

主编按：近年来，几丁质农药的研究和产业化取得突破性进展，是新兴的未来农药。本期特约杨青教授组织国内顶尖的科学家专题论述几丁质农药的研究进展，以期为中国农药高质量发展贡献力量。

◆ 专论：几丁质农药(特约稿) ◆

## 几丁质酶及其抑制剂在农业防治中的研究进展

王 娜, 蒋志洋, 杨 澜, 韩 清, 师东梅, 陈锦绣, 张婧瑜, 段红霞\*

(中国农业大学理学院应用化学系, 农药创新中心, 北京 100193)

**摘要：**几丁质作为自然界中重要的结构多糖，广泛存在于真菌、昆虫、线虫等生物体中，但在高等植物和脊椎动物中并不存在。几丁质酶(EC3.2.1.14)通过催化几丁质中 $\beta$ -1,4-糖苷键的水解将几丁质降解为寡糖或单糖，在真菌细胞壁重塑、细菌营养循环代谢、昆虫蜕皮发育、线虫卵孵化等生理过程中发挥着关键作用。本文系统总结了真菌、细菌和昆虫等不同生物体内几丁质酶的晶体结构特征，重点聚焦于靶向亚洲玉米螟几丁质酶(*OjChtI*, *OjChtII*, *OjChi-h*)、秀丽隐杆线虫几丁质酶(*CeCht1*)和大豆胞囊线虫几丁质酶(*HgCht2*)的抑制剂研究进展，系统梳理了基于晶体结构解析、虚拟筛选、分子对接等现代药物设计策略发现的新型几丁质酶抑制剂，以期为靶向几丁质酶开发新型绿色病虫害防控剂提供参考。

**关键词：**几丁质酶；晶体结构；几丁质酶抑制剂；昆虫生长调节剂；病虫害防治

中图分类号：TQ 450 文献标志码：A doi:10.3969/j.issn.1671-5284.2025.04.001

### Research progress on chitinase and its inhibitors in agricultural pest control

WANG Na, JIANG Zhiyang, YANG Lan, HAN Qing, SHI Dongmei, CHEN Jinxiu, ZHANG Jingyu, DUAN Hongxia\*  
(Innovation Center of Pesticide Research, Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Chitin, an essential structural polysaccharide, is widely distributed in fungi, insects, nematodes, and other organisms, but is absent in higher plants and vertebrates. Chitinase (EC3.2.1.14) catalyzes the hydrolysis of  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds in chitin, and degrades it into oligosaccharides or monosaccharides, which plays a pivotal role in many physiological processes such as fungal cell wall remodeling, bacterial nutrient cycling, insect molting and development and nematode egg hatching. This review systematically summarized the crystal structural characteristics of chitinases across various organisms, including fungi, bacteria, and insects. It was particular focused on the inhibitor research progress targeting chitinases in Asian corn borer (*OjChtI*, *OjChtII*, *OjChi-h*), the nematode *Caenorhabditis elegans* (*CeCht1*), and the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*, *HgCht2*). It comprehensively delineated the discovery of novel chitinase inhibitors based on crystallographic structure analysis, virtual screening, and molecular docking et al., by employing modern drug design strategies. This review aimed to provide a reference for the development of novel, environmentally friendly pest control agents targeting chitinases.

**Key words:** chitinase; crystal structure; chitinase inhibitor; insect growth regulator; pest control

收稿日期：2025-07-13

基金项目：国家重点研发计划(2022YFD1700200)

作者简介：王娜,女,博士研究生。研究方向:新农药分子设计与创制。E-mail:15318146036@163.com

通信作者：段红霞,女,教授,博士生导师,主要从事靶标导向新农药分子设计与创制研究。E-mail:hxdxuan@cau.edu.cn

几丁质(chitin)是一种由 $N$ -乙酰葡萄糖胺( $N$ -acetylglucosamine, GlcNAc)通过 $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成的天然氨基多糖,是自然界中最丰富的氨基多糖之一,广泛存在于真菌、昆虫、线虫和其他生物(藻类或原生动物)中<sup>[1]</sup>。几丁质的分子排列方式为微纤维形式,由多条 $N$ -乙酰葡萄糖胺链通过氢键紧密结合。根据链的排列方向,几丁质可分为3种类型: $\alpha$ -几丁质(反平行、稳定,常见于昆虫外骨骼和真菌细胞壁) $\beta$ -几丁质(平行、松散,存在于海洋生物中) $\gamma$ -几丁质(平行与反平行混合、较少见,存在于特定昆虫结构)。

作为一种重要的结构多糖,几丁质的生物功能因生物种类的不同而异。在真菌中,几丁质作为细胞壁的主要成分,可以与 $\beta$ -葡聚糖构成细胞壁的网状结构,赋予细胞壁机械强度和弹性,维持菌丝形态和结构完整性,增强细胞壁对环境胁迫(如渗透压、病原菌侵染和氧化应激)的抵抗能力<sup>[2]</sup>。在昆虫中,几丁质是其外骨骼、翅膀和肠道内膜的主要成分,提供刚性和物理保护,抵御机械损伤和外界威胁,其肠道内膜的几丁质层还能够保护消化系统,防止病原菌的侵入;在昆虫蜕皮过程中,支持其表皮的重塑和生长发育<sup>[3]</sup>。在线虫中,几丁质是构成卵壳的核心组分,可以保护胚胎免受环境胁迫和病原体侵害,为胚胎发育提供物理支撑<sup>[4]</sup>。值得注意的是,几丁质在高等植物和脊椎动物中并不存在。

几丁质优异的生物功能为真菌、昆虫等的结构和生长发育提供了强力支持。然而,这种刚性结构也限制了真菌的菌丝分裂和昆虫的体型扩展,因此几丁质在生物体内需通过周期性代谢,包括合成与降解的动态平衡,来适应其生长、发育和环境的需求。从真菌到昆虫,几丁质的生物合成和代谢途径高度一致,涉及一系列的酶促反应,不同的是真菌中几丁质合成的起始底物通常为糖原,昆虫中则以海藻糖(trehalose)为底物<sup>[5]</sup>。本文以昆虫体内的几丁质生物合成及水解代谢为例<sup>[6]</sup>进行介绍(图1)。以海藻糖为底物,经海藻糖酶(TRE)、己糖激酶(HK)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(G6PI)、果糖-6-磷酸氨基转移酶(GFAT)、葡糖胺-6-磷酸- $N$ -乙酰转移酶(GNA)、磷酸乙酰氨基葡萄糖变位酶(PAGM)、UDP- $N$ -乙酰葡糖胺焦磷酸化酶(UAP)和几丁质合成酶(CHS)等多步酶促反应生成几丁质,随后几丁质酶(ChT)和 $\beta$ - $N$ -乙酰氨基葡萄糖苷酶(NAG)将几丁质水解为 $N$ -乙酰基葡萄糖(GlcNAc),其中部分单体经 $N$ -乙酰葡糖胺激酶循环利用,其余排出体外。几丁质酶通

过催化几丁质的降解与代谢平衡,在不同生物的关键生理过程中发挥着核心作用。因此,深入研究不同生物体内几丁质酶的结构和功能特性,为开发靶向真菌、昆虫和线虫的几丁质酶抑制剂用于农业病虫害的绿色防控提供了关键理论依据。

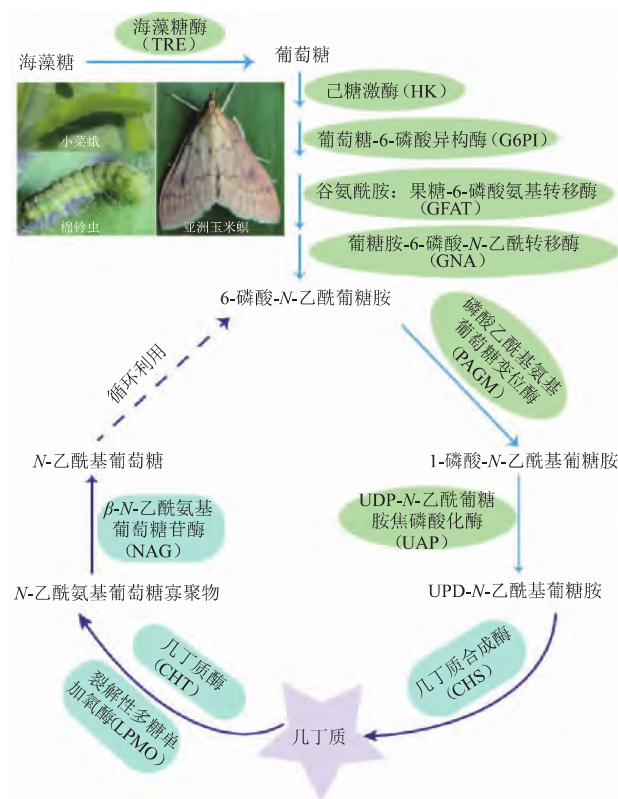


图1 昆虫体内几丁质的生物合成途径与代谢过程

近年来,已有部分综述主要聚焦于昆虫中某种几丁质酶的功能特性及作用的研究进展<sup>[7-9]</sup>。但针对真菌、细菌或线虫等几丁质酶晶体结构的阐述,尤其是结合现代药物设计策略发现新型几丁质酶抑制剂的研发进展综述较为有限。因此,本文系统梳理了以GH18家族为主的几丁质酶的分类、代表性几丁质酶的晶体结构及其在真菌、细菌、昆虫和线虫中的功能特性,阐释了其作为农业病虫害绿色防治靶标的潜能。同时聚焦于通过晶体结构解析、虚拟筛选、分子对接等现代药物设计策略获得的靶向亚洲玉米螟几丁质酶(*Ostrinia furnacalis*, *OfChT*I、*OfChT*II、*OfChT*-h)、秀丽隐杆线虫几丁质酶(*Caenorhabditis elegans*, *CeChT*1)和大豆胞囊线虫几丁质酶(*Heterodera glycines*, *HgChT*2)的抑制剂,对其研发进展进行综述,以期靶向几丁质酶结构开发新型抑制剂用于现代农业病虫害绿色防控提供研究思路。

1 几丁质酶

1.1 分类

几丁质酶(chitinase)由Karrer和Hofmann于1929年首次在蜗牛胃液中发现<sup>[10]</sup>,随后在其他生物体内陆续发现。其属于糖基水解酶(GH),具有高度的特异性。截至目前,碳水化合物活性酶数据库(CAzy)根据氨基酸序列、三维结构、催化机制和底物特异性将糖基水解酶分为185个家族(GH1~GH185)。几丁质酶主要属于GH18和GH19家族,少量属于GH23和GH48家族,其中GH18家族几丁质酶广泛分布于真菌、昆虫等物种中。根据功能、序列及结构特征的差异,GH18家族几丁质酶主要细分为A、B、C等亚类,其催化区都是由三磷酸异构酶(TIM)的桶状( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>结构域构成<sup>[11]</sup>。根据水解位点,几丁质酶又分为内切几丁质酶(EC3.2.1.14)和外切几丁质酶(EC3.2.1.29)。其中,内切几丁质酶是指随机切割 $\beta$ -(1,4)-糖苷键生成小分子寡糖,外切几丁质酶包括壳二糖酶和 $\beta$ -(1,4)-*N*-乙酰葡萄糖苷酶,分别从非还原性

末端或低聚物水解生成壳二糖或单体。按照水解机制的不同,又可以将其分为持续性几丁质酶和非持续性几丁质酶。

此外,按其N端序列、定位等可以将几丁质酶分为I至VI六大类。几丁质酶作为催化几丁质降解的关键酶,广泛分布于多种生物中,几丁质酶的不同分类也凸显了其功能的多样性。这不但为其作为多种农业病虫害的绿色生物防治手段提供可能,也为基于解析其晶体结构实现靶向多功能几丁质酶抑制剂的研发奠定基础。

1.2 几丁质酶的晶体结构

几丁质酶广泛分布于真菌、细菌、病毒、昆虫、植物、线虫和人体中,参与几丁质的自然循环并在不同生物的生命系统中发挥重要的功能。GH18家族几丁质酶的首个晶体结构来自巴西橡胶树,随后真菌、细菌、昆虫、线虫等多种生物中几丁质酶晶体结构被陆续解析。表1列出了Protein Data Bank(PDB)数据库中已报道的不同物种代表性几丁质酶的晶体结构信息。

表 1 不同物种中代表性几丁质酶的晶体结构

种类	名称	蛋白名称	PDB编号	配体	氨基酸数/个	分辨率/Å	年份	参考文献
真菌	烟曲霉( <i>Aspergillus fumigatus</i> )	AfChiB1	1W9P	无	433	1.70	2005 年	[12]
			2A3E	allosamidin	433	1.95	2005年	[13]
细菌	黏质沙雷氏菌( <i>Serratia marcescens</i> )	SmChiA	1EDQ	无	540	1.55	2003年	[14]
		SmChiA	1FFQ	(GlcNAc) <sub>2</sub>	540	1.90	2003年	[14]
		SmChiB	1E15	无	499	1.90	2000年	[15]
昆虫	亚洲玉米螟( <i>Ostrinia furnacalis</i> )	OfChtI	3W4R	无	554	1.70	2014年	[16]
		OfChi-h	5GQB	(GlcN) <sub>6</sub>	553	2.70	2017年	[17]
		OfChtII	5Y29	无	377	1.80	2018年	[18]
病毒	核型多角体病毒( <i>Autographa californica nucleopolyhedrovirus</i> )	AcMNPV-ChiA	5DEZ	无	551	2.30	2016年	[19]
线虫	秀丽隐杆线虫( <i>Caenorhabditis elegans</i> )、大豆胞囊线虫( <i>Heterodera glycines</i> )	CeCht1	6LE7	无	381	1.86	2021年	[20]
			8HW6	无	336	1.92	2024年	[21]
		HgCht2	8HW7	(GlcNAc) <sub>3</sub>	356	1.75	2024年	[21]
			8HW8	SmNF-V3RM4	356	1.57	2024年	[21]

本文以烟曲霉(*Aspergillus fumigatus* AfChiB1)、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*, SmChiA 和 SmChiB)、亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis* OfChtI、OfChtII和OfChi-h)以及秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, CeCht1)和大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)的几丁质酶晶体结构特征为代表,深入探讨其结构与功能的关系。截至目前,已报道的烟曲霉几丁质酶B1晶体结构均为其与抑制剂或其他小分子配体的复合物结构,详细揭示了AfChiB1活性位点与配体的相互作用特征。2005年,Rao等<sup>[12]</sup>通

过X射线晶体学首次解析了AfChiB1(PDB :1W9P)与天然产物环五肽抑制剂(如 argifin 和 argadin)的复合物晶体结构(PDB :1WAV和1W9V),指出其活性位点包含1个深沟槽,由保守的芳香族氨基酸(如 Trp137)和催化残基(如 Asp175、Glu144)构成, argifin 和 argadin 通过氢键和疏水相互作用与这些关键残基结合(图2a)。这2个环五肽抑制剂对 AfChiB1 的IC<sub>50</sub>分别为27 nmol/L和200 nmol/L。这些靶酶与抑制剂的结构及其抑制机制特征将为抗真菌药物的设计提供基础。在细菌中,黏质沙雷氏菌



是高产几丁质酶的模式菌种,其分泌的几丁质酶因出色的几丁质降解能力成为研究细菌几丁质酶的焦点,其中对*SmChiA*和*SmChiB*的研究最为深入。2003年,Papanikolaou等<sup>[14]</sup>指出*SmChiA*的晶体结构(PDB:1EDQ)表现为中央 $\beta$ -片层和周围 $\alpha$ -螺旋,体现了其典型 $\alpha/\beta$ 折叠的桶状结构,并首次解析了*SmChiA*与抑制剂allosamidin复合物的晶体结构(1FFQ),揭示其抑制剂活性位点呈半封闭隧道状并且与3个重要的残基相互作用。这3个残基分别为:Glu315(作为催化质子供体)、Asp313(其在天然结构中呈现“椅式”和“舟式”2种构象,但在抑制剂复合物中朝向Glu315)、Tyr390(位于活性位点隧道内,与Glu315相对)。这些活性位点的确认为黏质沙雷

氏菌几丁质酶的进一步研究提供了结构基础。2000年, Van等<sup>[15]</sup>通过X射线晶体学解析了*SmChiB*的晶体学结构,指出该酶由2个功能性结构域组成。一个采用经典TIM桶型折叠的催化域,负责通过活性位点水解几丁质的 $\beta$ -1,4-糖苷键;另一个是由49个氨基酸残基构成的C端几丁质结合域,可以通过特异性的相互作用增强酶与几丁质底物的结合亲和力,提高其水解效率。结构分析表明,该酶的C端结合域通过暴露的芳香族氨基酸残基可以与几丁质的多糖链形成疏水性相互作用,从而稳定底物-酶的复合物(图2b)。这些结构的解析不仅揭示了细菌几丁质酶水解几丁质的催化机制和底物结合模式,还为理解其降解几丁质的生物学过程提供了重要依据。

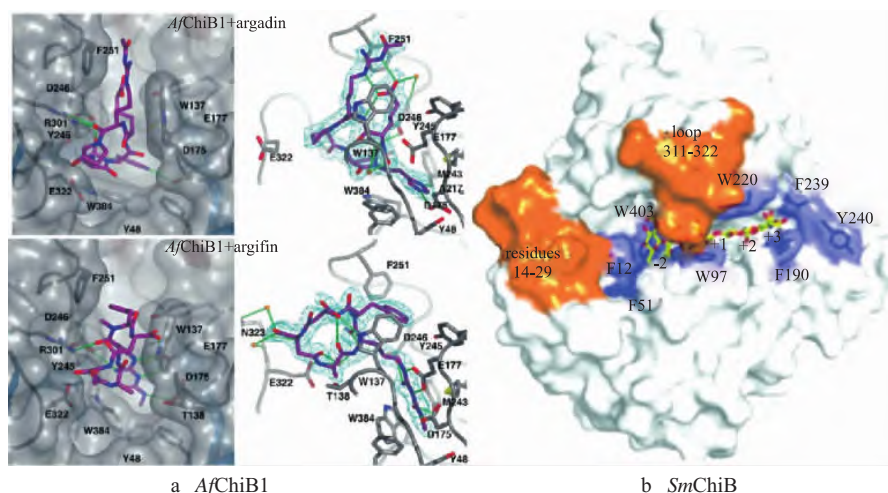


图2 *A/ChiB1*、*SmChiB* 及配体复合物的底物结合腔<sup>[12, 15]</sup>

值得注意的是,截至目前,昆虫几丁质酶中仅有亚洲玉米螟的几丁质酶(*OjChtI*、*OjChtII*和*OjChi-h*)结构被成功解析,它们的晶体结构同样展现了GH18家族的典型特征和功能多样性。其中,*OjChtI*由N端信号区、CAD催化域、短肽序列连接区和C端几丁质结合域组成,其催化域折叠为 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状核心结构域(CAD,由第24~271和350~406号残基构成)和插入结构域(CID,由5个反平行 $\beta$ 链和2个短 $\alpha$ 螺旋组成),活性口袋含催化残基Glu148(酸/碱

催化)、Asp146(稳定中间体)和Asp144(维持质子化),底物结合腔具5个糖基位点(-3~+2),由芳香残基Trp34、Tyr37等支撑,表面还有Phe159等4个残基形成的疏水锚定平面,显示其内切酶活性(图3)<sup>[18]</sup>。*OjChtII*全长含5个结构域,其中*OjChtII*-C1和*OjChtII*-C2具催化活性,核心为 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构,CID位于 $\beta 7$ 和 $\alpha 7$ 间,含催化残基Asp1729、Asp1731和Glu1733,结合腔跨越-5~+2的7个位点,由Trp1621等芳香残基非对称排列<sup>[16]</sup>。

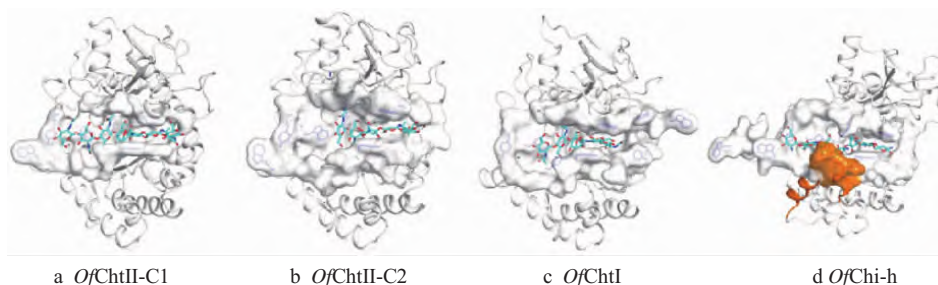


图3 亚洲玉米螟几丁质酶底物结合区的结构比较<sup>[18]</sup>

*OfChi-h*(鳞翅目特有)具有结构域I(类免疫球蛋白- $\beta$ -三明治)和结构域II( $(\beta/\alpha)_8$ 桶状催化域),通过25个氨基酸连接链连接,催化残基Glu308、Asp306和Asp304居结合腔中,7个糖基位点(-5~+2)由Trp27等芳香残基非对称分布,显示外切酶活性<sup>[17]</sup>。总之,*OfChtI*、*OfChtII*和*OfChi-h*在靠近催化中心处均具有高度保守的4个色氨酸残基,可以通过 $\pi$ - $\pi$ 堆叠和疏水作用与底物或抑制剂结合,但其底物结合模式也会因这三种酶中芳香残基分布和位点占据的差异(*OfChtI*对称,*OfChtII*和*OfChi-h*非对称)而不同<sup>[18]</sup>。这些昆虫几丁质酶结构的异同将为靶向开发多几丁质酶抑制剂或选择性几丁质酶抑制剂提供了重要结构基础。

此外,在无脊椎动物(如线虫)中的几丁质酶也表现出独特的结构特征和功能适应性。2021年,Chen等<sup>[20]</sup>报道了线虫中几丁质酶的第1个晶体结构——模式线虫秀丽隐杆线虫几丁质酶*CeCht1*,其结构主要包括N端信号肽(1~22号残基)、GH18催化域(CAD,53~424号残基)和2个几丁质结合模块(CBM14,481~532和567~615号残基)。其催化域高度保守,也呈现 $(\beta/\alpha)_8$  TIM桶状结构,由8条 $\beta$ 链和8

条 $\alpha$ 螺旋组成,插入结构域(303~370号残基)含6个反平行 $\beta$ 链和1个短 $\alpha$ 螺旋,形成底物结合裂缝的一侧壁。催化基序“DxDxE”(Asp175-Glu179)中,Glu179为酸/碱催化剂,Asp177和Asp175分别稳定中间体和维持质子化。底物结合裂缝由保守芳香残基(如Trp62、Phe89等)排列,裂缝几何形状和长度因残基差异(如Phe398/Val334和Trp110)而略有不同。值得一提的是,2024年,Chen等<sup>[21]</sup>解析了大豆胞囊线虫分泌的*HgCht2*几丁质酶的3种晶体结构(图4)——无底物(apo)结构(8HW6)、(GlcNAc)<sub>3</sub>结合复合物(8HW7)、与来自苜蓿根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)的Nod因子(*SmNF-V*)结合的复合物。结果表明,所有晶体结构均以 $(\beta/\alpha)_8$  TIM桶状结构为核心,呈现圆柱形框架,表面具有开放的沟槽状底物结合裂缝,适配于内切几丁质酶的水解功能。无底物结构包含1个插入域,增加了结构复杂性,裂缝两端宽敞,便于底物进入。含(GlcNAc)<sub>3</sub>和*SmNF-V*的几丁质酶复合物中,裂缝线性容纳几丁寡糖或脂质几丁寡糖主链,其中*SmNF-V*的脂肪酰基和磺酸基团灵活适应裂缝的开放末端。以上3种结构均保持一致的圆柱形构象,裂缝的适应性确保了高效的底物水解功能。

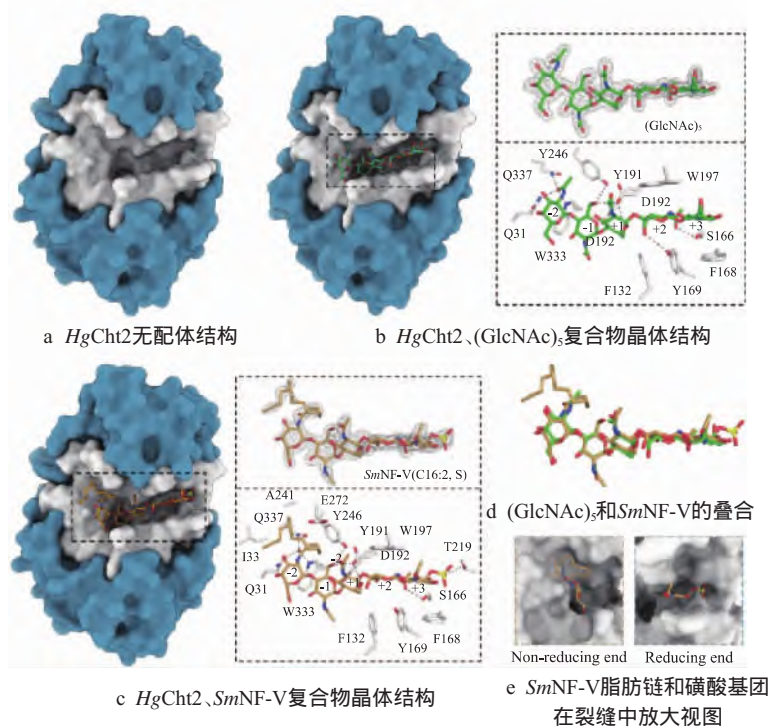


图4 *HgCht2*的晶体结构<sup>[21]</sup>

这些晶体结构的解析和活性位点的确认为设计靶向线虫几丁质酶的新型抑制剂提供了结构基础。

由此可见,不同物种的几丁质酶晶体结构均

以 $(\beta/\alpha)_8$  TIM桶状结构为核心,以保守的催化基序“DxDxE”和芳香残基介导的底物结合裂缝为特征,展现出内切或外切水解几丁质的活性。此外,不同几丁质酶的复合物晶体结构的解析(*AfChiB1*与抑



制剂复合物、*SmChIA/B*的半封闭隧道、*OjChtI/II*的多样结合腔及*HgCht2*的开放裂缝)也揭示了底物结合和催化机制差异的多样性,这为理解几丁质酶的功能适应性提供了理论依据。这些晶体结构的不断解析不仅阐述了几丁质酶在不同生物中的重要生物学功能,也为靶向几丁质酶进行新型抑制剂的精准设计提供方向。

## 2 几丁质酶抑制剂

课题组前期以几丁质酶抑制剂的化学结构为基础,尤其是结合噻唑烷酮类骨架化合物的合成及农用生物活性为主线,进行了几丁质酶抑制剂的综述<sup>[7]</sup>。本文在此基础上进一步以靶标蛋白及其作用对象为主线,系统梳理了近年来靶向亚洲玉米螟和线虫的几丁质酶抑制剂研究进展,详细分析了靶向*OjChtI*、*OjChtII*、*OjChi-h*、*CeCht1*、*HgCht2*及多靶点抑制剂的分子设计思路、结合模式及农用生物活性,旨在为靶向几丁质酶抑制剂的创新精准设计提供深入指导和参考。

### 2.1 靶向昆虫几丁质酶抑制剂

随着几丁质酶研究的深入,越来越多的几丁质酶抑制剂被报道,其中多数都是针对亚洲玉米螟的几丁质酶抑制剂。其可以通过干扰昆虫全生命周期进而表现出良好的抑制活性。这些抑制剂通常是基

于晶体结构、虚拟筛选、分子对接、活性片段拼接、生物等排等多种现代药物研发策略进行设计和发现,旨在通过靶向特定的几丁质酶,如亚洲玉米螟的*OjChtI*、*OjChtII*和*OjChi-h*,为农业害虫绿色防控提供可持续管理策略。本文主要综述近10年本课题组在靶向亚洲玉米螟几丁质酶(*OjChtI*、*OjChtII*和*OjChi-h*)抑制剂方面的研究进展,探讨基于靶标蛋白酶晶体结构和分子设计策略实现高效和绿色病虫害防控剂发现和应用。

#### 2.1.1 靶向*OjChtI*抑制剂

*OjChtI*作为亚洲玉米螟几丁质降解的关键内切型几丁质酶,是开发靶向昆虫生长调节剂的重要靶标。近年来,基于*OjChtI*晶体结构和分子互作机制研究不断深入,多种新型抑制剂通过虚拟筛选、结构优化和天然产物改造被开发出来,为高效、特异性几丁质酶抑制剂的设计提供了新方向。2016年, Jiang等<sup>[22]</sup>基于*OjChtI*的晶体结构,通过虚拟筛选发现化合物1和2为*OjChtI*抑制剂(图5),两者 $IC_{50}$ 分别为101  $\mu\text{mol/L}$ 和6.4  $\mu\text{mol/L}$ 。分子互作机制研究揭示,化合物1通过 $\pi$ - $\pi$ 堆叠和疏水相互作用经吡啶环N原子与*OjChtI*结合腔中的Glu148残基形成氢键,而化合物2通过酰胺上的N原子与*OjChtI*结合腔中的Glu148残基形成氢键。该新型骨架的发现为开发特异性几丁质酶抑制剂提供了新的起点。

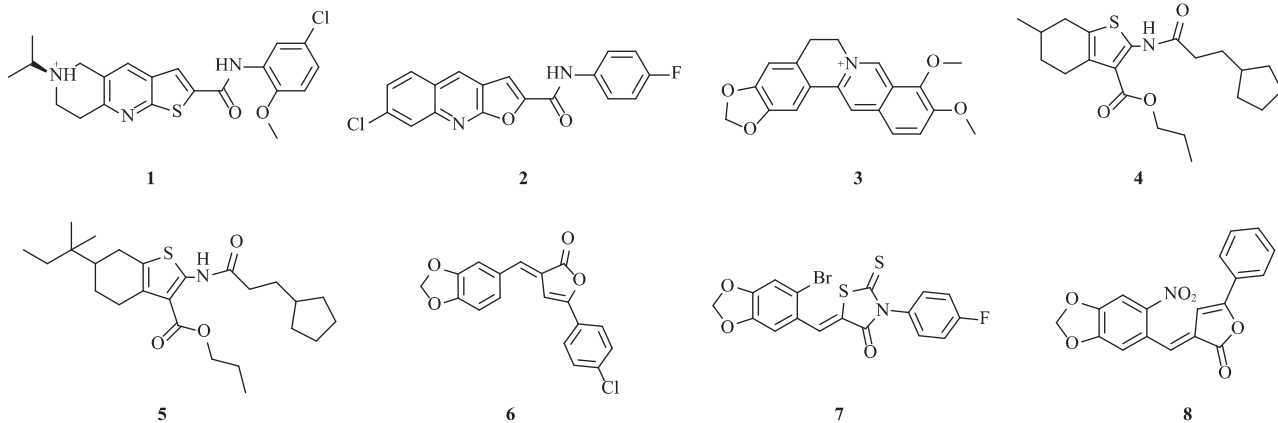


图5 靶向几丁质酶 *OjChtI* 抑制剂的化学结构

2018年, Duan等<sup>[23]</sup>报道了小檗碱(化合物3)及其类似物作为*OjChtI*抑制剂,其 $K_i$ 为23  $\mu\text{mol/L}$ 。分子互作机制研究表明,该抑制剂带正电的共轭平面与酶之间的 $\pi$ - $\pi$ 堆积相互作用是其抑制活性的关键。2019年, Dong等<sup>[24]</sup>通过优化先导化合物4与*OjChtI*的结合模式设计合成了化合物5。酶抑制活性研究发现,化合物5中因其6位非极性基团的大空间位阻增强了其与酶结合腔周围氨基酸的相互作用,表现出

最佳的抑制效果( $K_i=0.71 \mu\text{mol/L}$ )。近年来,课题组也在靶向*OjChtI*的抑制剂研究中取得进展。2021年, Han等<sup>[25]</sup>基于天然产物胡椒碱与*OjChtI*底物结合腔的相互作用机制,设计合成了含丁烯内酯骨架的化合物6。其酶抑制活性( $K_i=1.03 \mu\text{mol/L}$ )比胡椒碱( $K_i=81.45 \mu\text{mol/L}$ )抑制活性高80倍;分子动力学研究结果表明,引入的丁烯内酯骨架由于增加了 $\pi$ 堆叠作用提高了化合物6与*OjChtI*的结合亲和力和抑制活

性。此外,生物活性研究结果显示,该化合物对亚洲玉米螟表现出一定的杀虫活性,这为基于天然产物结构开发靶向*Of*ChtI的绿色杀虫剂提供了新方向。2023年,Han等<sup>[26]</sup>结合 $\pi$ 堆叠效应和高水溶性的协同设计策略,开发了靶向*Of*ChtI的新型罗丹宁类似物(化合物7),其酶抑制活性的 $K_i$ 低至2.2  $\mu\text{mol/L}$ 。生物活性评估实验结果表明,化合物7能够显著抑制亚洲玉米螟幼虫的生长和发育,为开发高效昆虫生长调节剂提供了创新候选分子。2024年,Han等<sup>[27]</sup>采用残基导向策略,以胡椒丁烯内酯为先导化合物,针对*Of*ChtI的关键残基Trp107设计合成了化合物8,发现其对*Of*ChtI的 $K_i$ 为0.68  $\mu\text{mol/L}$ 。这为通过靶向酶结合腔中关键残基进行结构优化发现高效*Of*ChtI抑制剂提供了新思路。这些研究进展表明,靶向*Of*ChtI开发的新型抑制剂在提高酶抑制活性和杀虫或昆虫生长发育抑制效果方面均具有良好的潜力,将为开发环境友好型昆虫生长调节剂提供创新候选分子。

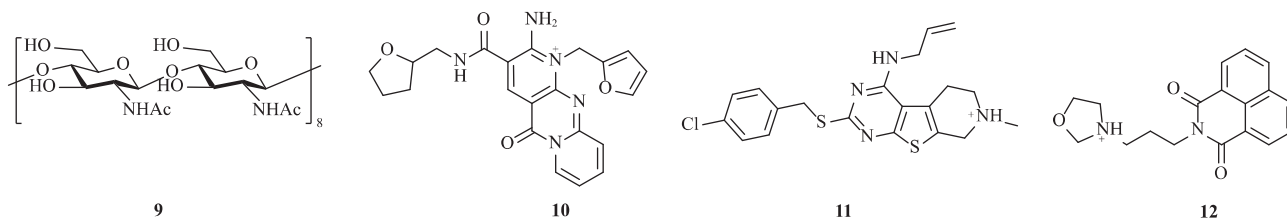


图6 靶向*Of*ChtII抑制剂的化学结构

将这4种抑制剂注射到4龄亚洲玉米螟幼虫中,幼虫发育和化蛹发生异常,其中约有30%的幼虫在蜕皮阶段停止生长,显示出这4种抑制剂在农业害虫防治方面的应用潜力。

### 2.1.3 靶向*Of*Chi-h抑制剂

靶向*Of*Chi-h的抑制剂开发因其对鳞翅目害虫的防治潜力而备受关注。*Of*Chi-h作为鳞翅目害虫蜕皮过程中的特有关键几丁质酶,为开发高效且对环境友好的新型鳞翅目害虫杀虫剂提供了重要靶标。近年来,研究人员通过天然产物筛选、虚拟筛选及分子优化等策略,发现多种对*Of*Chi-h表现出高抑制活性的化合物。这些化合物与*Of*Chi-h的互作模式不仅揭示了新活性结合口袋和独特分子的相互作用模式,还为低毒、绿色昆虫生长调节剂的设计提供了重要的结构骨架。

2021年,Lu等<sup>[30]</sup>发现天然产物化合物13(图7)可以竞争性选择抑制*Of*Chi-h( $K_i=8.76 \mu\text{mol/L}$ ),其共晶结构首次揭示其二氯吡啶基团与*Of*Chi-h间结合的独特口袋。其对多种鳞翅目害虫均表现出较高的杀虫活性,且对蜜蜂等非靶标生物无害。2022年,Dong

### 2.1.2 靶向*Of*ChtII抑制剂

*Of*ChtII是昆虫所有发育阶段中蜕皮所必需的酶<sup>[28]</sup>。由于*Of*ChtII的晶体结构于2018年才被解析出来,因此针对靶向*Of*ChtII抑制剂的报道也相对起步较晚<sup>[18]</sup>。直到2021年,Chen等<sup>[29]</sup>通过对*Of*ChtII晶体结构的分析,报道了4种小分子抑制剂壳八糖(GlcN)<sub>8</sub>(化合物9)、二吡啶并嘧啶衍生物(化合物10)、嘧啶-噻吩并吡啶衍生物(化合物11)和萘酰亚胺衍生物(化合物12),见图6。它们对*Of*ChtII-C1的 $K_i$ 分别为38.43、1.99、1.72、2.18  $\mu\text{mol/L}$ 。其中,化合物9主要通过堆叠相互作用与*Of*ChtII结合;化合物10在结合位点处与*Of*ChtII形成了强烈的疏水相互作用,并通过水介导的氢键加强其结合能力;化合物11和12尽管具有不同的化学结构,但它们在*Of*ChtII中结合位点的结构与化合物10相似,显示出有效的抑制*Of*ChtII活性。这4种抑制剂均与酶底物结合裂缝中的+1/+2位点色氨酸和-1疏水口袋产生相互作用。

等<sup>[31]</sup>基于虚拟筛选和分子优化策略,设计合成了偶氮氨基嘧啶衍生物(化合物14)。其对*Of*Chi-h表现出优异的酶抑制活性( $K_i=64.7 \text{ nmol/L}$ ),且对小菜蛾和亚洲玉米螟的杀虫活性优于商品化昆虫生长调节剂氟铃脲。2022年,Zhao等<sup>[32]</sup>对天然产物argifin进行结构改造,替换了12-和16-氮杂大环内酯中的环肽骨架得到化合物15,发现其对*Of*Chi-h的 $\text{IC}_{50}$ 为56  $\text{nmol/L}$ 。化合物15与*Of*Chi-h和*Sm*ChiB的结合模式表明,其通过*N*-甲基氨基甲酰基胍基团结合于*Of*Chi-h的-1位点,与argifin结合模式相同。同时,均方根偏差分析测量结果表明,氮杂大环抑制剂能够稳定地结合于几丁质酶,这为*N*-甲基氨基甲酰基胍基团在新型几丁质酶抑制剂开发中的应用潜力奠定了基础。此外,化合物15在50  $\text{mg/L}$ 质量浓度时对小菜蛾的致死率为76%,这为开发以*Of*Chi-h为靶标的新型杀虫剂提供了参考骨架。2025年,Pang等<sup>[33]</sup>受Rhein(化合物16)二聚体结构启发,筛选鉴定出高效靶向*Of*Chi-h的天然化合物17,其 $K_i$ 为80  $\text{nmol/L}$ 。分子动力学模拟显示,化合物17在*Of*Chi-h的活性位点内采用折叠构象,通过与关键色氨酸残基的 $\pi$ - $\pi$ 堆叠相互作用

增强了其对酶的结合亲和力。生物活性实验结果表明,在5 mmol/L浓度时,化合物17对亚洲玉米螟的致死率达到100%;在1 mmol/L浓度时可以抑制其幼虫

发育。化合物17具有卓越的酶抑制作用和杀虫活性,显著优于其他植物源杀虫剂,在靶向昆虫蜕皮机制的害虫绿色防控方面具有重要的应用前景。

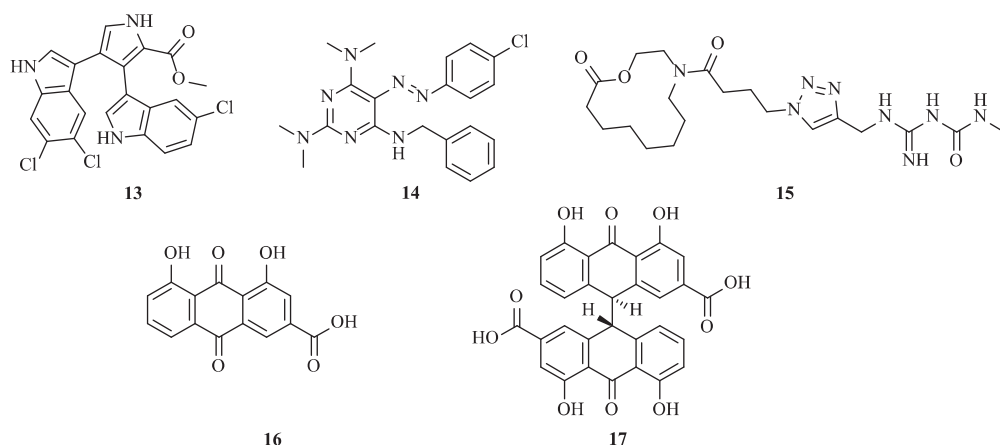


图7 靶向 *OfChi-h* 抑制剂的化学结构

#### 2.1.4 靶向多几丁质酶抑制剂

鉴于 *OfChtI*、*OfChtII* 和 *OfChi-h* 在亚洲玉米螟几丁质降解中的协同作用,开发靶向3种几丁质酶的多靶点抑制剂用于防治亚洲玉米螟成为热点。多靶点抑制剂策略利用几丁质降解通路中内切型酶(*OfChtI*和*OfChtII*)与外切型酶(*OfChi-h*)存在的协同机制,通过同时干扰上述相关的几丁质的代谢途径进而提高药剂的杀虫效果,同时有望降低抗性风险。近年来,本课题组在靶向多几丁质酶的抑制剂研究方面也取得重要进展。2022年,Jiang等<sup>[34]</sup>首次以*OfChtI*、*OfChtII*和*OfChi-h*为靶点,基于3种酶结合腔中的保守芳香性氨基酸残基合理设计并合成了新型胡椒酰胺类衍生物。化合物18(图8)的苯并二氧五环在+2位点通过Ala192、Asn1778和Lys362残基分别与*OfChtI*、*OfChtII*和*OfChi-h*形成氢键和 $\pi$ - $\pi$ 相互作用,苄胺基团在-1/-2位点通过Tyr272、Trp372、Trp1691、Trp1951、Phe184和Trp268与3种几丁质酶形成额外的 $\pi$ - $\pi$ 和疏水相互作用,显著增强了化合物18对3种几丁质酶的抑制活性(*OfChtI*  $K_i=11.78 \mu\text{mol/L}$ , *OfChtII*  $K_i=17.34 \mu\text{mol/L}$ , *OfChi-h*  $K_i=22.82 \mu\text{mol/L}$ )。胃毒实验结果表明,化合物18在500  $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时对亚洲玉米螟的校正死亡率为69.23%;显微注射实验结果显示,化合物18显著干扰亚洲玉米螟的蜕皮、化蛹和羽化,进而导致90%的幼虫死亡,且化蛹率和羽化率分别降至15%和5%。这为开发靶向几丁质酶的昆虫生长调节剂提供了重要的候选化合物。2022年,Han等<sup>[35]</sup>基于*OfChtI*和*OfChi-h*的结合腔,设计并合成了含罗丹宁骨架的胡椒碱衍生物(化合物19),发现其除了类似于先导对*OfChtI*

的抑制活性外,还首次发现其对*OfChi-h*的抑制作用。其对2种几丁质酶的抑制能力(*OfChtI*  $K_i=0.34 \mu\text{mol/L}$ , *OfChi-h*  $K_i=0.32 \mu\text{mol/L}$ )比胡椒碱(*OfChtI*  $K_i=81.45 \mu\text{mol/L}$ , *OfChi-h*  $K_i=69.40 \mu\text{mol/L}$ )高200~300倍,并可以通过干扰昆虫蜕皮显著抑制幼虫的生长,显示出显著的昆虫生长调节效果。该研究通过结构导向的生物电子等排体策略,开发了高效的双几丁质酶抑制剂,为新型昆虫生长调节剂的候选提供了思路。2023年,大连理工大学Ding等<sup>[36]</sup>基于机器学习策略对天然产物库进行高通量虚拟筛选,发现天然产物3,5-二-O-咖啡酰奎尼酸(化合物20)和 $\gamma$ -芒果素(化合物21)可以多靶点抑制*OfChtI*、*OfChtII*和*OfChi-h*。其中,化合物20对*OfChtI*、*OfChtII*、*OfChi-h*的 $K_i$ 分别为20.9、21.2、26.9  $\mu\text{mol/L}$ ,化合物21的 $K_i$ 分别为27.9、6.0、3.9  $\mu\text{mol/L}$ 。两者可以抑制鳞翅目害虫草地贪夜蛾和亚洲玉米螟的生长发育,展示了虚拟筛选和高通量筛选在靶向多几丁质酶抑制剂的发现和开发中的应用潜力。最近,本课题组在前期研究基础上又取得了新的进展。2024年,Zou等<sup>[37]</sup>以课题组前期发现的靶向*OfChtI*抑制剂化合物6为先导,设计合成了含共轭骨架的丁烯内酯衍生物(化合物22)。其通过 $\pi$ - $\pi$ 堆叠相互作用展现出双靶点抑制效果(*OfChtI*  $K_i=1.82 \mu\text{mol/L}$ , *OfChi-h*  $K_i=2.00 \mu\text{mol/L}$ ),这为靶向双几丁质酶开发新型双靶点抑制剂提供了候选物。2025年,Chen等<sup>[38]</sup>在课题组前期研究基础上设计合成了1,4-苯并二噻烷连接的罗丹宁衍生物,化合物23因较大的共轭平面结构成为最有效的双靶点抑制剂(*OfChtI*  $K_i=2.57 \mu\text{mol/L}$ , *OfChi-h*  $K_i=2.03 \mu\text{mol/L}$ ),也为靶向双几丁质酶的高效双靶



点抑制剂设计提供新策略。同年,Shi等<sup>[39]</sup>进一步基于*Oj*ChtI、*Oj*ChtII和*Oj*Chi-h的保守结合腔,以5-烯基硫代噻唑烷酮为骨架,通过引入疏水烃基链和苄基甲酰胺基团,设计合成了化合物24。酶活测试结果显示,其具有多酶抑制活性(*Oj*ChtI  $K_i=5.82 \mu\text{mol/L}$ , *Oj*ChtII  $K_i=27.5 \mu\text{mol/L}$ , *Oj*Chi-h  $K_i=6.77 \mu\text{mol/L}$ );生物活性测试结果表明,化合物24影响亚洲玉米螟的生长和发育。由此可见,5-烯基硫代噻唑烷酮可作为靶向多几丁质酶的新型抑制剂骨架,具有用于开发昆虫生长调节剂的潜力。2025年,Jiang等<sup>[40]</sup>在系统梳理课题组前期发现的几丁质酶抑制剂基础上,首次通过活性片段替换、三维定量构效关系分析和生物电子等排体替换策略,设计并合成了肉桂基-噻唑烷二酮化合物,作为靶向亚洲玉米螟*Oj*ChtI、*Oj*ChtII和*Oj*Chi-h的潜在抑制剂。其中,化合物25对*Oj*ChtI、*Oj*ChtII、*Oj*Chi-h的 $K_i$ 分别为0.82、5.03、0.86  $\mu\text{mol/L}$ ,化合物26的 $K_i$ 分别为0.60、3.15、0.69  $\mu\text{mol/L}$ 。分子对接和分子动力学模拟结果表明,化合物25的罗丹宁环通过 $\pi$ 相互作用和氢键固定在酶结合腔的-1或-2位点,肉桂基和*N*-苄基延伸至酶结合腔的正负位点,与保守芳香残基(如*Oj*ChtI的Trp34、Trp107、

Trp372; *Oj*ChtII的Trp1621、Trp1691; *Oj*Chi-h的Trp160、Trp268)和极性残基(如Asn1692)形成 $\pi$ - $\pi$ 堆叠、 $\pi$ -阴离子和氢键相互作用。化合物26的噻唑烷二酮环和肉桂基占据在酶结合腔的-1至+2位点,丙酸酯链通过疏水堆叠固定在酶结合腔的负位点。生物活性测试结果表明,化合物25和26表现出良好的杀虫活性,在500 mg/L质量浓度时对害虫的致死率分别为66.67%~70.37%(亚洲玉米螟)、61.54%~68.97%(草地贪夜蛾)、79.31%~93.10%(小菜蛾),优于或相当于先前报道的硫代噻唑烷酮化合物<sup>[26, 39]</sup>。该研究不但首次基于配体药物设计策略,发现了新型噻唑烷酮类多靶点几丁质酶抑制剂,而且抑制剂表现出显著的*Oj*ChtII抑制活性、广泛的杀虫谱,可以作为防控多种鳞翅目害虫的候选昆虫生长调节剂开展田间试验和机制研究。2025年,中国农业大学Ai等<sup>[41]</sup>通过多靶点策略合成了系列化合物,发现化合物27因1,3,4-噻二唑啉的强氢键和亲水性表现出优异的几丁质酶抑制活性。其对*Oj*ChtI、*Oj*ChtII、*Oj*Chi-h的 $K_i$ 分别为23.21、40.20、28.32  $\mu\text{mol/L}$ ,在500  $\mu\text{g/mL}$ 时对小菜蛾和亚洲玉米螟的致死率约为70%,具有良好的应用前景。

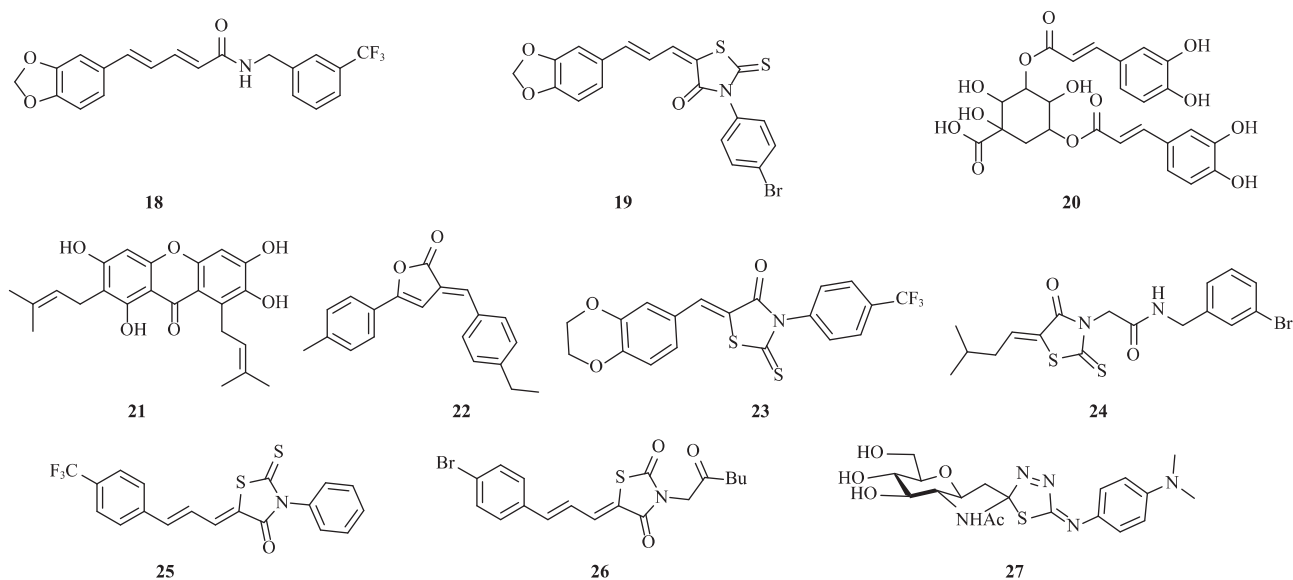


图8 靶向多几丁质酶抑制剂的化学结构

近年来针对亚洲玉米螟几丁质酶(*Oj*ChtI、*Oj*ChtII和*Oj*Chi-h)的抑制剂研究取得了重要进展,借助晶体结构解析、虚拟筛选、分子对接等现代药物设计技术,已经开发出多种高效、低毒的单靶点及多靶点抑制剂,显著提高了与几丁质酶结合的亲和力与抑制活性,并展现出良好的杀虫或昆虫生长抑制效果。未来的研究还可以聚焦于结构优化和活

性提升,借助人工智能、结构生物学等手段精准设计更具靶向性和广谱性的抑制剂,进一步结合生物学手段(多组学技术)深入解析抑制剂的作用机制,推动其与现有农药品种的协同应用,加强田间试验与环境安全性评估,实现从实验室研究到制剂开发和商业化落地,为靶向新靶标的昆虫生长调节剂的创制提供创新途径。

## 2.2 靶向线虫几丁质酶抑制剂

### 2.2.1 靶向CeCht1抑制剂

线虫几丁质酶在线虫孵化、蜕皮和繁殖等生命周期过程中扮演重要角色,是开发新型杀线虫剂的理想靶标。其中,秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的几丁质酶CeCht1因其在线虫中的高度保守性及其在线虫关键生理过程中的重要作用成为研究热点<sup>[20]</sup>。2021年,Chen等<sup>[20]</sup>首次报道了模式线虫秀丽隐杆线虫几丁质酶CeCht1的晶体结构,指出CeCht1在不同线虫中高度保守。与其他几丁质酶的结构比较显示,其具有经典的TIM桶状折叠,但在底物结合裂缝中有细微结构差异。基于解析的晶体结构进行虚拟筛选鉴定出靶向CeCht1的线虫几丁质酶抑制剂化合物28( $K_i=11.26 \mu\text{mol/L}$ )和29( $K_i=2.02 \mu\text{mol/L}$ ),见图9。分子对接和分子动力学模拟分析表明,化合物29通过苯并噻唑部分与酶结合腔中疏水口袋的芳香残基(如Trp62、Phe89等)产生相互作用。其三甲基胺部分与酶结合腔中的活性位点

残基(如Tyr58、Trp394)形成 $\pi$ -阳离子作用,其乙基磺酰苯部分通过氢键和疏水作用增强其对酶的结合同年,Chen等<sup>[42]</sup>基于CeCht1的晶体结构,通过分级筛选发现化合物30具有较好的酶抑制活性( $K_i=0.18 \mu\text{mol/L}$ ),是迄今报道的针对CeCht1的最有效抑制剂。分子互作机制研究表明,化合物30通过氢键、 $\pi$ - $\pi$ 堆积、疏水夹心结构与CeCht1活性位点产生作用实现高效的竞争性抑制,这为进一步优化和开发新型高效线虫几丁质酶抑制剂奠定了重要基础。2022年,Jin等<sup>[43]</sup>基于CeCht1的晶体结构,从16 000种天然产物库中经过虚拟筛选发现天然产物喹啉生物碱类化合物31可作为CeCht1的抑制剂,基于化合物31与CeCht1结合模式设计了苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-羧酸酯衍生物。其中,化合物32在10  $\mu\text{mol/L}$ 时对CeCht1的抑制率达到84.1%,且对线虫的 $\text{LC}_{50}$ 为41.54 mg/L。这为开发靶向CeCht1的新型杀线虫剂提供了研究基础。

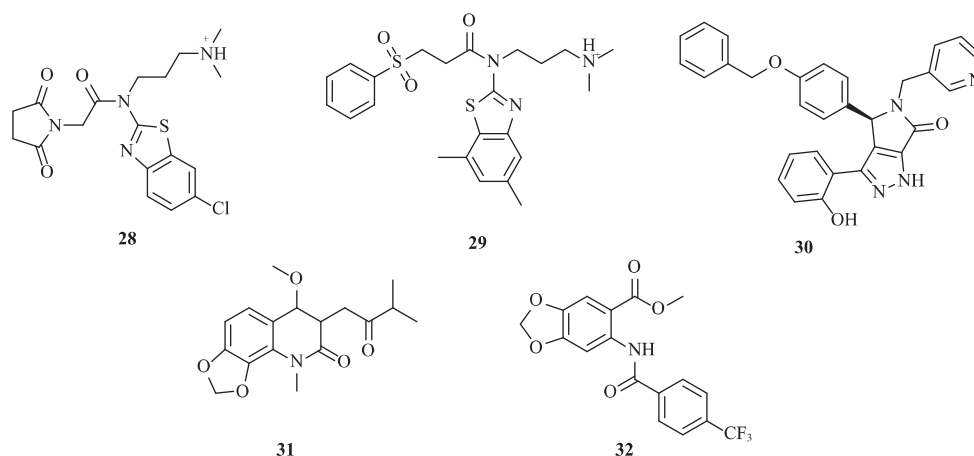


图9 靶向CeCht1抑制剂的化学结构

### 2.2.2 靶向HgCht2抑制剂

相比于靶向CeCht1的抑制剂,HgCht2因需要考虑其独特的功能(侧重于植物-微生物共生)、高亲和力的底物结合特性、避免干扰植物几丁质酶的专一性要求,导致其研究起步晚、报道较少。2024年,Chen等<sup>[21]</sup>基于HgCht2的晶体结构研究设计并合成了化合物33( $K_i=118.9 \mu\text{mol/L}$ ),见图10。其通过3个疏水部分(含吡啶和色胺基团)与酶结合腔中的底物结合裂隙(-2至+3亚位点)形成极性相互作用,实现竞争性抑制HgCht2的活性。值得注意的是,化合物33并不抑制植物几丁质酶的分泌,且在100  $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度时可以有效恢复根瘤菌的发育,为减轻大豆胞囊线虫对植物损害提供了候选物,具有成为开

发新型靶向HgCht2杀线虫剂的潜力。

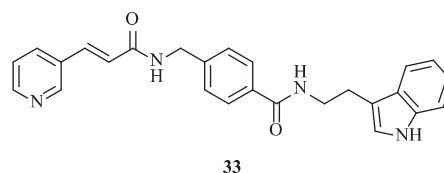


图10 靶向HgCht2抑制剂的化学结构

综上,昆虫几丁质酶抑制剂的研究广泛,其中靶向亚洲玉米螟的OfChtI抑制剂研究最为成熟,发现的酶抑制剂化合物1~8( $K_i$ 为0.68~101  $\mu\text{mol/L}$ ),大多通过 $\pi$ - $\pi$ 堆积、疏水和氢键相互作用与OfChtI相结合,表现出良好的酶抑制活性及杀虫活性。而OfChtII抑制剂化合物9~12( $K_i$ 为1.72~38.43  $\mu\text{mol/L}$ )及

*Oj*Chi-h抑制剂化合物13~17( $K_i$ 为0.056~8.76  $\mu\text{mol/L}$ )研究较少,这类抑制剂主要通过干扰昆虫的蜕皮和生长发育,有望成为新型昆虫生长调节剂。多几丁质酶抑制剂化合物18~27( $K_i$ 为0.32~40.20  $\mu\text{mol/L}$ )通过分子中的共轭骨架与多酶的保守氨基酸残基结合,在发挥优异的酶抑制活性的同时,可以显著提升其杀虫效果,并能有效拓宽杀虫谱。未来应进一步优化抑制剂的分子设计,平衡广谱杀虫效果与其对非靶标生物(如有益共生微生物或天敌昆虫)的选择性,避免可以带来的对生态影响。相较而言,线虫几丁质酶抑制剂的研究较晚,其中线虫*Ce*Cht1抑制剂化合物28~32的研究比较多,可以通过精准靶向酶活性位点发挥抑制活性进而展现出一定的杀线虫活性,而报道的靶向*Hg*Cht2抑制剂目前仅有化合物33( $K_i$ 为118.9  $\mu\text{mol/L}$ )。*Hg*Cht2是大豆胞囊线虫分泌的几丁质酶,其通过水解脂质几丁寡糖破坏大豆与有益微生物的共生关系,导致大豆根部无法形成有效的根瘤或菌根结构,从而限制了氮和磷的生物固氮与吸收,进而显著抑制大豆的正常生长。因此,若能开发针对*Hg*Cht2的高效抑制剂不仅可以导致线虫寄生能力下降,减少线虫病害,还可有效保护大豆与微生物的共生关系,恢复其营养获取能力。未来需优化*Hg*Cht2抑制剂活性与专一性,借鉴亚洲玉米螟多靶点抑制剂共轭骨架的设计策略,探索线虫多靶点策略;利用人工智能和高通量筛选优化分子设计,结合多组学技术深入解析抑制剂对蜕皮、共生等生命周期的调控机制;推进高活性抑制剂(如靶向*Oj*ChtI的化合物8,靶向*Ce*Cht1的化合物30)的田间试验与环境安全性评估,同时拓宽杀虫/杀线虫谱,覆盖更多鳞翅目害虫和植物寄生线虫,为缓解传统农药靶标单一的“卡脖子”问题提供了解决方案,为可持续农业提供绿色防控方案。

### 3 总结与展望

本文系统总结了真菌、细菌、昆虫和线虫中几丁质酶的晶体结构特征及其在农业病虫害绿色防控中的应用,重点分析了靶向亚洲玉米螟几丁质酶(*Oj*ChtI、*Oj*ChtII、*Oj*Chi-h),秀丽隐杆线虫几丁质酶(*Ce*Cht1)和大豆胞囊线虫几丁质酶(*Hg*Cht2)抑制剂的研究进展。利用晶体结构解析、虚拟筛选和分子对接等现代药物设计策略,发现了多种高效、低毒的单靶和多靶几丁质酶抑制剂,为开发新型昆虫生长调节剂和杀线虫剂提供了重要参考。

近年来,随着结构生物学和分子模拟技术的发

展,几丁质酶作为昆虫和线虫中高度保守,而植物和脊椎动物中缺失的潜在靶标,成为绿色农药研发的热点。目前,不同物种对几丁质酶三维晶体结构的解析越来越多,有力推动了研究人员对几丁质酶特异性抑制剂的研究热情。多种新颖骨架类型的高效几丁质酶抑制剂已被报道,若能进一步完善高活性抑制剂与靶酶的共晶结构,这将有利于基于现有新型骨架,靶向几丁质酶的结合腔的保守性或选择性特征,设计发现高效酶抑制剂。对发现的高效酶抑制剂进一步进行多重生物活性评价和深入的作用机制研究,为开发靶向潜在靶酶的害虫或线虫控制剂用于农业病虫害的绿色防控提供成功研究范式。未来还可以通过冷冻电镜和X射线晶体学进一步解析尚未完全阐明的几丁质酶高分辨率三维晶体结构,结合分子动力学模拟揭示活性位点在底物结合和催化过程中的动态构象变化,为靶向几丁质酶抑制剂设计提供更细致的结构信息。对于抑制剂的设计还可以通过突变分析和离体/活体实验验证关键残基与抑制剂结合的作用,结合田间试验评估结构导向抑制剂的实际效果,推动晶体结构到绿色农药应用的转化。此外,还可以借助人工智能辅助预测结构-功能,深化对活性位点和抑制机制的理解,为设计高效、专一的绿色杀虫/杀线虫剂提供精准结构指导,助力可持续农业的发展。

### 参考文献

- [1] KOZMA M, ACHARYA B, BISSESSUR R. Chitin, chitosan, and nanochitin: extraction, synthesis, and applications[J]. *Polymers*, 2022, 14(19): 3989.
- [2] THAKUR D, BAIRWA A, DIPTA B, et al. An overview of fungal chitinases and their potential applications[J]. *Protoplasma*, 2023, 260(4): 1031-1046.
- [3] RABADIYA D, BEHR M. The biology of insect chitinases and their roles at chitinous cuticles[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2024, 165: 104071.
- [4] ZHANG J, SUN H, FENG F, et al. Chitinase-assisted winner: nematodes antagonize symbiotic microbes[J]. *Trends in Microbiology*, 2024, 32(10): 931-933.
- [5] MUTHUKRISHNAN S, MERZENDORFER H, ARAKANE Y, et al. Chitin organizing and modifying enzymes and proteins involved in remodeling of the insect cuticle[M]//YANG Q, FUKAMIZO T. Targeting chitin-containing organisms. Singapore: Springer Singapore. 2019: 83-114.
- [6] DOUCET D, RETNAKARAN A. Chapter six-insect chitin: metabolism, genomics and pest management[M]//DHADIALLA T S. Advances in insect physiology. United States, California: Academic Press. 2012: 437-511.



- [7] 张婧瑜, 韩清, 蒋志洋, 等. 几丁质酶抑制剂及噻唑烷酮类化合物合成与农用活性研究进展[J]. 农药学报, 2021, 23(3): 421-437.
- [8] 谢慧杰, 丁艺, 胡雪, 等. 昆虫II家族几丁质酶的生理功能、结构特征及其抑制剂研究进展[J]. 农药学报, 2024, 26(2): 224-233.
- [9] 王慧敏, 仝志斌, 张爱兵, 等. 昆虫几丁质代谢通路及其调控机制研究进展[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2024, 45(4): 11-19; 28.
- [10] ADRANGI S, FARAMARZI M A. From bacteria to human: a journey into the world of chitinases[J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1786-1795.
- [11] YANG Y, SOSSAH F L, LI Z, et al. Genome-wide identification and analysis of chitinase GH18 gene family in *Mycogone perniciosa*[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 596719.
- [12] RAO F V, HOUSTON D R, BOOT R G, et al. Specificity and affinity of natural product cyclopentapeptide inhibitors against *A. fumigatus*, human, and bacterial chitinases[J]. Chemistry & Biology, 2005, 12(1): 65-76.
- [13] RAO F V, ANDERSEN O A, VORA K A, et al. Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding modes[J]. Chem Biol, 2005, 12(9): 973-980.
- [14] PAPANIKOLAU Y, TAVLAS G, VORGIAS C E, et al. De novo purification scheme and crystallization conditions yield high-resolution structures of chitinase A and its complex with the inhibitor allosamidin[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003, 59(2): 400-403.
- [15] VAN AALTEN D M, SYNSTAD B, BRURBERG M B, et al. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(11): 5842-5847.
- [16] CHEN L, LIU T, ZHOU Y, et al. Structural characteristics of an insect group I chitinase, an enzyme indispensable to moulting[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2014, 70(4): 932-942.
- [17] LIU T, CHEN L, ZHOU Y, et al. Structure, catalysis, and inhibition of *O*/Chi-h, the lepidoptera-exclusive insect chitinase[J]. J Biol Chem, 2017, 292(6): 2080-2088.
- [18] CHEN W, QU M, ZHOU Y, et al. Structural analysis of group II chitinase (ChtII) catalysis completes the puzzle of chitin hydrolysis in insects[J]. J Biol Chem, 2018, 293(8): 2652-2660.
- [19] DONG F, WANG J, DENG R, et al. Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus gene Ac81 is required for nucleocapsid envelopment[J]. Virus Research, 2016, 221: 47-57.
- [20] CHEN Q, CHEN W, KUMAR A, et al. Crystal structure and structure-based discovery of inhibitors of the nematode chitinase *Ce*ChtI[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(11): 3519-3526.
- [21] CHEN W, WANG D, KE S, et al. A soybean cyst nematode suppresses microbial plant symbionts using a lipochitooligosaccharidehydrolysing enzyme[J]. Nat Microbiol, 2024, 9(8): 1993-2005.
- [22] JIANG X, KUMAR A, LIU T, et al. A novel scaffold for developing specific or broad-spectrum chitinase inhibitors[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 2016, 56(12): 2413-2420.
- [23] DUAN Y, LIU T, ZHOU Y, et al. Glycoside hydrolase family 18 and 20 enzymes are novel targets of the traditional medicine berberine[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(40): 15429-15438.
- [24] DONG Y, HU S, JIANG X, et al. Pocket-based lead optimization strategy for the design and synthesis of chitinase inhibitors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(13): 3575-3582.
- [25] HAN Q, WU N, LI H L, et al. A piperine-based scaffold as a novel starting point to develop inhibitors against the potent molecular target *O*/ChtI[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(27): 7534-7544.
- [26] HAN Q, WU N, ZHANG J, et al. Discovery of rhodanine inhibitors targeting *O*/ChtI based on the  $\pi$ -stacking effect and aqueous solubility[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(48): 18685-18695.
- [27] HAN Q, ZI Y J, FENG T Y, et al. Vital residues-orientated rational design of butenolide inhibitors targeting *O*/ChtI[J]. Medicinal Chemistry Research, 2024, 33(5): 740-747.
- [28] ROYER V, FRAICHARD S, BOUHIN H. A novel putative insect chitinase with multiple catalytic domains: hormonal regulation during metamorphosis[J]. Biochemical Journal, 2002, 366(3): 921-928.
- [29] CHEN W, ZHOU Y, YANG Q. Structural dissection reveals a general mechanistic principle for group II chitinase (ChtII) inhibition[J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(24): 9358-9364.
- [30] LU Q, XU L, LIU L, et al. Lynamycin B is a potential pesticide by acting as a lepidoptera-exclusive chitinase inhibitor[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(47): 14086-14091.
- [31] DONG L, SHEN S, JIANG X, et al. Discovery of azo-aminopyrimidines as novel and potent chitinase *O*/Chi-h inhibitors via structure-based virtual screening and rational lead optimization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(38): 12203-12210.
- [32] ZHAO Z, XU Q, CHEN W, et al. Rational design, synthesis, and biological investigations of *N*-methylcarbamoylguanidinyl azamacrolides as a novel chitinase inhibitor[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(16): 4889-4898.
- [33] PANG Z, XIE H, JIANG X, et al. Discovery of sennidin B as a potent multitarget inhibitor of insect chitinolytic enzymes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(19): 11661-11669.
- [34] JIANG Z, SHI D, LI H, et al. Rational design and identification of novel piperine derivatives as multichitinase inhibitors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(33): 10326-10336.
- [35] HAN Q, WU N, LIU Y Y, et al. Piperonyl-tethered rhodanine derivatives potently inhibit chitinolytic enzymes of *Ostrinia furnacalis*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(24): 7387-7399.
- [36] DING Y, CHEN S, LIU H, et al. Discovery of multitarget inhibitors against insect chitinolytic enzymes via machine learning-based virtual screening[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(23): 8769-8777.
- [37] ZOU R, LI X, JIANG X, et al. Novel butenolide derivatives as dual-chitinase inhibitors to arrest the growth and development of the Asian corn borer[J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(9): 5036-5045.

(下转第20页)

- secreted fungal chitinases that suppress chitin-triggered immunity [J]. *Plant Cell*, 2021, 33(4): 1319-1340.
- [25] YANG W J, XU K K, YAN X, et al. Functional characterization of chitin deacetylase 1 gene disrupting larval-pupal transition in the drugstore beetle using RNA interference[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2018, 219:10-16.
- [26] ZHOU Y, ZHANG Y, XU K, et al. Chitin deacetylase 1 gene as an optimal rnai-based target for controlling the tomato leaf miner *Tuta absoluta*[J]. *Insects*, 2024, 15: 838.
- [27] WANG C Y, CHENG J, LYU Z H, et al. Chitin deacetylase 1 and 2 are indispensable for larval-pupal and pupal-adult molts in *Heortia vitessoides* (Lepidoptera: Crambidae)[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2019, 237: 110325.
- [28] YANG Y, FAN P, LIU J, et al. *Thinopyrum intermedium* TiAP1 interacts with a chitin deacetylase from *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* and increases the resistance to BGT in wheat [J]. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20(3): 454-467.
- [29] JEONG G J, KHAN F, TABASSUM N, et al. Chitinases as key virulence factors in microbial pathogens: understanding their role and potential as therapeutic targets[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 249: 126021.
- [30] 庄钰鑫, 刘慧泉, 许铭. 真菌几丁质酶研究进展[J]. *微生物学报*, 2024, 64 (11): 4022-4035.
- [31] XUAN C, FENG M, LI X, et al. Genome-wide Identification and expression analysis of chitinase genes in watermelon under abiotic stimuli and *Fusarium oxysporum* infection[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(1): 638.
- [32] DIAZ R E, ECKER A K, CORREY G J, et al. Structural characterization of ligand binding and pH-specific enzymatic activity of mouse acidic mammalian chitinase[J]. *Elife*, 2024, 12: 89918.
- [33] MUN S, NOH M Y, GEISBRECHT E R, et al. Chitin deacetylases are necessary for insect femur muscle attachment and mobility[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(24): e2120853119.
- [34] CHEN Y, SHI Y, WANG Z, et al. dsRNAEngineer: a web-based tool of comprehensive dsRNA design for pest control[J]. *Trends Biotechnol*, 2025, 43(4): 969-983.
- [35] HE L, ZHOU Y, MO Q, et al. Spray-induced gene silencing in phytopathogen: mechanisms, applications, and progress[J]. *Advanced Agrochem*, 2024, 3(4): 289-297.
- [36] RILEY A T, ROBSON J M, ULANOVA A, et al. Generative and predictive neural networks for the design of functional RNA molecules[J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 4155.
- [37] TANING C N T, CHRISTIAENS O, LI X, et al. Engineered flock house virus for targeted gene suppression through RNAi in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) in vitro and in vivo[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 805.
- [38] LI M, MA Z, PENG M, et al. A gene and drug co-delivery application helps to solve the short life disadvantage of RNA drug [J]. *Nano Today*, 2022, 43: 101452.
- [39] NINO-SANCHEZ J, SAMBASIVAM P T, SAWYER A, et al. BioClay™ prolongs RNA interference-mediated crop protection against *Botrytis cinerea*[J]. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64: 2187-2198.
- [40] ZHANG Z, LUO H, ZHANG X, et al. Extracellular vesicles mimetic design of membrane chimeric nanovesicles for dsRNA delivery in spray-induced gene silencing for crop protection [J]. *ACS Nano*, 2024, 18(47): 32468-32480.
- [41] TANING C N, ARPAIA S, CHRISTIAENS O, et al. RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market[J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(3): 841-845.
- [42] MCGRUDDY R A, SMEELE Z E, MANLEY B, et al. RNA interference as a next-generation control method for suppressing *Varroa destructor* reproduction in honey bee (*Apis mellifera*) hives [J]. *Pest Manag Sci*, 2024, 80: 4770-4778.
- [43] HE L, HUANG Y, TANG X. RNAi-based pest control: production, application and the fate of dsRNA[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 1080576.
- [44] OECD. Considerations for the environmental risk assessment of the application of sprayed or externally applied dsrna-based pesticides [R]. Paris: OECD, 2020.
- [45] DIETZ-PFEILSTETTER A, MENDELSON M, GATHMANN A, et al. Considerations and regulatory approaches in the USA and in the EU for dsRNA-based externally applied pesticides for plant protection[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 682387.

(编辑:顾林玲)

(上接第 12 页)

5046.

- [38] CHEN J, SHI D, JIANG Z, et al. Novel conjugated 5-alkenyl rhodanine tethered 1,4-benzodioxane derivatives as dual-chitinases inhibitors to hinder the growth of Asian corn borer[J]. *Medicinal Chemistry Research*, 2025, 34(4): 882-894.
- [39] SHI D, JI X, ZOU R, et al. Novel 5-alkenylthiothiazolidinone scaffold discovery as multi-chitinases inhibitors to arrest the molting of Asian corn borer[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2025, 1321: 140058.
- [40] JIANG Z, SHI D, FU H, et al. Discovery of multi-chitinase inhibitors cinnamyl thiazolidinone compounds as candidates for insect growth regulators via ligand-based optimization strategies [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 306: 141805.
- [41] AI Y, ZHANG Y, CHEN W, et al. Glycosyl structure guided design, synthesis and biological accessment of chitin degrading enzyme inhibitors with insecticidal activity[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2025, 1339: 142457.
- [42] CHEN W, QI C, ASHUTOSH K, et al. Structure-based virtual screening of highly potent inhibitors of the nematode chitinase *CeCht1*[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2021, 36(1): 1198-1204.
- [43] JIN X, SUN T, ZHANG X, et al. Structure-based virtual screening of natural products and optimization for the design and synthesis of novel *CeCht1* inhibitors as nematicide candidates[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(1): 244-254.

(编辑:顾林玲)