

分类号: Q78

密 级:

单位代码: 10422

学 号: 202012543



山东大学

SHANDONG UNIVERSITY

硕士学位论文

Thesis for Master Degree

论文题目: 20-羟基蜕皮酮促进凋亡诱导因子 1 切割引起
线粒体自噬和细胞凋亡

20-Hydroxyecdysone promotes cleavage of apoptosis-inducing
factor 1 to cause mitophagy and apoptosis

作 者 姓 名	黄真
培 养 单 位	生命科学学院
专 业 名 称	生物化学与分子生物学
指 导 教 师	赵小凡 教授
合 作 导 师	

2023 年 5 月 18 日

摘要

研究背景和科学问题:

凋亡诱导因子 (Apoptosis-inducing factor, AIF) 在生物体中发挥双重功能, 其全长蛋白定位在线粒体内膜, 参与电子传递链合成能量, 维持线粒体稳态, 其降解后的 C 末端片段进入细胞核与 DNA 内切酶结合并形成凋亡复合体, 结合并切割 DNA 导致染色体降解, 导致细胞凋亡。目前对于调控 AIF 片段化的上游因子知之甚少。完全变态昆虫在发育过程中经历组织重塑, 幼虫组织发生自噬和凋亡, 成虫组织增殖, 这一过程受到类固醇激素 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 的调控。已知 20E 诱导自噬并通过激活半胱氨酸蛋白水解酶 (Cysteine/aspartate specific proteinase, CASP) 转向凋亡, 但 20E 对 AIF 的调控及对细胞命运的影响未见报道, 且 20E 对线粒体稳态的调控机制也未被完全阐明。本研究以重大农业害虫棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*, *H. armigera*) 为模型, 探讨 20E 对 AIF 的调控在组织重塑中的作用及分子机制, 丰富线粒体稳态调控及其生物学意义的相关知识。

研究结果:

1. 利用生物信息学方法在棉铃虫基因组中鉴定到了三种 AIF: AIF1(XP_049697456.1)、AIF2(XP_049697520.1)和 AIF3(XP_021182458.1)。AIF1 在变态期脂肪体内高表达, 因此选定为本论文的研究靶标。
2. 制备了抗 AIF1 兔源多克隆抗体, 发现 AIF1 在取食期表皮为全长 AIF 形式(full length-AIF1, f-AIF1), 在变态期中肠则是被截短的 AIF1 (cleaved-AIF1, c-AIF1), 在脂肪体中, 取食阶段为 f-AIF1 形式, 变态阶段为 c-AIF1 形式。
3. 免疫组织荧光实验发现 AIF1 定位在取食期脂肪体细胞质中, 在变态期转位至细胞核。
4. 在棉铃虫表皮(*H. armigera* epidermal cell line, HaEpi)细胞系中过表达 f-AIF1-RFP-His, 发现 20E 以不依赖于自噬的方式诱导定位在线粒体中的 f-AIF1 降解为 c-AIF1, 引起线粒体自噬, 并诱导 c-AIF1 转位到细胞核, 引起细胞凋亡。
5. f-AIF1 仅在取食期表达, c-AIF1 仅在变态期表达, 因此通过虫体 RNA 干扰实验, 分别在取食期和变态期敲降 *Aif1*。发现取食期 f-AIF1 缺失导致 ATP 合成下降、发育迟缓、线粒体自噬和虫体死亡。而变态期 c-AIF1 缺失则导致脂肪体细胞凋亡水平下降。
6. 通过软件分析发现 *Aif1* 启动子区存在与叉头盒转录因子 O (Forkhead box transcription factor O, FOXO) 结合元件 (FOXO-binding element, FOXOEB, 序列 5'-TTGTTTAC-3')序列, 通过双荧光素酶报告实验证明 20E 通过转录因子 FOXO 诱导 *Aif1* 转录。

结论: 取食期 f-AIF1 定位在线粒体中, 参与 ATP 合成, 维持线粒体稳定,

抑制自噬。变态期，20E 通过转录因子 FOXO 促进 *Aif1* 表达，并使 f-AIF1 裂解为 c-AIF1，导致线粒体失稳而自噬。c-AIF1 进入细胞核导致细胞凋亡。

意义：该研究发现了类固醇激素 20E 促进 *Aif1* 转录并使 AIF 片段化，同时引起线粒体自噬和细胞凋亡，为研究自噬调控提供了新的知识，为害虫防治提供了新的靶标基因。

关键词：凋亡诱导因子；20-羟基蜕皮酮；自噬；线粒体自噬；凋亡；脂肪体

ABSTRACT

Research background and existing scientific questions:

Apoptosis-inducing factor (AIF) plays a dual role in organisms. The full-length expression of AIF is located in the mitochondrial inner membrane and participates in the synthesis of energy in the electron transport chain to maintain mitochondrial homeostasis. The degraded C-terminal fragment enters the nucleus and binds with DNA endonuclease to form apoptotic complex, which binds and cleaves DNA to cause chromosome degradation and apoptosis. However, the upstream factors which regulating AIF fragmentation are poorly studied. Complete metamorphosis insects undergo tissue remodeling during development. The larval tissues undergo autophagy and apoptosis, while the adult tissues proliferate. This process is regulated by the steroid 20-hydroxyecdysone (20E). It is known that 20E induces autophagy and leads to apoptosis by activating Cysteiny aspartate specific proteinase (CASP). However, the regulation of 20E on AIF and its effects on cell fate have not been reported. Moreover, the regulatory mechanism of 20E on mitochondrial homeostasis has not been fully elucidated. In this study, *Helicoverpa armigera* (*H. armigera*), the cotton bollworm, a major agricultural pest, was used as a model to explore the role and molecular mechanism of 20E regulation of AIF in tissue remodeling, and to enrich the knowledge of mitochondrial homeostasis regulation and its biological significance.

Research results:

1. Bioinformatics method was used to identify three AIFs in the genome database of *Helicoverpa armigera*: AIF1(XP_049697456.1)、AIF2(XP_049697520.1) and AIF3(XP_021182458.1). AIF1 was highly expressed in fat body during metamorphosis. Therefore, it is selected as the research target of this thesis. 2. Rabbit polyclonal antibody against AIF1 was acquired. AIF1 expressed full length-AIF1 (f-AIF1) in epidermis during feeding stage. Cleaved-AIF1 (c-AIF1) was detected in midgut during metamorphosis. In fat body, f-AIF1 expressed during the feeding stage, and c-AIF1 expressed during metamorphosis. 3. Tissue immunofluorescence experiments showed that in fat body, AIF1 was localized in the cytoplasm during feeding stage and was translocated to the nucleus during metamorphosis. 4. Overexpression of f-AIF1-RFP-His in *H. armigera* epidermal cell line (HaEpi) showed that 20E induced the degradation of f-AIF1 which localized in mitochondria to c-AIF1 in an autophagy independent manner, induced mitophagy. and c-AIF1 translocation to the nucleus to

induce cell apoptosis.5. Because f-AIF1 was only expressed at feeding stage, and c-AIF1 was only expressed at metamorphosis stage. *Aif* was knocked down at feeding stage and metamorphosis stage respectively by RNA interference experiments to study its dual roles. The result shows that f-AIF1 deficiency would lead to insufficient ATP synthesis, developmental retardation, mitophagy and death. c-AIF1 deficiency resulted in decreased apoptosis of fat body cells. 6. The same sequence of AIF1 promoter region as Forkhead box transcription factor O (FOXO) binding element (FOXOEB, sequence 5'-TTGTTTAC-3') was predicted by software, and the results of dual-luciferase reporter showed that 20E induced the increase of AIF1 expression through the downstream transcription factor FOXO.

Conclusion:

f-AIF1 was located in mitochondria during feeding stage, involved in ATP synthesis, maintained mitochondrial stability, and inhibited autophagy. During metamorphosis stage, 20 promoted the expression of *Aif1* through the transcription factor FOXO, and f-AIF cleaves to c-AIF, leaving mitochondria, leading to mitochondrial instability and mitophagy. c-AIF enters the nucleus and leads to a shift from autophagy to apoptosis.

Significance:

This study found that steroid hormone 20E can promote *Aif* transcription and AIF fragmentation, causing mitophagy and apoptosis. It provides new knowledge for the study of autophagy regulation, and provides target genes for pest control.

Key words: Apoptosis-inducing factor; 20-hydroxyecdysone; Autophagy; Mitophagy; Apoptosis; Fat body

目 录

1 前言.....	1
1.1 凋亡诱导因子.....	1
1.1.1 凋亡诱导因子家族.....	1
1.1.2 凋亡诱导因子参与氧化磷酸化产生 ATP	2
1.1.3 凋亡诱导因子诱导凋亡.....	2
1.2 自噬与凋亡.....	4
1.2.1 自噬.....	4
1.2.2 线粒体自噬.....	5
1.2.3 凋亡.....	5
1.2.4 自噬与凋亡的关系.....	6
1.3 完全变态昆虫的脂肪体重塑	7
1.4 20E 信号途径	8
1.5 本论文的科学问题及研究方案	9
2 20-羟基蛻皮酮诱导凋亡诱导因子 1 的降解引起线粒体自噬和细胞 凋亡	10
2.1 引言.....	10
2.2 实验材料.....	11
2.2.1 实验动物.....	11
2.2.2 实验试剂.....	11
2.2.3 实验仪器.....	11
2.3 实验方法.....	12
2.3.1 生物信息学分析.....	12
2.3.2 虫体 RNA 提取	12
2.3.3 虫体基因组 DNA 的提取	12
2.3.4 cDNA 合成	12
2.3.5 基因克隆.....	13
2.3.6 PCR 产物酚-氯仿抽提.....	13
2.3.7 QRT-PCR	13
2.3.8 兔源多克隆抗体的制备.....	14
2.3.9 免疫印迹.....	14
2.3.10 脂肪体细胞的观察及免疫荧光.....	15
2.3.11 细胞重组质粒的构建.....	15
2.3.12 自噬流和凋亡检测.....	15
2.3.13 免疫细胞化学.....	15

2.3.14 虫体干扰.....15

2.3.15 ATP 含量检测.....16

2.3.16 20E 虫体激素刺激.....16

2.3.17 Luciferase 检测.....16

2.3.18 统计.....16

2.4 结果.....17

2.4.1 棉铃虫 AIF 的鉴定.....17

2.4.2 AIF1 原核表达及抗体制备.....19

2.4.3 AIF1 在变态期中肠和脂肪体表达量增加.....20

2.4.4 AIF1 取食期定位于细胞质,变态期定位在细胞核.....21

2.4.5 20E 诱导 f-AIF1 片段化为 c-AIF1 和核移位.....22

2.4.6 f-AIF1 抑制线粒体自噬.....23

2.4.7 f-AIF1 维持线粒体稳定和 ATP 的产生.....25

2.4.8 c-AIF1 入核促进细胞凋亡.....27

2.4.9 变态期间 20E 上调 AIF1 的表达.....28

2.5 讨论.....30

2.5.1 AIF 的双功能及调控.....30

2.5.2 AIF 的转录调控.....31

2.5.3 AIF 诱导的线粒体自噬与凋亡.....31

2.6 结论.....32

参考文献.....34

符号说明

表 1-1 符号说明

Tab.1-1 Symbol description

缩略语	英文全称	中文全称
20E	20-hydroxyecdysone	20-羟基蜕皮酮
AIF	Apoptosis-inducing factor	凋亡诱导因子
<i>H. armigera</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	棉铃虫
f-AIF1	full length-AIF1	AIF1 全长
c-AIF1	cleaved-AIF1	被裂解的 AIF1
AMID	AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of death	AIF 同源线粒体相关死亡诱导物
AIFL	AIF-like	类凋亡诱导因子
MLS	Mitochondrial localization signal	线粒体定位信号
IMSS	Inner membrane sorting signal	内膜分选信号
TM	Transmembrane	跨膜
FAD	Flavin adenine dinucleotide	黄素腺嘌呤二核苷酸
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	还原型烟酰胺腺嘌呤核苷酸
WAH-1	Worm AIF homolog	蠕虫 AIF 同源体
ATG	Autophagy-related	自噬相关
LC3	Low complexity communications codec	低复杂度通信编解码器
CASP	CysteinyI aspartate specific proteinase	半胱氨酸蛋白水解酶
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
FOXO	Forkhead box O	叉头盒转录因子 O
FOXOBE	FOXO-binding element	FOXO 结合元件
<i>dsRNA</i>	Double-stranded RNA	双链 RNA
ATP	Adenosine-triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
AMP	Adenosine monophosphate	单磷酸腺苷

续表 1-1 符号说明

Tab.1-1 Symbol description(continued)

缩略语	英文全称	中文全称
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP 依赖性蛋白激酶
GPCR	G protein-coupled receptor	G 蛋白偶联受体
PBS	Phosphate-buffer saline	磷 T 酸缓冲盐溶液
TBS	Tris Buffered saline	Tris-HCl 缓冲盐溶液
kDa	Kilodalton	千道尔顿
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
HaEpi	<i>H. armigera</i> epidermal cell line	棉铃虫表皮细胞系
h	Hour (s)	小时
min	Minute (s)	分钟

1 前言

1.1 凋亡诱导因子

1.1.1 凋亡诱导因子家族

凋亡诱导因子 (Apoptosis-inducing factor, AIF) 是一种双功能线粒体蛋白, 既参与线粒体能量代谢[1], 又诱导细胞核非半胱天冬氨酸蛋白酶 (Cysteine/aspartate specific proteinase, CASP) 依赖的凋亡[2]。在哺乳动物细胞中, AIF 家族主要包括 AIF、AMID (AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of death)、AIFL (AIF-like), 分别由 *Aifm1*、*Aifm2*、*Aifm3* 基因编码[3], AIFL 又被称为 AIF3。

AIF 可以通过多种组织特异性剪接产生各种变体, 其中 AIF1 在所有组织中均有普遍表达。AIF1 在细胞质中翻译, 在其 N 端线粒体定位信号 (Mitochondrial localization signal, MLS) 的帮助下导入细胞的线粒体, MLS 的 C 端含有内膜分选信号 (Inner membrane sorting signal, IMSS) 以及跨膜 (Transmembrane, TM) 区域, 确保蛋白对线粒体内膜的正确靶向[2]。在进入线粒体后, MLS 的 N 端甲硫氨酸残基 53 位点后被线粒体肽酶水解。锚定在线粒体内膜的 AIF1 面向膜间隙, 通过加入其辅助因子黄素腺嘌呤二核苷酸 (Flavin adenine dinucleotide, FAD) 形成成熟的折叠构型。AIF1 具有 FAD 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 结合片段, 与细菌 NADH 依赖的氧化酶具有强同源性, 具有氧化活性。AIF1 的 C 端为促凋亡结构域, 通过招募多种核酸酶形成凋亡复合物, 切割 DNA 使染色质凝缩[4,5]。AIFsh (AIF short) 是 AIF 的一种短变体, 其转录起始位点位于 *Aifm1* 的第九个内含子内, 该变体缺乏酶结构域, 但保留了 C 端促凋亡片段。在动物细胞中转染表达 AIFsh 可导致其在细胞核中积累并引发细胞凋亡。AIF 的另一种变体包含一个终止密码子, 维持保守的线粒体定位和氧化酶功能, 但缺乏 C 端促凋亡结构域。AIF 的第三种变体 AIFsh3 缺乏线粒体定位信号, 但在其他方面功能类似于 AIFsh2[6]。

AMID 在人类中由位于 10 号染色体上的 *Aifm2* 编码, 其 N 端没有 MLS, 从而无法进入线粒体, 它使用辅助因子 6-羟基 FAD 而不是 FAD 来提高其氧化酶活性[7]。在细胞核中, DNA 结合 AMID 的同时阻止还原性辅酶 NADH 与 AMID 结合[8]来抑制酶活性。此外, 它被肿瘤抑制基因 p53 转录激活, 在肿瘤细胞中表达量降低, 成为肿瘤检测指标之一[9]。AIFL 在人类中由位于 22 号染色体上的

Aifm3 编码, 在脑、结肠、心脏、肾、肝等组织中普遍表达, 除了发挥氧化酶活性外, AIFL 还具有一个典型的 Rieske 结构域, 此结构域通过电子转移释放细胞色素 c 和激活 CASP3 导致线粒体去极化, 增加线粒体膜通透性从线粒体中释放诱导凋亡, 但不进入细胞核[10]。

1.1.2 凋亡诱导因子参与氧化磷酸化产生 ATP

氧化磷酸化是能量合成最主要的生物化学过程, 体内的糖、脂质、蛋白质等物质转化释放大电子, 通过电子传递驱动 ATP 的合成。在正常细胞中, AIF 被锚定在线粒体内膜上, 发挥氧化还原酶活性, 参与电子传递链, 严格控制其与辅因子的相互作用维持构象稳定[11,12], 但其靶向的底物目前仍不清楚。已发表的数据表明, 小鼠中 AIF 的缺失导致肌肉损伤, 复合体 I 数量明显减少。在一些细胞或组织中, 也检测到复合物 III 和 IV 的功能障碍[6]。在线虫中也发现, AIF 的同源基因 WAH-1 (Worm AIF homolog) 的下调也会损害氧化磷酸化的功能, 并缩短个体寿命[13]。在人类中, AIF 是稳定氧化还原酶 CHCHD4 (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 4) 功能必不可少的, 两者发生物理作用[14,15]。CHCHD4 是酵母线粒体膜间隙输入和组装蛋白质 Mia40 (Mitochondrial import and assembly 40) 的人类同源物, 它依赖 NADH 在线粒体中的氧化还原状态的改变驱动携带半胱氨酸残基的蛋白进入线粒体, 帮助呼吸链复合体的正确生物生成[16-18]。人类 AIF 基因突变导致 Cowchock 综合征, 表现为耳聋和认知障碍[19], 与呼吸链复合体表达和功能降低有关[20,21]。

AIF 除了参与线粒体内膜中蛋白质的导入过程外, 还可能包含调节线粒体内膜结构稳定性的其他功能片段。在小鼠中, AIF 的缺失会导致线粒体网络破碎和皮层神经元嵴的异常[22]、生长迟缓、毛发脱落、共济失调和失明[23,24]。肌肉特异性凋亡诱导因子的丢失也会导致线粒体功能障碍、骨骼肌萎缩和扩张型心肌病[25]。此外, AIF 缺失小鼠还表现出 T 细胞信号的阻断, 通过表达携带野生型 NADH 氧化酶结构域的重组 AIF 蛋白恢复信号传递[26]。这些研究表明, AIF 的氧化还原酶活性在细胞存活过程中发挥重要的作用。此外, AIF 是肥胖和糖尿病易感性的重要调节因子[27]。AIF 缺失会导致氧化磷酸化功能受阻[28], 对糖酵解 ATP 生成的依赖性增强, 导致乳酸产量高, 引起上游代谢紊乱。

1.1.3 凋亡诱导因子诱导凋亡

在酵母、丝状真菌、线虫、苍蝇和哺乳动物的整个真核生物系统发育过程中, AIF 都参与了凋亡的执行[29]。细胞凋亡诱导后, AIF 从线粒体转移到细胞质和细胞核。当细胞受到兴奋毒素、烷基化 DNA 损伤剂或 ROS 刺激时, AIF 会转移

至细胞核促进细胞凋亡。在这个过程中减轻 ROS 引起的氧化应激[30]。

AIF 介导两种凋亡模式，在谷氨酸兴奋毒性诱导的凋亡中，聚 ADP 核糖聚合酶产生的 Poly(ADP-ribose)聚合物促使位于线粒体外膜的 AIF 如 AMID 或 AIFsh 释放，称为 parthanatos[31]；而在烷基化 DNA 损伤介导的凋亡过程中，位于线粒体内膜的 AIF 水解入核，水解过程的主要因子有两类：(1)半胱氨酸蛋白酶的两大家族：钙蛋白酶[32]和组织蛋白酶 [33]。钙蛋白酶在 Ca^{2+} 依赖的条件下调节 AIF 的裂解，而 Ca^{2+} 不参与组织蛋白酶介导的 AIF 激活；(2)来自 Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) 家族的促凋亡分子的激活[34], Bcl-2 家族引起线粒体外膜通透性增加，但具体释放机制并未完全阐明。这两类水解过程不一定是独立的，因为一些促凋亡的 Bcl-2 蛋白可以被半胱氨酸蛋白酶激活[33]。在细胞质中，AIF 激活细胞膜中的脂质转移酶，使细胞膜中的磷脂酰丝氨酸暴露，释放早期凋亡信号[2]。在秀丽隐杆线虫中，AIF 同源基因 WAH-1 也可以促进凋亡细胞表面磷脂酰丝氨酸外化[35]。此外，在真核生物中，Kim 等人[36]发现了真核翻译起始因子 3 亚基 g (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g, eIF3g) 的 N 端和 AIF 的 C 端区域之间具有相互作用，从而在胞质中抑制正常的蛋白质翻译。AIF 的入核过程受到热休克蛋白(Heat shock70, Hsp70) 的抑制[37]。AIF 介导凋亡的过程如图 1-1 所示。

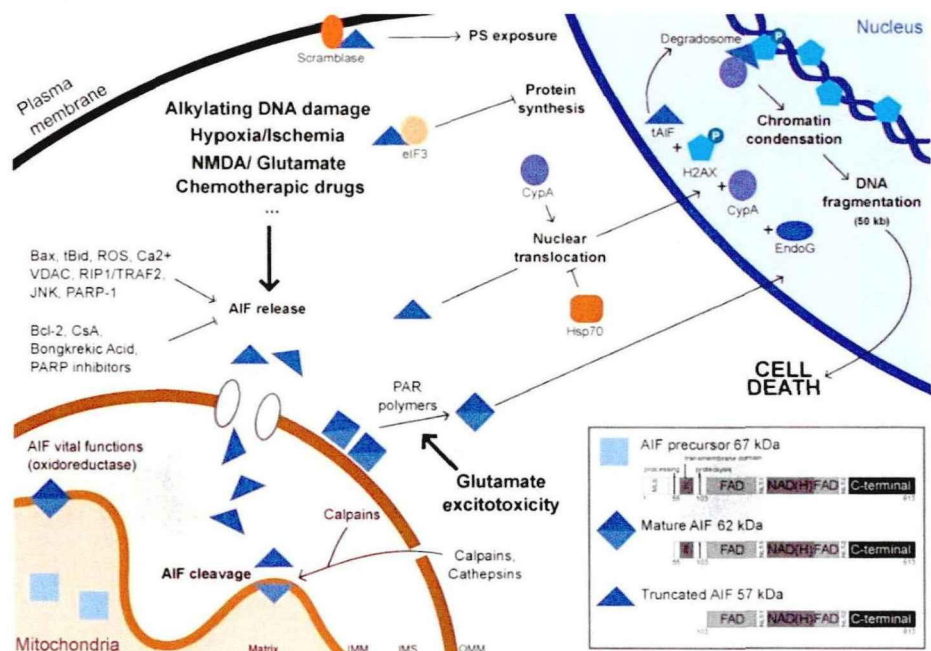


图 1-1 AIF 介导凋亡 [38]

Fig. 1-1 AIF mediates apoptosis [38]

由于 AIF 本身不显示任何内切酶活性，AIF 介导的 DNA 降解依赖于下游核酸酶的募集。在细胞核中，AIF 招募非特异性核酸内切酶并调节其活性，包括磷

酸化组蛋白 H2AX[5]、亲环素 A [39]或内切酶 G (Endonuclease G, EndoG)[40], 形成凋亡复合体, 其中, EndoG 也经历线粒体-核易位过程。凋亡复合体结合 DNA, 直接切割染色体, 引起 DNA 断裂, 诱导不依赖 CASP 的凋亡[41]。AIF 表面携带带负电荷的氨基酸[4], 确保其与 DNA 直接作用。在无细胞系统中, AIF 氧化还原活性所需的 FAD 部分的化学失活不会阻断其凋亡功能[42], 且在转染试验中, FAD、NADH 结合位点的突变也不会影响凋亡功能[43]。因此, AIF 的凋亡活性不依赖于其 NADH 氧化酶活性。而 DNA 结合所需的氨基酸残基突变会使 AIF 的凋亡活性消失。在果蝇中, 已经发现氧化还原蛋白硫氧还蛋白-2 的下调抑制了 AIF 介导的细胞凋亡[44]。

1.2 自噬与凋亡

1.2.1 自噬

自噬是细胞内物质被运送到动物细胞溶酶体或植物和酵母细胞的液泡并在其中降解的过程, 为细胞更新和内稳态产生新的物质如新蛋白质的合成、糖异生和能量的产生[45], 自噬分三类:巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬[46]。其中, 巨自噬(以下简称自噬)包括选择性自噬和非选择性自噬, 其中, 选择性自噬根据吞噬物的不同分为线粒体自噬、溶酶体自噬、脂自噬等。自噬利用细胞器膜结构如内质网、高尔基复合体、线粒体膜或细胞膜的额外膜包裹待降解物形成自噬体, 自噬体与溶酶体融合成为自溶酶体[47-49], 并降解其中包含的物质。微自噬是指溶酶体本身通过溶酶体膜内陷吞噬细胞质的降解成分。分子伴侣介导的自噬顾名思义是由分子伴侣与降解蛋白结合转运至溶酶体[50]。

在自噬过程中, 多种 ATG (Autophagy-related) 蛋白调控自噬体的形成。其中, ATG1-10, 12-14, 16 和 18 是自噬体形成所必需的, 被称为核心 ATG 蛋白[51], 在真核生物中高度保守[52]。在营养丰富的条件下, mTOR 复合物 1 抑制 ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1) 复合物(酵母中为 ATG1)。在营养物质如氨基酸、生长因子、氧气和能量缺乏的条件下, 自噬发生[53]。其中氮或氨基酸的缺乏在酵母和培养的哺乳动物细胞中诱导最高水平的自噬[54]。自噬诱导后, ATG13 将 ULK1 复合物锚定在一个前自噬体结构上, 招募几乎所有的 ATG 蛋白, 形成吞噬泡[47]。多个 ATG 蛋白协同生成隔离膜[55], 并包裹和吞噬部分细胞质和细胞器。最后在 ATG12-ATG5 偶联途径和 ATG8/LC3 (Low complexity communications codec 3) 偶联系统的介导下, 形成封闭有双层膜结构的自噬体[56], 接着与溶酶体融合形成自噬溶酶体。

LC3 会被 ATG4 剪切暴露甘氨酸残基产生 LC3-I, 定位于细胞质中, 自噬发

生时, LC3-I 被 ATG7、ATG3 等泛素化修饰后与磷脂酰乙醇胺相偶联, 形成 LC3-II, 定位于自噬体膜上。自噬体和溶酶体融合后, 外膜上的 LC3-II 被 ATG4 切割, 产生 LC3-I 循环利用, 内膜上的 LC3-II 被溶酶体酶降解, 因此, LC3-II 成为检测自噬的重要指标。

1.2.2 线粒体自噬

线粒体是双层膜结构的细胞器, 是 ATP 合成的主要场所, 同时也参与磷脂生物合成与运输、钙信号传递、铁稳态、细胞凋亡和先天免疫反应等基本过程[57-60]。由于电子传递链产生活性氧, 致使线粒体不断受到氧化应激的挑战, 最终可能导致其结构和功能失活[61]。“线粒体自噬”一词于 2005 年首次提出[62], 是指自噬系统将受损的线粒体运送到溶酶体进行降解, 最终维持多种细胞类型的线粒体的数量和活性[63], 是维持细胞结构和功能的细胞器特异性自噬之一[64]。在大脑、骨骼肌、心脏、肝脏等需要大量 ATP 的组织中, 线粒体高度发达以维持能量需求。当这些细胞在缺氧条件下时, 线粒体自噬被诱导以减少线粒体数量, 适应厌氧条件[65]。此外, 在人类中, 线粒体自噬缺陷导致多种疾病, 如帕金森病、心力衰竭、癌症和衰老[66]。

在线粒体自噬中, 丝氨酸-苏氨酸激酶 (PTEN-induced putative kinase1, Pink1) 和 E3 泛素连接酶 Parkin 发挥重要功能, 同时这两者也被确定为帕金森病的隐性致病基因[67]。损伤的线粒体膜去极化, 触发 Parkin 聚集[68]。Pink1 定位在线粒体, 直接磷酸化并激活 Parkin 在其泛素化结构域的丝氨酸 65 位点[69], 招募 p62 等自噬因子[70], 这些自噬因子招募带有 LC3 的吞噬膜[71], 最终将受损线粒体运送至溶酶体。

1.2.3 凋亡

细胞凋亡是指受损的细胞在基因调控下自主死亡的过程, 凋亡过程中细胞结构发生形态变化以及多种酶依赖的生化过程, 最终以对周围组织损害最小的方式将细胞从体内清除, 也称为程序性细胞死亡[72]。细胞凋亡分为依赖的启动依赖 CASP 的凋亡和不依赖 CASP 的凋亡。CASP 分为起始 CASP 和执行 CASP[73]。一旦检测到细胞损伤, 起始 CASP (CASP 8 和 9) 被激活, 并继续激活执行 CASP (CASP3、6 和 7), 导致 DNA 内切酶的激活、核蛋白和细胞骨架的破坏、蛋白质的交联、吞噬细胞配体的表达和凋亡小体的形成[74,75]。不依赖 CASP 的凋亡主要由 AIF 家族中的 AIF 和 AIMD 诱导[76]。

细胞凋亡过程在多细胞生物中高度保守, 并受基因控制[77]。当细胞内的一些传感器检测到损伤从而启动凋亡的机制被称为内源性凋亡, 由 CASP9 起始,

与凋亡蛋白酶激活因子 1 结合,招募 CASP 组装成凋亡体,引起线粒体通透性改变[78]。线粒体膜通透性增加是凋亡和坏死死亡的关键事件之一,由电压依赖性阴离子通道、腺嘌呤核苷酸易位因子、亲环素 D 和其他分子组成的通道使 Ca^{2+} 依赖性的线粒体膜通透性增加,导致线粒体电极差消失,线粒体膨胀,外膜破裂,最终释放凋亡介质[79]。而由免疫系统细胞与受损细胞之间引起的被称为凋亡的外源性途径,通过 CASP8 的激活诱导凋亡[80]。肿瘤坏死因子超家族中包含多个死亡受体[81],每个死亡受体都有相应的死亡配体,两者结合导致多个单体 CASP8 酶原通过其死亡诱导结构域募集在位于配体上的死亡诱导信号复合物上,导致它们的二聚和激活,诱导细胞凋亡[82,83]。无论细胞凋亡是由内源性途径还是外源性途径引发的,都必须经过严格的调控。在癌症中,各种凋亡启动机制的突变通常会刺激外部通路或抑制增殖,导致细胞生长和分裂不受控制,从而形成良性肿瘤或癌症[84]。过早启动凋亡程序,可导致外周淋巴器官增生、自身免疫性疾病和溃疡性结肠炎[85]。

1.2.4 自噬与凋亡的关系

细胞自噬和凋亡作为组织的存活机制,它们之间存在复杂的关系。在一些情况下,自噬抑制凋亡。癌细胞在缺乏营养的情况下诱导自噬,为细胞提供能量,此时抑制自噬会导致细胞凋亡[86]。在秀丽隐杆线虫发育过程中,自噬相关因子的缺失增加了 CASP 依赖性凋亡水平和凋亡小体的数量[87]。其机制可能是由于自噬的抑制导致生物体物质和能量缺乏,从而引发细胞凋亡[88]。周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p27 是诱导自噬和抑制凋亡的一个关键因子,营养损耗时发生代谢应激导致 ATP 不足,刺激 AMP 依赖性激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 的活性, p27 被磷酸化,使细胞通过自噬存活[88]。而细胞启动刺激的类型决定了哪个过程将占主导地位。营养剥夺过程中主要发生自噬,细胞为产生高 ATP 的抗凋亡代谢状态[89],而未能恢复内稳态将导致凋亡。相比之下, DNA 损伤或死亡受体激活将立即引发凋亡,这个快速的、自我放大的过程使细胞无法再发生自噬。

而在一些细胞环境中,自噬导致细胞凋亡,称为自噬性细胞死亡[90]。神经元特异性敲除 ATG5 或 ATG7 导致神经退行性变和神经元凋亡死亡[91]。在果蝇细胞中过表达 ATG1 导致细胞凋亡,干扰了 ATG3 或 ATG8a 阻止了凋亡的发生[92]。此外,在一些应激条件下,自噬作为主要反应触发细胞凋亡或坏死细胞的死亡。当 T 细胞与表达一型艾滋病病毒编码的包膜糖蛋白的细胞相互作用时,首先发生自噬,然后诱导凋亡,在该模型中, ATG7 的缺失抑制了细胞凋亡[93]。常见细胞应激触发的几种信号转导途径可以同时诱导自噬和凋亡。一般应激介质有

ROS[94], 神经酰胺[95]和 Ca^{2+} 。其中, Ca^{2+} 离子浓度的增加、内质网 Ca^{2+} 外排和线粒体的 Ca^{2+} 过载都构成了显著的促凋亡信号[57], 同时通过激活钙调蛋白依赖性蛋白激酶 β 来引起自噬。

昆虫物种丰富, 是已知生物中种类最多的类群[96], 其中, 完全变态昆虫具有特殊的发育模式, 其发育过程经历卵、幼虫、蛹、成虫四个发育阶段, 期间部分幼虫组织会发生自噬转向凋亡。在果蝇的中肠中, 参与自噬的蛋白如 ATG1、ATG13、ATG9 和 ATG8 是中肠细胞凋亡所必需的[97]。在秀丽隐杆线虫中, 凋亡减少时, 自噬仍可促进细胞死亡[98]。在棉铃虫中也发现 ATG12 的下调阻断了幼虫中肠的降解, 表明自噬是中肠细胞死亡所必需的[99], 且自噬触发组织蛋白酶 D 成熟, 诱导中肠细胞内 CASP3 裂解促进中肠细胞凋亡[100]。有研究发现细胞的死亡是由于细胞成分的大量降解, 溶酶体可能导致细胞自噬死亡[101]。然而, 最终决定自噬走向存活还是凋亡的分子机制还未被完全阐明。

1.3 完全变态昆虫的脂肪体重塑

在完全变态昆虫的变态发育过程中, 多个组织发生了显著的变化, 包括翅芽的增殖, 中肠和脂肪体的重塑等。脂肪体是昆虫特有器官, 与脊椎动物的脂肪组织和肝脏类似[102], 位于昆虫包括体表下和周围器官的多个部位[103], 其形态在物种之间存在差异。脂肪细胞由胚胎祖细胞发育而来, 通过内复制不断繁殖[104,105]。脂肪体的主要任务是合成、运输、积累和释放营养分子, 即蛋白质、脂类和碳水化合物, 以供变态发育时消耗使用[106], 其内部的代谢与其他组织联系密切, 同时也是先天免疫和解毒的主要部位[107]。

完全变态发育的昆虫由幼虫向成虫转化的过程中, 脂肪体在形状、大小和功能上经历了显著的变化, 这一过程被称为脂肪体重塑, 包括幼虫脂肪体细胞的自噬、凋亡和细胞解离以及成虫脂肪体组织的形成[108]。脂肪体组织细胞数量、内复制和营养储存分别决定了幼虫脂肪体的最终大小。两种基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, Mmps) 参与幼虫脂肪体细胞的分离: Mmps 1 负责邻近细胞之间的切割, 而 Mmps 2 降解覆盖在脂肪体组织上的基底膜[109,110], 最终幼虫组织从单层附着的多边形细胞解离成单个、自由漂浮的球形细胞[108]。脂肪体重塑伴随着代谢改变, 特别是脂质和蛋白质的利用[105], 产生营养物质供给成虫组织的生长和分化。成虫脂肪组织可以由剩余的幼虫脂肪体细胞重建[111], 也可以由成虫祖细胞分化生成[105]。成虫脂肪组织在调节成虫活动如合成和分泌卵黄原蛋白和其他雌性生殖所需的蛋白质中, 起着至关重要的作用[106]。

由于脂肪体在调节昆虫幼虫生长、体型、生物钟、蛹滞育等方面的核心作用,

脂肪体已经成为研究代谢、免疫、自噬及凋亡的一个合适的模型。

1.4 20E 信号途径

对于变态发育昆虫，20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 诱导了多种组织的重塑。20E 是一种类固醇激素，由前胸腺产生蜕皮激素前体，进入细胞后加工成 20E，通过下游级联信号触发一系列生化反应，从而诱导昆虫蜕皮变态。

20E 可以与细胞膜受体 GPCR 结合，引起细胞内钙离子的释放，在棉铃虫的中肠中，钙离子浓度的增加使 ATG5 裂解，使细胞由自噬转向凋亡[99]。20E 还可以通过基因组途径传递下游信号(图 1-2)，20E 与其核受体复合物 EcR/USP 结合形成转录复合物，与 ECRE 配体结合域结合，促进下游与变态发育相关的基因的表达，如激素受体 3 (Hormone receptor3, HR3)、Broad 复合物、蜕皮激素诱导的转录因子 E74 (Ecdysone inducible transcription factor74)、E93[112,113]等，促进下游自噬凋亡相关基因的转录。叉头盒 O 类 (Forkhead box O, FOXO) 家族成员是一类多功能转录因子，参与多种代谢过程[114]。在昆虫中，FOXO 是多种激素的下游靶点，在幼虫的取食期，胰岛素引起磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphatidylinositol3-kinase, PI3K) 级联反应，导致 FOXO 的磷酸化，定位于细胞质中，而 20E 诱导下，磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (Phosphatase and tensin homolog, PTEN) 抑制了 FOXO 的磷酸化，使其入核，与 Broad 亚型 7 启动子区的 FOXO 结合元件结合，诱导 ATGs 和 CASPs 的表达[115]。20E 除了在转录水平上直接激活自噬、凋亡相关基因外，还通过缓慢减少食物消耗，诱导类似饥饿条件，也导致自噬和凋亡的启动[116]。

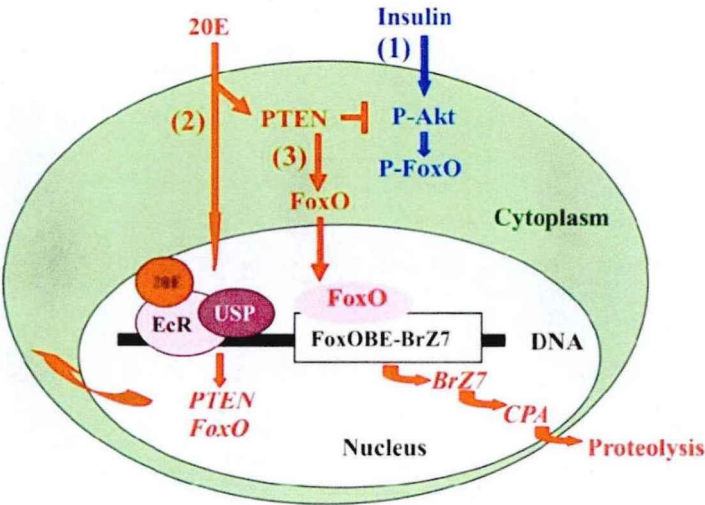


图 1-2 20E 基因组信号途径 [115]

Fig. 1-2 20E genomic signaling pathway [115]

1.5 本论文的科学问题及研究方案

线粒体自噬是细胞选择性吞噬线粒体的过程。AIF 一方面在线粒体中维持其功能稳定,一方面片段化入核促进凋亡,但调控 AIF 片段化的上游因子知之甚少,且 20E 对 AIF 的调控及对细胞命运的影响未见报道,20E 对线粒体稳态的调控机制也未被完全阐明。本文以棉铃虫为研究材料,通过生物信息学分析和 QPCR,筛选在变态期脂肪体中高表达的 AIF1,利用蛋白免疫印迹实验探究 AIF1 在虫体的表达情况;利用免疫组化探究 AIF1 在组织中的定位;利用细胞过表达实验探究 20E 对 AIF1 片段化和亚细胞定位的影响;通过干扰全长 AIF1 探究 AIF1 与自噬的关系,探究 AIF1 在虫体中的功能;用虫体激素刺激和双荧光素酶报告实验探究 20E 在转录水平上对 AIF1 的调控,从而阐明 20E 通过 AIF1 同时促进线粒体自噬和凋亡的分子机制。

2 20-羟基蜕皮酮诱导凋亡诱导因子 1 的降解引起线粒体自噬和细胞凋亡

2.1 引言

凋亡诱导因子 (Apoptosis-inducing factor, AIF) 是一种双功能线粒体蛋白, 对线粒体能量代谢和诱导细胞核非半胱氨酸蛋白水解酶 (Cysteine-specific proteinase, CASP) 独立的凋亡至关重要。AIF 是线粒体氧化磷酸化的重要组成部分, 其 N 端编码线粒体定位信号 (Mitochondrial localization signal, MLS), MLS 的 C 端连接内膜分选信号以确保其正确定位并锚定在线粒体内膜上, 面向膜间隙[8]。AIF 含有黄素腺嘌呤二核苷酸 (Flavin adenine dinucleotide, FAD) 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 结合域, 使其发挥氧化还原酶活性, 在电子传递链中发挥重要作用[10], 同时与辅因子如氧化还原酶 CHCHD4 (Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 4) 相互作用维持线粒体构象稳定。所有 AIF 的 C 端均含有凋亡区, 通过募集多种核酸内切酶形成凋亡复合体使 DNA 断裂[117]。当细胞受到神经毒素、DNA 损伤或 ROS 刺激时, AIF 会被半胱氨酸蛋白酶切割[118]并从线粒体内膜释放出来。进入细胞质的 AIF 可以与真核翻译起始因子 3 亚基 g 等因子结合抑制正常的蛋白质翻译, 也可以使细胞膜中的磷脂酰丝氨酸暴露, 释放早期凋亡信号。AIF 进入细胞核后, 招募和调节、磷酸化组蛋白 H2AX、亲环素 A 或直接切割 DNA 的非特异性核酸内切酶 G (Endonuclease G, EndoG), 形成凋亡复合体, 直接切割染色体, 引起 DNA 断裂, 诱导凋亡[119]。然而, 目前对于调控 AIF 片段化的上游因子知之甚少。

自噬是细胞在能量不足时主动清除受损细胞器的一种生存机制, 部分细胞质和细胞器被分离在特征性的双膜或多膜自噬液泡(自噬体)中, 最后转运到溶酶体中降解[120], 其中, 当营养缺乏时, 受损的线粒体被运送到溶酶体进行降解, 称为线粒体自噬, 最终稳定线粒体的数量和活性, 是维持细胞结构和功能的细胞器特异性自噬之一。自噬通常是一种细胞存活的机制[88], 但也有研究发现自噬可能转向凋亡, 如, 在神经元细胞和昆虫细胞中发现自噬可以诱导凋亡的发生[91]。

脂肪体是昆虫的一种能量生成和储存组织, 脂肪体中含有大量的甘油三酯, 同时发生糖和氨基酸等能量物质的转化[106]。在完全变态昆虫的发育过程中, 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 在各种幼虫组织如中肠和脂肪体中既诱导自噬又诱导凋亡, 在棉铃虫中, 20E 通过 ATG5 裂解使细胞由自噬转向凋亡[99], 自噬触发组织蛋白酶 D 成熟, 诱导中肠细胞内 CASP3 裂解促进中肠细胞

凋亡[100]。但 20E 对 AIF 的调控及对细胞命运的影响未见报道，且 20E 对线粒体稳态的调控机制也未被完全阐明。

棉铃虫是一种完全变态昆虫，在变态过程中脂肪体发生自噬和凋亡，是研究上述问题的良好实验模型。我们以棉铃虫为研究材料，揭示了 20E 会诱导全长 AIF1 的裂解，并将裂解后的 AIF1 转移到细胞核，从而同时导致脂肪体发生线粒体自噬和凋亡。

2.2 实验材料

2.2.1 实验动物

实验所需动物棉铃虫在实验室人工饲养，饲养温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度约 50%-70%，每天日照约 14 小时，由面粉、大豆粉、维生素、蔗糖、酪蛋白配制饲料。

2.2.2 实验试剂

Trizol、HIFI、HIFI bufferI、HIFI bufferII、dNTPs、6DNA loading buffer（全式金生物，北京，中国）；Swescript all-in-one first strand 逆转录试剂盒、多聚甲醛固定液（塞维尔生物，武汉，中国）；2×SYBR PCR Mix（艾德莱，北京，中国）；T4 连接酶（纽英伦生物，新英格兰，美国）；Ni NTA Beads 6FF（天地人和生物，常州，中国）；DNA marker（捷瑞生物工程，上海，中国）；蛋白 marker、Mitotracker green（赛默飞世尔，马萨诸塞州，美国）；DMSO、ATP 含量检测试剂盒（索莱宝，北京，中国）；YF488 TUNEL 凋亡检测试剂盒、SuperView 488 CASP3 检测试剂盒（美国光大股份有限公司，苏州，中国）。20E（Sigma-Aldrich，麻省，美国）；转染试剂（博奥龙，北京，中国）；双荧光素酶报告基因检测试剂盒（宇恒生物，苏州，中国）；GFP/RFP/ACTB 单克隆抗体（爱博泰克生物，武汉，中国）；山羊抗兔 IgG/碱磷标记、马抗小鼠 IgG/碱磷标记（中杉金桥生物，北京，中国）。

2.2.3 实验仪器

QRT-PCR 仪和 PCR 仪（耶拿分析仪器，耶拿，德国）；多功能酶标仪（帝肯贸易，上海，中国）；低温离心机（艾本德，汉堡，德国）；摇床（捷德生物，上海，中国）。

2.3 实验方法

2.3.1 生物信息学分析

在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中检索基因名称以及利用人、家蚕、果蝇等不同物种 AIF 序列比对获得棉铃虫中所有 AIF 基因序列。用 MEGA5.0 软件构建系统发育树，通过 DNAMAN 进行序列比对，通过 SMART (<http://smart.embl.de/>) 预测结构域。通过 ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi) 预测蛋白分子量大小和等电点，通过 JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>)预测启动子结合位点。

2.3.2 虫体 RNA 提取

分别取不同龄期虫体的背部表皮、中肠、脂肪体各 100 mg，每个龄期取 3-4 只虫体组织，经 1×PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) 漂洗后，放入已加入 1 ml Trizol 的 EP 管中，冰上匀浆，4 °C 10000g (下述离心转速均相同) 离心 15 min。取上清于另一干净 EP 管，加入 1/5 体积的三氯甲烷，震荡混匀，静置 5 min，离心 15 min。取上清，加入相同体积异丙醇混匀，于 -20 °C 沉淀 RNA 30 min，离心 10 min 后弃上清，用 75% 乙醇 (DEPC 水稀释) 洗沉淀，离心，弃上清，室温风干。加 20 µl DEPC 水于 58 °C 溶解 RNA 沉淀，可直接用于后续实验或 -80 °C 保存。全程使用无 RNA 酶耗材。

2.3.3 虫体基因组 DNA 的提取

取虫体中肠、脂肪体组织各 30 mg，匀浆器中加入 1 mL 提取液，加入组织后充分研磨至无可见组织碎片，将研磨液转移至离心管中，于 4 °C，10000 g 离心 10 min，取上清至新的离心管中，加入 500 µl 的无水乙醇，缓慢翻转使离心管内液体混匀。用枪尖将白色絮状沉淀轻轻挑入另一离心管中，用灭菌水配制的 75% 的乙醇清洗，最后 4 °C，10000 g 离心 5 min 弃上清，加入约 1 mL 灭菌水溶解沉淀，得到基因组 DNA。

2.3.4 cDNA 合成

使用逆转录试剂盒合成 cDNA。加入 2 µg RNA，2 µl AccuRT Reaction Mix (4X)，补充无核酸酶灭菌水至 6 µl，42 °C 放置 2 min。随后添加 2 µl AccuRT Reaction Stopper (5X) 吹打混匀，随后加入 4 µl 的 5X All-In-One RT Master Mix 和 6 µl 无核酸酶灭菌水，震荡混匀后于 25 °C 放置 10 min，42 °C 放置 20 min，85 °C 放置 5 min。用于后续 QRT-PCR 和 PCR 的模板。

2.3.5 基因克隆

使用软件 primer 5 设计基因上下游引物，将 cDNA 或基因组 DNA 模板稀释至 100-200 ng/μl，根据表 2-1 中的体系，表 2-2 中的程序运行 35 个循环，最终得到扩增产物。其中扩增 cDNA 使用 HIFI bufferII，扩增基因组 DNA 使用 HIFI bufferI。

表 2-1 PCR 反应体系

Tab. 2-1 PCR reaction system

反应体系	25 μl
cDNA	1 μl
ddH2O	17.375 μl
HIFI	0.125 μl
HIFI buffer	2.5 μl
F 引物 (10 μM)	1 μl
R 引物 (10 μM)	1 μl
dNTP (2.5 mM)	2 μl

表 2-2 PCR 反应程序

Tab. 2-2 PCR reaction program

程序	
95 °C	3 min
95 °C	30 sec
50-60 °C (根据 F/R 引物 Tm 值设定)	30 sec
72 °C	1000 bp/min (由扩增片段决定)
72 °C	10 min

2.3.6 PCR 产物酚-氯仿抽提

收集 PCR 产物，添加无菌水至 200 μl，加等体积 DNA 提取液，充分震荡混匀，4 °C条件下 10000 g 离心 15 min，小心取上清约 150 μl 至新的离心管中，加入 1/10 体积的 3 M 乙酸钠以及 2.5 倍体积的乙醇，缓慢上下翻转几次后放置于-20 °C沉淀至少 30 min。之后于 4 °C离心 30 min，弃去上清，用 80%的乙醇充分洗沉淀，将沉淀从管底弹起上下翻转多次，离心弃去乙醇后室温风干，最终用 20 μl 灭菌水溶解，即为抽提得到的 DNA。

在合成 dsRNA 时，用 RNA 提取液代替酚-氯仿，最后用 DEPC 水溶解沉淀。全程使用无 RNA 酶的试剂和耗材。

2.3.7 QRT-PCR

将反转录获得的 cDNA 稀释 5 倍作为模板，每个 QRT-PCR 体系包括 1 μl 模板，上下游引物各 1 μl, 2×SYBR PCR Mix 5 μl, β-Actin 作为内参。得出的基因 Ct 值与 β-ActinA 组差值为ΔCt，实验组与对照组的基因组ΔCt 差值为ΔΔCt。最终

2^{-ΔΔCt} 计算出的数据表示基因的表达差异。

2.3.8 兔源多克隆抗体的制备

根据 Aif1 序列分别设计上下游引物, 扩增得到 609 bp 的 PCR 产物, 取抽提产物与 pET-32a (+) 质粒 3 μg 在酶切位点 BamH I 和 Sal I 之间切开, 经过琼脂糖凝胶电泳后回收酶切后的片段于 4 °C 连接过夜。将重组质粒转入感受态 DH5α 中, 于涂布了卡那霉素抗性的固体培养基中过夜培养, 挑取单个菌落, 筛选含目的条带片段的菌落提取质粒, 转入 Rosetta 表达菌株, 37 °C 摇过夜后转至 500 mL 的培养基中扩大培养 3 h, 随后在 26 °C、0.1 mM 的 IPTG 诱导下表达 5h。取诱导前和诱导后菌液检测是否含表达产物, 菌液离心后取上清和沉淀检测表达产物位置, 加入 1/2 体积蛋白处理液 100 °C 煮 15 min, SDS-PAGE 检测到表达产物位于包涵体内。使用 8 M 脲将蛋白变性, 经 Ni²⁺ NTA Beads 6FF 柱料亲和纯化后, 使用尿素梯度复性, 即为抗原, 将其浓缩为 1 mg/ml。

从新西兰大白兔耳缘静脉处取血 1 mL 作为前血清, 将抗原与完全佐剂以 1:1 的比例混合成油包水状态, 皮下注射, 2 周后, 将抗原与不完全佐剂 1:1 混合再次免疫, 7 天后采血分离血清, 获得 AIF1 抗体。免疫印迹检测 AIF1 抗体可特异性识别且效价良好。

2.3.9 免疫印迹

预先制备蛋白提取物。虫体蛋白的提取是将虫体组织漂洗后放置于提前加入了 40 mM Tris-HCl 的研磨杵中, Tris-HCl 中提前按 1:100 加入蛋白酶抑制剂 PMSF 和磷酸酶抑制剂, 充分研磨至无组织碎片后转移至离心管中, 12000 g, 4 °C 离心 15 min, 取上清加入 1/2 体积的蛋白处理液, 100 °C 煮 15 min, 即组织蛋白。细胞蛋白的提取液将组织蛋白提取液中的 Tris-HCl 换为杜氏磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS), 加入提取液后刮下细胞, 离心 3000 g, 4 °C 离心 5 min 后弃上清, 加入少量 PBS 悬起沉淀后再加入 1/2 体积的蛋白处理液, 100 °C 煮 15 min, 即得到细胞蛋白。

测定蛋白浓度, 取 30 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 随后转移至硝化纤维素膜上。5% 脱脂奶粉封闭 1h。在脱脂奶粉中稀释抗体, 其中, AIF1 抗体按 1:50 稀释, ACTB、GFP 和 RFP 抗体按 1:3000 稀释, LC3 抗体按 1:2000 稀释。4 °C 孵育过夜, 然后用 TBST (TBS 中加入 0.02% Tween) 清洗 2 次, TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) 清洗 1 次, 在脱脂奶粉中按 1:3000 加入碱磷标记的二抗, 室温孵育 1 h, 继续上述清洗步骤。TBS 中加入四唑硝基蓝 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐 (BCIP) 配制发色液, 在黑暗中孵育 20 min 后终止发色。

2.3.10 脂肪体细胞的观察及免疫荧光

取脂肪体并固定在多聚甲醛和电镜固定液中,脂肪体石蜡包埋切片用于 HE 染色、尼罗红染色、扫描电子显微结构观察和免疫荧光。图片由赛维尔公司提供。免疫荧光染色实验中,1:50 稀释一抗。DAPI 表示细胞核。此外,石蜡切片后使用 YF488 TUNEL 凋亡检测试剂盒检测脂肪体凋亡。

2.3.11 细胞重组质粒的构建

扩增 *Aif1* 全长,在酶切位点 BgIII 和 Sal I 之间插入质粒 pIEx-RFP-His 中,构建重组质粒。此外,扩增 *Aif1* 起始密码子上游包含 FOXO 结合元件 2500 bp 的序列,在本实验室构建的质粒 pIEx-4-luciferase-GFP-His 的 Sma I 和 Sac I 酶切位点之间插入上游序列,替换了其启动子和增强子,得到 *pAif1-LUC-GFP-His*,在细胞在板中密度约 80% 时转染。

2.3.12 自噬流和凋亡检测

LC3-I 型至 LC3-II 型是判断自噬的重要指标。使用蛋白免疫印迹实验及 LC3 抗体检测蛋白中的自噬水平。另外,由于自噬发生时首先出现自噬囊泡,自噬囊泡与溶酶体融合形成自噬溶酶体,呈现酸性使绿色荧光信号猝灭,所以可以通过在细胞中转染 pIEx-4-RFP-GFP-LC3-His 质粒观察荧光判断自噬的阶段。将细胞转移至 24 孔板,每个孔转染质粒 2 μ g,48 h 后转染 *dsRNA*,自噬抑制剂 3-MA 作为阴性对照。

使用 SuperView 488 CASP3 检测试剂盒检测细胞 CASP3 活性。

2.3.13 免疫细胞化学

细胞转移至 24 孔板中培养,孔中加入细胞爬片,将重组质粒或 *dsRNA* 与转染试剂稀释至生理盐水后混匀加入。使用 200 nM Mitotracker green 进行线粒体染色,37 $^{\circ}$ C 染色 30 min。细胞观察时,用 DPBS 清洗后加入多聚甲醛固定细胞,之后用 DPBS 清洗多次,加入 1 μ l/mL 的 DAPI 染核,再用 PBS 清洗 30 min,于少量甘油上封片观测。

2.3.14 虫体干扰

加入表 2-3 中的体系,过夜孵育后使用 RNA 提取液提取 *dsRNA*,测量 *dsRNA* 浓度。

表 2-3 *dsRNA* 合成体系
Tab. 2-3 *dsRNA* synthesis system

合成体系	50 μ l
cDNA	3 μ g
ATP、GTP、CTP、UTP	各 2.4 μ l
Transcription buffer	20 μ l
RNA inhibitor	3 μ l
T7 RNA Polymerase	3 μ l
DEPC 水	定容至 50 μ l

将 *dsRNA* 用 PBS 稀释至 400 ng/ μ l，每只幼虫注射 5 μ l *dsRNA*，24 h 后提取虫体脂肪体蛋白和 RNA，用于后续检测。5F 期干扰后，至虫体均进入 6 龄后进行二次干扰，变态期每 24 h 注射一次双链，共注射 3 次。每次干扰实验注射 30 只虫，分三组进行统计。

2.3.15 ATP 含量检测

根据 ATP 含量检测试剂盒测定血淋巴中的 ATP 含量，每组平均取 10 只虫血淋巴检测，测定吸光值后计算 ATP 含量。

2.3.16 20E 虫体激素刺激

使用 DMSO 溶解 20E 至 20 mM，使用 PBS 稀释 20E，按每只虫注射 5 μ l 的体积将其稀释成不同浓度，每个浓度梯度和时间梯度注射 5 只 6th-6 h 的幼虫，浓度梯度刺激的虫体 12 h 后提取 RNA。

2.3.17 Luciferase 检测

将重组 *pAif1*-LUC-GFP-His 转染到表皮细胞系中，同时转染内参质粒 pRL-TK，共设计四组，其中两组与本实验室构建的 pIEx-FOXO-RFP-His 共转染后分别加入 DMSO 和 20E。免疫印迹检测 Luciferase 表达水平。双荧光素检测试剂盒检测 *Aif1* 非翻译取转录活性。

2.3.18 统计

所有实验均重复三次，QRT-PCR 均满足三次生物学重复和三次技术重复，误差线表示平均值 $\pm$ SD，两组之间差异使用 *t* 检验统计，分析显著性差异(* p <0.05，** p <0.01，*** p <0.001)，多组之间差异用 ANOVA 统计，多组之间有显著差异的用不同字母表示。

表 2-4 实验所用引物序列表

Tab. 2-4 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
Exp- <i>Aif1</i> -like-F	tactcaggatcctggcatctgggcaaatgaata
Exp- <i>Aif1</i> -like-R	tactcagtcgacgacattccttgaaaagccccac
<i>Aif1</i> -RTF	agaatgcaggaggtaacgaaa
<i>Aif1</i> -RTR	tgcctattatgagatactgaac
<i>Aif1</i> -RNAiF	gcgtaatacgactcactataggaagggaactaacaagggaatg
<i>Aif1</i> -RNAiR	gcgtaatacgactcactataggacatactcaaatcttcgggt
<i>Gfp</i> -RNAiF	gcgtaatacgactcactataggatgggtccaattctcgtggaac
<i>Gfp</i> -RNAiR	gcgtaatacgactcactataggactgaagttgacctgatgcc
<i>Aif2</i> - RTF	aaagccgtatctgcaattta
<i>Aif2</i> - RTR	agcctgcgtgctcagcgagc
<i>Aif3</i> -RTF	cggctttgactcgcttcctt
<i>Aif3</i> -RTR	cgacatgcccatatccttga
β - <i>Actin</i> -RTF	cctgtattgctgaccgtatgc
β - <i>Actin</i> -RTR	ctgttgggaaggtggagagggaa
Oe- <i>Aif1</i> -F	tactcaagatctcgatgataggtccgtttcgata
Oe- <i>Aif1</i> -R	tactcagtcgaccatactttccaattagttaa
Pro- <i>Aif1</i> -RTF	ccatgattacgaattcccgggcgctgtcacactggcggattt
Pro- <i>Aif1</i> -RTR	ccaattgggatccgcgagctccaccatgggttgactcccgacacatcaa

注：表中基因所对应的 GenBank. AIF1: XP_049697456.1; AIF2: XP_049697520.1; AIF3: XP_021182458.1; β -actin: ALP73405.1.

2.4 结果

2.4.1 棉铃虫 AIF 的鉴定

在 NCBI 中检索基因名称以及利用人、家蚕、果蝇等不同物种 AIF 序列比对获得棉铃虫中所有 AIF 蛋白序列,共找到 3 个 AIF,分别是 AIF1(XP_049697456.1)、AIF1(XP_049697520.1)、AIF3(XP_021182458.1),蛋白质的理论分子量分别为 79 kDa、69 kDa、65 kDa。其中两个 AIF1 在 NCBI 中命名完全相同,通过 SMART 分析结构域(图 2-1),发现 AIF1(XP_049697456.1)含有一个跨膜结构域,一个氧化还原酶结构域和 AIF 凋亡结构域。而 AIF1(XP_049697520.1)不含跨膜结构域,所以我们将不含跨膜结构域的 AIF1(XP_049697520.1)命名为 AIF2。AIF3 含有典型的 Rieskie 结构域。使用 MEGA 5.0 软件构建棉铃虫与人、小鼠、家蚕、果蝇和草地贪夜蛾 AIF 的系统发育树(图 2-2),所有物种的 AIF3 聚为一支,图中用绿色线条表示,红色线条显示人和小鼠的 AIF2 单独聚为一支,昆虫中其余 AIF 与人、小鼠中的 AIF1 聚为另外一支,图中用蓝色线条表示,这表明 AIF 进化较保守。通过 DNAMAN 进行序列比对(图 2-3),结果表明棉铃虫中 3 条 AIF 序列相似性为 23.09%,相似性较低。

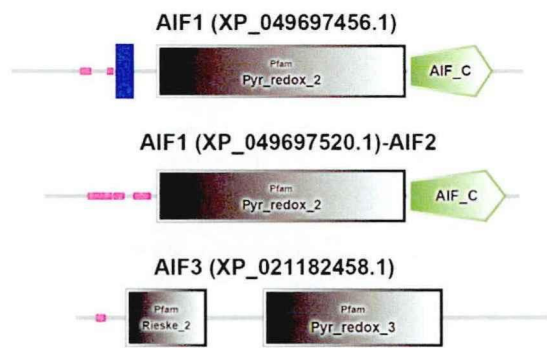


图 2-1 SMART 预测结构域

Fig. 2-1 Predicted the domain by SMART

注：蓝色表示跨膜区。AIF1(XP_049697520.1)不含跨膜区，将其命名为 AIF2。

Notes: The blue area indicates the transmembrane region. AIF1(XP_049697520.1) did not contain transmembrane region and was named AIF2.

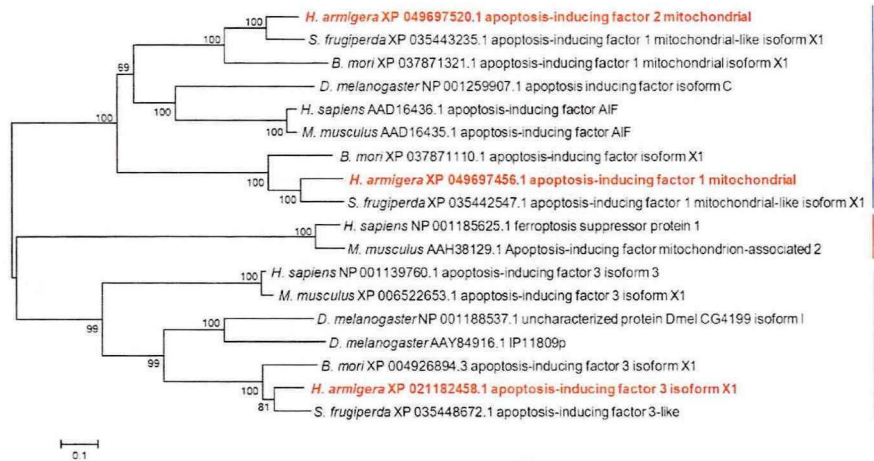


图 2-2 MAGE 5.0 构建棉铃虫 AIF 系统进化树

Fig. 2-2 The phylogenetic tree of AIFs in *H. armigera* analyzed by MAGE 5.0

注：基于邻接法构造进化树。红色字体表示棉铃虫 AIF，绿色线表示 AIF3，红色线条表示人和小鼠的 AIF2 单独聚为一支，蓝色线条表示昆虫中其余 AIF 与人、小鼠中的 AIF1 聚为一支。*H. armigera*: 棉铃虫; *H. sapiens*: 人; *M. musculus*: 小鼠; *B. mori*: 家蚕; *D. melanogaster*: 果蝇; *S. frugiperda*: 草地贪夜蛾。

Notes: Construct evolutionary tree based on adjacency method. The red font indicates AIF of *H. armigera*, The green line represents AIF3, the red line represents AIF2 of human and mouse, and the blue line represents AIF of other insects and AIF1 of *H. sapiens* and *M. musculus*. *H. armigera*: *Helicoverpa armigera*; *H. sapiens*: *Homo sapiens*; *M. musculus*: *mus musculus*; *B. mori*: *Bombyx mori*; *D. melanogaster*: *Drosophila melanogaster*; *S. frugiperda*: *Spodoptera frugiperda*.

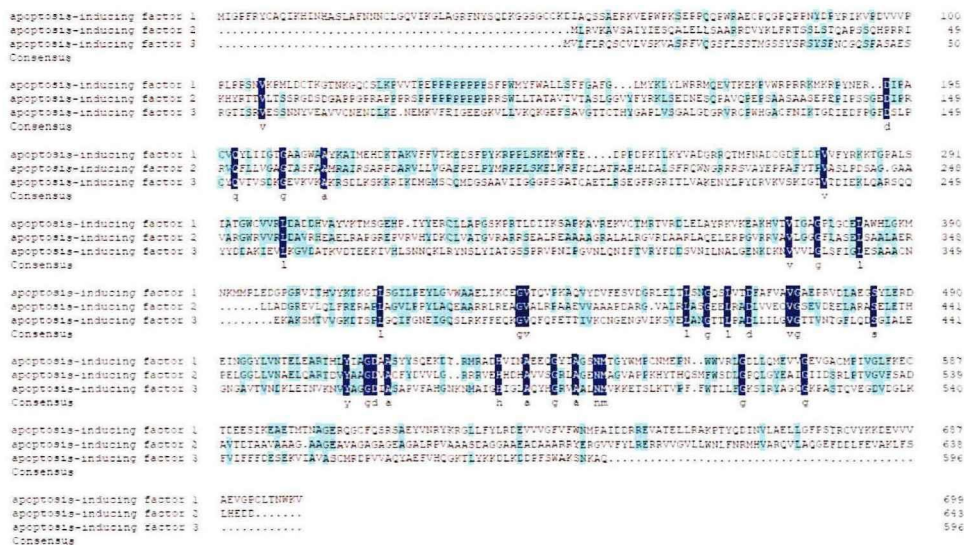


图 2-3 对棉铃虫中的 AIF 进行序列比对

Fig. 2-3 *H. armigera* AIF sequences alignment

注：三个 AIF 序列相似性为 23.09%。

Notes: The similarity of the three AIF sequences was 23.09%.

为了筛选出参与脂肪体组织重塑的 AIF，我们在转录水平上检测了棉铃虫取食期 6th-24 h 和变态期 6th-96 h 脂肪体中 3 种 *Aif* 的表达水平，发现只有 *Aif1* 在两个时期具有差异性表达，且在 6th-96 h 表达量较高（图 2-4），因此我们选择 AIF1 进行后续实验。

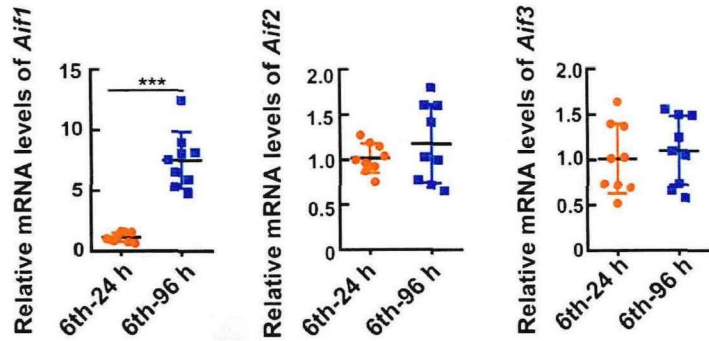


图 2-4 筛选脂肪体中差异表达的 *Aif*

Fig. 2-4 Screened *Aif* that differentially expressed in the fat body

注：QRT-PCR 检测 *Aif* 在取食期 6th-24 h 和变态期 6th-96 h mRNA 水平上的表达量。

Notes: *Aif* expression levels at 6th-24 h at feeding stage and 6th-96 h at metamorphosis stage was detected by QRT-PCR.

2.4.2 AIF1 原核表达及抗体制备

为了检测 AIF1 在全龄期表达水平的变化，使用 AIF1 蛋白质中 385-587 位氨基酸序列制备 AIF1 的兔多克隆抗体。扩增 *Aif* 序列片段插入 pET32a (+)-His 质

粒，构建原核表达载体制备抗原.使用 0.1 mM 的 IPTG 诱导表达，取诱导前和诱导后菌液检测是否含表达产物，菌液离心后取上清和沉淀检测表达产物位置，发现 AIF1 表达在包涵体中，变性后纯化抗原，抗原条带单一（图 2-5A）。利用该抗原制备 AIF1 的兔多克隆抗体，该抗体特异性识别 AIF1（图 2-5B）。

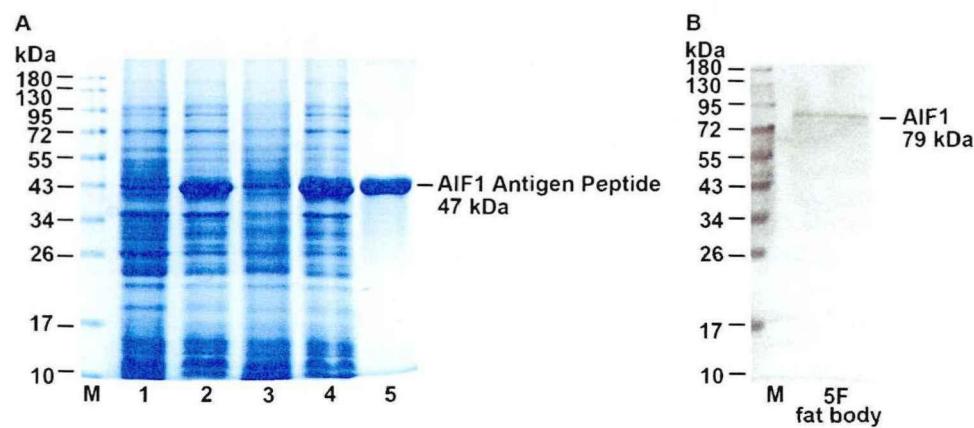


图 2-5 AIF1 的原核表达、纯化及抗体特异性检测图

Fig. 2-5 Prokaryotic expression, purification and antibody specificity detection of AIF1

注：（A）AIF1 的原核表达及纯化。M：蛋白 marker；1：未加 IPTG 诱导的样品；2：加 IPTG 诱导的样品；3：诱导后破碎的上清样品；4：诱导后破碎的包涵体样品；5：AIF1 片段抗原纯化。（B）抗体特异性检测，用 5 龄取食期虫体的脂肪体作为检测蛋白。所用胶浓度为 12.5%。5F：5 龄取食期。

Notes: (A) Prokaryotic expression and purification of AIF1. M: protein marker; 1: No IPTG induction sample; 2: IPTG induction sample; 3: Supernatant samples broken after induction; 4: Inclusion body samples broken after induction; 5: AIF1 fragment antigen purification. (B) Antibody specific detection, the 5F fat body protein was used as the detection protein. The gel concentration was 12.5%. 5F: the 5th instar feeding age.

2.4.3 AIF1 在变态期中肠和脂肪体表达量增加

蛋白免疫印迹检测 AIF1 在表皮、中肠和脂肪体中的蛋白表达水平，分析 AIF1 在发育中的作用。表皮仅在 5F 至 6th-6 h 取食期检测到全长的 AIF1 (full length-AIF1, f-AIF1)。在脂肪体中，在 5F 至 6th-24 h 取食期检测到 f-AIF1，在 6th-72 h 至 p-6d 期间检测到 55-72 kDa 之间的条带，推测其为切割跨膜区后的 AIF1 的 C 端 (cleaved-AIF1, c-AIF1)（图 2-6A,B），在中肠中只检测到了 c-AIF1。结果表明，AIF1 呈现出组织特异性表达及变化。

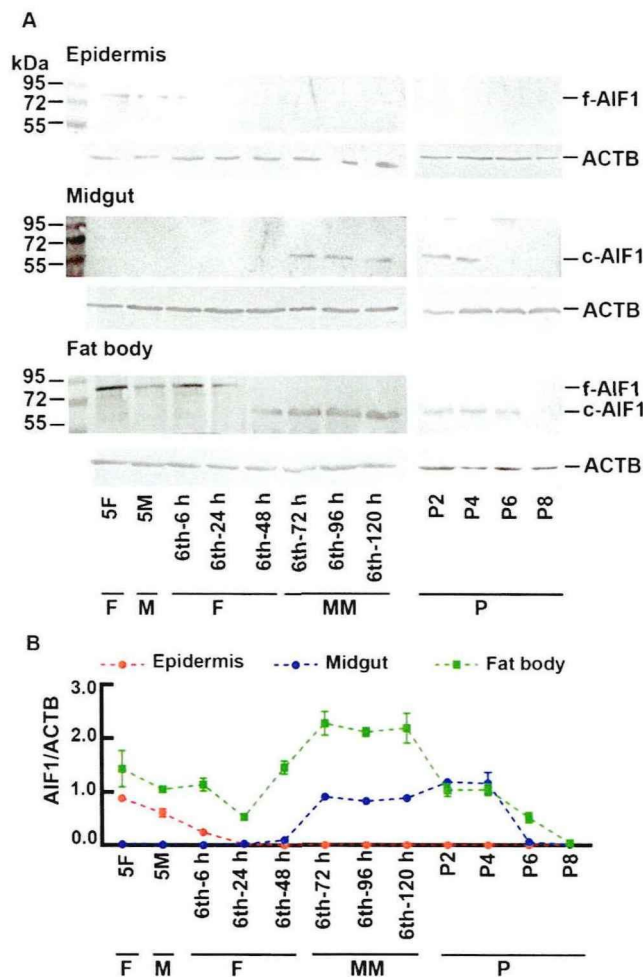


图 2-6 蛋白免疫印迹分析 AIF1 的虫体表达模式

Fig. 2-6 The expression pattern of AIF1 was analyzed by western blot

注：(A) AIF1 在不同时期的表皮、中肠和脂肪体中的蛋白水平。ACTB 作为内参蛋白，所用胶浓度均为 12.5%。(B) Image J 统计 (A) 中 AIF1 和 ACTB 条带密度的比值。误差线表示平均值 ± SD。f-AIF1：全长 AIF1；c-AIF1：被裂解的 AIF1；5F：5 龄取食；5M：5 龄蜕皮；6th-6 h、6th-24 h、6th-48 h、6th-72 h、6th-96 h、6th-120 h 分别对应 6 龄不同时期；P2、P4、P6、P8 分别对应化蛹天数；F：取食期；M：蜕皮期；MM：变态蜕皮期；P：蛹期。实验均满足三次生物学重复。

Notes: (A) The protein levels of AIF1 in epidermis, midgut and fat body at different stages. ACTB is an internal reference protein. The concentration of the gel was 12.5%. (B) Image J was used to calculate the ratio of AIF1 and ACTB band density in (A). The error bar indicated the average ± SD of the three biological repetitions. f-AIF1: full length-AIF1; c-AIF1: cleaved-AIF1; 5F: the 5th instar feeding age; 5M: the 5th molting age; 6th-6 h, 6th-24 h, 6th-48 h, 6th-72 h, 6th-96 h, 6th-120 h corresponding to different stages of 6th instar; P2 d, P4 d, P6 d, P8 d corresponding to different pupation days; F: feeding stage; M: molting stage; MM: metamorphosis molting stage; P: pupal stage. All the experiments satisfied three biological replicates.

2.4.4 AIF1 取食期定位于细胞质，变态期定位在细胞核

为了探索 f-AIF1 和 c-AIF1 在虫体中的定位，进行了免疫荧光组织化学分析。

前血清作为对照，红色荧光显示 AIF1 定位情况。前血清检测 6th-24 h 脂肪体组织中未观察到红色荧光。f-AIF1 在 6th-24 h 定位于细胞质，c-AIF1 在 6th-120 h 定位于细胞核（图 2-7）。结果表明，f-AIF1 和 c-AIF1 在不同发育阶段定位在不同的部位。

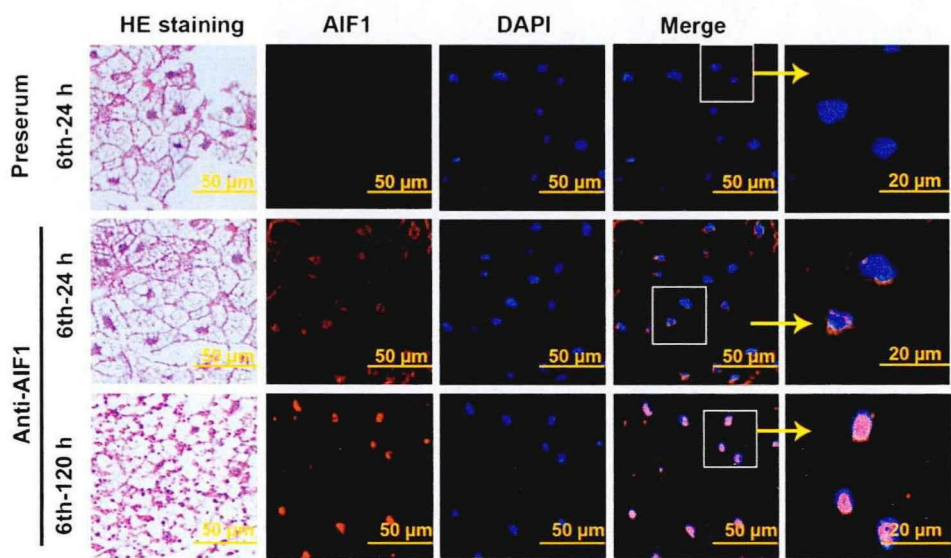


图 2-7 AIF1 取食期定位于细胞质，变态期定位在细胞核

Fig. 2-7 AIF1 was localized in cytoplasm during feeding phase, in the nucleus during metamorphosis phase

注：HE 染色为对应的免疫荧光组织的脂肪体结构。红色荧光：AIF1，蓝色荧光：DAPI。前血清做阴性对照。

Notes: HE staining showed the fat body structure of corresponding tissues of immunofluorescence. Red fluorescence: AIF1, blue fluorescence: DAPI. The preserum was used as negative control.

2.4.5 20E 诱导 f-AIF1 片段化为 c-AIF1 和核移位

为了探究 20E 是否引起 AIF1 定位变化，构建了 pIEx-f-AIF1-RFP-His 质粒，并在棉铃虫表皮(*H. armigera* epidermal cell line, HaEpi)细胞系[121]中过表达 f-AIF1-RFP-His。蛋白免疫印迹结果显示 115 kDa (f-AIF1 79 kDa + RFP-His 36 kDa) 的条带（图 2-8A），说明 f-AIF1-RFP-His 表达正确（图 2-8A）。线粒体染色剂 Mitotracker green 显示 f-AIF1-RFP-His 与线粒体共定位（图 2-8B），表明 f-AIF1 定位于线粒体。

经 10 μM20E 处理 72 h 后，AIF1 转移至细胞核（图 2-8C），显示 20E 诱导 f-AIF1 裂解为 c-AIF1 并移位到细胞核。

为了阐明 20E 诱导的 c-AIF1 的截断是否依赖自噬，用自噬抑制剂 3-MA 和溶酶体抑制剂氯喹(CQ)处理细胞，再加入 20E 处理后，AIF1 仍然可以被 20E 诱

导片段化和入核（图 2-8C,Ci）。这一结果表明 20E 诱导 AIF1 裂解和入核并不依赖自噬。

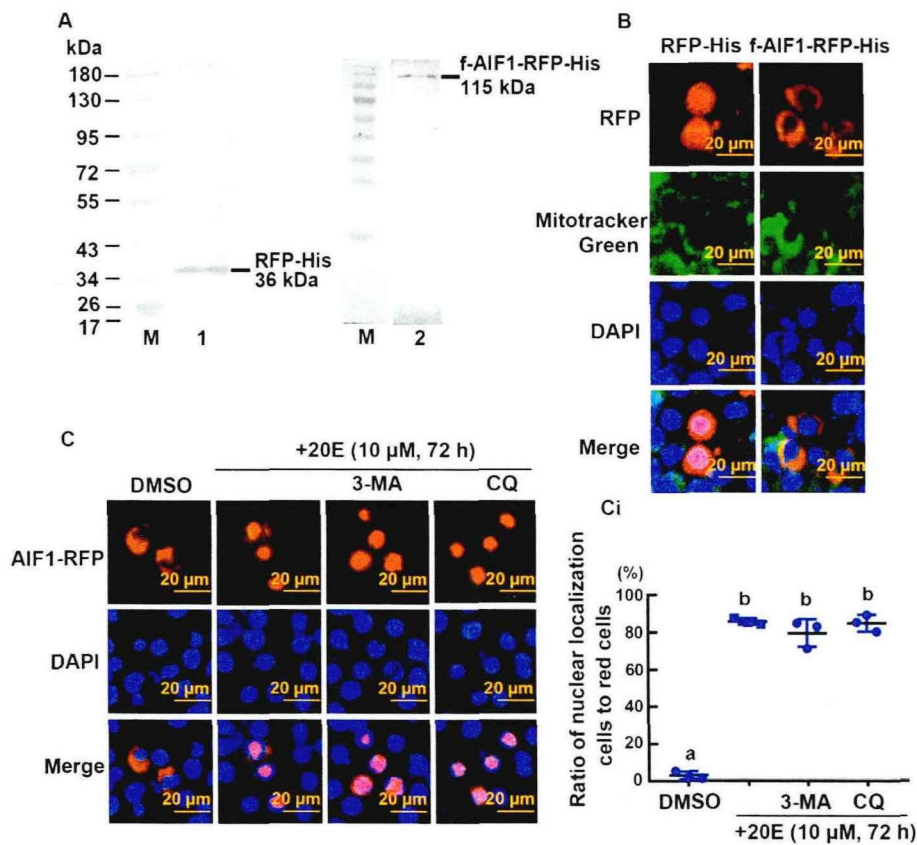


图 2-8 20E 诱导 c-AIF1 核定位

Fig. 2-8 20E induced c-AIF1 nuclear localization

注：（A）利用 RFP 抗体通过蛋白免疫印迹检测 pIEx-f-AIF1-RFP-His 的表达。（B）免疫荧光显示 f-AIF1 定位于线粒体。（C）20E 诱导 c-AIF1 入核。加入自噬抑制剂 3-MA 和氯喹均不能抑制 AIF1 片段化和核定位。标尺为 20 μm。（Ci）统计（C）中进入细胞核的 AIF1 占有红色荧光细胞总数的百分比。

Notes: (A) Examination of the expression of pIEx-f-AIF1-RFP by western blotting using RFP antibodies. (B) Immunofluorescence showed f-AIF1 is localized in mitochondria. (C) 20E induced c-AIF1 nuclear localization. Addition of autophagy inhibitors 3-MA and chloroquine did not inhibit AIF1 fragmentation and nuclear localization. The bars represented 20 μm. (Ci) Counted the percentage of AIF1 entering the nucleus in the total number of red fluorescent cells in (C).

2.4.6 f-AIF1 抑制线粒体自噬

由于表皮中仅有 f-AIF1 的表达，所以在棉铃虫表皮细胞 HaEpi 中干扰 *Aif1* 即干扰 *f-Aif1* 探究全长 AIF1 功能。我们在 HaEpi 细胞系中过表达 pIEx-4-RFP-GFP-LC3-His 质粒指示自噬流，以 *dsYfp* 处理作为 *dsf-Aif1* 的对照。转染 *dsRNA* 48 h 后观察细胞状态，结果显示，干扰 *f-Aif1* 后 48h 细胞出现自噬小泡（图 2-

9A,Ai)。干扰 *f-Aif1* 后 72 h, 只观察到红色荧光, 绿色荧光猝灭 (图 2-9B,Bi), 表明自噬泡向自噬溶酶体转变, 说明 f-AIF1 有抑制自噬的功能。

为了检测 f-AIF1 缺失引起的自噬是否转为凋亡, 在未过表达 pIEx-4-RFP-GFP-LC3-His 质粒的 HaEpi 中干扰 *f-Aif1*, 使用 SuperView 488 CASP3 检测试剂盒检测细胞 CASP3 凋亡水平, 绿色荧光表示细胞中 CASP3 水平。48 h 后, 干扰 *f-Aif1* 和凋亡抑制剂 Ac-DEVD-CHO 处理均未检测到绿色荧光, 说明此时未发生凋亡 (图 2-9C,Ci)。但 72 h 后, 在干扰 *f-Aif1* 的细胞中显示绿色荧光, 而凋亡抑制剂 Ac-DEVD-CHO 处理后检测不到绿色荧光 (图 2-9D,Di), 说明 f-AIF1 的缺失使细胞自噬最终转向了凋亡。这些结果表明 f-AIF1 具有抑制细胞自噬和凋亡的功能。

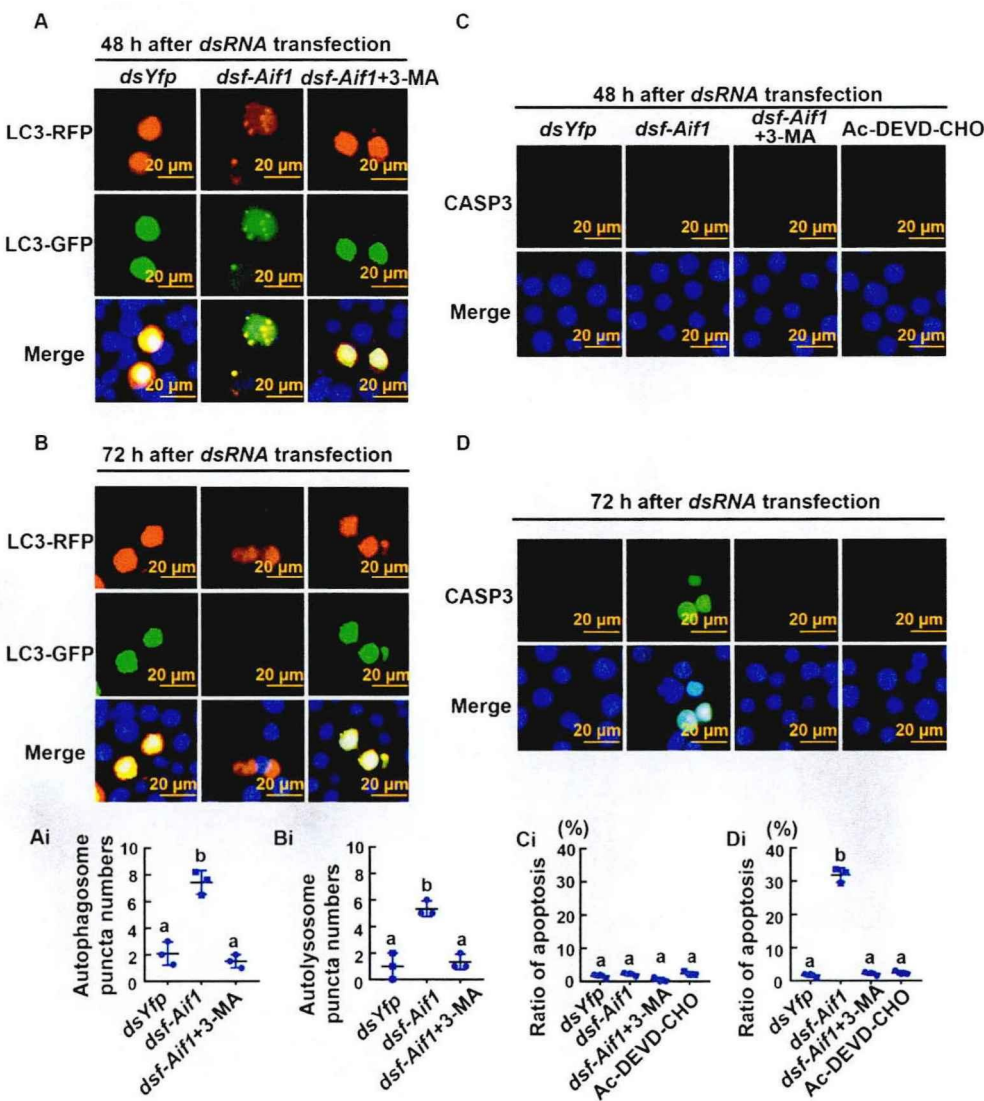


图 2-9 通过观察自噬流和 CASP3 活性验证 f-AIF1 抑制自噬和凋亡

Fig. 2-9 f-AIF1 inhibited autophagy and apoptosis detected by autophagic flux and CASP3

activity

注：(A, B)检测干扰 *f-Aif1* 后 HaEpi 细胞的自噬通量，以 *dsYfp* 为对照。(Ai, Bi) 计数成功转染 pIEx-GFP-RFP-LC3 细胞中的自噬小泡数和自噬溶酶体数。(C, D)在 HaEpi 细胞中敲除 *f-Aif1* 后，通过检测 CASP3 活性检测凋亡，Ac-DEVD-CHO 是 CASP3 抑制剂。(Ci, Di) 统计 C、D 图中凋亡细胞的个数。黄色标尺表示 20 μ m。蓝色荧光：DAPI。

Notes: (A, B) The autophagic flux were detected in HaEpi cells when f-AIF1 was knocked down, *dsYfp* was used as the control. the yellow bars represented 20 μ m. (Ai, Bi) Counted the number of autophagosome puncta and autolysosome in successfully transfected with pIEx-GFP-RFP-LC3 cells. (C, D) After knockdown f-AIF1 in HaEpi cells, examination of apoptosis by the addition of active CASP3, Ac-DEVD-CHO is a CASP inhibitor. (Ci, Di) Quantification apoptotic cells from C and D. Blue: DAPI.

为了探究自噬是否在线粒体发生，在过表达了 pIEx-4-RFP-LC3-His 质粒的 HaEpi 细胞中干扰 *f-Aif1*，同时进行线粒体染色。转染 *dsRNA* 48 h 后，结果显示，干扰 *f-Aif1* 后自噬小泡与线粒体共定位（图 2-10），表明发生了线粒体自噬，说明 f-AIF1 抑制了线粒体自噬和凋亡的发生。

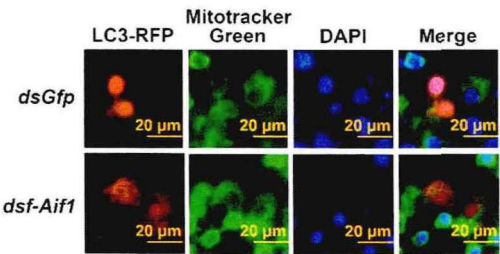


图 2-10 细胞中敲降 f-AIF1 发生线粒体自噬

Fig. 2-10 Mitophagy occurs when f-AIF1 is knocked down in cells

注：免疫荧光显示干扰 f-Aif1 后 LC3-RFP 与线粒体共定位。

Notes: Immunofluorescence showed that LC3-RFP was co-localized with mitochondria after interference with *f-Aif1*.

2.4.7 f-AIF1 维持线粒体稳定和 ATP 的产生

由于取食期仅有 f-AIF1 的表达，为了探究 f-AIF1 抑制自噬的分子机制，我们在 5F 干扰 *Aif1*，即干扰 *f-Aif1*。蛋白免疫印迹显示 *f-Aif1* 干扰效率(图 2-11A)。敲降 *f-Aif1* 后，幼虫出现延迟蜕皮和死亡的表型（图 2-11B）。30%的幼虫延迟蜕皮进入 6 龄，从注射到蜕皮至 6 龄的时间延迟了 17h，死亡率为 36%(图 2-11C, D)。与对照组相比，敲降组血淋巴中 ATP 水平明显下降（图 2-11E）。敲降 *f-Aif1* 后，脂肪体中 LC3-II 水平升高（图 2-11F），说明发生了自噬。

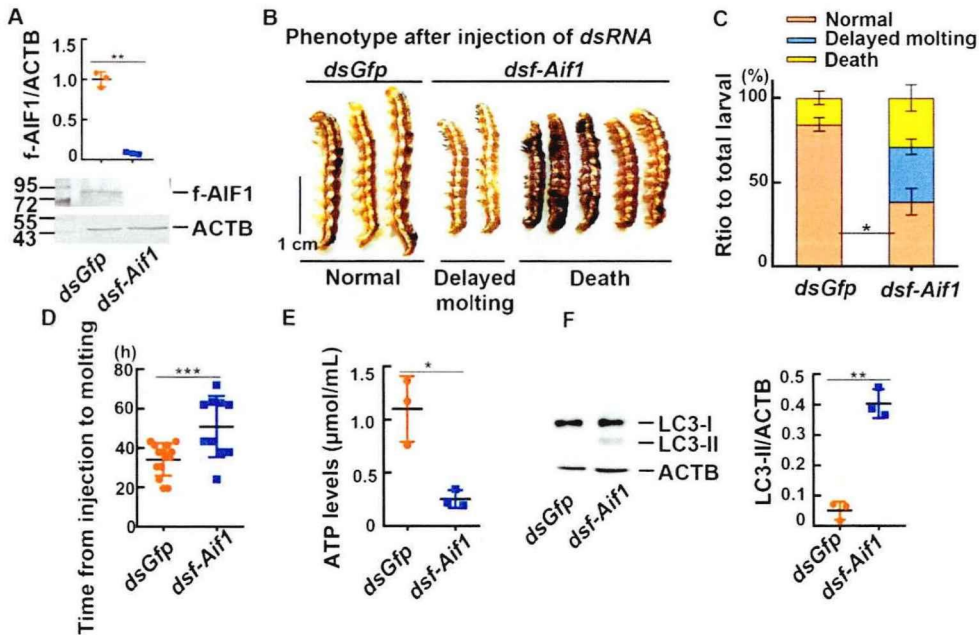


图 2-11 在 5 龄取食期幼虫中敲降 *f-Aif1* 导致延迟蜕皮和死亡

Fig. 2-11 The knockdown of *f-Aif1* in 5F larvae led to delayed molting and death

注: (A) 注射 *dsRNA* 24 h 后蛋白免疫印迹验证脂肪体中的干扰效率。(B) 5F 幼虫期注射 *dsf-Aif1* 直至 6th-24 h 的表型图, 标尺为 1 cm。(C) 注射 *dsAif1* 和 *dsGfp* 后的表型统计。(D) 从 5F 幼虫期注射 *dsf-Aif1* 后至蜕皮为 6 龄的时间。(E) 注射 *dsf-Aif1* 和 *dsGfp* 后 ATP 水平。(F) 敲除 *dsGfp* 和 *dsf-Aif1* 后, 蛋白免疫印迹检测 LC3-II。

Notes: (A) Western blotting validation of the interference efficiency in the fat body 24 h after the *dsRNA* injection. (B) Phenotypes after injection of *f-Aif1 dsRNA* from 5F larva to 6th-24 h, the ruler represents 1 cm. (C) Phenotype statistics after injection of *dsf-Aif1* and *dsGfp*. (D) The time of which the 5F larvae molted into 6th instar. (E) The ATP levels after injection of *dsf-Aif1* and *dsGfp*. (F) After knockdown *dsGfp* and *dsf-Aif1*, western blotting detected LC3-II.

用透射电镜(Transmission electron microscopy, TEM)观察线粒体形态, 结果显示注射 *dsGfp* 对脂肪体细胞中的线粒体无影响, 线粒体呈正常形态, 有清晰的嵴, 而注射 *dsf-Aif1* 引起脂肪体细胞的线粒体损伤, 线粒体发生肿胀使嵴结构无法清晰可见(图 2-12A), 且观察到双层或多层膜结构的自噬小体靠近并包裹线粒体过程(图 2-12B), 说明线粒体发生了自噬。

以上结果表明, 在取食期敲降 *f-Aif1* 导致线粒体损伤, 触发线粒体自噬, 降低 ATP 的合成, 使虫体发育受阻并死亡。

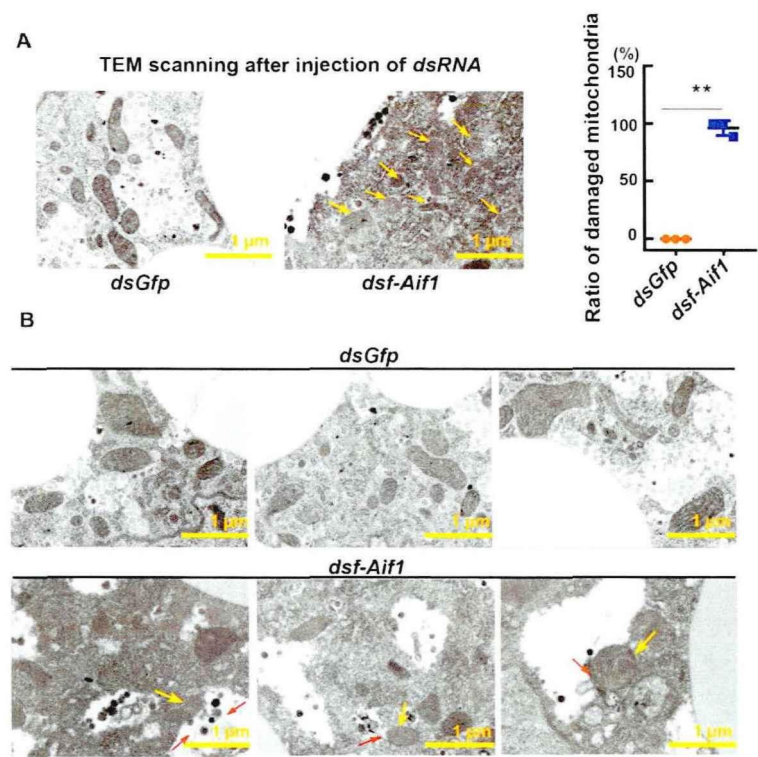


图 2-12 注射 *dsf-Aif1* 后线粒体受损自噬

Fig. 2-12 Mitochondria were damaged and mitophagy occurred after injection of *dsf-Aif1*

注: (A)注射 *dsRNA* 24 h 后,统计脂肪体细胞透射电镜中的受损线粒体比例。(B) *dsf-Aif1* 组出现自噬小泡包围线粒体发生线粒体自噬。标尺为 1 μm, 黄色箭头代表受损肿胀的线粒体, 红色箭头表示双层或多层膜结构的自噬小泡。

Notes: (A) The ratio of damaged mitochondria in fat body cell was calculated by TEM 24 h after *dsRNA* injection. (B) Autophagosome puncta surrounded mitochondria in the *dsf-Aif1* group, and mitophagy occurred. The bars represented 1 μm. The yellow arrows represented the damaged mitochondria. The red arrow indicates a bilayer or multilayer autophagosome puncta.

2.4.8 c-AIF1 入核促进细胞凋亡

由于变态期仅有 c-AIF1 的表达, 为了探究 c-AIF1 在变态发育中的作用, 我们在 6th-48 h 干扰 *Aif1* 观察表型, 为方便区分, 图中用 *dsc-Aif1* 表示。蛋白免疫印迹检测到 c-AIF1 在蛋白水平上被敲低 (图 2-13A), 干扰组出现死亡表型, 死亡率达到 50% (图 2-13B,C)。为了找出高死亡率的原因, 我们在注射 *dsRNA* 24 h 和 48 h 后取脂肪体分别用于实验观察。HE 染色显示, 与对照组相比, 干扰组未见游离脂肪体; 尼罗红染色显示, 干扰组脂滴未分解; TUNEL 染色显示 *c-Aif1* 干扰后细胞凋亡水平显著减少 (图 2-13D,E)。这些结果表明, c-AIF1 促进了脂肪体在变态期的凋亡。

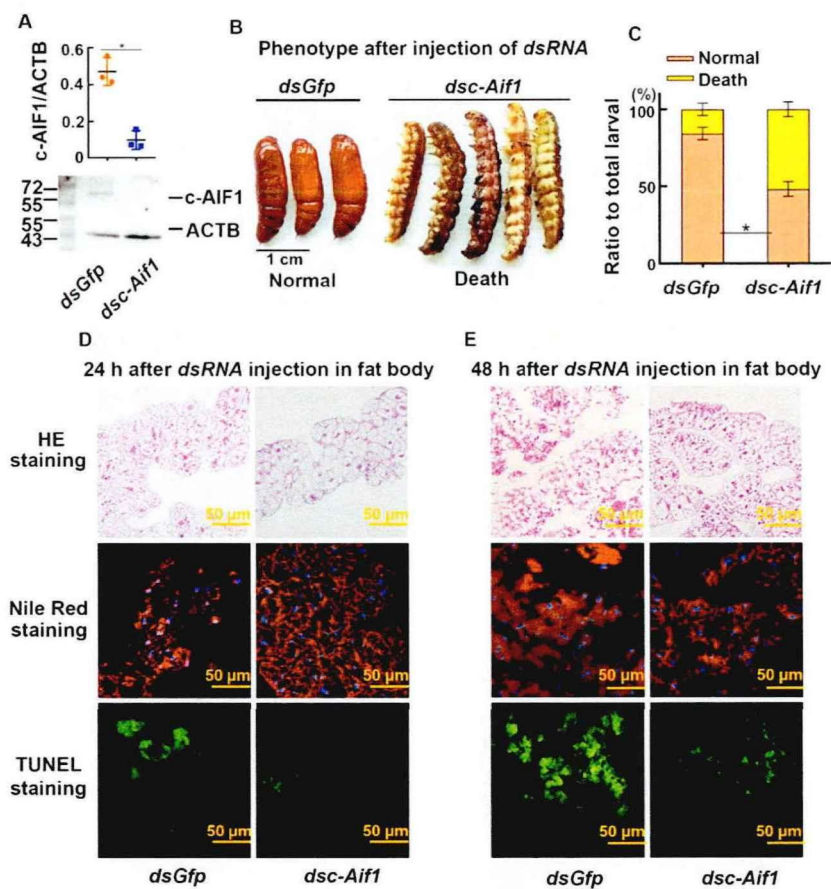


图 2-13 在 6th-48 h 敲降 *c-Aif1* 导致死亡

Fig. 2-13 The knockdown of *c-Aif1* in 6th-48 h led to death

注：(A)注射 *dsRNA* 24 h 后蛋白免疫印迹验证在脂肪体中的干扰效率。(B)注射 *dsc-Aif1* 后的表型图，标尺为 1 cm。(C)注射 *dsc-Aif1* 和 *dsGfp* 后的表型统计。(D, E)注射 *dsRNA* 24 h 和 48 h 后，HE 染色、尼罗红染色和 TUNEL 染色观察脂肪体形态，标尺为 50 μ m。

Notes: (A) Western blotting validation of the interference efficiency in the fat body 24 h after the *dsRNA* injection. (B) Phenotypes after injection of *dsc-Aif1*, the scale bar represented 1 cm. (C) Phenotype statistics after injection of *dsc-Aif1* and *dsGfp*. (D, E) HE staining, Nile red staining and TUNEL staining showed fat body morphology, observed after first injection *dsRNA* for 24 h and 48 h. The scale bar represented 50 μ m.

2.4.9 变态期间 20E 上调 AIF1 的表达

在中肠和脂肪体中，AIF1 在变态期高表达，说明 20E 调控了其表达水平。体内注射不同浓度梯度和时间梯度的 20E 显示，脂肪体中 20E 处理 200 ng-500 ng 后 *Aif1* 表达显著上调（图 2-14A），每只幼虫注射 500 ng 20E 12 h 后，*Aif1* 表达上调（图 2-14B）。为了探索 20E 上调 *Aif1* 表达的途径，使用在线预测网站 JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>) 预测到了 *Aif1* 启动子区域(*pAif1*)含有 FOXO 的

DNA 结合位点(FOXOBE) (图 2-14C), 虫体干扰 FOXO 后 *Aif1* 表达下调 (图 2-14D)。这些结果证实了 20E 通过 FOXO 上调 *Aif1* 的表达。

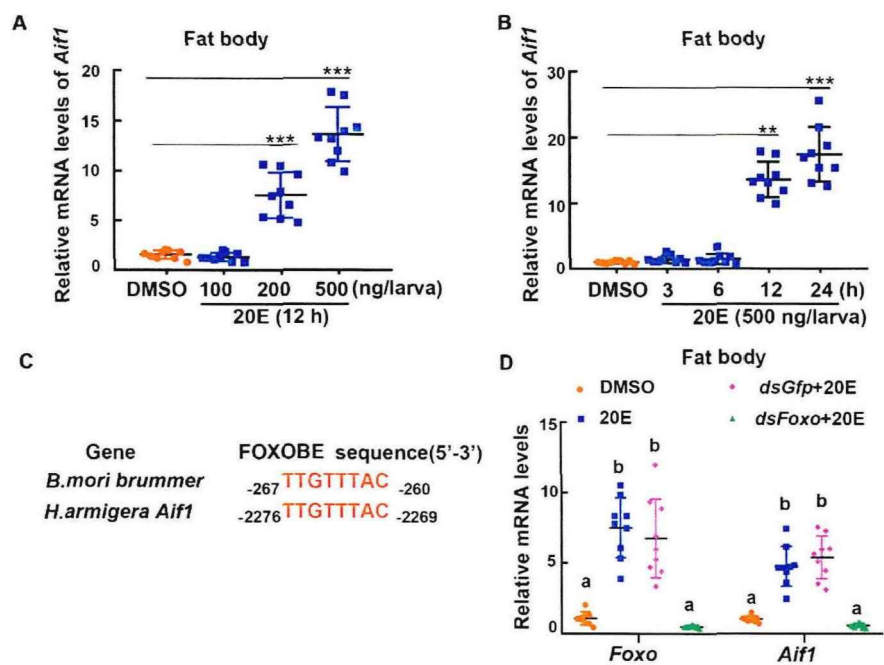


图 2-14 20E 上调脂肪体中 *Aif1* 的表达

Fig. 2-14 20E up-regulated *Aif1* in fat body

注: (A)通过 QRT-PCR 检测脂肪体中 *Aif1* 的水平, 加入等量 DMSO 作为阴性对照。(B) 用 20E (500 ng/幼虫)刺激 3 h、6 h、12 h、24 h 后, 用 QRT-PCR 检测脂肪体中 *Aif1* 水平, 并加入等量 DMSO 作为阴性对照。(C)家蚕 *Brummer* 和棉铃虫 *Aif1* 启动子 FOXOBE 序列的比对。(D)敲降 *Foxo* 后用 QRT-PCR 检测 *Aif1* 的转录水平。

Notes: (A) The level of *c-Aif1* in fat body was detected by QRT-PCR, and the same amount of DMSO was added as negative control. (B) The *c-Aif1* level in fat body was detected by QRT-PCR after 3 h, 6 h, 12 h, 24 h stimulation with 20E (500 ng/larva), and the same amount of DMSO was added as negative control. (C) Alignment of FOXOBE sequences in *B. mori Brummer* and *H. armigera Aif1* promoters. (D) QRT-PCR analysis of the transcript levels of *Aif1* after knockdown *Foxo*.

为了进一步研究 FOXO 对 AIF1 的转录调控, 构建了含有 FOXO 结合位点的 *pAif1-Luciferase-GFP-His* 报告质粒(*pAif1-LUCI-GFP-His*) (图 2-15A), Western blotting 实验显示, 当报告质粒与 RFP-His 共转染至表皮细胞系后, *pAif1-LUCI-GFP-His* 有少量表达, 推测其有基础转录活性, 且叠加 20E 诱导后表达量上升。与 FOXO-RFP-His 过表达质粒共转染后, 并叠加 20E 诱导, 可显著上调 LUCI-GFP-His 的表达 (图 2-15B), Luciferase 实验显示 FOXO 可显著诱导增强 AIF1 的转录活性 (图 2-15C)。

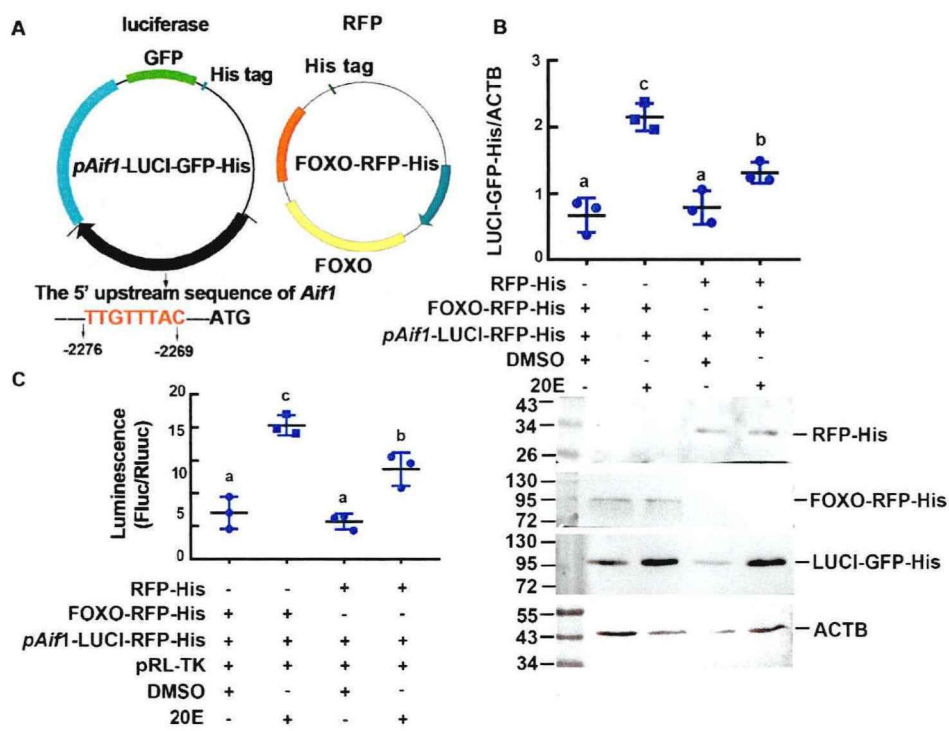


图 2-15 FOXO 诱导并增强了 *Aif1* 5'上游序列的转录活性

Fig. 2-15 FOXO induces and enhances the transcriptional activity of *Aif1* 5' upstream

注：(A) *pAif1*-LUCI-GFP-His 和 FOXO-RFP-His 的质粒图谱，在质粒图下方显示 *Aif1* 5'上游序列中 FOXOBE 的位置。(B) Western blot 检测 LUCI-GFP-His 的表达，并用 Image J 进行统计分析。(C) 双荧光素酶报告实验测定转录活性。

Notes: (A) Plasmid maps of *pAif1*-LUCI-GFP and FOXO-RFP, The position of FOXOBE contained in the *Aif1* 5' upstream sequence is shown below the plasmid maps. (B) Western blot detection of LUCI-GFP-His expression, and Image J statistical analysis. (C) Transcriptional activity was measured by dual-luciferase reporter assay.

2.5 讨论

线粒体稳态是维持生物体正常活动的基础。调控线粒体稳态的因素众多，本文发现 AIF1 对于维持线粒体稳态、抑制线粒体自噬具有关键作用。类固醇激素 20E 通过转录水平上调 AIF 的表达，同时诱导 AIF1 裂解和核移位，一方面破坏了 AIF1 在线粒体中的功能，导致线粒体稳态的破坏和线粒体自噬，同时，促进 c-AIF1 进入细胞核，促进脂肪体细胞凋亡，因此，类固醇激素 20E 通过调控 AIF 同时促进了自噬和凋亡。

2.5.1 AIF 的双功能及调控

AIF 线粒体中的功能缺失会导致氧化磷酸化无法正常进行。小鼠中 AIF 的缺失导致复合体 I 数量明显减少。在一些细胞或组织中，也检测到复合物 III 和 IV

的功能障碍[6], 人类中 AIF 是稳定氧化还原酶 CHCHD4 的线粒体膜间隙输入和组装功能必不可少的[14,15]。同样, 我们的研究也表明 AIF 的缺失会导致棉铃虫血淋巴中 ATP 水平的下降, 说明线粒体中电子传递链受阻从而无法进行能量合成。线粒体是能量合成的主要场所, 由于电子传递链产生活性氧使线粒体不断受到氧化应激的挑战, 最终可能导致线粒体结构和功能失活[61]。线粒体自噬是指自噬系统将受损的线粒体运送到溶酶体进行降解, 最终维持多种细胞类型的线粒体的数量和活性[63]。在本文中, 我们阐明了全长 AIF 的缺失导致线粒体功能障碍最终导致线粒体自噬, 丰富了线粒体自噬的发生机制。以往的研究表明, AIF 在细胞质中激活脂质转移酶, 使细胞膜中的磷脂酰丝氨酸暴露, 释放早期凋亡信号, 并入核招募核酸内切酶导致细胞凋亡。我们的研究发现, 除了入核外, AIF 由于在线粒体中的功能缺失导致线粒体自噬, 这种自噬最终诱导 CASP3 活化和凋亡发生, 可能因为线粒体损伤引起的线粒体自噬导致细胞难以存活。

以往的研究中也发现 AIF 的完全缺失有致命性, 检测 AIF 缺失小鼠发现其氧化还原酶活性和促凋亡功能均丧失, 而这种致命性是由于凋亡的缺乏还是线粒体功能的改变还尚不清楚, 我们对棉铃虫不同龄期的干扰实验表明, 无论是敲降维持能量合成的 f-AIF1 还是促凋亡的 c-AIF1, 都会导致棉铃虫发育异常或死亡。这表明在昆虫发育中, AIF 的双功能缺一不可, 缺失 f-AIF1 导致线粒体自噬和能量不足, 而缺失 c-AIF1 导致凋亡受阻, 成虫发育没有能量物质供给。此外, 本研究发现 f-AIF 抑制自噬, 而 20E 促进 AIF 表达的同时促进了 AIF 裂解, 因此, 20E 通过 AIF 同时促进了自噬和凋亡的发生。

2.5.2 AIF 的转录调控

已知, AIF 的转录水平可以受到多种因素调节。有研究表明, 缺氧诱导因子(Hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)可以通过直接结合 AIF 启动子中的缺氧反应元件在转录上抑制 AIF 的表达, AIF 的下调有助于缺氧诱导的上皮细胞-间充质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT) [122], EMT 在生理上与胚胎着床、胚胎发生和器官发育相关, 是诱导肿瘤侵袭和转移的中心机制之一[123]。缺氧导致 AIF 下调导致 PTEN 失活, AKT 激酶活化, 促进肿瘤发生[124]。本研究发现类固醇激素 20E 通过 FOXO 促进 AIF1 的表达, 并通过 AIF1 的片段化和入核整合了脂肪体的自噬和凋亡, 为研究类固醇激素对线粒体的作用及机制提供了参考。

2.5.3 AIF 诱导的线粒体自噬与凋亡

已有研究表明自噬可以转向凋亡, 在棉铃虫中已发现 20E 通过使细胞中 Ca^{2+} 浓度增加从而裂解 ATG5 [99], 且自噬触发组织蛋白酶 D 成熟, 诱导中肠细胞内

CASP3 裂解使中肠由自噬转向细胞凋亡[100]。本研究发现,在自噬和凋亡过程中,AIF1 发挥了重要作用。不同于自噬向凋亡的转变,在脂肪体中,由于 20E 使 AIF1 的核易位,导致细胞线粒体自噬和凋亡同时发生。研究表明昆虫中细胞的凋亡可能是由选择性自噬引起的[125]。在果蝇中肠中,阻止依赖自噬的细胞死亡会导致线粒体的积累,这表明线粒体在大量清除细胞质物质中起着重要作用[126],但线粒体自噬是否是导致 CASP3 依赖的凋亡的原因还需要进一步研究。

线粒体和凋亡本身就有密切联系,在 CASP 诱导的内源性凋亡中,细胞色素 C 从线粒体释放,激活凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apoptosis protease-activating factor-1, Apaf-1) 并触发 CASP 级联[127]。虽然 AIF 参与的凋亡被称为不依赖 CASP 的凋亡,但两者在生物体中有着密切的联系。线粒体可以释放凋亡相关因子 HtrA 丝氨酸蛋白酶 2[128],其主要通过结合和抑制凋亡抑制蛋白 (Inhibitor of apoptosis, IAP) 家族成员促进 CASP 的激活[129],AIF 也从线粒体中被释放。在胚状体空化过程中,中心的细胞通过凋亡消失,这一过程通常与 CASP3 激活有关,但研究表明,在存在 CASP3 抑制剂或 Apaf-1 或 CASP9 缺陷的细胞中,AIF 的核移位和细胞凋亡仍然可以进行[130]。这说明 AIF 诱导的凋亡与 CASP 诱导的凋亡同时参与了凋亡过程。我们的研究也发现,在昆虫的变态期干扰 AIF 后,凋亡水平显著下降,但依然能够检测到少量的凋亡信号,这表明了脂肪体的凋亡是由 AIF 和 CASP 共同参与的,且都是由 20E 调控。CASP 和 AIF 均被 FOXO 转录上调表达,说明 FOXO 作为两种凋亡途径共同的上游转录因子发挥作用。

2.6 结论

1. 取食期 f-AIF1 定位在线粒体中,参与能量合成,维持线粒体稳定,抑制自噬和凋亡。2. 变态期 20E 滴度增加,20E 除了通过活化 CASP3 引起凋亡外,还通过转录因子 FOXO 促进 f-AIF1 表达,并使 f-AIF 裂解为 c-AIF,离开线粒体,导致线粒体损伤失稳,发生线粒体自噬,ATP 不足,c-AIF 入核,同时诱发凋亡 (图 2-16)。

本文通过阐明类固醇激素 20E 促进 *Aif1* 转录并使 AIF 片段化引起线粒体自噬和细胞凋亡的机制,为研究自噬凋亡提供了新的理论基础。但依赖 CASP 与依赖 AIF 的凋亡之间的关系,还需要进一步研究。

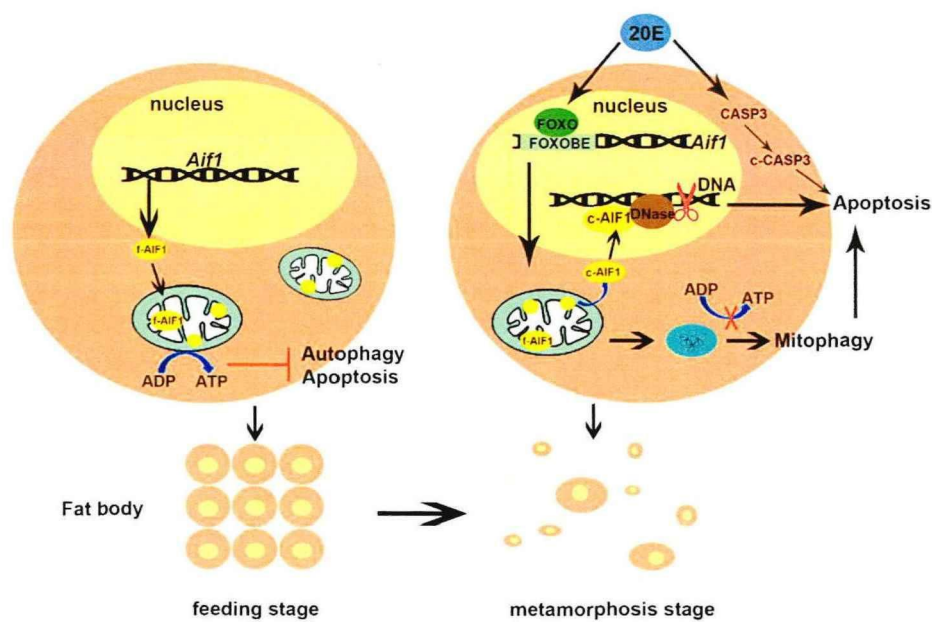


图 2-16 20E 促进 AIF1 切割引起线粒体自噬和细胞凋亡

Fig. 2-16 20E promotes cleavage of AIF1 to cause mitophagy and apoptosis

注：取食期 f-AIF1 定位在线粒体参与能量合成抑制自噬和凋亡，此时幼虫脂肪体紧密排列并保持完整，变态期 20E 使 f-AIF1 裂解成 c-AIF1 入核引起脂肪体细胞的线粒体自噬和凋亡，脂肪体组织发生解离。

Notes: In the feeding stage, f-AIF1 is located in mitochondria to participate in energy synthesis and inhibit autophagy and apoptosis. The larval fat body cells are tightly packed and remain intact. In the metamorphosis stage, 20E promotes f-AIF1 decomposed into c-AIF1 entering nucleus, it induces mitophagy and apoptosis of fat body cells, and the tissue dissociated.

参考文献

- [1] Sevrioukova, I. F. Redox-linked conformational dynamics in apoptosis-inducing factor[J]. *J Mol Biol*, 2009, 390(5): 924-938.
- [2] Susin, S. A., Lornzo, H. K., Zamzami, N., *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor[J]. *Nature*, 1999, 397(6718): 441-446.
- [3] Novo, N., Ferreira, P., and Medina, M. The apoptosis-inducing factor family: Moonlighting proteins in the crosstalk between mitochondria and nuclei[J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(3): 568-581.
- [4] Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., *et al.* DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor[J]. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(9): 680-684.
- [5] Parrish, J. Z., and Xue, D. Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(4): 987-996.
- [6] Hangen, E., Blomgren, K., Bénit, P., *et al.* Life with or without AIF[J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(5): 278-287.
- [7] Marshall, K. R., Gong, M., Wodke, L., *et al.* The human apoptosis-inducing protein AMID is an oxidoreductase with a modified flavin cofactor and DNA binding activity[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(35): 30735-30740.
- [8] Elguindy, M. M., and Nakamaru-Ogiso, E. Apoptosis-inducing Factor (AIF) and its family member protein, AMID, are rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductases (NDH-2)[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(34): 20815-20826.
- [9] Gong, M., Hay, S., Marshall, K. R., *et al.* DNA binding suppresses human AIF-M2 activity and provides a connection between redox chemistry, reactive oxygen species, and apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(41): 30331-30340.
- [10] Xie, Q., Lin, T., Zhang, Y., *et al.* Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 19673-19681.
- [11] Sevrioukova, I. F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(12): 2545-2579.
- [12] Sevrioukova, I. F. Structure/Function relations in AIFM1 variants associated with neurodegenerative disorders[J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(18): 3650-3665.
- [13] Troulinaki, K., Büttner, S., Marsal Cots, A., *et al.* WAH-1/AIF regulates mitochondrial oxidative phosphorylation in the nematode[J]. *Cell Death Discov*,

- 2018, 4(2): 1-9.
- [14] Meyer, K., Buettner, S., Ghezzi, D., *et al.* Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(7): e1814.
- [15] Hangen, E., Féraud, O., Lachkar, S., *et al.* Interaction between AIF and CHCHD4 regulates respiratory chain biogenesis[J]. *Mol Cell*. 2015, 58(6): 1001-1014.
- [16] Herrmann, J. M., and Riemer, J. The intermembrane space of mitochondria[J]. *Antioxid redox signal*, 2010, 13(9): 1341-1358.
- [17] Modjtahedi, N., Tokatlidis, K., Dessen, P., *et al.* Mitochondrial proteins containing Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix (CHCH) domains in health and disease[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 245-260.
- [18] Dickson-Murray, E., Nedara, K., Modjtahedi, N., *et al.* The Mia40/CHCHD4 oxidative folding system: redox regulation and signaling in the mitochondrial intermembrane space[J]. *Antioxidants (Basel)*. 2021, 10(4):592
- [19] Rinaldi, C., Grunseich, C., Sevrioukova, I. F., *et al.* Cowchock syndrome is associated with a mutation in apoptosis-inducing factor[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 91(6): 1095-1102.
- [20] Berger, I., Ben-Neriah, Z., Dor-Wolman, T., *et al.* Early prenatal ventriculomegaly due to an AIFM1 mutation identified by linkage analysis and whole exome sequencing[J]. *Mol Genet Metab*, 2011, 104(4): 517-520.
- [21] Ghezzi, D., Sevrioukova, I., Invernizzi, F., *et al.* Severe X-linked mitochondrial encephalomyopathy associated with a mutation in apoptosis-inducing factor[J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(4): 639-649.
- [22] Cheung, E. C. C., Joza, N., Steenaart, N. A. E., *et al.* Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis[J]. *EMBO J*, 2006, 25(17): 4061-4073.
- [23] Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., *et al.* The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor[J]. *Nature*, 2002, 419(6905): 367-374.
- [24] Armand, A.-S., Laziz, I., Djeghloul, D., *et al.* Apoptosis-inducing factor regulates skeletal muscle progenitor cell number and muscle phenotype[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27283.
- [25] Joza, N., Oudit, G. Y., Brown, D., *et al.* Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and

- dilated cardiomyopathy[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(23): 10261-10272.
- [26] Banerjee, H., Das, A., Srivastava, S., *et al.* A role for apoptosis-inducing factor in T cell development[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(9): 1641-1653.
- [27] Pospisilik, J. A., Knauf, C., Joza, N., *et al.* Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes[J]. *Cell*, 2007, 131(3): 476-491.
- [28] Vahsen, N., Candé, C., Brière, J.-J., *et al.* AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation[J]. *EMBO J*, 2004, 23(23): 4679-4689.
- [29] Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P., *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 24): 4727-4734.
- [30] Klein, J. A., and Ackerman, S. L. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(6): 785-793.
- [31] Bai, P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The factotums of cell maintenance[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(6): 947-958.
- [32] Norberg, E., Karlsson, M., Korenovska, O., *et al.* Critical role for hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 2 in the AIF-mediated apoptosis[J]. *EMBO J*, 2010, 29(22): 3869-3878.
- [33] Bidère, N., Lorenzo, H. K., Carmona, S., *et al.* Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 31401-31411.
- [34] Yacoub, A., Park, M. A., Hanna, D., *et al.* OSU-03012 promotes caspase-independent but PERK-, cathepsin B-, BID-, and AIF-dependent killing of transformed cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(2): 589-603.
- [35] Wang, X., Wang, J., Gengyo-Ando, K., *et al.* *C. elegans* mitochondrial factor WAH-1 promotes phosphatidylserine externalization in apoptotic cells through phospholipid scramblase SCRM-1[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(5): 541-549.
- [36] Kim, J.-T., Kim, K. D., Song, E. Y., *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g)[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(27): 6375-6383.
- [37] Gurbuxani, S., Schmitt, E., Cande, C., *et al.* Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor[J]. *Oncogene*, 2003, 22(43): 6669-6678.

- [38] Delavallée, L., Cabon, L., Galán-Malo, P., *et al.* AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics[J]. *IUBMB Life*, 2011, 63(4): 221-232.
- [39] Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., *et al.* An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast[J]. *J Cell Biol*, 2004, 166(7): 969-974.
- [40] Wang, X., Yang, C., Chai, J., *et al.* Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Science*, 2002, 298(5598): 1587-1592.
- [41] Zhu, C., Wang, X., Huang, Z., *et al.* Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(4): 775-784.
- [42] Miramar, M. D., Costantini, P., Ravagnan, L., *et al.* NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(19): 16391-16398.
- [43] Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S. A., *et al.* Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor[J]. *FASEB J*, 2001, 15(3): 758-767.
- [44] Joza, N., Galindo, K., Pospisilik, J. A., *et al.* The molecular archaeology of a mitochondrial death effector: AIF in *Drosophila*[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(6): 1009-1018.
- [45] Mizushima, N., and Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [46] Fleming, A., Bourdenx, M., Fujimaki, M., *et al.* The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration[J]. *Neuron*, 2022, 110(6): 935-966.
- [47] Tooze, S. A., and Yoshimori, T. The origin of the autophagosomal membrane[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(9): 831-835.
- [48] Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation[J]. *Cell*, 2010, 141(4): 656-667.
- [49] Ge, L., and Schekman, R. The ER-Golgi intermediate compartment feeds the phagophore membrane[J]. *Autophagy*, 2014, 10(1): 170-172.
- [50] Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., *et al.* Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes[J]. *Dev Cell*, 2011. 20(1): 131-139.

- [51] Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., *et al.* Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(7): 458-467.
- [52] Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., *et al.* Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization[J]. *Genes Cells*, 2007, 12(2): 209-218.
- [53] He, C., and Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy[J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 67-93.
- [54] Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., *et al.* Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR[J]. *Nature*, 2010, 465(7300): 942-946.
- [55] Cheong, H., Nair, U., Geng, J., *et al.* The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(2): 668-681.
- [56] Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., *et al.* Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 11): 2534-2544.
- [57] Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., *et al.* Calcium at the center of cell signaling: interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria, and lysosomes[J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(12): 1035-1049.
- [58] Tamura, Y., and Endo, T. Role of intra- and inter-mitochondrial membrane contact sites in yeast phospholipid biogenesis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 997: 121-133.
- [59] Kalkavan, H., and Green, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(1): 46-55.
- [60] Mehta, M. M., Weinberg, S. E., and Chandel, N. S. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP[J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(10): 608-620.
- [61] Wong, H.-S., Dighe, P. A., Mezera, V., *et al.* Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(41): 16804-16809.
- [62] Lemasters, J. J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging[J]. *Rejuvenation Res*, 2005, 8(1): 3-5.
- [63] Pickles, S., Vigie, P., and Youle, R. J. Mitophagy and quality control

- mechanisms in mitochondrial maintenance[J]. *Curr Biol*, 2018, 28(4): R170-R185.
- [64] Okamoto, K. Organellophagy: eliminating cellular building blocks via selective autophagy[J]. *J Cell Biol*, 2014, 205(4): 435-445.
- [65] Wu, H., and Chen, Q. Hypoxia activation of mitophagy and its role in disease pathogenesis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(12): 1032-1046.
- [66] Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., *et al.* Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy[J]. *EMBO J*, 2021, 40(3): e104705.
- [67] Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1[J]. *Science*, 2004, 304(5674): 1158-1160.
- [68] Ziviani, E., Tao, R. N., and Whitworth, A. J. *Drosophila* parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates mitofusin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(11): 5018-5023.
- [69] Iguchi, M., Kujuro, Y., Okatsu, K., *et al.* Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(30): 22019-22032.
- [70] Johansen, T., and Lamark, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins[J]. *Autophagy*, 2011, 7(3): 279-296.
- [71] Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy[J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 309-314.
- [72] Zhao, X.-F. Progress in understanding hormonal regulation during the postembryonic development of *Helicoverpa armigera*[J]. *J Integr*, 2021, 43(6): 1417.
- [73] Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(4): 495-516.
- [74] Martinvalet, D., Zhu, P., and Lieberman, J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis[J]. *Immunity*, 2005, 22(3): 355-370.
- [75] Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G., *et al.* Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 166-180.
- [76] Zhou, H., Xu, M., Gao, Y., *et al.* Matrine induces caspase-independent program cell death in hepatocellular carcinoma through bid-mediated nuclear

- p translocation of apoptosis inducing factor[J].
- Mol Cancer*
- , 2014, 13: 59.
- [77] Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. Apoptosis, autophagy, and more[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2405-2419.
- [78] Cain, K., Bratton, S. B., and Cohen, G. M. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex[J]. *Biochimie*, 2002, 84(2-3): 203-214.
- [79] Halestrap, A. Biochemistry: a pore way to die[J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 578-579.
- [80] Kim, J. H., Lee, S. Y., Oh, S. Y., *et al.* Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells[J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(6): 1233-1238.
- [81] Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., *et al.* Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(20): 13964-13971.
- [82] Samraj, A. K., Keil, E., Ueffing, N., *et al.* Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(40): 29652-29659.
- [83] Spencer, S. L., Gaudet, S., Albeck, J. G., *et al.* Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis[J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 428-432.
- [84] Philchenkov, A., Zavelevich, M., Krocak, T. J., *et al.* Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities[J]. *Exp Oncol*, 2004, 26(2): 82-97.
- [85] Wang, Y., An, R., Umanah, G. K., *et al.* A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1[J]. *Science*, 2016, 354: 6308.
- [86] Baehrecke, E. H. Autophagy: dual roles in life and death?[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(6): 505-510.
- [87] Takacs-Vellai, K., Vellai, T., Puoti, A., *et al.* Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(16): 1513-1517.
- [88] Kroemer, G., and Jäätelä, M. Lysosomes and autophagy in cell death control[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(11): 886-897.
- [89] Katayama, M., Kawaguchi, T., Berger, M. S., *et al.* DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in

- malignant glioma cells[J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(3): 548-558.
- [90] Gozuacik, D., and Kimchi, A. Autophagy and cell death[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2007, 78: 217-245.
- [91] Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice[J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 880-884.
- [92] Scott, R. C., Juhász, G., and Neufeld, T. P. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death[J]. *Curr Biol*, 2007, 17(1): 1-11.
- [93] Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., *et al.* Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(8): 2161-2172.
- [94] Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., *et al.* Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4[J]. *EMBO J*, 2007, 26(7): 1749-1760.
- [95] Lavieu, G., Scarlatti, F., Sala, G., *et al.* Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(13): 8518-8527.
- [96] Villagra, C., and Frías-Lasserre, D. Epigenetic Molecular Mechanisms in Insects[J]. *Neotrop Entomol*, 2020, 49(5): 615-642.
- [97] Xu, T., Nicolson, S., Denton, D., *et al.* Distinct requirements of Autophagy-related genes in programmed cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(11): 1792-1802.
- [98] Wang, H., Lu, Q., Cheng, S., *et al.* Autophagy activity contributes to programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Autophagy*, 2013, 9(12): 1975-1982.
- [99] Li, Y.-B., Yang, T., Wang, J.-X., *et al.* The steroid hormone 20-hydroxyecdysone regulates the conjugation of autophagy-related proteins 12 and 5 in a concentration and time-dependent manner to promote insect midgut programmed cell death[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9(28): 1-12.
- [100] Di, Y.-Q., Han, X.-L., Kang, X.-L., *et al.* Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis[J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1170-1192.
- [101] Karch, J., Schips, T. G., Maliken, B. D., *et al.* Autophagic cell death is dependent

- on lysosomal membrane permeability through Bax and Bak[J]. *Elife*, 2017, 6: e30543.
- [102] Law, J. H., and Wells, M. A. Insects as biochemical models[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(28): 16335-16338.
- [103] Skowronek, P., Wójcik, Ł., and Strachecka, A. Fat Body-Multifunctional Insect Tissue[J]. *Insects*, 2021, 12(6): 547.
- [104] Edgar, B. A., and Orr-Weaver, T. L. Endoreplication cell cycles: more for less[J]. *Cell*, 2001, 105(3): 297-306.
- [105] Zheng, H., Yang, X., and Xi, Y. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*[J]. *Life Sci*, 2016, 167: 22-31.
- [106] Li, S., Yu, X., and Feng, Q. Fat Body Biology in the Last Decade[J]. *Annu Rev Entomol*, 2019, 64: 315-333.
- [107] Bangi, E. *Drosophila* at the intersection of infection, inflammation, and cancer[J]. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013, 3: 103.
- [108] Nelliott, A., Bond, N., and Hoshizaki, D. K. Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*[J]. *Genesis*, 2006, 44(8): 396-400.
- [109] Bond, N. D., Nelliott, A., Bernardo, M. K., *et al.* BFTZ-F1 and Matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila*[J]. *Dev Biol*, 2011, 360(2): 286-296.
- [110] Jia, Q., Liu, Y., Liu, H., *et al.* Mmp1 and Mmp2 cooperatively induce *Drosophila* fat body cell dissociation with distinct roles[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7535.
- [111] Aguila, J. R., Suszko, J., Gibbs, A. G., *et al.* The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*[J]. *J Exp Biol*. 2007. 210(Pt 6): 956-963.
- [112] Ryoo, H. D., and Baehrecke, E. H. Distinct death mechanisms in *Drosophila* development[J]. *Curr Opin Cell Biol*. 2010, 22(6): 889-895.
- [113] He, H.-J., Wang, Q., Zheng, W.-W., *et al.* Function of nuclear transport factor 2 and Ran in the 20E signal transduction pathway in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*[J]. *BMC Cell Biol*, 2010, 11(1): 1-13.
- [114] Hannenhalli, S., and Kaestner, K. H. The evolution of Fox genes and their role in development and disease[J]. *Nat Rev Genet*. 2009. 10(4): 233-240.
- [115] Cai, M.-J., Zhao, W.-L., Jing, Y.-P., *et al.* 20-Hydroxyecdysone activates Forkhead box O to promote proteolysis during *Helicoverpa armigera* molting[J]. *Development*, 2016, 143(6): 1005-1015.

- [116] Wang, S., Liu, S., Liu, H., *et al.* 20-hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation[J]. *J Mol Cell Biol*, 2010, 2(3): 128-138.
- [117] Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z.-I., *et al.* Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space[J]. *EMBO J*, 2005, 24(7): 1375-1386.
- [118] Cao, G., Xing, J., Xiao, X., *et al.* Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(35): 9278-9293.
- [119] Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., *et al.* Potential therapeutic applications of autophagy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(4): 304-312.
- [120] Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., *et al.* Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(9): 741-752.
- [121] Shao, H.-L., Zheng, W.-W., Liu, P.-C., *et al.* Establishment of a new cell line from lepidopteran epidermis and hormonal regulation on the genes[J]. *PLoS One*, 2008, 3(9): e3127.
- [122] Kalluri, R., and Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428.
- [123] Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- [124] Xiong, Z., Guo, M., Yu, Y., *et al.* Downregulation of AIF by HIF-1 contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition of colon cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37(11): 1079-1088.
- [125] Denton, D., and Kumar, S. Autophagy-dependent cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(4): 605-616.
- [126] Chang, T.-K., Shravage, B. V., Hayes, S. D., *et al.* Uba1 functions in Atg7- and Atg3-independent autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(9): 1067-1078.
- [127] Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L., *et al.* Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis[J]. *EMBO J*, 1999, 18(13): 3586-3595.
- [128] Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. *Cell*, 2000, 102(1): 43-53.

- [129] Martins, L. M., Iaccarino, I., Tenev, T., *et al.* The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif[J]. J Biol Chem, 2002, 277(1): 439-444.
- [130] D'Anneo, A., Carlisi, D., Lauricella, M., *et al.* Parthenolide induces caspase-independent and AIF-mediated cell death in human osteosarcoma and melanoma cells[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(5): 952-967.