

昆虫基质金属蛋白酶研究进展

陈康康, 张一强, 朱前明, 唐 泰, 王迎娟, 冯从经*

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 经过长期的进化, 昆虫已形成了完善的变态发育和天然免疫机制以适应自然界环境变化。在昆虫变态发育和免疫过程中产生的冗余蛋白质和瞬时蛋白质需要及时地降解, 以保证变态发育和免疫反应的平衡。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases, MMPs)是一类能够降解基底膜和胞外基质中多数蛋白质的蛋白水解酶, 也是一类参与昆虫变态发育和天然免疫调节的重要锌离子依赖型蛋白酶。MMPs 可降解关键的胞外基质和肽类激素, 参与变态发育过程中的组织重构及天然免疫反应强度的调节。本文重点综述了基质金属蛋白酶参与调控昆虫发育和免疫的功能, 并对昆虫基质金属蛋白酶研究中存在的问题、潜在的研究方向进行了探讨。

关键词: 昆虫; 基质金属蛋白酶; 细胞外基质; 发育; 天然免疫

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)12-1472-09

Matrix metalloproteases in insects

CHEN Kang-Kang, ZHANG Yi-Qiang, ZHU Qian-Ming, TANG Tai, WANG Ying-Juan, FENG Cong-Jing* (College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: Insects have formed developed metamorphosis and innate immunity system to adapt to the complex habitats during evolution. Some proteins produced in the process of metamorphosis and innate immunity in insects must be degraded in time, so that insects are capable of maintaining the homeostasis of development and immune responses. Matrix metalloproteases (MMPs) are Zn^{2+} -dependent proteases. MMPs can degrade most proteins in the basement membrane and extracellular matrix, and also are involved in the regulations of metamorphosis and innate immunity in insects. They participate in tissue remodeling and limitation of excessive immune responses through degradation of key extracellular matrix and peptide hormones. In this article, the functions of MMPs involved in regulation of metamorphosis and innate immunity were summarized, and the directions for further investigations were also discussed.

Key words: Insect; matrix metalloprotease; extracellular matrix; development; innate immunity

蛋白酶是水解蛋白质中肽键的酶, 按水解方式可分为内肽酶和外肽酶; 按作用位置可分为胞外蛋白酶和胞内蛋白酶。蛋白酶在生命体中具有多重功能, 例如取食的蛋白质经蛋白酶降解后可提供昆虫生长发育所必需的氨基酸(Bown *et al.*, 2004), 参与昆虫变态发育和免疫反应调节(Lefebvre *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2015)。在昆虫体内存在多种蛋

白酶, 主要包括组织蛋白酶(cathepsin)家族、丝氨酸蛋白酶(serine proteases)家族、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases, MMPs)家族和半胱天冬蛋白酶(caspases)家族。在昆虫胚胎发育和变态发育过程中, 其形态和构造发生明显的变化, 需要大量蛋白酶参与体内旧组织的降解和新组织重构(Liu *et al.*, 2006)。对昆虫蛋白酶进行研究有许多重要的科

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471817, 31171895)

作者简介: 陈康康, 男, 1987年11月生, 河南开封人, 讲师, 研究方向为昆虫生理生化与分子生物学, E-mail: chen kangkang@yzu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: fengcj@yzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-05-31; 接受日期 Accepted: 2018-07-28

学意义和应用前景,比如对昆虫滞育卵的处理、开发杀卵剂或胚胎发育抑制剂等用于农业害虫的防治。

1 基质金属蛋白酶研究概述

MMPs 是一类维持细胞外基质正常结构及功能所必需的蛋白水解酶,负责新陈代谢和组织重构,广布于动植物界、细菌、病毒和寄生虫,几乎能降解所有的细胞外基质成分和肽类激素 (Page-McCaw *et al.*, 2007; Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010; Beton *et al.*, 2012)。MMPs 家族是昆虫蛋白酶家族重要成员,是细胞分泌的 Zn^{2+} 依赖金属内肽酶的总称,也是降解胞外基质的最重要蛋白酶之一。因其活性依赖 Zn^{2+} 并能够降解细胞外基质,诸如胶原蛋白、粘连蛋白、纤维粘连蛋白、弹性蛋白及蛋白聚糖等 (Mott and Werb, 2004; Frantz *et al.*, 2010) 而得名。而细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是由细胞分泌的生物大分子粘着蛋白、结构蛋白及蛋白聚糖三大成分组成的动态变化的复杂网架结构,可为周围细胞提供物理和生化反应的支撑,是哺乳动物肿瘤转移的重要屏障 (Daley *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2016)。MMPs 可调控 ECM 的动态重构,并可参与伤口的修复 (Ravanti and Kahari, 2000; Steffensen *et al.*, 2001)。

在哺乳动物中, MMPs 家族主要参与组织的构建和修复 (Page-McCaw *et al.*, 2007), 在人体内发现 MMPs 与肿瘤迁移有关,在人体多种病理的检测中发现 MMPs 大量表达,且发现 MMPs 的异常表达可导致许多疾病的发生,因而受到广泛关注 (Ravanti and Kahari, 2000)。MMPs 在降解细胞质基质的同时,可释放出原本为细胞质基质所束缚的蛋白,这些被释放出来的蛋白则可充分发挥其功能,例如,原本受到 LAP (latency-associated peptide) 束缚的转化生长因子 $\text{TGF-}\beta$, 在 MMPs 降解 LAP 后可释放出 $\text{TGF-}\beta$ (Tam *et al.*, 2004)。除可降解细胞外基质外, MMPs 还可作用于趋化因子、抗菌肽、细胞因子及生长因子等,使其生物活性及作用位点改变,改变它们在生物体中的功能 (McQuibban *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 2007; Dean and Overall, 2007; Cox *et al.*, 2008; Kleifeld *et al.*, 2010)。另外, MMPs 也可降解细胞膜受体的胞外区段,改变细胞膜受体对信号的接收能力 (Tam *et al.*, 2004; Butler *et al.*, 2008)。在哺乳动物体内, MMPs 种类多且关系复杂, MMPs 间的功能存在相互影响,很难研究其相互作用机理。因此,

许多学者已在遗传背景相对简单、清晰的模式生物中开展了许多 MMPs 家族成员功能的研究。除了哺乳动物外,无脊椎动物也被作为模式动物用于 MMPs 的研究,如非洲爪蛙 *Xenopus laevis*、海胆 *Strongylocentrotus purpuratus*、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*、水螅 *Hydra*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、大蜡螟 *Galleria mellonella*、烟草天蛾 *Manduca sexta* 及家蚕 *Bombyx mori* 等 (Griesch *et al.*, 2000; Leontovich *et al.*, 2000; Llano *et al.*, 2000; Vishnuvardhan *et al.*, 2013)。这些在模式生物尤其是昆虫中的 MMPs 研究大大增加了我们对 MMPs 结构、分类及其在发育和免疫应答中功能的认知。

2 基质金属蛋白酶的结构

在结构上, MMPs 具有高度同源性。MMPs 家族蛋白一般由信号肽、前肽区 (pro-peptide)、ZnMc 催化活性区、铰链区与 C 末端类血色素结合蛋白区 (C-terminal hemopexin-like domain) 和跨膜区等结构中的 4~5 个组成 (图 1)。其中,酶催化活性区和前肽区具有高度保守性 (de Coignac *et al.*, 2000); 信号肽疏水区负责引导翻译后的 MMPs 转运至胞外或细胞膜上。MMPs 合成后由前肽区维持其酶原状态,前肽区存在于每一种 MMPs 中,由约 80 个氨基酸组成,大多数具有 $\text{PR}\boxed{\text{C}}\text{G}(\text{V/N})\text{PD}$ 序列,且该保守序列中的半胱氨酸残基 (方框标记的“C”) 被称为“半胱氨酸开关” (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1999)。当 $\boxed{\text{C}}$ 被外源酶切断后, MMPs 由酶原形式转变为活化状态。ZnMc 催化活性区存在于每一种 MMPs 中,一般由含有一个保守的 Zn^{2+} 结合序列 “ HExxHxxGxxH ” (Bode *et al.*, 1993), Zn^{2+} 可以与该序列中的 3 个组氨酸结合;而在酶原状态下, Zn^{2+} 与前肽区中“半胱氨酸开关”的巯基结合,维持 MMPs 酶原状态 (Springman *et al.*, 1990; Parks *et al.*, 2004)。但 MMPs 由酶原形式转变为活化状态前的激活机制尚不清楚。铰链区富含脯氨酸,位于 ZnMc 催化区和类血色素结合蛋白区之间,以二硫键形式与类血色素结合蛋白区相连。类血色素结合蛋白区由 4 个保守的类血色素结合蛋白结构域组成,其功能与 MMPs 底物特异性有关 (Murawaki *et al.*, 1999), 同时在 MMPs 与 MMPs 抑制剂 (tissue inhibitor of MMPs, TIMP) 的结合过程中起重要作用 (Zhu and Woessner, 1991)。跨膜区存在于膜型 MMPs



图1 典型基质金属蛋白酶结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of archetypal matrix metalloprotease structure

SP: 信号肽 Signal peptide; Pro: 前肽区 Pro-peptide; ZnMc: ZnMc 催化活性区 Zinc ion catalytic domain; Hinge: 富含脯氨酸的铰链区 Proline-rich hinge region; HX: 类血红素结合蛋白区 Hemopexin-like domain.

(memberane-type MMP, MT-MMPs)中,其作用是将MT-MMPs 固定于细胞膜。虽然 MMPs 结构上有不同的形式,但所有的 MMPs 都有含有保守的前肽区和 ZnMc 催化活性区。MMPs 成员在结构上具有保守性,但 MMPs 具有上述保守结构的基础上仍各有特点,这使得其分类方式多样化。

昆虫 MMPs 家族与哺乳动物 MMPs 家族在典型结构上保持一致(图1),但昆虫 MMPs 家族结构特征更趋向于 MMPs 典型结构;而哺乳动物 MMPs 家族成员的结构在典型结构的基础上结构域排布变化较多,使得哺乳动物 MMPs 家族成员可参与更多的生物学过程。对昆虫 MMPs 结构分析发现果蝇、烟草天蛾、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、大蜡螟、家蚕和黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* 等 MMPs 多数具有信号肽、前肽区、ZnMc 催化活性区、铰链区与类血红素结合蛋白区。但有些哺乳动物 MMPs 结构排布变化较大,例如结构最简单的人类 MMP-7 及 MMP-26 仅具有前肽区和催化结构域两个保守区域(Burke, 2004; Gruber *et al.*, 2012);MMP-2 和 MMP-9 具有可以结合明胶的3个重复的纤粘蛋白样模体;MMP-23 的铰链区和类血红素结合蛋白区变为半胱氨酸富集区和一个免疫球蛋白类似区,这一结构域的变化使 MMP-23 成为潜在的黑色素瘤免疫抑制靶标,也成为了黑色素瘤免疫疗法的生物靶标(Galea *et al.*, 2014; Moogk *et al.*, 2014)。这些哺乳动物 MMPs 结构域的细微变化为其行使更多的生物学功能奠定了基础,这也是哺乳动物中 MMPs 种类繁多的重要原因。

3 基质金属蛋白酶的分类

自1962年发现第一种间质胶原酶MMP-1以来(Gross and Lapiere, 1962),已有大量的MMPs 家族成员被研究。目前,MMPs 的分类依据有3种:一种依据为底物,一种依据为定位,还有一种依据为结构域排布方式(表1)。根据作用底物的不同,MMPs 被分为5大类(Nelson *et al.*, 2000; Lohi *et al.*, 2001):第1类,胶原酶(collagenases),包括间质胶原酶(MMP-1)、多形核胶原酶(MMP-8)、MMP-13,它们的作用底物主要为间质胶原;第2类,明胶酶(gelatinases),又被称为IV型胶原酶,包括明胶酶A(MMP-2)和明胶酶B(MMP-9),其作用底物主要是IV型胶原和明胶;第3类,基质溶素/间质溶解酶(stromelysins),包括基质溶素-1(MMP-3)、基质溶素-2(MMP-10)和基质溶素-3(MMP-11),其作用底物主要为基质中的蛋白多糖和糖蛋白,如层粘连蛋白(laminin, LN)、纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)等;第4类,膜型金属蛋白酶(MT-MMPs),是MMPs 的受体,同时也是MMPs 的激活剂,MT-MMPs 定位于肿瘤细胞及其基质成纤维细胞的细胞膜上,可降解I、II和IV型胶原以及FN;第5类,其他MMPs,如Matrilysin(MMP-7)、Macrophage elastase(MMP-12)、CA-MMP(MMP-23)、釉质溶解素(MMP-20)、RASI-1(MMP-19)等。虽然各种MMPs 都具有一定的底物特异性,但这并不是绝对的。有些MMPs 会降解多种细胞外基质成分,但一种细胞外基质成分

表1 基质金属蛋白酶分类

Table 1 Classification of matrix metalloproteases

分类依据 Basis of classification	MMPs 分类 Classification of MMPs	参考文献 References
作用底物 Substrate	胶原酶(Collagenases), 明胶酶(Gelatinases), 基质溶素/间质溶解酶(Stromelysins), 膜型金属蛋白酶(Membrane type-MMPs, MT-MMPs), 其他 Others	Nelson <i>et al.</i> , 2000; Lohi <i>et al.</i> , 2001
定位 Localization	分泌性 MMPs (Secreted MMPs), 膜锚定 MMPs (Membrane-anchored MMPs)	Kessenbrock <i>et al.</i> , 2010
结构域排布 Arrangement of domains	典型 MMPs (Archetypal MMPs), 基质溶解素(Matrilysins), 明胶酶(Gelatinases), 弗林蛋白酶激活型 MMPs (Furin-activatable MMPs)	Fanjul-Fernandez <i>et al.</i> , 2010

又可被多种 MMPs 降解,但是不同酶的降解效率不同。根据 MMPs 结构特征和定位可将 MMPs 分为分泌性 MMPs 和膜锚定型 MMPs (Kessenbrock *et al.*, 2010)。根据 MMPs 结构域的排布方式,MMPs 可分为典型 MMPs (archetypal MMPs)、基质溶解素 (matrilysins)、明胶酶 (gelatinases) 和弗林蛋白酶激活型 MMPs (furin-activatable MMPs) (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010)。

4 昆虫基质金属蛋白酶的功能

与庞大的哺乳动物 MMPs 家族相比,每种昆虫一般仅有不超过 3 种 MMPs。因此,在研究 MMPs 在昆虫中的功能时,通过 RNA 干扰敲除部分或全部 MMP 基因更易达到精准研究的目的。在对哺乳动物研究中发现 MMPs 除了具有组织重构功能以外,还可参与多种机制的调节,例如借助其对生长因子、表面受体、细胞因子等的蛋白水解作用改变机体对信号的接受等能力,进而调节生长、发育等过程。哺乳动物 MMPs 家族种类多、功能复杂,在哺乳动物中

MMPs 可参与组织重塑和器官发育等。例如:缺失 MMP-2 的小鼠头骨出现畸形,生长发育缓慢;MMP-9 可降解 ECM,同时也诱导血管生成,并可促进释放胰岛素样生长因子 (Egeblad and Werb, 2002),而缺失 MMP-9 的小鼠长骨发育迟缓,且骨骼生长板中的血管发育不全,并导致成年后长骨的长度显著短于正常小鼠的长骨 (Vu *et al.*, 1998; Colnot *et al.*, 2003; Mosig *et al.*, 2007)。这些结果表明 MMPs 可以起到维持哺乳动物正常发育的作用,而缺失 MMPs 的个体则出现发育缓慢、畸形等现象。但这些敲除 MMP 基因的实验并不能排除与之起相同功能的其他 MMP 基因的影响,这些可能与哺乳动物 MMPs 种类多、功能和调控机制错综复杂有关。这也同时严重限制了以某个 MMP 为靶点全面研究该 MMP 功能实验的开展。近年来,随着测序技术和研究手段的快速发展,以及得益于昆虫具有的繁殖快、遗传背景清楚、组织器官易研究、天然免疫系统简单等优点,研究者逐渐以果蝇、大蜡螟、赤拟谷盗 *T. castaneum*、烟草天蛾和家蚕等为模式生物,解析 MMPs 家族在昆虫发育和天然免疫系统中的潜在功能(表 2)。

表 2 昆虫金属蛋白酶功能
Table 2 Functions of insect MMPs

物种 Species	蛋白名称 Protein name	功能 Functions	参考文献 References
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	MMP-1	参与果蝇中枢神经系统的发育;蛹期发育和幼虫气管生长内部组织变化所必需;脂肪体解离;肿瘤细胞扩散。	Srivastava <i>et al.</i> , 2007; Glasheen <i>et al.</i> , 2009; Zheng <i>et al.</i> , 2016, 2017; Jia <i>et al.</i> , 2017
	MMP-2	蛋白水解活性;参与眼和神经组织的发育;变态发育;抑制成虫感觉神经元的树突再生;脂肪体解离;促进排卵和黄体的形成。	Jia <i>et al.</i> , 2014, 2017; Deady <i>et al.</i> , 2015; Zheng <i>et al.</i> , 2016; DeVault <i>et al.</i> , 2018
大蜡螟 <i>Galleria mellonella</i>	MMP-1	基底膜的降解;响应 LPS 感染,参与天然免疫反应调节和变态发育调控的双重功能。	Altincicek and Vilcinskas, 2008
赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	MMP-1	维持触角、复眼、翅、足和头部正常发育;抵御白僵菌的侵染。	Knorr <i>et al.</i> , 2009
	MMP-2	维持肠道正常发育。	Knorr <i>et al.</i> , 2009
烟草天蛾 <i>Manduca sexta</i>	MMP-1	分解明胶,参与蜕皮,保证正常发育。	Vishnuvardhan <i>et al.</i> , 2013
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	MMP-1	降解基底膜,参与变态发育,翅芽的发育;维持气管和发育速度;参与 BmNPV 的增殖,参与家蚕天然免疫反应。	Liu, 2017; Kawasaki <i>et al.</i> , 2018
	MMP-2	降解基底膜,参与变态发育,翅芽的发育;参与调控发育、生存活、交配、卵的发育、马氏管发育等;参与 BmNPV 的增殖,参与家蚕天然免疫反应。	Liu, 2017; Kawasaki <i>et al.</i> , 2018
	MMP-3	参与体躯大小的控制;维持正常发育和生存活力,参与雌蛾产卵;参与 BmNPV 的增殖,参与家蚕天然免疫反应。	刘太行, 2017

4.1 MMPs 在昆虫发育过程中的功能

以果蝇作为模式生物进行 MMPs 研究,Llano 等 (2000) 克隆、鉴定得到黑腹果蝇的第 1 个 MMP 基

因 *Dm1-MMP* (MMP-1 基因),该基因可编码 541 个氨基酸,含有脊椎动物 MMPs 特征结构域和一个信号肽序列(图 1)。通过 Northern 杂交发现,*Dm1-MMP*

在胚胎发生时 10–22 h 的时期表达量较高,而后减少。原位杂交结果显示 *Dm1-MMP* 在胚胎发育期细胞簇中线区域表达,由此推测 *Dm1-MMP* 可参与果蝇中枢神经系统的发育。与脊椎动物 MMPs 活性相似,重组表达的 *Dm1-MMP* 具有蛋白水解酶活性,并可降解 ECM 和大部分基底膜蛋白 (Llano *et al.*, 2000)。为进一步研究果蝇 MMPs 的功能, Llano 等 (2002) 克隆、鉴定得到黑腹果蝇的第 2 个 MMP 基因 *Dm2-MMP* (MMP-2 基因), *Dm2-MMP* 定位于细胞表面、具有蛋白水解活性。与 *Dm1-MMP* 不同, *Dm2-MMP* 在各发育阶段表达水平较低,但在脑及眼的成虫盘表达水平非常高,推测 *Dm2-MMP* 可通过降解和重构 ECM 成分在眼的发育和神经组织发育中起重要作用 (Llano *et al.*, 2002)。随后在果蝇 *Dm1-MMP* 和 *Dm2-MMP* 突变体实验中发现, *Dm1-MMP* 突变体在化蛹时的头部外翻和幼虫气管生长有缺陷,表明 *Dm1-MMP* 为蛹期发育和幼虫气管生长内部组织变化所必需 (Glasheen *et al.*, 2009); *Dm2-MMP* 突变体在变态发育中的组织溶解及重构有缺陷,表明 *Dm2-MMP* 是变态发育过程中所必需的蛋白酶 (Page-McCaw *et al.*, 2003)。随后研究发现果蝇的 MMPs 在胚胎发育中可参与神经系统的发育:果蝇成虫具有的树突再生能力随着衰老逐渐减弱,而来自于表皮的 *Dm2-MMP* 能够抑制果蝇成虫感觉神经元的树突再生 (DeVault *et al.*, 2018); MMPs 能够清理掉断裂的树突,参与树突的重塑 (Kaczmarek *et al.*, 2002), 与小鼠 MMP-9 参与正常生理过程的可塑性结果相吻合 (Bozdagi *et al.*, 2007)。

昆虫脂肪体是由单层或多层细胞构成的细胞间的紧密连接形成的组织,其外围由基膜包裹 (Hoshizaki, 2005)。在果蝇变态发育中, MMP-1 和 MMP2 可协同参与脂肪体层状细胞梯度解离,形成单细胞,在这一解离过程中, MMP1 主要负责打断 DE 型钙粘附蛋白介导的脂肪体细胞间连接,而 MMP2 主要负责降解基底膜成分进而打断脂肪体细胞间的连接,同时还发现蜕皮信号和保幼激素信号可通过 MMPs 参与脂肪体的解离 (Nelliot *et al.*, 2006; Bond *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2014, 2017; Zheng *et al.*, 2016, 2017)。昆虫排卵是繁殖成功的关键一步, Deady 等人发现果蝇 MMP-2 在黄体细胞和成熟卵泡中表达量较高,能够促进果蝇的排卵和黄体的形成 (Deady *et al.*, 2015)。虽然 *Dm1-MMP* 在胚胎中大量表达 (Llano *et al.*, 2000), 但 MMPs 在

果蝇的胚胎发育中作用非常微弱。上述研究表明果蝇 MMPs 可能与果蝇后期发育中的组织降解和重构及神经发育和生殖有关。

果蝇 MMPs 可与哺乳动物的 MMPs 一样通过降解基底膜成分促进肿瘤细胞转移 (Egeblad and Werb, 2002)。将带有肿瘤的脑组织及成虫盘碎片植入果蝇腹部后,发现 MMP-1 使肿瘤细胞获得侵袭转移的能力,并发现 MMP-1 在肿瘤组织处大量表达,而过表达 MMP 抑制因子 TIMP 可抑制肿瘤细胞侵袭。而敲除 *MMP-1* 和 *MMP-2* 后发现果蝇肿瘤细胞失去侵袭能力 (Uhlirva and Bohmann, 2006; Beaucher *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2007)。这些结果表明 MMPs 可参与肿瘤细胞的转移扩散,但尚不清楚调控 MMPs 参与肿瘤细胞转移扩散作用的具体机制。

MMPs 在其他昆虫的发育过程中也扮演着重要角色。在昆虫中第 3 个被鉴定出来的 MMP 是大蜡螟的 *Gm1-MMP*, 研究发现该 MMP 在变态发育和天然免疫反应中扮演多重角色。昆虫中 IV 型胶原是唯一的胶原类型,也是一种重要的基底膜蛋白,研究发现大蜡螟中的 *Gm1-MMP* 可增强 IV 型胶原的降解,说明 *Gm1-MMP* 可参与基底膜的降解 (Altincicek and Vilcinskas, 2008), 这也是鳞翅目昆虫中鉴定出来的第一种 MMP。大蜡螟化蛹后 *Gm1-MMP* 表达量显著增高,而在受到 LPS 感染后可以增强血细胞中 *Gm1-MMP* 的表达,进而增加 *Gm1-MMP* 对 IV 型胶原的降解能力,但 MMP 抑制剂 GM6001 可以显著抑制 *Gm1-MMP* 对 IV 型胶原的降解 (Altincicek and Vilcinskas, 2008)。这些结果表明大蜡螟 *Gm1-MMP* 可以参与其发育和免疫反应。在赤拟谷盗基因组中鉴定出来 3 个 MMP 基因,通过 RNAi 干扰掉 *MMP-1* 后赤拟谷盗的触角、复眼、翅、足和头部不能正常发育,更为有趣的是干扰父本 *MMP-1* 可导致幼虫气管发育缺陷,干扰父本 *MMP-2* 所产后代幼虫肠道发育不正常 (Knorr *et al.*, 2009)。这些实验结果表明 MMPs 在赤拟谷盗胚胎发育过程中具有维持正常发育的功能,这一点与 MMPs 在果蝇胚胎发育中的作用不同。在蜕皮过程中烟草天蛾 *MMP-1* 的表达量上升 10 倍,并且伴随着蛋白表达水平和明胶分解活力的上升;当注射 MMPs 广谱抑制剂时,烟草天蛾幼虫发育延迟,且生长速度减缓 (Vishnuvardhan *et al.*, 2013)。

在鳞翅目昆虫家蚕基因组中,已鉴定出 3 种 MMPs,分别为 MMP-1 (有 a 和 b 两个可变剪切体)、

MMP-2 和 MMP-3,且结构分析发现这些 MMPs 均含有 MMPs 典型结构(图 1)。同时研究发现与正常品系家蚕相比,过表达 *BmMMP-3* 的家蚕幼虫体型变大并且体重增加;而在过表达 *BmTIMP* 的家蚕幼虫发育缓慢,出现死亡和不能正常上簇等现象。同时,刘太行(2017)在利用转基因技术将家蚕 3 个 MMP 基因特异性敲除的家蚕品系中发现,敲除 MMP 基因的家蚕发育迟缓,在幼虫或蛹期死亡,在成虫期生存活力低、不能完成正常交配,且可导致家蚕气管、下颚、卵及马氏管等的发育出现异常。在家蚕变态发育过程中,20-羟基蜕皮酮可显著诱导翅芽中的 *MMP-1* 和 *MMP-2* 表达,且两者可参与家蚕变态发育中基底膜的降解(Kawasaki *et al.*, 2018)。以上结果表明 MMPs 在昆虫的正常发育过程中是必不可少的。

4.2 MMPs 在昆虫免疫系统中的功能

在生物体中,MMPs 时刻动态变化地存在着,少量的 MMPs 可促进免疫应答,但过量 MMPs 则导致机体受损(Loffek *et al.*, 2011)。家蚕在感染家蚕核型多角体病毒(*BmNPV*)、LPS 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 后,家蚕细胞系和体内中肠、血细胞及脂肪体中的 *BmMMP* 基因均显著上调表达,这与 LPS 可诱导家蚕 *MMP-1* 转录本 *MMPV1* 和 *MMPV2* 上调表达结果一致(管京敏等, 2009)。这些结果表明 *BmMMPs* 可参与家蚕天然免疫反应。体外细胞水平实验发现,在家蚕细胞系 *BmNS-SWU1* 中过表达 MMP 基因,可显著增强 *BmNPV* 的增殖,而敲除 *BmMMP* 基因则可显著抑制 *BmNPV* 的增殖,表明 *BmMMPs* 可调控 *BmNPV* 的增殖。在家蚕的体内实验发现过表达 *BmMMP3* 的家蚕品系可显著增强 *BmNPV* 的增殖;而利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 MMP 基因的家蚕品系中 *BmNPV* 的增殖受到抑制。这些结果表明 *BmMMPs* 有利于 *BmNPV* 的增殖,降低家蚕对 *BmNPV* 的抵抗力,并导致家蚕死亡率上升。同时,通过双荧光共定位、免疫共沉淀实验以及荧光双分子互补实验研究 *BmMMPs* 与 *BmTIMP* 之间的相互作用,发现 *BmTIMP* 能够直接与 *BmMMPs* 结合,进而抑制 *BmMMPs* 的活性;在细胞水平过表达 *BmMMP* 基因并敲除 *BmTIMP* 可增强 *BmNPV* 的增殖;反之,敲除 *BmMMP* 基因并过表达 *BmTIMP* 可显著抑制 *BmNPV* 的增殖(刘太行, 2017)。这些在家蚕中的 MMPs 和 TIMP 实验数据非常系统地揭示了 MMPs 在应对病原微生物感染过程中所起到的作用,可为研究其他昆虫 MMPs 参与

调节免疫系统的功能研究提供参考,也为新型农药靶标的筛选及利用转基因技术防治害虫提供理论依据。

在赤拟谷盗中,MMP-1 有利于抵御球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 的侵染,而球孢白僵菌感染赤拟谷盗幼虫时,干扰掉 *MMP-1* 的赤拟谷盗死亡率显著高于对照组,而干扰 *MMP-2* 和 *MMP-3* 对赤拟谷盗的存活率没有影响(Knorr *et al.*, 2009)。这些数据表明 *MMP-1* 在赤拟谷盗的免疫系统中起着关键的作用,但 *MMP-1* 参与赤拟谷盗免疫系统的机制仍未研究清楚。LPS 刺激大蜡螟幼虫后,发现血淋巴中 IV 型胶原被降解,而 Gml-MMP 表达量明显升高。在对大蜡螟幼虫向蛹期变态发育的研究中发现 Gml-MMP 会随着细胞外基质降解,同时表达量急剧增加(Altincicek and Vilcinskis, 2008),由此推测 Gml-MMP 在大蜡螟中具有参与天然免疫反应调节和变态发育调控的双重功能。

5 小结与展望

MMPs 的主要功能是通过降解细胞外基质及基底膜蛋白质的降解,参与昆虫变态发育的组织重构及胚胎发育和免疫系统调节(表 2)。本文介绍了基质金属蛋白酶的结构、分类,揭示 MMPs 可以维持昆虫正常的发育,并有利于昆虫免疫系统抵御外源生物的侵染,但关于 MMPs 的功能研究仍有很多值得探索之处。

5.1 MMPs 参与调节昆虫发育和天然免疫系统的分子机制仍不清楚

在本文中,我们对 MMPs 参与昆虫发育及免疫反应调节的研究进行了综述,但目前昆虫 MMPs 参与调节两者的研究还聚焦在功能上面。文中所述的昆虫 MMPs 研究主要是通过 RNA 干扰、抑制剂处理及过表达等技术改变 MMPs 的转录或酶活情况,进而通过观察组织、器官及表型变化和死亡率统计等手段,研究 MMPs 在昆虫发育和免疫系统中的功能。尽管有研究表明 MMPs 可能是通过将原本束缚在细胞质基质或基底膜上的蛋白释放出来,进而间接参与发育的调控(Tam *et al.*, 2004),但具体的相互作用蛋白仍未被鉴定,其相互作用分子机制理也不清楚。这些研究并未找到 MMPs 参与两者调节的切入点,仅仅观察到 MMPs 可以参与两者的调控,鉴定 MMPs 相互作用蛋白并对 MMPs 参与两者调控的具体分子机制仍需进一步研究。因此,以 MMPs 为组

带研究昆虫发育和免疫之间的关系将是非常有价值的研究方向。

5.2 昆虫 MMPs 活化机制尚不明晰

MMPs 是以酶原形式存在的,通过 MMPs 的结构分析发现当前肽区保守序列 PR[C]G(V/N)PD 中的“半胱氨酸开关”[C] (Kleiner and Stetler-Stevenson, 1999)被外源酶切断后,MMPs 由酶原形式转变为活化状态;但是由于 MMPs 家族有多种 MMPs,因此负责切断 PR[C]G(V/N)PD 序列“半胱氨酸开关”的蛋白酶是否具有特异性值得我们深入研究。在大鼠中,注射组织蛋白酶 Cathepsins B 抑制剂 E64D 可以显著抑制大鼠 MMP-9 的活性,表明 Cathepsins B 可直接激活 MMPs (Tsubokawa *et al.*, 2006),体外实验发现重组的 Cathepsins K 也可直接剪切激活 MMP-9 (Christensen and Shastri, 2015);同时发现 Cathepsins B 和 Cathepsins L 还可能通过纤溶酶(plasmin)激活 MMPs (Rao, 2003; Gocheva and Joyce, 2007),但在昆虫中还没相关报道。另外,负责 MMPs 酶原剪切的蛋白酶是如何获得 MMPs 需要剪切激活的信号? MMPs 间是否会相互影响?这些都是尚需解决的问题。

5.3 以昆虫 MMPs 为靶标可为肿瘤治疗提供理论支持

MMPs 是降解 ECM 的降解酶体系,在哺乳动物中 MMPs 可参与调控肿瘤相关的细胞行为,如细胞的生长、分化、凋亡、迁移以及浸润,且与肿瘤发生有关(Daley *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2016)。因此,以 MMPs 作为治疗靶标,筛选抑制 MMPs 的药物成为肿瘤治疗的热点。与哺乳动物的二十几种 MMPs 相比,昆虫 MMPs 种类少,且昆虫中基因的干扰、敲除、过表达、基因编辑等技术成熟、易操作,将哺乳动物肿瘤研究嫁接到昆虫上进行研究是肿瘤研究的一个新方法。MMPs 具有调节发育和调控免疫反应的双重功能,全面剖析 MMPs 激活机制将打开研究昆虫发育及免疫调控机制研究的崭新大门,对以 MMPs 为靶标进行的肿瘤治疗和害虫防治具有重大的指导意义。

参考文献 (References)

- Altincicek B, Vilcinskas A, 2008. Identification of a lepidopteran matrix metalloproteinase with dual roles in metamorphosis and innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(4): 400–409.
- Beaucher M, Hersperger E, Page-McCaw A, Shearn A, 2007. Metastatic ability of *Drosophila* tumors depends on MMP activity. *Dev. Biol.*, 303(2): 625–634.
- Beton D, Guzzo CR, Ribeiro AF, Farah CS, Terra WR, 2012. The 3D structure and function of digestive cathepsin L-like proteinases of *Tenebrio molitor* larval midgut. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 42(9): 655–664.
- Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W, 1993. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’. *FEBS Lett.*, 331(1–2): 134–140.
- Bond ND, Nelliott A, Bernardo MK, Ayerh MA, Gorski KA, Hoshizaki DK, Woodard CT, 2011. ssFTZ-F1 and matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 360(2): 286–296.
- Bown DP, Wilkinson HS, Jongsma MA, Gatehouse JA, 2004. Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 34(4): 305–320.
- Bozdogi O, Nagy V, Kwei KT, Huntley GW, 2007. *In vivo* roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *J. Neurophysiol.*, 98(1): 334–344.
- Burke B, 2004. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *Immunobiology*, 209(1–2): 51–56.
- Butler GS, Dean RA, Tam EM, Overall CM, 2008. Pharmacoproteomics of a metalloproteinase hydroxamate inhibitor in breast cancer cells: dynamics of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated membrane protein shedding. *Mol. Cell Biol.*, 28(15): 4896–4914.
- Christensen J, Shastri VP, 2015. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. *BMC Res. Notes*, 8(1): 322.
- Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA, 2003. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*, 130(17): 4123–4133.
- Cox JH, Dean RA, Roberts CR, Overall CM, 2008. Matrix metalloproteinase processing of CXCL11/I-TAC results in loss of chemoattractant activity and altered glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.*, 283(28): 19389–19399.
- Daley WP, Peters SB, Larsen M, 2008. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J. Cell Sci.*, 121(3): 255–264.
- De Coignac AB, Elson G, Delneste Y, Magistrelli G, Jeannin P, Aubry JP, Berthier O, Schmitt D, Bonnefoy JY, Gauchat JF, 2000. Cloning of MMP-26. A novel matrilysin-like proteinase. *Eur. J. Biochem.*, 267(11): 3323–3329.
- Deady LD, Shen W, Mosure SA, Spradling AC, Sun J, 2015. Matrix metalloproteinase 2 is required for ovulation and corpus luteum formation in *Drosophila*. *PLoS Genet.*, 11(2): e1004989.
- Dean RA, Butler GS, Hamma-Kourbali Y, Delbé J, Brigstock DR, Courty J, Overall CM, 2007. Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-

- based proteomic screens; disruption of vascular endothelial growth factor (VEGF)/heparin affin regulatory peptide (pleiotrophin) and VEGF/connective tissue growth factor angiogenic inhibitory complexes by MMP-2 proteolysis. *Mol. Cell Biol.*, 27(24): 8454 – 8465.
- Dean RA, Overall CM, 2007. Proteomics discovery of metalloproteinase substrates in the cellular context by iTRAQ labeling reveals a diverse MMP-2 substrate degradome. *Mol. Cell Proteomics*, 6(4): 611 – 623.
- DeVault L, Li T, Isabel S, Thompson-Peer KL, Jan LY, Jan YN, 2018. Dendrite regeneration of adult *Drosophila* sensory neurons diminishes with aging and is inhibited by epidermal-derived matrix metalloproteinase 2. *Genes Dev.*, 32(5–6): 402 – 414.
- Egeblad M, Werb Z, 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 161 – 174.
- Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C, 2010. Matrix metalloproteinases; evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta*, 1803(1): 3 – 19.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM, 2010. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.*, 123(24): 4195 – 4200.
- Galea CA, Nguyen HM, George Chandy K, Smith BJ, Norton RS, 2014. Domain structure and function of matrix metalloprotease 23 (MMP23); role in potassium channel trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71(7): 1191 – 1210.
- Glasheen BM, Kabra AT, Page-McCaw A, 2009. Distinct functions for the catalytic and hemopexin domains of a *Drosophila* matrix metalloproteinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(8): 2659 – 2664.
- Gocheva V, Joyce JA, 2007. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle*, 6(1): 60 – 64.
- Griesch J, Wedde M, Vilcinskas A, 2000. Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30(6): 461 – 472.
- Gross J, Lapiere CM, 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues; a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48(6): 1014 – 1022.
- Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, Hanley EN Jr, 2012. Matrix metalloproteinase-26, a novel MMP, is constitutively expressed in the human intervertebral disc in vivo and in vitro. *Exp. Mol. Pathol.*, 92(1): 59 – 63.
- Guan JM, Li B, Wang D, Liu CL, Shen WD, 2009. Cloning, sequence analysis and expression of a matrix metalloproteinase gene (*Bm-MMP*) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 52(4): 353 – 362. [管京敏, 李兵, 王东, 刘村丽, 沈卫德, 2009. 家蚕基质金属蛋白酶基因 *Bm-MMP* 的克隆、序列分析及表达研究. 昆虫学报, 52(4): 353 – 362]
- Hoshizaki DK, 2005. Fat-cell development. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S eds. Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier B. V., Oxford. 315 – 345.
- Jia Q, Liu S, Wen D, Cheng Y, Bendena WG, Wang J, Li S, 2017. Juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone coordinately control the developmental timing of matrix metalloproteinase-induced fat body cell dissociation. *J. Biol. Chem.*, 292(52): 21504 – 21516.
- Jia Q, Liu Y, Liu H, Li S, 2014. Mmp1 and Mmp2 cooperatively induce *Drosophila* fat body cell dissociation with distinct roles. *Sci. Rep.*, 4: 7535.
- Kaczmarek L, Lapinska-Dzwonek J, Szymczak S, 2002. Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *EMBO J.*, 21(24): 6643 – 6648.
- Kawasaki H, Manickam A, Shahin R, Ote M, Iwanaga M, 2018. Expression of matrix metalloproteinase genes during basement membrane degradation in the metamorphosis of *Bombyx mori*. *Gene*, 638: 26 – 35.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z, 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141(1): 52 – 67.
- Kleifeld O, Doucet A, auf dem Keller U, Prudova A, Schilling O, Kainthan RK, Starr AE, Foster LJ, Kizhakkepathu JN, Overall CM, 2010. Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products. *Nat. Biotechnol.*, 28(3): 281 – 288.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG, 1999. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 43 (Suppl.): S42 – S51.
- Knorr E, Schmidtberg H, Vilcinskas A, Altincicek B, 2009. MMPs regulate both development and immunity in the *Tribolium* model insect. *PLoS ONE*, 4(3): e4751.
- Lefebvre C, Vandenbulcke F, Bocquet B, Tasiemski A, Desmons A, Verstraete M, Salzert M, Cocquerelle C, 2008. Cathepsin L and cystatin B gene expression discriminates immune coelomic cells in the leech *Theromyzon tessulatum*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(7): 795 – 807.
- Leontovich AA, Zhang J, Shimokawa K, Nagase H, Sarrajs MP Jr, 2000. A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process. *Development*, 127(4): 907 – 920.
- Liu J, Shi GP, Zhang WQ, Zhang GR, Xu WH, 2006. Cathepsin L function in insect moulting; molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol. Biol.*, 15(6): 823 – 834.
- Liu TH, 2017. Functional Analysis of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Silkworm, *Bombyx mori*. PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing. [刘太行, 2017. 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. 重庆: 西南大学博士学位论文]
- Llano E, Adam G, Pendas AM, Quesada V, Sanchez LM, Santamaria I, Noselli S, López-Otín C, 2002. Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.*, 277(26): 23321 – 23329.

- Llano E, Pendás AM, Aza-Blanc P, Kornberg TB, López-Otin C, 2000. Dml-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J. Biol. Chem.*, 275(46): 35978–35985.
- Löffek S, Schilling O, Franzke CW, 2011. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur. Respir. J.*, 38(1): 191–208.
- Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC, 2001. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. *J. Biol. Chem.*, 276(13): 10134–10144.
- McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM, 2000. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science*, 289(5482): 1202–1206.
- Moogk D, da Silva IP, Ma MW, Friedman EB, de Miera EV, Darvishian F, Scanlon P, Perez-Garcia A, Pavlick AC, Bhardwaj N, Christos PJ, Osman I, Krogsgaard M, 2014. Melanoma expression of matrix metalloproteinase-23 is associated with blunted tumor immunity and poor responses to immunotherapy. *J. Transl. Med.*, 12(1): 342.
- Mosig RA, Dowling O, DiFeo A, Ramirez MC, Parker IC, Abe E, Diouri J, Aqeel AA, Wylie JD, Oblander SA, Madri J, Bianco P, Apte SS, Zaidi M, Doty SB, Majeska RJ, Schaffler MB, Martignetti JA, 2007. Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Hum. Mol. Genet.*, 16(9): 1113–1123.
- Mott JD, Werb Z, 2004. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16(5): 558–564.
- Murawaki Y, Ikuta Y, Idobe Y, Kawasaki H, 1999. Serum matrix metalloproteinase-1 in patients with chronic viral hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 14(2): 138–145.
- Nelliot A, Bond N, Hoshizaki DK, 2006. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*. *Genesis*, 44(8): 396–400.
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM, 2000. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.*, 18(5): 1135–1149.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z, 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(3): 221–233.
- Page-McCaw A, Serano J, Sante JM, Rubin GM, 2003. *Drosophila* matrix metalloproteinases are required for tissue remodeling, but not embryonic development. *Dev. Cell*, 4(1): 95–106.
- Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS, 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 4(8): 617–629.
- Qin J, Zha GB, Yu J, Zhang HH, Yi S, 2016. Differential temporal expression of matrix metalloproteinases following sciatic nerve crush. *Neural Regen. Res.*, 11(7): 1165–1171.
- Rao JS, 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat. Rev. Cancer*, 3(7): 489–501.
- Ravanti L, Kahari VM, 2000. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int. J. Mol. Med.*, 6(4): 391–407.
- Shen JD, Cai QF, Yan LJ, Du CH, Liu GM, Su WJ, Ke C, Cao MJ, 2015. Cathepsin L is an immune-related protein in Pacific abalone (*Haliotis discushannai*) – purification and characterization. *Fish Shellfish Immunol.*, 47(2): 986–995.
- Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE, 1990. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a “cysteine switch” mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(1): 364–368.
- Srivastava A, Pastor-Pareja JC, Igaki T, Pagliarini R, Xu T, 2007. Basement membrane remodeling is essential for *Drosophila* disc eversion and tumor invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(8): 2721–2726.
- Steffensen B, Hakkinen L, Larjava H, 2001. Proteolytic events of wound-healing-coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 12(5): 373–398.
- Tam EM, Morrison CJ, Wu YI, Stack MS, Overall CM, 2004. Membrane protease proteomics: isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(18): 6917–6922.
- Tsubokawa T, Solaroglu I, Yatsushige H, Cahill J, Yata K, Zhang JH, 2006. Cathepsin and calpain inhibitor E64d attenuates matrix metalloproteinase-9 activity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 37(7): 1888–1894.
- Uhlirva M, Bohmann D, 2006. JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. *EMBO J.*, 25(22): 5294–5304.
- Vishnuvardhan S, Ahsan R, Jackson K, Iwanicki R, Boe J, Haring J, Greenlee KJ, 2013. Identification of a novel metalloproteinase and its role in juvenile development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (Linnaeus). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 320(2): 105–117.
- Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z, 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, 93(3): 411–422.
- Zheng H, Wang X, Guo P, Ge W, Yan Q, Gao W, Xi Y, Yang X, 2017. Premature remodeling of fat body and fat mobilization triggered by platelet-derived growth factor/VEGF receptor in *Drosophila*. *FASEB J.*, 31(5): 1964–1975.
- Zheng H, Yang X, Xi Y, 2016. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. *Life Sci.*, 167: 22–31.
- Zhu C, Woessner JF Jr, 1991. A tissue inhibitor of metalloproteinases and alpha-macroglobulins in the ovulating rat ovary: possible regulators of collagen matrix breakdown. *Biol. Reprod.*, 45(2): 334–342.