



刘彬, 侯有明, 汤宝珍. 昆虫锌金属蛋白酶研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (4): 909-921.

## 昆虫锌金属蛋白酶研究进展

刘彬<sup>1,2</sup>, 侯有明<sup>1,2</sup>, 汤宝珍<sup>1,2\*</sup>

(1. 福建农林大学闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002; 2. 福建省昆虫生态重点实验室, 福州 350002)

**摘要:** 锌金属蛋白酶是指含有锌离子的蛋白酶, 在哺乳动物中参与多项生物学过程的调控。在昆虫中也发现了许多锌金属蛋白酶, 能够参与昆虫体内多项生命活动进程如食物的消化与吸收、组织重塑、变态发育、神经系统的调控及免疫防御反应等。本文综述了目前在昆虫中发现的锌金属蛋白酶的结构和底物特异性, 聚焦 6 种锌金属蛋白酶 (羧肽酶、基质金属蛋白酶、脑啡肽酶、胰岛素降解酶、血管收缩素转换酶及氨肽酶) 在昆虫中的功能, 旨在为昆虫锌金属蛋白酶的深入研究提供参考。

**关键词:** 锌金属蛋白酶; 家族分类; 消化; 发育; 变态; 免疫

中图分类号: Q965; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 04-0909-13

### Advancement on zinc metalloproteases in insects

LIU Bin<sup>1,2</sup>, HOU You-Ming<sup>1,2</sup>, TANG Bao-Zhen<sup>1,2\*</sup> (1. State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Insect Ecology, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** Zinc metalloproteases are those proteases containing zinc ion, which participate in regulation of many physiological processes in mammals. Many zinc metalloproteases have also been found in insects, and they are involved in many life activities, such as digestion and absorption of food, tissue remodeling, metamorphosis, regulation of central nervous system and immune defense response. In the present paper, the structure and substrate specificity of zinc metalloproteases found in insects were reviewed with focusing on the functions of six zinc proteases (carboxypeptidase, matrix metalloprotease, neprilysin, insulin degrading enzyme, angiotensin converting enzyme and aminopeptidase), aiming to provide reference for further investigation of zinc metalloproteases in insects.

**Key words:** Zinc metalloproteases; family classification; digestion; development; metamorphosis; immune

酶是由活细胞产生的、具有高度底物特异性和高度催化效能的蛋白质或 RNA。根据催化机制可分为 6 类: 氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶和合成酶。水解酶指的是催化水解反应的一类酶, 常见的有蛋白酶、淀粉酶、胰蛋白酶和核酸酶等。其中蛋白酶是研究最早也是最深入的一类, 其催化原理就是水解蛋白质中的肽

键。根据所水解肽键的位置可分为外肽酶和内肽酶两大类。蛋白酶在昆虫的各种生命活动中有着不可或缺的作用, 比如在中肠中参与食物的水解, 在血淋巴中参与免疫系统的激活反应, 在蜕皮液中参与表皮的降解等 (Samuels and Paterson, 1995; Bown *et al.*, 2004; Fortier *et al.*, 2007; Kanost and Jiang, 2015)。锌金属蛋白酶是昆虫金属蛋白酶的

基金项目: 国家自然科学基金 (32072492, 31672086); 国家重点研发项目 (2017YFC1200604)

作者简介: 刘彬, 男, 1996 年生, 山东荣成人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫免疫与害虫综合治理, E-mail: liubin@fafu.edu.cn

\* 通讯作者: Author for correspondence: 汤宝珍, 女, 博士, 副教授, 研究方向为害虫综合治理, E-mail: tangbaozhen@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2020-07-08; 接受日期 Accepted: 2020-09-16

一种,在昆虫体内发挥着重要作用。本文在概述昆虫锌金属蛋白酶的结构与分类的基础上,重点介绍了其功能特征,以加深人们对昆虫锌金属蛋白酶的认识,以期为深入研究其功能、发现害虫防治新靶标提供参考。

## 1 锌金属蛋白酶概述

锌金属蛋白酶 (Zinc metalloproteases) 是一类活性中心保守、依靠锌离子催化肽键水解的蛋白水解酶,广布于动物、植物、真菌、细菌、病毒及寄生虫中 (Turner *et al.*, 2001; Carpentier *et al.*, 2004; Overall and Kleifeld, 2006)。在哺乳动物中可参与多种生命活动的调控,如胚胎发育、组织病变、细胞形态重塑及伤口愈合等重要生理过程 (Page-McCaw *et al.*, 2007),同时也与常见疾病如癌症、高血压、动脉粥样硬化、白血病等的发生和治疗有密切关系 (毛居戴·亚力等, 1999; 陈香红, 2007; 姚益群等, 2019)。近年来在多种昆虫中也发现了许多锌金属蛋白酶,如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和家蚕 *Bombyx mori* 等。由于昆虫相对于哺乳动物来说体型小、结构相对简单、操作简便,因此更便于对其金属蛋白酶进行深入研究,且有助于更好地理解锌金属蛋白酶的类型及其各自的功能。

## 2 锌金属蛋白酶的结构与分类

早期, Jiang 等 (1992) 将含锌离子的蛋白酶划分为 5 个家族。随后, Hooper (1994) 又进行了一次划分,他将龙虾肽酶 (Astacin)、沙雷氏菌蛋白酶 (Serratia proteases)、基质金属蛋白酶 (Matrix Metalloproteases, MMPs) 以及 Reprolysin 这 4 类蛋白酶统一划分到锌蛋白家族的甲硫氨酸锌蛋白亚族中,同时将嗜热菌蛋白酶 (Thermolysin) 划分到锌蛋白家族的谷氨酸锌蛋白亚族中。锌金属蛋白酶中有不同的锌离子结合基序,如 *HEXXH* (斜体加粗表示锌离子的配体氨基酸,粗体表示涉及催化的氨基酸, X 为任意氨基酸) 等。根据不同的基序,可将锌金属蛋白酶超家族分为 4 个家族 (图 1): 锌蛋白 (Zincins)、羧肽酶 (Carboxypeptidases, CPs)、DD-羧肽酶 (DD-

carboxypeptidases) 及反锌蛋白 (Inverzincins)。其中锌蛋白的锌离子结合基序为 *HEXXH*, 与之相对的为反锌蛋白,其基序为 *HXXEH*, CPs 的基序为 *HXXE*, DD-羧肽酶的基序为 *HXH*。

锌离子的配体指的是与锌离子配位的氨基酸,在锌金属蛋白酶中锌离子的配体氨基酸有 3 个,大多数锌金属蛋白酶都有 2 个位于锌离子  $\alpha$  螺旋处的组氨酸。对于锌蛋白家族来说,所有成员都有 2 个位于锌离子结合基序 *HEXXH* 中的组氨酸配体,根据与锌离子结合的第三个配体氨基酸的不同,该家族可进一步划分成 3 个亚族: 甲硫氨酸锌蛋白 (Metzincins)、谷氨酸锌蛋白 (Gluzincins) 及天冬氨酸锌蛋白 (Aspzincins)。甲硫氨酸锌蛋白的第三个配体为组氨酸,在这个亚族里有 7 种蛋白酶,分别为龙虾肽酶、沙雷氏菌蛋白酶、MMPs、Reprolysin、利什曼溶蛋白 (Leishmanolysin)、Snapalysin 及最近在细菌 *Myroides sp.* 中发现的 Myroilysin (Xu *et al.*, 2017)。谷氨酸锌蛋白的第三个配体为谷氨酸,包含 6 种蛋白酶,分别为嗜热菌蛋白酶、肽链内切酶 (Endopeptidases)、血管紧张素转化酶 (Angiotensin converting enzyme, ACE)、脑啡肽酶 (Neprilysin, NEP)、破伤风和肉毒杆菌神经毒素 (Tetanus and Botulism neurotoxins) 及氨肽酶 (Aminopeptidases, APs)。天冬氨酸锌蛋白的第三个配体为天冬氨酸, *Aspergillus oryzae* 的 Deuterolysin 是第一个被发现的天冬氨酸锌蛋白酶 (Fushimi *et al.*, 1999)。CPs 家族可根据锌离子结合基序进一步划分为 3 个亚族,第一个亚族包括 CPA 和 CPB,其共有基序为 *BHSYSQ*; 第二个亚族中有 CPT 和 *Streptomyces* CP,共有基序为 *FHTYSE*; 第三个亚族包含 CPH、CPM 和 CPN,共有的基序为 *LHGGXB*。

反锌蛋白家族比较小,由胰岛素降解酶 (Insulin degrading enzyme, IDE)、Pitriylsin 和酵母增强加工蛋白 (Processing-enhancing protein) 组成,包含反向锌结合基序。

DD-羧肽酶最早在白色链霉菌 *Streptomyces albus* 中被发现,其中两个锌离子配体位于 *DHXXHV* 基序中,第三个锌离子配体位于基序 *SRHMY* 的 N 末端侧,这与其它锌金属蛋白酶的锌离子配体的位置都不同 (Becker and Roth, 1993)。DD-羧肽酶家族的金属蛋白酶主要在细菌如铜绿假单胞菌和大肠杆菌中分布 (Presslitz and Ray, 1975; Mallick *et al.*, 2019),在昆虫中还未发现。

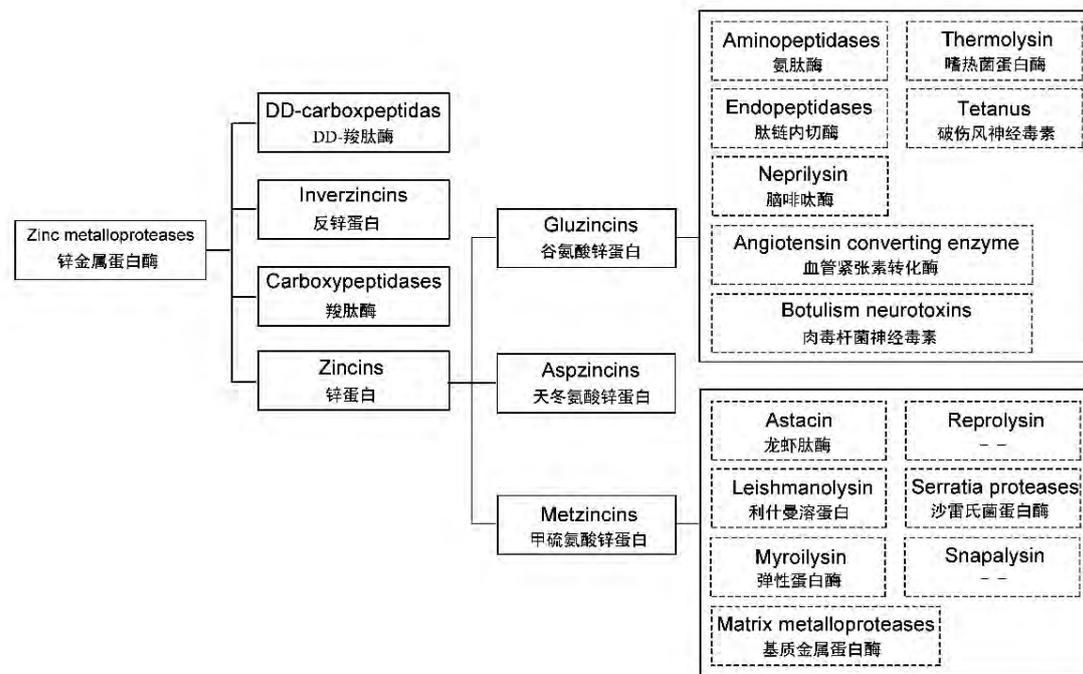


图 1 锌金属蛋白酶家族 (根据 Hopper, 1994 修改)

Fig. 1 Families of zinc metalloproteases

目前 MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) 数据库里共有 103 个金属蛋白酶家族, 这些家族中的金属蛋白酶有的具有内肽酶活性 (如 M13 家族), 有的具外肽酶活性 (如 M14 家族), 也有的既有内肽酶活性又有外肽酶活性 (如 M3 家族)。

在昆虫中发现的锌金属蛋白酶也可以划分到数据库内对应的家族中 (图 2): APs (M1 家族)、ACE (M2 家族)、MMPs (M10 家族)、NEP (M13 家族)、CPs (M14 家族) 和 IDE (M16 家族)。

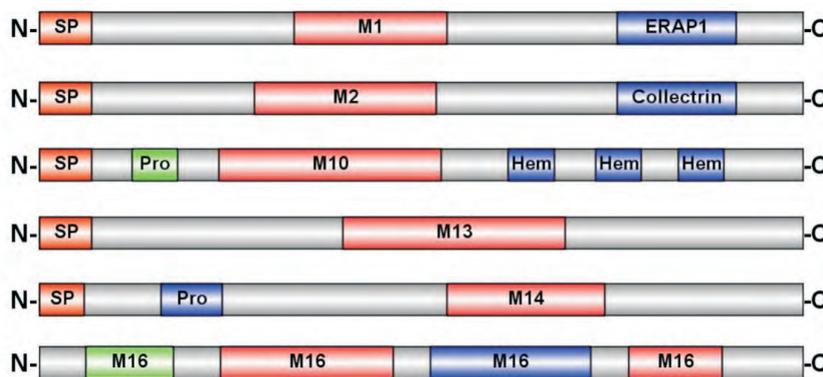


图 2 锌金属蛋白酶结构示意图

Fig. 2 Schematic diagrams of structure of zinc metalloproteases

注: SP, 信号肽; M1, 金属蛋白酶 M1 结构域; ERAP1, 内质网氨基肽酶 1 结构域; M2, 金属蛋白酶 M2 结构域; Collectrin, 一种单程跨膜蛋白结构域; Pro, 前肽区; M10, 金属蛋白酶 M10 结构域; Hem, 类血红素结合蛋白区; M13, 金属蛋白酶 M13 结构域; M14, 金属蛋白酶 M14 结构域; M16, 金属蛋白酶 M16 结构域。Note: SP, Signal peptide; M1, Metalloprotease 1 domain; M2, Metalloprotease 2 domain; Collectrin, A single-pass transmembrane protein domain; Pro, Pro-peptide; M10, Metalloprotease 10 domain; Hem, Hemopexin-like domain; M13, Metalloprotease 13 domain; M14, Metalloprotease 14 domain; M16, Metalloprotease 16 domain.

### 3 锌金属蛋白酶的功能特征

#### 3.1 羧肽酶 (CPs)

在哺乳动物中存在 3 种编码消化羧肽酶的基因, 分别称为 CPA1、CPA2 和 CPB (Clauser *et al.*, 1988)。在昆虫中发现的 CPs 主要分为两类, 一类与昆虫消化吸收食物有关 (CPA1、CPA2 和 CPB), 其中 CPA 和 CPB 结构相似, 都具有一段前肽, CPA 主要对芳香族、脂肪类及疏水性残基具有较强的切割能力, 而 CPB 会优先剪切碱性氨基酸残基, 其次也会剪切一些非碱性残基 (Segundo, 1982); 另一类是 CPE 和 CPD, 与 CPA 和 CPB 不同之处在于二者不含或仅含一小段前肽 (Fricker, 1988; Walter *et al.*, 1996)。

Ward (1976) 首次在衣蛾 *Tineola bisselliella* 的消化道内发现了 CPs, 其活性能被马铃薯羧肽酶抑制剂 (Potato carboxypeptidase inhibitor) 和邻二氮杂菲 (Phenanthroline) 强烈抑制, 同时该酶对中性脂肪族氨基酸残基具有强烈的偏好, 并且不会水解 C 末端脯氨酸、精氨酸和赖氨酸。类似地, 从棉铃虫的肠道中分离检测到 CPA 和 CPB 的活性, CPA 占据主要地位, 而 CPB 量极少; CPA 能在较宽的 pH 范围内发挥作用, 其活性主要被邻二氮杂菲和马铃薯羧肽酶抑制剂抑制; 棉铃虫幼虫长期摄入大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (Soybean Kunitz trypsin inhibitor) 会导致中肠细胞中 CPA 基因表达量增加 (Bown *et al.*, 1997)。Bown 等 (2004) 随后又从棉铃虫中分离得到一种新 CP, 其不能水解 CPA 或 CPB 的底物, 但却能裂解底物 C 末端谷氨酸残基, 这是第一个被鉴别和发现的锌金属蛋白酶家族中对谷氨酸具有特异性的 CP。在粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 幼虫的中肠中, 消化性 CPs 活性也主要由 CPA 引起, CPA 比 CPB 的活性高 8 倍, 这两种羧肽酶在 pH 8.0~8.5 之间都具有较高的酶活, 对于马铃薯羧肽酶抑制剂和邻二氮杂菲, 二者也展示出相同的抑制现象 (Wang *et al.*, 2004)。

在一些双翅目昆虫中, 如库态按蚊 *Anopheles culicifacies* 和冈比亚按蚊在吸食寄主血液后肠道内 CPs 基因的表达量显著上升 (Ramos *et al.*, 1993; Edwards *et al.*, 2000), 且其表达量在吸血 1 d 后到达顶峰 (Horler *et al.*, 1995)。Shi 等 (2017) 通过定量 PCR 也发现, 中华按蚊 *Anopheles sinensis*

体内 8 个 CPs 基因的表达在吸血之后发生显著变化。由此可见, 在一些吸血昆虫中, 血液能够诱导 CPs 活性的改变, 这一改变可能与食物消化相关。

CPs 除了具有消化功能, 还可能参与免疫反应。当疟原虫进入冈比亚按蚊体内后, 冈比亚按蚊 CPB 基因表达量显著上升, 但若使用抑制剂降低 CPB 的活性, 按蚊体内的疟原虫发育也会受到影响 (Lavazec *et al.*, 2007)。埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中肠的 CPB1 通过与登革热病毒外壳蛋白互作而抑制该病毒的入侵 (Tham *et al.*, 2014)。家蚕 5 龄幼虫喂食感染核型多角体病毒后, 中肠中的 4 个 CPs 基因表达量升高, 表现出对病原侵染的免疫应答作用 (朱玉苹等, 2016)。

Sidyelyeva 和 Fricker (2002) 真核表达出黑腹果蝇 CPD 的两个结构域, D1B (Domain 1B) 和 D2 (Domain 2), 体外酶活实验表明 D1B 在中性 pH 下活性更高, D2 则在 pH 5~6 时活性更高; D1B 和 D2 都能裂解 C 末端为精氨酸或赖氨酸的底物, 且 D1B 在裂解 C 末端为精氨酸的底物时活性更高, 分析认为两个结构域之间的底物特异性和 pH 的差异可能为 CPD 行使功能所必需。

CPs 在昆虫的生长发育中起着重要作用, 包括食物的消化吸收、抵御外源物的免疫反应等。但目前对于昆虫 CPs 的研究仅限于少数几种昆虫中, 且对其功能的研究也仅限于消化食物方面, CPs 参与先天免疫防御的研究还有待深入分析。

#### 3.2 基质金属蛋白酶 (MMPs)

MMPs 是一种内肽酶, 隶属于甲硫氨酸锌蛋白酶家族。由于其能够裂解胞外基质中的蛋白而被称为基质金属蛋白酶。大部分 MMPs 的结构相似, 包含一个信号肽、一个前肽、一个催化区、一个铰链区和 C 末端 3 个血红素区 (Hemopexin domain) (Page-McCaw *et al.*, 2003; 2007; 2008)。MMPs 在组织重塑、细胞增殖和分化、伤口愈合、胚胎发育及变态等方面都具有重要作用, 但其活性通常被内部组织金属蛋白酶抑制剂 (Tissue inhibitor of metalloproteinase) 所抑制 (Page-McCaw *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2007)。

在哺乳动物中 MMPs 的底物分布很广, 包括生长因子、细胞附着因子、趋化因子和细胞活素等 (Sternlicht and Werb, 2001; Greenlee *et al.*, 2007)。由于昆虫体型小, 遗传背景清晰, 且一种昆虫中最多不超过 3 个 MMPs, 这使得在昆虫中解析

MMPs 功能变得简单。

目前,黑腹果蝇中发现的两个 MMPs (Dm1-MMP 和 Dm2-MMP) 都对其神经系统的发育、脂肪体解离、稳态调控、肿瘤细胞转移和组织重塑具有重要作用 (Srivastava *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2016; 2017; DeVault *et al.*, 2018)。Dm1-MMP 和 Dm2-MMP 能以一种合作的方式引导果蝇脂肪体解离, Dm1-MMP 能够破坏 DE-钙粘素 (DE-cadherin-mediated) 介导的细胞与细胞之间的连接, 而 Dm2-MMP 负责裂解基底膜, 二者共同作用破坏了细胞与基底膜之间的连接最终导致脂肪体的解离 (Jia *et al.*, 2014)。同样地, Wen 等 (2020) 对表达纯化的 Dm1-MMP 和 Dm2-MMP 的催化域 (Catalytic domain) 进行底物降解实验, 也发现 Dm1-MMP 和 Dm2-MMP 在组织重塑中具有协同作用但具有不同功能。MMPs 的血红素 (Hemopexin domain) 区域对于要入侵的组织还具有特异性 (Glasheen *et al.*, 2009)。此外, Dm2-MMP 能促进排卵进程和黄体的生成 (Deady *et al.*, 2015)。

在大蜡螟 *Galleria mellonella* 中发现的 Gm1-MMP 能够增强 IV 型胶原蛋白的降解, 在组织重塑和应对细菌脂多糖的感染中发挥了重要作用 (Altincicek and Vilcinskas, 2008)。赤拟谷盗的 2 个 MMPs (Tc1-MMP 和 Tc2-MMP), 在结构和功能上都与 Dm1-MMP 类似, 干扰 Tc1-MMP 后其身体多处部位不能正常发育, 同时抵御白僵菌侵染的能力也下降, 干扰 Tc2-MMP 后幼虫肠道发育受损, 这些表明 MMPs 对赤拟谷盗的生长发育以及免疫系统的运作具有重要影响 (Knorr *et al.*, 2009)。烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 Ms1-MMP 在其蜕皮时表达量提高了 10 倍, 且在注射 MMPs 抑制剂后, 幼虫生长发育速度变缓, 这表明 Ms1-MMP 参与了蜕皮过程, 对维持正常发育起着重要作用 (Vishnuvardhan *et al.*, 2013)。家蚕的 3 个 MMPs (Bm1-MMP、Bm2-MMP 和 Bm3-MMP) 扮演着不同角色, Bm1-MMP 和 Bm2-MMP 参与翅芽的发育, Bm3-MMP 与体重有关; 在家蚕被病原物感染后, MMPs 表达量上升, 过表达 MMPs 会增加病毒的繁殖量, 而敲除 MMPs 后可抑制病毒繁殖量, 这表明少量的 MMPs 能促进免疫系统运作, 而过量的 MMPs 会对机体产生不利影响 (刘太行, 2017; Kawasaki *et al.*, 2018)。

尽管在哺乳动物中已有相当多关于 MMPs 的研究, 但目前在昆虫中 MMPs 研究才刚刚开始, 虽然

MMPs 在昆虫生长发育、组织重塑及先天免疫方面具有重要作用, 但它们在昆虫中的作用底物以及在免疫系统中的作用机制尚不清楚。还有很多问题亟待解决, 如 MMPs 是如何参与免疫系统运作, MMPs 为何过表达后会对机体产生毒害作用等。

### 3.3 脑啡肽酶 (NEP)

NEP 是位于神经细胞上的胞外酶, 能灭活脑啡肽 (Enkephalins), 故将其命名为脑啡肽酶, 在细胞表面肽信号关闭中起着重要作用。作为一种胞外酶, NEP 在细胞外催化肽的水解, 通过对位于 N 端 P<sub>1</sub>' 疏水性氨基酸残基的切割, 优先水解相对短的寡肽 (不超过 30 个氨基酸)。同时, NEP 能够被塞奥芬 (Thiorphan) 和磷酰二肽 (Phosphoramidon) 这两种抑制剂强烈抑制 (Roques *et al.*, 1993)。NEP 能够通过裂解脑啡肽和速激肽家族的 P 物质 (Substance P) 从而关闭脑中的神经信号 (Malfroy *et al.*, 1978; Barnes *et al.*, 1993)。除了在神经系统中的作用外, NEP 还参与了哺乳动物神经、心血管、炎症和免疫系统的调节肽的代谢 (Turner *et al.*, 2001)。如通过抑制心房钠尿肽 (Atrial natriuretic peptide) 来终止钠离子排泄和血管舒张活动 (Turner *et al.*, 2001)。NEP 在癌症发生方面也扮演着重要的角色, 由于香烟的刺激导致肺部 NEP 下调可能与一些小细胞癌变有关 (Shipp *et al.*, 1991)。

昆虫中也存在类似哺乳动物 NEP 活性的酶, 这些酶能够降解那些控制行为和生理的神经肽。在沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 大脑的突触膜上, 富含一种可能负责代谢的类 NEP 内肽酶, 介导肽递质和调节剂的失活 (Isaac, 1988)。在东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 大脑的蘑菇体、中央体神经纤维和视叶中都检测到了对磷酰二肽敏感的内肽酶活性, 这些内肽酶可能是速激肽信号系统中的一部分, 负责对突触的速激肽灭活。在东亚飞蝗和蟑螂中, 大脑中 NEP 裂解速激肽这一功能是保守的 (Isaac and Nässel, 2003)。黑腹果蝇中至少存在 20 多个 NEP 基因, 果蝇 NEP2 的体外实验证实其能够裂解蝗虫速激肽和果蝇速激肽 (Thomas *et al.*, 2005)。根据 NEP2 在马氏管和两性生殖器官中高丰度的表达, 推测其可能在肾脏和生殖中具有重要作用 (Thomas *et al.*, 2005; Chintapalli *et al.*, 2007)。果蝇中的 NEP4 有两种形式, 一种为膜结合形式, 另一种为可溶形式 (Meyer *et al.*, 2009)。在果蝇的每个发育阶段至少都存在一种 NEP4 的异

构体,表明果蝇整个生命周期都需要 NEP4 参与。在黑腹果蝇胚胎发育过程中,NEP4 在围心细胞、Muscle founder cells、神经胶质细胞 (Glia cells) 及雄性生殖腺中皆有表达 (Meyer *et al.*, 2009)。体外异源表达的 NEP4 对 P 物质和血管收缩素 (Angiotensin I) 表现出底物偏好性,显示出与人 NEP2 相似的底物特异性 (Meyer *et al.*, 2009)。Sitnik 等 (2014) 进一步研究了 NEP 在生殖方面的作用: 在雌性个体中,NEP1、NEP2 和 NEP4 表达量的降低会导致产卵量减少; NEP2 的增加还能导致黑腹果蝇表现出异常的攀爬行为,野生型呈直线垂直上升,NEP2 过度表达个体则呈螺旋上升,并在静止期表现出梳理行为的增加,据此推测 NEP 过度表达造成了神经肽信号的干扰从而导致了运动行为异常 (Bland *et al.*, 2009)。此外,果蝇的 NEP4 通过裂解相关调节肽从而调控胰岛素通路和食物的摄取 (Hallier *et al.*, 2016)。

在一些寄生蜂如匙胸瘦蜂 *Leptopilina boulandi*、镶颞姬蜂 *Hyposoter didymator*、阿尔蚜茧蜂 *Aphidius ervi* 的毒液中发现 NEP (Dorémus *et al.*, 2013; Colinet *et al.*, 2013; 2014), 同时在仓蛾姬蜂 *Venturia canescens* 的卵巢区中也发现了 NEP (Asgari *et al.*, 2002)。目前对于 NEP 在寄生蜂中或寄生蜂与寄主互动中的作用还不清楚,仅 Asgari 等 (2002) 推测 NEP 可能通过破坏寄主免疫相关肽调控寄主的免疫反应。

NEP 在哺乳动物的研究比较多,与多种疾病如高血压、癌症的发生及阿尔茨海默症的致病机制密切相关,但 NEP 在昆虫中的生理功能和作用底物尚不清楚,目前仅鉴定出黑腹果蝇 NEP4 的底物肽能够影响胰岛素样肽的表达,从而调控胰岛素信号通路和食物的摄取。NEP 在昆虫体内的功能可能多样化,包括调控生长发育、生殖及免疫防御等,但这些都还有待进一步研究。

### 3.4 胰岛素降解酶 (IDE)

对昆虫 IDE 的研究主要集中在黑腹果蝇,黑腹果蝇 IDE 的氨基酸序列与人的 IDE 有 30% 的相似性 (Shen *et al.*, 2006)。IDE 能够裂解哺乳动物的胰岛素,其水解胰岛素 B 链肽键位点包括 B10-B11、B14-B15、B16-B17 和 B25-B26,这些切割位点与哺乳动物胰岛素蛋白酶中的 4 个切割位点对应,这表明 IDE 在进化中是相对保守的 (Garcia *et al.*, 1988; Duckworth *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1991)。黑腹果蝇中 IDE 的过表达与胰岛素缺乏呈

现出的表型相同,这表明黑腹果蝇体内 IDE 同样具有裂解胰岛素的功能 (Tsuda *et al.*, 2010)。Galagovsky 等 (2014) 发现黑腹果蝇的 IDE 能够通过调节磷脂酰肌醇-3-磷酸激酶 (PI3K) 途径从而限制生长发育,认为 IDE 是胰岛素信号的调节剂,其功能的丧失有利于胰岛素抵抗。

胰岛素抵抗是 II 型糖尿病 (Diabetes mellitus type II, DMII) 的标志,实际上在人和小鼠的研究中很早就发现了 IDE 降解与 DMII 之间的联系 (Rudovich *et al.*, 2009; Abdul-Hay *et al.*, 2011), 但能将 IDE 和 DMII 的起源关联的机制还不清楚。

目前对于昆虫 IDE 的研究还很少,虽然发现黑腹果蝇 IDE 能够裂解胰岛素,但具体的分子机理还不清楚,对其机理的揭示还可为 DMII 的研究提供参考依据。

### 3.5 血管紧张素转化酶 (ACE)

ACE 也称为二肽基羧肽酶。昆虫的 ACE 首次从家蝇 *Musca domestica* 的头膜中分离得到 (Lamango and Isaac, 1993), 且其氨基酸序列与哺乳动物的 ACE 高度保守 (Quan *et al.*, 2001), 区别在于哺乳动物 ACE 在 C 末端存在一个膜锚定位点 (Membrane anchor), 而昆虫 ACE 没有,这使得大部分哺乳动物的 ACE 为膜结合形式,而昆虫的为可溶形式 (Korneel *et al.*, 2002)。

血管紧张素 I (Angiotensin I, AI)、缓激肽 (Bradykinin) 和 P 物质通常被认为是哺乳动物 ACE 的生理底物,虽然在昆虫体内中还未发现与 AI、血管升压素 II (Vasoconstrictor angiotensin II)、缓激肽有关的肽或激素 (Isaac *et al.*, 1999), 但体外实验发现纯化后的家蝇和黑腹果蝇的 ACE 能裂解哺乳动物的许多神经肽或激素,如白细胞激肽 (Leucokinin)、蝗虫速激肽 (Locustatachykinin)、脑啡肽和抑咽侧体神经肽 (Allatostatin) (Lamango *et al.*, 1997; Siviter *et al.*, 2002)。虽然昆虫 ACE 能裂解很多神经肽,但在不同昆虫中裂解速度不同,如黑腹果蝇的 ACE 能快速裂解蝗虫速激肽,但裂解其他昆虫速激肽的速度较慢甚至无法水解 (Siviter *et al.*, 2002)。此外,在一些昆虫如甘蓝夜蛾 *Mamestra brassica*、家蚕、马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*、竹节虫 *Carausius morosus*、灰肉蝇 *Neobellieria bullata* 和马德拉蜚蠊 *Leucophaea maderae* 的脑部神经纤维网中能检测到 ACE 荧光,这暗示 ACE 可能参与昆虫神经系统中神经肽的胞外代谢 (Schoofs *et al.*, 1998)。

ACE 在生殖方面也具有作用。对班须按蚊 *Anopheles stephensi* 雌虫使用 ACE 抑制剂后, 其产卵量显著低于正常雌蚊 (Ekbote *et al.*, 2003)。有趣的是在斜纹夜蛾 *Spodoptera littoralis* 幼虫期饲喂 ACE 抑制剂卡托普利 (Captopri) 对雌成虫的产卵量无影响, 而对雌成虫进行卡托普利处理则使其产卵量减少 30% (Vercruyssen *et al.*, 2004)。在番茄夜蛾 *Lacanobia oleracea* 中也发现使用卡托普利后雌虫产卵量下降 (Ekbote *et al.*, 2003)。

ACE 在昆虫的生长发育中也扮演着重要的角色。如 ACE 抑制剂福辛普利 (Fosinoprilat) 能延缓烟草天蛾 4 龄幼虫的生长速率 (Isaac *et al.*, 2007)。卡托普利能使海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的化蛹率下降 80% (Vercruyssen *et al.*, 2004)。黑腹果蝇中存在两种与哺乳动物结构类似的 ACE, 分别命名为 ANCE 和 ACER (Taylor *et al.*, 1996)。ANCE 突变的黑腹果蝇的胚胎发育正常, 无明显缺陷, 但无法成功孵化, 推测 ANCE 可能参与孵化相关肽的加工途径 (Isaac *et al.*, 2007)。ACER 在果蝇胚胎中表达, 而且主要在假定的背侧脉管区域的细胞中表达 (Taylor *et al.*, 1996), 据此推测其可能与心脏的功能相关。Crackower 等 (2002) 发现在 ACER 中插入 P 原件 (Lethal transposon insertion strain) 会使黑腹果蝇幼虫心脏中原组细胞分布无序且数量减少, 最终导致 1 龄或 2 龄幼虫死亡, 由此得出 ACER 影响心脏功能的结论。但 Isaac 等 (2009) 通过实验发现, 当 P 原件被 P 原件转座酶精确切除时, 这种幼虫死亡的现象并没有消失, 可能的解释是前者插入 P 原件时在同一染色体上可能产生了新的致死突变, 所以 ACER 与心脏间的关系还需进一步研究。

此外, ACE 可能还参与昆虫的消化和免疫反应。如 ACE 通过影响蚜虫取食行为进而调控蚜虫与植物的互作 (Wang *et al.*, 2015)。注射脂多糖能导致东亚飞蝗血淋巴中的 ACE 基因转录水平提高 10 倍 (Macours *et al.*, 2003; Duressa and Huybrechts, 2016), 在冈比亚按蚊中也存在类似的现象 (Aguilar *et al.*, 2005)。褐飞虱 *Laodelphax striatellus* 感染水稻条纹病毒后, 其脂肪体和睾丸中 ACE 基因表达量显著上升 (Wang *et al.*, 2019)。

ACE 在昆虫中的生物学功能是多样的, 如参与了幼虫的生长和发育、神经肽的代谢失活和生物合成、食物的消化、雌虫的繁殖及先天免疫等

方面。虽然通过体外实验证明 ACE 能够裂解很多神经肽, 但其在昆虫体内的代谢方式还不清楚。在黑腹果蝇中发现 ACER 与心脏之间有联系, 但二者作用的机制也未被阐明。此外, ACE 参与免疫反应具体的免疫信号通路也未被发现。

### 3.6 氨肽酶 (APs)

APs 是一种重要的外肽酶, 能够水解 N 末端氨基酸, 在动植物中广泛存在 (Taylor, 1993)。在昆虫中的功能也是多样的, 包括消化食物 (Noriega *et al.*, 2002)、参与神经肽的灭活 (Isaac, 1987) 及细胞周期的调控等 (Brownless and Williams, 1993; Taylor, 1993)。

根据氨肽酶在细胞中的定位、对 pH 值及对不同氨基酸水解的偏好, 其可分为 4 类: 氨肽酶 A (APA)、氨肽酶 P (APP)、氨肽酶 N (APN) 和氨肽酶 W (APW) (Tieku and Hooper, 1992)。APA 能够优先水解 N 端有酸性氨基酸的底物肽 (Brownless and Williams, 1993), APP 能够水解 P<sub>1</sub>' 位置是脯氨酸的肽 (Simmons and Orawski, 1992), APN 的水解范围甚广 (McDonald and Barrett, 1986), 但偏好水解中性多肽或蛋白 (Matsas *et al.*, 1985), APW 优先水解一些较短的肽 (Gee and Kenny, 1987)。

昆虫中的 APA 同哺乳动物一样, 也有两种形式, 膜结合形式和可溶形式 (Ferreira and Terra, 1984; 1985; Lenz *et al.*, 1991)。哺乳动物中的 APA 能将血管紧张素 II 转化为血管紧张素 III (Nagatsu *et al.*, 1970; Brownless and William, 1993), 但昆虫中并不存在血管紧张素, 因而 APA 在昆虫中的作用有待研究。

昆虫中 APN 的研究相对较多, 通过糖基化磷脂酰肌醇 (Glycosylphosphatidylinositol) 锚定于昆虫中肠细胞膜上 (Lee *et al.*, 1996)。APN 是苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* Cry 毒蛋白的重要受体。如 Sivakumar 等 (2007) 证实了棉铃虫 APN1 是 Cry1Ac 的受体。Cry 毒蛋白被昆虫摄取后经蛋白酶分解成小片段与昆虫中肠刷状缘膜囊 (Brush border membrane vesicle, BbmV) 上的 APN 结合引起毒素构象改变, 致使细胞膜破损裂解, 最终昆虫中毒死亡 (Schnepf *et al.*, 1998)。而磷酸酰肌醇特异性的磷脂酶 C 可将锚定在 BbmV 上的蛋白释放, 从而减轻 Cry 对虫体的毒害 (Lorence *et al.*, 1997)。Gill 和 Ellar (2002) 将烟草天蛾的 APN1 转到对 Cry1Ac 不敏感的黑腹果蝇中, 发现

转基因黑腹果蝇取食含 Cry1Ac 的食物后死亡。沉默斜纹夜蛾的 APN4 后,再用 Cry1Ca 处理,发现其死亡率下降 75% (Rajagopal *et al.*, 2002)。Cry 与 APN 的结合具有特异性,在某些昆虫中 Cry 只与特定分子量的 APN 结合。如烟草天蛾里 Cry1C 只能与 106 kDa 的 APN 结合 (Luo *et al.*, 1996); 家蚕中 Cry1Aa 只和 115 kDa 的 APN 结合 (Jenkins and Dean, 2001)。有些昆虫只有一种 APN 可和 Cry 结合,如在舞毒蛾 *Lymantria dispar* 中只有 APN1 能与 Cry1Ac 结合,其它形式的 Cry 如 Cry1Aa 和 Cry1Ab 不能与其任何 APN 结合 (Lee *et al.*, 1996)。还有些昆虫中 APN 可和多种 Cry 结合,如烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 170 kDa 的 APN 能与 3 种形式的 Cry (1Aa、1Ab 和 1Ac) 结合 (Gill *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1997; Oltean *et al.*, 1999; Banks *et al.*, 2001)。

哺乳动物 APP 能够裂解缓激肽和脑啡肽 (Isaac *et al.*, 2009), 且 APP 能优先裂解倒数第二个位置为脯氨酸的肽, 由于脯氨酸存在于一些昆虫神经肽的 N 末端倒数第二个位置, 因此昆虫 APP 很可能在神经传导中发挥着重要作用, 但至今未被证实 (Isaac *et al.*, 2009)。迄今为止, 没有发现 APW 参与任何活性肽的代谢 (Tieku and Hooper, 1992)。

APN 是昆虫中研究最多的, 其与 Cry 的互作对害虫的防控具有重要的参考价值, 虽然已经证明 APN 能与 Cry 互作, 但二者结合后如何造成虫体死亡目前还没有定论。昆虫中并未发现 APA 的常用底物血管紧张素 II, 因而具体功能还有待研究, APP 也仅是推测其参与神经传导, APW 更是未曾发现其参与代谢。

#### 4 总结与展望

目前在昆虫中发现的锌金属蛋白酶的功能多种多样, 如 CPs 参与食物消化和营养物质的吸收, MMPs 主要通过降解胞外基质中的蛋白调控昆虫生长发育进程, NEP 通过降解相关神经肽调控昆虫的行为与生理活动, IDE 通过调控胰岛素的降解从而影响昆虫生长发育进程, ACE 参与神经系统的调控, APs 参与食物消化、细胞周期调控等。

尽管如此, 至今仍有许多问题尚不明晰。如 CPs 可能还参与一些神经肽的加工甚至某些昆虫的形态发生, 但参与的机制未知; 其它形式的 CPs

是否也具有消化食物的作用或其它功能等。MMPs 虽能够通过降解胞外蛋白参与调控昆虫生长发育, 但其降解的底物蛋白及互作机制尚不清楚; 相关证据表明 MMPs 能够参与免疫调控反应, 但如何参与以及过表达 MMPs 会抑制免疫系统的原因等还需深入分析。昆虫中 NEP 的功能研究还不多, 可能和哺乳动物类似, 但 NEP 的作用底物还未被发现, 同时 NEP 在昆虫免疫系统中的作用也未被阐明; 此外, 昆虫 NEP 与淀粉样肽之间的联系及其作用机制仍未阐明, 该作用机制可为阿尔茨海默症的治疗提供指导意义。果蝇的 IDE 能够降解胰岛素, 其过表达与胰岛素抵抗的表型相同, 该过程与 DMII 的发生密切相关, 但目前有关 IDE 与 DMII 的作用机制仍不明确, 阐明二者的联系对于临床治疗 DMII 具有参考价值。ACE 分布于昆虫神经纤维网中, 其发生机制还需要深入解析, ACE 参与昆虫的免疫应答同样需要深入分析。APs 功能具有多样性, 但目前对于 APs 的研究主要集中在 APN 上, 有关 APA、APP 和 APW 在昆虫中的作用研究比较局限。

哺乳动物中的锌金属蛋白酶研究比较多, 昆虫中发现的许多锌金属蛋白酶与哺乳动物具有相似的序列特征和作用底物, 因而可借鉴哺乳动物的相关研究来推测其在昆虫体内多样化的功能, 最终为害虫防治提供新思路和新途径。

#### 参考文献 (References)

- Abdul-Hay SO, Kang D, McBride M, *et al.* Deletion of insulin-degrading enzyme elicits antipodal, age-dependent effects on glucose and insulin tolerance [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6 (6): 20818.
- Aguilar R, Jedlicka AE, Mintz M, *et al.* Global gene expression analysis of *Anopheles gambiae* responses to microbial challenge [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35 (7): 709-719.
- Altincicek B, Vilcinskas A. Identification of a lepidopteran matrix metalloproteinase with dual roles in metamorphosis and innate immunity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32 (4): 400-409.
- Asgari S, Reineke A, Beck M, *et al.* Isolation and characterization of a neprilysin-like protein from *Venturia canescens* virus-like particles [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 11 (5): 477-485.
- Banks DJ, Jurat FJL, Dean DH, *et al.* *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa  $\delta$ -endotoxin binding to a novel 110-kDa aminopeptidase in *Heliothis virescens* is not N-acetylgalactosamine mediated [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 31: 909-918.
- Barnes K, Turner AJ, Kenny AJ. An immunoelectron microscopic study

- of pig substantia nigra shows colocalization of pig shows colocalization of endopeptide-24.11 with substance P [J]. *Neuroscience*, 1993, 53 (4): 1073–1082.
- Becker AB, Roth RA. Identification of glutamate-169 as the third zinc-binding residue in proteinase III, a member of the family of insulin-degrading enzymes [J]. *Biochemical Journal*, 1993, 292: 137–142.
- Billingsly PF, Hecker H. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): Activity and distribution of trypsin, aminopeptidases, and alpha-glucosidase in the midgut [J]. *Journal of Medical Entomology*, 1991, 28 (6): 865–871.
- Bland ND, Robinson P, Thomas JE, et al. Locomotor and geotactic behavior of *Drosophila melanogaster* over-expressing neprilysin 2 [J]. *Peptides*, 2009, 30 (3): 571–574.
- Bown DP, Wilkinson HS, Gatehouse JA. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 27 (7): 625–638.
- Bown DP, Gatehouse JA. Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271 (10): 2000–2011.
- Brownless J, Williams CH. Peptidases, peptides and the mammalian blood-brain barrier [J]. *Journal of Neurochemistry*, 1993, 60: 780–793.
- Carpentier M, Guillemette C, Bailey JL, et al. Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NLI [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24 (10): 4428–4437.
- Chen XH. Expression of matrix metalloproteinase-9 and Caspase-3 in the children with acute myelogenous leukemia [J]. *Journal of Basic and Clinical Oncology*, 2019, 32 (1): 12–14. [陈香红. 儿童急性髓细胞性白血病中基质金属蛋白酶-9和半胱氨酸蛋白酶-3的表达 [J]. *肿瘤基础与临床*, 2019, 32 (1): 12–14]
- Chintapalli VR, Wang J, Dow JA. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39 (6): 715–720.
- Clauser E, Gardell SJ, Craik CS, et al. Structural characterization of the rat carboxypeptidase A1 and carboxypeptidase B genes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263 (33): 17837–17845.
- Colinet D, Deleury E, Anselme C, et al. Extensive inter- and intraspecific venom variation in closely related parasites targeting the same host: The case of Leptopilina parasitoids of *Drosophila* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43 (7): 601–611.
- Colinet D, Anselme C, Deleury E, et al. Identification of the main venom protein components of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp of the aphid model *Acyrtosiphon pisum* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1): 342.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function [J]. *Nature*, 2002, 417 (6891): 822–828.
- DeVault LD, Li T, Izabel S, et al. Dendrite regeneration of adult *Drosophila* sensory neurons diminishes with aging and is inhibited by epidermal-derived matrix metalloproteinase 2 [J]. *Genes and Development*, 2018, 32 (5–6): 402–414.
- Deady LD, Shen W, Mosure SA, et al. Matrix metalloproteinase 2 is required for ovulation and corpus luteum formation in *Drosophila* [J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11 (2): 1004989.
- Dorémus T, Urbach S, Jouan V, et al. Venom gland extract is not required for successful parasitism in the polydnavirus-associated endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae) despite the presence of numerous novel and conserved venom proteins [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43 (3): 292–307.
- Duckworth WC, Garcia JV, Liepnieks JJ, et al. *Drosophila* insulin degrading enzyme and rat skeletal muscle insulin protease cleave insulin at similar sites [J]. *Biochemistry*, 1989, 28 (6): 2471–2477.
- Duressa TF, Huybrechts R. Development of primary cell cultures using hemocytes and phagocytic tissue cells of *Locusta migratoria*: An application for locust immunity studies [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 2016, 52 (1): 100–106.
- Edwards MJ, Lemos FJ, Donnelly-Doman M, et al. Characterization of a carboxypeptidase a gene from the mosquito, *Aedes aegypti* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2000, 1: 33–38.
- Ekbote UV, Weaver RJ, Isaac RE. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity of the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: Changes in levels of activity during development and after copulation suggest roles during metamorphosis and reproduction [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 33 (10): 989–998.
- Ekbote UV, Looker M, Isaac RE. ACE inhibitors reduce fecundity in the mosquito, *Anopheles stephensi* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 134 (4): 593–598.
- El-Amouri SS, Zhu H, Yu J, et al. Neprilysin protects neurons against A $\beta$  peptide toxicity [J]. *Brain Research*, 2007, 1152: 191–200.
- El-Amouri SS, Zhu H, Yu J, et al. Neprilysin: An enzyme candidate to slow the progression of Alzheimer's disease [J]. *The American Journal of Pathology*, 2008, 172 (5): 1342–1354.
- Ferreira C, Terra WR. Souble aminopeptidases from cytosol and luminal contents of *Rhynchosciara americana* midgut caeca: Properties and phenanthroline inhibition [J]. *Insect Biochemistry*, 1984, 14 (2): 145–150.
- Ferreira C, Terra WR. Minor aminopeptidases purified from the plasma membrane of midgut caeca cells of insect (*Rhynchosciara americana*) larva [J]. *Insect Biochemistry*, 1985, 15 (5): 619–625.
- Fortier M, Vachon V, Frutos R, et al. Effect of insect larval midgut proteases on the activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73 (19): 6208–6213.
- Fricker LD. Carboxypeptidase E [J]. *Annual Review of Physiology*,

- 1988 ,707 (1) : 74 – 80.
- Fushimi N , Ee CE , Nakajima T , *et al.* Aspzincin , a family of metalloendopeptidases with a new zinc-binding motif [J]. *The Journal of Biological Chemistry* ,1999 ,274: 24195 – 24201.
- Garcia JV , Fenton BW , Rosner MR. Isolation and characterization of an insulin-degrading enzyme from *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochemistry* ,1988 ,27 (12) : 4237 – 4244.
- Galagovsky D , Katz MJ , Acevedo JM , *et al.* The *Drosophila* insulin-degrading enzyme restricts growth by modulating the PI3K pathway in a cell-autonomous manner [J]. *Molecular Biology of the Cell* ,2014 ,25 (6) : 916 – 24.
- Gee N , Kenny AJ. Proteins of the kidney microvillar membrane. Enzymic and molecular properties of aminopeptidases W [J]. *Biochemical Journal* ,1987 ,246: 97 – 102.
- Gill SS , Cowles EA , Francis V. Identification , isolation , and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens* [J]. *Journal of Biological Chemistry* ,1995 ,270 (45) : 27277 – 27282.
- Gill M , Ellar D. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAc1 [J]. *Insect Molecular Biology* ,2002 ,11 (6) : 619 – 625.
- Glasheen BM , Kabral AT , Page-McCaw A. Distinct functions for the catalytic and hemopexin domains of a *Drosophila* matrix metalloproteinase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ,2009 ,106 (8) : 2659 – 2664.
- Greenlee KJ , Werb Z , Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: Multiple , multifarious , and multifaceted [J]. *Physiological Reviews* ,2007 ,87 (1) : 69 – 98.
- Gross J , Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ,1962 ,48: 1014 – 1022.
- Hemming ML , Patterson M , Reske-Nielsen C , *et al.* Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an A $\beta$ -degrading protease: A novel therapeutic approach to Alzheimer disease [J]. *PLoS Medicine* ,2007 ,4 (8) : 262.
- Hooper NM. Families of zinc metalloproteases [J]. *FEBS Letters* ,1994 ,354 (1) : 1 – 6.
- Horler E , Briegel H. Proteolytic enzymes of female *Anopheles*: Biphasic synthesis , regulation , and multiple feeding [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* ,1995 ,28 (2) : 189 – 205.
- Hallier B , Schiemann R , Cordes E , *et al.* *Drosophila* neprilysins control insulin signaling and food intake via cleavage of regulatory peptides [J]. *ELife* ,2016 ,5: 19430.
- Isaac RE , Ekbote U , Coates D , *et al.* A processing enzyme with broad substrate specificity and a role in reproduction [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences* ,1999 ,897 (1) : 342 – 347.
- Isaac RE , Lamango NS , Ekbote U , *et al.* Angiotensin-converting enzyme as a target for the development of novel insect growth regulators [J]. *Peptides* ,2007 ,28 (1) : 153 – 162.
- Isaac RE. Neuropeptide-degrading endopeptidase activity of locust (*Schistocerca gregaria*) synaptic membranes [J]. *Biochemical Journal* ,1988 ,255 (3) : 843 – 847.
- Isaac RE , Nässel DR. Identification and localization of a neprilysin-like activity that degrades tachykinin-related peptides in the brain of the cockroach , *Leucophaea maderae* , and locust , *Locusta migratoria* [J]. *Journal of Comparative Neurology* ,2003 ,457 (1) : 57 – 66.
- Isaac RE. Proctolin degradation by membrane peptidases from nervous tissues of the desert locust (*Schistocerca gregaria*) [J]. *Biochemical Journal* ,1987 ,245: 365 – 370.
- Isaac ER , Bland ND , Shirras AD. Neuropeptidases and the metabolic inactivation of insect neuropeptides [J]. *General and Comparative Endocrinology* ,2009 ,162 (1) : 8 – 17.
- Jenkins JL , Dean DH. Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* CryIAa for purified , native *Bombyx mori* aminopeptidases N and cadherin-like receptors [J]. *BMC Biochemistry* ,2001 ,2: 12.
- Jiang W , Bond JS. Families of metalloendopeptidases and their relationships [J]. *FEBS Letters* ,1992 ,312 (2) : 110 – 114.
- Jia Q , Liu Y , Liu H , *et al.* Mmp1 and Mmp2 cooperatively induce *Drosophila* fat body cell dissociation with distinct roles [J]. *Scientific Reports* ,2014 ,4: 7535.
- Kawasaki H , Manickam A , Shahin R , *et al.* Expression of matrix metalloproteinase genes during basement membrane degradation in the metamorphosis of *Bombyx mori* [J]. *Gene* ,2018 ,638 (1) : 26 – 35.
- Kanost MR , Jiang HB. Clip-domain serine proteases as immune factors in insect hemolymph [J]. *Current Opinion in Insect Science* ,2015 ,11: 47 – 55.
- Knorr E , Schmidtberg H , Vilcinskas A , *et al.* MMPs regulate both development and immunity in the *Tribolium* model insect [J]. *PLoS ONE* ,2009 ,4 (3) : 4751.
- Korneel H , Anick V , Nathalie M , *et al.* Characterization of four substrates emphasizes kinetic similarity between insect and human C-domain angiotensin-converting enzyme [J]. *European Journal of Biochemistry* ,2002 ,269 (14) : 3522 – 3530.
- Kuo WL , Gehm BD , Rosner MR. Regulation of insulin degradation: Expression of an evolutionarily conserved insulin-degrading enzyme increases degradation via an intracellular pathway [J]. *Molecular Endocrinology* ,1991 ,5 (10) : 1467 – 1476.
- Lavazec C , Boudin C , Lacroix R , *et al.* Carboxypeptidases B of *Anopheles gambiae* as targets for a *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine [J]. *Infection and Immunity* ,2007 ,75 (4) : 1635 – 1642.
- Lamango NS , Nachman RJ , Hayes TK , *et al.* Hydrolysis of insect neuropeptides by an angiotensin-converting enzyme from the housefly , *Musca domestica* [J]. *Peptides* ,1997 ,18 (1) : 47 – 52.
- Lamango N , Isaac RE. Identification of an ACE-like peptidyl dipeptidase activity in the housefly , *Musca domestica* [J]. *Biochemical Society Transactions* ,1993 ,21 (3) : 245.
- Lenz CJ , Kang J , Rice WC. Digestive proteinases of larva of the corn earworm , *Heliothis zea*: Characterization , distribution , and dietary relationships [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* ,1991 ,16 (3) : 201 – 212.

- Lee MK, You TH, Young BA. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 2845–2849.
- Liu TH. Functional Analysis of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Silkworm, *Bombyx mori* [D]. Chongqing: Southwest University, 2017. [刘太行. 家蚕基质金属蛋白酶家族 MMPs 及组织金属蛋白酶抑制剂 TIMP 在家蚕中的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017]
- Luo K, Lu YJ, Adang MJ. A 106-kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C  $\delta$ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, 26 (8–9): 783–791.
- Luo K, Sangadala S, Masson L, et al. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase function as “receptor A” by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxin binding and pore formation [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 27 (8–9): 735–743.
- Lorence A, Darszon A, Bravo A. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membrane [J]. *FEBS Letters*, 1997, 414 (2): 303–307.
- Mallicka S, Dasa J, Vermab J, et al. Role of *Escherichia coli* endopeptidases and DD-carboxypeptidases in infection and regulation of innate immune response [J]. *Microbes Infection*, 2019, 21 (10): 464–474.
- Macours N, Hens K, Francis C, et al. Molecular evidence for the expression of angiotensin converting enzyme in hemocytes of *Locusta migratoria*: Stimulation by bacterial lipopolysaccharide challenge [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2003, 49 (8): 739–746.
- Matsas R, Stephenson SL, Hryszko J, et al. The metabolism of neuropeptidases. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N [J]. *Biochemical Journal*, 1985, 231: 445–449.
- Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, et al. High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine [J]. *Nature*, 1978, 276: 523–526.
- Mcdonald JK, Barrett AJ. Mammalian proteases: A glossary and bibliography volume 2 exopeptidases [J]. *Biochemical Society Transactions*, 1986, 224 (1): 357.
- Meyer H, Panz M, Zmojdian M, et al. Neprilysin 4, a novel endopeptidase from *Drosophila melanogaster*, displays distinct substrate specificities and exceptional solubility states [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212 (22): 3673–3683.
- Noriega FG, Edgar KA, Bechet R, et al. Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2002, 48 (2): 205–212.
- Nagatsu I, Nagatsu T, Yamaoto T, et al. Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1970, 198 (2): 255–270.
- Oltean D, Pullikuth AK, Lee HK, et al. Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor A from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (11): 4760–4766.
- Overall CM, Kleinfeld O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6: 227–239.
- Page-McCaw A, Serano J, Santé JM, et al. *Drosophila* matrix metalloproteinase are required for tissue remodeling, but not embryonic development [J]. *Developmental Cell*, 2003, 4 (1): 95–106.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8 (3): 221–233.
- Page-McCaw A. Remodeling the model organism: Matrix metalloproteinase functions in invertebrates [J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2008, 19 (1): 14–23.
- Presslitz JE, Ray VA. DD-carboxypeptidase and peptidoglycan transpeptidase from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1975, 7 (5): 578–581.
- Quan GX, Mita K, Okano K, et al. Isolation and expression of the ecdysteroid-inducible angiotensin-converting enzyme-related gene in wing discs of *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 31 (1): 97–103.
- Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, et al. Silencing of midgut aminopeptidases N of *Spodoptera litura* by double-strand RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (49): 46849–46851.
- Ramos A, Mahowald A, Jacobs-Lorena M. Gut-specific genes from the black fly *Simulium vittatum* encoding trypsin-like and carboxypeptidase-like proteins [J]. *Insect Molecular Biology*, 1993, 1: 149–163.
- Roques BP, Noble F, Dauge V, et al. Neutral endopeptidase 24.11 structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology [J]. *Pharmacological Reviews*, 1993, 45 (1): 87–146.
- Rudovich N, Pivovarova O, Fisher E, et al. Polymorphisms within insulin-degrading enzyme (IDE) gene determine insulin metabolism and risk of type 2 diabetes [J]. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 2009, 87 (11): 1145–1151.
- Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: Who, when and how? [J]. *Trends in Cell Biology*, 2008, 18 (11): 560–574.
- Samuels RI, Paterson IC. Cuticle degrading proteases from insectmoulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 110 (4): 661–669.
- Sangadala S, Walters FS, English LH. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1A (c) toxin binding and 86 Rb (+) -K+ efflux in vitro [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (13): 10088–10092.
- Schnepf E, Crickmore N, Van RJ, et al. *Bacillus thuringiensis* and its

- pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (3): 755–806.
- Schoofs L, Veelaert D, Loof AD, et al. Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects [J]. *Brain Research*, 1998, 785 (2): 215–227.
- Segundo BS, Martinez MC, Vilanov AM. The severed activation segment of porcine pancreatic procarboxypeptidase a is a powerful inhibitor of the active enzyme. Isolation and characterisation of the activation peptide [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1982, 707 (1): 74–80.
- Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, et al. CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88 (23): 10662–10666.
- Shen Y, Joachimiak A, Rosner MR, et al. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism [J]. *Nature*, 2006, 443 (7113): 870–874.
- Siviter RJ, Nachman RJ, Dani MP, et al. Peptidyl dipeptidases (Ance and Acer) of *Drosophila melanogaster*: Major differences in the substrate specificity of two homologs of human angiotensin I-converting enzyme [J]. *Peptides*, 2002, 23 (11): 2025–2034.
- Sidyelyeva G, Fricker LD. Characterization of *Drosophila* carboxypeptidase D [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (51): 49613–49620.
- Shi ZP, Zhi ZJ, Luo SH, et al. Molecular characterization and blood feeding-relative expression analysis of eight carboxypeptidase genes in *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2017, 60 (6): 621–631.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2001, 17: 463–516.
- Sitnik JL, Francis C, Hens K, et al. Neprilysins: An evolutionarily conserved family of metalloproteases that play important roles in reproduction in *Drosophila* [J]. *Genetics*, 2014, 196: 781–797.
- Simmons WH, Orawski AT. Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 4897–4903.
- Sivakumar S, Rajagopal R, Venkatesh GR, et al. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected SF21 cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (10): 7312–7319.
- Sreedhara KH, Goldberg AL. *E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent [J]. *Nature*, 1981, 29 (5824): 652–654.
- Stefano GB, Salzet M. Invertebrate opioid precursors: Evolutionary conservation and the significance of enzymatic processing [J]. *International Review of Cytology*, 1999, 187: 261–286.
- Srivastava A, Pastor-Pareja JC, Igaki T, et al. Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (8): 2721–2726.
- Taylor A. Aminopeptidases: Structure and function [J]. *FASEB Journal: Official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1993, 7 (2): 290–298.
- Taylor CA, Coates D, Shirras AD. The Acer gene of *Drosophila* codes for an angiotensin-converting enzyme homologue [J]. *Gene*, 1996, 181 (1/2): 191–197.
- Thomas JE, Rylett CM, Carhan A, et al. *Drosophila melanogaster* NEP2 is a new soluble member of the neprilysin family of endopeptidases with implications for reproduction and renal function [J]. *Biochemical Journal*, 2005, 386 (2): 357–366.
- Tieku S, Hooper NM. Inhibition of aminopeptidase N, A and W. A re-evaluation of the action of bestatin and inhibitors of angiotensin converting enzyme [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1992, 44 (9): 1725–1730.
- Tsuda M, Kobayashi T, Matsuo T, et al. Insulin-degrading enzyme antagonizes insulin-dependent tissue growth and A $\beta$ -induced neurotoxicity in *Drosophila* [J]. *FEBS Letters*, 2010, 584 (13): 2916–2920.
- Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: Genomics and function [J]. *BioEssays*, 2001, 23 (3): 261–269.
- Tham HW, Balasubramaniam V, Tejo BA, et al. CPB1 of *Aedes aegypti* interacts with DENV2 E protein and regulates intracellular viral accumulation and release from midgut cells [J]. *Viruses*, 2014, 12: 5028–5046.
- Vercruyse L, Gelman D, Raes E, et al. The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril reduces oviposition and ecdysteroid levels in Lepidoptera [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2004, 57 (3): 123–32.
- Vishnuvardhan S, Ahsan R, Jackson K, et al. Identification of a novel metalloproteinase and its role in juvenile development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (Linnaeus) [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution*, 2013, 320 (2): 105–117.
- Wang W, Luo L, Lu H, et al. Angiotensin-converting enzymes modulate aphid-plant interactions [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8885.
- Wang P, Li GX, Kain W. Characterization and cDNA cloning of midgut carboxypeptidases from *Trichoplusia ni* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34 (8): 831–843.
- Walter MF, Zeineh LL, Black BC, et al. Catecholamine metabolism and *in vitro* induction of premature cuticle melanization in wild type and pigmentation mutants of *Drosophila melanogaster* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1996, 31 (2): 219–233.
- Ward CW. Properties of the major carboxypeptidase in the larvae of the webbing clothes moth, *Tineola bisselliella* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976, 429 (2): 564–572.
- Wang X, Wang W, Zhang WZ, et al. Immune function of an

- angiotensin-converting enzyme against rice stripe virus infection in a vector insect [J]. *Virology*, 2019, 533 (1): 137–144.
- Wen D, Chen Z, Zhang ZY, et al. The expression, purification, and substrate analysis of matrix metalloproteinases in *Drosophila melanogaster* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 171: 105629.
- Xu DQ, Zhou JL, Lou XD, et al. Myroilysin is a new bacterial member of the M12A family of metzincin metalloproteinases and activated by a cysteine-switch mechanism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292 (13): 5195–5206.
- Yali M, Anwar O, Sapar A. Effect of MMPs in reproductive process of mammal [J]. *Journal of Xingjiang Normal University* (Natural Sciences Edition), 1999, 18 (4): 40–46. [毛居戴·亚力, 欧尔比特·安尼瓦尔, 阿依古丽·沙帕尔. 基质金属蛋白酶家族在哺乳动物生殖过程中的作用 [J]. 新疆师范大学学报 (自然科学版), 1999, 18 (4): 40–46]
- Yao YQ, Wu Y, Shen SB, et al. Experimental study on the inhibitory effect of extracellular matrix metalloproteinase inducer monoclonal antibody on the formation of ApoE<sup>(-/-)</sup> atherosclerosis in mice [J]. *Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases*, 2019, 38 (3): 298–302. [姚益群, 吴勇, 申松波, 等. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子单克隆抗体抑制 ApoE<sup>(-/-)</sup> 小鼠动脉粥样硬化形成的实验研究 [J]. 心肺血管病杂志, 2019, 38 (3): 298–302]
- Zhu YP, Han MJ, Zha XL, et al. Identification and expression analysis of Metalloprotease gene family in silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Science of Sericulture*, 2016, 42 (3): 393–403. [朱玉苹, 韩民锦, 查绪乐, 等. 家蚕金属羧基蛋白酶基因家族的鉴定与表达分析 [J]. 蚕业科学, 2016, 42 (3): 393–403]
- Zheng HM, Wang XX, Guo PF, et al. Premature remodeling of fat body and fat mobilization triggered by platelet-derived growth factor/VEGF receptor in *Drosophila* [J]. *FASEB Journal*, 2017, 31 (5): 1964–1975.
- Zheng HM, Yang Xh, Xi YM. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila* [J]. *Life Sciences*, 2016, 167: 22–31.