

分类号：Q78  
密级：

单位代码：10422  
学号：201712193



山东大学  
SHANDONG UNIVERSITY

# 博士学位论文

Dissertation for Doctoral Degree

论文题目：蜕皮激素重编程糖代谢和氨基酸代  
谢调控昆虫的变态发育

20-Hydroxyecdysone reprogrammes glucose and amino acid  
metabolism to regulate insect metamorphosis

|      |            |
|------|------------|
| 作者姓名 | 王晓培        |
| 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 25 日



## 摘要

### 研究背景与科学问题

完全变态昆虫一生经历卵、幼虫、蛹和成虫四个发育时期，在幼虫期通过取食促进生长发育，在变态发育期（从末龄幼虫经历蛹到成虫羽化）停止取食，通过分解幼虫组织-自噬来维持生命和成虫组织发育。蜕皮激素（此文指 20-羟基蜕皮酮，20-hydroxyecdysone, 20E）是调控昆虫变态发育的重要激素。变态期 20E 滴度增加，拮抗胰岛素信号通路，抑制摄食行为，使昆虫体内的代谢发生巨大变化，从摄取食物获取能量转变为通过分解幼虫组织获取能量，涉及基因转录变化及代谢产物变化，其调控机制尚不清楚，代谢产物与组织重塑的关系也少见报道。本论文以重大农业害虫棉铃虫（*Helicoverpa armigera*）为研究模型，研究 20E 调控昆虫变态发育期代谢重编程的分子机制，包括研究 20E 对 Krüppel 样转录因子（krüppel-like factor, KLF）的表达调控及其在自噬和糖异生中的作用；通过代谢组学研究 20E 调控氨基酸代谢重编程的分子机制。

### 研究结果

通过检测 KLF15 在棉铃虫生长发育过程中的表达变化，发现 KLF15 主要是在变态期的脂肪体中高表达，20E 通过 EcR 促进 *Klf15* 的转录。通过观察脂肪体形态以及虫体敲降实验，证明 KLF15 对于变态期脂肪体分解至关重要，KLF15 促进糖异生、自噬和凋亡相关基因的表达。敲降自噬相关基因 8（autophagy related gene 8, *Atg8*）后，脂肪体的分解受到抑制，生糖底物包括游离脂肪酸、甘油和游离氨基酸的含量下降，葡萄糖水平下降，说明 KLF15 促进自噬，为糖异生提供底物。通过软件分析，发现在 *Atg8* 和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（phosphoenolpyruvate carboxykinase, *Pepck*）的启动子序列中有 KLF15 的结合位点（CACCC, KLF bs），20E 诱导 KLF15 结合 *Atg8* 和 *Pepck* 启动子中的 KLF bs 从而促进其转录，重编程糖代谢，使糖代谢从取食期的糖酵解为主转变为变态期的糖异生为主。通过检测与葡萄糖生成相关的代谢物以及代谢途径中的关键限速酶，发现糖代谢相关的基因表达发生了显著变化，从取食期的糖酵解基因、糖原和海藻糖合成酶基因高表达转变为变态期的糖异生基因、糖原和海藻糖分解酶基因高表达，导致蛹期血淋巴葡萄糖水平升高。研究表明 20E 通过 KLF15 整合促进变态期幼虫组织的自噬和糖异生。

通过测定幼虫生长期（6th-24 h）、游走期（6th-96 h）和蛹期（P6）的血淋巴代谢组，发现血淋巴中的代谢产物在棉铃虫发育过程中发生显著变化，其中，精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸被鉴定为幼虫生长期、游走期和蛹期的标志代谢物。实验证明精氨酸促进幼虫细胞增殖， $\alpha$ -酮戊二酸促进幼虫细胞自噬，谷氨酸促进成虫细胞增殖。在变态期，20E

通过抑制精胺琥珀酸合酶 (argininosuccinate, *Ass*) 的表达, 抑制精氨酸合成, 并且, 20E 通过促进精氨酸酶 (arginase, *Arg*) 的表达, 促进精氨酸分解, 从而使血淋巴中的精氨酸在进入游走期后含量较取食期大幅下降。而谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, *GDH*) 在取食期和游走期的中肠中高表达, 促进取食期从食物中获得的谷氨酸转变为  $\alpha$ -酮戊二酸, 从而使  $\alpha$ -酮戊二酸含量在游走期升高。进入蛹期后,  $\alpha$ -酮戊二酸在另一种谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase-like, *GDH-like*) 的作用下转变为谷氨酸, 加之变态期细胞自噬产生的游离氨基酸也转变为谷氨酸, 从而使血淋巴中的谷氨酸在蛹期大量增加, 成为成虫发育的主要能量物质。在幼虫停止取食进入变态期后, 20E 通过调控不同代谢途径中关键基因的表达从而重编程氨基酸代谢支持棉铃虫的变态发育。

## 结论

### 一、蜕皮激素通过 KLF15 整合促进自噬和糖异生从而维持昆虫变态发育中葡萄糖稳态

1. 20E 通过 EcR 促进 *Klf15* 的表达。

2. KLF15 通过结合 *Atg8* 启动子区域的 KLF bs 促进 *Atg8* 的转录, 促进脂肪体的自噬和凋亡。

3. 变态期幼虫组织发生自噬与凋亡为糖异生提供底物。

4. 棉铃虫变态发育过程中, 20E 通过 KLF15 调控糖代谢基因表达重编程糖代谢。

### 二、蜕皮激素重编程氨基酸代谢支持昆虫的变态发育

1. 棉铃虫生长发育过程中体内的代谢产物会发生变化。

2. 精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸分别在幼虫取食期、游走期和蛹期富集, 是幼虫取食期、游走期和蛹期的标志代谢物。精氨酸在幼虫期促进幼虫生长和增殖,  $\alpha$ -酮戊二酸在游走期促进幼虫自噬, 谷氨酸在蛹期促进成虫生长和增殖。

3. 20E 通过抑制 *Ass* 的表达、促进 *Arg* 的表达降低变态期精氨酸的水平。

4. 在取食期和游走期中肠中高表达的 *Gdh* 会促进谷氨酸转变为  $\alpha$ -酮戊二酸。 $\alpha$ -酮戊二酸通过在蛹期脂肪体中高表达的 *Gdh-like* 转变为谷氨酸。

5. 自噬可以产生多种游离氨基酸并转化为谷氨酸, 从而为成虫发育提供能量。

## 科学意义

该研究阐明了类固醇激素 20E 通过调控不同基因表达重编程糖代谢和氨基酸代谢的分子机制, 阐明了代谢与组织重塑的关系, 为深入研究类固醇激素调控代谢重编程提供了新的理论知识, 为害虫防治提供了理论基础和靶标基因。

关键词: 蜕皮激素; 代谢; 组织重塑; 转录因子 KLF15; 精氨酸;  $\alpha$ -酮戊二酸; 谷氨酸

## ABSTRACT

### Background and scientific questions

Holometabolous insect undergo four developmental stages in their life: egg, larva, pupa and adult. Feeding supports growth and development in larval stages, stops feeding in metamorphosis development stages (from the last larva through pupa to adult), and survive and develop adult tissues by breaking down larval tissue, a process known as autophagy. 20-hydroxyecdysone (20E) is a crucial hormone that controls insect metamorphosis. The high-titer 20E during metamorphosis inhibits feeding behavior and opposes the insulin signaling pathway, resulting in great changes in the metabolism, from food intake to energy acquisition by decomposing larval tissues, which involves changes in genes transcription and metabolites. In this paper, the major agricultural pest *Helicoverpa armigera*, cotton bollworm, was used as the research model to investigate the molecular mechanism of 20E regulating metabolic reprogramming during metamorphosis, including the regulation of 20E on KLF expression and its role in autophagy and gluconogenesis; the molecular mechanism of 20E regulating amino acid metabolic reprogramming by metabonomics.

### Results

By detecting the expression changes of KLF15 during the development and metamorphosis, we found that KLF15 was highly expressed in the fat body during metamorphosis, and 20E promoted *Klf15* transcription through EcR. By observing the morphology of fat body and knockdown experiments, KLF15 was crucial for the decomposition of fat body during metamorphosis. After knockdown *Klf15*, a series of metabolites and related genes were detected, and KLF15 was found to promote gluconogenesis, autophagy and apoptosis. The decomposition of fat body was inhibited after knockdown autophagy related gene 8 (*Atg8*), the level of glycogenic substrates including free fatty acids (FFAs), glycerol, and free amino acids (FAAs) decreased, and the glucose levels decreased, indicating that KLF15 promoted autophagy and provided substrates for gluconogenesis. We found the binding sites of KLF15 (CACCC, KLF bs) in the promoter sequence of *Atg8* and *Pepck*, and 20E induced the binding of KLF15 to KLF bs to promote the transcription of *Atg8* and *Pepck*. 20E reprogrammed glucose metabolism from glycolysis in feeding phase to gluconogenesis in metamorphosis phase. The expression of genes related to glucose metabolism changed significantly, going from high expression of glycolysis, glycogen and trehalose synthase genes during feeding stages to high expression of gluconogenesis, glycogen and trehalose



decomposition genes during metamorphosis, leading to the increase of hemolymph glucose levels. These finding showed that 20E promoted KLF15 to integrate autophagy and gluconogenesis to maintain glucose homeostasis during metamorphosis.

The metabolites were measured in the hemolymph at the larval growing stage (6th-24 h), wandering stage (6th-96 h) and pupal stage (P6). It was found that the metabolites changed significantly during the development and metamorphosis of *H. armigera*. Arginine,  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG) and glutamate (Glu) were screened as the mark metabolites of the feeding larva, wandering larva and pupa. Arginine promoted larval cell proliferation,  $\alpha$ -KG promoted larval cell autophagy, and Glu promoted adult cell proliferation. By inhibiting the expression of argininosuccinate (*Ass*), 20E inhibited the synthesis of arginine; additionally, by promoting the expression of arginase (*Arg*), 20E promoted the decomposition of arginine, resulting in a significant decrease in arginine levels in the hemolymph after entering the metamorphosis stages compared to the feeding stages. Glutamate dehydrogenase (GDH) was highly expressed in the midgut during feeding and wandering stages, which promoted the conversion of Glu obtained from food into  $\alpha$ -KG and increased the levels of  $\alpha$ -KG during wandering stages. After entering the pupal stage,  $\alpha$ -KG is transformed into Glu by another glutamate dehydrogenase-like (GDH-like), and FAAs produced by autophagy during metamorphosis were also transformed into Glu, resulting in a significant increase of Glu in the pupal hemolymph, it becomes the primary source of energy for adult development. 20E reprogrammed amino acid metabolism to promote tissue remodeling during metamorphosis by regulating the expression of key genes in different metabolic pathways.

## Conclusion

### **KLF 15 integrated autophagy and gluconeogenesis to maintain glucose homeostasis under 20-hydroxyecdysone regulation**

1. 20E promoted *Klf15* expression through EcR.
2. KLF15 promoted *Atg8* transcription by binding to KLF bs in the *Atg8* promoter, thereby promoting autophagy and apoptosis in the fat body during metamorphosis.
3. Autophagy and apoptosis of larva tissue during metamorphosis provided the substrates for gluconeogenesis.
4. 20E reprogrammed glucose metabolism by regulate the expression of glucose metabolism genes.

### **20-hydroxyecdysone reprogramming amino acid metabolism support the metamorphic development of insects**

1. The hemolymph metabolites were altered during metamorphosis of *Helicoverpa armigera*.

2. Arginine,  $\alpha$ -KG and Glu are abundant marker metabolites of the feeding larvae, wandering larvae and pupae, which promoted larval cell proliferation and growth, larval cell autophagy, and imaginal cell proliferation and growth, respectively.

3. The arginine levels were decreased by 20E regulation via repression of *Ass* expression and upregulation of *Arg* expression during metamorphosis.

4. The  $\alpha$ -KG was increased from the transformation of Glu by GDH expressed in the feeding and wandering larval midgut that was repressed by 20E during metamorphosis. The Glu was increased from the transformation of  $\alpha$ -KG by GDH-like expressed in the pupal fat body that was upregulated by 20E.

5. The FAAs produced from autophagy also contributed to the increased Glu levels at pupal stages.

#### **Scientific significance**

This study elucidated the molecular mechanism of steroid hormone 20E reprogramming glucose metabolism and amino acid metabolism by regulating different genes expression, and illustrated the relationship between metabolism and tissue remodeling. It provided new theoretical knowledge for further study of steroid hormone regulation metabolic reprogramming, and provided theoretical basis and target genes for pest control.

**Key words:** 20-hydroxyecdysone; metabolism; tissue remodeling; Krüppel-like factor 15; arginine;  $\alpha$ -KG; Glu



# 目 录

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 第一章 前言.....                                           | 1  |
| 1. 概述.....                                            | 1  |
| 2. 20E 促进昆虫变态发育 .....                                 | 1  |
| 2.1 20E 的合成与分泌 .....                                  | 2  |
| 2.2 20E 的基因组途径 .....                                  | 2  |
| 2.3 20E 的非基因组途径 .....                                 | 3  |
| 2.4 20E 促进组织重塑 .....                                  | 4  |
| 3. 昆虫变态发育过程代谢发生重编程 .....                              | 6  |
| 3.1 脂肪体是储存营养与调控代谢的主要组织 .....                          | 6  |
| 3.2 代谢与发育密切相关.....                                    | 7  |
| 3.3 20E 调控代谢 .....                                    | 8  |
| 3.4 代谢组 .....                                         | 9  |
| 4. KLF 是调控代谢的重要转录因子 .....                             | 9  |
| 4.1 KLF 的结构特征 .....                                   | 9  |
| 4.2 KLF 的功能 .....                                     | 10 |
| 4.3 KLF15 调控糖脂代谢 .....                                | 10 |
| 5. 本文的科学问题及研究方案 .....                                 | 10 |
| 5.1 科学问题.....                                         | 10 |
| 5.2 研究方案及预期目标.....                                    | 11 |
| 第二章 蜕皮激素通过 KLF15 整合促进自噬和糖异生从而维持昆虫<br>变态发育中葡萄糖稳态 ..... | 12 |
| 1. 引言 .....                                           | 12 |
| 2. 材料与方法.....                                         | 13 |
| 2.1 实验材料.....                                         | 13 |
| 2.2 实验方法.....                                         | 14 |
| 3. 实验结果.....                                          | 23 |
| 3.1 筛选棉铃虫中参与糖异生的 KLF.....                             | 23 |
| 3.2 20E 促进 Klf15 的表达 .....                            | 26 |
| 3.3 KLF15 促进化蛹以及脂肪体的自噬和凋亡 .....                       | 28 |
| 3.4 组织降解为糖异生提供底物.....                                 | 36 |
| 3.5 昆虫变态发育过程中糖代谢由糖酵解转变为糖异生 .....                      | 38 |
| 3.6 KLF 通过上调 Pepck 的表达促进糖异生 .....                     | 41 |
| 4. 讨论.....                                            | 44 |
| 4.1 20E 重编程糖代谢 .....                                  | 44 |

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 20E 通过 KLF15 促进自噬基因的表达.....                               | 45 |
| 4.3 自噬和凋亡为糖异生提供底物.....                                        | 45 |
| 5. 小结.....                                                    | 46 |
| 第三章 蜕皮激素重编程氨基酸代谢支持昆虫的变态发育 .....                               | 48 |
| 1. 引言.....                                                    | 48 |
| 2. 材料与方法.....                                                 | 49 |
| 2.1 实验材料.....                                                 | 49 |
| 2.2 实验方法.....                                                 | 49 |
| 3. 实验结果.....                                                  | 51 |
| 3.1 代谢组学分析.....                                               | 51 |
| 3.2 精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸决定不同的细胞命运 .....                    | 57 |
| 3.3 20E 调节精氨酸水平下降 .....                                       | 61 |
| 3.4 20E 通过 GDH 和 GDH-like 调控 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸相互转<br>换 ..... | 65 |
| 3.5 谷氨酸促进成虫脂肪体的形成.....                                        | 71 |
| 4. 讨论.....                                                    | 73 |
| 4.1 氨基酸通过决定不同的细胞命运来调控组织重塑 .....                               | 73 |
| 4.2 20E 通过重编程代谢调控代谢产物的变化 .....                                | 74 |
| 4.3 自噬产生的 FFAs 用于蛹/成虫的发育 .....                                | 75 |
| 5. 小结.....                                                    | 75 |
| 第四章 论文创新点总结及意义 .....                                          | 77 |
| 参考文献.....                                                     | 78 |

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         |
| 3-MA      | 3-methyladenine                     | 3-甲基腺嘌呤          |
| 5F        | fifth feeding stage                 | 5 龄取食期           |
| 5M        | fifth molting stage                 | 5 龄蜕皮期           |
| 6th-6 h   | sixth instar 6 h                    | 6th-6 小时         |
| 6th-24 h  | sixth instar 24 h                   | 6th-24 小时        |
| 6th-48 h  | sixth instar 48 h                   | 6th-48 小时        |
| 6th-72 h  | sixth instar 72 h                   | 6th-72 小时        |
| 6th-96 h  | sixth instar 96 h                   | 6th-96 小时        |
| 6th-120 h | sixth instar 120 h                  | 6th-120 小时       |
| P0        | pupa on day 0                       | 蛹 0 天            |
| P2        | pupa on day 2                       | 蛹 2 天            |
| P4        | pupa on day 4                       | 蛹 4 天            |
| P6        | pupa on day 6                       | 蛹 6 天            |
| P8        | pupa on day 8                       | 蛹 8 天            |
| ANOVA     | analysis of variance                | 方差分析             |
| ARG       | arginase                            | 精氨酸酶             |
| ASS       | argininosuccinate synthetase        | 精胺琥珀酸合酶          |
| ATG       | autophagy-related gene              | 自噬相关基因           |
| bp        | base pair                           | 碱基对              |
| °C        | degree Celsius                      | 摄氏度              |
| CASP3     | caspase-3                           | 半胱氨酸蛋白酶 3        |
| cDNA      | complementary deoxyribonucleic acid | 互补脱氧核糖核酸         |
| ChIP      | chromatin immunoprecipitation       | 染色质免疫共沉淀         |
| DAPI      | 4', 6-diamidino-2-phenylindole      | 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 |
| DEPC      | diethy pyrocarbonate                | 焦炭酸二乙酯           |
| DMSO      | dimethyl sulfoxide                  | 二甲基亚砷            |
| dsRNA     | double-stranded RNA                 | 双链核糖核酸           |
| EcR       | ecdysone receptor                   | 蜕皮激素受体           |
| EcRE      | ecdysone response element           | 蜕皮激素受体元件         |
| FAAs      | free amino acids                    | 游离氨基酸            |
| FFAs      | free fatty acids                    | 游离脂肪酸            |
| G6P       | glucose-6-phosphatase               | 葡萄糖-6-磷酸         |
| GFP       | green fluorescent protein           | 绿色荧光蛋白           |



续表 1-1 符号说明

Tab. 1-1 Symbol description

| 缩略语   | 英文全称                                                                   | 中文全称                   |
|-------|------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Glu   | glutamate                                                              | 谷氨酸                    |
| GDH   | glutamate dehydrogenase                                                | 谷氨酸脱氢酶                 |
| GS    | glycogen synthase                                                      | 糖原合成酶                  |
| h     | hour                                                                   | 小时                     |
| HaEpi | <i>H. armigera</i> epidermal cell line                                 | 棉铃虫表皮细胞系               |
| HE    | hematoxylin and eosin                                                  | 苏木精伊红                  |
| H3    | histone H3                                                             | 组蛋白 H3                 |
| HK    | hexokinase                                                             | 己糖激酶                   |
| IgG   | immunoglobulin G                                                       | 免疫球蛋白 G                |
| IM    | imaginal midgut                                                        | 成虫中肠                   |
| IPTG  | isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactoside                                   | 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 |
| kDa   | kilodalton                                                             | 千道尔顿                   |
| KLF   | krüppel-like factor                                                    | krüppel 样转录因子          |
| L     | liter                                                                  | 升                      |
| LB    | luria-bertani medium                                                   | Luria-Bertani 培养基      |
| LC3   | microtubule-associated protein 1 light chain 3                         | 微管相关蛋白 1 轻链 3          |
| LM    | larval midgut                                                          | 幼虫中肠                   |
| M     | mol per liter                                                          | 摩尔每升                   |
| mg    | milligram                                                              | 毫克                     |
| min   | minute                                                                 | 分钟                     |
| mL    | milliliter                                                             | 毫升                     |
| mRNA  | messenger RNA                                                          | 信使 RNA                 |
| ng    | nanogram                                                               | 纳克                     |
| PA    | pyruvic acid                                                           | 丙酮酸                    |
| PBS   | phosphate-buffered saline                                              | 磷酸盐缓冲液                 |
| PCR   | polymerase chain reaction                                              | 聚合酶链式反应                |
| PEPCK | phosphoenolpyruvate carboxykinase                                      | 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶             |
| PFK   | phosphofructokinase                                                    | 磷酸果糖激酶                 |
| pH    | hydrogen ion concentration                                             | 氢离子浓度指数                |
| p-H3  | phosphorylated histone H3                                              | 组蛋白 H3 磷酸化             |
| PK    | pyruvate kinase                                                        | 丙酮酸激酶                  |
| PMSF  | phenylmethanesulfonyl fluoride                                         | 丙甲基磺酰氟                 |
| PTU   | phenylthiourea                                                         | 苯基硫脲                   |
| qPCR  | quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction | 实时荧光定量 PCR             |

续表 1-1 符号说明

Tab. 1-1 Symbol description

| 缩略语          | 英文全称                                                          | 中文全称              |
|--------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|
| s            | second                                                        | 秒                 |
| SDS-PAGE     | sodium dodecyl sulfate-<br>polyacrylamide gel electrophoresis | 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 |
| TCA cycle    | tricarboxylic acid cycle                                      | 三羧酸循环             |
| TPS          | trehalose-6-phosphate synthetase                              | 海藻糖-6-磷酸合成酶       |
| TRE          | trehalase                                                     | 海藻糖酶              |
| USP1         | ultraspiracle isoform 1                                       | 超气门蛋白 1           |
| YFP          | yellow fluorescent protein                                    | 黄色荧光蛋白            |
| $\alpha$ -KG | alpha-ketoglutarate                                           | $\alpha$ -酮戊二酸    |
| $\mu$ g      | microgram                                                     | 微克                |
| $\mu$ L      | microliter                                                    | 微升                |

# 第一章 前言

## 1. 概述

昆虫是地球上已知的数量和种类最多的生物类群，目前已知的被命名的昆虫种类已经超过 100 万种[1]。变态发育是昆虫适应进化的结果，根据发育历程可以将昆虫的变态种类分为增节变态、表变态、原变态、不完全变态和完全变态。完全变态昆虫一生经历卵、幼虫、蛹和成虫四个发育时期，在变态发育过程中，昆虫的内部结构、外部形态和生理功能均发生显著变化，组织发生重塑，即幼虫组织降解及成虫组织形成，体内的代谢也发生变化，从摄食获得能量转变为降解组织获得能量。蜕皮激素（此文指 20-羟基蜕皮酮，20-hydroxyecdysone, 20E）作为调控昆虫变态发育的重要激素，在昆虫变态发育过程中如何调控组织重塑及代谢依旧存在许多未解之谜。昆虫由于生长周期短、形态变化显著，因此是一种十分良好的实验模型。本研究以重大农业害虫棉铃虫为研究对象，通过研究蜕皮激素调控昆虫变态发育、组织重塑以及代谢，阐明蜕皮激素调控代谢重编程及其与组织重塑的关系。本研究丰富了激素调控机体发育的知识，为研究代谢重编程提供理论参考，同时为害虫防治提供靶标基因，对于保护农业减少农作物损耗从而提高经济效益具有十分重要的意义。

## 2. 20E 促进昆虫变态发育

昆虫的变态发育主要由 20E 调控[2, 3]。在昆虫发育过程中，体内的 20E 滴度发生明显变化，如在烟草天蛾中，幼虫期 20E 滴度较低，而到了 4 龄末期进入 5 龄期，体内的 20E 滴度逐渐升高，从而促进变态[4]。在果蝇中，20E 滴度会在三龄幼虫时期形成第一个小脉冲，从而触发幼虫到蛹的转变以及成虫盘细胞的增殖[5]。到了游走期，20E 滴度不断升高并形成新的脉冲，诱导幼虫停止取食从而完成变态过程并形成新的成虫组织，驱动幼虫进入蛹期[6]。在棉铃虫中，20E 滴度在幼虫停止取食后不断上升（图 1-1）。20E 发挥功能既可以与其核受体（ecdysone receptor, EcR）相结合，也可以与细胞膜上的受体 G 蛋白偶联受体（G protein-coupled receptors, GPCR）结合起始变态反应。20E 通过 GPCR 调控蛋白定位变化以及翻译后修饰，激活基因组途径的关键转录因子，从而将基因组途径和非基因组途径相连接[7]。

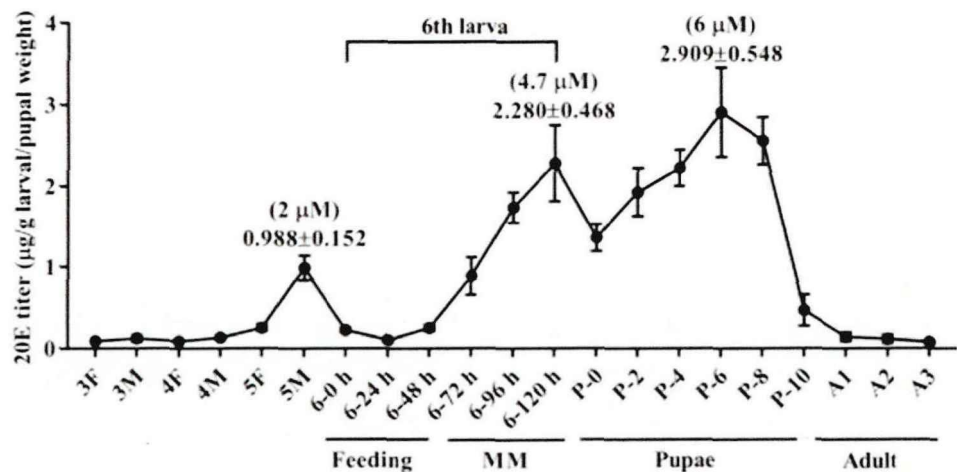


图 1-1 棉铃虫发育过程中 20E 滴度曲线[7]

Fig. 1-1 20E titer curve of *H. armigera* during development [7]

2.1 20E 的合成与分泌

蜕皮激素是在 1954 年由 Butenandt 和 Karlason 首次分离出来的[8]。蜕皮激素是在前胸腺中由促前胸腺激素（prothoracicotrophic hormone, PTTH）调控合成的[9, 10]。PTTH 是一种小分子的神经肽，在昆虫咽侧体由内分泌腺细胞合成后，分泌到前胸腺中促进蜕皮激素的合成与分泌[11, 12]。由前胸腺分泌出来的蜕皮激素在蜕皮激素 20-单加氧酶（ecdysone 20-monooxygenase, E20MO）的作用下，在第 20 位碳原子上加羟基成为有活性的 20E 并结合其受体激活蜕皮变态相关通路[13, 14]（图 1-2）。

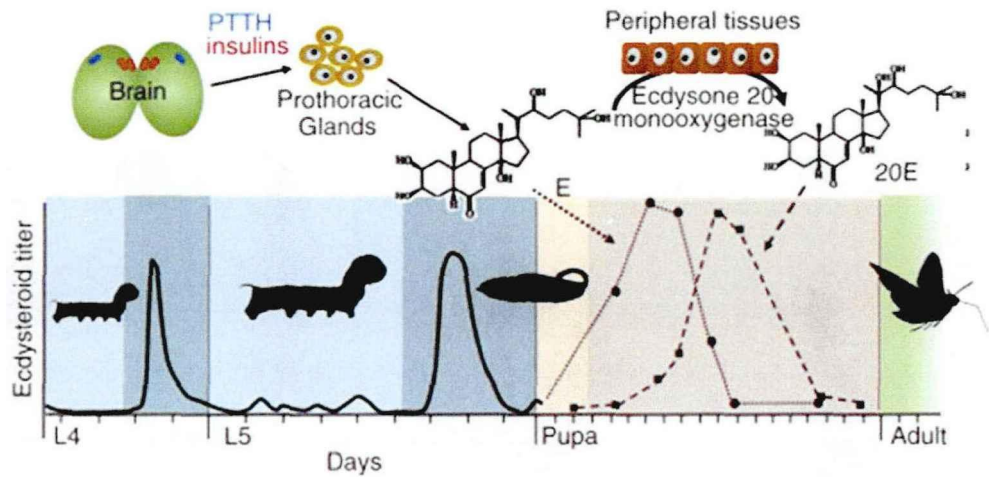


图 1-2 20E 合成机制[12]

Fig. 1-2 20E synthesis mechanism [12]

2.2 20E 的基因组途径

20E 发挥功能是通过与其核受体 EcR 相结合，EcR 再与超气门蛋白（ultraspiracle protein, USP）形成转录复合体，调控 20E 诱导的变态通路的基因表达[15, 16]，这是之



前大家一致认为的 20E 发挥功能的“唯一”信号通路（图 1-3）。大多数昆虫体内有两种 EcR，即 EcRA 和 EcRB[17]，在果蝇中鉴定到 3 个 EcR 基因，即 EcRA，EcRB1 和 EcRB2，EcRA 主要存在于成虫组织，EcRB1 在凋亡的幼虫组织中高表达[18]。在棉铃虫中鉴定到一种 EcR 基因，即 EcRB1[19]，也只存在一种 USP。在果蝇中鉴定到一种 USP，埃及伊蚊和烟草天蛾中则存在两种 USP[20]。在 20E 的诱导下 EcR 与 USP 形成异源二聚体并进一步结合下游基因如 *Hr3*、*Hr4* 和 *E75* 的启动子，从而诱导昆虫变态[21]。

EcR 具有核受体家族的结构特点[17, 22]，即具有转录激活域、DNA 结合域、核定位信号以及配体结合域。缺乏 EcR 或者功能失常将导致化蛹失败和幼虫死亡[23]。USP 对于 20E 诱导的变态通路也是至关重要的。在果蝇中突变 USP 导致幼虫不能正常蜕皮[24]，20E 信号通路下游基因的转录下调，并抑制幼虫组织的凋亡[25]。EcR 也可以以一种不结合 USP 的方式响应 20E[26]，但与 20E 结合后，EcR 与 USP 的结合亲和力增强。USP 除了协同 EcR，对于受精、卵形态发育和成虫组织形成也是至关重要的[27]。

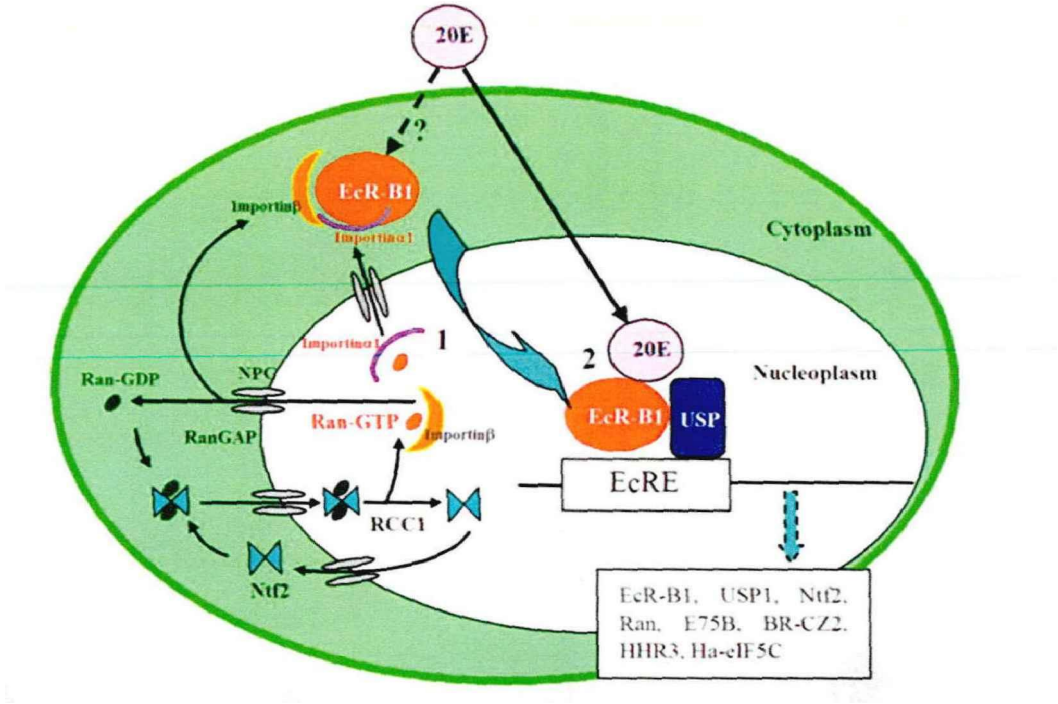


图 1-3 基因组信号通路[21]

Fig. 1-3 Genomic signaling pathway [21]

2.3 20E 的非基因组途径

后来研究发现，20E 除了可以进入细胞内与其核受体结合外，也可以快速与细胞膜上的 GPCR 相结合，起始下游信号通路。GPCR 作为类固醇激素的细胞膜受体发挥重要作用，如在哺乳动物中 GPR30 作为雌激素的受体，响应激素后诱导细胞内  $Ca^{2+}$  快速变化[28]。果蝇中的多巴胺受体 (dopamine receptor, DopEcR) 与 20E 相结合引起一系列细胞反应[29]。棉铃虫的 ErGPCR1 和 ErGPCR2 在 20E 的诱导下可以起始下游蜕皮变态

信号通路，如调控 EcR 和 USP 的形成或  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化，而在敲降这两种 *Gpcr* 后，20E 信号通路的基因表达受到抑制，说明 20E 可以通过膜受体传递信号[30,31]。在非基因组途径中，20E 通过 GPCR 调控 CDK10 和 USP1 的翻译后修饰，促进 EcRB1 与 USP 形成转录复合体，从而将基因组途径和非基因组途径相结合。非基因组途径的发现完善了激素调控发育的机制，并且通过与基因组途径协同合作从而更加精确的调控昆虫的变态发育（图 1-4）。

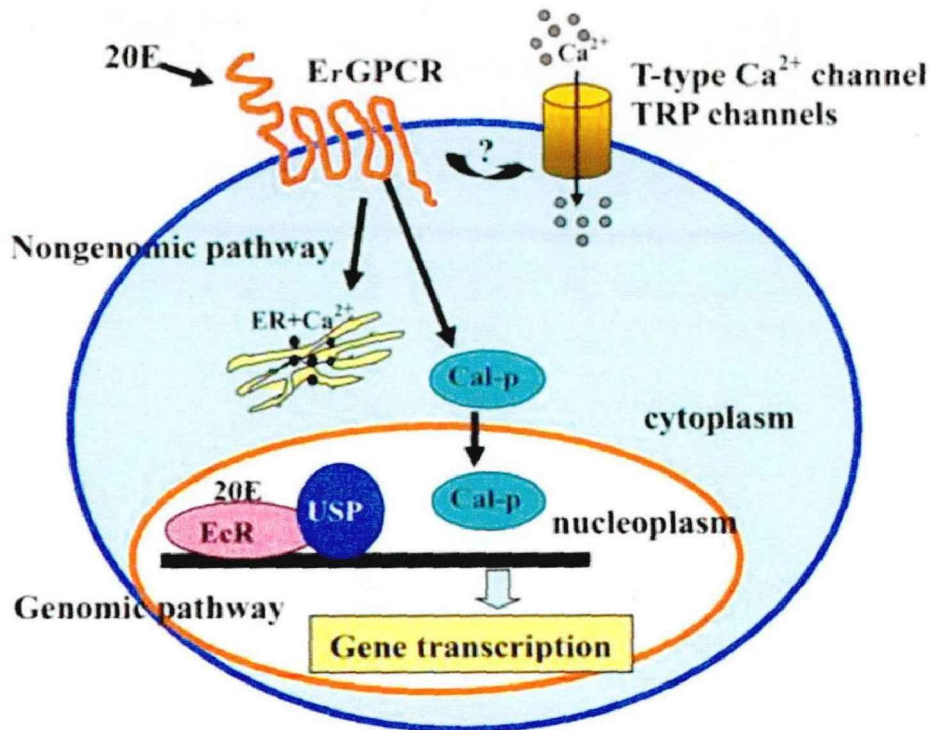


图 1-4 非基因组信号通路[31]

Fig. 1-4 Non-genomic signaling pathways [31]

## 2.4 20E 促进组织重塑

对于完全变态昆虫而言，其发育需要经历幼虫组织的凋亡和成虫组织的形成，在这个过程中，不管是虫体的外部形态还是内部构造都发生明显变化。组织重塑主要是通过细胞程序性死亡（programmed cell death, PCD）实现的，包括自噬和凋亡。许多研究都发现 20E 可以通过核受体转录复合体 EcR/USP 或非基因途径促进细胞自噬和凋亡。

自噬是指通过吞噬自身的细胞物质并将其包裹形成囊泡，然后与溶酶体结合形成自噬溶酶体，从而产生自身所需要的物质。因此自噬过程并不是一个单纯的死亡过程，而是利用溶酶体进行自我回收从而再利用的过程，是一种促进存活的机制。但过度自噬或者持续性自噬会诱导细胞凋亡，因此自噬引起存活或者死亡是由多种因素决定的。自噬与营养状态密切相关，是机体饥饿状态下必不可少的一种生存机制[32]（图 1-5）。自噬的机制在近些年得到很好地研究，整个过程涉及 30 多个自噬相关蛋白。自噬的发生涉

及两大泛素连接系统，其中自噬相关蛋白 8（autophagy related gene 8，ATG8/LC3）结合磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine，PE），从 LC3-I 转变为 LC3-II，并转移至自噬膜上，因此 LC3-II 是自噬发生的重要标志[33, 34]。凋亡是由基因控制的使细胞自主且有序死亡的过程，半胱天冬蛋白酶（caspase）在其中发挥重要作用。当起始的 caspase（2、8、9、10）被激活后便去活化下游效应 caspase（3、6、7），从而诱导细胞凋亡。Caspase-3（CASP3）是细胞凋亡过程中最主要的蛋白酶，也是启动细胞凋亡的主要效应分子[35]。

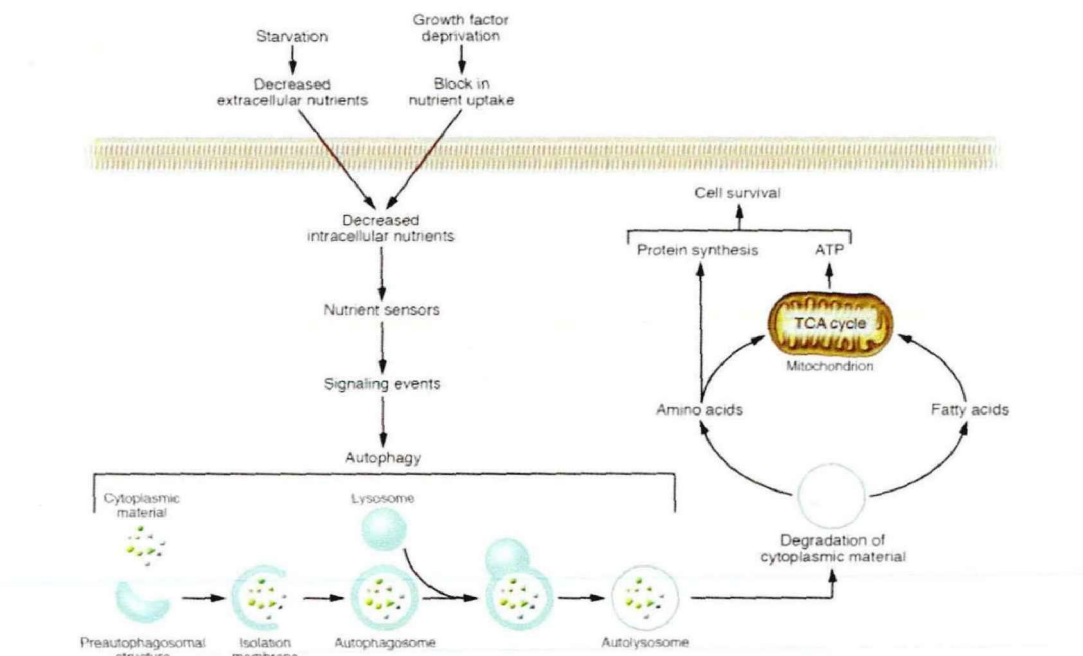


图 1-5 自噬与营养状态密切相关[32]

Fig. 1-5 Autophagy is closely related to nutritional status [32]

20E 可以上调 *Atgs* 和 *Casps* 的表达诱导组织发生自噬和凋亡[36]。在家蚕中随着 20E 滴度的升高，自噬基因被激活[37, 38]，而后激活凋亡基因，从而出现胃囊收缩、中肠降解和脂肪体降解等现象[39]（图 1-6）。20E 参与调节脂肪体的重塑过程[40]，通过 *Br-C*、*E93* 等基因激活自噬和凋亡，从而诱导脂肪体的降解。敲降 *E93* 的表达导致家蚕生长发育滞后，脂肪体的降解受到抑制[41]。20E 也可以通过细胞外基质金属蛋白酶对脂肪体重塑发挥重要作用[42, 43]。在棉铃虫变态发育过程中 20E 促进 *lgf-2-like* 的表达促进成虫脂肪体的形成[44]。自噬与凋亡关系密切，在棉铃虫中发现自噬决定凋亡的发生，20E 诱导  $\text{Ca}^{2+}$  内流，从而使自噬转变为凋亡，在添加自噬抑制剂 3-MA 后抑制凋亡的发生[45]。20E 促进组织蛋白酶 D（cathepsin D，CTSD）表达，通过自噬诱导转变为

成熟的状态从而进一步激活 CASP3 促进组织凋亡[46],说明自噬是凋亡的先决条件[47]。

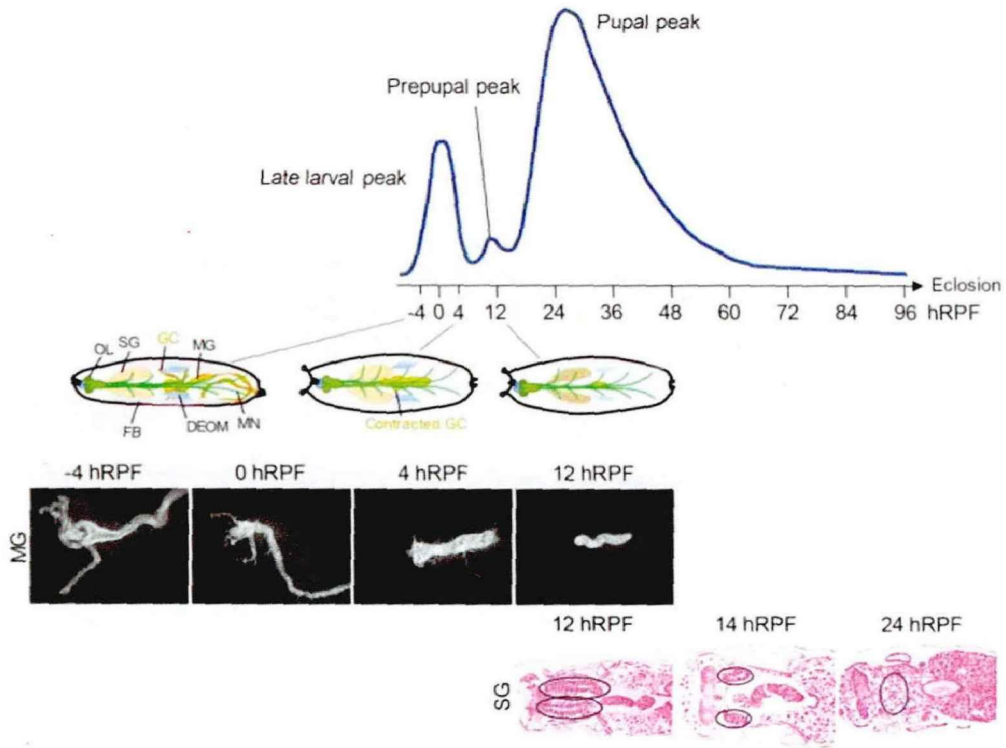


图 1-6 20E 调控组织重塑[39]

Fig. 1-6 20E regulates tissue remodeling [39]

### 3. 昆虫变态发育过程代谢发生重编程

#### 3.1 脂肪体是储存营养与调控代谢的主要组织

昆虫脂肪体的功能类似于哺乳动物的肝脏，在胚胎时期由中胚层分化而来。脂肪体内的主要成分是脂滴 (lipid droplets, LD)，其内的主要成分是甘油三酯 (triacylglyceride, TAG)，由脂肪酸和甘油组成。脂肪体是昆虫进行生长发育、免疫反应、新陈代谢和接受激素调控的中心组织[48]。脂肪体由一个个脂肪细胞构成，充斥整个体腔，将中肠等其余器官包裹其中。比如家蚕的脂肪体，主要集中分布在腹部和头部，身体其他部位也少量存在。脂肪体在昆虫变态发育时期发生明显的形态变化，在幼虫时期体积较大，脂肪体组织完整成片状，脂滴密集分布，表面分布着少许微气管。而到了变态期，片状脂肪体发生解离并变成絮状，脂滴含量变小变少，化蛹后脂肪体继续降解，大量的幼虫脂肪体细胞死亡[49]，因此是一种十分良好的变态发育的组织检测指标。

作为脂肪体中储存能量的主要细胞器，脂滴是一种由单层磷脂膜包被的脂质，其中主要物质是 TAG、甾醇酯和视黄醇[50, 51]。脂肪体可以通过感知营养对能量储存进行调控，作为昆虫体内的主要循环用糖，当脂肪体中的海藻糖浓度达到一定水平时，便阻



止 UDP-葡萄糖合成海藻糖转而合成糖原。需要用糖时,糖原通过糖原磷酸化酶进行分解。在蛹向成虫转变的发育过程中,脂肪体中的糖原磷酸化酶活性处于较高的状态从而满足用糖需求。胰岛素、脂动激素等营养激素也是通过感知脂肪体中的能量物质来调整机体的能量稳态。

### 3.2 代谢与发育密切相关

昆虫属于无脊椎动物,开放性的血液系统使血液与淋巴液混在一起,包裹着各个组织并传送不同的营养物质[52]。昆虫的血淋巴可以维持变化浓度更高的血糖和氨基酸[53],从而为摄取外源性营养物质以及储存代谢产物提供更多可能性。血淋巴的成分是由从外部摄入的营养和自身的代谢状态共同决定的[54],有研究发现昆虫的摄食状态与血淋巴中营养含量有关[55]。

代谢与生长发育密切相关,代谢产物调控昆虫的生长发育,如蝗虫通过肉碱及其酰基衍生物进行独居和群居的相变,具体的机制是肉碱改变了蝗虫的神经系统[56]。在柑橘大实蝇中,TCA 循环中间代谢产物是调节昆虫是否滞育的重要物质[57]。昆虫滞育过程中,心磷脂是滞育蛹保证低能量消耗而存活的主要因素[58]。在家蚕中,取食期饲喂的营养物质被用来构建蚕体,而后用于合成蚕丝以及提供给蛹发育,从而为成虫发育以及繁衍后代提供能量支持。在棉铃虫中也发现糖代谢在发育过程中发生重编程,葡萄糖水平在幼虫停止取食后不断上升,并在预蛹期达到最高,而进入蛹后期又开始下降(图 1-7),与 20E 的滴度变化具有相似性[59]。昆虫体内的一些代谢营养物如葡萄糖和谷氨酰胺可以作为代谢开关,帮助免疫细胞快速产生 ATP 和新的生物分子[60]。

对于完全变态昆虫而言,它们只在占生命 50%的时间里取食,从幼虫末期到成虫羽化前的变态期处于不取食的状态,主要依靠取食期储存的物质和分解自身组织来生存。糖原和 TAG 是重要的能量储备代谢物,葡萄糖由于易降解是重要的糖酵解燃料[61],也是合成角质层的重要物质,对于适应寒冷或者干旱十分重要[62, 63]。TAG 由于其每单位重量中包含的热量高于糖[64-66],所以是昆虫滞育期最重要的能量来源[67],也是昆虫长时间飞行的重要燃料[68]。对于越冬昆虫而言,由于氧传递受损导致脂质氧化速率降低,乙酰化的 TAG 处于液体状态并可以与水分子互作从而提供低温保护[69]。代谢物也可能影响摄食行为,如肽激素和生物活性肽对所有动物的摄食行为进行调节[70],在家蚕中,速激肽作为激励因子促进摄食[70, 71]。在棉铃虫中,幼虫取食期多巴胺处于高水平状态,促进幼虫摄食。而到了变态期,20E 竞争结合 DopEcR 从而抑制幼虫摄食[7]。



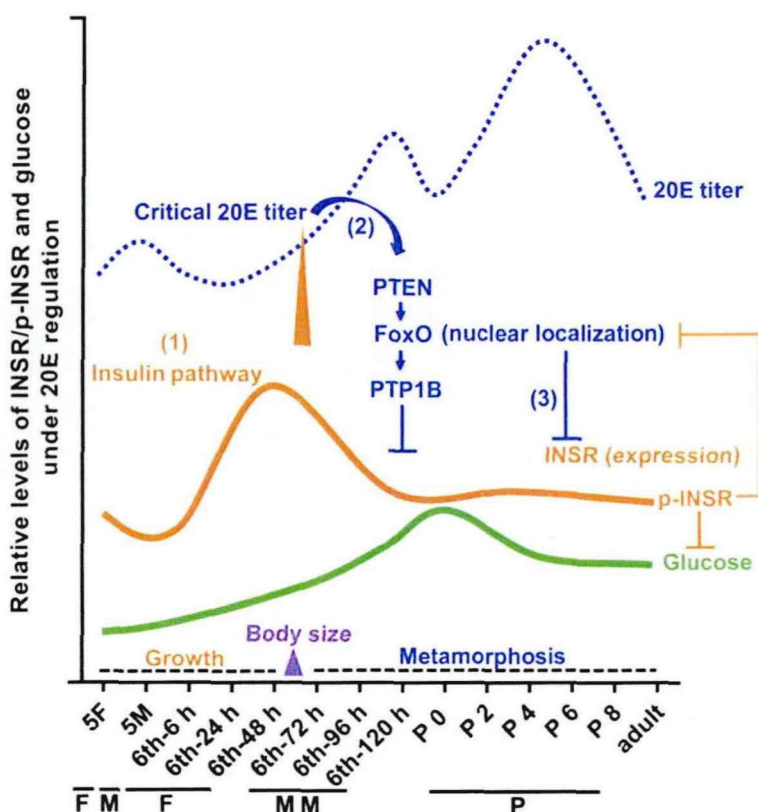


图 1-7 在棉铃虫发育过程中葡萄糖水平发生改变[59]

**Fig. 1-7 Glucose levels changes during the development of *H. armigera* [59]**

### 3.3 20E 调控代谢

20E 作为调控昆虫变态发育的重要激素,与代谢密切相关,可以重编程代谢,改变代谢状态,促进变态发育。在果蝇中,蜕皮激素通过诱导神经细胞能量代谢改变(氧化磷酸化和线粒体呼吸链的改变),导致细胞周期进程减缓抑制细胞生长[72]。在烟草天蛾和意大利蜜蜂中,20E 通过转录因子 HR4 和 E75 调控酪氨酸代谢,促进角质层的色素沉着和硬化[73, 74]。在白蚁中敲降 *EcR* 之后抑制酪氨酸代谢通路中漆酶基因 2(*laccase2*, *Lac2*) 的表达,从而导致角质层呈现黄白色[75]。在昆虫变态过程中,20E 通过上调死亡启动因子的表达如 *rpr*, *hid*, *dark* 和 *dronc* 诱导大量幼虫组织的凋亡[76, 77]。在棉铃虫由幼虫向蛹转变的过程中,20E 促进血淋巴中葡萄糖的含量上升[59]。在蜜蜂中也观察到相似的现象,20E 通过 *EcR* 促进糖异生和糖原分解途径基因表达,抑制糖原合成与糖酵解途径基因的表达,从而直接或者间接上调变态期血淋巴中的葡萄糖水平[78]。在棉铃虫中,20E 促进甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*) 的表达,GAPDH 通过直接与海藻糖酶(trehalase, *HaTreh1*) 结合控制其活性,保证葡萄糖稳态[79]。注射 20E 后会减少食物消耗,诱导出现类似饥饿的表型从而促进脂肪的分解[80]。在果蝇中,20E 通过激活叉头转录因子(fork head transcription Factor, FOXO)

[81, 82]上调甘油三酯脂肪酶 (adipose triglyceride lipase, *Atgl*) 的表达促进脂肪的分解 [83]。20E 还通过诱导甲硫氨酸硫氧化物还原酶 (methionine sulfoxide reductases, *MsrA*) 的表达从而抗氧化[84]。

3.4 代谢组

作为继基因组学、转录组学、蛋白质组学之后的新型组学，代谢组是研究生物体代谢物种类、数量或者含量变化的一门科学。代谢物处于生命活动调控的末端，利用代谢组分析可以为研究代谢物对生命体发育的调控提供很好的研究思路[85, 86]。根据研究对象的不同可以将代谢组学分为靶向或者非靶向的代谢组学，其中非靶向代谢组学由于是对生命体内源性代谢产物的研究，从而获得大量的代谢物数据，因此更加无偏向和全面。非靶向代谢组学的流程包括样本的采集与处理、实验分析，其中常见的技术包括核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR)、液相色谱-质谱联用 (liquid chromatograph-mass spectrometer, LC-MS)、气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 等。如有文献报道通过 GC-MS 技术，鉴定和分析出滞育麻蝇和非滞育麻蝇体内代谢物的差别，从而阐明了糖类、氨基酸等物质在滞育麻蝇耐寒性中的作用。

4. KLF 是调控代谢的重要转录因子

4.1 KLF 的结构特征

KLF 是一类转录因子超家族，从人类等高等生物到单细胞原生动物如领鞭毛虫等低等生物中广泛存在，由于其结构域与果蝇的 *krüppel* 高等同源而被命名为 *krüppel* 样转录因子[87]。其结构特点是在其羧基端具有三个保守性很高的 Cys2His2 锌指结构，锌指之间由 7 个氨基酸连接，其中前两个锌指结构含有 23 个氨基酸，另一个锌指结构含有 21 个氨基酸[88-90] (图 1-8)。KLF 的氨基端序列并没有什么相似性，但通常都具有转录激活结构域或者转录抑制结构域。目前在人中已经鉴定到 18 个 KLFs，果蝇中鉴定到 5 个 KLFs。KLFs 通过锌指结构结合富含 GC 的 DNA 序列 (CACCC, KLF bs) 从而调节靶基因的转录[91]。

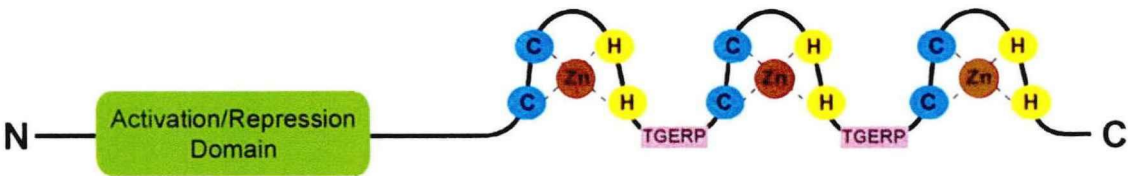


图 1-8 KLF 结构域特征[92]

Fig. 1-8 KLF domain characteristics [92]

## 4.2 KLF 的功能

KLF 广泛参与调控细胞的多种功能包括增殖、生长、分化、凋亡等。如在线虫中 KLFs 以一种依赖于自噬的方式促进 *Atgs* 的转录从而延长寿命[93]; 在 小鼠中 KLF5 促进生长, 敲除后导致死亡[94]; KLF4 可以作为一种干细胞因子对于上皮细胞的分化十分重要[95, 96]; KLF15 与糖异生关系密切; KLF 之间还可以协同发挥作用, 如 KLF11 和 KLF13 与 Sin3 蛋白结合, 作用于组蛋白去乙酰化酶、组蛋白甲基转移酶等共辅因子。虽然 KLF 的结合序列是一样的, 但由于和靶基因结合的亲和力不同、羧基端不同以及竞争作用, 从而决定不同的 KLF 与不同基因结合发挥特定的作用[97-99]。

## 4.3 KLF15 调控糖脂代谢

在人中 KLF15 是一种参与调控糖脂代谢的重要转录因子, 它在肝脏中高表达, 并且在饥饿状态下表达量上升, 正向调控糖异生代谢途径中重要限速酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, *Pepck*) 的表达[100]。KLF15 还促进氨基酸分解酶如丙氨酸转氨酶 1 (alanine aminotransferase 1, *Alt1*)、脯氨酸脱氢酶 (prolinedehydrogenase, *Prodh*)、色氨酸 2, 3-双加氧酶 (tryptophan 2, 3-dioxygenase, *Tdo2*) 和 4-羟苯丙酮酸脱氢酶 (4-hydroxyphenylpyruvic acid dehydrogenase, *Hpd*) 的表达, 从而为糖异生提供底物支持[101, 102]。在 小鼠中敲除 *Klf15* 导致空腹低血糖, 并且不能利用丙氨酸合成葡萄糖, 这是糖异生异常以及缺乏底物的共同作用[102]。葡萄糖转运体 4 (glucose transporters 4, GLUT4) 是在肌肉和脂肪组织中高表达的运输葡萄糖的转运体, KLF15 上调 *Glut4* 的表达从而促进细胞对葡萄糖的摄取[103]。KLF15 可以调控细胞周期进程, 通过抑制细胞周期蛋白 D 和 E (*cyclin D* and *E*) 和周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, *Cdk2*) 的表达抑制肾小球系膜细胞进入细胞周期 S 期, 抑制细胞增殖[104]。禁食诱导酰基辅酶 A 合成酶短链家族成员 1 (acyl-CoA synthetase short chain family member 1, *Acsc1*) 高表达, 这主要是通过 KLF15 结合其启动子中的 KLF bs 实现的[105]。KLF15 通过与 liver X receptor (LXR) 相互作用抑制固醇调节元件结合蛋白 1c (sterol regulatory element-binding protein-1c, *Srebp-1c*) 的转录, 通过这一机制, KLF15 可以将脂肪生成转换为糖异生来适应禁食状态[106]。

# 5. 本文的科学问题及研究方案

## 5.1 科学问题

KLF 作为一类重要的转录因子, 对于调控细胞功能发挥重要作用, KLF15 与糖代谢密切相关, 尤其是在饥饿状态下可以促进糖异生, 然而与自噬凋亡的关系并不清楚, 在昆虫中关于 KLF 的报道很少, KLF 对变态发育的作用研究以及如何响应激素调控也是

未知的。

对于完全变态昆虫而言,需要经历幼虫组织的凋亡才能形成新的成虫组织,在这个过程中,幼虫从摄食状态转变为停止取食,由于能量不足而引起组织自噬,体内代谢产物发生变化,代谢物与组织重塑的关系以及相关机制是不清楚的。在棉铃虫发育过程中,生长和变态发育的标志代谢物也是未知的。20E 作为调控变态发育的重要激素,在变态期滴度上升,诱导昆虫停止取食并拮抗胰岛素信号通路,促进组织的自噬和凋亡,是改变代谢的关键因子,然而 20E 如何协同调控组织重塑和代谢也不完全清楚。

## 5.2 研究方案及预期目标

本研究以重大农业害虫棉铃虫为研究对象,运用一系列生物化学及分子生物学方法,通过检测 KLF15 的表达模式以及激素刺激明确 20E 促进 *Klf15* 的表达及具体机制;RNA 干扰实验探究 KLF15 对于虫体发育的功能;细胞系检测自噬流和凋亡探究 KLF15 促进自噬凋亡;检测一系列代谢产物和代谢途径关键基因探究 KLF15 对代谢的调控以及变态期高水平葡萄糖的来源;转录调控实验揭示 KLF15 促进糖异生、自噬凋亡的具体机制。

利用 LC-MS 技术,测定幼虫生长期、游走期和蛹期血淋巴代谢组,鉴定不同发育阶段的标志代谢产物;通过注射代谢物和 RNA 干扰代谢途径的关键限速酶明确代谢物对组织重塑的作用;通过检测代谢途径中关键限速酶的表达以及 20E 刺激阐明 20E 调控氨基酸代谢重编程的具体机制。

通过以上研究明确转录因子 KLF15 在棉铃虫变态发育中的功能及调控机制;鉴定完全变态昆虫发育过程中的标志代谢物,阐明代谢产物与组织重塑的关系;完善 20E 调控代谢的分子机制,为害虫防治提供了新的理论基础和靶标基因。

## 第二章 蜕皮激素通过 KLF15 整合促进自噬和糖异生从而维持昆虫变态发育中葡萄糖稳态

### 1. 引言

葡萄糖是动物和人类生长发育过程中必不可少的能量物质，可以直接或间接地通过代谢产生能量供给机体发育。有些组织如哺乳动物的大脑和红细胞，主要依赖葡萄糖来满足它们的能量需求。葡萄糖主要来自于糖原分解和糖异生，在正常摄食条件下，糖原磷酸化酶（glycogen phosphorylase, GP）催化糖原分解产生葡萄糖[107]，并通过糖酵解分解产生丙酮酸（pyruvate, PA）和三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）。然而储存的糖原在停止取食十小时左右消耗殆尽，此时糖异生便成为主要且几乎唯一的生糖方式，即通过一些非糖前体物质如乳酸（lactate, LA）、甘油、PA 和游离氨基酸（free amino acids, FAAs）产生葡萄糖[108, 109]。因此取食期向停止取食期的转变过程存在糖代谢重编程，然而具体的调控机制并不清楚。

Krüppel-like factors (KLFs) 家族是一类在其羧基端具有三个保守的 Cys2His2 锌指结构的转录调控因子，通过特异性结合基因启动子序列中 GC box, GT box (CACCC, KLF bs) 从而调控基因转录[91, 105]，参与细胞的生长，增殖或者凋亡[110, 111]。在秀丽隐杆线虫中，KLFs 以依赖自噬的方式延长寿命[93]，KLF3 对于调控脂代谢十分重要[112]。在小鼠中，KLF15 是一种参与糖代谢的重要转录因子，在禁食期，KLF15 在肝脏中表达量上升，促进糖异生关键酶葡萄糖-6-磷酸酶（glucose-6-phosphatase, *G6p*）和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（phosphoenolpyruvate carboxykinase, *Pepck*）的转录[100, 106]。同时，KLF15 还能上调编码氨基酸分解酶基因的表达，从而为糖异生提供丰富的生糖底物[101, 102]。有研究发现 KLF15 抑制肺腺癌细胞生长[113]。然而，KLF15 调控自噬的作用和机制尚不清楚。

当完全变态昆虫停止取食并从幼虫转向成虫时，幼虫存活与成虫组织发育所需的能量只能来自自身储存的物质，在此期间幼虫组织通过程序性细胞死亡（programmed cell death, PCD）降解，包括自噬和凋亡[48, 114]。昆虫脂肪体作为哺乳动物肝脏的同源组织，是感知各种激素、储存营养物质和进行糖代谢的主要组织[68, 115]，脂滴（lipid droplet, LD）是脂肪体细胞中主要的脂质储存细胞器，其中的主要成分是甘油三酯（triglyceride, TAG）[64]。20E 是昆虫蜕皮变态的主要调节因子[114, 116]。20E 滴度在幼虫向蛹转变期间持续升高[46]，通过结合其核受体（ecdysone receptor, EcR）并与超气门蛋白（ultraspiracle protein, USP）形成转录复合体，与蜕皮酮反应元件（ecdysone reaction element, EcRE）结合后[117]启动下游基因表达从而起始昆虫的变态发育[118]。高滴度



的 20E 可以促进幼虫组织从自噬转变为凋亡[45]。之前实验室的研究发现在幼虫停止摄食后,血淋巴中葡萄糖水平升高[59],幼虫的组织发生降解。尽管 20E 对昆虫变态的调控已有广泛的研究,但其调控糖异生的机制及其与幼虫脂肪体 PCD 的关系仍不清楚。

本章节研究以棉铃虫为实验模型,揭示了 20E 调控糖代谢重编程和脂肪体 PCD 的机制,20E 通过 KLF15 整合自噬和凋亡促进幼虫脂肪体降解,为糖异生产生底物,从而升高血糖水平促进变态发育。

## 2. 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验动物

重大杂食性农业害虫棉铃虫为本实验的研究对象,养殖温度为  $27^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,养殖湿度为 60-70%,光照时长 14 小时,喂食由大豆粉、小麦胚芽、复合维生素、蔗糖和无机盐等配置而成的饲料[119]。

#### 2.1.2 实验细胞

棉铃虫表皮细胞系 (HaEpi cell line) 是由本实验室从 5 龄幼虫表皮组织中分离培养获得[120]。将细胞传至培养瓶中使其松散地贴附单层,加入 5 mL Grace 培养基 (11300 043, Gibco, 美国) 和 10% 热灭活胎牛血清 (16140063, Gibco, 美国),培养温度为  $27^{\circ}\text{C}$ ,每周传代培养一次并观察细胞状态以及是否有污染。

#### 2.1.3 实验试剂

Trizol RNA 提取试剂盒、dNTP、Taq 聚合酶、HIFI 酶 (全式金, 北京, 中国)。琼脂糖、二甲基亚砜 (DMSO)、DNA 提取液、核蛋白提取试剂盒、CCK-8 细胞活力试剂盒、海藻糖测定试剂盒、丙酮酸测定试剂盒、游离脂肪酸测定试剂盒、谷氨酸测定试剂盒 (索莱宝, 北京, 中国)。葡萄糖测定试剂盒 (酶联生物, 上海, 中国)。ChIP 试剂盒 (碧云天, 上海, 中国)。引物序列合成、氨苄青霉素、卡那霉素、异丙基硫代半乳糖苷 IPTG、蛋白酶抑制剂 PMSF (生工生物, 上海, 中国)。胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒 (捷瑞, 上海, 中国)。RNA 酶抑制剂、限制性内切酶、合成 dsRNA 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, 马萨诸塞州, 美国)。弗氏佐剂、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, 麻省, 美国)。20E (Caymanchem, 密歇根州, 美国)。细胞转染试剂 (博奥龙, 北京, 中国)。牛胎盘血清 (Biolnd, 基布兹·拜特·埃梅克, 以色列)。T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs, 麻省, 美国)。cDNA 反转录试剂盒 (Abcam, 剑桥, 英国)。Grace 培养基 (Gibco, 加利福尼亚州, 美国)。溴化氢柱料 (General Electric Healthcare, 白金汉郡, 英国)。吐温 20 (鼎国, 北京, 中国)。磷酸化的组蛋白 H3 多克隆抗体 (Ser10)

(Cell Signaling Technology, 麻省, 美国)。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG、碱性磷酸酶标记的羊抗兔或马抗鼠 IgG (中杉金桥, 北京, 中国)。β-Actin 单克隆抗体、GFP/RFP 单克隆抗体 (ABclonal, 武汉, 中国)。CASP3 多克隆抗体 (万类, 沈阳, 中国)。CASP3 活细胞分析试剂盒、Annexin V-PI 凋亡检测试剂盒、Tunel 细胞凋亡试剂盒 (宇恒生物, 苏州, 中国)。TransStart Tip Green qPCR Supermix (艾德莱, 北京, 中国)。其他试剂均购于国药的分析纯试剂。

#### 2.1.4 实验仪器

PCR 仪 (博日科技, 杭州, 中国), 荧光定量 PCR 仪 (Analytik Jena, 德国), 电泳仪、SDS-PAGE 电泳槽 (凯元, 上海, 中国), 移液枪、高速冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), 超声破碎仪 (新芝, 宁波, 中国), 微量分光光度计 (凯奥, 北京, 中国), Olympus BX51 荧光显微镜 (奥斯巴林, 日本), 流式细胞仪 (Amnis, 西雅图, 美国), 化学发光成像系统 5200 (天能, 上海, 中国), L-8900 氨基酸分析仪 (日立, 东京, 日本)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 提取 RNA

选取不同龄期、体重大小相似的三只虫, 将其在冰上冻 15 min, 在显微镜下沿侧线将虫解剖, 分离出表皮, 中肠和脂肪体并放入 1×PBS (pH 7.4, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl) 中冲洗去除血淋巴, 然后称取 100 mg 组织放入已加入 Trizol 试剂的研磨器中充分研磨, 取出研磨好的组织在冷冻离心机中 12000 rpm 离心 15 min, 取上清液至新的无 RNA 酶的 EP 管中室温静置 5 min。在提取细胞 RNA 时, 用 1×PBS 洗涤细胞两次, 然后取 1 mL Trizol 至六孔板中在冰上放置 10 min 充分裂解细胞, 用枪吹打细胞并收集至 EP 管中。加入 200 μL 氯仿后剧烈震荡 20 s 后 12000 rpm, 4℃离心 10 min, 取上层水相并加入等体积的预冷后的异丙醇充分混匀后室温静置 10 min, 12000 rpm, 4℃离心 10 min 后去除上清液, 留下沉淀, 用 DEPC 水配置的 75% 的乙醇充分洗涤沉淀后 12000 rpm, 4℃离心 5 min, 去除乙醇并在超净台风干 5 min 使乙醇彻底挥发, 根据沉淀量加入 DEPC 水并于 72℃金属浴中孵育 10 min 使 RNA 充分溶解。

#### 2.2.2 反转录合成 cDNA

将提取好的 RNA 测浓度, 根据 5×All-In-One RT MasterMix 反转录试剂盒说明书, 定量 2 μg 做模板, 并加入 2 μL AccuRT Reaction Mix (4×), 补 DEPC 水至 8 μL 混匀后放置 42℃金属浴中孵育 2 min; 加入 2 μL AccuRT Reaction Stopper (5×)、4 μL 5×All-In-One RT MasterMix、6 μL DEPC 水, 放置 25℃金属浴中孵育 10 min, 然后转至 42℃金属浴中孵育 15 min, 最后在 85℃金属浴中孵育 5 min。将合成好的 cDNA 进行-20℃保存。

#### 2.2.3 基因鉴定、克隆和生物信息学分析

根据文献报道的人和果蝇的 KLF 序列进行 NCBI 序列查找, 获取了人 18 个 KLFs 和果蝇 5 个 KLFs; 以人和果蝇的 KLF 为路标, 在棉铃虫基因组中进行 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 查找, 根据得分排列在棉铃虫中筛选到 5 个 KLFs, 将 KLFs 的全长序列进行 SMART 在线软件分析发现其羧基端都具有保守的锌指结构。根据 KLFs 的全长序列分别设计干扰引物, 过表达引物和荧光定量 PCR 引物, 选择合适的 cDNA 模板进行扩增。用 MEGA 7.0 软件对不同物种的 KLFs 蛋白序列进行比对并构建进化树。

## 2.2.4 实时定量 PCR (qRT-PCR)

将不同组织的 cDNA 进行稀释 (表皮 1:6; 中肠 1:8; 脂肪体 1:5) 作为模板, 避光加入以下反应 (总体积为 10  $\mu$ L):

表 2-1 PCR 反应体系

Tab. 2-1 PCR reaction system

| 合成体系                 | 10 $\mu$ L |
|----------------------|------------|
| 上游引物 (1 $\mu$ M)     | 2 $\mu$ L  |
| 下游引物 (1 $\mu$ M)     | 2 $\mu$ L  |
| TransStart Tip Green | 5 $\mu$ L  |
| qPCR Supermix        |            |
| 稀释过的 cDNA 模板         | 1 $\mu$ L  |

反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 78 $^{\circ}$ C 2 s, 一共设 40 个循环, 在 65 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C 进行溶解曲线分析, 间隔 0.5 $^{\circ}$ C。获得的 Ct 值根据公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算, 即  $2^{-(\Delta C_t \text{ 实验组} - \Delta C_t \text{ 对照组})}$ ,  $\Delta C_t$  代表实验组中基因的 Ct 平均值/对照组中基因的 Ct 平均值 - 内参基因的 Ct 平均值,  $\beta$ -Actin 为内参基因。将计算出来的数值进行  $t$  检验 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) 或者 ANOVA (不同字母表示两组之间存在显著差异  $p < 0.05$ ) 分析是否具有显著差异。

## 2.2.5 制备多克隆抗体

### 2.2.5.1 构建原核表达载体

选择 KLF15 的 cDNA 片段 (1-564 的核苷酸序列, 编码 188 个氨基酸) 进行扩增, 根据 pET-30a 质粒图谱选择合适的酶切位点, 用 DNA 限制性内切酶在 37 $^{\circ}$ C 金属浴中酶切 KLF15 目的片段和 pET-30a 1.5 h, 点样至琼脂糖凝胶孔中并进行胶回收, 测定浓度后用 T4 连接酶于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中冰上孵育 30 min 后于 42 $^{\circ}$ C 金属浴中热激 75 s, 迅速转移到冰上 2 min, 加入 1 mL 培养基后放入 37 $^{\circ}$ C 摇床中孵育 1 h。离心收集菌体均匀涂至含卡那霉素 (Kana) 的 LB 固体培养基中并放到 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 16 h。挑取单菌落进行 PCR 扩增跑胶筛选阳性菌落, 加 LB 培养基培养过夜进行保种和提质粒, 将构建好的重组质粒转入大肠杆菌 Rosetta 菌株培养过夜, 筛选阳性菌后加入 20% 甘油进行 -80 $^{\circ}$ C 保存。

### 2.2.5.2 大规模表达重组蛋白并纯化

将重组菌株接种到含有 5 mL LB 培养基中 (Kana 抗性) 于 37°C 培养过夜, 然后以 1% 的比例转移至 500 mL 培养基中于 37°C 摇床中培养 3 h, 加入 0.5 mM 的 IPTG 后继续放置 37°C 摇床培养 6-7 h。室温离心收集菌落, 用 30 mL 1×PBS 悬起沉淀放到破碎仪中进行超声破碎 (超声 5 s, 间隔 5 s, 总时长 1.5 h)。于冷冻离心机中离心 20 min 后分别收集上清液和沉淀。经过 SDS-PAGE 跑胶, KLF15 蛋白形成包涵体, 将沉淀溶于含有 8 M 尿素的变性液 (0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 8 M 尿素) 中进行变性并放置 37°C 摇床震荡过夜。将沉淀于 4°C, 12000 rpm 离心 20 min 后取上清液过 His-tag 变性柱进行纯化。

### 2.2.5.3 制备多克隆抗体

将新西兰大白兔作为免疫对象, 观察确保其健康后从耳缘静脉处取 1 mL 血作为前血清。将纯化好的蛋白进行 SDS-PAGE 和浓度检测, 定量 500  $\mu$ g 与等量的完全弗氏佐剂充分混匀至油包水的状态, 在新西兰大白兔的皮下进行多点注射; 三周后将 500  $\mu$ g 纯化的抗原与等量的不完全弗氏佐剂混匀后进行第二次注射; 两周后将 1 mg 的纯化抗原进行肌肉注射来加强免疫。一周后取血为兔多克隆抗体, 并以前血清作为对照进行抗体特异性检测[121]。

### 2.2.6 提取组织蛋白

将棉铃虫放置冰上 15 min 后将其解剖, 取表皮, 中肠和脂肪体放到 1×PBS 中洗涤, 然后将组织放到 pH 7.5 的 40 mM Tris-HCl (含 1% 的 PMSF) 中充分研磨后转移至 EP 管中, 12000 rpm, 4°C 离心 15 min 后取上清液即为虫体组织总蛋白。提取细胞蛋白时, 首先吸去培养基并加入 1×PBS 洗涤两次, 然后加入 1 mL 的 1×PBS 吹打收集细胞, 4°C, 3000 rpm 离心 5 min 后取上清液即为细胞总蛋白。加入 1/2 体积的蛋白处理液于 100°C 中孵育 15 min。

### 2.2.7 蛋白质免疫印迹

定量处理好的蛋白样品加到 SDS-PAGE 加样孔中, 设置电压 80 V 至样品跑出蛋白胶前沿停下。将滤纸和硝酸纤维素膜裁剪至和蛋白胶大小, 先铺三层滤纸和一层硝酸纤维素膜到电泳仪石墨板上, 将蛋白胶小心转移到硝酸纤维素膜上, 再铺上三层滤纸进行转膜。裁剪硝酸纤维素膜至合适大小放到孵育盒里用 TBST (TBS 中加入 0.02% 的吐温) 清洗一遍后加入封闭液 (5 g 脱脂奶粉溶于 100 mL TBST 中) 孵育 1 h, 去除奶粉后用 TBST 清洗一遍膜后加入抗体于 4°C 孵育过夜。TBST 清洗膜两次, TBS (pH 7.5, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) 清洗膜一次, 每次 10 min, 加入二抗, 于室温孵育 2 h, 去除二抗后用 TBST 清洗两次, TBS 清洗一次后用机器或者发色液进行显色观察。蛋白条带分析使用 Image J 软件 (马里兰州, 贝塞斯达, 美国)。

### 2.2.8 构建过表达质粒

扩增 KLF15 全长序列, 选择合适的酶切位点用限制性内切酶切目的片段和质粒

pLEX-4-RFP-His，点样至琼脂糖凝胶中，电泳后胶回收，用 T4 连接酶连接过夜后转入大肠杆菌 DH5α，筛选阳性菌落后测序确保序列准确。

2.2.9 合成双链 RNA

选择 400-500 bp 的 cDNA 序列，在其 5'端加入 T7 启动子序列并进行扩增作为合成双链 RNA 的模板，加入以下反应配置合成双链 RNA 的体系：

表 2-2 dsRNA 合成体系

Tab. 2-2 dsRNA synthesis system

| 合成体系                 | 50 $\mu$ L             |
|----------------------|------------------------|
| cDNA                 | 3 $\mu$ g              |
| T7 polymerase        | 4 $\mu$ L              |
| T7 polymerase buffer | 20 $\mu$ L             |
| Rnase inhibitor      | 2 $\mu$ L              |
| NTPs                 | 2.4 $\mu$ L $\times$ 4 |
| DEPC 水               | 补至 50 $\mu$ L          |

将反应体系放置 37℃水浴锅中孵育过夜，加入 10  $\mu$ L 的 DNaseI 和 10  $\mu$ L 的 DNaseI buffer，加 DEPC 水补至 100  $\mu$ L，于 37℃水浴锅中孵育 1 h。每组样品加 DEPC 水至 200  $\mu$ L，加入 100  $\mu$ L 氯仿和 100  $\mu$ L 水饱和酚后震荡混匀，12000 rpm，4℃离心 15 min，取约 400  $\mu$ L 上清液和等体积的氯仿混匀后离心，取约 200  $\mu$ L 上清液加入 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3M 乙酸钠(pH 4.0)，放到-20℃冰箱过夜。离心收集沉淀，用 DEPC 水配置的 75%的乙醇洗涤沉淀后风干去除乙醇，加入 50  $\mu$ L 的 DEPC 水溶解沉淀。1:10 稀释合成好的 dsRNA 测定浓度并进行琼脂糖凝胶电泳，条带单一且明亮代表合成成功。

2.2.10 虫体 RNA 干扰

长的双链 RNA (dsRNA) 在昆虫体内可以被分解成多个较小的 dsRNA 从而降解靶标基因的转录[122]。将刚蜕下皮的六龄 0 h 幼虫进行计时，取体重大小相似的六龄 6 h 幼虫置于冰上。用灭菌的 1 $\times$ PBS 将双链 RNA 稀释至 500 ng/ $\mu$ L，注射针吸取 dsRNA 从棉铃虫侧腹部第三腹足的位置插入体内向前注射，间隔 24 h 后注射第二针，一共注射三次。dsGfp 为对照组，实验组和对对照组每组至少 30 只虫，并重复三次进行统计。

2.2.11 虫体激素刺激

用 DMSO 将 20E 溶解至 10 mg/mL 进行储存。1 $\times$ PBS 将 20E 稀释至 20、40 和 100 ng/ $\mu$ L。选取 6 只大小体重相似的六龄 6 h 幼虫进行注射，每次注射 5  $\mu$ L，使其终浓度分别为 100、200 和 500 ng/只虫，分别刺激 1、3、6、12 和 24 h，提取脂肪体进行检测。

2.2.12 转染过表达质粒和 dsRNA

将 HaEpi 细胞接种到六孔板中，待其密度约为 80%时，进行转染：用镊子夹取两个无菌 EP 管，分别加入 100  $\mu$ L 的 0.9%NaCl，一个 EP 管中加入 10  $\mu$ L 的转染试剂，另一个 EP 管中加入 5  $\mu$ g 过表达质粒或 2  $\mu$ g 的 dsRNA，将两个 EP 管混匀静置片刻后加到六



孔板中, 于 27°C 培养 48-72 h, 每隔 24 h 在荧光显微镜下观察细胞是否发出明亮荧光来确定是否转染成功。空载质粒 pIEX-4-RFP-His 为空白对照。

### 2.2.13 测定血淋巴葡萄糖

取至少三只虫的血淋巴共 30  $\mu\text{L}$  (含 1 mM 苯基硫脲, (phenylthiourea, PTU)), 离心去除血细胞后取 10  $\mu\text{L}$  血淋巴, 加入 1 mL 葡萄糖提取液, 于 37°C 避光孵育 10 min, 在 505 nm 处测定吸光值。

### 2.2.14 测定血淋巴海藻糖

选取至少三只同龄期的幼虫或蛹, 剪去第四对附肢或者在腹眼处轻扎一针, 吸取 50  $\mu\text{L}$  血淋巴收集到含有 2.5  $\mu\text{L}$  1 mM PTU 的离心管中, 离心后取上清液加入 450  $\mu\text{L}$  海藻糖提取液并在室温静置 45 min 后, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清液与试剂盒中的工作液混匀, 将样品放到 95°C 金属浴中加热 10 min, 待其自然冷却后用分光光度法在 620 nm 处测定吸光值。

### 2.2.15 测定血淋巴丙酮酸

收集至少三只虫的血淋巴 45  $\mu\text{L}$ , 加入提取液 200  $\mu\text{L}$  在冰上快速研磨后转至室温静置 30 min, 10000 rpm 离心 10 min 后取上清液 75  $\mu\text{L}$ , 按照试剂盒说明书加入试剂一和试剂二, 充分混匀之后用分光光度法在 520 nm 处测定吸光值。

### 2.2.16 测定脂肪体糖原

称取不同发育阶段幼虫或蛹的脂肪体 0.1 g, 用 PBS 漂洗去除血细胞, 加入试剂盒中的提取缓冲液, 于 100°C 孵育 20 min, 每隔 5 min 摇匀一次使其充分混匀, 待样品完全冷却后按照说明书加入检测试剂, 然后在 620 nm 处测定吸光值。

### 2.2.17 测定游离氨基酸

取 25  $\mu\text{L}$  血淋巴至 1.5 mL EP 管中, 加入 1.5  $\mu\text{L}$  1 mM PTU 和 25  $\mu\text{L}$  抗凝剂 (450 mM NaCl、10 mM KCl、10 mM EDTA、10 mM HEPES), 离心后取 30  $\mu\text{L}$  上清液加入 300  $\mu\text{L}$  20% 的三氯乙酸并充分混匀, 10000 rpm 离心 10 min 后取上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器过滤后用氨基酸分析仪测定不同氨基酸的含量。

### 2.2.18 测定游离脂肪酸

从不同发育阶段的幼虫和蛹中取出 50  $\mu\text{L}$  血淋巴, 与 PTU 混合防止黑化, 按照试剂盒说明书加入试剂后在 550 nm 处测定吸光值。

### 2.2.19 CCK-8 测定细胞活力

将细胞传至 96 孔板中, 使其密度为  $4 \times 10^3$  个细胞/mL, 加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 在 27°C 培养箱中孵育 2-3 h 待颜色稳定后测定 450 nm 处的吸光值。

### 2.2.20 免疫细胞化学

将灭菌飞片放到 24 孔板中, 去除培养瓶中的旧培养基, 加入新的培养基将细胞均匀传至 24 孔板中, 待每个孔的细胞密度约为  $2 \times 10^5$ - $3 \times 10^5$  个细胞/mL 时转入质粒, 在转

染成功后添加激素或者 dsRNA 处理。去掉 24 孔板中的培养基，用 1×DPBS 洗涤两次，加入 4%多聚甲醛避光固定细胞 10 min，用 1×PBS 洗涤细胞 3 次去除多聚甲醛，加入 DAPI (1 μg/mL) 室温避光孵育 10 min 进行细胞核染色，去除染料，用 1×PBS 洗涤细胞 6 次，每次 5 min。载破片上滴加 2 μL 甘油，将飞片反扣在甘油上进行封片，短期保存在 4℃冰箱，使用 Olympus BX51 荧光显微镜观察细胞荧光并拍照。

2.2.21 凝胶电泳迁移实验 (EMSA)

将 pIEX-EcR-RFP-His 和 pIEX-KLF15-RFP-His 转染进 HaEpi 细胞中，转染成功后加入 DMSO 或者 20E (5 μM) 刺激 6 h 后提取核蛋白。从生工生物公司设计带有 6-羧基荧光素 (FAM) 标记的探针引物，分别是：Klf15 启动子区域包含 EcRE 的序列探针 (正义链 5'- TCTCAATTACGTTCAATAAACGGCTTTGTAA-3' 和 反义链 5'-TTAACAAAGCCGTTTATTGAACGTAATTGAGA-3')，突变位点探针 (正义链 5'-TCTCAATTACATGTAATAAACGGCTTTGTAA-3' 和 反义链 5'-TTAACAAAGCCGTTTATTACATGTAATTGAGA-3')；Atg8 启动子区域包含 CACCC 序列的探针 (正义链 5'-CCCGCGGTTTCACCCTCGTCCTGTGGGAACTGCTGCCCCG-3'和反义链 5'-CGGGCAGCAGTTCCACAGGACGAGGGTGAAACCGCGGG-3')，突变位点探针 (正义链 5'-CCCGCGGTTTTCATCGTCCTGTGGGAACTGCTGCCCCG-3'和反义链 5'-CGGGCAGCAGTTCCACAGGACGATGGGAAAACCGCGGG-3')；Pepck 启动子区域包含 CACCC 序列的探针 (正义链 5'-TGAAAACACCCTGACGCCATCTTGTGTTGAAGCTCGCGCG-3' 和 反义链 5'-CGCGCGAGCTTCAACACAAGATGGCGTCAGGGTGTTTCA-3')，突变位点探针 (正义链 5'- TGAAAATCCCATGACGCCATCTTGTGTTGAAGCTCGCGCG-3'和反义链 5'-CGCGCGAGCTTCAACACAAGATGGCGTCATGGGATTTTCA-3')。将探针溶解于退火缓冲液 (pH 7.5, 10 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) 中，于 95℃加热 10 min 后缓慢冷却至室温。配置 6%的聚丙烯酰胺凝胶 (2 块板)：

表 2-3 聚丙烯酰胺凝胶合成体系

| Tab. 2-3 Polyacrylamide gel synthesis system |          |
|----------------------------------------------|----------|
| 合成体系                                         | 20.14 mL |
| 10×TBE 缓冲液                                   | 1 mL     |
| 40%丙烯酰胺溶液                                    | 3 mL     |
| 50%甘油                                        | 1 mL     |
| 10%过硫酸铵                                      | 120 μL   |
| TEMED                                        | 20 μL    |
| 去离子水                                         | 15 mL    |

将 15 μg 核蛋白加到缓冲液 (pH 7.5, 10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA, 5%甘油) 中混匀后在室温静置 10 min，与 200 fmol FAM 标记的探针

在室温下孵育 15 min 后上样到 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上样孔中[123, 124]。对于超级迁移实验, 结合反应加入 1.5  $\mu\text{g}$  的 His 抗体; 对于竞争实验, 结合反应加入 50 倍未标记的探针。80 V 的电压跑 80 min 左右后停止, 取凝胶到 Tanon 凝胶成像仪中进行成像和数据分析。

#### 2.2.22 染色质免疫共沉淀 (ChIP)

分别定量 5  $\mu\text{g}$  的 pIEX-EcR-RFP-His 和 pIEX-KLF15-RFP-His 质粒转染进 HaEpi 细胞中, 72 h 后加入 DMSO 或 20E 刺激 6 h。避光条件下, 每孔加入 40.5  $\mu\text{L}$  甲醛并放置 37°C 培养箱孵育 10 min; 加入 165  $\mu\text{L}$  甘氨酸溶液混匀后室温避光放置 5 min; 去除甲醛和甘氨酸后, 加入 1 mL 含有 PMSF 的 1×PBS 洗涤细胞两次后用细胞刮板收集细胞并离心; 去除上清液后用含有 PMSF 的 SDS 缓冲液悬起沉淀并且进行破碎 (超声 2 s, 间隔 9 s, 总时长 8 min) 以剪切基因组 DNA, 使 DNA 大部分断裂成 200-1000bp 大小。低温离心后分别取出 400  $\mu\text{L}$  上清, 加入 500  $\mu\text{L}$  的 dilution 缓冲液后离心取上清液并均匀分成三份, 一份为 Input 组, 放置 4°C 冰箱, 另外两份加入 protein A+G 于 4°C 摇床摇摆 30 min 去除非特异性结合。低温离心后取上清液, 一份加 3  $\mu\text{L}$  抗体, 另一份不加抗体, 一同放置 4°C 摇床摇摆过夜。加入 60  $\mu\text{L}$  protein A+G 放置 4°C 摇床摇摆 1 h 以沉淀一抗所识别的蛋白, 低温离心去除上清液后将沉淀分别用 Low salt wash buffer、High salt wash buffer、LiCl wash buffer 和 TE buffer 洗涤, 每次洗涤加入 1 mL 试剂, 于 4°C 摇床摇摆 5 min 后在冰上静置 5 min, 然后离心留沉淀。洗涤后加入 250  $\mu\text{L}$  Elution buffer (1% SDS, 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ ), 在室温摇床摇摆洗脱 5 min, 重复一次后共收集上清液 500  $\mu\text{L}$ , 加入 20  $\mu\text{L}$  5 M NaCl, 混匀后 65°C 加热 4 h, 以解除蛋白和基因组 DNA 之间的交联。样品中加入 10  $\mu\text{L}$  0.5 M EDTA, 20  $\mu\text{L}$  1 M Tris (pH 6.5) 和 1  $\mu\text{L}$  20 mg/mL 蛋白酶 K, 混匀后于 45°C 孵育 60 min。最后加入氯仿进行抽提 DNA 用于 qPCR 检测。

#### 2.2.23 检测自噬流

转染 2.5  $\mu\text{g}$  的 pIEX-RFP-GFP-LC3-His 双标签荧光质粒到 HaEpi 细胞中, 转染 48 h 后分别添加 5  $\mu\text{M}$  的 20E 刺激 1 h, 12 h, 24 h 和 48 h, 然后进行免疫细胞化学观察细胞荧光。由于 GFP 荧光对酸性 pH 敏感, 当自噬起始时, 出现自噬小体, 而后自噬进一步加强形成自噬溶酶体时, 绿色荧光发生淬灭[125]。

#### 2.2.24 检测凋亡

将细胞传至 24 孔板中进行激素或者干扰处理后, 弃去旧培养基加入 200  $\mu\text{L}$  的 1×PBS 和 2  $\mu\text{L}$  的 CASP3 底物, 于室温孵育 30 min, 然后进行免疫细胞化学观察。流式检测细胞凋亡时先将细胞传至 6 孔板中, 实验处理后用 0.25% 的胰酶进行消化并收集细胞, 用预冷的 1×PBS 洗涤细胞沉淀两次, 收集  $1-5 \times 10^5$  个细胞后用 100  $\mu\text{L}$  的 1×结合缓冲液悬起细胞沉淀, 每管样品加入 4  $\mu\text{L}$  的 Annexin V 和 4  $\mu\text{L}$  的 PI 工作液, 放置室温避光孵育 10-15 min, 每管加入 400  $\mu\text{L}$  的 1×结合缓冲液后通过流式细胞仪检测细胞凋亡情

况。Annexin V 为绿色荧光，PI 为红色荧光。末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）dUTP 缺口末端标记（TUNEL）染色法检测组织凋亡时，首先解剖去除脂肪体，1×PBS 漂洗去掉血淋巴，送到武汉赛维尔公司进行石蜡包埋，将包含组织的石蜡块切成 5 μm 厚的组织切片固定于载玻片上，根据 TUNEL 试剂盒说明书进行操作，组织中发生凋亡的部位发出明亮的绿色荧光信号。

2.2.25 测定脂肪体甘油

取各个发育阶段的脂肪体，1×PBS 漂洗后称重，按照每 1 mg 组织加入 10 μL 裂解液的比列在冰上对脂肪体进行快速研磨，将样品放置 70°C 金属浴孵育 10 min 使脂肪酶失活，低温离心后取上清液用分光光度法在 620 nm 处测得吸光值。

2.2.26 统计方法

实验结果使用 Excel 和 GraphPad 7 软件（加州，美国）分析数据并作图。所有代谢物的测定中，每个样本至少包含三只幼虫或蛹并进行三次重复，实验数据用 *t* 检验（\*  $p<0.05$ ，\*\*  $p<0.01$ ，\*\*\*  $p<0.001$ ）进行两两比较或者 ANOVA（不同字母表示两组之间存在显著差异  $p<0.05$ ）进行多重比较来表示是否存在显著差异。

表 2-4 PCR 引物序列

Tab. 2-4 Oligonucleotide sequences of PCR primers

| Primer name       | Sequence (5'-3')        | GenBank accession number |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>qRT-PCR</b>    |                         |                          |
| <i>Tre</i> -RTF   | aatggcgaggctctacaat     | AJK29979.1               |
| <i>Tre</i> -RTR   | atggctccagttcgtgtgc     |                          |
| <i>Tps</i> -RTF   | atgctgagccaaactcttcg    | XP_021201246             |
| <i>Tps</i> -RTR   | ctttcccttctgtgttgagc    |                          |
| <i>Gp</i> -RTF    | gagatggcctaccacgat      | XP_021190210.1           |
| <i>Gp</i> -RTR    | gaaccaacaacgcacaag      |                          |
| <i>Gs</i> -RTF    | tcggactattatgctcaggac   | XP_021199514.1           |
| <i>Gs</i> -RTR    | aggagatgttctgcctcgtaa   |                          |
| <i>G6p</i> -RTF   | gatggaacaaatctacgcactcg | XP_021186784.1           |
| <i>G6p</i> -RTR   | agccaccatttcataagagcatt |                          |
| <i>Pepck</i> -RTF | cgcaagaacgatgagggcaaat  | XP_021197900.1           |
| <i>Pepck</i> -RTR | gttgtcacagcggcgcaggat   |                          |
| <i>Atg8</i> -RTF  | aagagaaagaccgaaggcg     | XP_021181573.1           |
| <i>Atg8</i> -RTR  | ggctcgcgagtctagccttc    |                          |
| <i>Casp3</i> -RTF | acccttcaaatacagcaatcc   | AEK20819.1               |
| <i>Casp3</i> -RTR | catcattgtccgtaccattcctt |                          |
| <i>Hk</i> -RTF    | tcacattctcgttcccgatgaa  | XP_021198412.1           |
| <i>Hk</i> -RTR    | gtgccggtggtgtcgttga     |                          |
| <i>Pfk</i> -RTF   | ctgatgtgactgggtgggtag   | ALJ94066.1               |
| <i>Pfk</i> -RTR   | cgggcacgtgttactgat      |                          |
| <i>Pk</i> -RTF    | agggtgggcaaaccagtaatc   | ARQ20739.1               |
| <i>Pk</i> -RTR    | tcggacctcaacaaccaaatac  |                          |
| <i>Klf15</i> -RTF | tgttttgtgaaggctctggat   | XP_021201196.1           |
| <i>Klf15</i> -RTR | gatctaaatcactaagctgcc   |                          |
| <i>Klf16</i> -RTF | tcgtcccacctgaaagcg      | XP_021187184.1           |
| <i>Klf16</i> -RTR | cggcacccgaactcttc       |                          |

续表 2-4 PCR 引物序列

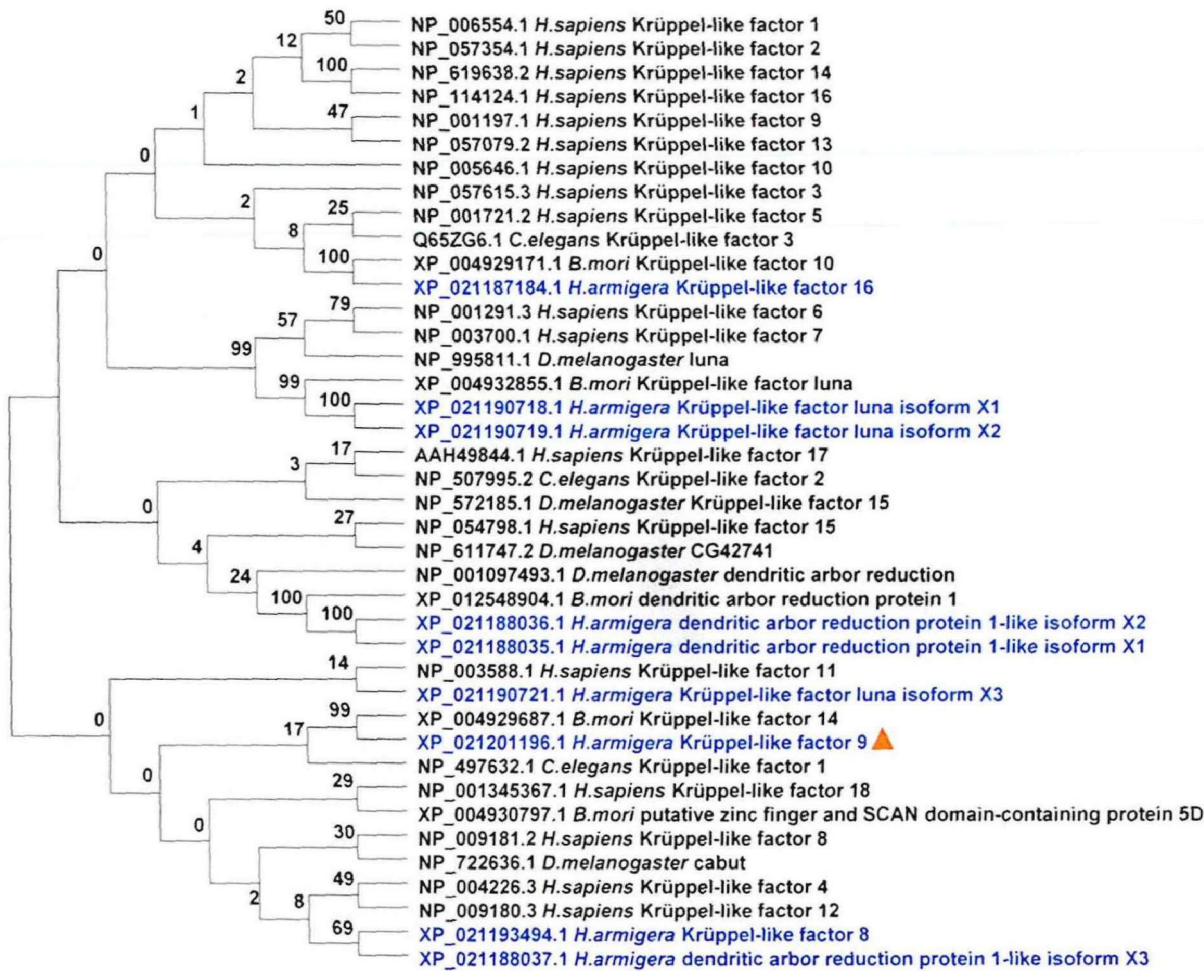
Tab. 2-4 Oligonucleotide sequences of PCR primers

| Primer name                  | Sequence (5'-3')                              | GenBank accession number |
|------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Klf8</i> -RTF             | cgtgctgccctctacaat                            | XP_021193494.1           |
| <i>Klf8</i> -RTR             | gacaaccagccacatcac                            |                          |
| <i>Dar</i> -RTF              | agcaccagccaaacacctcctt                        | XP_021188037.1           |
| <i>Dar</i> -RTR              | gcagtggtggaccctcctcttct                       |                          |
| <i>Luna</i> -RTF             | caaccaccacgaccttca                            | XP_021190721.1           |
| <i>Luna</i> -RTR             | cgccagtatgcgtcctcttat                         |                          |
| <i>EcR</i> -RTF              | aattgcccgctcagtacga                           | ACD74807.1               |
| <i>EcR</i> -RTR              | tgagcttctcattgagga                            |                          |
| <i>β-Actin</i> -RTF          | cctggtattgctgaccgtatgc                        | EU52707                  |
| <i>β-Actin</i> -RTR          | ctgttgggaaggtggagagggaa                       |                          |
| <i>Atg3</i> -RTF             | ctggcttgttgatgagggtg                          | XP_021197073.1           |
| <i>Atg3</i> -RTR             | cggcggttgtagtattgt                            |                          |
| <i>Atg4b</i> -RTF            | cagaaggcaaggagtgggc                           | XP_021182853.1           |
| <i>Atg4b</i> -RTR            | tgagcggcactatcaacagc                          |                          |
| <i>Atg7</i> -RTF             | gcgatgacggatgaaacag                           | XP_021186875.1           |
| <i>Atg7</i> -RTR             | agcagccgagatcaacacc                           |                          |
| <i>Atg12</i> -RTF            | ctacaggcaatgctcaa                             | XP_021193862.1           |
| <i>Atg12</i> -RTR            | ctggtgacggtgcaaacg                            |                          |
| <i>Atg14</i> -RTF            | geggaaactcaggagccataa                         | XP_021191352.1           |
| <i>Atg14</i> -RTR            | cctccgtgtcctcgctat                            |                          |
| <b>RNAi</b>                  |                                               |                          |
| <i>EcR</i> -RNAiF            | gcgtaatacgactcactataggcgctgtgataacaacggagga   |                          |
| <i>EcR</i> -RNAiR            | gcgtaatacgactcactataggaagctggagacaactcctcacg  |                          |
| <i>Gfp</i> -RNAiF            | gcgtaatacgactcactatagggtgggtcccaattctcgtggaac |                          |
| <i>Gfp</i> -RNAiR            | gcgtaatacgactcactataggcttgaagttgaccttgatgcc   |                          |
| <i>Klf15</i> -RNAiF          | gcgtaatacgactcactatagggtctcctgcggaagtcttata   |                          |
| <i>Klf15</i> -RNAiR          | gcgtaatacgactcactataggcctctactgggcaacgaaaa    |                          |
| <i>Atg8</i> -RNAiF           | gcgtaatacgactcactataggatcctgatcgtgttcggtaat   |                          |
| <i>Atg8</i> -RNAiR           | gcgtaatacgactcactataggtaatatccatatacattctc    |                          |
| <i>Casp3</i> -RNAiF          | gcgtaatacgactcactataggacctcgtcatgtgtgtca      |                          |
| <i>Casp3</i> -RNAiR          | gcgtaatacgactcactatagggtgaaggcgtgtatgtgtg     |                          |
| <i>Yfp</i> -RNAiF            | gcgtaatacgactcactataggcgccagcacgacttctca      |                          |
| <i>Yfp</i> -RNAiR            | gcgtaatacgactcactataggcgaaactccagcaggaccatg   |                          |
| Chip- <i>Atg8</i> F          | tcgattgttcattctatgactat                       |                          |
| Chip- <i>Atg8</i> R          | tcgctccctatttctgcaatttc                       |                          |
| Chip- <i>Pepck</i> F         | ttttattcatttggcacc                            |                          |
| Chip- <i>Pepck</i> R         | acaagatggcgtcagggtg                           |                          |
| Chip- <i>Klf15</i> F         | gcaaagagttacatagtag                           |                          |
| Chip- <i>Klf15</i> R         | cagtagaaaaatatcaatta                          |                          |
| <b>Exp in <i>E. Coli</i></b> |                                               |                          |
| Anti-KLF15F                  | tactcaggatccatgttttgaaggctctggat              |                          |
| Anti-KLF15R                  | tactcagagctcaccactgtgccgacgtaagt              |                          |

3. 实验结果

3.1 筛选棉铃虫中参与糖异生的 KLF

以人中 18 个 KLFs 和果蝇中 5 个 KLFs 为路标，通过 BLAST，在棉铃虫基因组中筛选到 5 个 KLFs，分别命名为 *krüppel-like factor luna* (*Luna*)，树突乔木还原蛋白(*Dar*)、*Klf8*、*Klf9* 和 *Klf16*，其中 KLF9 并不与人中的 KLF9 聚为一支，而与果蝇的 KLF15 聚在一起（图 2-1），而且与果蝇和人的 KLF15 序列更为相似（图 2-2），故将 KLF9 更名为 KLF15。为了筛选在变态期高表达的 KLF，提取 6th-24 h 和 6th-96 h 的表皮、中肠和脂肪体的 cDNA 作为模板进行逆转录聚合酶链式反应（reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR），结果显示 *Luna*、*Klf15* 和 *Klf16* 在变态期高表达（图 2-3A-E）。为了筛选参与糖异生的 KLF，用 RNAi 技术敲降 *Luna*、*Klf15* 和 *Klf16* 的表达并检测血糖（图 2-3F），结果显示敲降 *Klf15* 和 *Klf16* 后血淋巴中的葡萄糖水平显著下降（图 2-3G），与此同时，敲降 *Klf15* 之后显著降低糖异生关键酶 *G6p* 和 *Pepck* 的表达，而 *dsKlf16* 对 *Pepck* 的表达并没有影响（图 2-3H），因此选择 KLF15 作为靶标基因进行研究。





在棉铃虫基因组中鉴定到5个 *Klfs*, 分别是 *Luna*, LOC110376548 (XP\_021190718.1, XP\_021190719.1, XP\_021190721.1); *Dar*, LOC110374594 (XP\_021188035.1, XP\_021188036.1, XP\_021188037.1); *Klf8*, LOC110378525 (XP\_021193494.1); *Klf9*, LOC110384292 (XP\_021201196.1); *Klf16*, LOC110373997 (XP\_021187184.1)。 *H. armigera*: 棉铃虫; *B. mori*: 家蚕; *H. sapiens*: 智人; *D. melanogaster*: 果蝇; *C. elegans*: 秀丽隐杆线虫。

There are five *Klfs* in the genome, *Luna*, LOC110376548 (XP\_021190718.1, XP\_021190719.1, XP\_021190721.1); *Dar*, LOC110374594 (XP\_021188035.1, XP\_021188036.1, XP\_021188037.1); *Klf8*, LOC110378525 (XP\_021193494.1); *Klf9*, LOC110384292 (XP\_021201196.1); *Klf16*, LOC110373997 (XP\_021187184.1). *H. armigera*: *Helicoverpa armigera*; *B. mori*: *Bombyx mori*; *H. sapiens*: *Homo sapiens*; *D. melanogaster*: *Drosophila melanogaster*; *C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*.

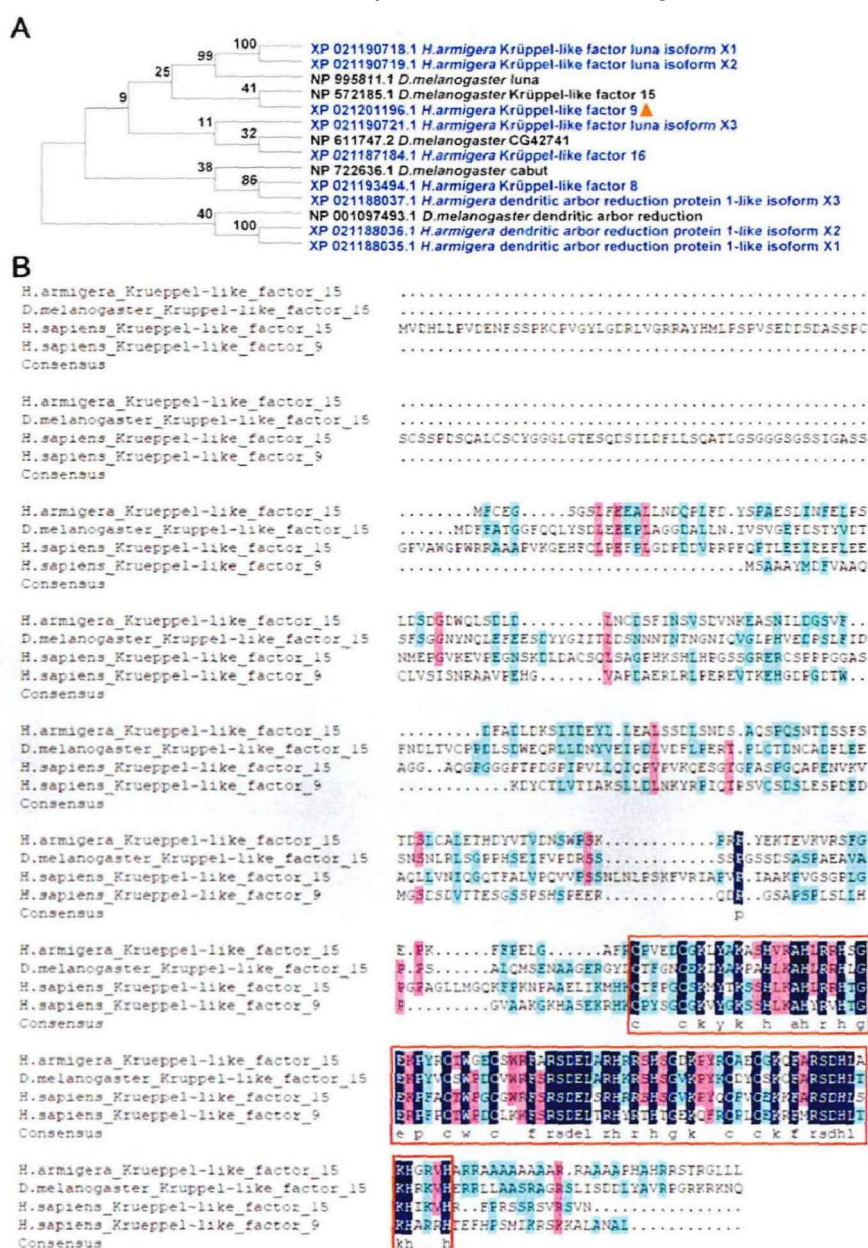


图 2-2 对人、果蝇和棉铃虫的 KLF15 进行序列比对

**Fig. 2-2 Sequence alignment of KLF15 in *H. sapiens*, *D. melanogaster*, and *H. armigera***

**A.** 对棉铃虫和黑腹果蝇中的 KLFs 构建系统发育树。**B.** 对人中的 KLF9 和 KLF15、果蝇中的 KLF15 和棉铃虫中的 KLF15 进行序列比对以正确命名靶标基因。红框标为结构域。

**A.** Phylogenetic tree analysis of KLFs from *H. armigera* and *D. melanogaster*. **B.** Sequence alignment of *H. sapiens* KLF9 and KLF15, *D. melanogaster* KLF15, and *H. armigera* KLF15 to name the targeted gene correctly. The area marked in the red box is the structural domain.

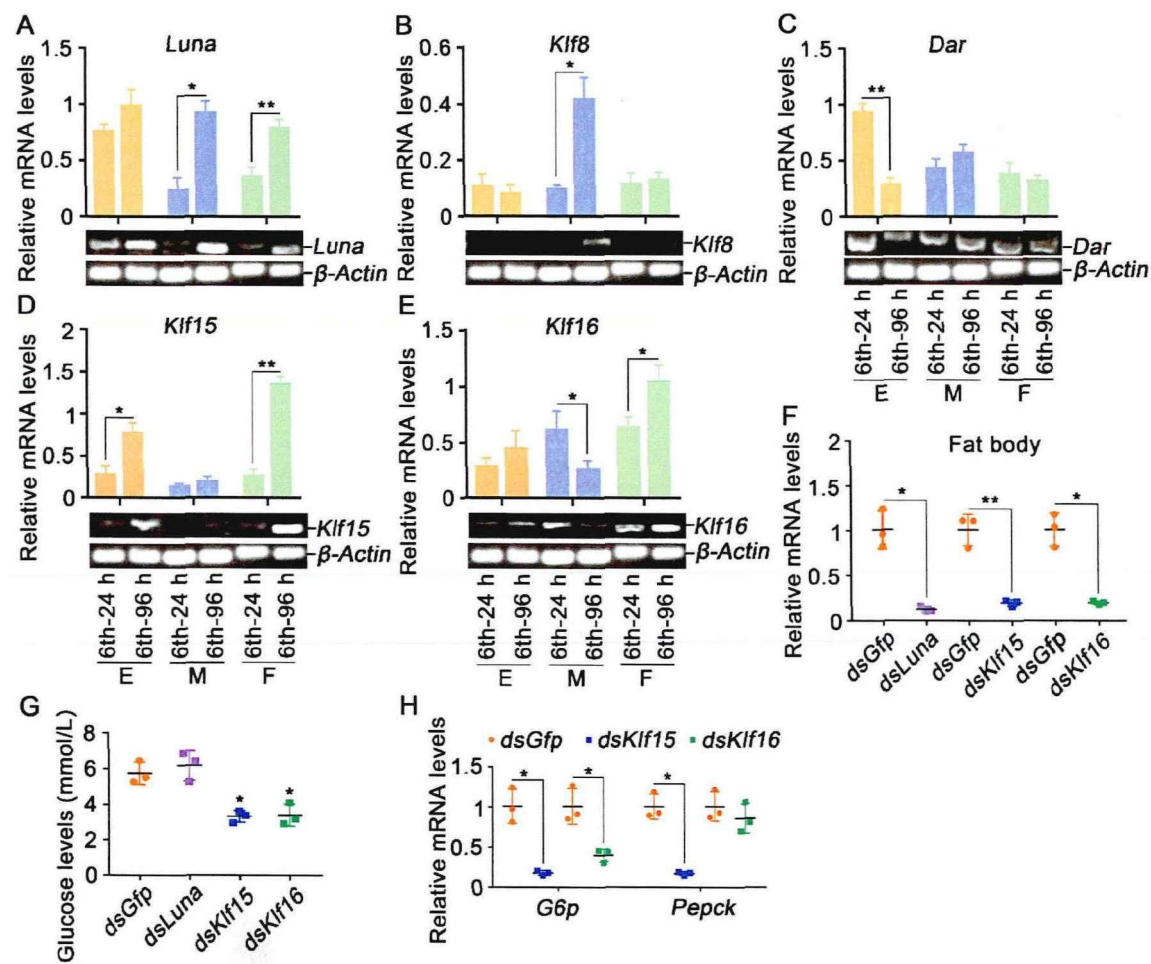


图 2-3 筛选在脂肪体中高表达并参与糖异生的 Klf

**Fig. 2-3 Screened Klf that highly expressed in the fat body and involved in gluconeogenesis**

**A-E.** 通过 RT-PCR 筛选出在变态期高表达的 Klfs。E: 表皮; M: 中肠; F:脂肪体。F. Luna、Klf15、Klf16 在脂肪体中的干扰效率。G. 敲降 Luna、Klf15 和 Klf16 后检测血淋巴中的葡萄糖水平。H. 通过 qRT-PCR 检测 Klf15、Klf16 敲低后 G6p 和 Pepck 的表达。

**A-E.** RT-PCR screened highly expressed Klfs during metamorphosis. E: epidermis; M: midgut; F: fat body. F. The RNAi efficiency of Luna, Klf15 and Klf16 in the fat body. G. Glucose levels were detected in the hemolymph after knockdown Luna, Klf15 and Klf16. H. Detected the expression of G6p and Pepck after Klf15 and Klf16 knockdown by qRT-PCR.

### 3.2 20E 促进 *Klf15* 的表达

为了探究 KLF15 的功能,制备了 KLF15 的兔源多克隆抗体,提取全龄期组织蛋白后进行 western blot 检测,结果显示 KLF15 表达量在变态期的表皮和脂肪体中上升,但在中肠中未检测出 KLF15 的表达(图 2-4A 和 Ai),说明 KLF15 在变态期的表皮和脂肪体中发挥重要作用。为了探究 20E 对 KLF15 的调控,对 6th-6 h 幼虫注射 20E 后设置不同的时间梯度检测 *Klf15* 的表达。结果显示,与对照组 DMSO 相比,500 ng 的 20E 刺激 1 h 即能上调 *Klf15* 的表达(图 2-4B);随后设置不同的浓度梯度,100 ng 的 20E 即能上调 *Klf15* 的表达,并且随着浓度的上升 *Klf15* 的表达也增加(图 2-4C)。为了探究 20E 上调 *Klf15* 表达的机制,敲降了 20E 的核受体 *EcR*,发现 *Klf15* 的表达量显著下降(图 2-4D)。通过 JASPAR 转录因子数据库和查阅文献[126, 127],在 *Klf15* 的启动子序列上发现了多个 EcRE 结合位点,为了证明 *Klf15* 启动子位点的 EcRE 可以与 EcR 相结合,将 *Klf15* 启动子中保守的 EcRE 结合位点进行基因组扩增,然后与提取的 EcR 核蛋白进行 EMSA,结果发现 *Klf15* 启动子位点上包含 5'-CGTTCAATAAACG-3'的 EcRE 结合位点可以与 EcR 相结合。进一步设计了包含 5'-CGTTCAATAAACG-3'结合位点的探针(带有 FAM 荧光标记),在 western blot 证明成功表达 EcR-RFP-His 核蛋白后(图 2-4E),将探针与核蛋白进行孵育后跑聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果显示 20E 促进 EcR 核蛋白与探针的结合从而形成迁移较慢的条带,而加入 His 抗体之后,抗体由于识别和结合 EcR-RFP-His 从而形成迁移更慢的条带。在竞争实验中,由于添加 50 倍的未标记的探针可以竞争结合核蛋白从而导致结合条带显著减弱。为了证明 EcRE 结合序列的特异性,将结合序列突变为 5'-CATGTAATAAACG[77, 128],结果发现结合条带消失(图 2-4F)。又进行了 ChIP 实验,与 IgG 相比,在 20E 的诱导下, RFP 抗体所识别的 EcR 蛋白可以沉淀更多的包含 EcRE 的 DNA 片段(图 2-4G)。以上实验说明 20E 可以促进 EcR 结合到 *Klf15* 启动子上的 EcRE 结合位点从而上调 *Klf15* 的转录。

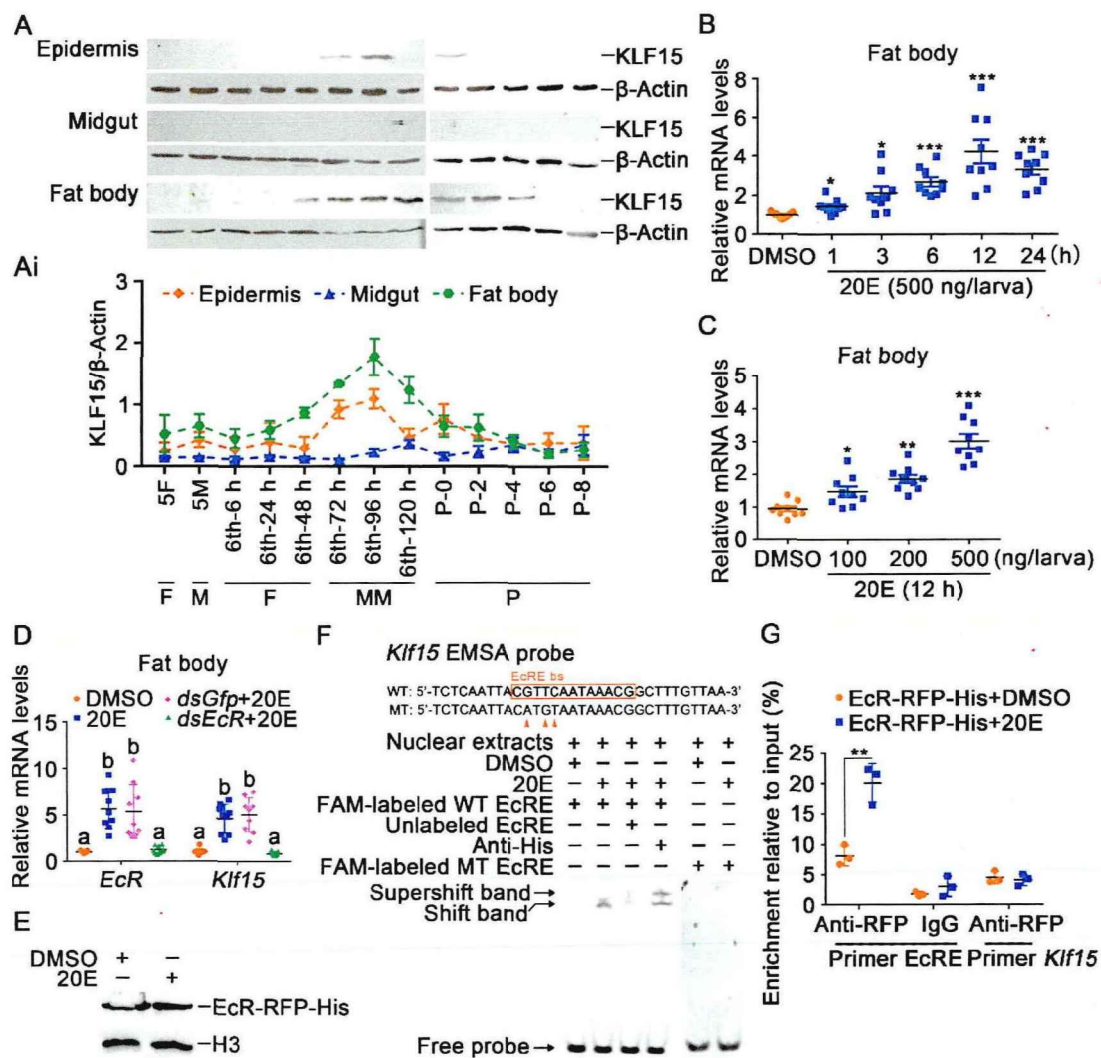


图 2-4 20E 促进 *Klf15* 的表达

Fig. 2-4 20E upregulated the expression of *Klf15*

**A.** 配制 12.5%的 SDS-PAGE 凝胶通过免疫印迹检测 KLF15 在表皮、中肠和脂肪体中的表达。5F: 五龄取食幼虫; 5M: 五龄蜕皮幼虫; 6th-6 h-120 h: 不同阶段的六龄幼虫; P0-P8: 0-8 日龄的蛹。F: 取食期; M: 蜕皮期; MM: 蜕皮变态期; P: 蛹期。**Ai.** 使用 Image J 软件对免疫印迹结果进行定量统计。**B.** 20E (500 ng/只虫) 诱导不同的时间后检测 *Klf15* 在脂肪体中的表达。**C.** 不同浓度的 20E 诱导 12 h 后检测 *Klf15* 在脂肪体中的表达。**D.** 注射 *dsEcR* (3  $\mu$ g/只虫) 敲降 *EcR* 表达后补充 20E (500 ng/只虫) 刺激 12 h, 检测 *Klf15* 在脂肪体中的表达。**E.** 在 HaEpi 细胞系中过表达 EcR-RFP-His 后提取核蛋白进行 EMSA 实验。**F.** EMSA 实验检测 *Klf15* 启动子序列中 EcRE 序列与 EcR 结合, WT 和 MT 分别代表 EcRE 探针和 EcRE 突变探针。**G.** ChIP 实验显示 20E 通过 EcR 结合 EcRE 从而促进 *Klf15* 的转录。Primer EcRE 表示包含 EcRE 的序列, Primer *Klf15* 为没有包含 EcRE 的序列, 位于 *Klf15* 的开放阅读框 (ORF) 中。

**A.** The protein profiles of KLF15 in the epidermis, midgut, and fat body detected using western blotting after 12.5% SDS-PAGE. 5F: fifth instar feeding larvae; 5M: fifth instar molting larvae; 6th-6 h to 120 h: sixth instar larvae at different stages; P0 to P8: 0 to 8-day-old pupae. F: feeding; M: molting; MM: metamorphic



molting; P: pupae. **Ai.** Quantification of KLF15 in A using Image J software. **B.** Time course of the *Klf15* expression in the fat body after 20E (500 ng/larva) induction. DMSO was used as the control. **C.** The expression of *Klf15* in the fat body under stimulation with different concentrations of 20E for 12 h. **D.** Knockdown of *EcR* in the fat body by *dsEcR* (3  $\mu$ g/larva) followed by stimulation with 20E (500 ng/larva) for 12 h to detect the expression of *Klf15*. **E.** Nuclear proteins from *EcR*-RFP-His overexpressed cells were extracted for EMSA. **F.** EcRE on the *Klf15* promoter bound to EcR detected by EMSA assay. WT and MT represent EcRE probe and EcRE mutant probe, respectively. **G.** ChIP assay showing 20E promoted *Klf15* expression via EcR binding to EcRE and detected by qRT-PCR. Primer EcRE is the sequence containing EcRE. Primer *Klf15*, as non EcRE control targeting to *Klf15* open reading frame (ORF).

3.3 KLF15 促进化蛹以及脂肪体的自噬和凋亡

为了探究 KLF15 在棉铃虫生长发育过程中的功能，用 RNAi 技术合成 *dsGfp* 和 *dsKlf15*，选择大小体重相似的 6th-6 h 幼虫进行注射，敲降基因的表达。结果发现相比较对照组 *dsGfp*，敲降 *Klf15* 之后，68.9%的幼虫出现化蛹异常、化蛹失败和蛹期死亡以及羽化失败的表型，52.2%的幼虫延迟化蛹约 20 h，然后在蛹期或者成虫期死亡（图 2-5）。为了解释敲降 *Klf15* 后化蛹延迟、化蛹和羽化失败的原因，观察了敲降 *Klf15* 后脂肪体的自噬和凋亡。

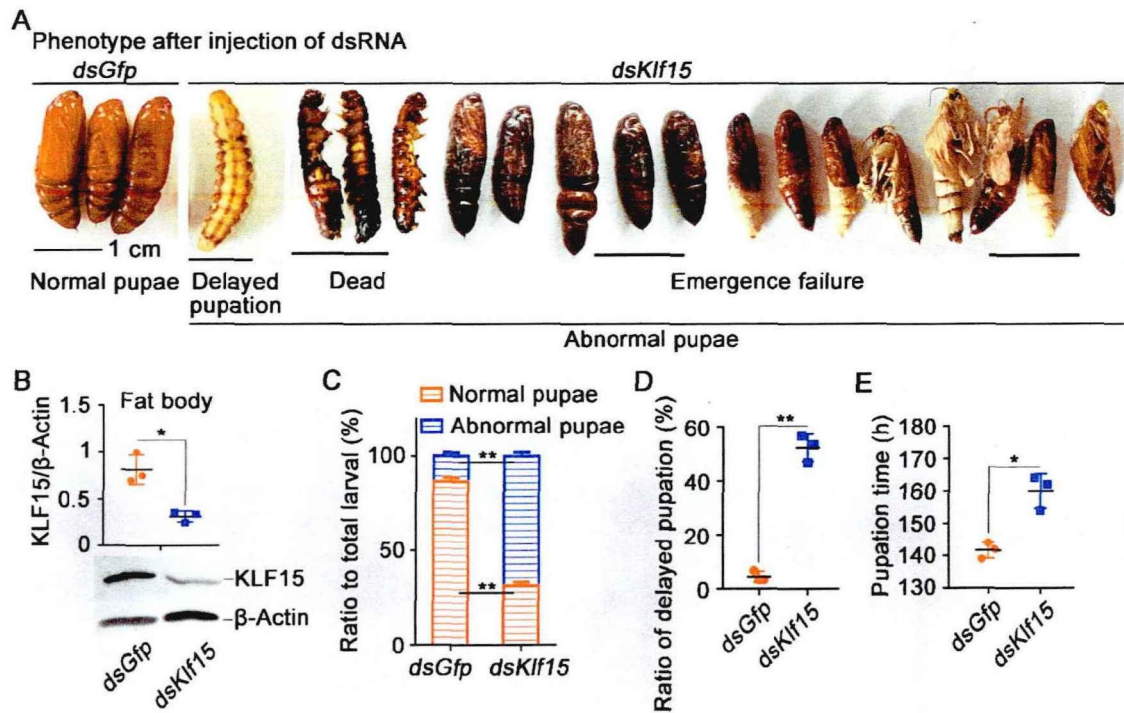


图 2-5 敲降 *Klf15* 后导致延迟化蛹

Fig. 2-5 Knockdown of *Klf15* delayed pupation

**A.** 往 6th-6 h 幼虫血腔中注射 *dsKlf15* 敲降 *Klf15* 的表达后观察虫体表型，一共注射三次，每次间隔 24 h。标尺代表 1 cm，*dsGfp* 为对照组。 **B.** 在第三次注射 *dsKlf15* 后提取脂肪体组织进行免疫印迹检测干扰效率。 **C.** 表型统计，异常蛹包含化蛹前死亡的幼虫、化蛹失败或者死亡的蛹、嵌合蛹、羽化

失败的蛹。**D.** 注射 *dsKlf15* 和 *dsGfp* 双链统计延迟化蛹的占比。**E.** 敲降 *Gfp* 和 *Klf15* 后统计化蛹时间。虫体敲降实验每组用虫 30 只，共三次重复。

**A.** Phenotypes after injection of *Klf15* dsRNA from 6th-6 h larva to 72 h; the ruler represents 1 cm, *dsGfp* was used as the control. **B.** Western blotting validation of the interference efficiency in the fat body after the third dsRNA injection. **C.** Ratio of phenotypes, abnormal pupae include larvae that die during the prepupa stages, dead pupae and chimeric pupae that cannot normally emerge. **D.** The ratio of delayed pupation after the dsRNA injection. **E.** The time at which the larvae pupated after knockdown *Gfp* and *Klf15*. The data were obtained in triplicate with thirty larvae each time.

在幼虫取食阶段（6th-24 h-6th-48 h），脂肪体结构完整，呈柔软的厚片状的结构，尼罗红染色显示脂滴大而密集。而幼虫停止取食后（6th-72 h），脂肪体开始解离，结构变薄，空隙变大，并在 6th-120 h 完全解离成小点状结构，变态期的脂滴变小，含量下降，TUNEL 染色发现 6th-72 h 之后出现凋亡信号（图 2-6A）。Western blot 结果与组织形态观察相一致，LC3-I（微管相关蛋白 1 轻链 3，又称自噬相关蛋白 8，ATG8）转化为 LC3-II（磷脂酰乙醇胺形式），是细胞发生自噬的标志。自噬从取食期开始，并在停止取食后（6th-72 h）加强。片段化的 Caspase-3（CASP3）是凋亡的标记基因，在 6th-72 h 开始表达并一直持续到蛹期的第 4 天（图 2-6B 和 Bi），这说明在棉铃虫停止取食进入变态发育的过程中，自噬和凋亡是连续发生的。而在敲降 *Klf15* 之后，脂肪体解离受到抑制，脂滴不再分解和减少，凋亡信号减弱（图 2-6C）。透射电子显微镜（TEM）显示，与 *dsGfp* 相比，敲降 *Klf15* 之后，脂肪体中典型的由单层膜或者双层膜包被的自噬小体（包含退化的细胞器或者降解的脂滴）和自噬空泡减少[129]，细胞核也不再像 *dsGfp* 组一样发生肿胀，染色质固缩和染色加深（图 2-6D-Dii）。与此同时，敲降 *Klf15* 之后，LC3-II 型和片段化 CASP3 的表达减少，说明 KLF15 可以促进自噬和凋亡（图 2-6E）。



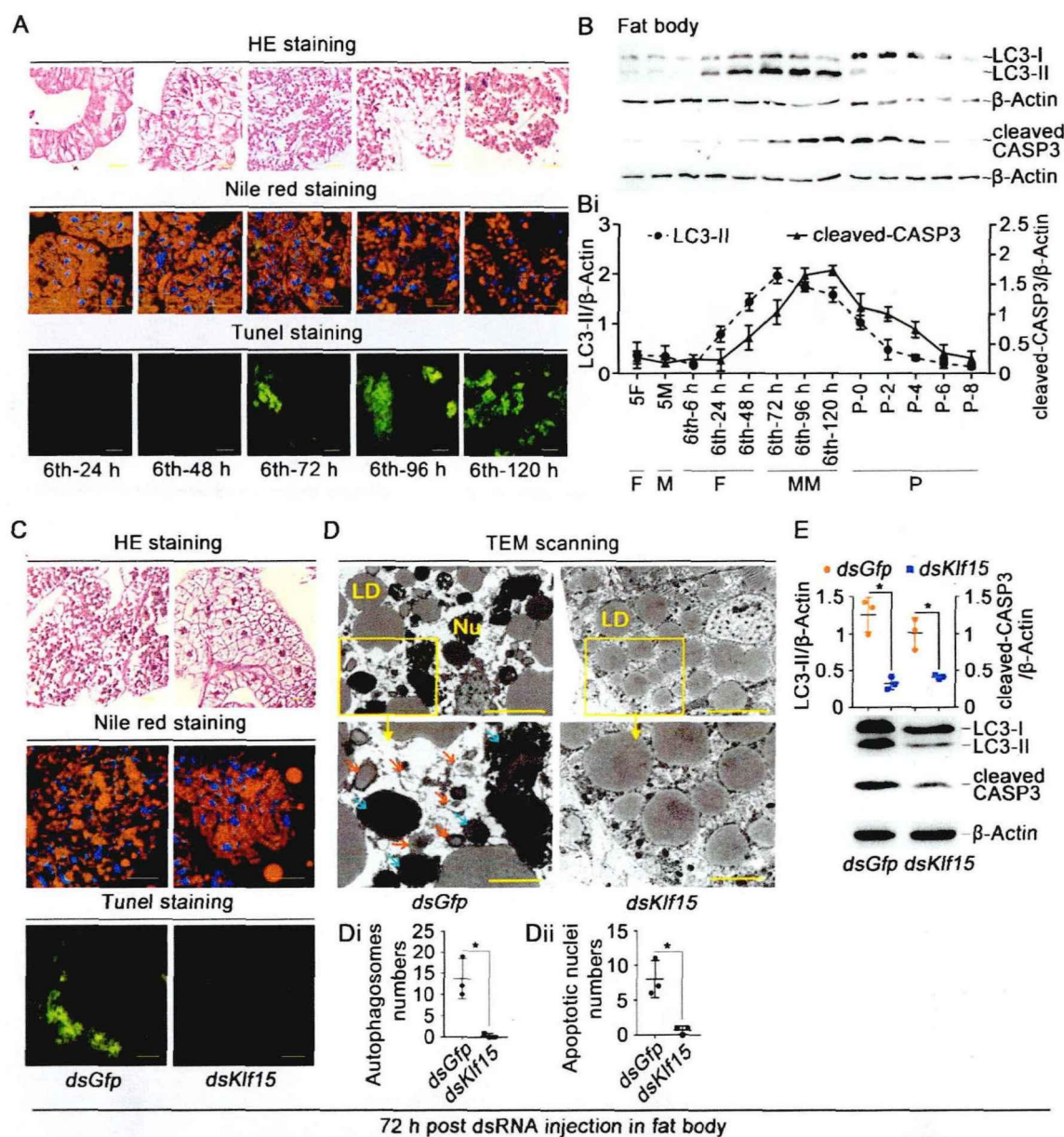


图 2-6 敲降 *Klf15* 后抑制脂肪体分解

Fig. 2-6 Knockdown of *Klf15* repressed fat body degradation

**A.** 通过 HE 染色、尼罗红染色和 TUNEL 染色探究 6th-24 h 到 6th-120 h 脂肪体的变化。HE 染色中标尺为 50  $\mu$ m。尼罗红染色中红色区域即为脂滴，标尺为 50  $\mu$ m。TUNEL 染色中绿色荧光显示为脂肪体中凋亡细胞区域，标尺为 100  $\mu$ m。**B.** 用 LC3 和片段化的 CASP3 抗体检测脂肪体中 LC3-II 和片段化的 CASP3 的蛋白水平，15% SDS-PAGE 凝胶， $\beta$ -Actin 为蛋白对照。**Bi.** 对 LC3-II 和片段化的 CASP3 的蛋白结果进行定量统计。**C.** 敲降 *Klf15* 后对脂肪体进行 HE 染色、尼罗红染色和 TUNEL 染色显示脂肪体形态。**D.** 注射 *dsKlf15* 后使用透射电镜观察脂肪体。大视野图中标尺为 100  $\mu$ m，小视野图中标尺为 40  $\mu$ m。红色箭头表示自噬体，蓝色箭头表示凋亡细胞核。Nu: 细胞核，LD: 脂滴。**Di.** 统计三组不同的电镜图像中包含的自噬体数量。每张图像的面积约为 0.09 mm<sup>2</sup>。**Dii.** 计数 *dsGfp* 和 *dsKlf15* 细胞凋亡核的数量。**E.** 敲低 *Gfp* 和 *Klf15* 表达后，western blotting 检测到 LC3-II 和片段化的 CASP3。所有的观察以及检测都是在注射 dsRNA 72 h 后进行实验的。

**A.** The morphological changes of fat body were assessed by HE staining, Nile red staining and TUNEL staining, the ruler represents 50  $\mu\text{m}$  in the HE staining. Nile red stained for intracellular LD, the ruler represents 50  $\mu\text{m}$ . The apoptotic cells in the fat body were determined by TUNEL staining assay, the ruler represents 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Western blotting detection of LC3-II and cleaved-CASP3 protein levels in the fat body using anti-LC3 and anti-CASP3 antibodies, with  $\beta$ -Actin as protein control after 15% SDS-PAGE. **Bi.** Quantification of the data in B. **C.** HE staining, Nile red staining and TUNEL staining showing fat body morphology after knockdown *Klf15*, observed after first injection dsRNA for 72 h. **D.** TEM observation after injection with *dsKlf15* in the fat body. The bars in the wide field view represented 100  $\mu\text{m}$ , in the small field view represented 40  $\mu\text{m}$ . The red arrows indicated autophagosomes, the blue arrows represented the apoptotic nuclei. Nu: nucleus, LD: lipid droplets. **Di.** Counted the autophagosomes contained in three different sets of images. The area of each image is about 0.09  $\text{mm}^2$ . **Dii.** Counted the apoptotic nuclei of *dsGfp* and *dsKlf15*. **E.** After knockdown *dsGfp* and *dsKlf15*, western blotting detected LC3-II and cleaved-CASP3. 72 h post dsRNA injection in fat body: 72 h post dsRNA injection into hemocoel and observed the variation in the fat body.

在细胞上进一步验证 KLF 促进自噬和凋亡, 在 HaEpi 细胞系中过表达 pIEX-RFP-GFP-LC3-His 双标签荧光质粒, 添加 DMSO 和 20E 后设置不同的时间梯度进行观察, 结果发现与 DMSO 组相比, 20E 处理 12 h 之后出现自噬小体, 处理 24 h 之后绿色荧光减弱, 而 20E 处理 48 h 之后绿色荧光消失, 只有红色荧光, 说明出现自噬溶酶体, 酸性环境导致绿色荧光淬灭 (图 2-7A)。与此同时通过添加 CASP3 底物, 发现 10  $\mu\text{M}$  的 20E 处理细胞 72 h 之后出现绿色荧光 (图 2-7B), 表明细胞出现凋亡。而在敲降 *Klf15* 或者添加自噬抑制剂 3-Methyladenine (3-MA) 之后, 相比较对照组 *Yfp*, 20E 处理 12 h 后自噬小体减少 (图 2-8A 和 Ai); 并且 20E 处理 48 h 后不再出现自噬溶酶体 (图 2-8B 和 Bi), 以上结果说明 KLF 促进自噬的发生。敲降 *Klf15* 之后也检测了细胞凋亡, 相比较 *dsYfp* 组, *dsKlf15* 或者添加 3-MA 之后 CASP3 活性减弱 (图 2-8C 和 Ci), 说明自噬促进凋亡的发生; 流式细胞实验也证明在 10  $\mu\text{M}$  的 20E 诱导 72 h 后细胞发生凋亡, 但在敲降 *Klf15* 之后凋亡细胞显著减少 (图 2-9A 和 Ai); CCK-8 实验证明敲降 *Klf15* 后增加细胞活性 (图 2-9B), 以上实验结果说明 KLF15 促进凋亡。

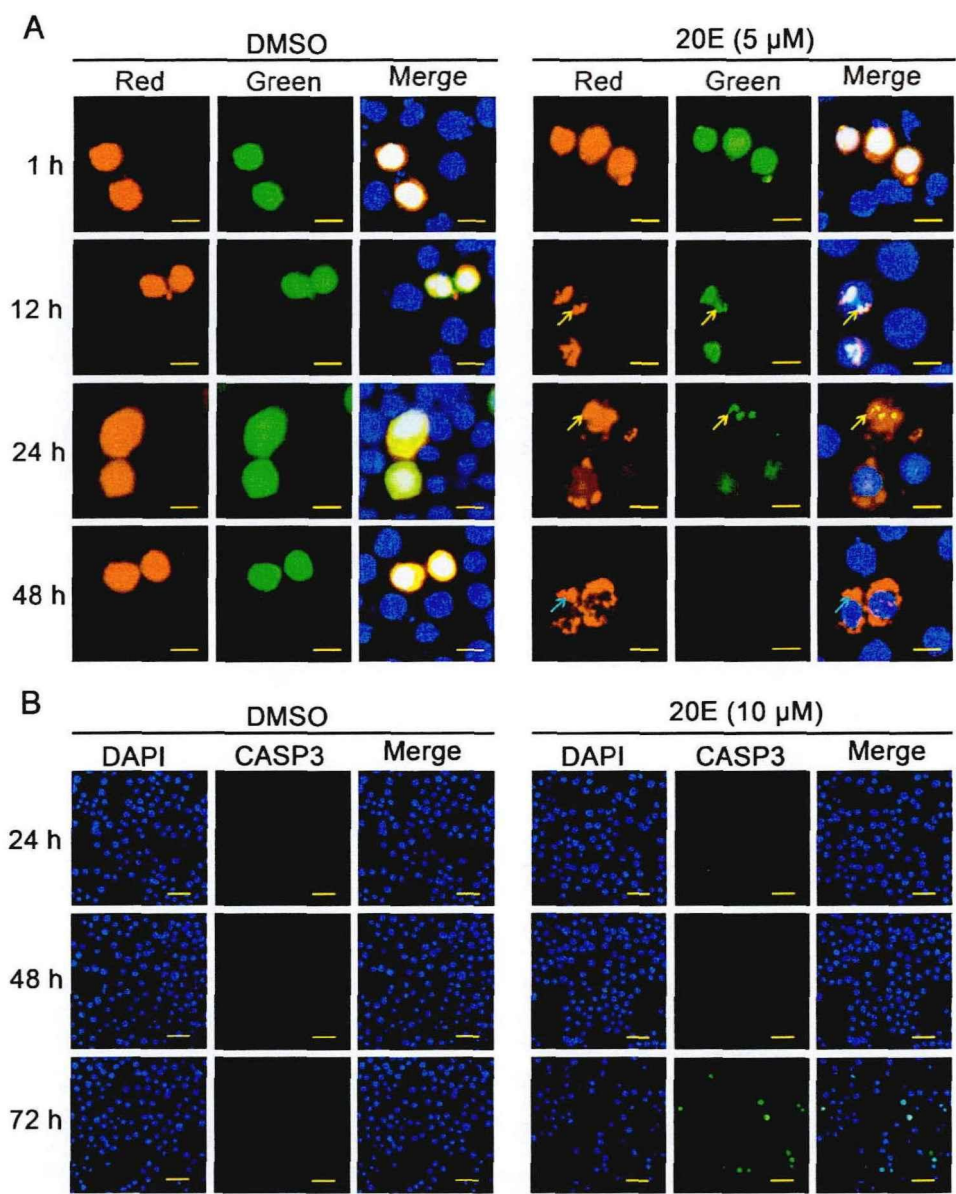


图 2-7 20E 促进细胞自噬和凋亡

Fig. 2-7 20E promoted autophagy and apoptosis.

**A.** RFP-GFP-LC3-His 荧光双标签质粒转染到 HaEpi 细胞。5 μM 20E 分别刺激 1 h、12 h、24 h 和 48 h，以 DMSO 为对照来检测自噬流，标尺表示 20 μm。黄色箭头表示自噬小体，蓝色箭头表示自噬溶酶体。**B.** 10 μM 20E 分别刺激 24 h、48 h 和 72 h 后用 SuperView 488 CASP3 检测 HaEpi 细胞凋亡情况，标尺表示 100 μm。

**A.** Transfection of RFP-GFP-LC3-His fluorescent double-labeled plasmid in HaEpi cells. 5 μM 20E to stimulate 1 h, 12 h, 24 h and 48 h, respectively, DMSO was used as the control. The yellow bars represented 20 μm. The yellow arrows represented autophagosome puncta, the blue arrow represented autolysosome puncta. **B.** Examination of apoptosis in HaEpi cells by the SuperView 488 CASP3 assay kit. 10 μM 20E to stimulate 24 h, 48 h and 72 h, respectively. The yellow bars represented 100 μm.



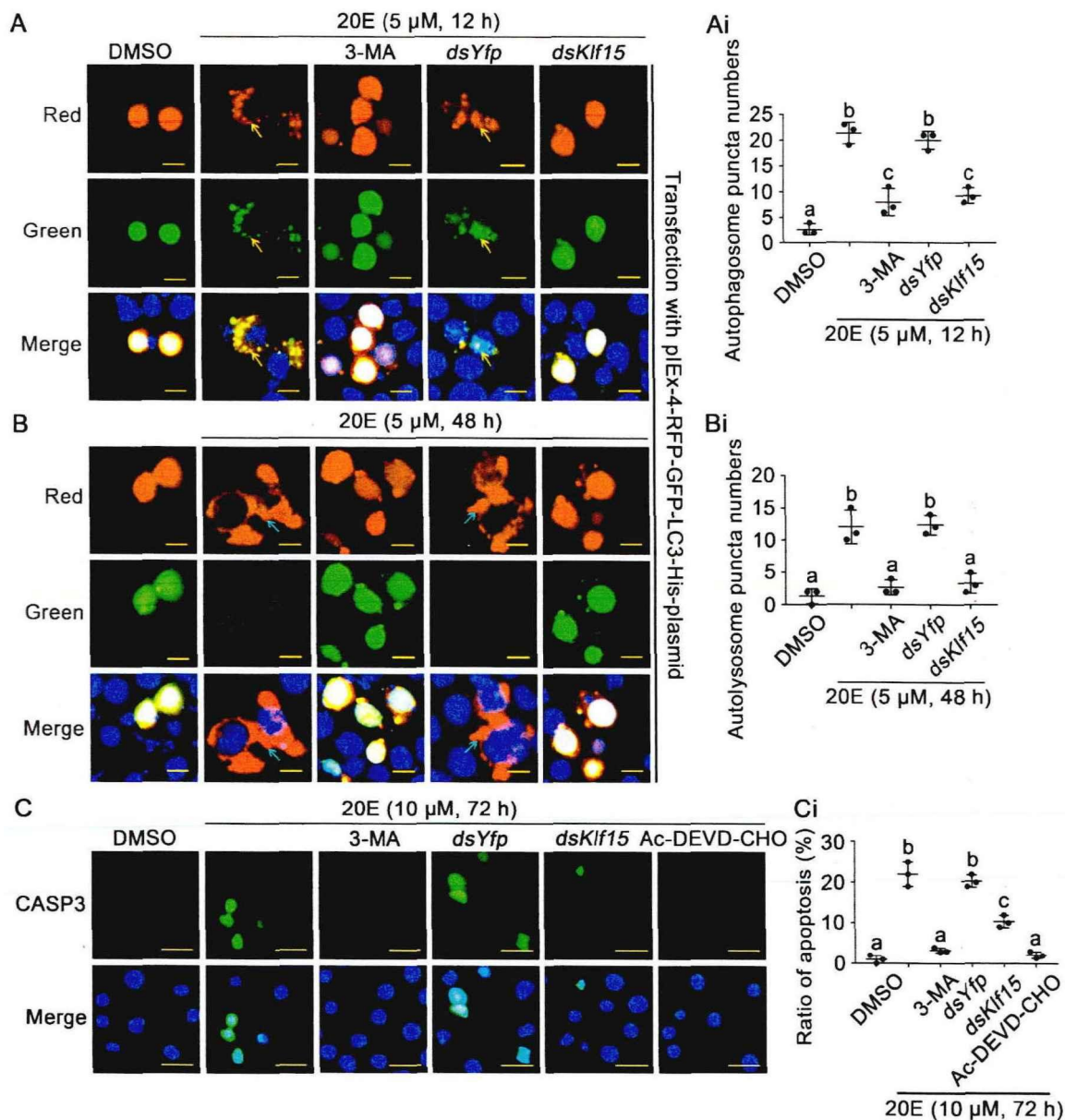


图 2-8 通过检测自噬流和 CASP3 活性发现 KLF15 促进自噬和凋亡

Fig. 2-8 KLF15 promoted autophagy and apoptosis as detected by autophagic flux and CASP3 activity

**A 和 B.** 敲降 *Klf15* 后检测 HaEpi 细胞系中的自噬流变化。3-MA (10  $\mu$ M) 为自噬抑制剂，标尺表示 20  $\mu$ m。黄色箭头表示自噬小体，蓝色箭头表示自噬溶酶体。**Ai 和 Bi.** 对 A 和 B 的统计。**C.** 在 HaEpi 细胞系中敲降 *Klf15* 之后加入有活性的 CASP3 检测细胞凋亡，Ac-DEVD-CHO 为 CASP3 的抑制剂，标尺表示 50  $\mu$ m。**Ci.** 统计 C 中的凋亡细胞。

**A and B.** The autophagic flux were detected in HaEpi cells when *Klf15* was knocked down, *dsYfp* was used as the control. 3-MA (10  $\mu$ M) is an autophagosome formation inhibitor; the yellow bars represented 20  $\mu$ m. The yellow arrows represented autophagosome puncta. The blue arrows represented autolysosome puncta. **Ai and Bi.** Counted the number of autophagosome puncta and autolysosome puncta in successfully transfected with pIEx-GFP-RFP-LC3 cells. **C.** After knocked down *Klf15* in HaEpi cells, examination of

apoptosis by the addition of active CASP3, Ac-DEVD-CHO is a CASP3 inhibitor, the bars represented 50  $\mu\text{m}$ . **Ci.** Quantification apoptotic cells in total from C.

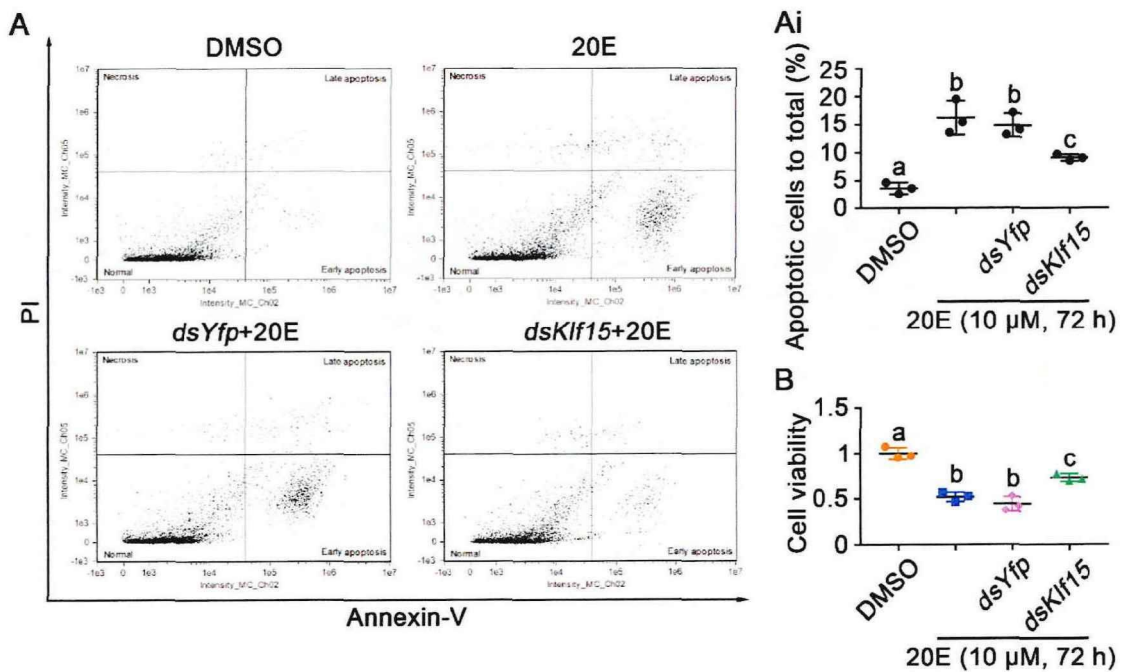


图 2-9 通过流式细胞术和 CCK-8 发现 KLF15 促进凋亡

Fig. 2-9 KLF15 promoted apoptosis as detected by flow cytometry and CCK-8

**A.** 敲降 *Yfp* 和 *Klf15* 后进行 YF488-annexin V 和 PI 染色然后使用流式细胞仪检测凋亡细胞。R1, 正常细胞; R2, 早期凋亡细胞; R3, 中晚期凋亡细胞; R4, 坏死细胞。Ai. 对 A 的结果进行统计分析。

**B.** 敲降 *Yfp* 和 *Klf15* 后使用 CCK-8 检测细胞活力。

**A.** Flow cytometry analysis of YF488-annexin V and PI staining after knocked down *Yfp* and *Klf15*. R1, normal cells; R2, early apoptotic cells; R3, middle and late apoptotic cells; R4, necrotic cells. **Ai.** Statistical analysis for A. **B.** CCK-8 detected cell viability after knocked down *Yfp* and *Klf15*.

为了探究 KLF15 促进自噬和凋亡的机制, 分析了 *Atg8* 和 *Casp3* 的启动子序列, 发现 *Atg8* 启动子上包含 CACCC 的 KLF bs, 然而并没有在 *Casp3* 的启动子上发现包含 CACCC 的 KLF bs。转染 pIEX-KLF15-RFP-His 到 HaEpi 细胞系中, DMSO 和 20E 刺激后提取核蛋白进行 EMSA 实验 (图 2-10A), 结果发现相比较 DMSO 组, 在 20E 的刺激下, 核蛋白与 *Atg8* 启动子上包含 CACCC 的 DNA 序列相结合从而导致结合条带迁移变慢, 而加入抗体后形成迁移更慢的 supershift band, 在加入未标记的探针后则因为竞争结合核蛋白导致标记探针和核蛋白的结合减少, 将 CACCC 保守序列突变为 TCCCA 后发现核蛋白不再结合 DNA 序列[106, 130] (图 2-10B), 这说明 CACCC 结合序列具有特异性。用 ChIP 实验进一步证明, 20E 处理后相比较 IgG 组, RFP 在结合 KLF15 蛋白后促进 KLF15-RFP-His 沉淀更多的包含 CACCC 的 DNA (图 2-10C)。在虫体敲降 *Klf15* 之后, *Atg8* 和 *Casp3* 的表达量都显著下降 (图 2-10D)。除了 *Atg8*, 多个 *Atgs* (*Atg3*,

*Atg4b*, *Atg7*, *Atg12* 和 *Atg14*) 的启动子序列都具有 KLF bs, 而敲降 *Klf15* 之后 *Atg4b*, *Atg12* 和 *Atg14* 的表达都显著下降 (图 2-11)。以上实验结果说明 20E 通过 *Klf15* 促进自噬和凋亡的发生。

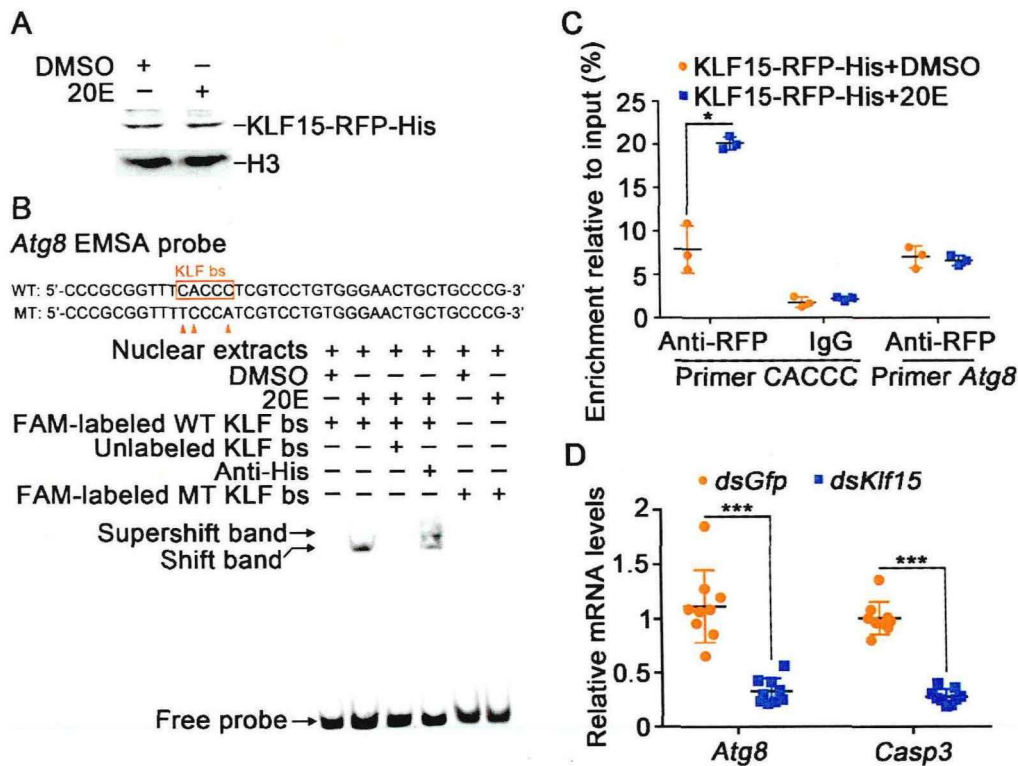


图 2-10 KLF15 通过上调 *Atg8* 的表达促进自噬

Fig. 2-10 KLF15 promoted autophagy through upregulating *Atg8*

**A.** 在 HaEpi 细胞系过表达 KLF15-RFP-His 后提取核蛋白进行 EMSA 实验。**B.** EMSA 实验检测 *Atg8* 启动子序列中 KLF bs 与 KLF15 结合, WT 和 MT 分别代表 KLF 结合探针和 KLF 结合突变探针。**C.** ChIP 实验显示 20E 通过 KLF15 结合 KLF bs 从而促进 *Atg8* 的转录。Primer CACCC 表示包含 KLF bs 的序列, Primer *Atg8* 为开放阅读框 (ORF) 中的序列。**D.** 敲降 *Klf15* 后检测 *Atg8* 和 *Casp3* 的表达。**A.** Nuclear proteins from KLF15-RFP-His overexpressed cells were extracted for EMSA. **B.** KLF bs on the *Atg8* promoter bound to KLF15 detected by EMSA assay. WT and MT represent KLF bs probe and KLF bs mutant probe, respectively. **C.** ChIP assay showing 20E promoted *Atg8* expression via KLF15 binding to KLF bs. Primer CACCC targeting KLF bs. Primer *Atg8* targeting *Atg8* ORF. **D.** Changes in the expression levels of *Atg8* and *Casp3* after *Klf15* knockdown.



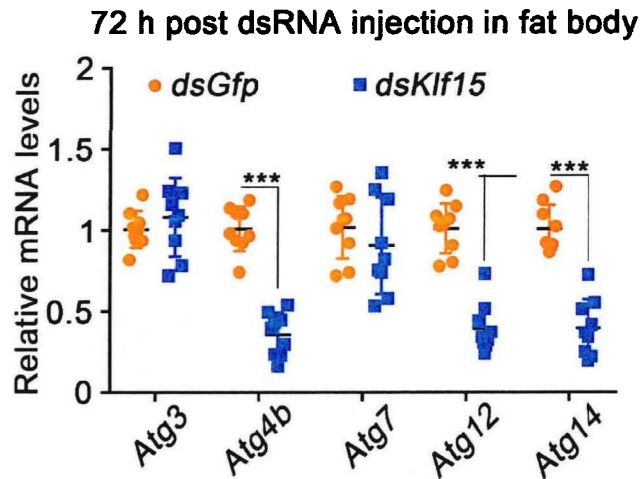


图 2-11 注射 dsRNA 72 h 后检测所有含 KLF bs 的 *Atgs* 的表达

Fig. 2-11 Detected the expression of all KLF bs-containing *Atgs* after first injection dsRNA for 72 h.

### 3.4 组织降解为糖异生提供底物

幼虫停止取食后各个组织的自噬和凋亡开始持续发生，而血淋巴中的葡萄糖水平也不断升高，此时由于幼虫不再摄食，糖异生成为主要的生糖途径，这提示自噬凋亡与糖异生密切相关。为了探究自噬与血糖升高的关系，往 6th-6 h 幼虫体内注射 *dsAtg8* 双链阻断自噬的发生，结果显示与 *dsGfp* 相比，敲降 *Atg8* 之后脂肪体的解离受到抑制，脂滴不再分解，凋亡也不再发生（图 2-12A）。此外，脂肪体的降解产物游离脂肪酸和甘油的水平也显著低于 *dsGfp* 组（图 2-12B 和 C），包括丝氨酸、缬氨酸、精氨酸、亮氨酸和异亮氨酸在内的一些生糖氨基酸在敲降 *Atg8* 之后也显著降低（图 2-12D）。*dsAtg8* 组的血淋巴葡萄糖水平相比较于 *dsGfp* 组显著下降（图 2-12E）。

为了进一步说明自噬与糖异生密切相关，检测了全龄期游离脂肪酸、甘油和游离氨基酸的含量，发现这三种代谢物都是在取食期含量最高，而在幼虫停止取食后快速下降（图 2-12F-H）。变态期由自噬凋亡分解脂肪体产生的游离脂肪酸、甘油和游离氨基酸并没有出现积累，这说明这三种代谢物都被利用而消耗殆尽。而在敲降 *Klf15* 之后，发现游离脂肪酸、甘油和包括丝氨酸、缬氨酸、精氨酸、酪氨酸和异亮氨酸在内的游离氨基酸含量上升（图 2-12I-K），这是由于敲降 *Klf15* 之后糖异生受阻导致底物不再利用而积累。敲降 *Casp3* 与敲降 *Atg8* 的结果相似，脂肪体降解受到抑制，葡萄糖水平显著降低（图 2-13）。这些结果证明自噬与凋亡与变态期血糖升高密切相关，自噬和凋亡的产物可以作为底物通过糖异生促进血糖上升。

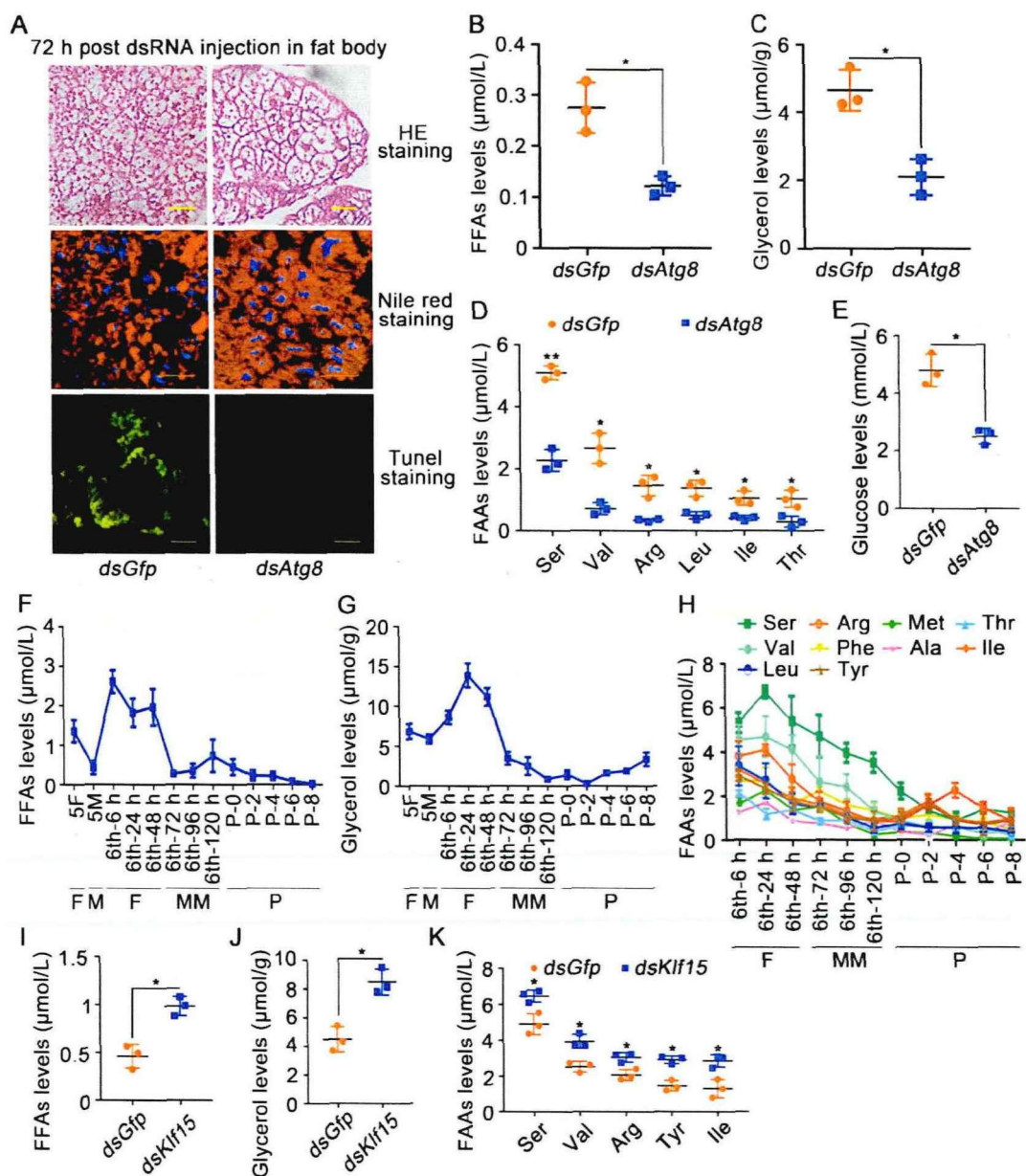


图 2-12 自噬为糖异生提供底物支持

Fig. 2-12 Autophagy presented substrates for gluconeogenesis

**A.** 敲降 *Atg8* 后对脂肪体进行 HE 染色、尼罗红染色和 TUNEL 染色显示脂肪体形态。**B 和 C.** 敲降 *Atg8* 后检测血淋巴中的游离脂肪酸和脂肪体中的甘油。**D.** 敲降 *Atg8* 后检测血淋巴中的游离氨基酸。**E.** 敲降 *Atg8* 后检测血淋巴中的葡萄糖。**F 和 G.** 五龄幼虫到第八天蛹血淋巴中游离脂肪酸和脂肪体中甘油的水平。**H.** 五龄幼虫到第八天蛹血淋巴中游离氨基酸水平。**I 和 J.** 注射 *dsKlf15* 72 h 后检测游离脂肪酸和甘油水平。**K.** 敲降 *Klf15* 之后检测游离氨基酸。

**A.** HE staining, Nile red staining and TUNEL staining showing the morphology of fat body after *dsGfp* and *dsAtg8* injection into hemocoel. **B and C.** Levels of FFAs in the hemolymph and glycerol in the fat body after knockdown of *Atg8*. **D.** FFAs levels in the hemolymph after knockdown of *Atg8*. **E.** Glucose levels in the hemolymph decreased after knockdown *Atg8*. **F and G.** FFAs levels in the hemolymph and glycerol

levels in the fat body from 5th instar larvae to 8-day-old pupae. **H.** FAAs levels in the hemolymph. **I and J.** FFAs and glycerol levels after first injection *dsKlf15* for 72 h. **K.** FAAs levels after knockdown of *Klf15*.

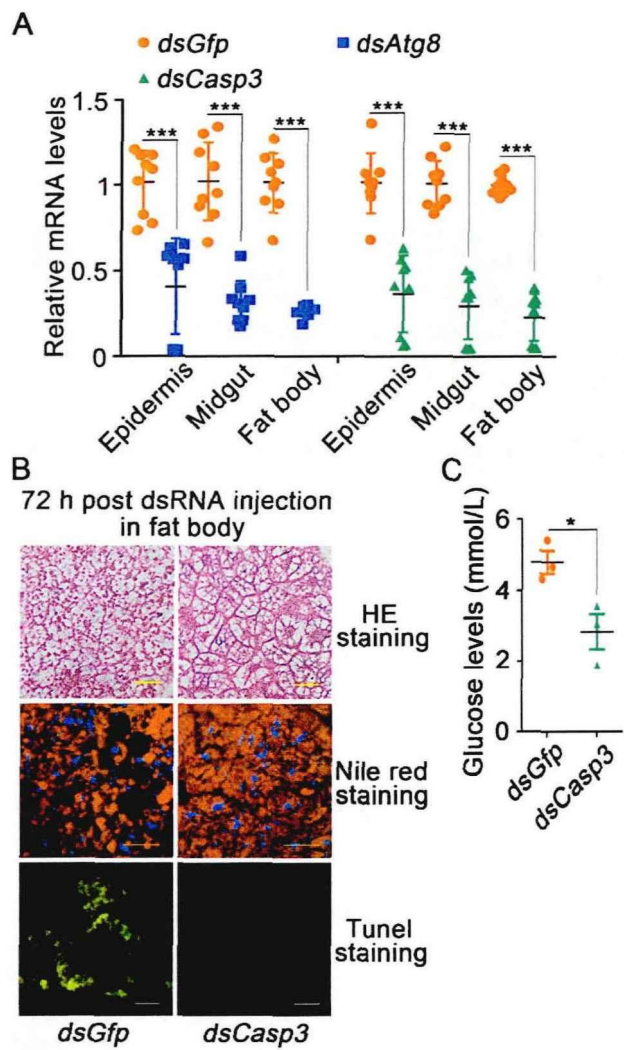


图 2-13 敲降 *Casp3* 抑制脂肪体分解，降低血糖

**Fig. 2-13 Knockdown *Casp3* inhibited fat body decomposition and decreased glucose levels**

**A.** 第三次注射 dsRNA 后，通过 qRT-PCR 检测 *Atg8* 和 *Casp3* 在表皮、中肠和脂肪体中的干扰效率。  
**B.** 注射 *dsCasp3* 后通过 HE 染色、尼罗红染色、TUNEL 染色显示脂肪体形态。  
**C.** 敲降 *Casp3* 后血淋巴葡萄糖水平下降。

**A.** The RNAi efficiency of *Atg8* and *Casp3* in the epidermis, midgut, and fat body assessed using qRT-PCR after the third injection of dsRNA. **B.** HE staining, Nile red staining and TUNEL staining showing the morphology of fat body after *dsCasp3* injection. **C.** Glucose levels in the hemolymph decreased after knockdown *Casp3*.

3.5 昆虫变态发育过程中糖代谢由糖酵解转变为糖异生

为了明确棉铃虫生长发育过程中糖代谢的变化，测定了全龄期血淋巴中葡萄糖和葡萄糖的代谢产物丙酮酸的含量，葡萄糖水平在幼虫停止取食后（6th-72 h）不断上升，并

在化蛹前（6th-120 h）达到最高，在进入蛹期后快速下降；而丙酮酸的含量则是在幼虫快速大量摄食的 6th-6 h-6th-24 h 最高，然后快速降低，并一直处于低水平的状态（图 2-14A）。这说明在变态期，葡萄糖不仅不通过糖酵解代谢为丙酮酸，而且可能在幼虫停止摄食后通过糖异生作用含量升高。因此，我们进一步检测了糖酵解关键酶，己糖激酶（hexokinase, *Hk*）、磷酸果糖激酶（phosphofructokinase, *Pfk*）和丙酮酸激酶（pyruvate kinase, *Pk*）和糖异生关键酶，*G6p* 和 *Pepck* 在脂肪体中的表达量。发现 *Hk* 和 *Pk* 都是在取食期（6th-6 h-6th-48 h）含量最高，然后停止取食后快速降低，直到蛹后期又开始慢慢升高，而 *Pfk* 的表达量并没有什么显著变化（图 2-14B）。与糖酵解关键酶表达量正好相反，*G6p* 和 *Pepck* 都是在变态期（6th-72 h-6th-120 h）表达量最高（图 2-14C），这说明在棉铃虫变态发育过程中发生糖代谢改变，由糖酵解转变为糖异生，在取食期旺盛的糖酵解途径促进了葡萄糖的分解利用，从而导致丙酮酸含量上升，而到了变态期，糖异生促进丙酮酸转变为葡萄糖而快速利用，并导致血淋巴葡萄糖含量增多。

为了进一步说明糖代谢发生变化，我们检测了全龄期血淋巴中海藻糖的含量以及脂肪体中糖原的含量来明确变态期高水平葡萄糖的来源，发现海藻糖从 6th-48 h 开始上升并在 6th-96 h 到达最高，然后降低；而糖原含量则是在取食期的 6th-48 h 达到最高，然后下降并处于平稳状态，在进入蛹期后快速下降。这说明海藻糖和糖原的降解且不再合成导致血淋巴中高水平的葡萄糖（图 2-14D）。为了支持上述假设，检测了合成海藻糖的海藻糖-6-磷酸合成酶（trehalose 6-phosphate synthetase, *Tps*）和分解海藻糖的海藻糖酶（trehalase, *Tre*）在脂肪体中的表达量，*Tps* 在取食期的 6th-24 h 表达量最高，*Tre* 在取食期的表达量较低，进入变态期后表达量上升，这表明在变态期，海藻糖合成减少以及分解增多导致葡萄糖水平上升（图 2-14E）。合成糖原的糖原合成酶（glycogen synthase, *Gs*）的表达量与糖原含量相似，在 6th-6 h-6th-48 h 含量较高，在停止取食后 *Gs* 的表达量快速降低。编码分解糖原的糖原磷酸化酶（glycogen phosphorylase, *Gp*）则是在 6th-96 h 最高（图 2-14F），这说明糖原合成减少和糖原分解增加也是导致变态期血淋巴葡萄糖水平升高的原因之一。为了探究 KLF15 与糖代谢的关系，敲降 *Klf15* 之后发现葡萄糖水平显著降低（图 2-14G），而海藻糖含量并没有什么显著变化，糖原含量和丙酮酸含量增多（图 2-14H 和 I）。之后通过检测一系列的糖代谢基因来解释 KLF15 调控糖代谢的机制，在敲降 *Klf15* 之后，糖酵解关键酶 *Hk*、*Pfk* 和 *Pk* 的表达量都显著上升，表明 KLF15 抑制糖酵解的发生；海藻糖合成酶 *Tps* 的表达量也增多；而糖异生关键酶 *G6p* 和 *Pepck* 的表达量在敲降 *Klf15* 之后显著下降，海藻糖分解酶 *Tre* 和糖原分解酶 *Gp* 的表达量也减少（图 2-14J），这些实验数据表明 KLF15 通过上调相关代谢基因的表达促进糖原分解和糖异生。



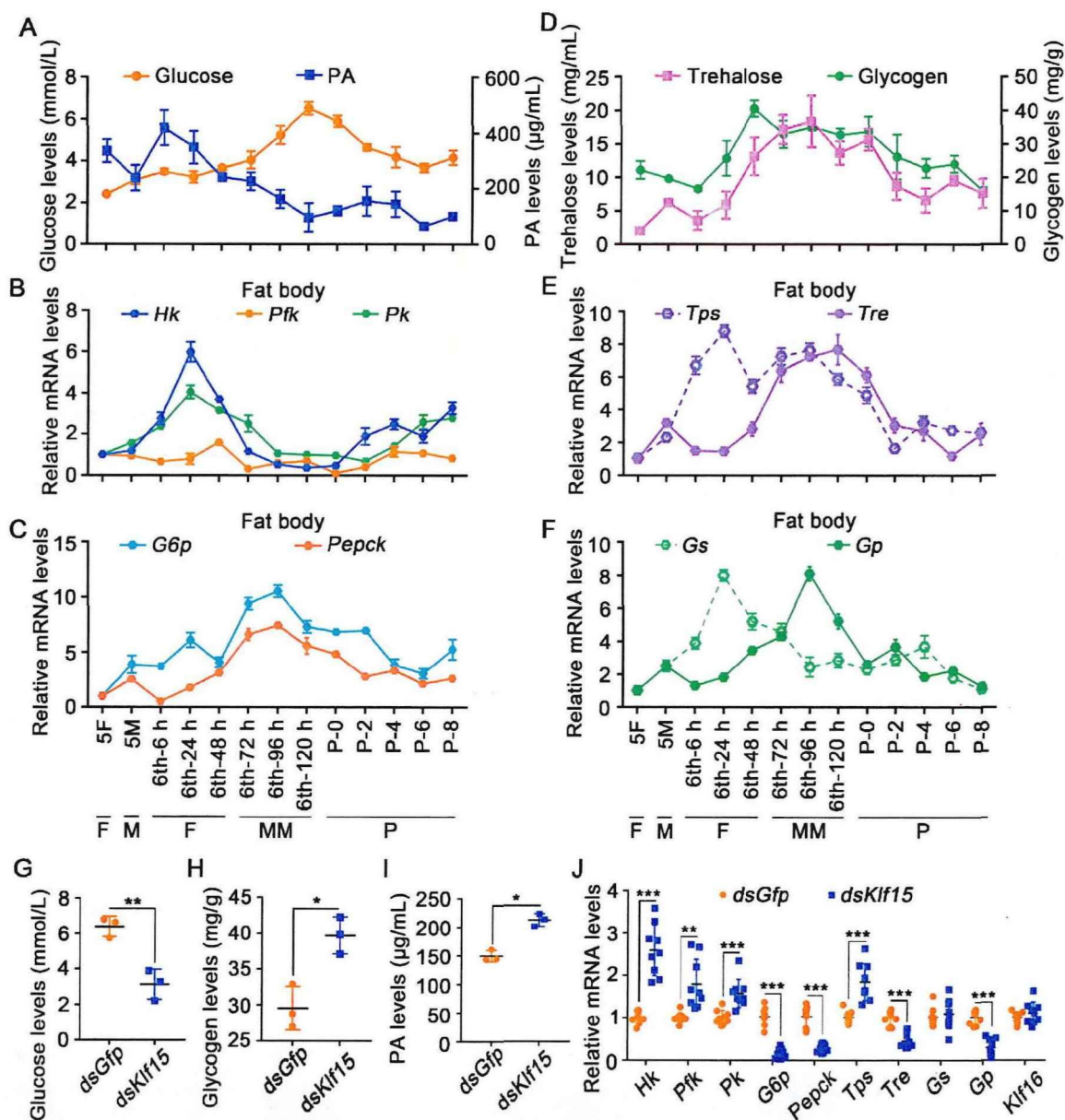


图 2-14 在敲降 *Klf15* 之后代谢物和基因表达发生变化

Fig. 2-14 Variation in the levels of metabolites and related genes expression after *Klf15* was knocked down in larvae

A. 全龄期血淋巴中葡萄糖和丙酮酸的水平。B. *Hk*、*Pfk*、*Pk* 在脂肪体中的表达量。C. *G6p* 和 *Pepck* 在脂肪体中的表达量。D. 血淋巴中的海藻糖水平和脂肪体中的糖原水平。E. 通过 qRT-PCR 检测脂肪体中 *Tps* 和 *Tre* 的表达量。F. 脂肪体中 *Gs* 和 *Gp* 的表达量。G-I. 注射 *dsKlf15* 72 h 后代谢物水平的变化。J. 通过 qRT-PCR 检测注射 *dsKlf15* 后基因表达水平的变化。

A. The levels of glucose and PA in the hemolymph. B. The expression profiles of *Hk*, *Pfk*, and *Pk* in the fat body. C. The expression profiles of *G6p* and *Pepck* in the fat body. D. Trehalose levels in the hemolymph and glycogen levels in the fat body. E. qRT-PCR showing the mRNA expression profiles of *Tps* and *Tre* in the fat body. F. The expression profiles of *Gs* and *Gp* in the fat body. G-I. Variation in the levels of metabolites



after first injection *dsKlf15* for 72 h. J. Changes in the expression levels of certain genes after *Klf15* knockdown by injection of dsRNA, as detected using qRT-PCR.

### 3.6 KLF 通过上调 *Pepck* 的表达促进糖异生

PEPCK 是糖异生代谢途径的第一个限速酶，可以催化草酰乙酸合成磷酸烯醇式丙酮酸，因此是糖异生途径最重要的关键酶，并且 PEPCK 的活性主要是在转录水平上受到调控，该基因的表达将直接影响糖异生的代谢效率[131]。*Pepck* 的启动子序列具有 CACCC 的 KLF bs，我们在结合序列附近设计了探针来进行 EMSA 实验，20E 促进 KLF15 核蛋白与 *Pepck* 上包含 CACCC 的 DNA 相结合而导致条带迁移变慢，加入未标记的探针后则因为竞争结合减少该条带。突变探针上的结合位点后不再出现结合反应。加入抗体后通过结合核蛋白从而导致结合条带迁移更慢形成“超级条带”（图 2-15A）。ChIP 实验证明在 20E 的诱导下，KLF15 可以沉淀更多的 *Pepck* 启动子上包含 KLF bs 的 DNA 从而促进 *Pepck* 的转录（图 2-15B）。为了证明糖异生与虫体发育密切相关，用 RNAi 技术敲降了 *Pepck* 的表达，出现了幼虫变态异常的表型（图 2-15C-E），更重要的是，血淋巴中的葡萄糖水平显著降低（图 2-15F），丙酮酸出现积累（图 2-15G）。这说明 PEPCK 对与糖异生至关重要，而糖异生促进棉铃虫的变态发育。

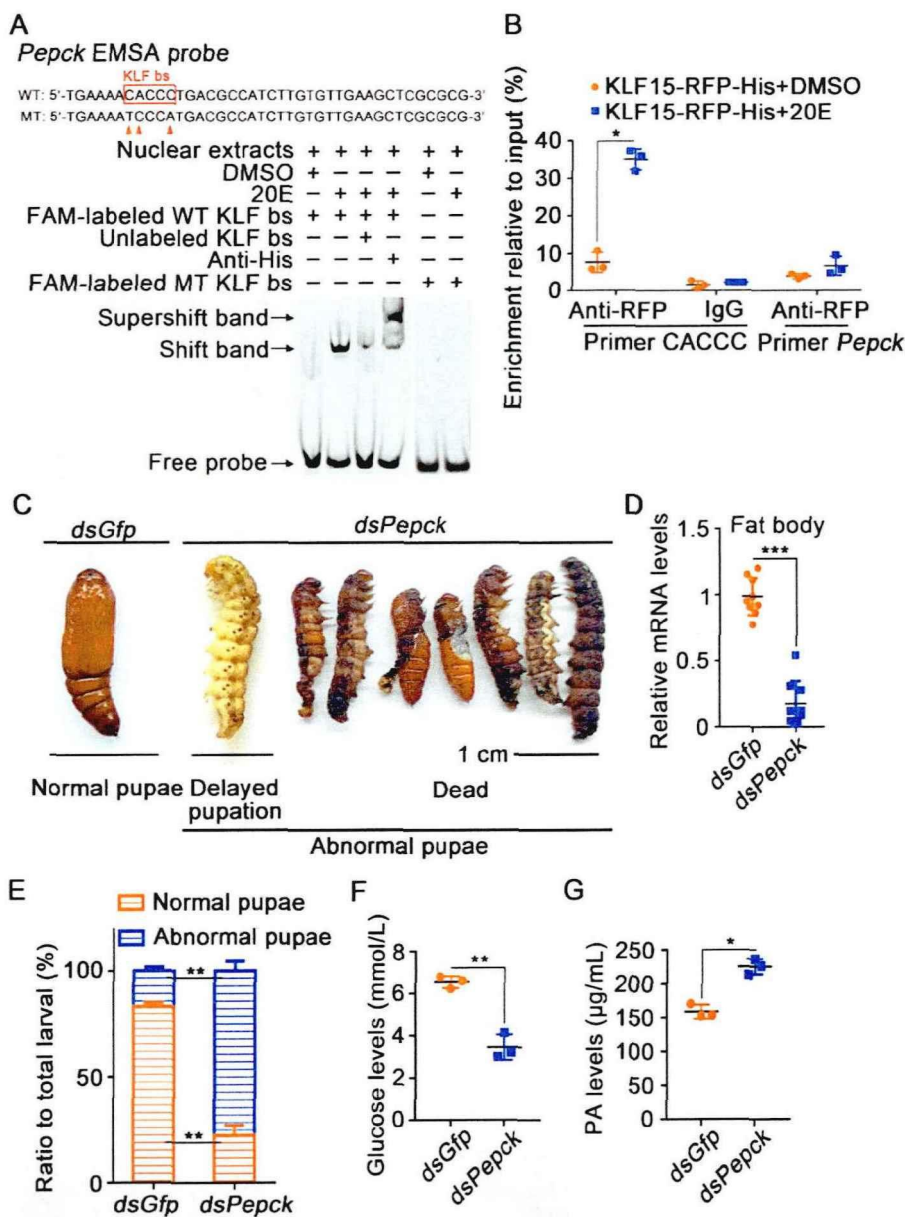


图 2-15 敲降 *Pepck* 之后延迟化蛹和降低葡萄糖水平

Fig. 2-15 Knockdown of *Pepck* delayed pupation and decreased hemolymph glucose levels

**A.** EMSA 证明 *Pepck* 启动子中的 KLF bs 可以与 KLF15 相结合。 **B.** ChIP 实验探究 20E 通过 KLF15 结合 KLF bs 促进 *Pepck* 表达。 **C.** 注射 *dsPepck* 和 *dsGfp* 后的表型；标尺代表 1 cm。 **D.** 通过 qRT-PCR 验证第三次注射 dsRNA 后的干扰效率。 **E.** 表型统计。 **F.** 敲降 *Pepck* 后血淋巴中的葡萄糖水平下降。 **G.** 敲降 *Pepck* 后血淋巴中 PA 水平升高。

**A.** KLF bs on the *Pepck* promoter bound to KLF15 detected by EMSA assay. **B.** ChIP assay showing 20E promoted *Pepck* expression via KLF15 binding to KLF bs. **C.** Phenotypes after injection of *dsPepck* and *dsGfp*; the ruler represents 1 cm. **D.** qRT-PCR validation of the interference efficiency in the fat body after the third dsRNA injection. **E.** Ratio of phenotypes. **F.** Glucose levels in the hemolymph decreased after knockdown *Pepck*. **G.** PA levels in the hemolymph increased after knockdown *Pepck*.

在细胞上转染 pIEx-4-RFP-His 和 pIEx-4-KLF15-RFP-His 并叠加 20E 或者 DMSO 进一步说明 KLF15 的功能，与只过表达 RFP-His 相比，过表达 KLF15-RFP-His 显著促进 *Atg8*、*Casp3* 和糖异生相关基因，*G6p* 和 *Pepck* 转录（图 2-16）。

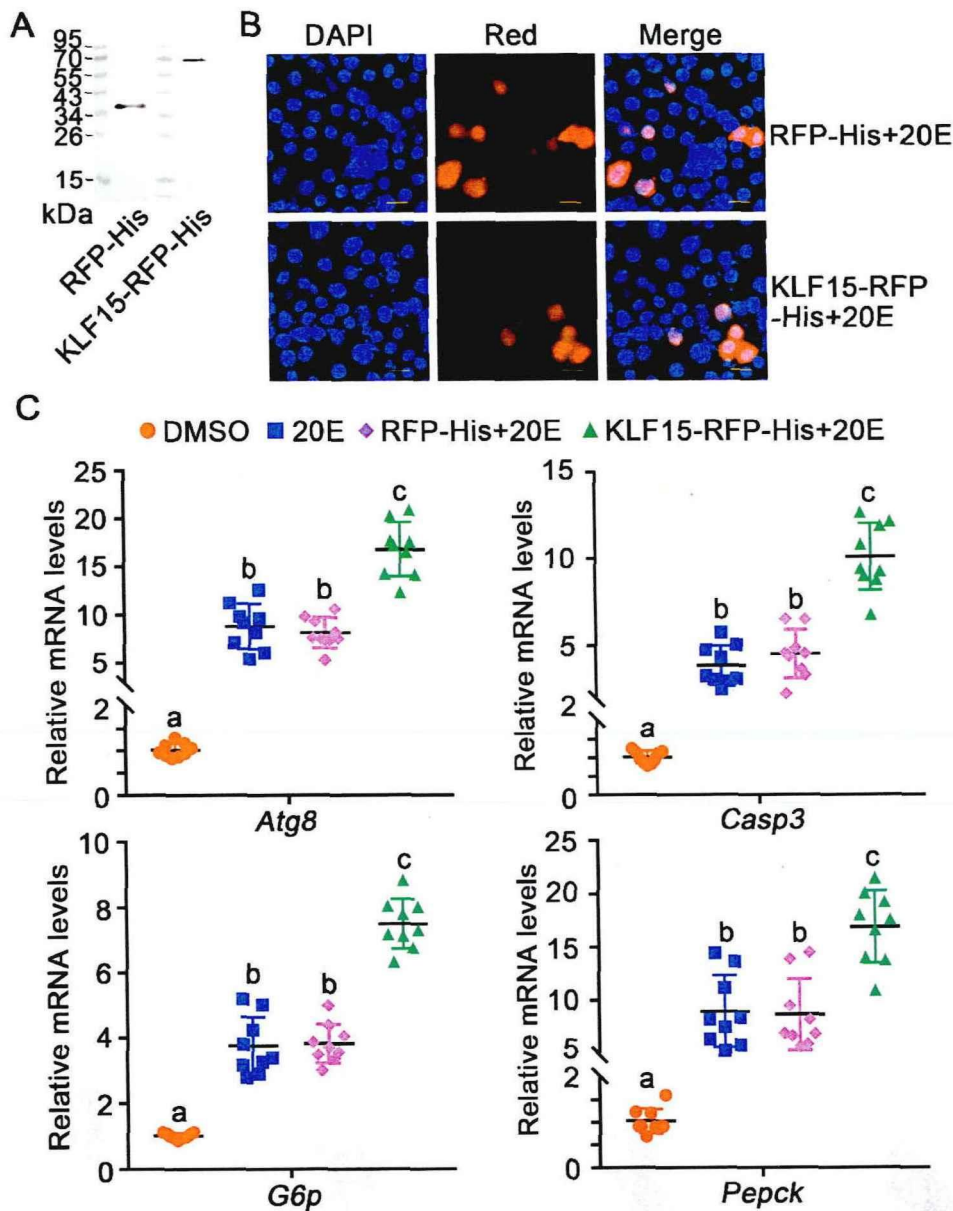


图 2-16 过表达 KLF15 促进自噬、凋亡和糖异生

Fig. 2-16 Overexpression of KLF15 promoted autophagy, apoptosis and gluconeogenesis

A. 使用免疫印迹检测 RFP-His, KLF15-RFP-His 的表达。B. 在 HaEpi 细胞系中转染 RFP-His 和 KLF15-RFP-His 质粒后检测表达效率。C. qRT-PCR 显示 HaEpi 细胞过表达 RFP-His 和 KLF15-RFP-His 后 *Atg8*、*Casp3*、*G6p* 和 *Pepck* 的表达。

A. RFP-His, KLF15-RFP-His detection by western blotting. B. RFP-His and KLF15-RFP-His fluorescent plasmid transfection efficiency detection. C. qRT-PCR showing the expression of *Atg8*, *Casp3*, *G6p* and *Pepck* after overexpression of RFP-His and KLF15-RFP-His in HaEpi cells.

## 4. 讨论

糖代谢稳态的调节机制是一个令人着迷和神秘的问题，近些年来许多研究与此相关，但其中的许多机制依旧不清楚。本研究发现，昆虫蜕皮激素 20E 通过 KLF15 调控糖代谢改变，从取食期的糖酵解转变为变态期的糖异生，并促进脂肪体自噬和凋亡，从而为变态发育中的糖异生提供底物。

### 4.1 20E 重编程糖代谢

激素与糖代谢密切相关。早在临床研究中就发现，胰岛素可以通过促进血液中葡萄糖的摄取、糖酵解消耗和利用葡萄糖、增加细胞对糖原的合成以及储存、加速葡萄糖的有氧氧化以及抑制糖异生来控制血糖水平[132]。在昆虫中，胰岛素样肽（insulin-like peptide, ILPs）通过胰岛素/胰岛素样生长因子（insulin/insulin-like growth factor, IGF）信号传导（IIS）可以发挥相似的功能[133]。在正常取食状态下，胰岛素通过葡萄糖转运体（glucose transporters, GLUTs）促进细胞对葡萄糖的摄取[134]。在人类疾病的临床治疗中，糖皮质激素等类固醇类激素抑制胰岛素的功能从而升高血糖水平。实验室之前的研究发现，20E 通过竞争结合多巴胺的受体从而抑制幼虫取食[7]，20E 抑制变态期胰岛素受体（insulin receptor, InR）的磷酸化从而升高血淋巴葡萄糖的水平[59]。在棉铃虫生长发育过程中，葡萄糖含量在蛹前期达到最高，然后进入蛹中期后快速下降，与变态期的 20E 滴度变化曲线相似[46]。在本文研究中，发现 20E 通过抑制相关基因的表达抑制糖酵解以及糖原、海藻糖的合成，从而阻断血淋巴中葡萄糖的代谢输出，另一方面，20E 促进糖原、海藻糖的分解以及糖异生，从而增加葡萄糖在体内的代谢输入。还发现丙酮酸的含量在幼虫停止取食后快速下降，其原因一方面是通过糖异生生成葡萄糖而被利用，另一方面是因为变态期 20E 滴度升高，从而拮抗胰岛素进而抑制糖酵解[135]。20E 调控糖代谢从取食期的糖酵解转变为变态期的糖异生进而升高血糖满足变态发育的需求。

转录调控是连接细胞内部状态变化和细胞对外界刺激感知和反应的桥梁[136, 137]，转录调控如转录因子、染色质修饰或者转录辅助因子的变化直接改变细胞信号通路，从而满足细胞快速增殖、分化或者死亡的需求[138-140]。在代谢途径中，由不同基因编码的限速酶或者代谢途径的关键酶一般都存在转录调控，它们启动子序列上可能存在多个不同的转录因子结合位点，从而接受不同的转录调控来改变代谢状态。在哺乳动物中，KLF15 与代谢密切相关，主要是在饥饿期高表达促进糖异生[100]。KLF15 还参与多种氨基酸分解酶的表达，如丙氨酸转氨酶 1、脯氨酸脱氢酶和色氨酸 2,3-双加氧酶，从而为进行糖异生提供相应的底物支持[101, 102]。在骨骼肌中，KLF15 诱导乙酰辅酶 A 合成酶在禁食期高表达[105]，促进乙酰辅酶 A 的合成，然后作为前体物质合成脂肪酸。KLF15 作为糖皮质激素受体的直接转录靶点，参与哺乳动物中糖皮质激素调节的生理过

程[141]。然而 KLF15 如何调控糖代谢重编程以及相关机制尚未见报道。本研究表明, KLF15 直接受到 20E 正向调控, 并进一步通过上调相关基因的表达促进糖原和海藻糖降解、脂肪体的自噬和凋亡以及糖异生。20E 通过调控代谢相关基因的转录实现代谢重编程。

#### 4.2 20E 通过 KLF15 促进自噬基因的表达

自噬是真核细胞在缺乏营养时进行能量供应的一种常见机制, 即通过溶酶体途径降解和回收细胞自身受损或者衰老的蛋白、细胞器[142]。自噬与营养状态密切相关, 在细胞缺乏营养时, 细胞启动自噬来维持细胞质中氨基酸池的平衡。目前关于 KLF15 与自噬关系的报道较少, 只在线虫中发现 KLF3 和人的 KLF4 可以促进自噬, 其中, 线虫的 KLF3 促进 *Atg2*、*Atg9* 和 *Atg16* 的表达[112]。在人中发现 KLF15 抑制细胞周期蛋白 D 和 E (*cyclin D* and *E*) 和周期蛋白依赖性激酶 2 (*cyclin-dependent kinase 2*, *Cdk2*) 的表达, 从而阻止肾小球系膜细胞进入 S 期, 抑制细胞增殖[104]。在本文实验中, 在 *Atg8* 的启动子上发现了 KLF bs, 并通过敲降实验、EMSA 和 ChIP 证明 KLF15 可以直接促进 *Atg8* 的转录。与此同时也在多个 *Atgs* (*Atg3*, *Atg4b*, *Atg7*, *Atg12* and *Atg14*) 的启动子序列中发现 KLF bs, 而在敲降 *Klf15* 之后 *Atg4b*, *Atg12*, and *Atg14* 的表达都显著下降。KLF15 还通过上调糖原和海藻糖分解酶、自噬凋亡相关基因、糖异生关键酶的表达参与调控糖代谢。除了 KLF15 之外, 棉铃虫基因组中还存在其他的 KLFs, 它们在不同的组织中表达, 其功能需要后续研究。

#### 4.3 自噬和凋亡为糖异生提供底物

自噬与细胞凋亡密切相关[143, 144]。在小鼠的神经元细胞中, 缺乏营养导致自噬, 继而导致凋亡。自噬抑制剂 3-MA 抑制细胞色素 C 的释放以及 caspase 的活化[145]。在完全变态昆虫的发育过程中, 大部分自噬相关基因都在凋亡相关基因之前表达。变态期高滴度的 20E 增加细胞内钙离子水平, 切割 ATG5, 激活 CASP3 诱导细胞凋亡[59]。20E 通过自噬诱导组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTSD) 的成熟, 并切割 CASP3 诱导凋亡[46]。

脂肪体作为昆虫体内主要的储存器官, 其内主要的细胞器是脂滴, 脂滴的主要成分是 TAG, TAG 的分解产物是游离脂肪酸和甘油[146, 147]。甘油可以直接转化为代谢中间体生成葡萄糖, 游离脂肪酸可以通过  $\beta$ -氧化途径转化成乙酰辅酶 A 后进入三羧酸循环提供能量。在饥饿状态下, 由肝脏自噬产生的生糖氨基酸通过糖异生转化成葡萄糖被认为是非常重要的能量来源[148, 149]。本研究发现在幼虫停止取食后, 自噬促进脂滴的分解, 而在敲降 *Atg8* 之后导致甘油、游离脂肪酸和游离氨基酸的减少, 这表明自噬可以为糖异生提供各种底物。变态期的糖异生促进甘油、游离脂肪酸和游离氨基酸的消耗, 从而直接或者间接的生成葡萄糖, 这也是甘油、游离脂肪酸和游离氨基酸没有在变态期积累的原因。



通过转录调控实验,发现 KLF15 可以直接正向调控 *Atg8* 和 *Pepck* 的表达,因此在敲降 *Klf15* 之后自噬和糖异生均受到抑制。然而在敲降 *Atg8* 之后,代谢产物甘油、游离脂肪酸和游离氨基酸的含量变化与敲降 *Klf15* 之后的含量变化相反,敲降 *Atg8* 之后,甘油、游离脂肪酸和游离氨基酸的含量降低,而敲降 *Klf15* 之后甘油、游离脂肪酸和游离氨基酸的含量增加。这是由于敲降 *Atg8* 之后只是阻断了自噬,从而减少了由于自噬产生的代谢底物,但糖异生途径依然正常进行。而在敲降 *Klf15* 之后,不仅阻断自噬和底物的产生,也通过抑制 *Pepck* 的表达阻断糖异生和底物的利用,在体内代谢网络平衡之后便出现甘油、游离脂肪酸和游离氨基酸积累的现象。

在棉铃虫变态发育过程中, KLF15 主要是在表皮和脂肪体中高表达,运用 RNAi 技术在昆虫中敲降基因产生的作用是全组织系统性的,代谢物在各个组织之间也是协同发挥功能的。但各个组织行使的功能是不同的,脂肪体是昆虫的代谢中心,在取食期可以储存物质,停止取食后或者缺乏营养时便通过消耗储存物质或者自噬和凋亡产生底物;而表皮主要是保护、支持机体和抵御病害的功能,并且除了局部细胞可能发生自噬和凋亡外,表皮并不像中肠和脂肪体一样发生降解[46, 150]。因此 KLF15 主要是在脂肪体中发挥功能,通过整合促进自噬和糖异生维持血淋巴中葡萄糖的稳态。

实验室之前的研究发现变态期高水平的葡萄糖是因为 20E 抑制胰岛素受体的表达和磷酸化,类似于人类的 2 型糖尿病[151],即胰岛素途径受阻,葡萄糖不能正常地被细胞吸收从而导致血糖水平上升。而在本文中发现 20E 调控糖代谢重编程,即从取食期的糖酵解转变为变态期的糖异生从而增加了血淋巴中葡萄糖的水平,而进入蛹期后,葡萄糖水平快速下降,这说明昆虫在化蛹前期储存的高水平葡萄糖可能是支持幼虫化蛹和发育的重要能量。

## 5. 小结

取食期糖酵解转变为变态期的糖异生以适应棉铃虫变态发育的能量需求。20E 通过正向直接调控 KLF15 促进细胞自噬、凋亡和糖异生。脂肪体通过自噬和凋亡产生的代谢产物将作为底物支持糖异生。棉铃虫变态期血淋巴中葡萄糖水平升高是糖酵解受阻、糖原和海藻糖分解加强以及糖异生的结果(图 2-17)。

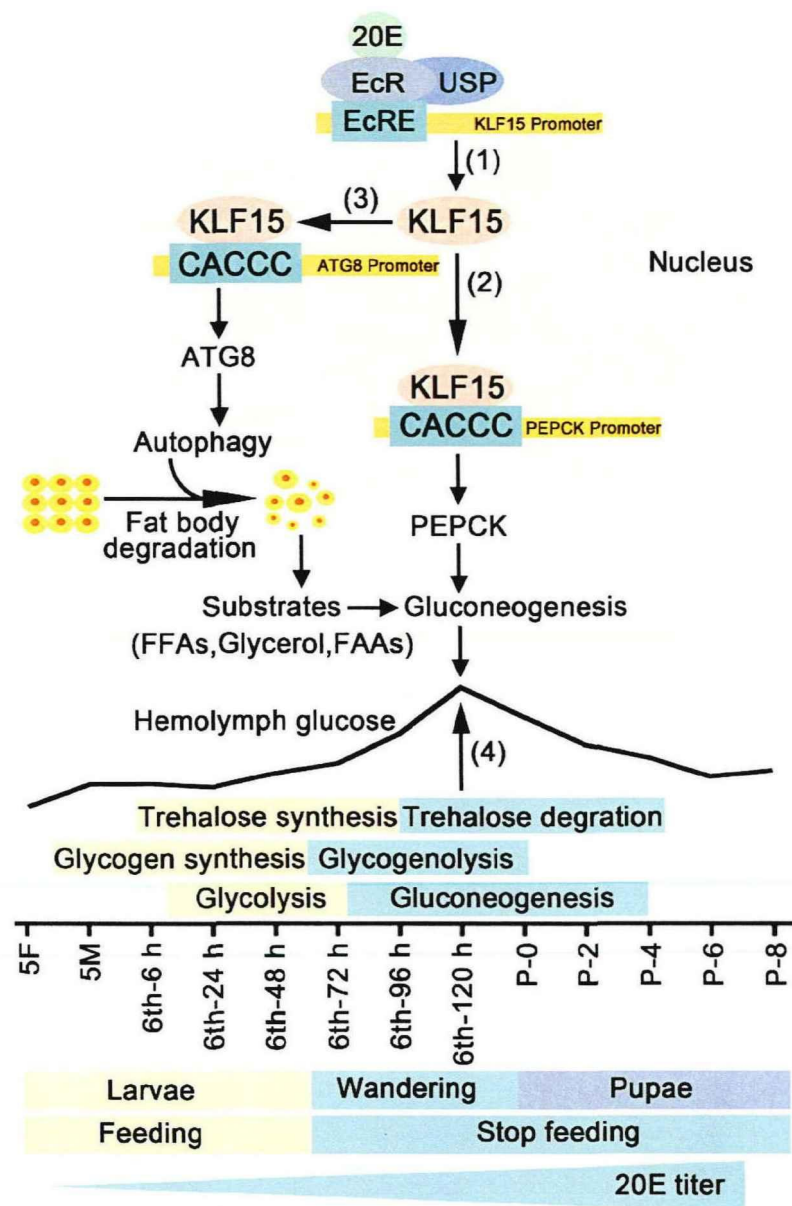


图 2-17 20E 通过 KLF15 重编程糖代谢，调控自噬和凋亡

Fig. 2-17 A diagram illustrating 20E regulates glycometabolism reprogramming, autophagy, and apoptosis via KLF15

20E 通过核受体促进 *Klf15* 的表达 (1)。*Klf15* 通过与 KLF bs 结合，促进糖异生中关键酶 *Pepck* 的转录 (2)。*KLF15* 上调自噬相关基因 *Atg8* 的转录，诱导自噬 (3)，从而为糖异生提供底物。在变态过程中葡萄糖的增加是由于海藻糖和糖原的降解，糖酵解受阻和糖异生的共同作用 (4)。

20E promotes the expression of *Klf15* via nuclear receptors (1). By binding to the KLF bs, *KLF15* promotes the transcription of *Pepck*, a crucial enzyme in gluconeogenesis (2). *KLF15* increases the transcription of *Atg8* to induce autophagy (3), thereby providing substrates for gluconeogenesis. The increase of glucose during metamorphosis is due to trehalose and glycogen degradation, glycolysis inhibition, and gluconeogenesis (4).

### 第三章 蜕皮激素重编程氨基酸代谢支持昆虫的变态发育

#### 1. 引言

氨基酸是直接调节生物体生长发育的重要代谢产物，如精氨酸对于细胞生理至关重要，因为它涉及许多细胞代谢和信号通路[152]。谷氨酸（glutamate, Glu）是合成  $\alpha$ -酮戊二酸（ $\alpha$ -ketoglutarate,  $\alpha$ -KG），氨基酸和  $\gamma$ -氨基丁酸的前体物质[153]，作为一种重要的神经递质，谷氨酸可以控制中枢神经系统的功能如认知、记忆等[154]。 $\alpha$ -酮戊二酸是三羧酸循环（the tricarboxylic acid cycle, TCA cycle）中的关键中间代谢物，是一种营养补充剂，对于产生能量等多种生物过程是必需的[155]。氨基酸水平在体内受到精确调控以维持机体的生长和健康，然而，关于氨基酸在体内代谢的调控机制还不是很清楚。

代谢与组织重塑密切相关，根据不同的代谢需求，组织通过改变细胞的大小和数量从而快速的完成重塑来响应能量状态的改变[156]。组织重塑涉及许多过程，包括细胞增殖、分化、自噬和凋亡[157]。完全变态昆虫从末龄幼虫到蛹再到成虫的过程即为变态，在这个过程中，昆虫必须适应从取食到不取食的营养变化，幼虫组织通过自噬和凋亡降解从而产生维持自身生存所需的能量和营养并支持成虫组织的形成[158, 159]。昆虫脂肪体在功能上类似于脊椎动物的肝脏组织，是参与调节代谢、储存和释放能量的主要组织。脂肪体在变态过程中形态发生显著变化，幼虫脂肪体通过自噬和凋亡降解成单细胞，成虫脂肪体通过细胞增殖形成棒状结构。然而昆虫变态过程中氨基酸代谢和组织重塑的关系尚不清楚。

细胞通过不断地调整其代谢状态和代谢产物来响应营养物质变化，从而满足不同的能量需求[160]。在果蝇中，其变态发育过程中体内的代谢速率会发生变化，呈现“U 型曲线”。在蛹早期代谢速率快速降低，或许是因为幼虫组织的凋亡，而到了蛹后期代谢速率快速上升，这与成虫组织的形成有关[161]。从幼虫到蛹再到成虫的发育过程中昆虫体内的代谢发生显著变化，以满足幼虫停止取食后到羽化前的能量供应[162-164]。在双翅目昆虫南美按实蝇中，碳水化合物、脂类和氨基酸被重新分配[165]。20E 对于变态发育至关重要，竞争多巴胺受体抑制摄食[7]、促进幼虫进入游走期[83, 166]、抑制胰岛素信号通路[59]并促进变态过程中的自噬和凋亡[48, 167]。然而关于 20E 整合调控氨基酸代谢与组织重塑的机制还不完全清楚。

本研究以重大农业害虫棉铃虫为研究模型，通过测定代谢组、分析幼虫取食期、幼虫向蛹的转变期（游走期幼虫）、蛹向成虫的转变期（蛹期）血淋巴中代谢产物的变化，将精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸鉴定为取食期幼虫、游走期幼虫和蛹的标志代谢物，揭示它们在组织重塑中的作用，并阐明 20E 调控氨基酸代谢和组织重塑的分子机制。

## 2. 材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验动物和细胞

同第二章 2.1.1 和 2.1.2

#### 2.1.2 实验试剂

$\alpha$ -酮戊二酸测定试剂盒（江苏酶免实业有限公司，江苏，中国）。谷氨酸测定试剂盒（索莱宝，上海，中国）。精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、谷氨酸（MCE，新泽西州，美国）。磷酸化的组蛋白 H3 多克隆抗体（Ser10）（Cell signaling technology，麻省，美国）。组蛋白 H3 多克隆抗体（安诺伦，北京，中国）。组蛋白提取试剂盒（贝博生物，上海，中国）。ASS 多克隆抗体（博士德，武汉，中国）。ARG 多克隆抗体（赛维尔生物，武汉，中国）。本章其他所用试剂均与第二章 2.1.3 相同。

#### 2.1.3 实验仪器

同第二章 2.1.4

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 与第二章相同的实验方法

实时定量 PCR（qRT-PCR）、免疫印迹、双链 RNA（*dsRNA*）合成、细胞培养、虫体激素刺激、CCK-8 测定细胞活力、凋亡检测、统计方法。

#### 2.2.2 采集血淋巴进行代谢组分析

选取大小、体重相似的、刚蜕皮的六龄幼虫进行计时，在发育 24 h、96 h 后记为 6th-24 h 和 6th-96 h 的幼虫，幼虫化蛹后第六天记为 P6 蛹。将 6th-24 h 和 6th-96 h 的幼虫置于冰上，待其不动后，剪去第一对附肢，用灭过菌的枪尖吸取血淋巴并转移至新的、灭过菌的 1.5 mL 离心管中，立马放到液氮中防止其黑化。对于 P6 样本，取未拆封的 1 mL 注射针，扎入蛹的腹眼下方，轻轻挤压蛹以促进血淋巴流出，吸取血淋巴至 1.5 mL 离心管中并立即转移至液氮。每个样本至少包含 100  $\mu$ L 的血淋巴（至少 5 只虫），每组设 6 个生物学重复，一共 18 个样本。将样品放置干冰中送至中国江苏帕诺米克生物科技有限公司进行样品质量检测、代谢物测定以及生物信息学分析。

#### 2.2.3 测定游离氨基酸

取幼虫血淋巴 500  $\mu$ L 后快速转移至液氮冷冻，然后干冰运输送至青岛科创质量检测有限公司进行游离氨基酸测定。具体步骤如下：取 0.3 g 样品于 10 mL 的容量瓶中，加 8 mL 0.02 mol/L 的盐酸，过 C18 固相萃取柱后分取 100  $\mu$ L 上清液，真空干燥箱烘干；加入 10 mL 0.02 mol/L 的盐酸，晃匀。分取 500  $\mu$ L，依次加入 250  $\mu$ L 0.1 mol/L 异硫氰

酸苯酯乙腈，250  $\mu\text{L}$  1 mol/L 三乙胺乙腈，氮气保护衍生 1 h，过 0.45  $\mu\text{m}$  有机膜上机。将数值除以 1000 即为氨基酸含量。

2.2.4 测定精氨酸

取不同发育阶段幼虫、蛹 20  $\mu\text{L}$  的血淋巴并加入 PTU 和抗凝剂。3000 rpm 离心 10 min 后取上清液与 300  $\mu\text{L}$  20% 的三氯乙酸混合，充分混合后离心取上清液，经过 0.22  $\mu\text{M}$  过滤器过滤后上氨基酸分析仪分析。

2.2.5 测定  $\alpha$ -酮戊二酸

取不同发育阶段幼虫、蛹血淋巴后迅速放置液氮中防止黑化，然后干冰运输至青岛科创质量检测有限公司进行检测。

2.2.6 测定谷氨酸

取不同龄期的幼虫或蛹的血淋巴 20  $\mu\text{L}$ ，加入试剂盒中的提取液于冰上研磨后 12000 rpm 离心 10 min 后取上清液并加入检测试剂后在 340 nm 处测定吸光值。然后根据标准样品的测定值建立标准曲线，将数值除以 1000 即为样品中谷氨酸含量。

2.2.7 注射代谢物

称取不同重量的精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸，用 PBS 配置成不同的浓度。选取大小、体重相似的幼虫（6th-6 h）进行注射，共注射四次，每次间隔 24 h。

2.2.8 检测增殖、自噬和凋亡

组蛋白 H3 的 Ser10 发生磷酸化是进行有丝分裂所特有的，是一种标志增殖的标记物。在注射代谢物后提取组蛋白，通过磷酸化的组蛋白 H3 多克隆抗体（Ser10）进行免疫印迹实验检测细胞增殖。通过免疫印迹实验测定 LC3-I 和 LC3-II 的表达量检测细胞自噬。在细胞系上添加不同浓度的代谢物后，处理 12 h，用 TUNEL 染色和 CASP3 活性检测显示细胞凋亡。

2.2.9 三级结构预测

通过 COACH 软件(<https://zhanggroup.org/COACH/>)分析预测 GDH 和 GDH-like 的三级结构[168, 169]。用 Sybyl-X 软件将 GDH 和 GDH-like 与谷氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸对接，用 PyMOL 软件绘制 GDH 和 GDH-like 的结构以及两种 GDH 与底物结合的结构。

表 3-1 PCR 引物序列

Tab. 3-1 Oligonucleotide sequences of PCR primers

| Primer name          | Sequence (5'-3')    | GenBank accession number |
|----------------------|---------------------|--------------------------|
| <b>qRT-PCR</b>       |                     |                          |
| <i>Gdh</i> -RTF      | ggctccatctacaaccctg | XP_021195200.1           |
| <i>Gdh</i> -RTR      | tcgcacttctcgtaaca   |                          |
| <i>Gdh-like</i> -RTF | gcaaggcggtcggtaaag  | XP_021188737.1           |
| <i>Gdh-like</i> -RTR | tcagcaggtcaggagga   |                          |
| <i>Ass</i> -RTF      | gaaggctttggcgatagg  | XP_021187849.1           |
| <i>Ass</i> -RTR      | ggctccgagttctttgc   |                          |



续表 3-1 PCR 引物序列

Tab. 3-1 Oligonucleotide sequences of PCR primers

| Primer name             | Sequence (5'-3')                            | GenBank accession number |
|-------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|
| <i>Arg</i> -RTF         | tacttaccacgatggactg                         | XP_021181851.1           |
| <i>Arg</i> -RTR         | gcgggcacattgtatttct                         |                          |
| <i>EcR</i> -RTF         | aattgcccgtcagtacga                          | ACD74807.1               |
| <i>EcR</i> -RTR         | tgagcttctcattgagga                          |                          |
| <i>β-Actin</i> -RTF     | cctggattgctgaccgtatgc                       | EU52707                  |
| <i>β-Actin</i> -RTR     | ctgttggaaggtggagagggaa                      |                          |
| <i>E20MO</i> -RTF       | ggaggtgcttctgtggtgt                         | XP_021191112.1           |
| <i>E20MO</i> -RTR       | cgtatctgtcgggtctgct                         |                          |
| <b>RNAi</b>             |                                             |                          |
| <i>EcR</i> -RNAiF       | gcgtaatacgactcactataggcgtggtataacaacggagga  |                          |
| <i>EcR</i> -RNAiR       | gcgtaatacgactcactataggcttgaagttgaccttgatgcc |                          |
| <i>Gfp</i> -RNAiF       | gcgtaatacgactcactatagggtgtcccaattctcgtggaac |                          |
| <i>Gfp</i> -RNAiR       | gcgtaatacgactcactataggcttgaagttgaccttgatgcc |                          |
| <i>Gdh</i> -RNAiF       | gcgtaatacgactcactataggggacctccgctaacccea    |                          |
| <i>Gdh</i> -RNAiR       | gcgtaatacgactcactataggggcccaataaagcccttc    |                          |
| <i>Gdh-like</i> - RNAiF | gcgtaatacgactcactataggcggtaccagcccctgatat   |                          |
| <i>Gdh-like</i> -RNAiR  | gcgtaatacgactcactatagggccttttgttcttcgccat   |                          |
| <i>Ass</i> -RNAiF       | gcgtaatacgactcactatagggtatgaatctggcgtgctt   |                          |
| <i>Ass</i> -RNAiR       | gcgtaatacgactcactatagggttcgggtgtaggttgctt   |                          |
| <i>Arg</i> -RNAiF       | gcgtaatacgactcactatagggaagaaggttggcatcatcg  |                          |
| <i>Arg</i> -RNAiR       | gcgtaatacgactcactataggccatcgtgggtaagtaggg   |                          |
| <i>E20MO</i> -RNAiF     | gcgtaatacgactcactatagggaccatcttcgtgccacct   |                          |
| <i>E20MO</i> -RNAiR     | gcgtaatacgactcactatagggcagcccttctgtccctca   |                          |

3. 实验结果

3.1 代谢组学分析

6th-24 h、6th-96 h 和 P6 这三个发育阶段分别代表幼虫生长期（取食期）、幼虫到蛹过渡时期（停止取食期）和蛹到成虫过渡时期（停止取食期）[170-172]。为了分析幼虫生长期、幼虫向蛹转变期和蛹向成虫转变期体内代谢产物的变化，测定这三个龄期血淋巴中的代谢产物。偏最小二乘判别分析（partial least squares discriminant analysis, PLS-DA）显示，6th-24 h 和 6th-96 h 和 P6 这三组样品之间存在显著差异，各组样品的生物学重复在 plot map 上相对聚集。三组样品一共鉴定出 358 种差异代谢物。三组数据进行两两比较，将满足  $\log_2$ （差异倍数） $> 1$ ， $p$  值 $< 0.05$  的代谢物定义为差异代谢物。发现 6th-24 h 和 P6 相比，有 95 种差异代谢物在 6th-24 h 含量高，140 种差异代谢物在 P6 含量高。6th-24 h 和 6th-96 h 相比，58 种差异代谢物在 6th-24 h 含量高，103 种差异代谢物在 6th-96 h 含量高。而 6th-96 h 和 P6 相比，67 种差异代谢物在 6th-96 h 含量高，90 种差异代谢物在 P6 含量高。在所有的差异代谢物中，种类最多的是氨基酸，其次是脂类和碳水化合物类代谢物（图 3-1）。三组数据进行比较，通过韦恩图发现有 66 种差异

代谢物在 6th-24 h 含量高，46 种差异代谢物在 6th-96 h 含量高，75 种差异代谢在 P6 含量高（图 3-2）。

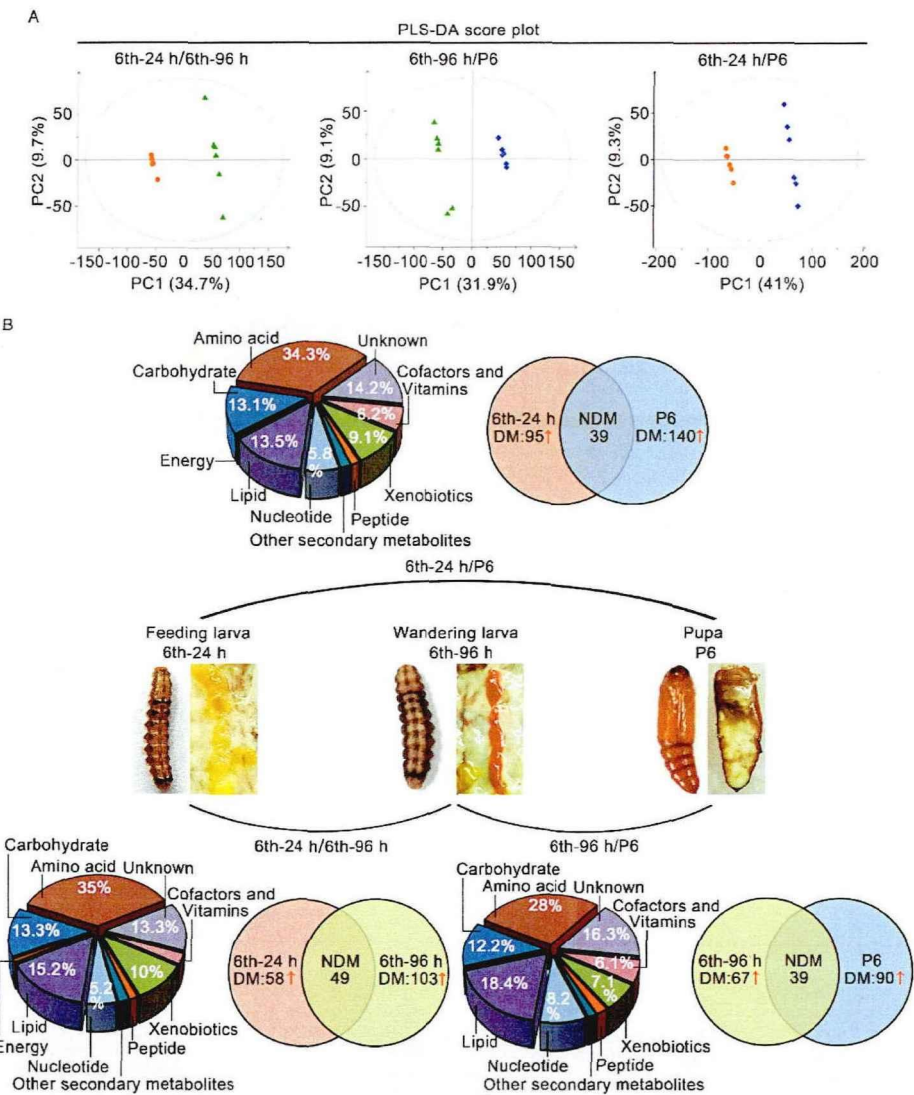


图 3-1 代谢组分析

Fig. 3-1 Overview of metabolome profiles

**A.** 将 6th-24 h、6th-96 h 和 P6 的血淋巴进行 LC-MS 代谢组测定，正离子数据进行 PLS-DA 分析。图中的每一个点表示一个样本，其中橙黄色的点代表 6th-24 h 的幼虫，绿色的点代表 6th-96 h 的幼虫，蓝色的点代表 P6 蛹。PC1: 主成分 1，PC2: 主成分 2。**B.** 将 6th-24 h、6th-96 h 和 P6 进行两两比较，确定代谢物的类型以及代谢物的数量。DM: 差异代谢物，筛选标准为  $\log_2$ （差异倍数）的绝对值大于 1 即为差异代谢物。NDM: 无差异的代谢物。

**A.** PLS-DA analyses of LC-MS for positive ion data from the hemolymph of 6th-24 h larvae, 6th-96 h larvae, and 6-day-old pupae. Points represent differential samples, orange points represent 6th-24 h larvae, green points represent 6th-96 h larvae and blue points represent 6-day-old pupae. PC1: principal component 1; PC2: principal component 2. **B.** Types of metabolites and the number of metabolites screened by pairwise comparison of 6th-24 h larvae, 6th-96 h larvae, and 6-day-old pupae. DM: differential metabolites, NDM: no

differential metabolites. The ratio of the content between the two groups of samples is log2 fold change (log2(FC)) after taking the logarithm base 2 of it, the absolute value of log2(FC) greater than 1 is then used as the screening criterion for differential metabolites (that is, a difference of more than twice is regarded as differential metabolites).

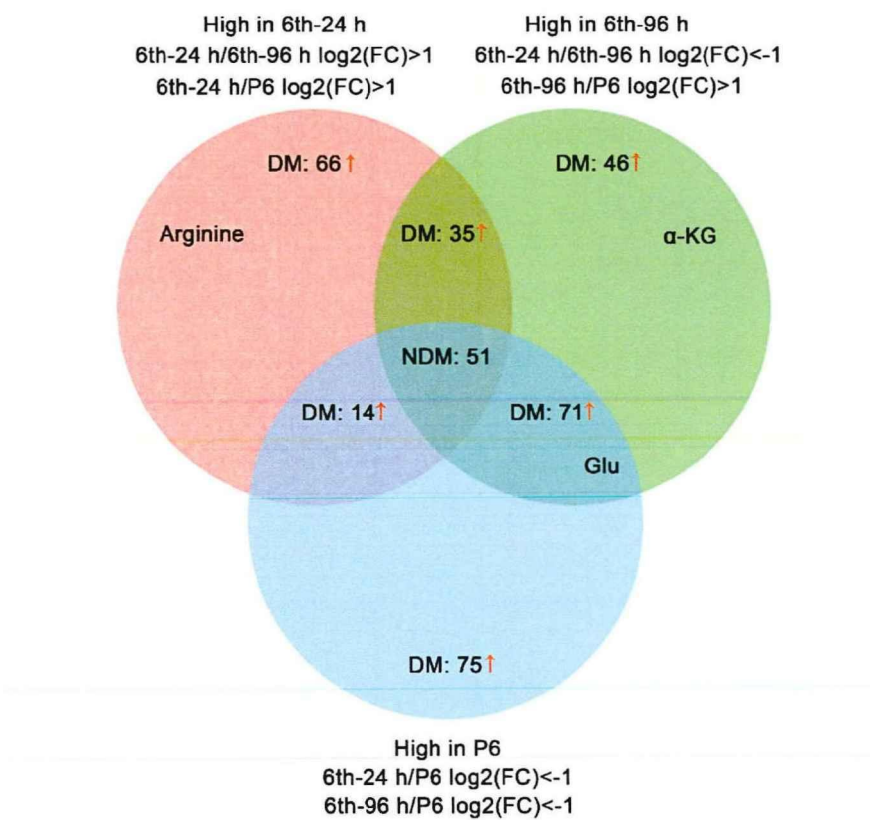


图 3-2 维恩图显示 6th-24 h、6th-96 h 和 P6 代谢物

Fig. 3-2 Venn diagram with the 6th-24 h, 6th-96 h, and P6

代谢物含量两两比较后，通过计算 log2（FC）得到不同龄期高水平代谢物的数量。  
After pairwise comparison of metabolite levels, the number of metabolites with high levels in different instars were obtained by calculating log2(FC).

根据 KEGG（kyoto encyclopedia of genes and genomes）分析[173]，将代谢产物按照糖类、氨基酸类和脂类进行分类以显示幼虫-蛹-成虫发育过程中代谢产物的变化。发现代谢产物在发育阶段发生变化（图 3-3），而且糖类、氨基酸类和脂类通过 TCA 循环进行关联（图 3-4）。

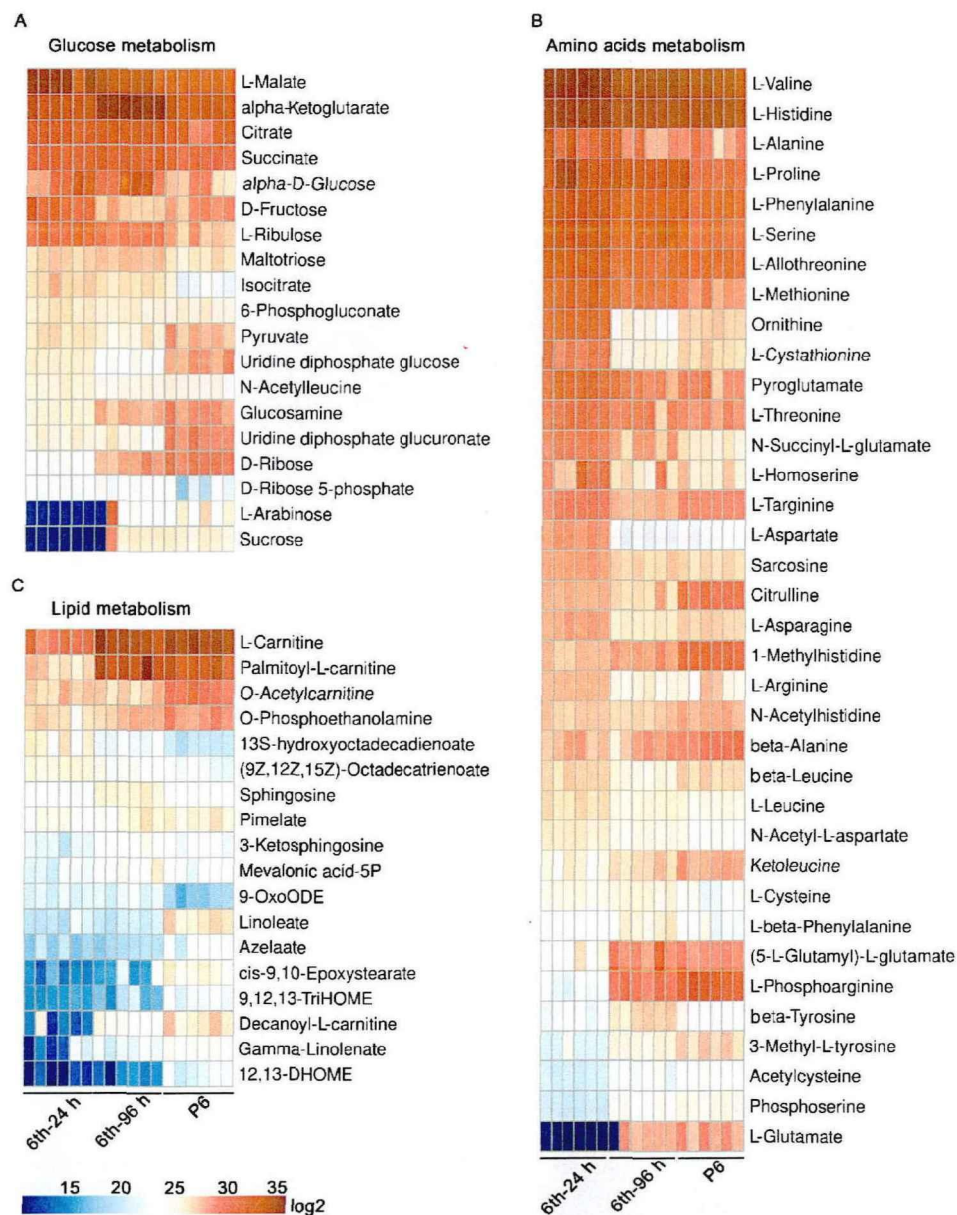


图 3-3 对参与营养代谢相关通路的代谢物进行热图分析

Fig. 3-3 Classification of metabolites related to nutrient metabolism

筛选 KEGG 中涉及葡萄糖、氨基酸和脂类的代谢物，通过 log2 变换其峰面积数据（强度）出示热图。  
The metabolites involved in glucose, amino acids, and lipids in KEGG were screened, and their peak area data (intensity) were mapped by log2 transform.

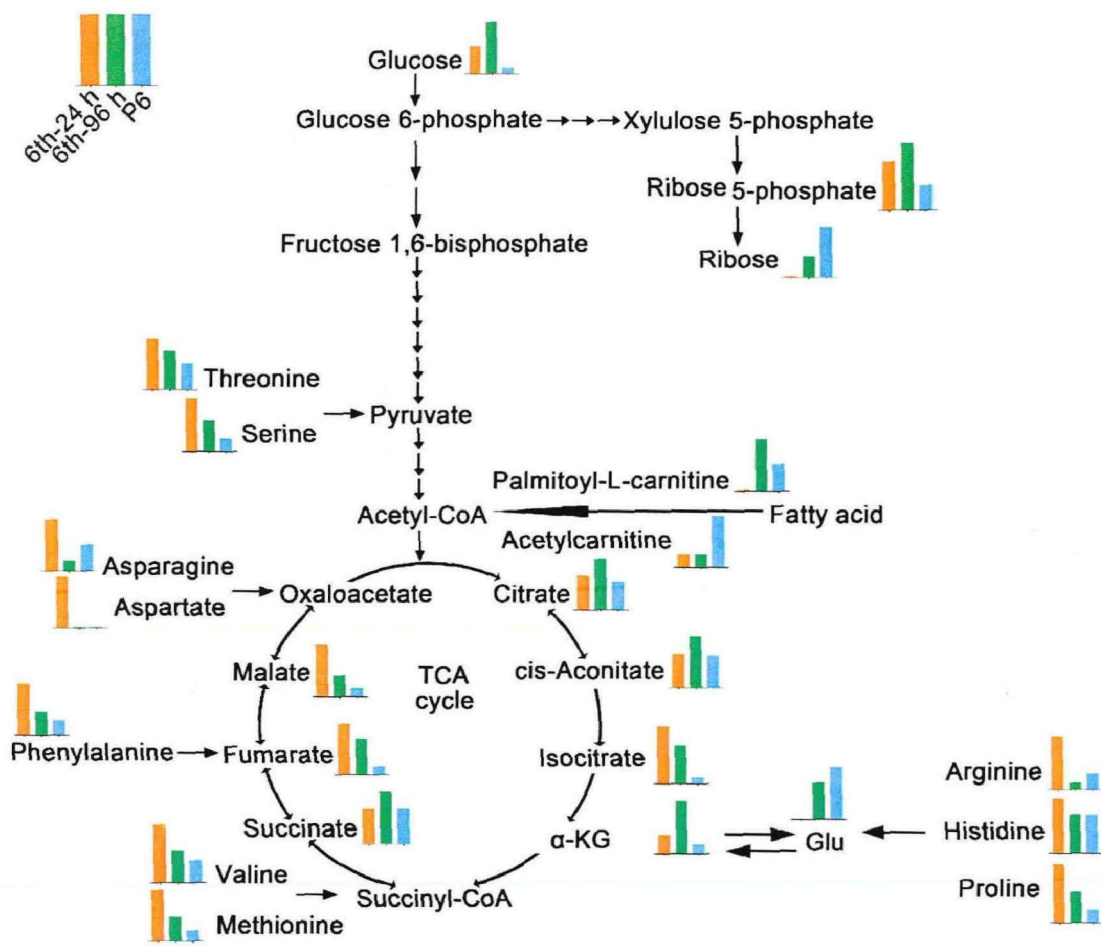


图 3-4 氨基酸、葡萄糖和脂类代谢物联系在一起的营养代谢途径

Fig. 3-4 Nutrient metabolic pathway of differential metabolites involving amino acids, glucose, and lipids

为了鉴定不同龄期的关键代谢产物，对 6th-24 h、6th-96 h 和 P6 这三组样品进行两两比较并用气泡图进行展示，气泡图中气泡的大小和颜色可以表示代谢途径的富集程度和代谢途径中富集的代谢物的数量。气泡图显示，6th-24 h/6th-96 h 和 6th-24 h/P6 所富集的代谢通路是相似的，其中排名前三的是丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，精氨酸合成以及 mTOR 信号通路（图 3-5A 和 B）。6th-96 h/P6 所富集的代谢通路主要是 TCA 循环、泛酸盐和辅酶 A 合成以及半胱氨酸和甲硫氨酸代谢（图 3-5C）。将代谢通路中的差异代谢物进行分析，发现谷氨酸在 6th-96 h 和 P6 含量都较高（丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢；精氨酸合成）；在 mTOR 信号通路中，精氨酸和亮氨酸都是在 6th-24 h 含量较高；在 TCA 循环中，异柠檬酸、延胡索酸和  $\alpha$ -酮戊二酸都是在 6th-96 h 含量较高。在泛酸盐和辅酶 A 合成途径中，磷酸泛酸是在 P6 富集；在半胱氨酸和甲硫氨酸代谢中，L-甲硫氨酸 S-氧化物是在 P6 含量较高（图 3-5D-I）。以上结果说明精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸



和谷氨酸分别在幼虫取食期、游走期和蛹期富集。考虑到精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸在细胞功能中的重要性，选择精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸作为 6th-24 h、6th-96 h 和 P6 的标志代谢物。

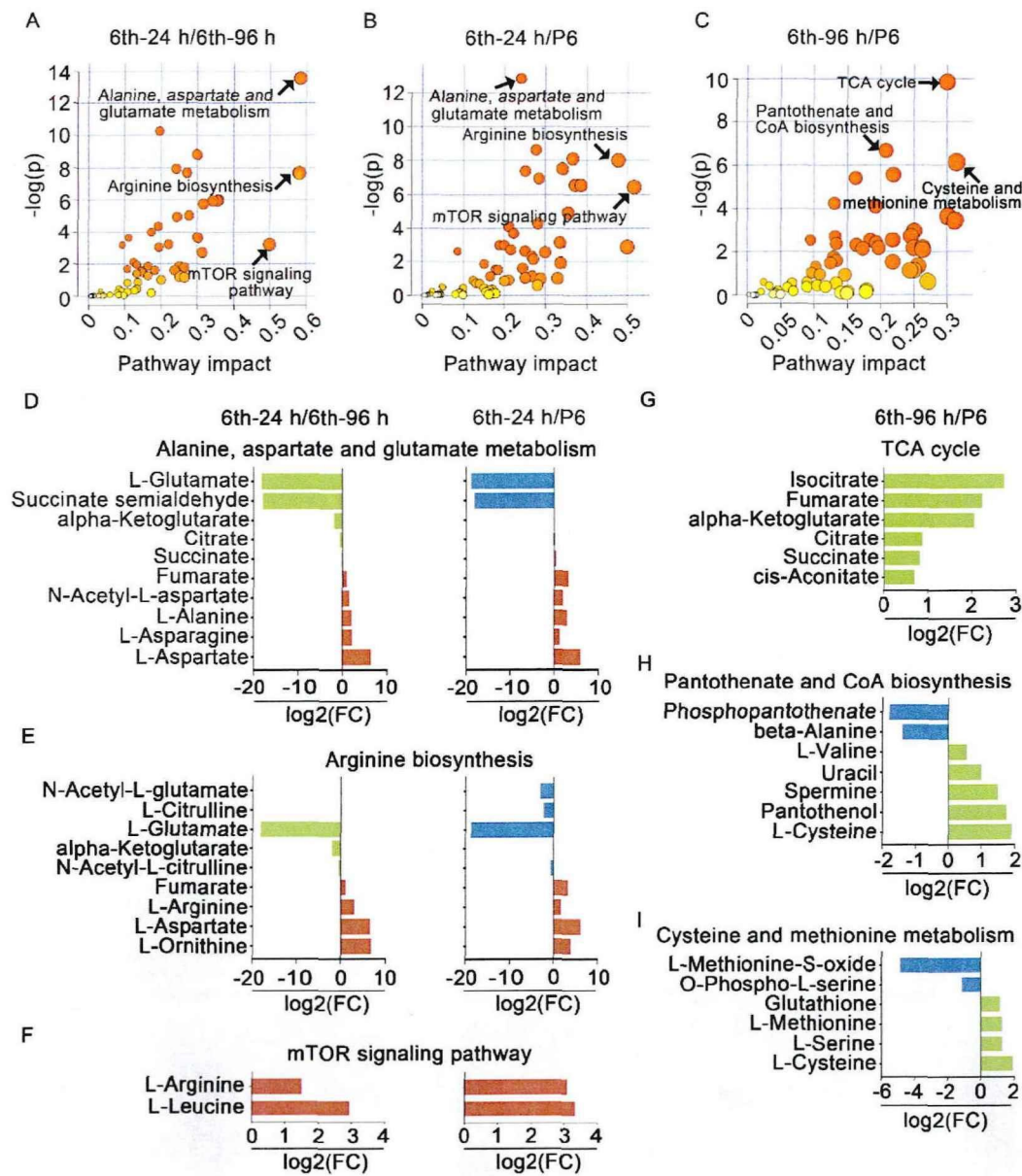


图 3-5 代谢通路分析

Fig. 3-5 Pathway analysis based on the differential metabolites

A-C. 气泡图分析 6th-24 h、6th-96 h 和 P6 两两相比所富集到的代谢通路，计算方法是将每个匹配代谢物的重要性指标相加，然后除以每个途径中所有代谢物的重要性指标之和，通路影响越大就越可能出现在气泡图的右上角。D-I. 筛选重要的代谢通路中的差异代谢物。FC：差异倍数，即样品之间含量差异的倍数。

A-C. Bubble chart of metabolic pathway enrichment. It was calculated by adding the importance measures of each matched metabolites and then dividing them by the sum of the important measures of all metabolites

in each pathway. The greater the pathway impact, the more likely it is to be in the upper right corner. **D-I.** Screened differential metabolites in important metabolic pathways. FC: fold change, multiples of difference in content between samples.

为了验证代谢组学的的数据,测定了精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸从 5F 取食期到 P8 蛹期的水平,发现精氨酸是在取食期含量高,在幼虫停止取食后逐渐下降(图 3-6A); $\alpha$ -酮戊二酸的含量则是在幼虫停止取食的初期(6th-72 h-6th-96 h)最高(图 3-6B);谷氨酸的含量在幼虫停止取食后不断上升并在蛹期(P4)达到峰值(图 3-6C)。这些结果与组学测定结果相一致。为了探究 20E 是否调控代谢产物的变化,将不同浓度的 20E 注射进入 6th-6 h 幼虫的血腔中,发现低浓度的 20E (100 ng/只虫)增加精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸的含量;而高浓度的 20E (500 ng/只虫)降低精氨酸和谷氨酸的水平,但依旧增加  $\alpha$ -酮戊二酸的水平(图 3-6D-F)。以上结果显示 20E 通过浓度依赖的方式调节代谢物的水平。

### 3.2 精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸决定不同的细胞命运

为了探究代谢产物与组织重塑的关系,首先在细胞系上分别添加精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸检测增殖、自噬和凋亡。通过 CCK-8 检测细胞活力,发现添加精氨酸的细胞活力增强,而添加  $\alpha$ -酮戊二酸抑制细胞活力,添加谷氨酸增强细胞活力(图 3-6G-I)。通过蛋白质免疫印迹实验检测组蛋白 H3 的磷酸化,发现精氨酸促进增殖, $\alpha$ -酮戊二酸抑制增殖,谷氨酸促进增殖(图 3-6J-L)。检测 LC3 的表达发现精氨酸抑制自噬, $\alpha$ -酮戊二酸促进自噬,谷氨酸抑制自噬(图 3-6M-O)。通过检测 caspase-3 活性和 TUNEL 染色,发现与阳性结果相比,添加精氨酸和谷氨酸并不引起凋亡,添加高浓度的  $\alpha$ -酮戊二酸后虽然会引起凋亡,但与对照组相比并不能形成显著差异(图 3-7)。

接下来将精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸注射到 6th-6 h 幼虫血腔中,探究它们对虫体的影响。发现与注射 PBS 相比,注射精氨酸后导致幼虫提前 26 h 化蛹,精氨酸促进脂肪体细胞增殖,抑制自噬(图 3-8A-Ei)。注射  $\alpha$ -酮戊二酸后导致化蛹延迟 14 h。 $\alpha$ -酮戊二酸抑制脂肪体细胞增殖,促进脂肪体细胞自噬(图 3-8F-Ji)。注射谷氨酸后出现的虫体表型与注射精氨酸相似,导致幼虫提前化蛹,促进脂肪体细胞增殖,抑制脂肪体细胞自噬(图 3-8K-Oi)。以上结果表明精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸可以通过调节不同的细胞命运来影响组织重塑。

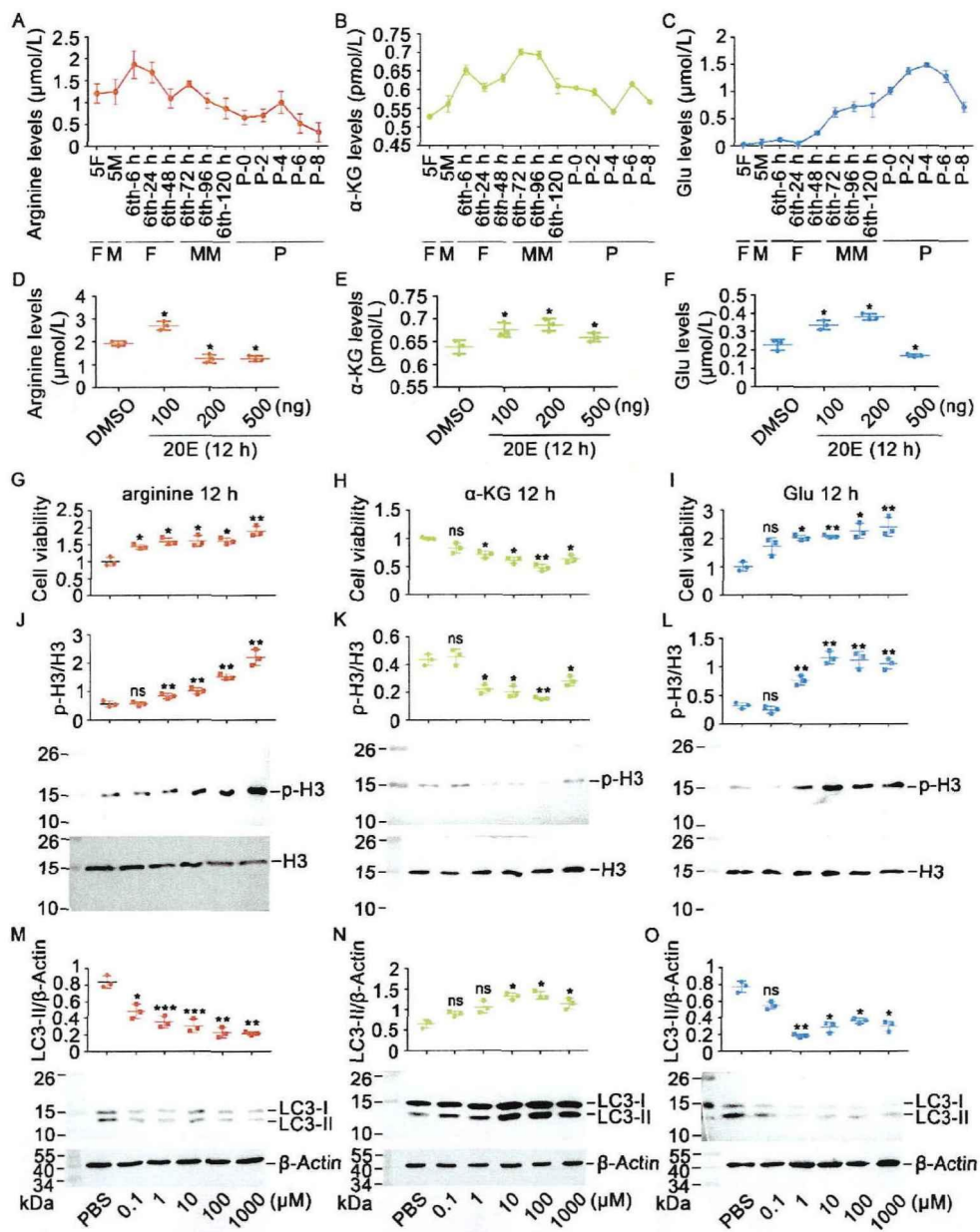


图 3-6 20E 重编程代谢

Fig. 3-6 20E reprogrammed metabolism

**A-C.** 测定全龄期精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸在血淋巴中的含量来验证代谢组学的结果。5F: 五龄取食幼虫; 5M: 五龄蜕皮幼虫; 6th-6 h to 120 h: 不同阶段的六龄幼虫; P0-P8: 0-8 日龄的蛹。F: 取食期; M: 蜕皮期; MM: 蜕皮变态期; P: 蛹期。D-F. 不同浓度的 20E 刺激 12 h 后检测精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸的含量变化, DMSO 为对照。G-I. 在 HaEpi 细胞系中添加精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸后检测细胞活力。J-L. 在 HaEpi 细胞系中添加精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸后检测组蛋白 H3 的磷酸化水平, 15% 的 SDS-PAGE 凝胶, H3 为蛋白对照。M-O. 在 HaEpi 细胞系中添加精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸后检测 LC3 水平。用 Image J 对蛋白条带进行统计量化。

**A-C.** The levels of arginine,  $\alpha$ -KG, and Glu were determined in the hemolymph to compare to the metabolome results. 5F: fifth instar feeding larvae; 5M: fifth instar molting larvae; 6th-6 h to 120 h: sixth instar larvae at different stages; P0 to P8: 0 to 8-day-old pupae. F: feeding; M: molting; MM: metamorphic

molting; P: pupae. **D-F.** The levels of arginine,  $\alpha$ -KG, and Glu were determined in the hemolymph under the stimulation of different concentrations of 20E. DMSO was used as the control. **G-I.** Cell viability was assayed with CCK-8 after adding arginine,  $\alpha$ -KG, and Glu. **J-L.** Detection of p-H3, with H3 as protein control after 15% SDS-PAGE. **M-O.** The protein profiles of LC3 after the addition of arginine,  $\alpha$ -KG, and Glu, with  $\beta$ -Actin as protein control after 15% SDS-PAGE. Quantification of the data in the scatter plot was made using Image J software.

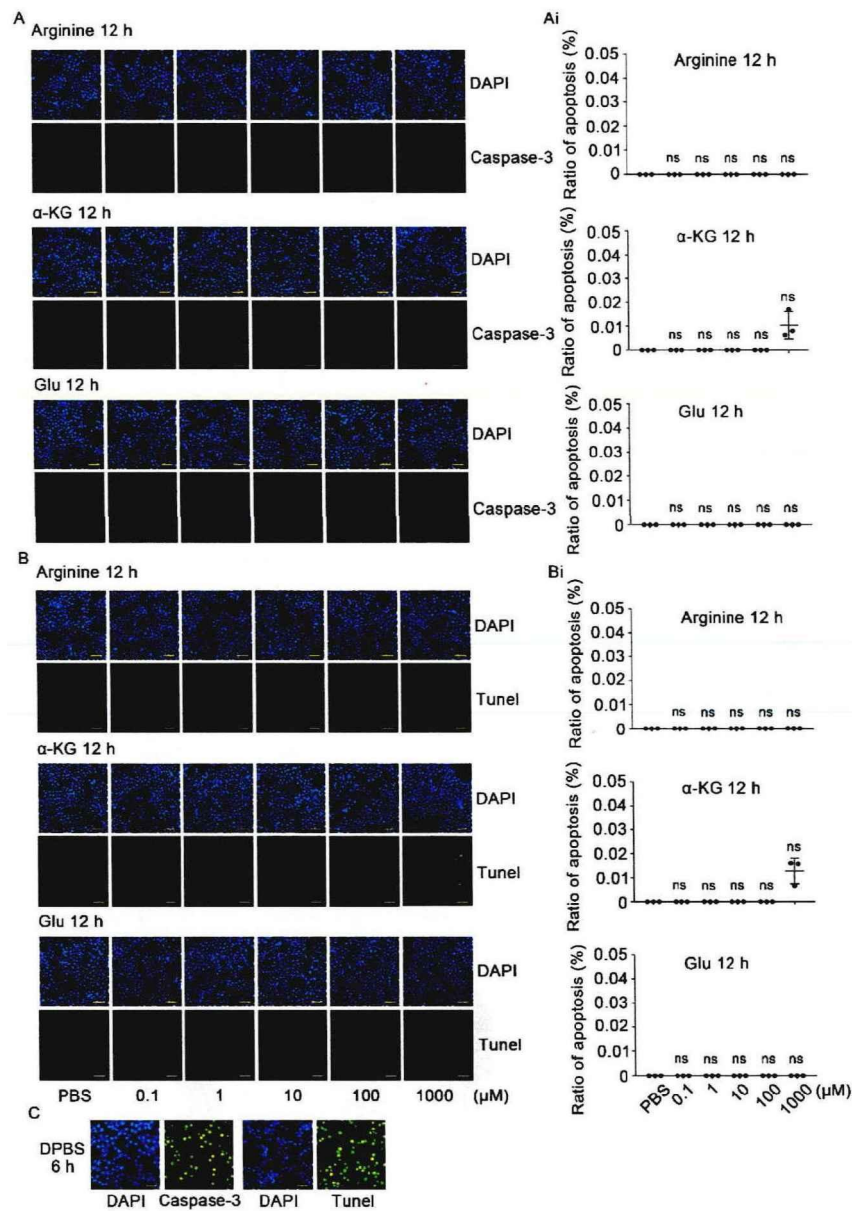


图 3-7 精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸不引起细胞凋亡

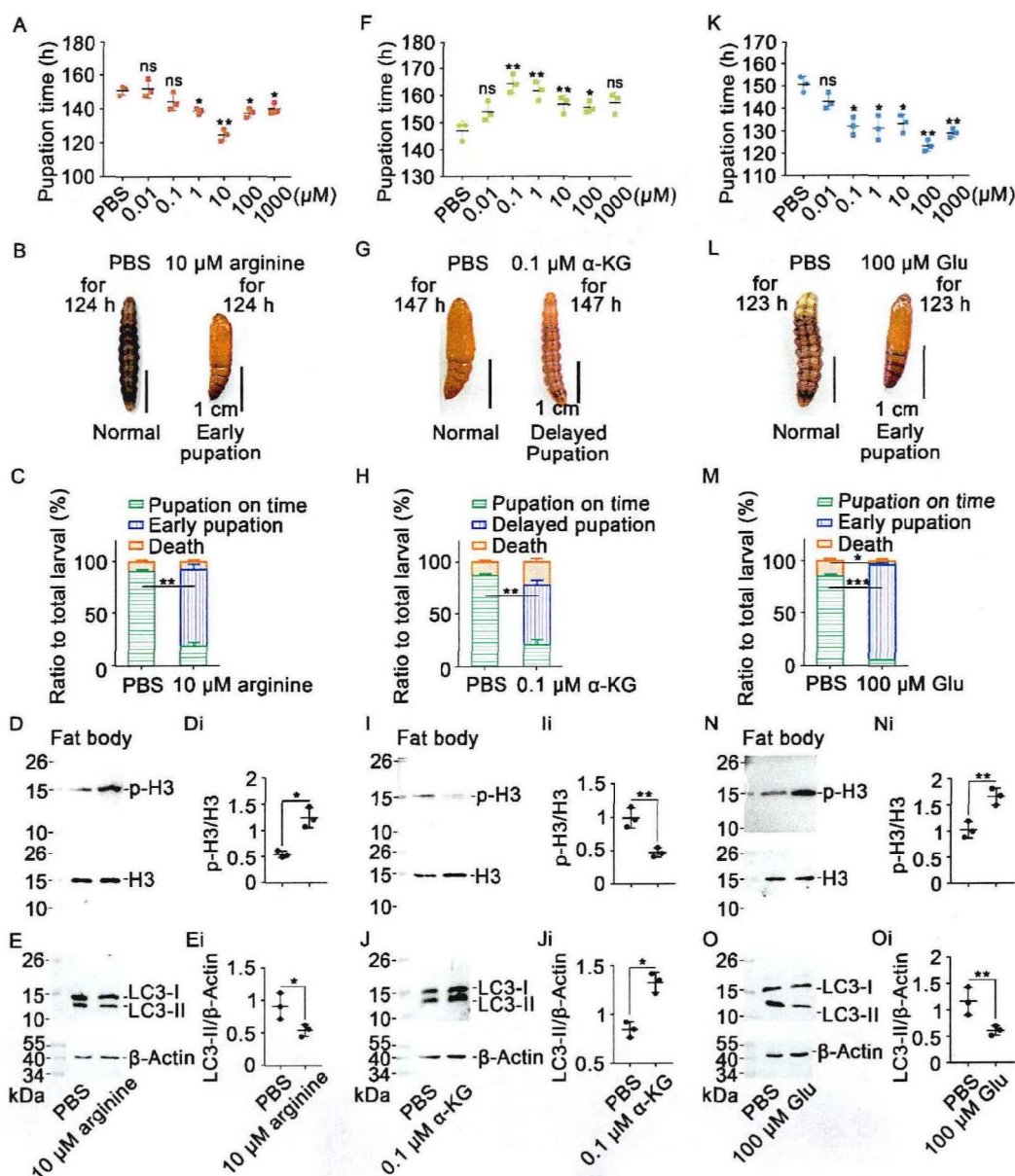
Fig. 3-7 Arginine,  $\alpha$ -KG and Glu did not promote apoptosis

**A.** 添加精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸后加入活性 caspase-3 检测凋亡细胞，标尺为 100  $\mu$ m。 **Ai.** 对 A 的统计。 **B.** 用 TUNEL 染色法检测加入精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸后的凋亡细胞，标尺为 100  $\mu$ m。 **Bi.** 对 B 的统计。 **C.** 作为阳性对照，DPBS 处理细胞 6 h 后引起凋亡。

**A.** Detection of apoptosis cells by the addition of active caspase-3 after addition of arginine,  $\alpha$ -KG and Glu,



**A.** 往 6th-6 h 幼虫血腔中注射 0.01-1000  $\mu\text{M}$  的精氨酸以筛选最佳浓度。**B.** 注射精氨酸后观察虫体表型, 标尺代表 1 cm, PBS 为对照。**C.** 注射 10  $\mu\text{M}$  精氨酸和 PBS 后统计表型。**D 和 E.** 注射 10  $\mu\text{M}$  精氨酸和 PBS 后检测组蛋白 H3 磷酸化和 LC3。**Di 和 Ei.** 对 D 和 E 进行统计。**F.** 往 6th-6 h 幼虫血腔中注射 0.01-1000  $\mu\text{M}$  的  $\alpha$ -酮戊二酸以筛选最佳浓度。**G 和 H.** 注射 0.1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -酮戊二酸和 PBS 后观察虫体表型以及统计表型, 标尺代表 1 cm。**I 和 J.** 注射 0.1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -酮戊二酸和 PBS 后检测组蛋白



**图 3-8 注射精氨酸和谷氨酸促进幼虫提前化蛹和细胞增殖, 注射  $\alpha$ -酮戊二酸延迟化蛹和诱导自噬**  
**Fig. 3-8 Injection of arginine and Glu promoted early pupation and proliferation while injection of  $\alpha$ -KG resulted in delayed pupation and autophagy**

**A.** 往 6th-6 h 幼虫血腔中注射 0.01-1000  $\mu\text{M}$  的精氨酸以筛选最佳浓度。**B.** 注射精氨酸后观察虫体表型, 标尺代表 1 cm, PBS 为对照。**C.** 注射 10  $\mu\text{M}$  精氨酸和 PBS 后统计表型。**D 和 E.** 注射 10  $\mu\text{M}$  精氨酸和 PBS 后检测组蛋白 H3 磷酸化和 LC3。**Di 和 Ei.** 对 D 和 E 进行统计。**F.** 往 6th-6 h 幼虫血腔中注射 0.01-1000  $\mu\text{M}$  的  $\alpha$ -酮戊二酸以筛选最佳浓度。**G 和 H.** 注射 0.1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -酮戊二酸和 PBS 后观察虫体表型以及统计表型, 标尺代表 1 cm。**I 和 J.** 注射 0.1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -酮戊二酸和 PBS 后检测组蛋白



H3 磷酸化和 LC3。Ii 和 Ji. 对 I 和 J 进行统计。K. 往 6th-6 h 幼虫血腔中注射 0.01-1000  $\mu\text{M}$  的谷氨酸以筛选最佳浓度。L 和 M. 注射 100  $\mu\text{M}$  谷氨酸和 PBS 后观察虫体表型以及统计表型。N 和 O. 注射 100  $\mu\text{M}$  谷氨酸和 PBS 后检测组蛋白 H3 磷酸化和 LC3。Ni 和 Oi. 对 N 和 O 进行统计。

A. Optimal concentration was screened by injecting 0.01-1000  $\mu\text{M}$  arginine into 6th-6 h larvae. B. Phenotypes after injection of arginine started at 6th-6 h; the ruler represents 1 cm, PBS was used as the control. C. Ratio of phenotypes after injection of 10  $\mu\text{M}$  arginine and PBS. D and E. After injection of 10  $\mu\text{M}$  arginine and PBS, western blot detected p-H3 and LC3-II. Di and Ei. Quantification of the data in D and E. F. Optimal concentration was screened by injecting 0.01-1000  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -KG. G and H. The phenotypes and ratio of phenotypes after injection of 0.1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -KG and PBS. I and J. Detected p-H3 and LC3-II after injection of 0.1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -KG and PBS. Ii and Ji. Quantification of the data in I and J. K. Optimal concentration was screened by injecting 0.01-1000  $\mu\text{M}$  Glu. L and M. Phenotypes and the ratio of phenotypes after injection of 100  $\mu\text{M}$  Glu and PBS. N and O. Detected p-H3 and LC3-II after injection of 100  $\mu\text{M}$  Glu and PBS. Ni and Oi. Quantification of the data in N and O.

### 3.3 20E 调节精氨酸水平下降

精氨酸除了可以从食物中获得，也可以通过精胺琥珀酸合酶（argininosuccinate synthetase, ASS）进行内源性合成。ASS 是尿素循环中的关键限速酶，催化瓜氨酸和天冬氨酸转化为精胺琥珀酸，用于从头合成精氨酸[174, 175]。而精氨酸酶（arginase, ARG）是分解精氨酸的关键限速酶[176]。通过检测 ASS 和 ARG 的表达，发现 ASS 在幼虫取食期高表达，而 ARG 则是在变态期高表达（图 3-9A-Aii）。HE 染色和免疫组化显示，ASS 定位在 6th-24 h 幼虫中肠中，而 ARG 则定位于 6th-96 h 幼虫中肠中（图 3-9B 和 C），说明取食期高水平的精氨酸是由 ASS 合成的，而在变态期由 ARG 进行分解。为了说明 20E 对精氨酸合成和分解的影响，在 6th-6 h 幼虫血腔中注射不同浓度的 20E 进行不同时间的处理，发现 20E 显著抑制 *Ass* 的表达，促进 *Arg* 的表达（图 3-9D-G）。为了探究 20E 对 *Arg* 调控的机制，分析了 *Arg* 的启动子序列，发现了 5'-GATTTGATTGAAATT-3' 这段保守的 EcRE 序列（图 3-10A），而在敲降 *EcR* 之后，*Arg* 的表达量显著降低（图 3-10B）。蜕皮激素 20-单加氧酶（E20MO）可以将蜕皮素（E）转化为有活性的 20E[177]，敲降 *E20MO* 后，*Arg* 的表达量显著降低（图 3-10C）。这些结果说明 20E 抑制 *Ass* 的表达，并通过其核受体 EcR 促进精氨酸酶的表达从而促进精氨酸的分解。

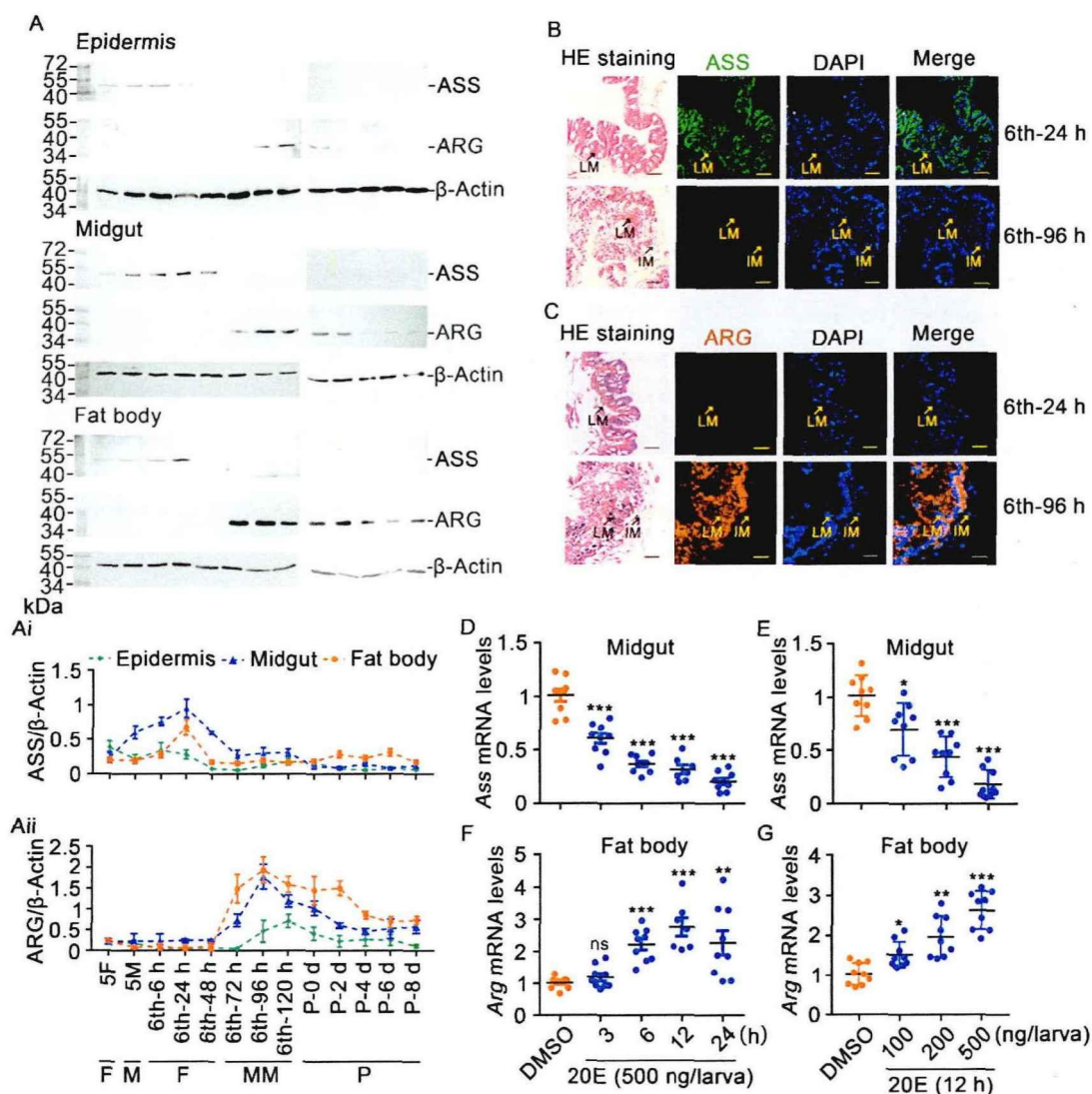


图 3-9 20E 抑制 *Ass* 的表达, 促进 *Arg* 的表达

**Fig. 3-9 20E inhibited the expression of *Ass* while increasing the expression of *Arg***

**A.** 配制 12.5% 的蛋白胶检测 *ASS* 和 *ARG* 在表皮、中肠和脂肪体中的表达。**Ai** 和 **Aii** 对 **A** 的定量统计。**B** 和 **C.** HE 染色和免疫组化显示 *ASS* 和 *ARG* 在 6th-24 h 和 6th-96 h 的定位。LM: 幼虫中肠; IM: 成虫中肠。标尺为 200  $\mu$ m。**D.** 不同时间的刺激下, 20E (500 ng/只虫) 诱导下中肠中 *Ass* 的表达变化。**E.** 不同浓度的 20E 刺激下中肠中 *Ass* 的表达变化, DMSO 为对照。**F.** 不同时间的处理下, 20E (500 ng/只虫) 诱导下 *Arg* 的变化。**G.** 不同浓度的 20E 刺激下脂肪体中 *Arg* 的表达变化。

**A.** The protein profiles of *ASS* and *ARG* in the epidermis, midgut, and fat body detected by western blot after 12.5% SDS-PAGE. **Ai.** Quantification of *ASS* in **A**. **Aii.** Quantification of *ARG* in **A**. **B and C.** HE staining and immunohistochemistry showing *ASS* and *ARG* location in the midgut of 6th-24 h and 6th-96 h. LM, larval midgut; IM, imaginal midgut, the ruler represents 200  $\mu$ m. **D.** *Ass* expression in the midgut after induction with 20E (500 ng/larva) under different time stimulations. **E.** *Ass* expression in the midgut under the stimulation of different concentrations of 20E. DMSO was used as the control. **F.** *Arg* expression in the fat body after induction with 20E (500 ng/larva) under different time stimulations. **G.** *Arg* expression in the

fat body under the stimulation of different concentrations of 20E.

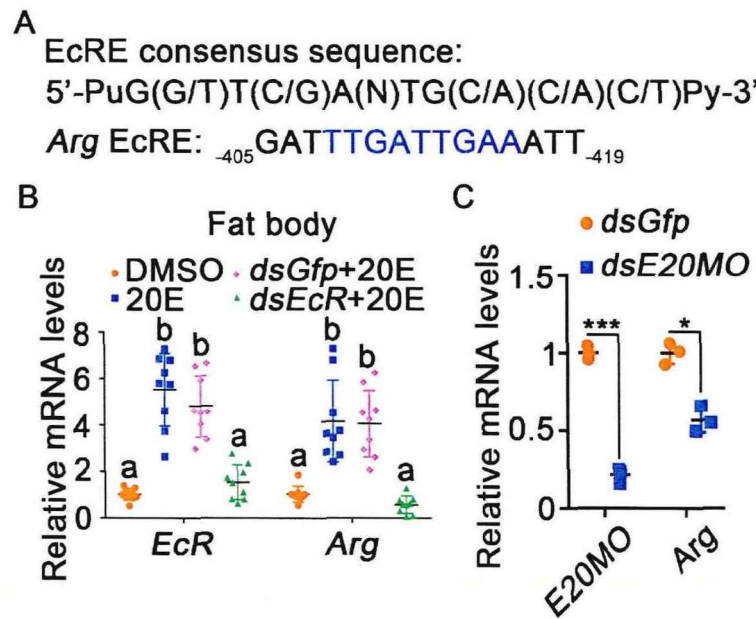


图 3-10 20E 通过 EcR 促进 Arg 的转录

Fig. 3-10 20E promotes Arg transcription through EcR

**A.** 利用 JASPAR 转录因子数据库预测 Arg 启动子上的 EcRE 位点。**B.** 敲降 EcR 后，检测脂肪体中 EcR 和 Arg 的表达水平。**C.** 敲降 E20MO 后，检测脂肪体中 E20MO 和 Arg 的表达水平。  
**A.** The EcRE site on the Arg promoter was predicted using the JASPAR transcription factor database. **B.** The expression levels of EcR and Arg were detected in the fat body after EcR knockdown. **C.** The expression levels of E20MO and Arg were detected in the fat body after E20MO knockdown.

为了探究 ASS 和 ARG 在控制精氨酸水平和虫体发育中的功能，分别在 5th-20 h 和 6th-6 h 幼虫血腔中注射 dsAss 和 dsArg 敲降 Ass 和 Arg 的表达。发现在确定敲降 Ass 之后，57.8%的幼虫在取食阶段死亡，剩余幼虫出现延迟化蛹的表型，25.6%的幼虫化蛹延迟，平均化蛹时间相比较于对照组延迟了 18 h（图 3-11A-D）。注射 dsGfp 的对照组中，中肠变成红色，这是幼虫中肠降解的标志[117]，但是注射 dsAss 之后中肠并没有变红（图 3-11E），dsGfp 组的幼虫中肠和成虫中肠发生分离，脂肪体也发生降解，而 dsAss 组的 HE 染色显示中肠、脂肪体的解离都受到抑制（图 3-11F）。在注射 dsAss 之后精氨酸水平下降（图 3-11G），组蛋白 H3 的磷酸化水平降低，自噬增强（图 3-11H），这说明，ASS 对于合成精氨酸是十分重要的，而精氨酸是细胞增殖、幼虫生长和生存所必需的。

在 6th-6 h 幼虫中敲降 Arg 之后，34.5%的幼虫在游走期和蛹期死亡，38.9%的幼虫延迟化蛹约 20 h（图 3-11I-L），中肠不再变红（图 3-11M），敲降 Arg 之后中肠和脂肪体的降解均受到抑制（图 3-11N），精氨酸积累（图 3-11O），增殖和自噬水平下降（图 3-11P），以上结果说明 ARG 通过分解精氨酸而降低精氨酸的水平，精氨酸可以抵抗自噬

的发生，但到了游走期和蛹期，由于发育过程中体内的复杂变化，精氨酸不能再促进细胞增殖。

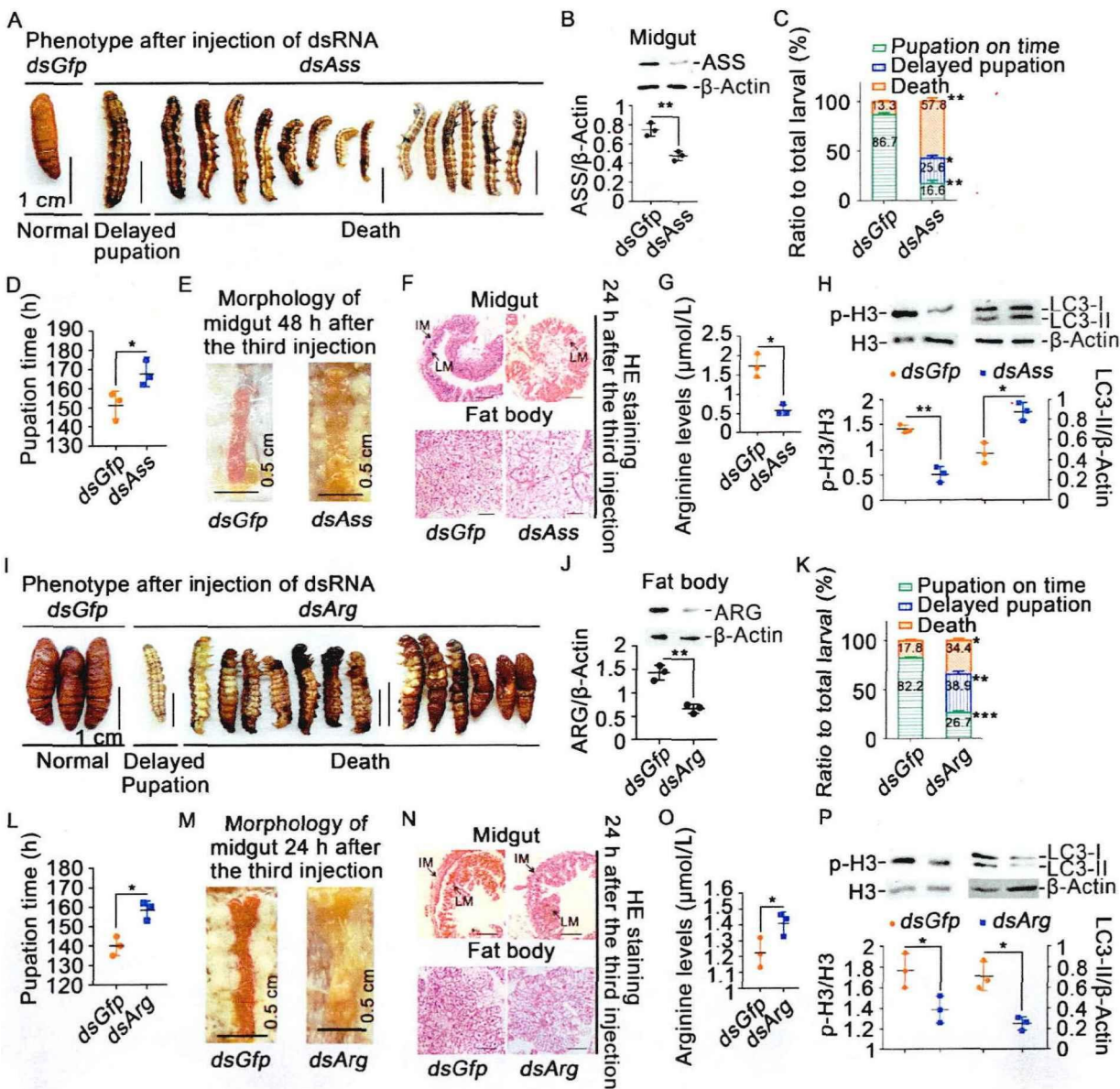


图 3-11 敲降 *Ass* 后导致幼虫死亡、抑制细胞增殖，而敲降 *Arg* 后导致化蛹失败、抑制自噬

**Fig. 3-11 Knockdown of *Ass* resulted in larval death and inhibited proliferation, while knockdown of *Arg* resulted in pupation failure and inhibiting autophagy**

**A.** 注射 *dsGfp* 和 *dsAss* 后统计表型，标尺表示 1 cm。**B.** 注射 *dsGfp* 和 *dsAss* 第二针后检测干扰效率。**C.** 统计干扰表型，每次干扰用虫 30 只，设三次重复。**D.** 敲降 *Gfp* 和 *Ass* 后统计化蛹时间。**E.** 敲降 *Gfp* 和 *Ass* 后的中肠形态。**F.** HE 染色观察中肠和脂肪体的形态变化，中肠图中标尺为 200 μm，脂肪体图中标尺为 100 μm。**G.** 敲降 *Gfp* 和 *Ass* 后测定精氨酸含量。**H.** 敲降 *Gfp* 和 *Ass* 后检测组蛋白 H3 的磷酸化水平和 LC-II。**I.** 注射 *dsGfp* 和 *dsArg* 后统计表型，标尺表示 1 cm。**J.** 注射 *dsGfp* 和 *dsArg* 第三针后检测干扰效率。**K.** 表型统计。**L.** 敲降 *Gfp* 和 *Arg* 之后统计化蛹时间。**M.** 敲降 *Gfp*



和 *Arg* 后观察中肠形态。**N.** 敲降 *Gfp* 和 *Arg* 之后通过 HE 染色观察中肠和脂肪体的形态变化。**O.** 敲降 *Gfp* 和 *Arg* 后测定精氨酸含量。**P.** 敲降 *Gfp* 和 *Arg* 后用蛋白印迹实验检测组蛋白 H3 的磷酸化水平和 LC3-II。

**A.** Phenotypes after injection of *dsGfp* and *dsAss*: the ruler represents 1 cm. **B.** Western blot validation of interference efficiency after the second *dsGfp* and *dsAss* injection. **C.** Based on three repeats, a statistical analysis of the phenotype in A was performed. Each repetition required 30 larvae. **D.** Pupation time after knockdown of *Gfp* and *Ass*. **E.** Morphology of the midgut after *Gfp* and *Ass* knockdown. Bar, 0.5 cm. **F.** HE staining was used to evaluate the morphological changes of the midgut and fat body. The bars in the midgut represented 200  $\mu\text{m}$  and the bars in the fat body represented 100  $\mu\text{m}$ . **G.** Arginine levels was determined after *Ass* knockdown. **H.** Western blot detected p-H3 and LC3-II after *dsGfp* and *dsAss* knockdown. **I.** Phenotypes after injection of *dsGfp* and *dsArg* from 6th-6 h larva to 72 h; the ruler represents 1 cm. **J.** Western blot validation of the interference efficiency after the third dsRNA injection. **K.** The phenotypes ratio after *Arg* knockdown. **L.** Pupation time after knockdown of *Gfp* and *Arg*. **M.** Morphology of the midgut. **N.** HE staining was used to evaluate the morphological changes of the midgut and fat body after *Gfp* and *Arg* knockdown. **O.** Arginine levels were determined after *Arg* knockdown. **P.** Western blot detected p-H3 and LC3-II after *dsGfp* and *dsArg* knockdown.

### 3.4 20E 通过 GDH 和 GDH-like 调控 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸相互转换

GDH 催化谷氨酸经过氧化脱氨可逆转化为  $\alpha$ -酮戊二酸[178]。在棉铃虫基因组中发现两个 GDH，分别命名为 GDH 和 GDH-like，这两个 GDH 的蛋白序列有 51.8% 的相似性，并与其他物种相比都具有相同的 ELFV 脱氢结构域（图 3-12）。系统树分析显示，GDH 与家蚕以及其他无脊椎动物的 GDH 聚为一支，而 GDH-like 则与文昌鱼以及其他脊椎动物的 GDH 聚为一支（图 3-13A）。通过进化树和氨基酸序列比对发现棉铃虫的 GDH 与人的 GDH 更为相似（图 3-13B 和图 3-14）。三维结构比对发现 GDH 和 GDH-like 的结构出现一些差异，主要 N 端不同，配体结合口袋是相似的，通过 COACH 预测发现 GDH 和 GDH-like 均具有结合谷氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸的能力（图 3-15）。通过表达模式，发现 *Gdh* 主要是在取食期和游走期（6th-6 h-6th-96 h）的中肠中高表达（图 3-16A），敲降 *Gdh* 之后导致 50% 的幼虫延迟化蛹约 24 h（图 3-16B-E），并且降低  $\alpha$ -酮戊二酸的含量，升高谷氨酸的含量（图 3-16F）。以上数据表明表明游走期高水平的  $\alpha$ -酮戊二酸是由在取食期和游走期中肠中高表达的 GDH 催化谷氨酸转化而来的，这对于幼虫生长和化蛹而言是至关重要的。而 *Gdh-like* 主要是在蛹期的脂肪体中高表达（图 3-16G），敲降 *Gdh-like* 导致延迟化蛹和化蛹失败，延迟化蛹时间约 12 h（图 3-16H-K）。敲降 *Gdh-like* 增加  $\alpha$ -酮戊二酸的含量，降低谷氨酸的含量（图 3-16L），这说明蛹期脂肪体中高表达的 GDH-like 促进  $\alpha$ -酮戊二酸转变为谷氨酸。

为研究 20E 对 *Gdh* 和 *Gdh-like* 表达的影响，我们往 6th-6 h 幼虫中注射 20E 后检测中肠中 *Gdh* 和脂肪体中 *Gdh-like* 的表达。100 ng 的 20E 会促进 *Gdh* 的表达，而高浓度



的 20E 抑制 *Gdh* 的表达(图 3-17A 和 B)，20E 以时间和剂量依赖的方式促进 *Gdh-like* 的表达(图 3-17C 和 D)，说明 20E 以浓度依赖的方式调节 *Gdh* 和 *Gdh-like* 的表达。



图 3-12 从高等到低等物种中 GDH 结构域分析

Fig. 3-12 GDH domain alignment from higher to lower species

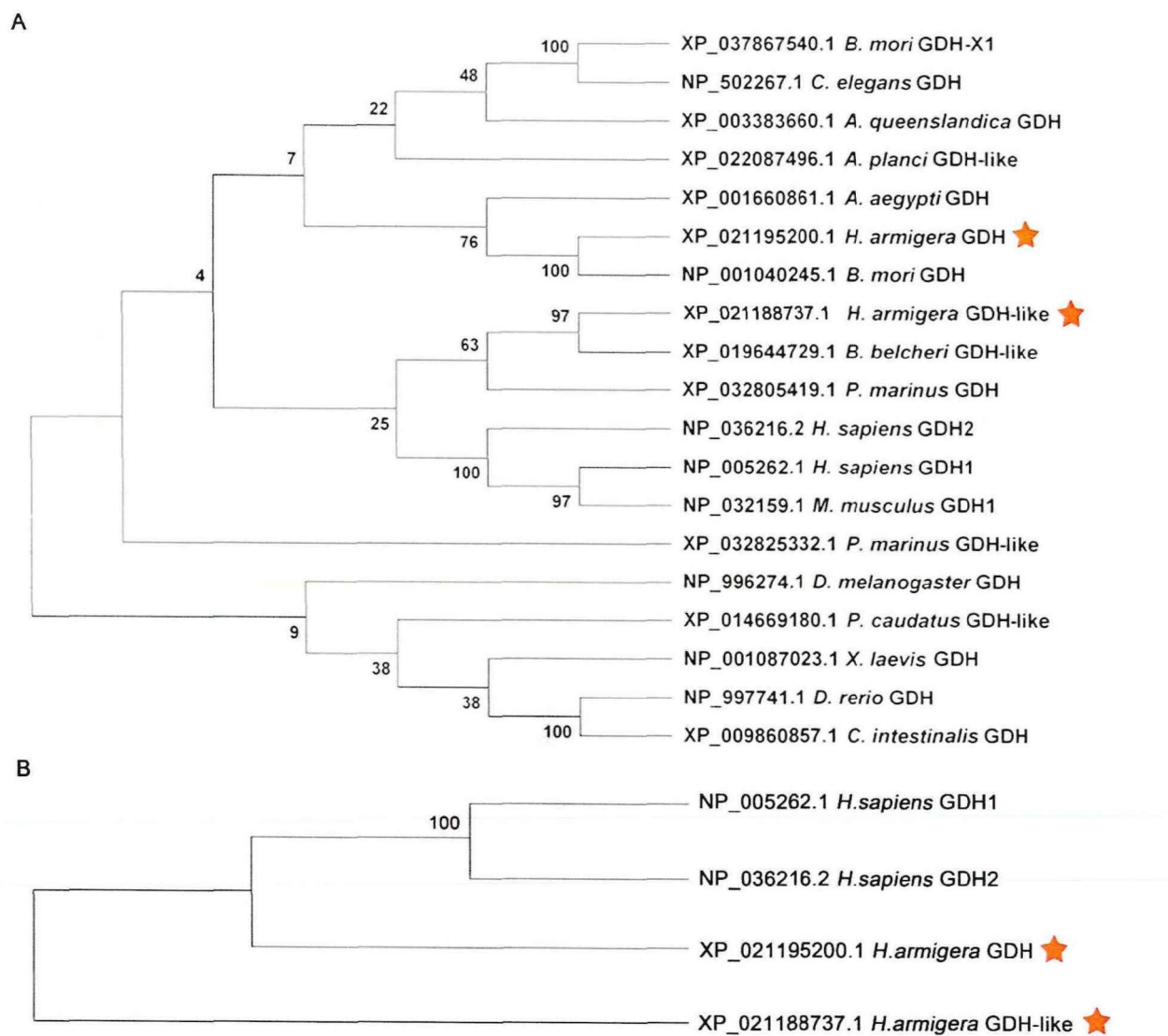


图 3-13 对不同物种的 GDH 构建进化树分析

Fig. 3-13 Phylogenetic tree analysis of GDH from different species

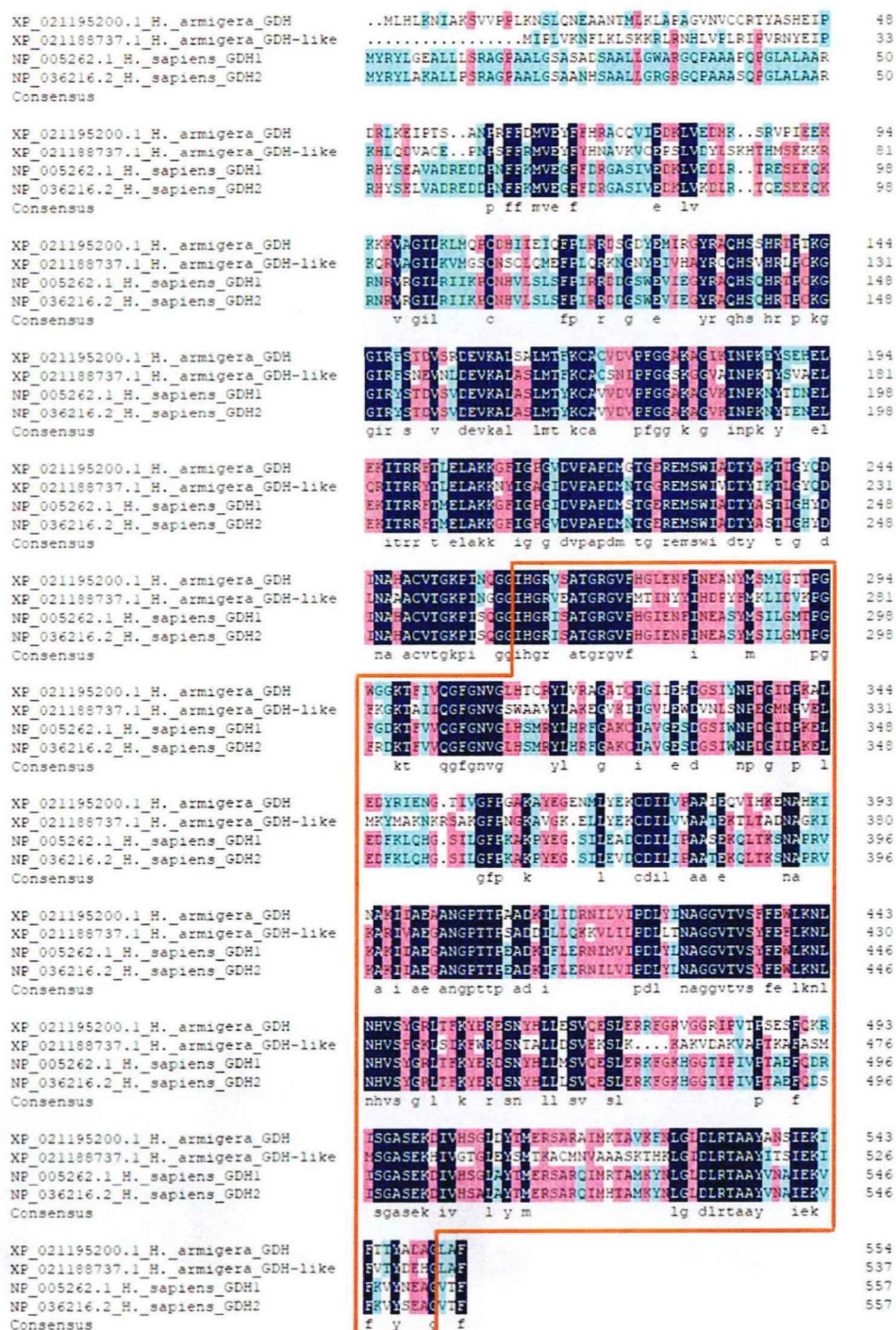


图 3-14 将人和棉铃虫中的 GDH 进行序列比对，红框为结构域

Fig. 3-14 Sequence alignment of the GDH of *H. armigera* and *Homo sapiens*, and the sequence marked by the red box is the domain region



Overlap of GDH (green) and GDH-like (purple)

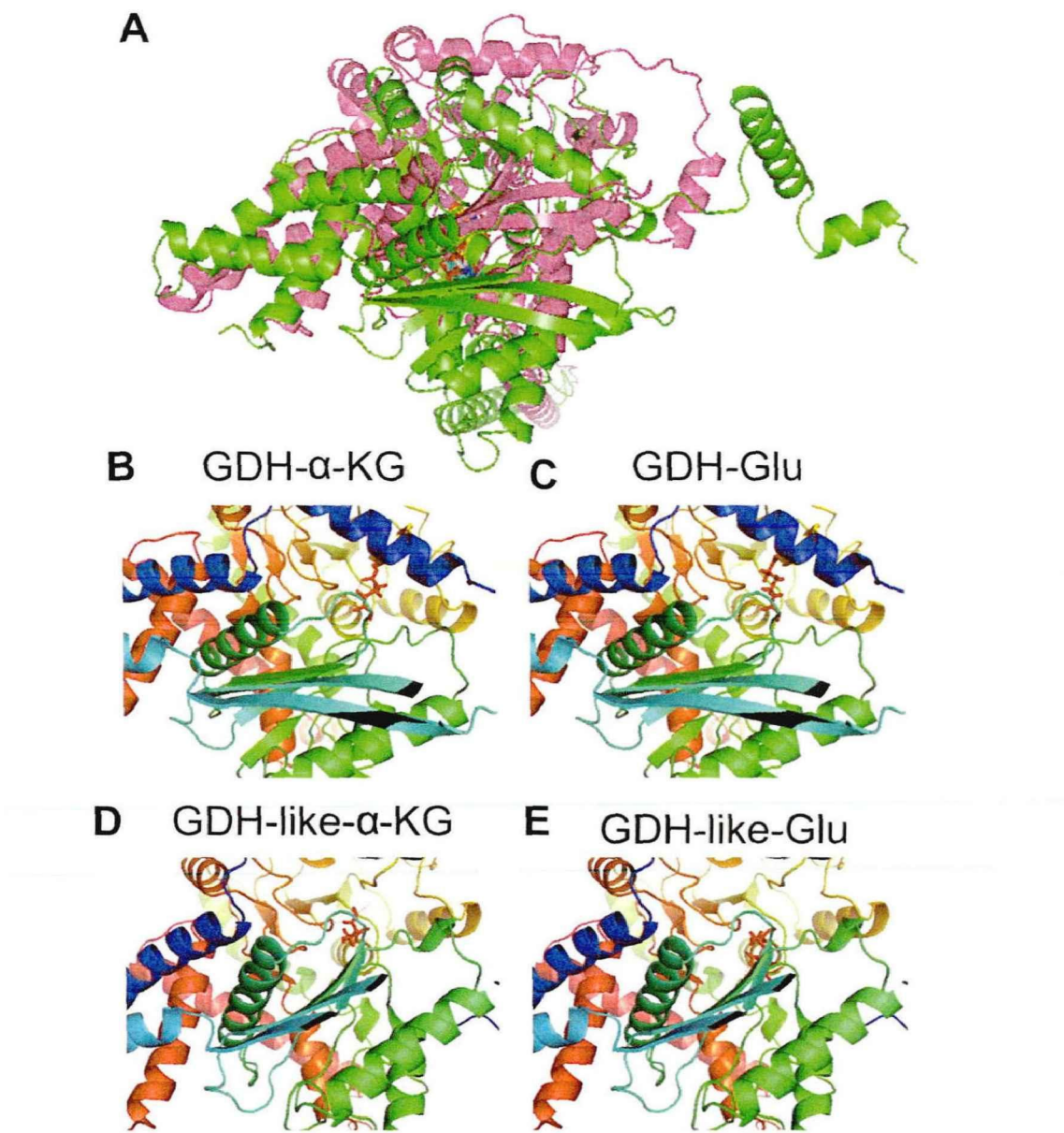


图 3-15 预测 GDH 和 GDH-like 的三级结构

Fig. 3-15 Structural prediction of GDH and GDH-like

**A.** GDH 和 GDH-like 的三级结构。 **B-E.** 通过 COACH 软件预测，GDH 和 GDH-like 都具有  $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸的结合位点，用 Sybyl-X 软件预测可能的结合位点，用 PyMOL 软件绘制。  
**A.** The structure of GDH and GDH-like. **B-E.** By COACH prediction, both GDH and GDH-like were able to bind  $\alpha$ -KG (C-score 0.32) and Glu (C-score 0.7), the possible binding sites were docked and drafted by Sybyl-X software and the picture drew by PyMOL.

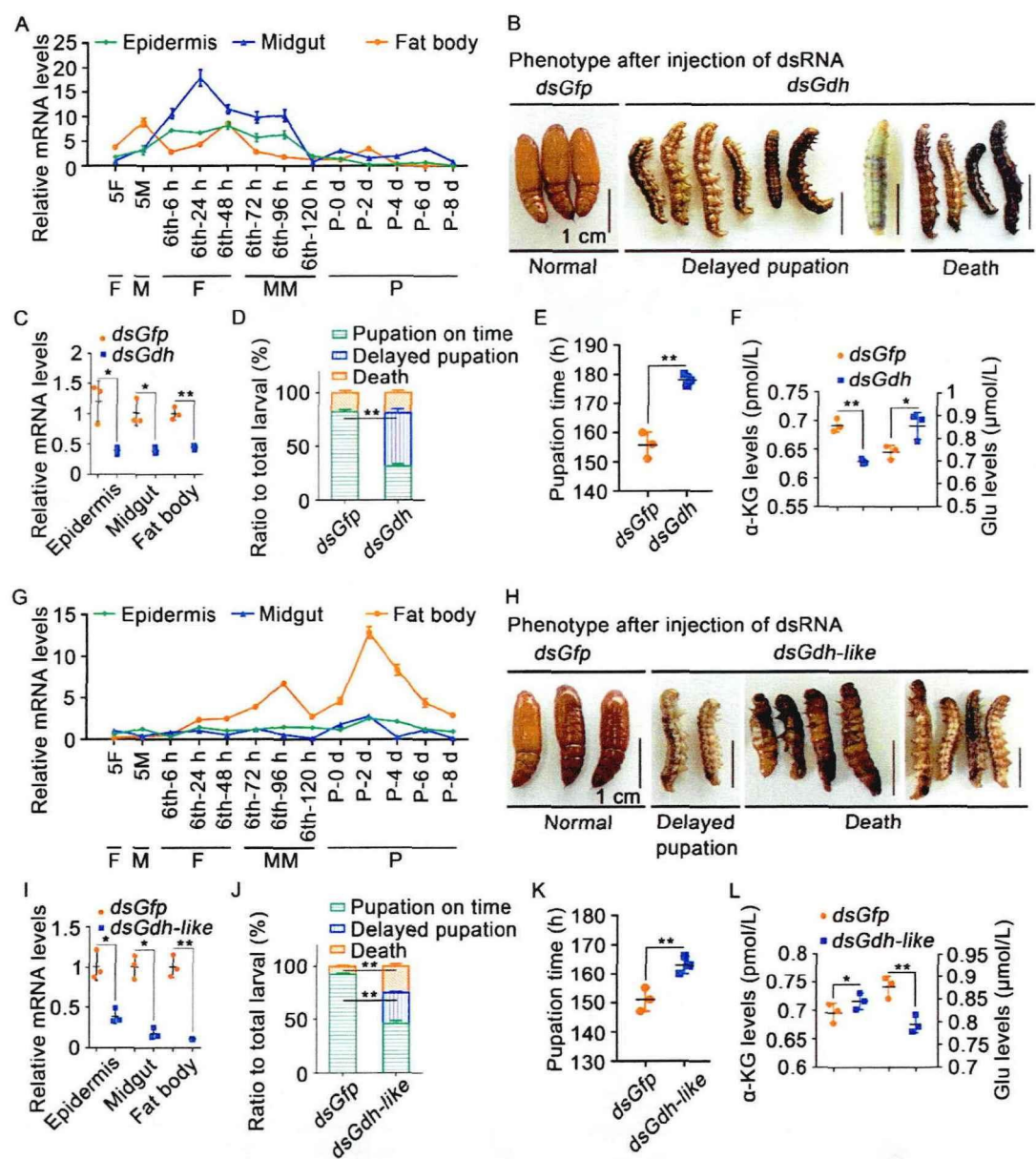


图 3-16 GDHs 调控谷氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸的相互转变

Fig. 3-16 GDHs regulates Glu and  $\alpha$ -KG interconversion

A. qRT-PCR 检测 *Gdh* 在表皮、中肠、脂肪体中的表达。B. 注射 *dsGfp* 和 *dsGdh* 后统计表型，标尺代表 1 厘米。C. 敲降 *Gdh* 后检测表皮、中肠、脂肪体的干扰效率。D. 敲降 *Gdh* 后统计表型。E. 敲降 *Gfp* 和 *Gdh* 后统计化蛹时间。F. 敲降 *Gdh* 后测定  $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸的含量。G. qRT-PCR 检测表皮、中肠、脂肪体中 *Gdh-like* 的表达。H. *dsGfp* 和 *dsGdh-like* 注射后的表型；标尺代表 1 厘米。I. qRT-PCR 验证 *Gdh-like* 在表皮、中肠、脂肪体的干扰效率。J. 敲降 *Gdh-like* 后的表型统计。K. 敲降 *Gfp* 和 *Gdh-like* 后的化蛹时间。L. 在敲降 *Gdh-like* 后测定  $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸含量。

A. Expression profiles of *Gdh* in the epidermis, midgut, and fat body detected by qRT-PCR. B. Phenotypes after injection of *dsGfp* and *dsGdh*; the ruler represents 1 cm. C. qRT-PCR validation of the interference efficiency of *Gdh* in the epidermis, midgut, and fat body. D. The phenotypes ratio after *Gdh* knockdown. E. Pupation time after knockdown of *Gfp* and *Gdh*. F.  $\alpha$ -KG and Glu levels were determined after *Gdh*



knockdown. **G.** The express profiles of *Gdh-like* in the epidermis, midgut, and fat body detected by qRT-PCR. **H.** Phenotypes after injection of *dsGfp* and *dsGdh-like*; the ruler represents 1 cm. **I.** qRT-PCR validation of the interference efficiency of *Gdh-like* in the epidermis, midgut, and fat body. **J.** Phenotype ratio after *Gdh-like* knockdown. **K.** Pupation time after knockdown of *Gfp* and *Gdh-like*. **L.**  $\alpha$ -KG and Glu levels were determined after *Gdh-like* knockdown.

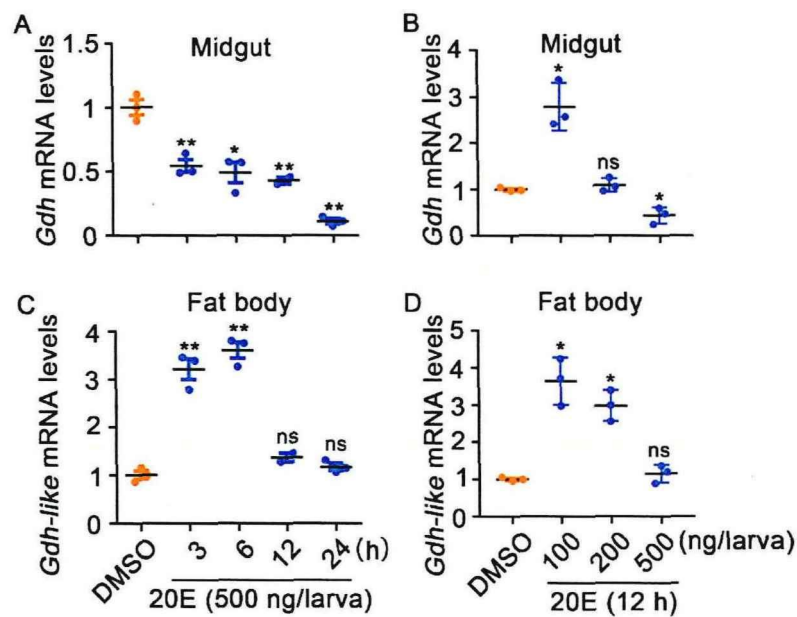


图 3-17 20E 抑制 *Gdh* 的表达，促进 *Gdh-like* 的表达

**Fig. 3-17 20E inhibited the expression of *Gdh* while increasing the expression of *Gdh-like***

**A.** 不同时间刺激下 20E (500 ng/幼虫)诱导后 *Gdh* 在中肠中的表达。 **B.** 不同浓度 20E 刺激下 *Gdh* 在中肠中的表达，以 DMSO 为对照。 **C.** 不同时间刺激下 20E (500 ng/幼虫)诱导后 *Gdh-like* 在脂肪体中的表达。 **D.** 不同浓度 20E 刺激下 *Gdh-like* 在脂肪体中的表达。

**A.** *Gdh* expression in the midgut after induction with 20E (500 ng/larva) under different time stimulations. **B.** *Gdh* expression in the midgut under the stimulation of different concentrations of 20E, DMSO was used as the control. **C.** *Gdh-like* expression in the fat body after induction with 20E (500 ng/larva) under different time stimulations. **D.** *Gdh-like* expression in the fat body under the stimulation of different concentrations of 20E.

### 3.5 谷氨酸促进成虫脂肪体的形成

谷氨酸可以从精氨酸、脯氨酸和组氨酸等其他氨基酸转化而来[179]，而自噬可能是变态过程中氨基酸和谷氨酸的重要来源。我们往 6th-6 h 幼虫血腔中注射 *dsAtg8* 以阻断自噬。自噬指标 LC3-II 型的表达在注射 *dsAtg8* 后显著降低 (图 3-18A)，并且导致 22.2% 幼虫死亡，存活的幼虫中 42.2% 的幼虫化蛹延迟约 17 h (图 3-18B-D)，中肠和脂肪体的解离均受到抑制 (图 3-18E)。在阻断自噬后，谷氨酸等氨基酸的水平都显著下降 (图 3-18F)。以上数据表明自噬是谷氨酸的重要来源。

为了探究蛹期高水平谷氨酸的功能，在 P2 和 P5 的蛹血腔中注射补充谷氨酸，发现相比较于对照组，注射谷氨酸后导致羽化提前约 1.8 天（图 3-18G-I），腹眼处色素沉着是蛹向成虫转变的重要标志[43]。注射谷氨酸后腹眼颜色更早变黑，成虫脂肪体也较对照组更早形成（图 3-18J）。这说明谷氨酸对于形成成虫组织至关重要。

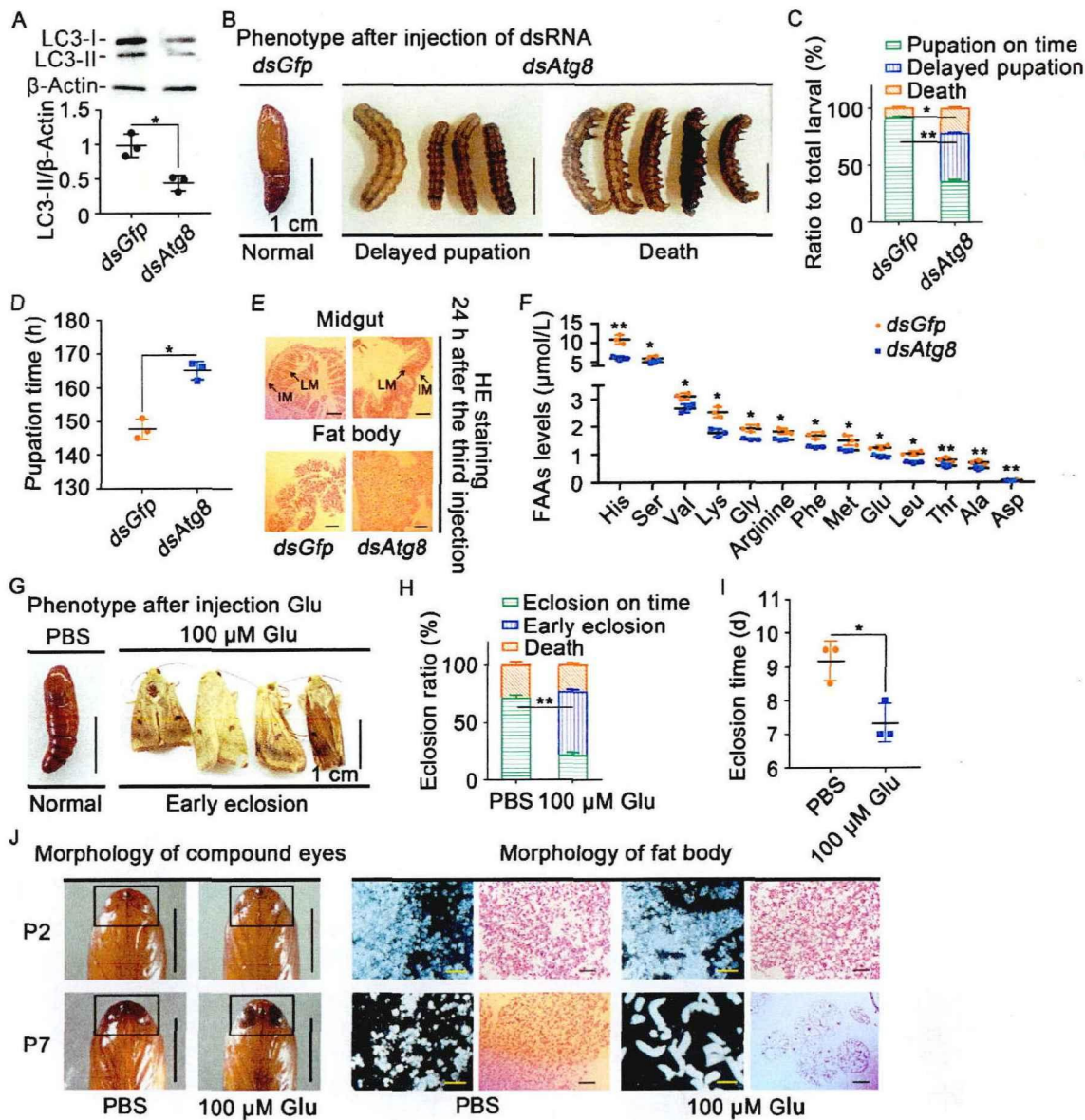


图 3-18 Glu 促进成虫脂肪体增殖

Fig. 3-18 Glu promoted adult fat body proliferation

**A.** 注射 *dsAtg8* (3  $\mu$ g/只虫) 和 *dsGfp* 后免疫印迹实验检测 LC3 表达。**B.** 注射 *dsAtg8* 和 *dsGfp* 后的表型，标尺代表 1 厘米。**C.** 表型统计。**D.** 统计注射 *dsAtg8* 和 *dsGfp* 后的化蛹时间。**E.** 注射 *dsAtg8* 和 *dsGfp* 后观察脂肪体和中肠的降解情况。**F.** *dsAtg8* 和 *dsGfp* 后测定血淋巴中的游离氨基酸。**G.** P2 注射谷氨酸后，每隔 2 天再次注射，观察成虫表型。**H.** 注射谷氨酸和 PBS 后统计羽化率。**I.** 统计

羽化时间。J. 注射谷氨酸和 PBS 后观察腹眼和脂肪体形态。腹眼图中的标尺代表 0.5 厘米, 脂肪体图中的标尺代表 500  $\mu\text{m}$ 。

A. Western blot detected LC3. B. Phenotypes after injection of *dsAtg8* and *dsGfp* from 6th-6 h; the ruler represents 1 cm. C. Ratio of phenotypes. D. Pupation time after injection of *dsAtg8* and *dsGfp*. E. HE staining was used to evaluate the morphological changes of the midgut and fat body after injection of *dsAtg8* and *dsGfp*. The bars in the midgut represented 200  $\mu\text{m}$  and the bars in the fat body represented 100  $\mu\text{m}$ . F. FAAs levels were determined after injection of *dsAtg8* and *dsGfp*. G. After the injection of Glu at P2, it was injected again at a two-day interval to observe the adult phenotype. H. The percentage of eclosion after injection of Glu and PBS. I. Eclosion time. J. Observation of compound eyes and fat body morphology at P7 after injection of Glu and PBS. The bars in the figures of compound eyes represented 0.5 cm; in the fat body figures, the bars represented 500  $\mu\text{m}$ .

## 4. 讨论

氨基酸代谢的调节机制以及代谢物与组织重塑的关系尚不清楚。我们发现昆虫甾醇激素 20E 通过依赖于组织和时间特异性的方式调节相关基因的表达, 对氨基酸代谢进行重编程, 在变态发育期减少精氨酸水平以抑制幼虫生长, 增加  $\alpha$ -酮戊二酸诱导幼虫细胞自噬, 增加谷氨酸以支持蛹/成虫的发育。

### 4.1 氨基酸通过决定不同的细胞命运来调控组织重塑

氨基酸在控制代谢和生长方面发挥重要作用[180]。脯氨酸对于成虫飞行至关重要[181, 182], 丙氨酸和天冬氨酸通过激活利尿激素 44 的神经元促进果蝇对食物的摄取[183]。丝氨酸可以促进 ATP 的合成, 对于家蚕繁殖至关重要[184]。精氨酸通过激活 mTOR 调节细胞代谢和增殖[185]。 $\alpha$ -酮戊二酸在细胞进程中的作用在不同情况下是不同的。在秀丽隐杆线虫中,  $\alpha$ -酮戊二酸直接抑制 ATP 合酶的表达来延长成虫的寿命, 从而降低细胞内 ATP 水平, 减少氧气的消耗, 激活腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 信号通路, 抑制 mTOR 信号通路, 增加自噬[186]。然而, 当氨基酸脱氨产生的  $\alpha$ -酮戊二酸作为唯一的碳源时, 也可以参与还原反应, 产生促进细胞增殖的代谢物异柠檬酸[187]。谷氨酸作为一种重要的氨基酸, 通过与其受体结合参与多种细胞功能[188], 是正常细胞和肿瘤细胞增殖的主要能源物质, 谷氨酸也可能是促进肿瘤发生的重要生长因子[189]。

本文通过代谢组分析, 发现了许多在幼虫-蛹-成虫转变过程中具有发育阶段特异性的代谢物, 其中氨基酸类代谢物变化显著。精氨酸作为幼虫取食期的标志代谢物, 在取食期富集并促进幼虫细胞增殖; 游走期高水平的  $\alpha$ -酮戊二酸诱导幼虫组织自噬; 谷氨酸在蛹期富集, 促进蛹/成虫细胞增殖。虽然精氨酸和谷氨酸都可以促进细胞增殖, 但它们在不同时期发挥功能。在果蝇中, TCA 循环在变态期处于低速率状态[158, 164], 葡萄糖水平在进入蛹期后含量逐渐下降[59], 谷氨酸作为能量供给可以代替葡萄糖[190, 191]。谷氨酸作为“谷氨酸家族”的中心, 可以通过谷氨酰胺、脯氨酸、精氨酸、组氨酸和鸟氨

酸转化而来。谷氨酸也可以通过 GDH 进行氧化脱氨形成  $\alpha$ -酮戊二酸以去除多余的氨[192]。几乎所有的氨基酸水平都是在取食期最高的,幼虫停止取食后各种氨基酸含量快速下降,而谷氨酸作为唯一一种在蛹期富集的氨基酸,可以促进细胞增殖。因此在失去食物和葡萄糖供应后,由  $\alpha$ -酮戊二酸和其他氨基酸转化而来的谷氨酸可能是蛹/成虫转变过程中的主要能量来源之一。

## 4.2 20E 通过代谢重编程调控代谢产物的变化

氨基酸等代谢物对机体的生长和健康十分重要,精氨酸作为一种营养物质和免疫营养素在机体生长发育中起到重要作用[193],因此精氨酸的水平在体内必须得到很好的控制。胰岛素促进 *Ass* 的转录[194],因此幼虫取食期高水平的精氨酸来自于食物和胰岛素促进的内源性合成。而到了变态期,20E 滴度上升,通过其核受体直接促进 *Arg* 的表达,拮抗胰岛素信号通路,从而引起精氨酸的降解。因此 20E 通过降低精氨酸水平抑制幼虫生长并诱导自噬,依赖于滴度变化精确调控昆虫的发育。

$\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸对机体的生长和健康也至关重要,二者可以通过 GDH 相互转换,然而具体的机制并不清楚。人类有两种 GDH,分别由 GDH1 和 GDH2 编码[195],尽管这两种 GDH 高度同源,但是 GDH1 存在于多种组织中,而 GDH2 则主要存在于神经元、睾丸和类固醇器官中,是人类和类人猿所特有的[196,197]。GDH2 的表达可能因为 GDH1 的表达受到抑制而增强,例如拮抗 GTP 的负调控作用[198]。GDH 的催化速率主要是受到变构调节或者体内的代谢需求[191]。GDH 主要催化谷氨酸分解产生  $\alpha$ -酮戊二酸,然后通过 TCA 循环分解代谢产生 ATP[178,191]。然而,当需要进行氨基酸代谢时, $\alpha$ -酮戊二酸经过 GDH 转化为谷氨酸,谷氨酸再代谢为谷氨酰胺从而去除多余的有毒氨,保护神经发育[155,187,199]。

在棉铃虫中发现了两种 GDHs,其中 GDH 主要在取食期和游走期的中肠中高表达,催化谷氨酸转化为  $\alpha$ -酮戊二酸。而 GDH-like 则主要在蛹期的脂肪体中高表达并受到 20E 的正向调控,催化  $\alpha$ -酮戊二酸转变成谷氨酸。在所有的物种中,GDHs 都具有相同的 ELFV 脱氢结构域。然而这两种 GDHs 的序列相似性不高,通过进化树发现棉铃虫的 GDH 与人的 GDH 更为相似,两种 GDHs 都具有  $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸的结合位点。但是两种 GDHs 在不同时间和不同组织中表达,对 20E 的响应也是不同的,说明这两种 GDHs 可能受到不同激素的调控。在本研究中,我们首次发现  $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸是由不同的 GDHs 调控转化的,这两种 GDHs 在不同发育阶段的不同组织中表达。在变态期 20E 抑制 *Gdh* 的表达但是促进 *Gdh-like* 的表达。

激素是调节代谢的重要因素。在取食期,昆虫的生长发育主要受到胰岛素和保幼激素(juvenile hormone, JH)的调控,而到了变态期,20E 则是调控变态发育的主要激素[200,201]。对于完全变态昆虫而言,在发育过程中激素交替变化从而影响昆虫的内部结

构、外部形态和生理功能[202, 203]。不同滴度的 20E 具有不同的功能[204, 205]，低滴度的 20E 由于不能抑制 JH 和 IIS 甚至协同它们促进细胞增殖，而高滴度的 20E 拮抗胰岛素和 JH，抑制幼虫取食，促进其进入游走期，启动自噬和凋亡相关基因促进变态[37, 206]。本研究发现 20E 以依赖浓度的方式调控基因的表达，这是因为 20E 必须通过上调基因的表达来拮抗 JH 和胰岛素。随着从幼虫时期通过食物获得能量转变为变态期通过降解组织获得能量，代谢产物在发育过程中发生了很大的变化。20E 通过依赖于组织特异性和时间特异性的方式调节基因的表达改变代谢，因此 20E 在变态期重编程了代谢。

#### 4.3 自噬产生的 FFAs 用于蛹/成虫的发育

在取食期幼虫大量进食，食物中的营养物质如氨基酸促进胰岛素样肽的分泌，激活 mTOR 信号通路和糖酵解后促进幼虫组织的增殖和快速生长[207]。另一方面 IIS 也会促进前胸腺中 20E 的合成[81]，在幼虫达到临界体重后，20E 滴度上升，促进自噬与凋亡的发生[208, 209]。自噬是一种细胞存活策略，但当自噬产生的能量不足时便会导致过度自噬或者持续性自噬，并转向凋亡[145, 210]，因此自噬是否转向凋亡取决于不同的代谢状态。于完全变态昆虫而言，在 20E 调控下，幼虫停止取食后，幼虫组织先发生自噬，而后转向凋亡，即自噬是凋亡发生的先决条件[47]。幼虫组织的降解产物是维持生存和形成成虫组织的重要来源。本文发现自噬促进游离氨基酸的产生，但在变态过程中只有谷氨酸水平升高，说明除了来自于  $\alpha$ -酮戊二酸和自噬外，谷氨酸还可以由其他氨基酸（如精氨酸、组氨酸等）转化而来。而在 P6 之后，谷氨酸含量快速降低，因为它被用于支持蛹-成虫转变过程中成虫组织的形成。

## 5. 小结

完全变态昆虫从幼虫到蛹再到成虫的发育过程中，包括氨基酸在内的代谢产物含量会发生显著变化。精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸在不同发育阶段调控细胞命运。精氨酸促进幼虫组织的增殖， $\alpha$ -酮戊二酸促进幼虫-蛹转变过程中幼虫组织的自噬，谷氨酸促进蛹-成虫转变过程中成虫组织的增殖。20E 通过抑制 *Ass* 的表达促进 *Arg* 的表达来调控变态过程中精氨酸含量的变化。在取食期和游走期中肠中高表达的 *Gdh* 催化谷氨酸转化为  $\alpha$ -酮戊二酸，高浓度的 20E 抑制 *Gdh* 的表达。在蛹期脂肪体中高表达的 *Gdh-like* 催化  $\alpha$ -酮戊二酸转化为谷氨酸，20E 促进 *Gdh-like* 的表达。自噬促进游离氨基酸的产生。综上所述，20E 通过组织特异性和时间特异性的方式调节基因的表达，重编程氨基酸代谢，支持蛹-成虫的发育（图 3-19）。



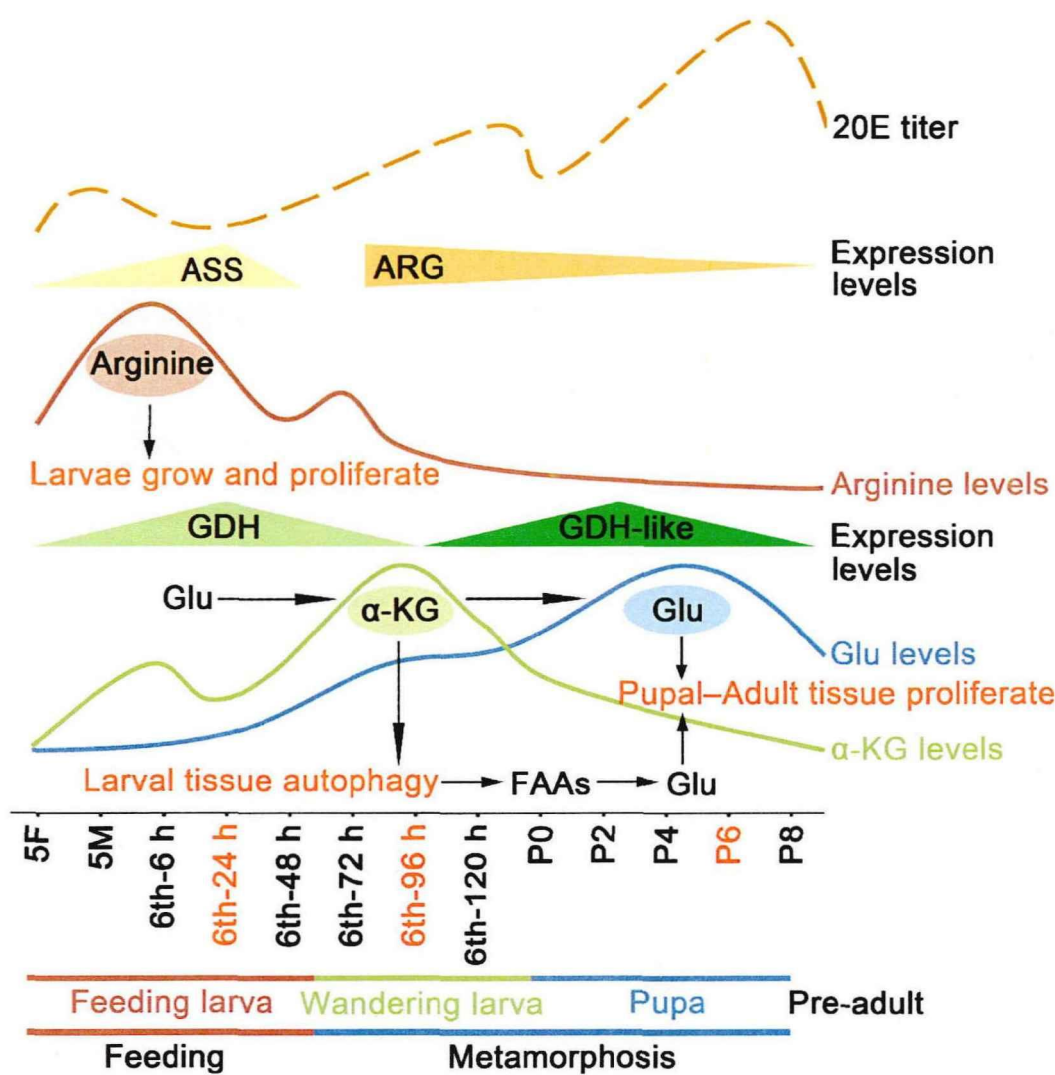


图 3-19 20E 通过调节基因表达重编程氨基酸代谢促进变态发育

Fig. 3-19 20E promotes metamorphosis by reprogramming amino acid metabolism by regulating metabolic genes

精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸分别被鉴定为取食期幼虫、游走期幼虫和蛹期的标记代谢物。20E 通过抑制 *Ass* 的表达和上调 *Arg* 的表达来降低变态发育中的精氨酸水平。在取食期幼虫中肠中高表达的 GDH 可提高  $\alpha$ -酮戊二酸水平。到了变态期，在蛹期脂肪体中高表达的 GDH-like 将  $\alpha$ -酮戊二酸转化为谷氨酸。20E 通过氨基酸代谢重编程以支持变态期的成虫发育。

Arginine,  $\alpha$ -KG, and Glu were identified as marker metabolites of the feeding larva, wandering larva, and pupa, respectively. The arginine levels were decreased by 20E regulation via repression of *Ass* expression and upregulation of *Arg* expression during metamorphosis. The  $\alpha$ -KG was increased by GDH expressed in the feeding larval midgut. The  $\alpha$ -KG was then transformed to Glu by GDH-like expressed in the pupal fat body that was upregulated by 20E. Thus, 20E regulated amino acid metabolic reprogramming to support adult development without feeding.

## 第四章 论文创新点总结及意义

本研究以重大农业害虫棉铃虫为研究对象,揭示了转录因子 KLF15 在棉铃虫发育阶段的表达模式及在虫体中的功能,发现 20E 通过 KLF15 整合促进自噬和糖异生,从而升高变态期血淋巴中的血糖水平,维持变态发育过程中的葡萄糖稳态,保证了昆虫在不取食的后半生仍然有维持生命和变态发育的能量供给。通过代谢组分析鉴定出不同发育阶段的重要代谢产物,明确代谢产物与组织重塑的关系以及 20E 调控氨基酸代谢重编程的具体机制。这一研究丰富了类固醇激素调控代谢重编程的分子机制;阐明了代谢与组织重塑的关系,为研究代谢重编程提供了理论支持和研究思路,为害虫防治提供了新的理论基础和靶标基因。

本文创新点总结:

### 一、蜕皮激素通过 KLF15 整合促进自噬和糖异生从而维持昆虫变态发育中葡萄糖稳态

1. 20E 通过 EcR 促进 *Klf15* 的表达。
2. KLF15 通过结合 *Atg8* 启动子区域的 KLF bs 促进 *Atg8* 的转录,促进脂肪体的自噬和凋亡。
3. 变态期幼虫组织发生自噬与凋亡为糖异生提供底物。
4. 棉铃虫变态发育过程中,20E 通过 KLF15 调控糖代谢基因表达重编程糖代谢。

### 二、蜕皮激素重编程氨基酸代谢支持昆虫的变态发育

1. 棉铃虫生长发育过程中体内的代谢产物会发生变化。
2. 精氨酸、 $\alpha$ -酮戊二酸和谷氨酸分别在幼虫取食期、游走期和蛹期富集,是幼虫取食期、游走期和蛹期的标志代谢物。精氨酸在幼虫期促进幼虫生长和细胞增殖, $\alpha$ -酮戊二酸在游走期促进幼虫自噬,谷氨酸在蛹期促进成虫生长和细胞增殖。
3. 20E 通过抑制 *Ass* 的表达、促进 *Arg* 的表达降低变态期精氨酸的水平。
4. 在取食期和游走期中肠中高表达的 *Gdh* 会促进谷氨酸转变为  $\alpha$ -酮戊二酸, $\alpha$ -酮戊二酸通过在蛹期脂肪体中高表达的 *Gdh-like* 转变为谷氨酸。
5. 自噬可以产生多种游离氨基酸并转化为谷氨酸,从而为成虫发育提供能量。

## 参考文献

- [1] Stork NE. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth?[J]. *Annu Rev Entomol*, 2018, 63(31-45).
- [2] Qu Z, Kenny NJ, Lam HM *et al*. How did arthropod sesquiterpenoids and ecdysteroids arise? comparison of hormonal pathway genes in noninsect arthropod genomes[J]. *Genome Biol Evol*, 2015, 7(7):1951-1959.
- [3] Krishnakumaran A, Schneiderman HA. Control of molting in mandibulate and chelicerate arthropods by ecdysones[J]. *Biol Bull*, 1970, 139(3):520-538.
- [4] Zhou B, Hiruma K, Shinoda T, Riddiford LM. Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of broad complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*[J]. *Dev Biol*, 1998, 203(2):233-244.
- [5] Koyama T, Iwami M, Sakurai S. Ecdysteroid control of cell cycle and cellular commitment in insect wing imaginal discs[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 213(2):155-166.
- [6] Edgar BA. How flies get their size: genetics meets physiology[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(12):907-916.
- [7] Kang XL, Zhang JY, Wang D *et al*. The steroid hormone 20-hydroxyecdysone binds to dopamine receptor to repress lepidopteran insect feeding and promote pupation[J]. *PLoS Genet*, 2019, 15(8):1008331.
- [8] Karlson P. On the hormonal control of insect metamorphosis. A historical review[J]. *Int J Dev Biol*, 1996, 40(1):93-96.
- [9] Zitnan D, Sehnal F, Bryant PJ. Neurons producing specific neuropeptides in the central nervous system of normal and pupariation-delayed *Drosophila*[J]. *Dev Biol*, 1993, 156(1):117-135.
- [10] Harvie PD, Filippova M, Bryant PJ. Genes expressed in the ring gland, the major endocrine organ of *Drosophila melanogaster*[J]. *Genetics*, 1998, 149(1):217-231.
- [11] Rewitz KF, Yamanaka N, Gilbert LI, O'Connor MB. The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis[J]. *Science*, 2009, 326(5958):1403-1405.
- [12] Truman JW. The evolution of insect metamorphosis[J]. *Curr Biol*, 2019, 29(23):1252-1268.
- [13] Gilbert LI. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 215(1-2):1-10.
- [14] Smith SL, Bollenbacher WE, Gilbert LI. Ecdysone 20-monooxygenase activity during

- larval-pupal development of *Manduca sexta*[J]. Mol Cell Endocrinol, 1983, 31(2-3):227-251.
- [15] Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF. Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle[J]. Nature, 1993, 362(6419):471-475.
- [16] Yao TP, Forman BM, Jiang Z *et al.* Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes[J]. Nature, 1993, 366(6454):476-479.
- [17] Hill RJ, Billas IM, Bonneton F *et al.* Ecdysone receptors: from the ashburner model to structural biology[J]. Annu Rev Entomol, 2013, 58(251-271).
- [18] Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms[J]. Cell, 1993, 73(7):1323-1337.
- [19] Zheng WW, Yang DT, Wang JX *et al.* Hsc70 binds to ultraspiracle resulting in the upregulation of 20-hydroxyecdysone-responsive genes in *Helicoverpa armigera*[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 315(1-2):282-291.
- [20] Wang SF, Li C, Zhu J *et al.* Differential expression and regulation by 20-hydroxyecdysone of mosquito ultraspiracle isoforms[J]. Dev Biol, 2000, 218(1):99-113.
- [21] He HJ, Wang Q, Zheng WW *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).
- [22] Billas IM, Iwema T, Garnier JM *et al.* Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor[J]. Nature, 2003, 426(6962):91-96.
- [23] Lam G, Thummel CS. Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*[J]. Curr Biol, 2000, 10(16):957-963.
- [24] Oro AE, McKeown M, Evans RM. The *Drosophila* retinoid X receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis[J]. Development, 1992, 115(2):449-462.
- [25] Hall BL, Thummel CS. The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor[J]. Development, 1998, 125(23):4709-4717.
- [26] Grebe M, Fauth T, Spindler-Barth M. Dynamic of ligand binding to *Drosophila melanogaster* ecdysteroid receptor[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34(9):981-989.
- [27] Tan A, Palli SR. Ecdysone [corrected] receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*[J]. Mol Cell Endocrinol. 2008. 291(1-2):42-49.
- [28] Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor[J]. J Endocrinol, 2010, 204(2):105-114.

- [29] Srivastava DP, Yu EJ, Kennedy K *et al.* Rapid, nongenomic responses to ecdysteroids and catecholamines mediated by a novel *Drosophila* G-protein-coupled receptor[J]. J Neurosci, 2005; 25(26):6145-6155.
- [30] Wang D, Zhao WL, Cai MJ *et al.* G-protein-coupled receptor controls steroid hormone signaling in cell membrane[J]. Sci Rep, 2015, 5(8675).
- [31] Cai MJ, Dong DJ, Wang Y *et al.* G-protein-coupled receptor participates in 20-hydroxyecdysone signaling on the plasma membrane[J]. Cell Commun Signal, 2014, 12(9).
- [32] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict?[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10):2679-2688.
- [33] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation[J]. Nature, 2000, 408(6811):488-492.
- [34] Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism[J]. Science, 2010, 330(6009):1344-1348.
- [35] Green DR, Llamby F. Cell death signaling[J]. Csh Perspect Biol, 2015, 7(12).
- [36] Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*[J]. Cell, 2007, 131(6):1137-1148.
- [37] Tian L, Ma L, Guo E *et al.* 20-Hydroxyecdysone upregulates *Atg* genes to induce autophagy in the *Bombyx* fat body[J]. Autophagy, 2013, 9(8):1172-1187.
- [38] Xie K, Tian L, Guo X *et al.* BmATG5 and BmATG6 mediate apoptosis following autophagy induced by 20-hydroxyecdysone or starvation[J]. Autophagy, 2016, 12(2):381-396.
- [39] Xu T, Jiang X, Denton D, Kumar S. Ecdysone controlled cell and tissue deletion[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(1):1-14.
- [40] Zheng H, Yang X, Xi Y. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*[J]. Life Sci, 2016, 167(22-31).
- [41] Liu H, Wang J, Li S. E93 predominantly transduces 20-hydroxyecdysone signaling to induce autophagy and caspase activity in *Drosophila* fat body[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2014, 45(30-39).
- [42] Jia Q, Chen X, Wu L *et al.* Matrix metalloproteinases promote fat body cell dissociation and ovary development in *Bombyx mori*[J]. J Insect Physiol, 2018, 111(8-15).
- [43] Jia Q, Li S. Mmp-induced fat body cell dissociation promotes pupal development and moderately averts pupal diapause by activating lipid metabolism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(1):2215214120.
- [44] Zhao YM, Wang XP, Jin KY *et al.* Insulin-like growth factor 2 promotes tissue-specific cell growth, proliferation and survival during development of *Helicoverpa armigera*[J]. Cells,



2022, 11(11).

- [45] Li YB, Li XR, Yang T *et al.* The steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes switching from autophagy to apoptosis by increasing intracellular calcium levels[J]. *Insect Biochem Molec*, 2016, 79(73-86).
- [46] Di YQ, Han XL, Kang XL *et al.* Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis[J]. *Autophagy*, 2020:1-23.
- [47] Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX *et al.* Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(3):305-324.
- [48] Li S, Yu X, Feng Q. Fat body biology in the last decade[J]. *Annu Rev Entomol*, 2019, 64(315-333).
- [49] Peng J, Li Z, Yang Y *et al.* Comparative transcriptome analysis provides novel insight into morphologic and metabolic changes in the fat body during silkworm metamorphosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11).
- [50] Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1791(6):419-440.
- [51] Walther TC, Farese RV, Jr. Lipid droplets and cellular lipid metabolism[J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81(687-714).
- [52] Blow F, Douglas AE. The hemolymph microbiome of insects[J]. *J Insect Physiol*, 2019, 115(33-39).
- [53] Thompson SN, Borchardt DB. Glucogenic blood sugar formation in an insect *Manduca sexta* L.: asymmetric synthesis of trehalose from <sup>13</sup>C enriched pyruvate[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003, 135(3):461-471.
- [54] Nagata S. Feeding modulation in insects through factors in the hemolymph[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(1):33-38.
- [55] Nijhout HF. The control of body size in insects[J]. *Dev Biol*, 2003, 261(1):1-9.
- [56] Wu R, Wu Z, Wang X *et al.* Metabolomic analysis reveals that carnitines are key regulatory metabolites in phase transition of the locusts[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(9):3259-3263.
- [57] Xu WH, Lu YX, Denlinger DL. Cross-talk between the fat body and brain regulates insect developmental arrest[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(36):14687-14692.
- [58] Lehmann P, Pruißscher P, Posledovich D *et al.* Energy and lipid metabolism during direct and diapause development in a pierid butterfly[J]. *J Exp Biol*, 2016, 219(Pt 19):3049-3060.
- [59] Li YL, Yao YX, Zhao YM *et al.* The steroid hormone 20-hydroxyecdysone counteracts insulin signaling via insulin receptor dephosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 2021:100318.

- [60] Dolezal T, Krejcova G, Bajgar A *et al.* Molecular regulations of metabolism during immune response in insects[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2019, 109(31-42).
- [61] Becker A, Schloder P, Steele JE, Wegener G. The regulation of trehalose metabolism in insects[J]. *Experientia*, 1996, 52(5):433-439.
- [62] Storey KB. Organic solutes in freezing tolerance[J]. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 1997, 117(3):319-326.
- [63] Watanabe M, Kikawada T, Minagawa N *et al.* Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures[J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(Pt 18):2799-2802.
- [64] Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation[J]. *Annu Rev Entomol*, 2010, 55(207-225).
- [65] Matthews JR, Downer RG, Morrison PE. Estimation of glucose in the haemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*[J]. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*, 1976, 53(2):165-168.
- [66] Downer RG, Matthews JR. Glycogen depletion of thoracic musculature during flight in the American cockroach, *Periplaneta americana* L[J]. *Comp Biochem Physiol B*, 1976, 55(4):501-502.
- [67] Hahn DA, Denlinger DL. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization[J]. *J Insect Physiol*, 2007, 53(8):760-773.
- [68] Beenaekkers AM, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJ. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes[J]. *Prog Lipid Res*, 1985, 24(1):19-67.
- [69] Sinclair BJ, Marshall KE. The many roles of fats in overwintering insects[J]. *J Exp Biol*, 2018, 221(Pt Suppl 1).
- [70] Nagata S, Morooka N, Matsumoto S *et al.* Effects of neuropeptides on feeding initiation in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2011, 172(1):90-95.
- [71] Nagata S, Matsumoto S, Mizoguchi A, Nagasawa H. Identification of cDNAs encoding allatotropin and allatotropin-like peptides from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Peptides*, 2012, 34(1):98-105.
- [72] Homem CCF, Steinmann V, Burkard TR *et al.* Ecdysone and mediator change energy metabolism to terminate proliferation in *Drosophila* neural stem cells[J]. *Cell*, 2014, 158(4):874-888.
- [73] Hiruma K, Riddiford LM. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2009, 39(4):245-253.
- [74] Elias-Neto M, Soares MP, Simoes ZL *et al.* Developmental characterization, function and

- regulation of a Laccase2 encoding gene in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae)[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2010, 40(3):241-251.
- [75] Masuoka Y, Maekawa K. Ecdysone signaling regulates soldier-specific cuticular pigmentation in the termite *Zootermopsis nevadensis*[J]. FEBS Lett, 2016, 590(12):1694-1703.
- [76] Cakouros D, Daish T, Martin D *et al.* Ecdysone-induced expression of the caspase DRONC during hormone-dependent programmed cell death in *Drosophila* is regulated by broad-complex[J]. J Cell Biol, 2002, 157(6):985-995.
- [77] Cakouros D, Daish TJ, Kumar S. Ecdysone receptor directly binds the promoter of the *Drosophila* caspase dronc, regulating its expression in specific tissues[J]. J Cell Biol, 2004, 165(5):631-640.
- [78] Yu J, Wang H, Chen W *et al.* 20-Hydroxyecdysone and receptor interplay in the regulation of hemolymph glucose level in honeybee (*Apis mellifera*) larvae[J]. Metabolites, 2023, 13(1).
- [79] Zhao W, Zhang B, Geng Z *et al.* The uncommon function and mechanism of the common enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the metamorphosis of *Helicoverpa armigera*[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2022, 10(1042867).
- [80] Beckstead RB, Lam G, Thummel CS. The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis[J]. Genome Biol, 2005, 6(12):R99.
- [81] Colombani J, Bianchini L, Layalle S *et al.* Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*[J]. Science, 2005, 310(5748):667-670.
- [82] Mensch J, Lavagnino N, Carreira VP *et al.* Identifying candidate genes affecting developmental time in *Drosophila melanogaster*: pervasive pleiotropy and gene-by-environment interaction[J]. BMC Dev Biol, 2008, 8(78).
- [83] 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.
- [84] Roesijadi G, Rezvankhah S, Binninger DM, Weissbach H. Ecdysone induction of MsrA protects against oxidative stress in *Drosophila*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(2):511-516.
- [85] Wikoff WR, Anfora AT, Liu J *et al.* Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(10):3698-3703.
- [86] Gowda GA, Zhang S, Gu H *et al.* Metabolomics-based methods for early disease diagnostics[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2008, 8(5):617-633.
- [87] Schuh R, Aicher W, Gaul U *et al.* A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by *krüppel*, a *Drosophila* segmentation gene[J].

Cell, 1986, 47(6):1025-1032.

[88] Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins[J]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000, 29(183-212).

[89] Wolfe SA, Ramm EI, Pabo CO. Combining structure-based design with phage display to create new Cys(2)His(2) zinc finger dimers[J]. Structure, 2000, 8(7):739-750.

[90] Lomberk G, Urrutia R. The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins[J]. Biochem J, 2005, 392(Pt 1):1-11.

[91] Shields JM, Yang VW. Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched krüppel-like factor[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(3):796-802.

[92] Pearson R, Fleetwood J, Eaton S *et al.* Krüppel-like transcription factors: a functional family[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(10):1996-2001.

[93] Hsieh PN, Zhou G, Yuan Y *et al.* A conserved KLF-autophagy pathway modulates nematode lifespan and mammalian age-associated vascular dysfunction[J]. Nat Commun, 2017, 8(1):914.

[94] Shindo T, Manabe I, Fukushima Y *et al.* Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling[J]. Nat Med, 2002, 8(8):856-863.

[95] Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(49):31384-31390.

[96] Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched krüppel-like factor expressed during growth arrest[J]. J Biol Chem, 1996, 271(33):20009-20017.

[97] Rane MJ, Zhao Y, Cai L. Krüppel-like factors (KLFs) in renal physiology and disease[J]. EBioMedicine, 2019, 40(743-750).

[98] Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian krüppel-like family of transcription factors[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(11-12):1103-1121.

[99] Eaton SA, Funnell AP, Sue N *et al.* A network of krüppel-like Factors (Klfs). Klf8 is repressed by Klf3 and activated by Klf1 in vivo[J]. J Biol Chem, 2008, 283(40):26937-26947.

[100] Teshigawara K, Ogawa W, Mori T *et al.* Role of krüppel-like factor 15 in PEPCCK gene expression in the liver[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(3):920-926.

[101] Gray S, Wang B, Orihuela Y *et al.* Regulation of gluconeogenesis by krüppel-like factor 15[J]. Cell Metab, 2007, 5(4):305-312.

[102] Takashima M, Ogawa W, Hayashi K *et al.* Role of KLF15 in regulation of hepatic

gluconeogenesis and metformin action[J]. *Diabetes*, 2010, 59(7):1608-1615.

[103] Gray S, Feinberg MW, Hull S *et al*. The krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(37):34322-34328.

[104] Wang LF, Lin WA, Chen JH. Krüppel-like factor 15: a potential therapeutic target for kidney disease[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(9):1955-1961.

[105] Yamamoto J, Ikeda Y, Iguchi H *et al*. A krüppel-like factor KLF15 contributes fasting-induced transcriptional activation of mitochondrial acetyl-CoA synthetase gene AceCS2[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17):16954-16962.

[106] Takeuchi Y, Yahagi N, Aita Y *et al*. KLF15 enables rapid switching between lipogenesis and gluconeogenesis during fasting[J]. *Cell Rep*, 2016, 16(9):2373-2386.

[107] Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism[J]. *Mol Aspects Med*, 2015, 46(34-45).

[108] Doorneweerd DD, Tan AW, Nuttall FQ. Liver phosphorylase kinase: characterization of two interconvertible forms and partial purification of phosphorylase kinase a[J]. *Mol Cell Biochem*, 1982, 47(1):45-53.

[109] Miyamoto T, Amrein H. Neuronal gluconeogenesis regulates systemic glucose homeostasis in *Drosophila melanogaster*[J]. *Curr Biol*, 2019, 29(8):1263-1272 e1265.

[110] Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2001, 188(2):143-160.

[111] Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R. Vascular implications of the krüppel-like family of transcription factors[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(6):1135-1141.

[112] Zhang J, Yang C, Brey C *et al*. Mutation in *Caenorhabditis elegans* krüppel-like factor, KLF-3 results in fat accumulation and alters fatty acid composition[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(15):2568-2580.

[113] Wang XY, He MQ, Li JZ *et al*. KLF15 suppresses cell growth and predicts prognosis in lung adenocarcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106(672-677).

[114] Lee CY, Simon CR, Woodard CT, Baehrecke EH. Genetic mechanism for the stage- and tissue-specific regulation of steroid triggered programmed cell death in *Drosophila*[J]. *Dev Biol*, 2002, 252(1):138-148.

[115] Arya R, White K. Cell death in development: signaling pathways and core mechanisms[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 39(12-19).

[116] Pritchett TL, Tanner EA, McCall K. Cracking open cell death in the *Drosophila* ovary[J]. *Apoptosis*, 2009, 14(8):969-979.



- [117] Chen CH, Pan J, Di YQ *et al.* Protein kinase C delta phosphorylates ecdysone receptor B1 to promote gene expression and apoptosis under 20-hydroxyecdysone regulation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(34):E7121-E7130.
- [118] Riddiford LM. Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis[J]. *Receptor*, 1993, 3(3):203-209.
- [119] Zhao XF, Wang JX, Wang YC. Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*[J]. *Insect Biochem Molec*, 1998, 28(4):259-264.
- [120] Shao HL, Zheng WW, Liu PC *et al.* Establishment of a new cell line from lepidopteran epidermis and hormonal regulation on the genes[J]. *PLoS One*, 2008, 3(9):e3127.
- [121] Liu W, Cai MJ, Wang JX, Zhao XF. In a nongenomic action, steroid hormone 20-hydroxyecdysone induces phosphorylation of cyclin-dependent kinase 10 to promote gene transcription[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(5):1738-1750.
- [122] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J]. *Cell*, 2000, 101(1):25-33.
- [123] Wang K, Gao Y, Peng X *et al.* Using FAM labeled DNA oligos to do RNA electrophoretic mobility shift assay[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(6):2871-2875.
- [124] Zhang F, Li B, Dong H *et al.* YdiV regulates *Escherichia coli* ferric uptake by manipulating the DNA-binding ability of Fur in a SlyD-dependent manner[J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(17):9571-9588.
- [125] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T *et al.* LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing (vol 19, pg 5720, 2000)[J]. *Embo J*, 2003, 22(17):4577-4577.
- [126] Riddihough G, Pelham HRB. An ecdysone response element in the *Drosophila* Hsp27 promoter[J]. *Embo J*, 1987, 6(12):3729-3734.
- [127] Antoniewski C, Laval M, Lepesant JA. Structural features critical to the activity of an ecdysone receptor-binding site[J]. *Insect Biochem Molec*, 1993, 23(1):105-114.
- [128] Shirai H, Kamimura M, Yamaguchi J *et al.* Two adjacent cis-regulatory elements are required for ecdysone response of ecdysone receptor (EcR) B1 transcription[J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e49348.
- [129] Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[J]. *Autophagy*, 2021, 17(1):1-382.
- [130] Jiang J, Chan YS, Loh YH *et al.* A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(3):353-360.

- [131] Nuttall FQ, Ngo A, Gannon MC. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant?[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2008, 24(6):438-458.
- [132] Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism[J]. *Nature*, 2001, 414(6865):799-806.
- [133] Lin XY, Smagghe G. Roles of the insulin signaling pathway in insect development and organ growth[J]. *Peptides*, 2019, 122
- [134] Gabbouj S, Ryhanen S, Marttinen M *et al*. Altered insulin signaling in alzheimer's disease brain - special emphasis on PI3K-Akt pathway[J]. *Front Neurosci*, 2019, 13(629).
- [135] Pan J, Di YQ, Li YB *et al*. Insulin and 20-hydroxyecdysone oppose each other in the regulation of phosphoinositide-dependent kinase-1 expression during insect pupation[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(48):18613-18623.
- [136] Kiviet DJ, Nghe P, Walker N *et al*. Stochasticity of metabolism and growth at the single-cell level[J]. *Nature*, 2014, 514(7522):376-379.
- [137] Ortmayr K, Dubuis S, Zampieri M. Metabolic profiling of cancer cells reveals genome-wide crosstalk between transcriptional regulators and metabolism[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1841.
- [138] Yuneva MO, Fan TW, Allen TD *et al*. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(2):157-170.
- [139] Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(4):351-359.
- [140] Reznik E, Wang Q, La K *et al*. Mitochondrial respiratory gene expression is suppressed in many cancers[J]. *Elife*, 2017, 6
- [141] Knoedler JR, Denver RJ. Krüppel-like factors are effectors of nuclear receptor signaling[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2014, 203(49-59).
- [142] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. *Nature*, 2008, 451(7182):1069-1075.
- [143] Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N *et al*. Autophagy and apoptosis: where do they meet?[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(4):555-566.
- [144] Wu H, Che X, Zheng Q *et al*. Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(9):1072-1083.
- [145] Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution[J]. *Mol Cell Neurosci*, 1999, 14(3):180-198.

- [146] Walther TC, Chung J, Farese RV, Jr. Lipid droplet biogenesis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017, 33(491-510).
- [147] Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T *et al*. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46):44507-44512.
- [148] Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M *et al*. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels[J]. *Autophagy*, 2011, 7(7):727-736.
- [149] Mallette LE, Exton JH, Park. Effects of glucagon on amino acid transport and utilization in the perfused rat liver[J]. *J Biol Chem*, 1969, 244(20):5724-5728.
- [150] Nardi JB, Bee CM, Wallace CL. Remodeling of the abdominal epithelial monolayer during the larva-pupa-adult transformation of *Manduca*[J]. *Dev Biol*, 2018, 438(1):10-22.
- [151] Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years[J]. *Cell*, 2012, 148(6):1160-1171.
- [152] Patil MD, Bhaumik J, Babykutty S *et al*. Arginine dependence of tumor cells: targeting a chink in cancer's armor[J]. *Oncogene*, 2016, 35(38):4957-4972.
- [153] Tome D. The roles of dietary glutamate in the intestine[J]. *Ann Nutr Metab*. 2018. 73 Suppl 5(15-20).
- [154] Aw SS, Lim IKH, Tang MXM, Cohen SM. A glio-protective role of mir-263a by tuning sensitivity to glutamate[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(9):1783-1793.
- [155] Legendre F, MacLean A, Appanna VP, Appanna VD. Biochemical pathways to alpha-ketoglutarate, a multi-faceted metabolite[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2020, 36(8):123.
- [156] Choe SS, Huh JY, Hwang IJ *et al*. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, 7(30).
- [157] Goncharova EA. mTOR and vascular remodeling in lung diseases: current challenges and therapeutic prospects[J]. *FASEB J*, 2013, 27(5):1796-1807.
- [158] Tian L, Guo E, Wang S *et al*. Developmental regulation of glycolysis by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in fat body tissues of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *J Mol Cell Biol*, 2010, 2(5):255-263.
- [159] Aguila JR, Suszko J, Gibbs AG, Hoshizaki DK. The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*[J]. *J Exp Biol*, 2007, 210(Pt 6):956-963.
- [160] Hopp AK, Gruter P, Hottiger MO. Regulation of glucose metabolism by NAD(+) and ADP-ribosylation[J]. *Cells*, 2019, 8(8).
- [161] Merkey AB, Wong CK, Hoshizaki DK, Gibbs AG. Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*[J]. *J Insect Physiol*, 2011, 57(10):1437-1445.
- [162] Hou Y, Zhang Y, Gong J *et al*. Comparative proteomics analysis of silkworm hemolymph

during the stages of metamorphosis via liquid chromatography and mass spectrometry[J]. *Proteomics*, 2016, 16(9):1421-1431.

[163] Colgan TJ, Carolan JC, Bridgett SJ *et al*. Polyphenism in social insects: insights from a transcriptome-wide analysis of gene expression in the life stages of the key pollinator, *Bombus terrestris*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(623).

[164] White KP, Rifkin SA, Hurban P, Hogness DS. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis[J]. *Science*, 1999, 286(5447):2179-2184.

[165] Dutra BK, Fernandes FA, Nascimento JC *et al*. Intermediate metabolism during the ontogenetic development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007, 147(3):594-599.

[166] Dominick OS, Truman JW. The physiology of wandering behaviour in *Manduca sexta*. IV. Hormonal induction of wandering behaviour from the isolated nervous system[J]. *J Exp Biol*, 1986, 121(133-151).

[167] Zhao XF. Progress in understanding hormonal regulation during the postembryonic development of *Helicoverpa armigera*[J]. *J Integr Agr*, 2020, 19(6):1417-1428.

[168] Yang J, Roy A, Zhang Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(20):2588-2595.

[169] Yang J, Roy A, Zhang Y. BioLiP: a semi-manually curated database for biologically relevant ligand-protein interactions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue):D1096-1103.

[170] Di YQ, Zhao YM, Jin KY, Zhao XF. Subunit P60 of phosphatidylinositol 3-kinase promotes cell proliferation or apoptosis depending on its phosphorylation status[J]. *PLoS Genet*, 2021, 17(4).

[171] Hiruma K, Kaneko Y. Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2013, 103(73-100).

[172] Liu CY, Zhao WL, Wang JX, Zhao XF. Cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 promotes cell proliferation by insulin regulation[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(19):3045-3057.

[173] Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1):27-30.

[174] Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A *et al*. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(9):1887-1899.

[175] Miyamoto T, Lo PHY, Saichi N *et al*. Argininosuccinate synthase 1 is an intrinsic Akt repressor transactivated by p53[J]. *Sci Adv*, 2017, 3(5):e1603204.

- [176] Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA *et al.* Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(2):641-665.
- [177] Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI. Developmental expression of *Manduca* shade, the P450 mediating the final step in molting hormone synthesis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 247(1-2):166-174.
- [178] Treberg JR, Banh S, Pandey U, Weihrauch D. Intertissue differences for the role of glutamate dehydrogenase in metabolism[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(3):516-526.
- [179] Brosnan ME, Brosnan JT. Hepatic glutamate metabolism: a tale of 2 hepatocytes[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90(3):857S-861S.
- [180] Maniere G, Alves G, Berthelot-Grosjean M, Grosjean Y. Growth regulation by amino acid transporters in *Drosophila* larvae[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(21):4289-4297.
- [181] Suarez RK, Darveau CA, Welch KC, Jr. *et al.* Energy metabolism in orchid bee flight muscles: carbohydrate fuels all[J]. *J Exp Biol*, 2005, 208(Pt 18):3573-3579.
- [182] Soares JB, Gaviraghi A, Oliveira MF. Mitochondrial physiology in the major arbovirus vector *Aedes aegypti*: substrate preferences and sexual differences define respiratory capacity and superoxide production[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0120600.
- [183] Yang Z, Huang R, Fu X *et al.* A post-ingestive amino acid sensor promotes food consumption in *Drosophila*[J]. *Cell Research*, 2018, 28(10):1013-1025.
- [184] Tanigawa M, Suzuki C, Niwano K *et al.* Participation of d-serine in the development and reproduction of the silkworm *Bombyx mori*[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2016. 87(20-29).
- [185] Chantranupong L, Scaria SM, Saxton RA *et al.* The CASTOR proteins are arginine sensors for the mTORC1 pathway[J]. *Cell*, 2016, 165(1):153-164.
- [186] Chin RM, Fu X, Pai MY *et al.* The metabolite alpha-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR[J]. *Nature*, 2014, 510(7505):397-401.
- [187] Legendre F, Tharmalingam S, Bley AM *et al.* Metabolic adaptation and NADPH homeostasis evoked by a sulfur-deficient environment in *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(5):605-616.
- [188] Schlett K. Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis[J]. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6(10):949-960.
- [189] Stepulak A, Rola R, Polberg K, Ikonomidou C. Glutamate and its receptors in cancer[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014, 121(8):933-944.
- [190] Divakaruni AS, Wallace M, Buren C *et al.* Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death[J]. *J Cell Biol*, 2017, 216(4):1091-1105.
- [191] Smith HQ, Li C, Stanley CA, Smith TJ. Glutamate dehydrogenase, a complex enzyme at



- a crucial metabolic branch point[J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(1):117-132.
- [192] Brosnan JT. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism[J]. *J Nutr*, 2000, 130(4S Suppl):988S-990S.
- [193] Albaugh VL, Pinzon-Guzman C, Barbul A. Arginine-dual roles as an onconutrient and immunonutrient[J]. *J Surg Oncol*, 2017, 115(3):273-280.
- [194] Haines RJ, Corbin KD, Pendleton LC *et al*. Insulin transcriptionally regulates argininosuccinate synthase to maintain vascular endothelial function[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(1):9-14.
- [195] Spanaki C, Plaitakis A. The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism[J]. *Neurotox Res*, 2012, 21(1):117-127.
- [196] Zaganas I, Kanavouras K, Mastorodemos V *et al*. The human GLUD2 glutamate dehydrogenase: localization and functional aspects[J]. *Neurochem Int*, 2009, 55(1-3):52-63.
- [197] Zaganas I, Spanaki C, Plaitakis A. Expression of human GLUD2 glutamate dehydrogenase in human tissues: functional implications[J]. *Neurochem Int*, 2012, 61(4):455-462.
- [198] Plaitakis A, Kalef-Ezra E, Kotzamani D *et al*. The glutamate dehydrogenase pathway and its roles in cell and tissue biology in health and disease[J]. *Biology (Basel)*, 2017, 6(1).
- [199] Radzki RP, Bienko M, Pierzynowski SG. Effect of dietary alpha-ketoglutarate on blood lipid profile during hypercholesterolaemia in rats[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009, 69(2):175-180.
- [200] Hyun S. Body size regulation and insulin-like growth factor signaling[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(13):2351-2365.
- [201] Nijhout HF, Riddiford LM, Mirth C *et al*. The developmental control of size in insects[J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2014, 3(1):113-134.
- [202] Riddiford LM. Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1978, 34(4):438-446.
- [203] Weeks JC, Ernst-Utzschneider K. Respecification of larval proleg motoneurons during metamorphosis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: segmental dependence and hormonal regulation[J]. *J Neurobiol*, 1989, 20(6):569-592.
- [204] Champlin DT, Truman JW. Ecdysteroids govern two phases of eye development during metamorphosis of the moth, *Manduca sexta*[J]. *Development*, 1998, 125(11):2009-2018.
- [205] Nijhout HF, Smith WA, Schachar I *et al*. The control of growth and differentiation of the wing imaginal disks of *Manduca sexta*[J]. *Developmental Biology*, 2007, 302(2):569-576.

- [206] Tian L, Liu S, Liu H, Li S. 20-hydroxyecdysone upregulates apoptotic genes and induces apoptosis in the *Bombyx* fat body[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2012, 79(4-5):207-219.
- [207] Das R, Dobens LL. Conservation of gene and tissue networks regulating insulin signalling in flies and vertebrates[J]. Biochem Soc Trans, 2015, 43(5):1057-1062.
- [208] Iga M, Manaboon M, Matsui H, Sakurai S.  $\text{Ca}^{2+}$ -PKC-caspase 3-like protease pathway mediates DNA and nuclear fragmentation in ecdysteroid-induced programmed cell death[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 321(2):146-151.
- [209] Liu X, Dai F, Guo E *et al.* 20-hydroxyecdysone (20E) primary response gene E93 modulates 20E signaling to promote *Bombyx* larval-pupal metamorphosis[J]. J Biol Chem, 2015, 290(45):27370-27383.
- [210] Oral O, Akkoc Y, Bayraktar O, Gozuacik D. Physiological and pathological significance of the molecular cross-talk between autophagy and apoptosis[J]. Histol Histopathol, 2016, 31(5):479-498.