

Functional Characterization of Citrate Carrier in the Biosynthesis of Juvenile Hormone in Cockroach

Shicheng Zhang^{1,2}, Juan Huang²

¹College of Life Science of Hebei University, Baoding Hebei

²Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing

Email: huangjuan@ioz.ac.cn

Received: Mar. 8th, 2017; accepted: Mar. 26th, 2017; published: Mar. 29th, 2017

Abstract

Purpose: To determine the function of Citrate carrier (CiC) in the biosynthesis of Juvenile hormone in cockroach, *D. punctata*, and build a basic theory for pest control. **Methods:** The expression profile and tissue distribution of CiC were determined by qRT-PCR. Furthermore, the relationship between JH biosynthesis and CiC were investigated by knocking down the essential genes in JH biosynthesis pathway using RNAi. **Results:** CiC has the highest expression level in CA, which is the biosynthetic site of JH, and followed by Fb. CiC expression pattern in CA corresponds with JH biosynthesis in the CA of 0 - 7d after mated female. There is a down regulation in CiC expression after knocking down the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase and Juvenile hormone acid methyl transferase, two key genes that play essential roles in JH biosynthesis. **Conclusion:** Our result suggested CiC was involved in JH biosynthesis pathway, probably by mediating the transmembrane transport of Acetyl-CoA. Further investigate was needed to determine the accurate function of CiC.

Keywords

Citrate Carrier, Juvenile Hormone, *Corpora allata*, RNAi

柠檬酸转运载体在蟑螂保幼激素合成中的研究进展

张士成^{1,2}, 黄娟²

¹河北大学生命科学学院, 河北 保定

*通讯作者。

²中国科学院动物研究所, 北京
Email: huangjuan@ioz.ac.cn

收稿日期: 2017年3月8日; 录用日期: 2017年3月26日; 发布日期: 2017年3月29日

摘要

目的: 研究太平洋折翅蠅(*Diploptera punctata*)中一种柠檬酸转运载体(Citrate carrier, CiC)在保幼激素(juvenile hormone, JH)合成通路中的功能, 探讨该CiC与JH合成的关系, 为针对保幼激素途径进行的新型害虫防治提供理论依据。方法: 以太平洋折翅蠅为研究对象, 利用荧光定量PCR技术对CiC在不同器官及咽侧体不同发育时期的表达量进行分析。结果: 柠檬酸转运载体在合成保幼激素的主要场所咽侧体(Corpora allata, CA)中表达量最高, 其次是脂肪体(Fat body, Fb)。在雌性蟑螂交配后0~7天内, 咽侧体中CiC表达量与JH释放量成正相关。利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术对JH合成关键酶3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶和保幼激素酸甲基转移酶基因进行干扰后, CiC表达量明显下调。结论: CiC与JH合成通路密切相关, 其可能是通过介导乙酰辅酶A由线粒体到细胞质的跨膜运输, 影响JH的从头合成。

关键词

柠檬酸转运载体, 保幼激素, 咽侧体, RNAi

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle)又称 Krebs 循环, 是需氧生物体内普遍存在的代谢途径, 是糖类, 脂类和蛋白质三大营养物质代谢的联系通路[1]。真核生物的线粒体和原核生物的细胞质是三羧酸循环进行的场所。在真核生物中, 柠檬酸转运载体是一类定位于线粒体膜上的载体蛋白, 负责介导乙酰辅酶 A 由线粒体转运至细胞质, 参与三羧酸循环, 将三大营养物质经氧化磷酸化彻底氧化成二氧化碳和水并释放能量保证机体代谢的顺利进行, 同时乙酰辅酶 A 也可以作为中间物质参与到糖类, 脂肪酸及其它代谢物质的合成通路[2]。柠檬酸转运载体家族具有许多种类, 自从 1972 年第一个柠檬酸转运载体蛋白从大鼠肝脏线粒体被纯化出来[3], 到现在已有多种该类蛋白分别从人, 大鼠, 鳗鱼和酵母中被提取出来[2] [4] [5] [6]。虽然部分柠檬酸转运载体基因及蛋白一级结构已经被解析, 但对其功能研究大多是在哺乳动物中进行的[7] [8], 对昆虫体内 CiC 的功能研究相对较少。

保幼激素是由昆虫咽侧体产生的一种倍半萜类化合物, 其主要功能是分泌到血淋巴保持幼虫的特性、维持前胸腺和促进卵巢成熟, 调控昆虫的发育、变态和生殖等[9] [10] [11]。在昆虫体内, 存在多种保幼激素的同源物[12], 其中, 保幼激素III(JH III)最为普遍, 其合成途径为: 乙酰辅酶 A→甲羟戊酸→异戊烯醇焦磷酸→法尼焦磷酸→法尼酸→保幼激素 III。在该过程中, 多种关键酶精确调控每一步化学反应, 影响 JH III 合成。例如 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase, HMGR)和保幼激素酸甲基转移酶(Juvenile hormone acid methyl transferase, JHAMT)的活性均与

JH 合成呈线性关系[13]。虽然 JHIII 合成过程已研究的较为详尽, 但作为介导 JH 合成最初底物乙酰辅酶 A 跨膜运输的 CiC 是否会影响 JH 的合成, 目前还没人在模式昆虫太平洋折翅蠖中进行研究。因此本实验选择太平洋折翅蠖这一生活害虫为研究对象, 对 CiC 与 JH 合成的关系进行了探究, 不仅可以进一步解析昆虫 JH 合成通路, 又能够为有害昆虫防治提供理论基础。

2. 实验材料与方法

2.1. 昆虫饲养

太平洋折翅蠖在实验室恒温 27 摄氏度的黑暗环境中饲养培养, 为了得到同时期材料, 新蜕皮的雄性与雌性成虫挑出来分开培养取材。

2.2. 实验方法

2.2.1. 组织收集和 RNA 提取

取 *D. punctata* 在解剖显微镜下, 于缓冲液(150 mM NaCl, 12 mM KCl, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM HEPES 94, 40 mM glucose, pH 7.2)中解剖组织, 样品迅速用液氮冷冻, 放于-80℃保存。对每一个解剖的雌性样品, 通过测量初级卵母细胞长度来决定生理周期。为了测定不同组织中的 CiC 基因表达图谱, 选择交配后 4 天的成虫的脑(Brain, Br), 咽侧体, 脂肪体, 中肠(Midgut, MG), 马氏管(Malpighian tubules, MT), 神经索(Nerve cord, NC)和卵巢(Ovaries, OV)取样, 每个样品取 10 头昆虫的该组织, 取 3 个独立的生物学重复。为了得到咽侧体中不同时期的 CiC 基因表达图谱, 取交配后 0-7 天的雌性成虫咽侧体组织, 每天在相同时间点取样, 每个时间点取 3 次独立的生物学重复, 每个重复包括十头昆虫。将取好的样品按照 RNeasy Mini Kit (Qiagen)说明书提取组织总 RNA。由于咽侧体组织较少, 故用 RNAqueous®-Micro Kit (Ambion)进行 RNA 提取, 提出的 RNA 用 Dnase 处理后用 NanoDrop 2000c 分光光度计检测浓度, 选择 A260/280 在 1.8~2.0 的 RNA 样品进行反转录。

2.2.2. 反转录合成 cDNA

按照反转录试剂盒(Qiagen)说明书合成 cDNA: 首先去除 RNA 中混有的 DNA, 加入总 RNA 1 μg, 5×gDNA Eraser Buffer 2 μL, gDNA Eraser 1 μL, 无 RNA 酶水 5 μL, 在 42℃ 的条件下反应 3 min, 迅速置于冰上。另取新管加入 Prime Script RT Enzyme Mix I 1 μL, FQ-RT Primer Mix 2 μL, 10× Fast RT Buffer 2 μL, 无 RNA 酶水 5 μL 混匀后将上述两个体系混合, 共 20 μL, 然后按如下条件进行反应: 42℃ 15 min, 95℃ 3 min, 4℃ 5 min, 反应结束后得到 cDNA, -20℃ 保存。

2.2.3. 实时定量 PCR

qRT-PCR 反应体系: 2×SYBR Green qPCR Master Mix 10 μL, 上下游引物(引物浓度 10 mmol/L)各 0.8 μL, cDNA 2 μL, 超纯水 6.4 μL; 总体系 20 μL。反应条件: 95℃ 预变性 30s; 95℃ 15s, 60℃ 30s, 72℃ 30 s, 共 40 个循环; 熔解曲线设定为 70℃ 与 95℃, 以验证产物的特异性。每个样品均做 3 个技术重复, 以保证试验数据的准确性, β-Tubulin 作为内参, 定量引物如下:

引物名称	引物序列(5'-3')
CiC-F	GGATTGACGGGAGGAATAGA
CiC-R	TATTGCTTGGCAGCTGTACC
β-Tubulin-F	TTCCTTCCCTAGACTTCACTTC
β-Tubulin-R	CAGCAGCCACAGTCAAATACC

2.2.4. RNA 干扰

用干扰引物以咽侧体 cDNA 为模版扩增基因片段用于双链 RNA 载体构建。在同一基因的不同区域扩增两个不同片段以确保干扰效果。双链 RNA 使用 MEGAscriptRNAi kit (Ambion)按照说明书合成。

RNA 使用 T7 启动子进行转录, 37°C 过夜反应。反应产物用 DNase I 和 RNase 处理后, 根据说明书用固相吸附柱纯化, 得到的双链 RNA 浓度用 NanoDrop2000c 分光光度计进行检测, 完整性和聚合度通过跑 1.2% 的琼脂糖电泳进行检测。阴性对照使用 pJET 基因的非编码区为模版进行 RNA 双链合成。然后选用新蜕皮的交配过的雌性昆虫进行双链 RNA 注射, HMGR 双链 RNA 在第 0 天与第 2 天注射, JHAMT 双链 RNA 在第 1 天与第 3 天进行注射, 注射剂量均为每头 3 μg , 咽侧体组织在第 4 天进行收集。

干扰引物如下:

引物名称	F 引物(5'-3') R 引物(5'-3')
HMGR dsRNA	ACATGGACAGTTCTGTGCCT CCCAACTTTTGCAGATGACAG CACTTCTCGCATTGTGGCT CAGTACCCTTGGAGAGC
JHAMT dsRNA	AAAAGAGACGCAGCCCACGCA CGATCCTCGTGGGAACAGATG GTACAGCACGCCACCTCCA AACTACGGCACTCTGGAGC
Control dsRNA	TTGCGTCACTGCCAATTGC CTGGCCTTTTGCTCACATGTT

3. 结果与讨论

为了检测 CiC 在 *D. punctata* 组织中的分布情况, 对交配后四天的雌性与雄性的脑, 咽侧体, 脂肪体, 中肠, 马氏管, 神经索和卵巢中 CiC mRNA 表达量利用实时定量 PCR 技术进行测定, 结果显示 CiC 在咽侧体和脂肪体具有很高的表达量, 在其他组织中表达量较低, 其中在咽侧体中表达量最高, 在中肠中表达量最低(如图 1)。在人类 CiC 分布研究中, CiC 在肝脏, 肾脏和胰腺中具有高表达, 在心脏和骨骼肌中表达量偏低, 而在脑和肺中几乎未检测到 CiC 表达[14]。人体肝脏是脂肪酸合成的主要场所, 需要大量乙酰辅酶 A 作为合成底物, 故而 CiC 表达量最高, 以满足对乙酰辅酶 A 从线粒体转运至细胞质参与反应的需求。在太平洋折翅蠅中, 咽侧体是合成保幼激素的腺体, 脂肪体是合成昆虫脂肪酸的场所, 这两个过程均需消耗大量的乙酰辅酶 A, 所以与人类肝脏线粒体类似, 咽侧体线粒体中 CiC 也维持在较高水平, 而中肠并不参与上述合成过程, CiC 水平也较低。这一结果说明 CiC 通过转运 JH 合成底物乙酰辅酶 A 参与到了 JH 合成途径, 对 JH 合成有一定影响。

为了研究 CiC 与 JH 合成在咽侧体发育过程中的变化趋势, 取交配后 0~7 天的咽侧体材料, 对 CiC 表达量进行测定, 结果 CiC 表达量在 0~4 天时均呈上升趋势, 在 4 天时 CiC 表达量达到最高值, 在 4~7 天呈下降趋势(图 2)。而在相同处理的咽侧体中, JH 释放量与 CiC 表达量在上升与下降过程中趋势大体相似[15], 表明 CiC 参与 JH 合成, CiC 高表达可以促进 JH 合成。第二天 JH 合成量较第一天上升时, CiC 表达量出现短暂下降。我们推测原因可能是由于太平洋折翅蠅中 CiC 有许多种类, 在 JH 快速合成时, 我们研究的这种 CiC 已经无法满足 JH 合成对乙酰辅酶 A 的转运需求, 因此另一种或几种转运效率更高的 CiC 开始大量合成并发挥作用, 这些蛋白的突然大量表达, 可能会对其它同源蛋白的表达产生短暂影响。

所以我们检测的 CiC 表达量可能会出现短暂降低。

为了进一步验证 CiC 与 JH 合成之间的关系, 我们利用 RNAi 技术对 JH 合成通路中已知的两个关键酶 HMGR 和 JHAMT 基因进行干扰[13], 二者分别影响 JH 合成通路中甲羟戊酸与甲基法尼脂的合成[15]。

在 JH 合成大幅降低的情况下对咽侧体中的 CiC 表达量进行测定。实验结果显示：与对照组相比，处理组 CiC 表达量降低了 48% (如图 3)，存在极显著差异。因此，我们推测在 JH 合成受阻的情况下，咽侧体可能存在一种反馈调节机制可以反向调节咽侧体中 CiC 的表达量，减少乙酰辅酶 A 的跨膜外运，维持胞质中乙酰辅酶 A 与 JH 合成速率的平衡。从而进一步证明 CiC 与 JH 合成通路具有紧密联系。

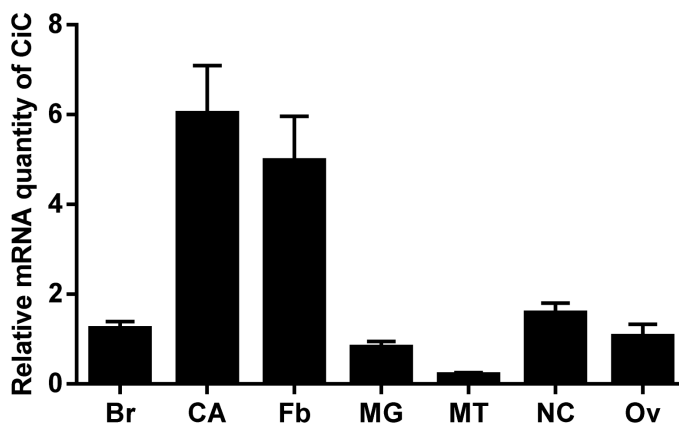


Figure 1. Tissue distribution of CiC in different tissues of the cockroach, *D. punctata*.

图 1. 太平洋折翅蠊不同组织中 CiC 的表达量分布

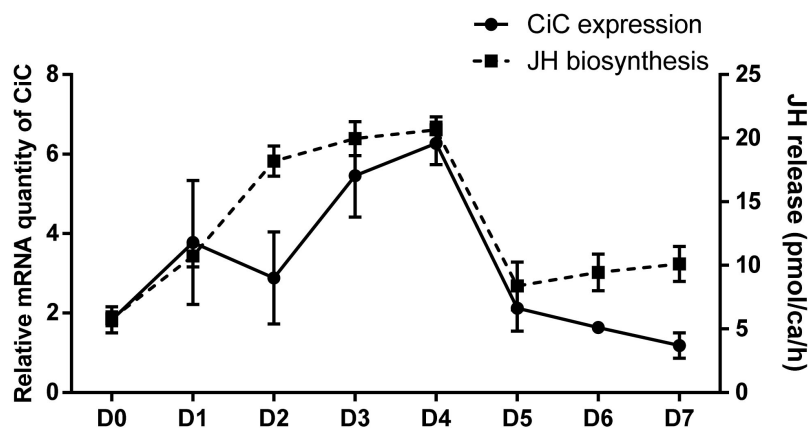


Figure 2. Expression of CiC and release of JH in CA of the first gonadotrophic cycles, mated female from day 0 - 7. Release of JH was cited from reference [15]

图 2. 交配后不同时期咽侧体 CiC 表达量与 JH 释放分布图, JH 释放引自参考文献[15]

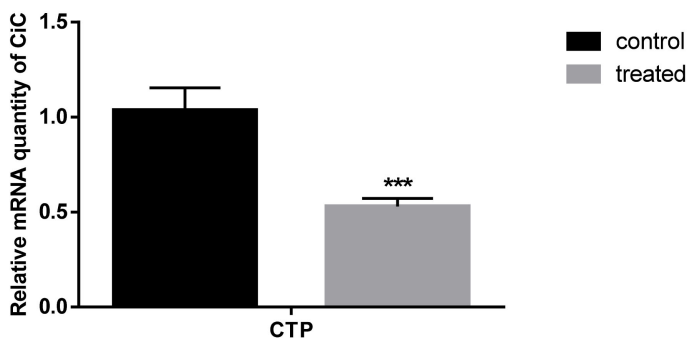


Figure 3. The expression of CiC in the corpora allata of cockroach

图 3. 咽侧体中 CiC 表达量

4. 结论与展望

柠檬酸转运载体在保幼激素合成器官咽侧体中具有高表达, 并且在咽侧体中表达量与 JH 释放量的变化趋势大致相似, 说明经由柠檬酸转运蛋白跨膜运输的乙酰辅酶 A 参与到了昆虫保幼激素合成途径。同时, 乙酰辅酶 A 又是三大营养物质代谢的中间产物, 对昆虫的三大物质循环和能量代谢至关重要。因此, CiC 对昆虫生长与发育也发挥重要作用。如今, 病媒生物控制是一个全球性的问题, 在世界重大疾病预防控制中占据重要地位, 是对病媒生物性传染病, 特别是对尚无有效疫苗控制的病媒生物性传染病一个非常重要的防控手段。蟑螂是四大生活害虫之一, 是多种病原微生物的传播媒介, 可以引发多种传染病, 并且具有种类多, 分布广, 繁殖快, 生存能力强, 危害性大, 难根除等特点。所以对蟑螂的生理生化研究不仅可以帮助解析昆虫的生理代谢机制, 更有助于研发新的害虫防治药物, 从而有利于人类健康。

保幼激素在昆虫生命周期中起重要作用, 以保幼激素合成通路中某一关键反应为突破点寻找药物靶标抑制保幼激素的合成, 或者将保幼激素类似物作为农药, 可以使昆虫发生代谢紊乱, 例如保幼激素类似物烯虫酯和吡丙醚可以使幼虫不能顺利完成化蛹及羽化, 从而有效控制虫害, 具有针对性强, 对人危害低, 绿色环保等特点。CiC 作为乙酰辅酶 A 跨膜运输载体, 不仅影响保幼激素的合成, 更是参与到昆虫三大营养物质代谢和能量代谢, 因此以 CiC 为切入点靶向设计新型杀虫剂, 将比仅仅阻碍保幼激素合成对害虫有更好的防治效果。需要注意的是柠檬酸转运载体可能包括多种可以转运乙酰辅酶 A 的蛋白, 因此需要更加深入和广泛地对 CiC 展开研究, 我们才能更加全面地了解 and 发掘它在害虫防治上的巨大潜质。

参考文献 (References)

- [1] Fernie, A.R., Carrari, F. and Sweetlove, L.J. (2004) Respiratory Metabolism: Glycolysis, the TCA Cycle and Mitochondrial Electron Transport. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.007>
- [2] Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Gremse, D.A. and Wood, D.O. (1995) High Level Expression and Characterization of The-mitochondrial Citrate Transport Protein from the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 4108-4114. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.4108>
- [3] Palmieri, F., Stipani, I., Quagliariello, E. and Klingenberger, M. (1972) Kinetic Study of the Tricarboxylate Carrier in Rat Liver Mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, **26**, 587-594. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb01801.x>
- [4] Zara, V., Iacobazzi, V., Siculella, L., Gnoni, G.V. and Palmieri, F. (1996) Purification and Characterization of the Tri-carboxylate Carrier from Eel Liver Mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **223**, 508-513. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0925>
- [5] Bisaccia, F., De Palma, A. and Palmieri, F. (1989) Identification and Purification of the Tricarboxylate Carrier from Rat Liver Mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, **977**, 171-176. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80068-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80068-4)
- [6] Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Johnston, N. and Oliveira, D.L. (1990) Purification and Characterization of the Reconstitutively Active Tricarboxylate Transporter from Rat Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 13379-13385.
- [7] Kaplan, R.S., Mayor, J.A. and Wood, D.O. (1993) The Mitochondrial Tricarboxylate Transport Protein. cDNA Cloning, Primary Structure, and Comparison with Other Mitochondrial Transport Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 13682-13690.
- [8] Zara, V., Dolce, V., Capobianco, L., Ferramosca, A., Papatheodorou, P., Rassow, J. and Palmieri, F. (2007) Biogenesis of Eel Liver Citrate Carrier (CIC): Negative Charges Can Substitute for Positive Charges in the Presequence. *Journal of Molecular Biology*, **365**, 958-967. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.077>
- [9] Hiruma, K. and Kaneko, Y. (2013) Hormonal Regulation of Insect Metamorphosis with Special Reference to Juvenile Hormone Biosynthesis. *Current Topics in Developmental Biology*, **103**, 73-100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00003-4>
- [10] Shelby, J.A., Madewell, R and Moczek, A.P. (2007) Juvenile Hormone Mediates Sexual Dimorphism in Horned Beetles. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **308**, 417-427. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21165>

-
- [11] Riddiford, L.M., Truman, J.W., Mirth, C.K. and Shen, Y.C. (2010) A Role for Juvenile Hormone in the Prepupal Development of *Drosophila Melanogaster*. *Development*, **137**, 1117-1126. <https://doi.org/10.1242/dev.037218>
- [12] Huang, J. (2014) Juvenile Hormone Biosynthesis in the Cockroach, *Diploptera Punctata*: The Characterization of the Biosynthetic Pathway and the Regulatory Roles of Allatostatins and NMDA Receptor. Ph.D. Thesis, University of Toronto, Toronto.
- [13] Couillaud, F. and Feyereisen, R. (1991) Assay of HMG-CoA Synthase in *Diploptera Punctata Corpora Allate*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **21**, 131-135.
- [14] Huizing, M., Ruitenbeek, W., van den Heuvel, L.P., Dolce, V., Iacobazzi, V., Smeitink, Jan A.M., Palmieri, F. and Frans Trijbels, J.M. (1998) Human Mitochondrial Transmembrane Metabolite Carriers: Tissue Distribution and Its Implication for Mitochondrial Disorders. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **30**, 277-284. <https://doi.org/10.1023/A:1020501021222>
- [15] Huang, J., Marchal, E., Hult, E.F. and Tobe, S.S. (2015) Characterization of the Juvenile Hormone Pathway in the Viviparous Cockroach, *Diploptera punctata*. *PLoS One*, **10**, e0117291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117291>

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: bp@hanspub.org