 *Bombyx mori* wing disc 的缩写，“3”是发现时的次序）；（3）根据表皮蛋白存在发育时期的第 1 个字母命名，如 ACP 指的是成虫表皮蛋白（Adult Cuticular Protein），LCP 指的是幼虫表皮蛋白（Larval Cuticular Protein）；（4）根据表皮蛋白所属家族和所在种属命名，如 BmorCPR22（该表皮蛋白来自家蚕，属于 CPR 家族，Bmor 是 *Bombyx mori* 的缩写）等。

ICP 常常根据其内在基序的不同来进行分类。基序（motif）是指蛋白质或 DNA 序列中局部的保守区域，或者是一个序列集中共有的一小段序列模式[12]。一个蛋白质家族共有的基序是该蛋白质家族区别于其它家族的特征，可以作为分类的依据。迄今为止，ICP 中主要发现以下保守基序：Rebers & Riddiford Consensus（R&R 保守区）、Forty-four amino acid residues（44 个氨基酸残基）、Tweedle 和 Glycine-rich（富含甘氨酸）基序等。研究者以表皮蛋白（cuticular protein）的英文缩写 CP 和各保守基序的第 1 个英文字母组合，分别把 R&R、44 个氨基酸残基、Tweedle 和富含甘氨酸基序的 ICP 家族命名为 CPR[13]、CPF[14]、CPT[7,15] 和 CPG[7]。此外，有一类 ICP 和 CPF 很相似（CPF-like），命名为 CPFL[14]。

1.1 CPR 家族

CPR 家族的保守基序 G-x（8）-G-x（6）-Y-x-A-x-E-x-G-Y-x（7）-P-x（2）-P（x 表示氨基酸，刮弧内的数字为该处 x 的数目）是 Rebers 和 Riddiford 于 1988 最先鉴定的。他们通过比对 7 条 ICP 的氨基酸序列而发现了此保守基序[16]，并由此开创了研究 ICP 的新时代，人们为纪念 Rebers 和 Riddiford 就把该保守基序命名为 R&R 保守基序。后来 Willis 把 R&R 保守基序扩展为 G-x（7）-[DEN]-G-x（6）-[FY]-x-A-[DGN]-x（2,3）-G-[FY]-x-[AP]-x（6）（刮弧内的数字为该处 x 的数目，中括号中的氨基酸是此处的候选氨基酸）[17]。R&R 保守基序的 N 端富含亲水性氨基酸，其序列的保守性与 ICP 所处角质层类型相关，在坚硬型角质层中其相当保守，而在柔软型角质层中其差异大[18]。故 Iconomidou 等把 R&R 保守基序和其

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

富含亲水氨基酸的 N 端序列一起约 64 个氨基酸序列命名为“广义 R&R 保守基序”[9]。He 等又把具有广义 R&R 保守基序的 ICP 命名为 CPR 家族[13]。

Rebers 和 Riddiford 指出 CPR 家族的保守基序对角质层结构起重要作用[16]。许多研究者认为其最大的作用就是结合几丁质[1,20~22],具有几丁质的结合位点,是 CPR 家族最大的特征。进一步研究显示 R&R 保守基序的分子构象最可能是 β 折叠[15,19],而 β 折叠是几丁质-蛋白质相互作用所必需的[23,24]。

CPR 家族分布最广,数量众多,约占所有 ICP 的 70%,其成员在双翅目、鳞翅目、鞘翅目、膜翅目、半翅目和直翅目等昆虫中都有发现[2]。根据 CPR 家族所处角质层的部位和类型的不同,CPR 家族可分 3 个亚族:RR-1、RR-2 和 RR-3[25]。RR-1 亚族表皮蛋白首先是从柔软型角质层中分离得到,现在普遍把 RR-1 型的 CPR 归类于柔和型角质层,但也有例外,如 Soares 等[8] 在蜜蜂中发现的表皮蛋白 AnelCPR14 也有 RR-1 基序,却与成虫蜕变时硬质表皮的分化有关。该亚族表皮蛋白保守区 C 端有许多芳香基氨基酸,但在保守区的位置有差异[21]。Hamodrakas 等[26] 通过研究广义 R&R 保守基序的三维结构证实了芳香基氨基酸对几丁质结合起重要的作用。RR-2 亚族与坚硬型角质层相关,其保守区内的赖氨酸位置非常保守。此外,RR-2 亚族富含组氨酸。已知组氨酸和赖氨酸可以作为硬化剂的反应点[27,28],因此人们认为坚硬型角质层中的许多蛋白都富含这些氨基酸[2]。Rebers 和 Willis 研究表明 RR-2 亚族的广义 R&R 保守基序的作用是作为几丁质结合域[29],而 Togawa 等[30] 研究表明 RR-1 亚族的广义 R&R 保守基序具有和 RR-2 亚族的广义 R&R 保守基序具有相似的作用——作为几丁质结合域,隐马尔科夫模型(Hidden Markov Models)可以区别这 2 个亚族[8]。RR-3 亚族比较少见,只在昆虫蜕皮后期角质层中发现[25],目前对此亚族还没有精确的定义[8]。

1.2　CPF 和 CPFL 家族

Andersen 等[31] 首先在黄粉虫 *Tenebrio molitor* 和东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 中发现 CPF 家族基序,并认为该基序是有 51 个保守氨基酸组成——(AY)-(AP)-x(2)-(PA)-(PA)-A-(LIV)-x-(SA)-(QS)-x-(SQ)-x-(IV)-(LV)-R-S-x-G-(NG)-x(3)-V-S-x-Y-(ST)-K-(TA)-(VI)-D-(TS)-(PA)-(YF)-S-SV-x-K-x-D-x-R-(VI)-(TS)-N-x-(GA)-(IVL)。不过,Togawa 等[14] 的研究显示该基序保守氨基酸的长度不超过 44 个。CPF 家族 C 末端非常保守,常是由芳香基氨基酸-小分子量氨基酸(G 或 A)-芳香基氨基酸 3 个氨基酸残基,最常见的是 YGW 或 YAW。与 CPR 家族不一样,CPF 没有几丁质结合域,不能结合几丁质[14]。

CPF 家族成员在双翅目(如黑腹果蝇,冈比亚按纹)、鞘翅目(如黄粉虫)、直翅目(如飞蝗)和鳞翅目(如家蚕)等都有发现[7,14,31]。对 CPF 家族的 42~44 个氨基酸基序聚类分析,发现 CPF 家族有 4 个群体,Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ,其中Ⅳ是本底水平表达,其它 3 个是特异性表达。群体Ⅰ具有蚊科 CPF4 和蜜蜂表皮蛋白的序列,此亚族具有相同的 C 末端保守序列,这是不同于其他亚族之处。群体Ⅱ存在于甲壳虫,群体Ⅲ存在于蚊科中,它们的特异性对这些物种中有特殊的作用。群体Ⅳ似乎是最本底的 CPF,因为所有的昆虫都存在此群体。群体Ⅳ在黑腹果蝇中是以成簇的形式存在的[14]。

CPFL 家族是 Togawa 等在鉴定 CPF 家族同时发现的,它与 CPF 有很高的同源性,它们有相似的 C 末端保守序列,但 CPFL 没有 44 氨基酸保守序列[14]。此家族在冈比亚按纹和家蚕中也有发现[7,14]。

1.3　CPG 家族

Apple 等[32] 首先发现果蝇蛹期表皮蛋白 DmEDG91 富含短的甘氨酸序列。Futahashi 等[7] 把富含甘氨酸的 ICP 家族命名为 CPG(cuticular protein glycine-rich)。CPG 属于富含甘氨酸蛋白质(glycine-rich protein),其特征是有许多短的甘氨酸重复序列(GXGX、GGXG 或

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

GGGX)。蜘蛛的丝蛋白、弹力蛋白和胶原蛋白都属于此范畴[33]。CPG 家族含有信号肽以及位于 N 端或 C 端的富含甘氨酸区域[1]。此外,CPG 家族成员大多有保守的 AAPA/V 基序[2],但几乎没有 R&R 基序[33]。

已报道的 CPG 家族成员有:BmorCPGs[7]、ACP-20[19]、DmEDG91[31]、Ld-GRP[32]、BmGRPs[34]和 BMCPG1[35]。CPG 家族主要存在于坚硬型角质层中,和卵壳蛋白、中间纤维蛋白、细胞角蛋白等富含甘氨酸的结构蛋白一样,CPG 家族具有保护和支撑作用[19],其甘氨酸重复序列 GXGX、GGXG 或 GGGX 能形成柔软的卷曲结构[36],对表皮硬化期间的蛋白质交联非常重要[35]。

1.4 CPT 家族

Tweedle 基序是 Guan 等在研究黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 表皮表型形态发生机制时偶然发现的,该基序的标记是有 YVLX20 - 23KPEVyFiKY(R_K)t [X 为任意氨基酸,酪氨酸(y 表示)和苏氨酸(t 表示)不是很保守]保守序列[15]。Futahashi 等[7]把具有 Tweedle 基序的 ICP 命名为 CPT 家族。定点突变该家族基因使得果蝇表皮出现各种突变性状,从而把体型调控和组成表皮的结构蛋白联系在一起[15]。CPT 家族能够直接和几丁质相互作用,形成的 β 折叠股,通过 2 个 β 折叠股又形成桶状结构,为堆积芳香族残基和结合几丁质提供了界面[26]。CPT 家族在果蝇中有 27 个成员,分布在表皮、前肠、翅原基和支气管等组织中,并且形成 3 个主要基因簇[15]。Okamoto 等在家蚕表皮细胞中发现 4 个 CPT 家族成员(BmorCPT1-4)[37],但他们不形成簇,主要分布在表皮和翅原基中[7]。

尽管 ICP 根据其保守基序可以分为以上几个家族,BmorCPR140 和 BmorCPT2 富含甘氨酸序列,它们却分别归类于 CPR 和 CPT 家族[7]。另外,ICP 还有其它一些家族,如:Futahashi 等在家蚕基因组中发现 34 个假定表皮蛋白,命名为 CPH 家族[7];He 等发现序列低复杂性表皮蛋白家族(CPLC)和序列中有 2 个保守的半胱氨酸表皮蛋白家族(CPTC)[13]。随着 ICP 的研究深入,定将发现更多新的家族。

2 ICPG 表达的调控

2.1 环境对 ICPG 调控的影响

干燥、高渗透压、季节性光周期等环境胁迫会影响昆虫等生物体的许多生理生化反应,并由此引起一系列相关基因的激活与沉默,从而反映昆虫对环境胁迫的耐受能力[38]。因此,表皮作为昆虫抵御外界环境的第一道防线,当昆虫受干燥胁迫、渗透胁迫、季节性光周期等环境条件影响时,ICPG 的表达调控功能就会作出相应反应。

表皮对昆虫体内水分的流向与散发有重大作用,昆虫通过改变表皮组分使失水最小化以应对干燥环境[2]。此外,昆虫产生抗药性也与昆虫表皮有关,其机制之一就是杀虫剂对昆虫表皮渗透能力降低[39]。Zhang 等[33]研究发现干燥处理马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* 也能诱导 LD-GRP1 和 LD-GRP2 基因表达,潮湿处理时 LD-GRP1 和 LD-GRP2 基因不表达,LLd-GRP1 和 LLd-GRP2 基因表达量的增加可以降低甲虫体内水分蒸发的速率,他们还发现杀虫剂谷硫磷能够高度地诱导马铃薯甲虫表皮蛋白 LLd-GRP1、LLd-GRP2 和 LLd-GRP3 的基因表达,并使该昆虫产生耐药性。LD-GRPs 富含甘氨酸,属于 CPG 家族,是坚硬型表皮蛋白[20],其疏水残基和跨膜螺旋所占的比例很高。表皮内迅速增加的 LD-GRPs 能够增加表皮的致密度,以平衡甲虫体内外的渗透差,进而降低体内水分蒸发和谷硫磷对体内的渗透[33]。

光周期对昆虫发育有重要的作用,尤其是对昆虫的滞育,被认为是诱导、维持和终止滞育的主要因素之一[40]。Le Trionnaire 等[41]利用 cDNA 微点阵和 Q-RT-PCR 在豌豆蚜虫 *Acyrthosiphon pisum* 头部鉴定到受昼长缩短调控的 59 个不同的转录物,其中有 19 个是编码不同的 ICP。他们认为在昼长缩短的环境下,ICP 发生了改型以应答光周期的变化。已知光受体位于蚜虫头部并且唯一的光感区靠近角质

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

层之下的前脑,蚜虫头部是感知光周期信号的中心并且这种信号是先透过角质层后由头壳(而不是眼)直接感应[42]。光在到达光受体的过程中受到任何在其之上的组织如角质层等的过滤[43],由此解释光周期可以影响 ICPG 的表达调控或者说 ICPG 表达受光周期信号的调控,并可能与发育相关。

马铃薯甲虫等昆虫是主要农业害虫[44],干燥、高渗透压、季节性光周期等外界环境因素对 ICPG 有调控作用,进而影响昆虫表皮的发育。这为马铃薯甲虫等农业害虫的防治提供了新思路。

2.2　蜕皮激素和保幼激素对 ICPG 表达的调控

昆虫发育、繁殖以及其它生物学过程都会受蜕皮激素和保幼激素的调控。蜕皮激素是类固醇激素,其作用是启动和协调昆虫蜕皮,而保幼激素是倍半萜(烯)化合物,通过与蜕皮激素协同诱导基因的表达来决定蜕皮[45]。昆虫在变态发育过程中,表皮在结构和组成都经历剧烈的变化,而 ICP 作为表皮的重要组成部分,其基因在变态过程中必然受到蜕皮激素和保幼激素的调控[46]。ICPG 的表达具有组织特异性和时期特异性,是研究激素调控机制的较好模型。

蜕皮激素的分子作用机制已有较详尽的研究。蜕皮激素与受体蛋白相互作用(EcR/USP),特异性地诱导某些上游基因的转录,并由它激活许多下游基因[35]。经过蜕皮激素启动一系列转录因子的级联反应,形成了一条蜕皮激素诱导的基因活化通路[47]。然而,蜕皮激素对 ICPG 精确的时空调控的分子机理还不是很清楚。应答蜕皮激素调控的 ICPG 主要有两类,一类 ICPG 是需要有蜕皮激素瞬间作用又必须随即清除蜕皮激素才表达。此类 ICPG 占受蜕皮激素调控的 ICPG 的大多数,如:AmelCPR14[8]、BMWCP2[10]、EDGs[32]、BMCPG1[35]、BmGRPs[34]、LCP-14[48] 和 GmPCP52[49]。另一类 ICPG 需要蜕皮激素持续存在才表达,属于受 20E 上调调控,如:BMWCP10[10]、LCP16/17[50] 和 ACP-20[51]。

保幼激素(JH)对昆虫生理功能的研究持续了近百年,但其分子作用机制至今仍不清楚[52]。保幼激素对 ICPG 的调控的研究报道不多,Shofuda 等[53]认为保幼激素对时期依赖性表达的 LCP18 起正调控作用。此外,Krämer 和 Wolbert[49] 发现 JH 能延长 GmPCP52 的转录和翻译,并且激活新一轮转录活性合成新的蛹角质层。他们认为 JH 抑制了细胞进程,使蛹期基因的活性延长了,从而延缓了向成虫的发育。这与保幼激素维持幼虫状态,维持原状的功能不谋而合[52]。不过保幼激素对 ACP-20[20]、BmWCP2[34] 和 BMCPG1[35] 有负调控作用,抑制它们表达。

2.3　转录因子对 ICPG 表达的调控

转录因子的改变对昆虫基因表达、形态多样化和发育机制等方面影响很大[54]。目前,转录因子对 ICPG 调控取得了一些进展。βFTZ-F1 是最早发现调控 ICPG 表达的转录因子之一,其对昆虫蜕皮发挥着关键作用。Murata 等首次发现 βFTZ-F1 正调控果蝇蛹期前中后期 ICPG 如 EDG84A 和 EDG74E 表达[55]。此后发现,βFTZ-F1 对 MSCP14.6[56]、BMACP-6.7[57]、BMCPG1[35]、ACP-20[51]、BMGRP3[34] 以及 BMWCP2[58] 等 ICPG 都有调控作用。脊椎动物转录因子 COUP-TF 和 HNF-4 能识别 BMCP18(家蚕 *Bombyx mori*)[59]、MSCP14.6(烟草天蛾 *Manduca sexta*)[60] 和 HCCP12(烟草天蛾)[61] 等鳞翅目表皮蛋白基因的 5′端上游序列。家蚕幼虫中发现 COUP-TF 的同系物 Bmsvp,能结合 BMCP18 中的 COUP-TF 识别位点,这表明 Bmsvp 可能在 BMCP18 基因表达中起作用。果蝇表皮蛋白基因 dsc73 在胚胎期表达需要转录因子 Shavenbaby(Svb),有研究表明转录因子调控表皮形成[62]。此外,Togawa 等[63] 从冈比亚按蚊中鉴定到 156 个 CPR 家族,发现所有的 CPR 基因启动子区都有与 E74A,Eve,Hb 和 Zen 等转录因子结合的顺式作用元件。

虽然调控 ICPG 的相关转录因子的研究取得了进展,但所研究的转录因子仍然较单一,与 ICP 的多样性不相称,新的转录因子还有待发

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

现研究。此外,转录因子对 ICPG 调控的机理还需进一步深入研究与明晰。

2.4 内含子对 ICPG 表达的调控

真核基因普遍存在内含子,内含子对前体 RNA 的剪接、转录、编辑、mRNA 的出核运输和 mRNA 翻译等基因表达调控影响很大[64]。Snyder 等[65]首次在果蝇中报道了 ICPG 内含子短且插进信号肽中。此后研究发现,大多数 ICPG 都只有 1 个内含子[32,57,65~72]。不过也有例外,如家蚕的 LCP30 有 4 个内含子[73],黄粉虫的 ACP-20[38]、烟蚜 *Myzus persicae* 的 Mpcp5[43]以及惜古比天蚕 *Hyalophora cecropia* 的 HCCP12[74]等有 2 个内含子,还有一些 ICPG 甚至没有内含子,如果蝇 65A 基因簇的某些基因[69]、柞蚕 *Antheraea pernyi* ApCP13 基因[61]和烟蚜 Mpcp2 、Mpcp3[75]基因。ICPG 内含子 1 的位置非常保守,通常位于第 4 个密码子的后面,这表明其对 ICPG 表达调控有重要的作用[74]。Lemoine 等[51]发现内含子是 ACP-20 高表达转录所必需的。Bruey-Sedano 等[76]也发现当去除 ACP65A 基因 81bp 内含子时,ACP65A 基因表达完全被抑制,这进一步证明内含子对 ICPG 具有重要调控功能的假说。

内含子对基因表达有增强或沉默作用[75,77]。内含子不是孤立地对基因表达调控起作用,如 Lemoine 等[51]在 ACP20 内含子 1 内发现有八聚体基序和 EcR 的半结合位点等顺式作用元件,而八聚体基序是八聚体转录因子的识别位点,EcR 是蜕皮激素的受体。Lestradet 等[78]也认为内含子有转录因子结合所必需的位点。故内含子调控基因表达离不开激素和转录因子等的调节。内含子调控 ICPG 表达包括转录前水平和转录后水平,转录前水平已有一些研究[51,76,78],但不多,转录后水平的研究还有待开展。

3 总结与展望

ICP 是结构蛋白,其具有数量众多和结构多样性的特点,对昆虫起保护作用。ICPG 具有组织和时期特异性,并且形成基因簇,进行协同表达。ICPG 即是蜕皮激素也是保幼激素的靶点,保幼激素和蜕皮激素对昆虫发育的相互作用机制还不是很明晰,ICPG 可以作为今后进一步研究这 2 种激素分子水平上的作用的模型。环境(干燥、渗透压和光周期)、激素、转录因子和内含子等因素调控 ICPG 表达,同时内含子调控作用离不开激素和转录因子,这些因素由表及里相互作用,使 ICPG 表达形成一个多级调控系统。这就要求从整体上研究,使环境、激素、转录因子和内含子等对 ICPG 表达调控的研究互相联动。此外,随着不同类型昆虫全基因组的测序完成,必将进一步揭示 ICPG 表达调控的内在规律,从而推进 ICP 与昆虫变态发育的关联机制。

参 考 文 献

1 Andersen S. O., Hojrup P. Roepstorff P. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **25**(2):153 ~ 176.

2 Gilbert L., Iatrou K., Gill S. In: Comprehensive Molecular Insect Science, vol. 4. Elsevier, Oxford, 2005. 79 ~ 110.

3 Karouzou M. V., Spyropoulos Y., Iconomidou V. A., *et al*. Drosophila cuticular proteins with the R&R Consensus: Annotation and classification with a new tool for discriminating RR-1 and RR-2 sequences. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, **37**(8): 754 ~ 760.

4 Cornman R. S., Togawa T., Dunn W. A., *et al*. Annotation and analysis of a large cuticular protein family with the R&R Consensus in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*, 2008, **9**: 22.

5 Weinstock G. M., Robinson G. E., Gibbs R. A., *et al*. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 2006, **443**(7 114): 931 ~ 949.

6 Richards S., Gibbs R. A., Weinstock G. M., *et al*. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 2008, **452**(7 190): 949 ~ 955.

7 Futahashi R., Okamoto S., Kawasaki H., *et al*. Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2008, **38**(12): 1 138 ~ 1 146.

8 Soares M., Elias-Neto M., Simoes Z., *et al*. A cuticle protein gene in the honeybee: Expression during development and in relation to the ecdysteroid titer. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, **37**(12):1 272 ~ 1 282.

9 Kucharski R., Maleszka J., Maleszka R. Novel cuticular

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

proteins revealed by the honey bee genome. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, **37**(2): 128 ~ 134.

10 Noji T., Ote M., Takeda M., *et al*. Isolation and comparison of different ecdysone-responsive cuticle protein genes in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2003, **33**(7): 671 ~ 679.

11 Magkrioti C. K., Spyropoulos I. C., Iconomidou V. A., *et al*. Cuticledb: a relational database of Arthropod cuticular proteins. *BMC Bioinformatics*, 2004, **5**:138 ~ 143.

12 Fu Y. T., Frith M. C., Haverty P. M., *et al*. MotifViz: an analysis and visualization tool for motif discovery. *Nucleic Acids Res.*, 2004, (2):420 ~ 423.

13 He N., Botelho J. M., McNall R. J., *et al*. Proteomic analysis of cast cuticles from *Anopheles gambiae* by tandem mass spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, **37**(2): 135 ~ 146.

14 Togawa T., Dunn W. A., Emmons A. C., *et al*. CPF and CPFL, two related gene families encoding cuticular proteins of *Anopheles gambiae* and other insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, **37**(7): 675 ~ 688.

15 Guan X., Middlebrooks B. W., Alexander S., *et al*. Mutation of TweedleD, a member of an unconventional cuticle protein family, alters body shape in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, **103**(45): 16 794 ~ 16 799.

16 Rebers J. E., Riddiford L. M. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to Drosophila cuticle genes. *J. Mol. Biol.* 1988, **203**(2): 411 ~ 423.

17 Willis J. H. Cuticular proteins in insects and crustaceans. *Am. Zool.*, 1999, **39**(3): 600 ~ 609.

18 Andersen S. O. Exoskeletal proteins from the crab, cancer pagurus. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 1999, **123**(2): 203 ~ 211.

19 Iconomidou V. A., Willis J. H., Hamodrakas S. J. Is beta-pleated sheet the molecular conformation which dictates formation of helicoidal cuticle? *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1999, **29**(3): 285 ~ 292.

20 Bouhin H., Charles J. P., Quennedey B., *et al*. Characterization of a cDNA clone encoding a glycine-rich cuticular protein of *Tenebrio molitor*: developmental expression and effect of a juvenile hormone analogue. *Insect Mol. Biol.*, 1992, **1**(2): 53 ~ 62.

21 Charles J. P., Bouhin H., Quennedey B., *et al*. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of a major, glycine-rich cuticular protein from the coleopteran *Tenebrio molitor*. Temporal and spatial distribution of the transcript during metamorphosis. *Eur. J. Biochem.*, 1992, **206**(3): 813 ~ 819.

22 Iconomidou V. A., Willis J. H., Hamodrakas S. J. Unique features of the structural model of 'hard' cuticle proteins: implications for chitin - protein interactions and cross-linking in cuticle. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2005, **35**(6): 553 ~ 560.

23 Fraenkel G., Rudall K. M. The structure of insect cuticles. *Proc. Roy. Soc. B*, 1947, **34**: 111 ~ 143.

24 Atkins E. D. T. Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates. Proceedings of the International Symposium on Biomolecular Structure Interactions. *Suppl. J. Biosci.*, 1985, **8** (1 ~ 2): 375 ~ 387.

25 Andersen S. O. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2000, **30**(7): 569 ~ 577.

26 Hamodrakas S. J., Willis J. H., Iconomidou V. A. A structural model of the chitin-binding domain of cuticle proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **32**(11): 1 577 ~ 1 583.

27 Kerwin J. L., Turecek F., Xu R., *et al*. Mass spectrometric analysis of catechol-histidine adducts from insect cuticle. *Anal. Biochem.*, 1999, **268**(2): 229 ~ 237.

28 Kramer K. J., Kanost M. R., Hopkins T. L., *et al*. Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems. *Tetrahedron*, 2001, **57**(2): 385 ~ 392.

29 Rebers J. E., Willis J. H. A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2001, **31**(11): 1 083 ~ 1 093.

30 Togawa T., Nakato H., Izumi S. Analysis of the chitin recognition mechanism of cuticle proteins from the soft cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2004, **34**(10): 1 059 ~ 1 067.

31 Andersen S. O., Rafn K., Roepstorff P. Sequence studies of proteins from larval and pupal cuticle of the yellow meal worm, *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1997, **27**(2): 121 ~ 131.

32 Apple R. T., Fristrom J. W. 20-hydroxyecdysone is required for, and negatively regulates, transcription of Drosophila pupal cuticle protein genes. *Dev. Biol.*, 1991, **146**(2): 569 ~ 582.

33 Zhang J., Goyer C., Pelletier Y. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol. Biol.*, 2008, **17**(3): 209 ~ 216.

34 Zhong Y. S., Mita K., Shimada T., *et al*. Glycine-rich protein genes, which encode a major component of the cuticle, have different developmental profiles from other

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cuticle protein genes in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2006, **36**(2): 99 ~ 110.

35 Suzuki Y., Matsuoka T., Iimura Y., *et al*. Ecdysteroid-dependent expression of a novel cuticle protein gene BMCPG1 in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **32**(6):599 ~ 607.

36 Mousavi A., Hotta Y. Glycine-rich protein. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2005, **120**: 169 ~ 174.

37 Okamoto S., Futahashi R., Kojima T., *et al*. A catalogue of epidermal genes: genes expressed in the epidermis during larval molt of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 2008, **9**: 396.

38 Chen S. B., Glazer I., Gollop N., *et al*. Proteomic analysis of the entomopathogenic nematode Steinernema feltiae IS-6IJs under evaporative and osmotic stresses. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2006, **145**(2): 195 ~204.

39 Ahmad M., Denholm I., Bromilow R. H. Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag. Sci.*, 2006, **62**(9): 805 ~ 810.

40 Beck S. D. Effect of thermoperiod on photoperiodic determination of larval diapause in *Ostrinia nubilalis*. *Insect Physiol.*, 1985, **31**: 41 ~ 46.

41 Le Trionnaire G., Jaubert S., Sabater-Munoz B., *et al*. Seasonal photoperiodism regulates the expression of cuticular and signalling protein genes in the pea aphid. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2007, **37**(10): 1 094 ~ 1 102.

42 Steel C. G. H., Lees A. D. The role of neurosecretion in the photoperiodic control of polymorphism in the aphid *Megoura viciae*. *J. Exp. Biol.*, 1977, **67**:117 ~ 135.

43 Hardie J. Juvenile hormone and photoperiodically controlled polymorphism in *Aphis fabae*: prenatal effects on presumptive oviparae. *J. Insect Physiol.*, 1981, **27**: 257 ~ 265.

44 **张衡, 李学锋, 王成菊, 等. 马铃薯甲虫防治技术及其抗药性研究进展. 昆虫知识,**2007,**44**(4):496 ~ 500.

45 Bitra K., Palli S. R. Interaction of proteins involved in ecdysone and juvenile hormone signal transduction. *Arch. Insect Biochem.*, 2009, **70**(2): 90 ~ 105.

46 Kerkut G. A., Gilbert L. I. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 8. Pergamon Press, New York, 1985. 37 ~ 84.

47 **李胜. 整合昆虫发育生物学和果蝇遗传学来研究昆虫发育与变态. 昆虫知识,**2007,**44**(3):319 ~ 322.

48 Hiruma K., Hardie J., Riddiford L. M. Hormonal regulation of epidermal metamorphosis in vitro: control of expression of a larval-specific cuticle gene. *Dev. Biol.*, 1991, **144**(2): 369 ~378.

49 Krämer B., Wolbert P. Down-regulation of expression of a pupal cuticle protein gene by transcriptional and posttranscriptional control mechanisms during metamorphosis in Galleria. *Dev. Genes Evol.*, 1998, **208**(4): 205 ~ 212.

50 Horodyski F. M., Riddiford L. M. Expression and hormonal control of a new larval cuticular multigene family at the onset of metamorphosis of the tobacco hornworm. *Dev. Biol.*, 1989, **132**(2): 292 ~ 303.

51 Lemoine A., Mathelin J., Braquart-Vernier C., *et al*. A functional analysis of ACP-20, an adult-specific cuticular protein gene from the beetle Tenebrio: role of an intronic sequence in transcriptional activation during the late metamorphic period. *Insect Mol. Biol.*, 2004, **13**(5): 481 ~493.

52 Riddiford L. M. Juvenile hormone action: a 2007 perspective. *J. Insect Physiol.*, 2008,**54**: 895 ~ 901.

53 Shofuda K., Togawa T., Nakato H., *et al*. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a larval cuticle protein of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1999, **122**(1): 105 ~ 109.

54 Arnosti D. N. Analysis and function of transcriptional regulatory elements: insights from Drosophila. *Annu. Rev. Entomol.*, 2003, **48**: 579 ~ 602.

55 Murata T., Kagayama Y., Hirose S. Regulation of the EDG84A gene by FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, **16**(11): 6 509 ~ 6 515.

56 Rebers J. E., Niu J., Riddiford L. M. Structure and spatial expression of the *Manduca sexta* MSCP14. 6 cuticle gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1997, **27**(3): 229 ~ 240.

57 Shiomi K., Niimi T., Imai K., *et al*. Structure of the VAP-peptide (BmACP-6. 7) gene in the silkworm, *Bombyx mori* and a possible regulation of its expression by BmFTZF1. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2000, **30**(2): 119 ~ 125.

58 Nita M., Wang H. B., Zhong Y. S., *et al*. Analysis of ecdysone-pulse responsive region of BMWCP2 in wing disc of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Phys. B.*, 2009, **153**(1): 101 ~ 108.

59 Togawa T., Shofuda K., Yaginuma T., *et al*. Structural analysis of gene encoding cuticle protein BMCP18, and characterization of its putative transcription factor in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2001, **31**(6): 611 ~ 620.

60 Rebers J. E., Niu J., Riddiford L. M. Structure and spatial expression of the *Manduca sexta* MSCP14. 6 cuticle gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1997, **27**(3): 229 ~ 240.

61 Kim B. Y., Park N. S., Jin B. R., *et al*. Molecular cloning

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

and characterization of a cDNA encoding a novel cuticle protein from the Chinese oak silkmoth, *Antheraea pernyi*. *DNA Seq.*, 2005, **16**(5): 397 ~ 401.

62 Andrew D. J., Baker B. S. Expression of the Drosophila secreted cuticle protein 73 (dsc73) requires shavenbaby. *Dev. Dynam.*, 2008, **237**(4): 1 198 ~ 1 206.

63 Togawa T., Dunn W. A., Emmons A. C., *et al*. Developmental expression patterns of cuticular protein genes with the R&R consensus from *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2008, **38**(5): 508 ~ 519.

64 Le Hir H., Nott A., Moore M. J. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.*, 2003, **28**(4): 215 ~ 220.

65 Snyder M., Hunkapiler M., Yuen D., *et al*. Cuticle protein genes of Drosophyla: structure, organization and evolution of four clustered genes. *Cell*, 1982, **29**(3):1 027 ~ 1 040.

66 Nakato H., Izumi S., Tomino S. Structure and expression of gene coding for a pupal cuticle protein of *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1992, **1 132**(2): 161 ~ 167.

67 Lampe D. J., Willis J. H. Characterization of a cDNA and gene encoding a cuticular protein from rigid cuticles of the giant silkmoth, *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1994, **24**(4): 419 ~ 435.

68 Qiu J., Hardin P. Temporal and spatial expression of an adult cuticle protein gene from Drosophila suggests that its protein product may impart some specialized cuticle function. *Dev. Biol.*, 1995, **167**(2): 416 ~ 425.

69 Charles J. P., Chihara C., Nejad S., *et al*. A cluster of cuticle protein genes of *Drosophila melanogaster* at 65A: sequence, structure and evolution. *Genetics*, 1997, **147**(3): 1 213 ~ 1 224.

70 Dotson E. M., Cornel A. J., Willis J. H., *et al*. A family of pupal-specific cuticular protein genes in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1998, **28**(7): 459 ~ 472.

71 Mathelin J., Quennedey B., Bouhin H., *et al*. Characterization of two new cuticular protein genes specifically expressed during the post-ecdysial molting period in *Tenebrio molitor*. *Gene*, 1998, **211**(2): 351 ~ 359.

72 Rondot I., Quennedey B., Delachambre J. Structure, organization and expression of two clustered cuticle protein genes during the metamorphosis of an insect, *Tenebrio molitor*. *Eur. J. Biochem.*, 1998, **254**(2): 304 ~ 312.

73 Nakato H., Shofuda K., Izumi S., *et al*. Structure and developmental expression of a larval cuticle protein gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1994, **1 218**(1): 64 ~ 74.

74 Binger L. C., Willis J. H. Identification of the cDNA, gene and promoter for a major protein from flexible cuticles of the giant silkmoth *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1994, **24**(10): 989 ~ 1 000.

75 Dombrovsky A., Sobolev I., Chejanovsky N., *et al*. Characterization of RR-1 and RR-2 cuticular proteins from *Myzus persicae*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2007, **146**(2): 256 ~ 264.

76 Bruey-Sedano N., Alabouvette J., Lestradet M., *et al*. The Drosophila ACP65A cuticle gene: deletion scanning analysis of cis-regulatory sequences and regulation by DHR38. *Genesis*, 2005, **43**(1): 17 ~ 27.

77 Wang G. L., Moore M. L., McMillin J. B. A region in the first exon/intron of rat carnitine palmitoyltransferase Ibeta is involved in enhancement of basal transcription. *Biochem. J.*, 2002, **362**:609 ~ 618.

78 Lestradet M., Gervasio E., Fraichard S., *et al*. The cis - regulatory sequences required for expression of the *Drosophila melanogaster* adult cuticle gene ACP65A. *Insect Mol. Biol.*, 2009, **18**(4):431 ~ 441.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net