

王禹生,田小利,肖阳,张杰,梁宽,黄浩贤,邓小娟. 20E 诱导家蚕抗菌肽 CecropinB6 的上调表达 [J].环境昆虫学报,2023,45 (5): 1306-1317.

## 20E 诱导家蚕抗菌肽 CecropinB6 的上调表达

王禹生<sup>1\*</sup>,田小利<sup>1\*</sup>,肖 阳<sup>2</sup>,张 杰<sup>1</sup>,梁 宽<sup>1</sup>, 黄浩贤<sup>1</sup>,邓小娟<sup>1\*\*</sup>

(1. 华南农业大学动物科学学院/广东省农业动物功能基因组学与分子育种重点实验室/广东省蚕桑工程技术研究中心,广州 510642;2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所,广州 510610)

**摘要:** 蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)是调控昆虫发育的重要激素,在昆虫的蜕皮和变态中起关键作用。近年来的研究表明,20E 也调控昆虫抗菌肽的表达,揭示昆虫的发育和免疫之间具有重要的联系。家蚕是重要的经济昆虫,家蚕抗菌肽对蜕皮激素(20E)的应答及其调控机制仍有待研究。本文利用 20E 注射家蚕 5 龄第 3 天幼虫,qRT-PCR 结果表明 20E 处理的脂肪体中抗菌肽 *CecropinB6* 基因(*BmCecB6*)的表达上调。通过对抗菌肽 *BmCecB6* 上游启动子的截短和双荧光素酶活性分析,结果显示 *BmCecB6* 响应 20E 的调控位点在启动子 - 448 ~ -170 区域,该区域内存在潜在的 FoxO、E74A 和 BR-C等结合位点。本研究表明 20E 抑制了 ILS 通路水平,暗示 ILS 下游的转录因子 FoxO 被激活。进一步对 *BmCecB6* 的启动子进行 FoxO 结合位点的缺失突变,双荧光素酶检测结果表明 20E 对 *BmCecB6* 的诱导活性并没有丧失,推测 *BmCecB6* 对 20E 的应答不是通过转录因子 FoxO 结合 *BmCecB6* 启动子中的顺式调控元件直接调控的。20E 激活 *BmCecB6* 表达的分子调控机制还需要进一步深入研究。 关键词:家蚕; 蜕皮激素; 抗菌肽; Cecropin; 调控 中图分类号: Q963; S89 文献标识码; A 文章编号: 1674 - 0858 (2023) 05 - 1306 - 12

### Upregulation of *CecropinB6* expression was triggered by 20E in silkworm, *Bombyx mori*

WANG Yu-Sheng<sup>1\*</sup>, TIAN Xiao-Li<sup>1\*</sup>, XIAO Yang<sup>2</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>, LIANG Kuan<sup>1</sup>, HUANG Hao-Xian<sup>1</sup>, DENG Xiao-Juan<sup>1\*\*</sup> (1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding/Guangdong Provincial Sericulture and Mulberry Engineering Research Center, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. The Sericultural and Agri-Food Research Institute of the Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China) Abstract: 20-hydroxyecdysone (20E) is an important hormone involved in insect development and it plays a key role in insect molting and metamorphosis. Recent studies have shown that 20E also regulates the expression of antimicrobial peptides (AMPs), revealing the crosstalk between insect development and immunity. Silkworm is an important economic insect. The expression of AMPs in response to 20E in silkworm and the regulatory mechanism remain to be studied. In this study, we showed by qRT-PCR that the expression of *CecropinB6* (*BmCecB6*) gene in the fat body was upregulated when 20E was injected into the hemocoel of the 3<sup>rd</sup> day of 5<sup>th</sup> instar silkworm larvae. Then a series of *BmCecB6* truncated promoters

基金项目:广东省自然科学基金 (2019A1515011533)

<sup>\*</sup> 共同第一作者: 王禹生, 男, 1993 年生, 河南信阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为昆虫先天免疫, E-mail: 1787685611@qq.com; 田小利, 女, 1988 年生, 河南驻马店人, 硕士, 主要研究方向为昆虫先天免疫, E-mail: 814322940@qq.com

<sup>\*\*</sup>通信作者 Author for correspondence:邓小娟,女,博士,副教授,主要研究方向昆虫免疫与发育,E-mail:dengxj@scau.edu.cn 收稿日期 Received: 2022-05-27;接受日期 Accepted: 2022-08-23

were constructed and analyzed for their transcriptional activities by Dual-luciferase reporter assays. The results showed that the 20E responsive elements were located in the promoter region between -448 and -170 bp, which contains potential DNA binding sites for FoxO, E74A and BR-C transcription factors. Our study showed that 20E inhibited the level of the ILS pathway, suggesting that FoxO, the transcription factor downstream of the ILS pathway, was activated. The Dual-luciferase activity results showed that the mutated *BmCecB6* promoter, in which the potential FoxO binding sites were deleted, was still activated by 20E. Therefore, activation of *BmCecB6* by 20E was not directly due to the binding of transcription factor FoxO to the cis-regulatory sites in the *BmCecB6* promoter. The molecular mechanism of *BmCecB6* expression in response to 20E needs to be further studied.

Key words: Silkworm; 20-hydroxyecdysone; antimicrobial peptides; Cecropin; regulation

昆虫具有极强的适应性,是地球上种类最多、 分布最广的类群,这主要是因为它们具有强大的 先天免疫系统。当微生物突破昆虫的第一道防线 —物理屏障时,被宿主模式识别受体 (PRR) 识别并激活宿主的先天免疫(Lu et al., 2020)。 先天免疫系统由细胞免疫和体液免疫两部分组成, 细胞免疫由血细胞执行的吞噬、包囊和凝结等组 成,而体液免疫包括黑化作用、合成和分泌抗菌 肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 与溶菌酶等 (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Yang et al. , 2021)  $_{\circ}$ 细胞免疫和体液免疫发挥各自不同的作用,并协 同工作以清除外来的病原物(Haine et al., 2008)。 AMPs 是一类重要的抗菌效应分子,受病原诱导并 能在昆虫持续存在达数周之久(Makarova et al., 2016)。微生物诱导 AMPs 的产生主要通过进化保 守的 Toll、IMD 和 JAK/Stat 等信号通路进行调控 (Yang et al., 2021), 1990s Toll 受体在果蝇 Drosophila melanogaster 中激活抗感染免疫功能的阐 明 (Lemaitre et al., 1996) 促进了哺乳动物 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)的发现,并极 大地推动了先天免疫分子机制的研究 (Vijay, 2018).

除了病原微生物的感染, AMPs 的表达也受到 非感染因素的诱导,如营养剥夺(Unckless et al., 2015)、激素(Reynolds et al., 2020)和 DNA 损 伤(Karpac et al., 2011)等。饥饿信号能降低果 蝇 ILS 水平激活丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt,进而导 致转录因子 FoxO 被激活进入细胞核内,启动 AMPs 基因的表达(Becker et al., 2010; Zhang et al., 2018)。类固醇激素 20-羟基蜕皮酮(20E) 作为昆虫发育和变态的重要调节因子,也调控 AMPs 基因的表达(Flat et al., 2008; Han et al., 2017),现有的研究表明 20E 可以通过调控肽聚糖 识别蛋白 (PGRP)进而调节 *AMPs* 的表达 (Rus *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2017),也可以通过 20E 信号通路中关键因子 BR-C 调控 *AMPs* 的表达 (Mai *et al.*, 2017)。

随着家蚕基因组计划的完成,在家蚕基因组中发现和鉴定了 Attacins、Cecropins、Moricins, Gloverins、Enbocins、Lebocins 和 Defensins 7 个 AMPs 家族的 37 条基因序列,部分序列的抗菌功能得到 鉴定(Cheng et al., 2006; Yang et al., 2011)。基 于抗菌谱、抗菌活性和微生物对 AMPs 基因的转录 诱导活性,推测 BmCecB6、BmcecD 和 Bmmor 在清 除微生物感染的免疫过程中起重要作用(Yang et al., 2011)。20E 对家蚕 AMPs 表达的影响及其分 子机制的研究较少,Tian 等(2010)发现 20E 抑 制家蚕 Moricin 和 Cecropin 等 AMPs 基因的转录水 平。本研究对 20E 调控家蚕抗菌肽 BmCecB6 的表 达进行研究,并对 BmCecB6 的启动子进行截短和 双荧光素酶启动子活性分析,以期为进一步揭示 昆虫的发育与免疫之间的联系奠定基础。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

家蚕幼虫:品种为大造,五龄幼虫在 25℃ ± 1℃以新鲜桑叶饲养。家蚕细胞卵巢细胞系 Bm-12 用含有 10% (v/v)胎牛血清 (Gibco)和 90% (v/v) TNM-FH 培养基 (Sigma Aldrich, USA), 在 27℃恒温培养箱中培养。

pGL3-Basic 萤火虫荧光素酶质粒载体和 pRL-Null 海肾荧光素酶质粒载体 (美国 Promega 公司) 由华南师范大学昆虫研究所李胜研究员提供,

pRL-Null 插入 Actin5 报告基因构建成 pRL-Null-Actin5 海肾荧光素酶重组内参质粒用于检测细胞中的本底荧光值。

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞购 自北京天根生物公司。

Phospho-Drosophila Akt (Ser505) 和 Akt 抗体 为 Cell signaling technology 公司产品, Tubulin 单克 隆抗体和 HRP 标记的山羊抗兔及 HRP 标记的山羊 抗小鼠二抗购自碧云天生物技术研究所。

蜕皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 为美国 Sigma Aldrich 公司产品。Trizol Reagents 总 RNA 抽 提试剂盒,限制性内切酶、反转录用试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser)、T4 DNA ligase、Primer-STAR DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 宝生物工程大连有限公司。实时荧光定量 PCR 试剂 SsoFast EvaGreen Supermix 为美国 Bio-Rad 产品。Effectene Transfection Reagent 转染试剂 盒为德国 Qiagen 公司产品。Dual-Luciferase Report Assay System 试剂盒为 Promega 公司产品。

#### 1.2 方法

1.2.1 20E 处理方法

20E 注射家蚕幼虫:取家蚕 5 龄第 3 天幼虫, 以微量注射器从腹部最后一对足处注射 5 µL 20E 工作液(相当于 5 µg/头), 3、6、9 和 12 h 后收 集脂肪体。为了探讨不同剂量的 20E 对 AMPs 表达 的影响,设置 0.05、0.5、5 和 10 µg/头的处理 组,注射 6 h 后进行样品收集和预处理,并以注射 等体积的 20% 乙醇为对照。将 5 头家蚕的脂肪体 作为一个样品,每个处理取 3 个重复样品。

20E 处理离体培养的家蚕脂肪体组织:取家蚕 5 龄第 3 天幼虫,以 75% 酒精进行体表消毒、晾 干,用解剖剪剖开体腔后从腹部刮取脂肪体,于 无菌的昆虫生理盐水中漂洗后转移至含有 Grace 昆 虫培养基(Antibiotic-Antimycotic)的6孔板中进 行无菌培养。培养3h后加入20E使终浓度为 5μg/mL,处理4、8和12h后收集脂肪体备用, 以加入等体积的20%酒精处理作为对照。

20E 处理 Bm-12 细胞:在对数生长期的 Bm-12 细胞中分别加入 20E,使终浓度为 0.01、0.1、1 和 10 μg/mL,处理 4、8 和 12 h 后收集细胞备用,以加入等体积的 20% 酒精作为对照。

#### 1.2.2 qRT-PCR 对 AMPs 基因的表达定量

为检测 AMPs 基因的表达水平, 取家蚕五龄幼 虫脂肪体和 Bm-12 细胞, 根据 MIQE 指南的标准 (Bustin et al., 2010) 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。首先按 TRIzol Reagent RNA (Invitrogen) 提取试剂使用说明书提取总 RNA, 总 RNA 经 PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒反转录合成 cDNA, 在 CFX96 定量 PCR 仪(Bio-rad)检测 AMPs、胰岛素受体 InR 和 20E 受体初级转录因子 E75a 的转录活性,参考 Zhang 等 (2018) 设计定量引物,序列见表 1。采 用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (Bio-rad), 反应体系为: SsoFast EvaGreen Supermix (2×) 10 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 0.2 μL, cDNA 0.1 μL (相当于10 ng 总 RNA),加 ddH<sub>2</sub>O 至总体 积 20 μL。反应程序为: 95℃ 预变性 1 min; (95℃ 15 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s) 循环 40 次; 溶解曲 线在65~95℃每隔0.5℃采集1次,每次采集5s。 以 rp49 (核糖体蛋白, ribosome protein, rp49) 作 为内参基因,采用 2<sup>-ΔΔet</sup>法 (Livak & Schmittgen, 2001) 计算基因相对表达量。

Table 1 Sequences of primers for qk1-rCk			
基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (5'-3')	
Targetgenes	Sense primer $(5'-3')$	Antisense primer $(5' - 3')$	
BmCecB6	GCAAAGATCCT ATCCTTCGTC	GAACCAAGGACCTCGATCGCC	
Bmmor	GGCAATGTCTCTGGTGTCATGTAG	GCTITCTTTTCTTCGGTITC	
BmdefB	GATTGGATTATCCAGGCGG	AACAGTATTGTTCTGATGAGAGATAG	
BmE75a	CGCTACGATGTGCCTACG	GATGCACAAGGAACGTGAAC	
BmInR	CCGAACTAGAAGTGTCCCAAGA	AGTACAGCGAGTATCCGAGCAG	
rp49	CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC	TGCTGGGCTCTTTCCACGA	

表 1 qRT-PCR 引物序列 Fable 1 Sequences of primers for gRT-PC

#### 1.2.3 BmCecB6 启动子序列的扩增

取家蚕脂肪体,利用 Tissue DNA Kit (OMEGA, USA) 抽提基因组 DNA,根据家蚕基 因组数据库 Silkbase 3.0 获得的 *BmCecB6* 启动子序 列,设计扩增不同长度的启动子序列引物。上游 引物序列见表 2,下游引物 BmCecB6\_R: 5'-GA <u>AGATCTGTTCACTCGTACACGGCTCAAAC-3'</u>,下划 线序列分别为 *Bgl* II 酶切位点。PCR 反应体系: TaKaRa Ex Taq (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, 10 × Ex Taq Buffer ( $Mg^{2+}$  Plus) 5 µL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 µL, 上下游引物 (20 µmol/L) 各 1 µL, 基因组模板 DNA 2.5 ng, 加 ddH<sub>2</sub>O 补充到 50 µL。PCR 反应参数为: 94℃ 4 min→ (94℃ 1 min→58℃ 30 s→72℃ 1.2 min) × 30 cycles→ 72℃ 10 min→4℃ ∞。经琼脂糖凝胶电泳分析获得 与预期大小相符的条带,按 AxyPrepDNA 凝胶回收 试剂盒说明书进行目的条带的回收与纯化。

表 2 扩增截短的 BmCecB6 启动子引物序列 Table 2 Sense primers for amplification of truncated promoters

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	启动子长度(bp) Promoter length
(-1623 ~ -1) -luc-F	CG ACGCGT TTACCCAAGTGTACGTGATG	1 623
$(-1003 \sim -1)$ -luc-F	CG ACGCGT GCACCGTTAGTGGATCG	1 003
$(-630 \sim -1)$ -luc-F	CG ACGCGT AGGGACAGTTTACTTCGC	630
$(-448 \sim -1)$ -luc-F	CG ACGCGT ATGGGTTGTTAGGTCGC	448
(-170 ~ -1) -luc-F	CG ACGCGT CCCGTTATCTTGCGCTC	170

注: 阴影部分序列分别为 Bgl II 酶切位点。Note: Shaded part of the sequence was the Bgl II restriction site.

**1.2.4** 构建 *BmCecB6* 不同长度启动子的 pGL3-Basic 重组载体

使用限制性内切酶 *Mlu* I 和 *Bgl* II 对 pGL3-Basic 启动子载体和 *BmCecB6* 启动子序列(野生型,wt)进行双酶切,分别回收大片段后于 16℃ 连接过夜。将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受 态细胞,经 amp 筛选和 PCR 鉴定,将阳性克隆送 上海生工生物技术有限公司进行测序确认,构建 成功的重组载体命名为 pGL3-BmCec6\_wt。

**1.2.5** 构建缺失 FoxO 结合位点的 *BmCecB6* 启动 子的 pGL3-Basic 重组载体

*BmCecB6* 启动子上游 1 623 bp 区域存在 5 个可能的 FoxO 结合位点 (TXTITAY; X-N, Y-C/T), 采用重叠 PCR 方法按 1 ~ 5 的顺序依次进行 FoxO 结合位点的缺失突变 (Zhang *et al.*, 2018), 引物 序列见表 3。由于第 2、3、4 三个位点紧密相邻, 可将 3 个位点同时进行缺失突变,经过 3 轮定点突 变后,即可获得缺失 FoxO 结合位点的 BmCecB6\_  $\Delta$ FoxO<sup>1-5</sup>上游序列。按 1.2.4 的方法将缺失 FoxO 结合位点的 *BmCecB6* 启动子序列插入 pGL3.0-Basic,构建成功的载体命名为 pGL3-BmCecB6\_  $\Delta$ FoxO<sup>1-5</sup>。

#### 1.2.6 启动子活性分析

利用 Effectene Transfection Reagent 转染试剂盒 分别将重组质粒 pGL3-BmCecB6\_wt和 pGL3-BmCecB6\_ $\Delta$ FoxO<sup>1-5</sup>与内参质粒 pRL-Null-Actin5 共 转染 Bm-12 细胞,转染 48 h 后,用 20E (1 µg/mL) 处理细胞 8 h,室温 1 000 r/min 离心 10 min 收集 细胞,弃上清。用 0.1 mol/L PBS 清洗细胞,收集 到的细胞按双荧光素酶报告检测试剂盒检测双荧 光值,计算萤火虫荧光素酶 (Fluc luciferase, Fluc)与海肾荧光素酶 (renilla luciferase, Rluc) 比值。

#### 1.2.7 免疫印迹检测

用细胞裂解液裂解细胞后提取总蛋白,上样进行 12% SDS-PAGE,然后将蛋白转移到 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 30 min 后,用 p-Akt 抗体 Phospho-Drosophila Akt (Ser505)、总 Akt 抗体、Tubulin 抗体室温孵育过夜,TBST 清洗 3 次后用二抗室温孵育 2 h,再用 TBST 清洗 3 次,最后用 ECL 化学发光检测试剂盒进行显色反应。

#### 1.2.8 数据处理

实验中采用3个独立的家蚕脂肪体样本或3个 独立的细胞培养液,每次实验分析中的每个样品

扩增片段	引物序列 (5'-3')
PCR fragments	Primer sequences $(5'-3')$
BmCcB6_△ <sup>Fox01</sup> 片段1	F: CG ACGCGT TTACCCAAGTGTACGTGATG
fragment 1	R: GTAATTAATTCAGACTTGTTTCATATACAAATTCGCGTGGTTTGTTG
BmCecB6_△ <sup>Fox01</sup> 片段2	F: CAACAAACCACGCGAATTTGTATATGAAACAAGTCTGAATTAATT
fragment 2	R: GAAGATCTTGTAAGTTTATCTAAATTCAAACGCGGACGTG
BmCecB6_△ <sup>Fox01.4</sup> 片段1	F: CG ACGCGT TTACCCAAGTGTACGTGATG
fragment 1	R: CAATGCAATGTACCAGGCGAGTATGTGCTTAGATGGGTAGGCGACCTAAC
BmCecB6_△ <sup>Fox01-4</sup> 片段 2	F: GTTAGGTCGCCTACCCATCTAAGCACATACTCGCCTGGTACATTGCATTG
fragment 2	R: GAAGATCTTGTAAGTTTATCTAAATTCAAACGCGGACGTG
BmCecB6_△ <sup>Fox01-5</sup> 片段 1	F: CG ACGCGT TTACCCAAGTGTACGTGATG
fragment 1	R: CTCTTGTGCTAGATGCAAACCGCATGTACTGCAGCATC
BmCecB6 ∧ <sup>Fox01-5</sup> 片段 2	F• GATGCTGCAGTACATGCGGTTTGCATCTAGCACAAGAG
fragment 2	R: GAAGATCTTGTAAGTTTATCTAAATTCAAACGCGGACGTG

表 3	BmCecB6 启动于序列缺失 FoxO 结合位点的重叠 PCR 引物序列
Table 3	Primers Sequence for overlapping PCR to delete FoxO binding sites

注: 序列中阴影部分为 *Mlu* I 酶切位点,下划线为 *Bgl* II 酶切位点。Note: Shaded part of the sequence was the *Mlu* I restriction site, and the underlined part was the *Bgl* II restriction site.

采用3~5个重复。使用 GraphPad Prism 8.0 软件
t-检验方法对数据进行统计分析, 星号表示差异显
著(\*, P < 0.05;\*\*, P < 0.01;\*\*\*, P < 0.001)。</li>

#### 2 结果与分析

#### 2.1 20E 上调家蚕 BmCecB6 的表达

20E 调控家蚕蜕皮的信号通路中, *E75* 是 20E 的初级应答基因, *E75* 家族中 *E75a* 对 20E 响应较 为明显(Li et al., 2016)。为测试家蚕对 20E 的应 答,取5 龄第 3 天的幼虫按 5 μg/头的剂量注射 20E,通过 qRT-PCR 检测对 20E 处理后的幼虫脂 肪体中 *BmE75a* 基因的转录活性,结果如图 1 所 示。20E 注射后,家蚕幼虫脂肪体中 *BmE75a* 在 3 h、6 h转录活性上调显著,9 h和12 h转录活性 降低,与对照没有显著差异(图 1-a)。为检测 *AMPs* 基因对 20E 的应答,本研究检测了 20E 处理 的 *AMPs* 转录水平变化,结果表明 *BmCecB6* (*BmCecropinB6*)在 20E 诱导 6 h 有明显的上调, 而家蚕 *BmdefB* (*BmDefensinB*)和 *Bmmor* (*BmMoricin*)的表达在 20E 处理后没有显著的变 化(图 1-b),因此选择 *BmCecB6* 作为后续检测应 答 20E 的抗菌肽靶基因。

为了确定 20E 的最佳处理剂量,本研究测试 了每头幼虫注射不同剂量的 20E 对 BmE75a 和 BmCecB6 的诱导效果,结果表明低浓度的 20E (0.05 μg/头和 0.5 μg/头)处理后,BmE75a 和 BmCecB6 的转录活性均没有明显的变化;5 μg/头 20E 能显著上调 BmE75a 和 BmCecB6 的表达(见 图 2)。高剂量的 20E (10 μg/头)注射后 48 h 左 右,家蚕出现体节发黑、口吐黄色液体的现象, 有少部分家蚕死亡。可见 10 μg/头的剂量严重影 响了家蚕的生理和发育。因此,处理 5 龄幼虫 20E 的合适剂量为 5 μg/头。

20E 处理促进家蚕 5 龄幼虫脂肪体中的抗菌肽 BmCecB6 的表达上调,那么 20E 是否同样能上调 游离培养的脂肪体和 Bm-12 细胞中 BmCecB6 基因 的表达? qRT-PCR 结果显示 20E 也能上调离体培 养的脂肪体和 Bm-12 细胞中 BmCecB6 的转录水平 (图 3)。

为探索 20E 处理 Bm-12 细胞的最佳处理浓度, 本研究设置了 4 个不同浓度的 20E (0.01、0.1、1 和 10 μg/mL 细胞培养液)处理 Bm-12 细胞, 8 h 后收集细胞检测 BmCecB6 的转录表达活性,结果显 示: 0.01 μg/mL 20E 处理的 Bm-12 细胞中, BmCecB6



#### 图 1 注射 20 E 后家蚕幼虫脂肪体中 E75a 和 AMPs 的转录水平

Fig. 1 Transcription of *E75a* and *AMPs* in fat body of silkworm larvae after injection of 20E 注:将 20E(5 μg/头)注射到家蚕幼虫体腔,处理 3、6、9 和 12 h 后收集脂肪体组织,通过 qRT-PCR 检测 *E75a*(图 1-a) 和抗菌肽 *BmCecB6、BmdefB*和 *Bmmor*(图 1-b)的转录水平,内参基因为核糖体蛋白 *rp49*。转录变化倍数是相对于对照的 基因转录水平,对照:以 20E 的溶剂 20% 乙醇处理。Note: 20E was injected into the hemocoel of silkworm larvae (5 μg per larva). Fat body tissue was collected for qRT-PCR at 3, 6, 9 and 12 h after 20E treatment. Gene transcription of *E75a* (Fig. 1a) and antimicrobial peptides, *BmCecB6*, *BmdefB* and *Bmmor* (Fig. 1b) was normalized to the internal reference gene *rp49*. Fold change was the relative transcription level compared with the control, injection of 20% ethanol, the solvent of 20E.





# 图 4 不同浓度的 20E 处理家蚕 Bm-12 细胞诱导 BmCecB6 的转录活性

图 2 注射不同剂量的 20E 后家蚕幼虫中脂肪体中 E75a 和 BmCecB6 的转录水平

Fig. 2 Transcription level of *E75a* and *BmCecB6* in fat body of silkworm larvae after injection of various dose of 20E

注:不同剂量 0.05、0.5 和 5 µg/头 20E 注射到家蚕 5 龄 第 3 天家蚕幼虫体腔,处理 6 h 后收集脂肪体组织,通过 qRT-PCR 检测 *E75a* 和抗菌肽 *BmCecB6* 的转录水平。内参 基因为核糖体蛋白 *rp49*,以 20% 乙醇处理的对照中同一基 因的转录水平为 1。Note: Different dose of 0.05, 0.5 and 5 µg 20E per larva was respectively injected into the hemocoel of silkworm larvae at the third day of the fifth instar. Fat body tissue was collected for qRT-PCR at 6 h after 20E treatment. Gene transcription of *E75a* and *BmCecB6* was normalized to the internal reference gene *rp49*. Relative transcription level was the index compared with the control which was injected by 20% ethanol. Fig. 4 Gene transcription level of BmCecB6 in the Bm-cells

was induced by the treatment of 20E at various concentration 注:在细胞培养液中加入 20E 使终浓度为 0.01、0.1、1 和 10  $\mu$ g/mL,处理 8 h 后取样进行 qRT-PCR 检测。qRT-PCR 的内参基因为核糖体 p49,以 20E 的溶剂 20% 乙醇处理的 对照中 *BmCecB6* 转录水平为 1。Note: 20E was added to the culture of Bm-12 cells at the concentration of 0.01, 0.1, 1 and 10  $\mu$ g/mL. Bm-12 cells was collected for qRT-PCR at 8 h after 20E treatment. Gene transcription of *BmCecB6* was normalized to the internal reference gene rp49. Relative transcription level was the index compared with the control which was injected by 20% ethanol, the solvent of 20E.

的表达无明显变化; 0.1、1、10 μg/mL 的 20E 均 显著上调 *BmCecB6* 的转录活性,以1 μg/mL 和 10 μg/mL诱导的效果最为明显(图 4)。虽然 1 μg/mL与 10 μg/mL 的 20E 处理细胞后 *BmCecB6* 





Fig. 3 Transcription level of *BmCecB6* in the cultured fat body of silkworm larvae and Bm-12 cells after 20E treatment 注: a, 收集 5 龄第 3 天的家蚕幼虫脂肪体组织, 在 Grace 培养基中培养 3 h 后, 按终浓度 5 µg/mL 加入 20E, 培养 4、8、 12 h 后, 取脂肪体组织进行 qRT-PCR 检测 *BmCecB6* 的转录水平; b, 以终浓度 1 µg/mL 20E 处理 Bm-12 细胞, qRT-PCR 检 测在 20E 处理 4、8 和 12 h 的 *BmCecB6* 转录水平。qRT-PCR 的内参基因为核糖体 rp49, 以 20% 乙醇处理的对照中 *BmCecB6* 转录水平为 1。Note: a, Fat body tissues of silkworm larvae at the 3<sup>rd</sup> day of the fifth instar was collected and cultured in Grace medium for 3 h. 20E was added to the Bm-12 culture at the final concentration of 5 µg/mL. After the treatment of 4, 8 and 12 h, the cultured fat body tissue was collected for qRT-PCR; b, Bm-12 cells was treated by 1 µg/mL 20E of final concentration. *BmCecB6* transcription was determined at 4, 8 and 12 h by qRT-PCR. Gene transcription of *BmCecB6* was normalized to the internal reference gene rp49. Relative transcription level was the index compared with the control which was injected by 20% ethanol.

的表达上调明显且无明显差异,但鉴于高浓度的 20E对 Bm-12 细胞正常生长有一定的影响,后续 的细胞实验采用的 20E 处理浓度为 1 μg /mL。与 红头丽蝇 *Calliphora vicina* 脂肪体细胞中报道的结 果(Gordya *et al.*, 2016)不同, Bm-12 细胞中没 有出现高浓度 20E 抑制免疫应答的现象。

#### 2.2 截短型 BmCecB6 启动子活性分析

为探讨 20E 诱导 *AMPs* 表达的分子调控机制, 使用在线软件 MatInspector (http://www. genomatix.de/products/index.html)对 *BmCecB6* 启 动子区进行转录因子结合位点的预测分析,发现 *BmCecB6*的1.6 kb 启动子区存在 NF-κB、FoxO 和 EcR、BR-C、E74A 等转录因子的结合位点 (图5)。根据这些转录因子结合位点在启动子中 的位置,将1623、1003、630、448和170bp共 5个不同长度的启动子序列,通过双荧光素酶活性 分析测定不同长度的启动子对20E的响应情况, 结果如图6所示。图6显示-1003~-1、-630~ -1和-448~-1启动子活性和野生型启动子无 明显差异,而20E对-170~-1启动子的诱导转 录活性明显下降,说明 *BmCecB6*对20E的应答元 件在-448~-170启动子区域。该区域存在1个 NF-κB、3个FoxO、2个BR-C和1个E74A位点。





#### 2.3 FoxO 不是直接调控 BmCecB6 的转录因子

*BmCecB6*在-448~-170启动子区域存在对 20E的可能应答元件 NF-кB、FoxO、BR-C和E74A 位点,其中 NF-κB 为昆虫体液免疫通路 (Toll 和 Imd 信号通路)中的关键转录因子,参与微生物感 染诱导的免疫机制 (Lemaitre & Hoffmann, 2007);





Fig. 6 Promoter activity of different lengths of the BmCecB6 5'-flanking region

注:不同长度的 *BmCecB6* 启动子分别克隆插入 pGL-3 Basic 载体,将重组载体与 pRL-actin5 共转染 Bm-12 细胞。为了验证 20E 对启动子的诱导活性,在转染后 48 h 加 20E 处理 Bm-12 细胞,处理 8 h 后以 pRL-actin5 为内参计算不同长度的启动 子荧光素酶活性。20E 诱导倍数为 20E 处理的荧光素酶活性相对于对照的比值。Note: *BmCecB6* promoter and its truncated promoters were respectively cloned into pGL-3 basic vector. Recombinant vectors were co-transfected with pRL-actin5 into Bm-12 cells. To verify the effect of 20E on luciferase activity, 20E was added to the culture of Bm-12 cells at 48 h after transfection. Luciferase activity was measured at 8 h of 20E treatment and normalized to pRL-actin5. 20E fold change was the relative luciferase activity of 20 treatment compared to the control of 20% ethanol.

FoxO 为类胰岛素信号(ILS)中的重要转录因子, 近年来发现 FoxO 也参与饥饿诱导的免疫 (Becker et al., 2010; Zhang & Palli, 2018); BR-C 和 E74A 是响应 20E 信号的初次级转录因子,在家蚕中已 经证明 BR-C 调控 20E 诱导变态发育期中肠抗菌肽 lebocin 的表达(Mai et al., 2017)。为了验证 FoxO 是否参与 20E 诱导的 BmCecB6 表达调控, 首先通过 qRT-PCR 检测 FoxO 的靶标基因胰岛素受体 (BmInR) 的表达是否上调来判断 20E 处理后是否激活家蚕 转录因子 FoxO, qRT-PCR 结果如图 7 所示,显示 20E 处理后的家蚕幼虫脂肪体、离体培养脂肪体和 Bm-12 细胞中 BmInR 的表达上调, 暗示了 20E 处 理减弱类胰岛素信号通路 (ILS) 水平, 激活的转 录因子 FoxO 入核调控靶标基因 BmInR 的表达。对 Akt 磷酸化水平的检测结果显示 20E 处理导致 Akt 磷酸化水平下降(图8),证实了上述的实验结果。 20E 处理导致 ILS 水平下降, FoxO 去磷酸化而被 激活入核,与 Hossain 等(2013)报道的结果 相符。

为了进一步 FoxO 的激活是否参与 20E 诱导的 BmCecB6 表达调控,将 BmCecB6 启动子区 (1.6 kb)的 FoxO 位点利用重叠 PCR 的方法进行 缺失 (Deletion)突变后,测序正确后插入 pGL3 Basic 载体,构建成缺失 FoxO 位点的 pGL3-





注: 5 µg/头 20E 注射家蚕 5 龄第 3 天家蚕幼虫, 6 h 后 收集幼虫脂肪体。离体培养脂肪体和 Bm-12 细胞的 20E 处理浓度为 5 µg/mL,处理时间为 8 h。qRT-PCR 检测 20E 处理后的家蚕幼虫脂肪体、离体培养的脂肪体及 Bm-12 细胞中 *BmInR* 的转录活性。Note: 20E was injected into the hemocoel of silkworm larvae (5 µg per larva). Fat body tissue was collected for qRT-PCR at 6 h after 20E treatment. Cultured fat body and Bm-12 cells were incubated with 20E at concentration of 5 µg/mL. qRT-PCR was used to detect the transcriptional level of *BmInR* in the fat body of silkworm larvae, cultured fat body tissue and Bm-12 cells after 20E treatment.

1313





注: a, Western blot 检测 20E 处理 Bm-12 细胞后 Akt 磷酸 化水平; b, 用 Image J 软件扫描 p-Akt、总 Akt 和 Tubulin 条带的灰度值, 相对灰度值是指 p-Akt 相对于总 Akt 和 Tubulin 的比值, 即 p-Akt/ (total Akt • tubulin), 对照的平 均相对灰度值指定为 1。Note: a, Western blot detection of Akt phosphorylation level of Bm-12 cells treated by 20E; b, Gray value was scanned by Image J and relative value was given by p-Akt/ (total Akt • tubulin), ie. the relative gray value was the division of the gray value of the p-Akt bands by the value of total Akt band, and then by the value of tubulin band. For the control samples, the final value was set as 1.

BmCecB6\_ $\Delta$ FoxO<sup>1-5</sup>重组载体。采用双荧光素酶活 性分析缺失 FoxO 位点对 *BmCecB6* 应答 20E 活性的 影响,将 pGL3-BmCecB6\_ $\Delta$ FoxO<sup>1-5</sup>和野生型启动 子重组载体 pGL3-BmCecB6\_wt 转染 Bm-12 细胞, 检测双荧光素活性,结果显示缺失 FoxO 位点对启 动子活性没有明显的影响(图9),可见 *BmCecB6* 启动子对 20E 的应答活性不是通过 FoxO 结合到 *BmCecB6* 启动子区的顺式元件直接起作用的。

#### 3 结论与讨论

在昆虫中,20E 与 JH 协同作用,调节蜕皮、 变态和发育繁殖(Riddiford *et al.*,2003; Zhu *et al.*,2021)。越来越多的证据表明20E 还参与昆





Fig. 9 Effect of the deletion of potential FoxO binding sites on promoter activity of *BmCecB6* gene

注: BmCecB6-wt 野生型启动子(1 623 bp)和突变缺失 FoxO 位点的 BmCecB\_ $\Delta$ FoxO<sup>1-5</sup>启动子分别克隆插入 pGL-3 Basic 载体,将重组载体与 pRL-actin5 共转染 Bm-12 细胞, 转染后 48 h将 20E 加入到 Bm-12 细胞培养液,20E 处理 8 h 后以 pRL-actin5 为内参计算不同长度的启动子荧光素酶活 性。20E 诱导倍数为 20E 处理的荧光素酶活性相对于 20% 乙醇处理(对照)的比值。Note: BmCecB6-wt wild type promoter of 1 623 bp and its mutated promoter with the deletion of 5 potential FoxO binding sites were respectively cloned into pGL-3 basic vector. Recombinant vectors were co-transfected with pRL-actin5 into Bm-12 cells. 20E was added to the culture of Bm-12 cells at 48 h after transfection. Luciferase activity was measured at 8 h of 20E treatment and normalized to pRL-actin5. 20E fold change was the luciferase activity of 20E treatment compared to the control of 20% ethanol.

虫先天免疫过程,如吞噬和 AMPs 的产生 (Dimarcq et al., 1997; Flatt et al., 2008; Zhang & Palli, 2009; Rus et al., 2013; Nunes et al., 2021). 哺乳动物中的研究也表明类固醇激素及其受体对 先天免疫和炎症反应起着重要的调节作用 (Benagiano et al., 2019)。果蝇幼虫中微生物感染 诱导体内产生抗菌肽 diptericin, 只有在3 龄幼虫后 期 20E 滴度达到足够的量时才会发生(Meister & Richards, 1996); 感染前以 20E 预处理果蝇 S2 细 胞可以提高 AMPs 基因的转录水平 (Flatt et al., 2008);本研究也证实了20E的处理可以激活家蚕 BmCecB6的表达。Wang 等(2014)发现,棉铃虫 Helicoverpa armigera 在化蛹前的游走期,随着 20E 滴度增高.脂肪体中抗菌肽 Attacin、Gloverin、 Cecropin 和溶菌酶 Lysozyme 等基因的转录表达上 调。20E 激活飞蝗 AMPs 基因表达的同时,也能激 活体液免疫的其他成分、比如酚氧化酶系统(Han et al., 2017; Han et al., 2020) $_{\circ}$ 

20E 对昆虫免疫系统的影响,除了调节体液免疫,其滴度升高同时可以激活细胞免疫(Regan et al.,2013)。在冈比亚按蚊 Anopheles gambiae (Ahmed et al.,1999; Reynolds et al.,2020)、昔古比天蚕 Hyalophora cecropia (Roxström-Lindquist et al.,2005)、印度谷螟 Plodia interpunctella (Aye et al.,2005)、印度谷螟 Plodia interpunctella (Aye et al.,2005)等昆虫中均报道了20E的免疫激活作用。值得注意的是,一方面20E促进昆虫的免疫反应,提高昆虫对病原微生物的抵抗能力;另一方面,微生物感染昆虫后可以通过3-脱氢蜕皮激素-3β-还原酶(3DE-3β-reductase)促进20E 滴度升高,同时促进免疫反应(Sun et al.,2016),表明昆虫的免疫与20E 的激素水平存在相互作用的关系。

20E 激活并增强昆虫的体液免疫作用,是与其 生理发育相适应的。在完全变态昆虫由幼虫—蛹 的变态发育过程中,20E结合到由脱皮激素受体 (EcR) 和超气门蛋白 (USP) 组成的异源二聚体 上,并激活包括广泛复合体(BR-C)和 E74 在内 的初、次级转录因子的信号级联反应 (Baehrecke, 2000),最终导致幼虫组织的降解和蛹组织的再 生。新旧组织的替换和更新过程中,昆虫容易受 到微生物的感染,此时体内 20E 水平的升高激活 的免疫反应对变态发育期的虫体起到重要的保护 作用。然后,也有些研究显示 20E 具有免疫抑制 的作用: Gordya 等 (2016) 发现在红头丽蝇脂肪 体细胞中,低浓度的蜕皮激素能够提高其免疫力, 诱导 AMPs 的表达, 而高浓度的蜕皮激素会抑制其 免疫反应; 20E 处理可以抑制家蚕某些 AMPs 基因 转录水平 (Tian et al., 2010); Beckstead 等 (2005)报道 20E 以 EcR 依赖性的方式抑制抗菌肽 defensin, cecropin C, attacin A, drosocin 和 drosomycin 的表达,这或许表明激素对免疫的调节作用是剂 量依赖性的。这种复杂性暗示了昆虫体内存在多 种不同的调控机制, 20E 调控体液免疫的关键基 因,这些基因的作用途径总结起来可以分为3类: (1) 依赖于 Toll 和 IMD 等先天免疫通路; (2) 依 赖于胰岛素 (Insulin) 信号途径; (3) 依赖于 20E 信号通路因子 BR-C 等的直接调控(王远等, 2019)。Rus 等(2013)提出果蝇通过两个不同的 机制调控 AMPs 的表达,一种机制是 20E 通过调控 早期蜕皮激素诱导的转录因子 (BR-C, Eip93F, Eip74EF, Eip78C 和 HR46) 以及2 个果蝇 GATA

因子 (Serpent 和 Pannier),进而调控 PGRP-LC, 通过 IMD 通路调控 AMPs 的表达;另一种是不依赖 PGRP-LC 而是通过 BR-C、Serpent 和 Pannier 影响 一部分 AMPs 的表达,两条通路之间存在交叉重 叠。该模型解释了在果蝇的先天性免疫中 20E 可 以通过影响 IMD 信号途径进而调控 AMPs 表达的 机制。

昆虫体液免疫主要由脂肪体(相当于哺乳动 物的肝脏)中合成 AMPs, 分泌到血淋巴后通过开 放的体液循环系统将其运送到其他组织器官,发 挥系统性免疫作用 (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Eleftherianos et al., 2021)。20E 对先天免疫的调 节,既作用于昆虫的系统免疫(Systemic immunity), 也调节局部免疫 (Local immunity), 即通过某些局部器官或组织如中肠、表皮、马氏 管、气管中合成的 AMPs 产生的局部免疫反应。最 近的研究发现: 化蛹期的果蝇抗真菌基因 drosomycin (drs) 及其家族同系物成员 drosomycinlike 2 和 drosomycin-like 5 的表达显著增加, 蜕皮激 素信号调控脂肪体 drosomycin 和中肠 drosomycinlike 2 的表达 (Nunes et al., 2021)。果蝇胚胎气管 上皮中抗菌肽 drosocin 的表达同样需要 20E 信号 (Tan et al., 2014)。家蚕由幼虫向蛹发育的变态 期中肠中的模式识别受体 (PRR) 和 AMPs 基因表 达上调 (Xu et al., 2012), Mai 等 (2017) 的研 究揭示中肠抗菌肽 lebocin 的表达上调受到 BmBR-C Z4 和 BmEts 的调控。

本研究表明 20E 诱导家蚕脂肪体抗菌肽 BmCeB6 的表达,调控 BmCeB6 表达的顺式元件存 在于5'上游启动子区 - 448 ~ -170 之间,该启动 子区域内存在的 BR-C 和 E74A 等结合位点是潜在 的调控因子。下一步将通过对该启动子区域做更 精细的截短和双荧光素酶活性分析,同时结合 EMSA 等方法获得 BmCecB6 应答 20E 的调控元件。

#### 参考文献 (References)

- Ahmed A, Martín D, Manetti AG, et al. Genomic structure and ecdysone regulation of the prophenoloxidase 1 gene in the malaria vector Anopheles gambiae [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 1999, 96 (26): 14795 – 14800.
- Aye TT, Shim JK, Rhee IK, et al. Upregulation of the immune protein gene hemolin in the epidermis during the wandering larval stage of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* [J]. J. Insect Physiol., 2008, 54 (8): 1301-1305.

Baehrecke EH. Steroid regulation of programmed cell death during

Drosophila development [J]. Cell Death Differ., 2000, 7 (11): 1057-1062.

- Becker T, Loch G, Beyer M, et al. FOXO dependent regulation of innate immune homeostasis [J]. Nature, 2010, 463 (7279): 369 – 373.
- Beckstead RB, Lam G, Thummel CS. The genomic response to 20 hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis [J]. *Genome Biol.*, 2005, 6 (12): R99.
- Benagiano M, Bianchi P, D'Elios MM, et al. Autoimmune diseases: Role of steroid hormones [J]. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol., 2019, 60: 24 – 34.
- Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, et al. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence – based quantitative real – time PCR experiments [J]. BMC Mol. Biol., 2010, 21 (11): 74.
- Cheng T, Zhao P, Liu C, et al. Structures, regulatory regions, and inductive expression patterns of antimicrobial peptide genes in the silkworm Bombyx mori [J]. Genomics, 2006, 87 (3): 356-65.
- Dimarcq JL, Imler JL, Lanot R, et al. Treatment of 1 (2) mbn Drosophila tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression [J]. Insect Biochem. Mol. Biol., 1997, 27 (10): 877-886.
- Eleftherianos I, Zhang W, Heryanto C, et al. Diversity of insect antimicrobial peptides and proteins – A functional perspective: A review [J]. Int. J. Biol. Macromol., 2021, 191: 277 – 287.
- Flatt T, Heyland A, Rus F, Porpiglia E, et al. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster* [J]. J. Exp. Biol., 2008, 211 (16): 2712 – 2724.
- Gordya NA, Nesin AP, Simonenko NP, et al. Regulation of antimicrobial peptide synthesis in the larvae of Calliphora vicina (Diptera, Calliphoridae): Dose dependent effect of ecdysteroids [J]. Zh. Evol. Biokhim. Fiziol., 2016, 52 (4): 264 269.
- Haine ER, Moret Y, Siva Jothy MT, et al. Antimicrobial defense and persistent infection in insects [J]. Science, 2008, 322 (5905): 1257 – 1259.
- Han P, Gong Q, Fan J, et al. 20-Hydroxyecdysone regulates the prophenoloxidase cascade to immunize Metarhizium anisopliae in Locusta migratoria [J]. Pest Manag. Sci., 2020, 6 (9): 3149 – 3158.
- Han P, Han J, Fan J, et al. 20-Hydroxyecdysone activates PGRP-SA mediated immune response in Locusta migratoria [J]. Dev. Comp. Immunol., 2017, 72: 128 – 139.
- Hossain MS, Liu Y, Zhou S, et al. 20-Hydroxyecdysone-induced transcriptional activity of FoxO upregulates brummer and acid lipase-1 and promotes lipolysis in Bombyx fat body [J]. Insect Biochem. Mol. Biol., 2013, 43 (9): 829-838.
- Karpac J, Younger A, Jasper H. Dynamic coordination of innate immune signaling and insulin signaling regulates systemic responses to localized DNA Damage [J]. *Developmental Cell*, 2011, 20 (6): 841-854.
- Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of Drosophila melanogaster [J]. Annu. Rev. Immunol., 2007, 25: 697-743.

- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults [J]. Cell, 1996, 86 (6): 973 – 983.
- Li K, Tian L, Guo Z, et al. 20-Hydroxyecdysone (20E) primary response gene E75 isoforms mediate steroidogenesis autoregulation and regulate developmental timing in *Bombyx* [J]. J. Biol. Chem., 2016, 291 (35): 18163 – 18175.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C (T)) method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402 – 408.
- Lu Y, Su F, Li Q, et al. Pattern recognition receptors in Drosophila immune responses [ J ]. Dev. Comp. Immunol., 2020, 102: 103468.
- Makarova O, Rodríguez-Rojas A, Eravci M, et al. Antimicrobial defence and persistent infection in insects revisited [J]. Philos. Trans. R. Soc. B, 2016, 371 (1695): 20150296.
- Mai T, Chen S, Lin X, et al. 20-hydroxyecdysone positively regulates the transcription of the antimicrobial peptide, lebocin, via BmEts and BmBR-C Z4 in the midgut of Bombyx mori during metamorphosis [J]. Dev. Comp. Immunol., 2017, 74: 10-18.
- Meister M, Richards G. Ecdysone and insect immunity: The maturation of the inducibility of the diptericin gene in *Drosophila* larvae [J]. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1996, 26 (2): 155-160.
- Nunes C, Koyama T, Sucena É. Co-option of immune effectors by the hormonal signalling system triggering metamorphosis in *Drosophila melanogaster* [J]. *PLoS Genet.*, 2021, 17 (11): e1009916.
- Regan JC, Brandão AS, Leitão AB, et al. Steroid hormone signaling is essential to regulate innate immune cells and fight bacterial infection in Drosophila [J]. PLoS Pathog., 2013, 9 (10): e1003720.
- Reynolds RA, Kwon H, Smith RC. 20-hydroxyecdysone primes innate immune responses that limit bacterial and malarial parasite survival in Anopheles gambiae [J]. mSphere, 2020, 5 (2): 1-12.
- Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, et al. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from Manduca sexta and Drosophila melanogaster [J]. Insect Biochem. Mol. Biol., 2003, 33 (12): 1327 - 1338.
- Roxström-Lindquist K, Assefaw-Redda Y, Rosinska K, et al. 20-Hydroxyecdysone indirectly regulates Hemolin gene expression in Hyalophora cecropia [J]. Insect Mol. Biol., 2005, 14 (6): 645 – 652.
- Rus F, Flatt T, Tong M, et al. Ecdysone triggered PGRP-LC expression controls Drosophila innate immunity [J]. EMBO J., 2013, 32 (11): 1626 - 1638.
- Sun W, Shen YH, Zhou LX, et al. Ecdysone titer determined by 3DE-3β-reductase enhances the immune response in the silkworm [J]. J. Immunol., 2016, 196 (4): 1646 - 1654.
- Tan KL, Vlisidou I, Wood W. Ecdysone mediates the development of immunity in the *Drosophila* embryo [J]. Curr. Biol., 2014, 24 (10): 1145 - 1152.
- Tian L, Guo E, Diao Y, et al. Genome-wide regulation of innate immunity by juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone in the

Bombyx fat body [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 549.

- Unckless RL, Rottschaefer SM, Lazzaro BP. The complex contributions of genetics and nutrition to immunity in *Drosophila melanogaster* [J]. *PLOS Genetics*, 2015, 11 (3): e1005030
- Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future [J]. Int Immunopharmacol., 2018, 59: 391-412.
- Wang JL, Chen L, Tang L, et al. 20-hydroxyecdysone transcriptionally regulates humoral immunity in the fat body of *Helicoverpa armigera* [J]. Insect Mol. Biol., 2014, 23 (6): 842-856.
- Wang Y, Zhang RN, Chen X, et al. Progress in the molecular mechanisms underlying the regulation of innate immunity by 20hydroxyecdysone in insects [J]. Acta Entomology Sinica, 2018, 61 (11): 1328-1339. [王远,张若男,陈雪,等. 20-羟基蜕 皮酮调控昆虫先天免疫的分子机制研究进展 [J]. 昆虫学报, 2018, 61 (11): 1328-1339]
- Xu Q, Lu A, Xiao G, et al. Transcriptional profiling of midgut immunity response and degeneration in the wandering silkworm, Bombyx mori [J]. PLoS ONE, 2012, 7 (8): e43769.

Yang L, Qiu LM, Fang Q, et al. Cellular and humoral immune

interactions between Drosophila and its parasitoids [J]. Insect Sci. , 2021, 5: 1208 - 1227.

- Yang W, Cheng T, Ye M, et al. Functional divergence among silkworm antimicrobial peptide paralogs by the activities of recombinant proteins and the induced expression profiles [J]. PLoS ONE, 2011, 6 (3): e18109.
- Zhang J, Yang W, Xu J, et al. Regulation of antimicrobial peptide genes via insulin-like signaling pathway in the silkworm Bombyx mori [J]. Insect Biochem. Mol. Biol., 2018, 103: 12-21.
- Zhang Z, Palli SR. Identification of a cis-regulatory element required for 20-hydroxyecdysone enhancement of antimicrobial peptide gene expression in *Drosophila melanogaster* [J]. *Insect Mol. Biol.*, 2009, 18 (5): 595-605.
- Zhu Z, Tong C, Qiu B, et al. 20E-mediated regulation of BmKr-h1 by BmKRP promotes oocyte maturation [J]. BMC Biol., 2021, 19 (1): 39.
- Zou Z, Wang Y, Jiang H. Manduca sexta prophenoloxidase activating proteinase-1 (PAP-1) gene: Organization, expression, and regulation by immune and hormonal signals [J]. Insect Biochem. Mol. Biol., 2005, 35 (6): 627 – 36.