

分类号: Q78

密 级:

单位代码: 10422

学 号: 202112482



山东大学

SHANDONG UNIVERSITY

硕士学位论文

Thesis for Master Degree

论文题目: 20-羟基蜕皮酮通过上调基质金属蛋白酶 2
表达促进棉铃虫变态时期脑的发育

**20-hydroxyecdysone promotes brain development
during metamorphosis of *Helicoverpa armigera* by
upregulating matrix metalloproteinase 2 expression**

作者姓名	田灿
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	

2024 年 5 月 30 日

摘 要

研究背景及科学问题:

基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteases, MMPs) 是一类维持细胞外基质正常结构及功能所必需的蛋白水解酶, 对于组织重塑具有重要作用, 但其表达调控机制尚不完全清楚。棉铃虫是广泛分布的世界性农业害虫, 属于完全变态昆虫, 在变态发育中, 幼虫脑要长大为成虫的脑, 形态发生显著变化, 是研究动物脑胚后发育的良好材料。昆虫变态发育过程中会受蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 调控。20E 通过核受体 (Ecdysone Receptor, EcR) 促进下游基因表达, 从而促进变态发育, 但 20E 对变态期脑发育的调控机制亦不清楚。本研究以棉铃虫为实验材料, 研究 MMP2 在变态期脑发育中的作用及 20E 对 MMP2 表达的调控, 从而阐明昆虫变态期脑发育的分子机制, 为类固醇激素调控动物脑胚后发育提供新的知识, 为害虫控制提供新的靶标。

研究结果:

通过生物信息学分析在棉铃虫基因组找到三种 MMPs: MMP2、MMP14 和 MMP25。通过 qRT-PCR 发现 MMP2 在变态期的脑中高表达, 因此将其选定为本论文研究的靶标基因。制备 MMP2 的兔源多克隆抗体, 通过检测 MMP2 在变态发育中的表达模式, 证明 MMP2 在变态期的脑中高表达。利用脑整体免疫组化实验发现 MMP2 定位于脑中。利用虫体 RNA 干扰实验发现, 敲降 *Mmp2* 会引起脑细胞自噬、抑制脑细胞增殖、抑制脑生长, 并且脑中的葡萄糖和谷氨酸水平下降, 葡萄糖和谷氨酸转运蛋白表达下降, 说明 MMP2 为脑细胞增殖、营养物质供应及脑生长发育奠定基础。利用网站预测到 *Mmp2* 的启动子区域有叉头盒转录因子 O (Forkhead box transcription factor O, FOXO) 的结合元件 (FOXO-binding element, FOXOBE, 序列 5' -TTGTTTAC-3') 序列。通过 20E 刺激和双荧光素酶报告实验进一步证明 20E 通过转录因子 FOXO 上调 *Mmp2* 的转录。

结论及意义:

该研究发现 MMP2 为脑细胞增殖、营养物质供应及脑生长发育奠定基础, 阐明了类固醇激素 20E 通过转录因子 FOXO 促进 *Mmp2* 转录, 为类固醇激素调控组织重塑提供新的知识, 为棉铃虫控制提供了新的思路和靶标基因, 具有重要的理论意义和实践价值。

关键词: 昆虫变态发育; 基质金属蛋白酶; 20-羟基蜕皮酮; 细胞增殖; 营养供给; 脑生长发育

ABSTRACT

Research Background and scientific issues:

Matrix metalloproteases (MMPs) are a class of proteolytic enzymes which are necessary to maintain the normal structure and function of extracellular matrix. MMPs are widely distributed in the animal and plant world and can degrade almost all extracellular matrix components and peptide hormones such as collagen, fibronectin, elastin, and proteoglycan. MMPs play an important role in tissue remodeling, but the regulatory mechanism of their expression is not fully understood. *Helicoverpa armigera* (*H. armigera*) belongs to the Lepidopteran Noctuidae. It is a holometabolous insect. During metamorphosis, the larval brain will grow to the adult brain, and the morphology will change significantly. Insect metamorphosis is mainly regulated by the steroid hormone 20-hydroxyecdysone (20E). 20E promotes the expression of downstream genes through nuclear receptors (ecdysone receptors, EcR), and thus promotes metamorphosis. However, the regulatory mechanism of 20E on brain development during metamorphosis is still unclear. In this study, we investigated the role of MMP2 in brain development during metamorphosis and the regulation of MMP2 expression by 20E in *H. armigera*, thereby clarifying the molecular mechanism of brain development during metamorphosis, providing new knowledge on the regulation of steroid hormones on animal brain post-embryo development, and providing new targets for the pest control.

Research Results:

Three MMPs, MMP2, MMP14 and MMP25, were identified in the *H. armigera* genome by bioinformatics analysis. MMP2 was found to be highly expressed in the brain during metamorphosis by qRT-PCR, so it was selected as the target gene for further study. The rabbit polyclonal antibody against MMP2 was prepared and the expression pattern of MMP2 was detected. It was proved that MMP2 was highly expressed in the brain during metamorphosis. Whole-brain immunohistochemistry showed that MMP2 was localized in the brain. In vivo RNA interference experiments showed that knockdown of *Mmp2* caused autophagy, inhibited brain cell proliferation, inhibited brain growth, decreased glucose and glutamate levels, and decreased the expression of glucose and glutamate transporters in the brain, indicating that MMP2 is the basis for brain cell proliferation, nutrient supply, brain growth and development. Using the website prediction, we found Forkhead box transcription factor O (FOXO) binding element (FOXOBE) 5' -TTGTTTAC-3' in the promoter region of *Mmp2*. Furthermore, 20E stimulation and dual luciferase reporter assay demonstrated that 20E upregulated *Mmp2*

transcription through the transcription factor FOXO.

Conclusions and significance:

This study revealed that MMP2 presents the basis of brain cell proliferation, nutrient supply, brain growth and development. It also demonstrated that steroid hormone 20E promotes *Mmp2* transcription through transcription factor FOXO, which provides new knowledge for steroid hormone regulation of tissue remodeling and new ideas and target genes for *H. armigera* control, which has important theoretical significance and practical value.

Key words: Insect metamorphosis; Matrix metalloproteinases; 20-hydroxyecdysone; Cell proliferation; Nutrient supply; Brain growth and development

目 录

1 绪论.....	1
1.1 基质金属蛋白酶.....	1
1.1.1 基质金属蛋白酶的功能.....	1
1.1.2 基质金属蛋白酶的活化.....	3
1.1.3 基质金属蛋白酶在昆虫发育中的作用及转录表达	3
1.2 昆虫变态发育中的脑.....	5
1.2.1 脑的胚后发育.....	5
1.2.2 血脑屏障及物质运输.....	6
1.2.3 葡萄糖为脑的发育提供能量.....	7
1.3 20E 调控变态发育	8
1.4 本论文的科学问题及研究方案	10
2 20-羟基蜕皮酮通过上调基质金属蛋白酶 2 表达促进棉铃虫变态时 期脑的发育	11
2.1 引言.....	11
2.2 实验材料.....	11
2.2.1 实验动物.....	12
2.2.2 实验试剂.....	12
2.2.3 实验仪器.....	12
2.3 实验方法.....	12
2.3.1 生物信息学分析.....	12
2.3.2 虫体 RNA 提取	13
2.3.3 cDNA 合成	13
2.3.4 基因克隆.....	13
2.3.5 PCR 产物酚-氯仿抽提.....	14
2.3.6 qRT-PCR	14
2.3.7 兔源多克隆抗体制备.....	15
2.3.8 免疫印迹.....	16
2.3.9 免疫组织化学.....	16
2.3.10 虫体干扰.....	16
2.3.11 谷氨酸含量检测.....	17
2.3.12 葡萄糖含量检测.....	17
2.3.13 20E 虫体激素刺激	18
2.3.14 细胞重组质粒构建以及细胞系转染.....	18
2.3.15 Luciferase 检测.....	18

2.3.16 统计.....	18
2.4 实验结果.....	19
2.4.1 棉铃虫 MMP2 的鉴定	19
2.4.2 基因筛选差异性表达的 Mmp2.....	22
2.4.3 MMP2 的原核表达及抗体制备	22
2.4.4 MMP2 在脑中表达水平最高,在变态期表达增加	23
2.4.5 MMP2 定位于脑中	24
2.4.6 虫体敲降 Mmp2 抑制了成虫脑的发育及变态发育.....	25
2.4.7 敲降 Mmp2 导致脑中葡萄糖和谷氨酸水平降低.....	27
2.4.8 敲降 Mmp2 抑制脑细胞增殖并引起脑细胞自噬、降低 GLUT 和 GT 表达	28
2.4.9 20E 通过 FOXO 上调 Mmp2 的转录表达	31
2.5 讨论.....	34
2.5.1 MMP2 为脑细胞增殖提供空间	35
2.5.2 MMP2 增加脑的营养供给	35
2.5.3 20E 通过 FOXO 促进 Mmp2 的转录	36
2.6 结论及创新点总结.....	36
参考文献.....	38

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
bp	Base Pair	碱基对
BBB	blood-brain barrier	血脑屏障
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
<i>dsRNA</i>	Double-stranded RNA	双链 RNA
ECM	Extra Cellular Matrix	细胞外基质
EcR	Ecdysone receptor	蜕皮激素受体
EcRE	Ecdysone receptor response element	蜕皮激素受体应答元件
FOXO	Foxhead box protein O	叉头框蛋白 O
FOXOBE	FOXO binding element	FOXO 结合元件
g	Centrifugal force	离心力
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
h	Hour (s)	小时
IPTG	Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
kDa	Kilodalton	千道尔顿
MMP	Matrix metalloproteases	基质金属蛋白酶
min	Minute (s)	分钟
PBS	Phosphate-buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PMSF	Phenyl methane sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
pH	Pondus hydrogenii	酸碱度

RFP	Red fluorescent protein	红色荧光蛋白
s	Second (s)	秒
TBS	Tris buffered saline	Tris-HCl 缓冲盐溶液
qRT-PCR	Real-time quantitative PCR	实时定量 PCR

1 绪论

1.1 基质金属蛋白酶

1.1.1 基质金属蛋白酶的功能

基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteases, MMPs) 是一类水解细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 的蛋白水解酶, 负责新陈代谢和组织重构, 几乎能降解所有的 ECM 成分和肽类激素^[1]。ECM 是复杂网架动态结构, 由间质基质和基底膜构成^[2], 间质基质是松散的胶原纤维网络结构^{[3] [4]}。在结构上, MMPs 具有高度同源性, 通常由信号肽 (Signaling peptide region)、前肽结构区 (Pro-peptide domain)、催化活性结构区 (Catalytic domain)、铰链区 (Hinge region)、C 末端类血红蛋白结合区 (Hemopexin-like C-terminal domain) 以及跨膜区 (Transmembrane domain) 等结构组成 (图 1-1) ^[5]。但是 MMPs 在结构域排列上也存在差异, 例如, MMP7 和 MMP26 缺乏铰链区和 C 末端类血红蛋白结合蛋白区, MMP23 具有免疫球蛋白样结构域, MMP2 和 MMP9 具有额外的纤维连接蛋白 II 型相关结构域^[6]。在分类上, MMPs 根据其底物特异性和结构域的组织结构分为胶原酶 (Collagenases)、膜型 MMPs (Membrane-type MMPs) 等^[7]。胶原酶包括 MMP1、MMP8 和 MMP13, 底物有 I、II、III、V、IX 型胶原蛋白、巢蛋白和纤维粘连蛋白^[8]。膜型 MMPs 包括含有跨膜结构域的 MMP14、MMP15、MMP16 和 MMP24 以及含有糖基磷脂酰肌醇化蛋白 (Glycophosphatidylinositol, GPI) 的 MMP17 和 MMP25。MMPs 成员在上述结构的基础上各有特点^{[9] [10]}。

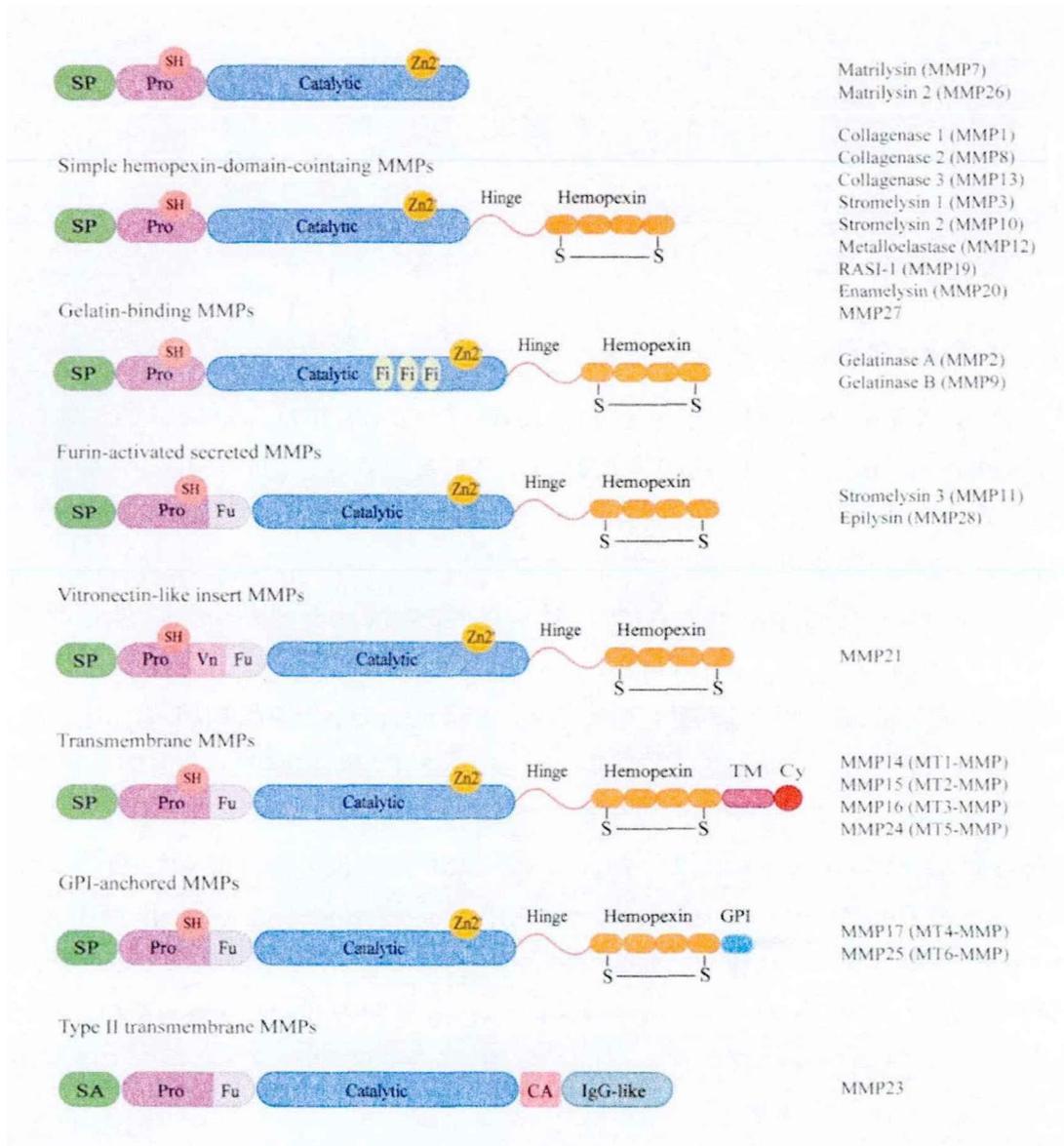


图 1-1 基质金属蛋白酶家族的分类和结构^[5]

Fig. 1-1 Classification and structure of the matrix metalloproteinase family

注：SP:信号肽，Pro: 前肽区，Fu: 弗林蛋白酶酶切位点，TM: 跨膜区，Cy: 细胞质结构域，GPI: 糖基磷脂酰基醇锚。

Notes: SP: Signaling peptide region, Pro: Pro-peptide domain, Fu: Furin-recognition site, TM: Transmembrane domain, GPI: Glycosylphosphatidylinositol.

MMPs 可以降解细胞外基质，与肿瘤的生长、发展密切相关^{[11][12]}。细胞通过 ECM 时，它们能够破坏旧的间质基质，并形成新的间质基质^[13]。最后，MMPs 可作用于 ECM 成分以发现隐藏的生物活性^[14]。例如，血管生成抑制剂血管抑制素可由纤溶酶原通过 MMPs 作用产生，而层粘连蛋白-5 可被 MMP2 特异性降解以产生可溶性趋化片段^[15]。因此，MMPs 在促进肿瘤细胞转移中发挥了关键作用，设计用于干扰特定 MMP 作用的

疗法对转移性疾病的控制卓有成效^[16]。MMPs 还能够通过降解 ECM 从而影响神经元的形态和功能,在调控突触可塑性、神经发生等多种生理过程中发挥作用^[17]。MMPs 的表达和活性常常发生改变^[18]。例如,在阿尔茨海默病中,炎症反应和细胞外基质的降解会导致 MMPs 的过度表达,进而促使神经元丧失和认知功能下降。同样,在帕金森病中,MMPs 的异常表达和活性也与病程进展和神经元死亡密切相关^[19]。因此,MMPs 在神经系统中发挥着重要作用,研究 MMPs 在神经系统中的作用机制,有助于更深入地了解神经系统的调控机制^[20]。

1.1.2 基质金属蛋白酶的活化

MMPs 是一类具有关键生物学功能的酶,通常以酶原形式分泌,在多个水平上受到调控^[21]。MMPs 具有两个关键的结构基序,锌结合活性位点域和前肽结构域中的保守序列,这些基序在酶的结构和功能上起着至关重要的作用^[22]。锌结合活性位点域是 MMPs 的催化中心,能够与锌离子结合。前肽结构域中包含半胱氨酸开关“PRCGV/NPD”的保守序列,是 MMPs 家族成员之间相互识别和相互作用的重要结构域^[23]。当其他蛋白水解酶切割前肽结构域时,半胱氨酸开关被去除,在这个过程中释放出游离的锌离子,随后游离的锌离子与 MMPs 的活性位点结合,形成锌-半胱氨酸键,从而活化 MMPs^[24]。此外,MT-MMPs 也可以在细胞内被内肽酶活化,并切割活化其他酶原^[25]。除了被其他蛋白水解酶切割前肽结构域外,MMPs 还可以被一些物理化学试剂和纤溶酶活化。例如,钙离子和镁离子可以与 MMPs 结合,促进其活化。某些金属离子(如镍和钴)也可以活化 MMPs^[26]。此外,一些有机化合物(如苯酚和甲苯)和物理因素(如高温和酸碱度变化)也可以刺激 MMPs 的活化^[27]。内源性组织金属蛋白酶抑制剂(Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)是一类与 MMPs 相互作用的蛋白质,可以形成非抑制性复合物,从而调节 MMPs 的活性。TIMPs 可以结合到 MMPs 的活性位点上,从而阻止 MMPs 与其他底物结合,也可以通过其他机制抑制 MMPs 的活性^[28]。因此,TIMPs 可以在维持组织稳态和预防疾病进展中发挥重要作用。MMPs 的活化和抑制是一个复杂的过程,涉及到多种因素的相互作用,一些 MMPs 也可以活化家族中其他成员^[29]。这种活化作用可以通过多种方式实现,例如通过与目标 MMPs 结合或者直接的蛋白之间相互作用^[30]。这种活化作用对于多种生物学过程都至关重要,例如细胞分化、发育、炎症和肿瘤形成等^[5, 31]。

1.1.3 基质金属蛋白酶在昆虫发育中的作用及转录表达

在昆虫生命周期中,变态发育是至关重要的阶段。在果蝇变态发育过程中,脂肪体细胞分解是一个复杂的过程,需要 MMPs 的协同作用^[32]。果蝇中的 MMPs 包括 MMP1 和 MMP2, MMP1 负责脂肪体细胞外膜的降解, MMP2 则负责脂肪体细胞内膜的降解,从而引发脂肪体细胞的分解^[33]。如果 MMPs 表达失调可能会导致果蝇变态发育异常,进

而影响果蝇的生长发育^[34]。

MMPs 在神经系统发育过程中发挥一定功能。研究发现,在神经系统发育的早期阶段,果蝇胚胎中的神经元会经历一系列形态和功能上的变化,从而形成一个高度有序的神经网络^[35]。在这一过程中,MMPs 通过降解神经元周围的细胞外基质调整神经元之间的相互作用,进而影响神经元的迁移和定位^[36]。MMP2 作为 MMPs 家族的一员,对于运动神经元的迁移和束缚具有至关重要的作用,在神经系统发育过程中具有显著的生物学意义^[37]。MMP2 能够促使运动神经元从神经管内向肌肉组织迁移,从而确保神经元能够准确地连接到目标肌肉。此外,MMP2 还能促进神经元之间的相互作用,使神经元能够有效地传递信号。研究表明,如果 MMP2 表达受到抑制,会导致神经元迁移和束缚过程受阻,进而影响神经系统的正常发育。研究还发现,MMPs 对神经细胞的存活和再生能力具有双向作用^[38]。MMPs 可以促进神经细胞存活,在神经细胞受损时,MMPs 能够降解细胞外基质,从而减轻神经细胞的压力,有利于神经细胞的修复和再生^[39]。此外,MMPs 还可以通过调节信号通路,促进神经细胞的存活和功能的维持。然而,MMPs 同时也具有抑制神经细胞存活的效应^[40]。过度的 MMPs 激活会导致神经细胞外基质过度降解,从而引发细胞骨架重塑、细胞凋亡等现象。此外,不同亚型的 MMPs 对神经细胞存活和再生的影响也有所差异^[41]。例如,MMP2 和 MMP9 主要参与炎症反应,激活时会抑制神经细胞的存活和再生;而 MMP3 和 MMP14 则对神经细胞具有一定的保护作用^[42]。综上所述,MMPs 对神经细胞的存活和再生能力具有双向作用,在神经损伤和修复过程中,精确调控 MMPs 的表达和激活程度,将有助于优化神经细胞的生存环境,促进损伤神经细胞的再生与修复。因此,深入研究 MMPs 在神经细胞中的作用机制具有重要意义^[43]。

目前 MMPs 的转录表达仍存在许多未知之处,但是研究报道炎症信号和多个转录因子在其中发挥了关键作用。炎症信号可以通过激活核因子- κ B (NF- κ B) 等转录因子来促进 MMPs 的表达^[44]。而且,细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-17 (IL-17) 可以通过激活 NF- κ B 途径来调节 MMP9 的表达。转录因子激活蛋白-1 (AP-1) 和构成性转录因子 (SP1) 等转录因子可以结合到 MMPs 基因的启动子上,从而促进其转录。而转录因子 YIN-YANG 1 (YY1) 和 SIN3 转录调控蛋白家族成员 A (Sin3A) 等染色质重塑因子则可以通过改变染色质的结构来调节 MMPs 的表达^[45]。同时,在不同类型的细胞中,MMPs 的转录表达也会受到环境因素的影响,ECM 的降解产物可以作为配体促进 MMPs 的表达^[46]。而细胞内代谢产物乳酸和 H_2O_2 等也可以通过激活不同的信号通路来调节 MMPs 的表达。这些调节机制相互作用,使得 MMPs 的表达在不同细胞类型中发生相应的变化,从而参与到多种生物学过程中,然而 MMPs 具体的调控机制以及激素调控目前仍有待研究^[47]。

1.2 昆虫变态发育中的脑

1.2.1 脑的胚后发育

昆虫的脑主要由前脑（Protocerebrum, PC）、中脑（Deutocerebrum, DC）和后脑（Tritocerebrum, TC）组成^[48]。前脑是一个高度复杂的神经中枢，由三个主要部分组成：视叶（Optic lobe, OL）、蕈形体（又称蘑菇体，Mushroombody, MB）和中央体（Central body, CB），这些部分各自担负着不同的功能共同协作，使得昆虫能够感知环境、学习记忆以及进行定向运动^[49]。视叶负责接收和处理来自眼睛的信息。它包含许多神经元，能够识别不同的形状、颜色和纹理，并帮助昆虫判断物体的位置、距离和速度，对于昆虫的觅食、避障、寻找配偶和繁殖都非常重要。蘑菇体是学习和记忆中心，负责处理和存储来自外部环境的感官信息，以及来自内部生理状态的信息^[50]。蕈形体杯口上面有大量的神经元细胞体^[51]。中央体是运动定向中心，负责控制昆虫的运动和姿势^[52]。它能够接收来自感觉器官的信息，如触角、肌肉和关节的感受器，并调节昆虫的运动和姿势，以适应不同的环境和行为需求^[53]。中脑是昆虫神经系统的关键部位之一，包括触角叶（Antennal lobe, AL）和围咽神经索。触角叶是昆虫的嗅觉中枢，对于昆虫的感知和识别外界环境中的气味具有至关重要的作用^[9]。棉铃虫成虫的触角叶相对较大，且具有上万个感受器，这使得它们能够更加敏锐地感知周围的环境，并迅速做出反应^[54]。除了嗅觉功能外，触角叶还参与了昆虫的许多行为，如寻找食物、寻找配偶、识别同种和异种个体等^[55]。因此，触角叶是昆虫感知和适应环境的重要器官之一。后脑通过围咽神经索与咽下神经节紧密相连。咽下神经节由3个神经节融合而成，这些神经节分别与幼虫的口器附肢相接，协同完成昆虫的进食活动^[56]。此外，后脑还与额神经和上唇神经相连，这些神经负责传递感觉信息，使昆虫能够感知外部环境的变化^[57]。烟草天蛾等昆虫的味觉受体神经元也投射到后脑^[58]。这说明昆虫可以通过后脑感知和分辨不同的味道，进而调整自己的进食行为。这种高度敏感的味觉系统，对于昆虫寻找食物和避免有毒物质具有重要意义^[59]。与此同时，后脑还与昆虫的触角和腿部等其他感觉器官相连接，使得昆虫能够全面地感知周围的环境。通过这些神经连接，昆虫可以迅速作出反应，以适应不断变化的外界条件^[60]。

昆虫的神经系统在变态发育过程中会发生显著的变化，这一过程涉及到幼虫神经元的死亡和成体特异性神经元的生成^[61]。这种变化是昆虫生命周期中至关重要的一个环节，它使得昆虫能够从幼虫阶段顺利过渡到成虫阶段，从而完成生命的延续。幼虫神经元的死亡为新神经元的生成让出空间，并为神经系统向成体特异性神经元的发展奠定基础^[62]。同时，死亡神经元的清除也有助于减轻幼虫体内神经元的负担，提高生命活动的效率^[63]。在幼虫神经元死亡的基础上，新的神经元开始生成，并逐渐形成具有成虫特征的神经系统。这些成体特异性神经元在昆虫的感知、运动和内分泌等方面发挥着重要作用，帮助

昆虫适应新的生活环境，提高生存和繁殖能力^[64]。在变态发育过程中，20-羟基蜕皮酮（20-hydroxyecdysone, 20E）通过调控昆虫的基因表达和细胞命运，调控神经系统的发育和功能^[65]。此外，20E还可以与其他激素和信号通路相互作用^[66]。因此，昆虫神经系统在变态发育过程中的变化是一个复杂的过程，涉及神经元的死亡和新生、激素调控等多个方面，20E在变态期脑发育中的功能及分子机制仍有待研究^[67]。

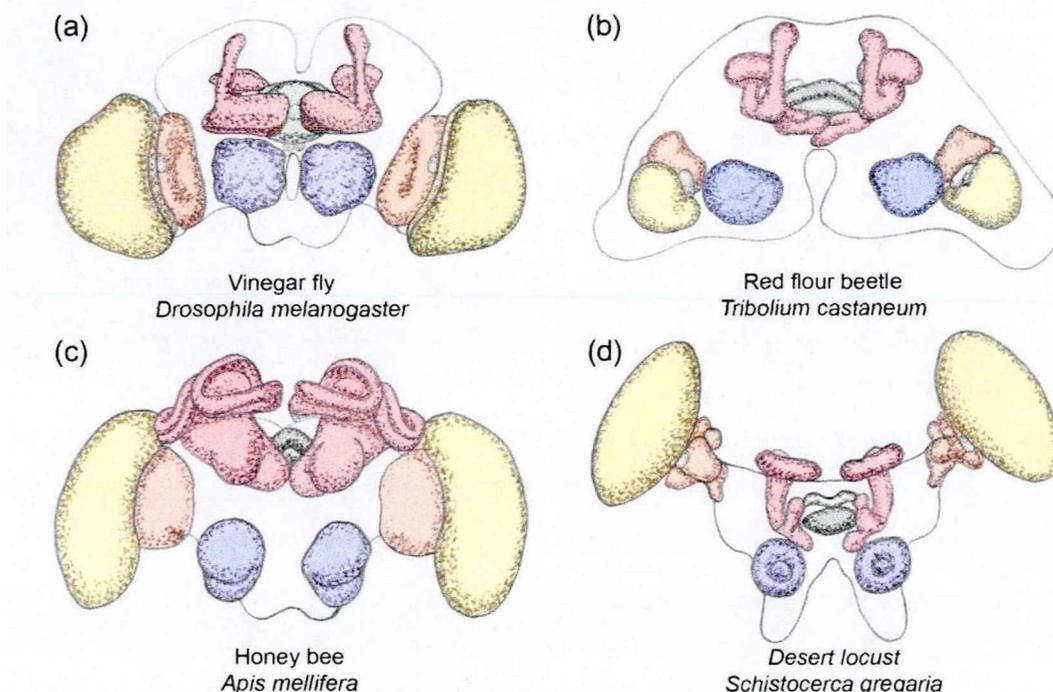


图 1-2 成年昆虫的脑^[60]

Fig. 1-2 Adult insect brains

注：蓝色：触角叶，红色：蘑菇体，黄色：视叶板，橙色：视叶小叶，绿色：中央复合体。

Notes: Blue: antennal lobes, Red: mushroom bodies, Yellow: lamina of optic lobes, Orange: lobula of optic lobes, Green: central complex.

1.2.2 血脑屏障及物质运输

血脑屏障（Blood Brain Barrier, BBB）能够通过血液循环系统与神经系统之间的交互作用，调节离子、分子和细胞在大脑和血液之间的运动^[68]。哺乳动物的血脑屏障包括ECM和调节层（神经周围胶质细胞（Pericyte neuroglial, PG）和周细胞（Pericyte, PC））以及屏障层（内皮细胞（Endothelial, EC））^[69]。果蝇的血脑屏障由两层胶质层组成。第一层PG相互连接形成具有隔膜连接的上皮样结构，类似于哺乳动物脑中的EC。另一层PG包含紧密连接（Tight junction, TJ），被认为是一种血淋巴传感器^[70]。物质运输穿过血脑屏障入脑的方式包括自由扩散、协助扩散和主动运输等，小分子溶质进入血脑屏障的方式是自由扩散，但必须同时具有亲脂性高和电负性低等特点^[71]。葡萄糖是脑组

织代谢的主要能源，难以通过自由扩散穿过血脑屏障，需要借助葡萄糖载体蛋白通过协助扩散和主动运输进入脑中，为脑的生长发育提供能量^[72]。

研究发现 MMPs 在血脑屏障的生理和病理过程中发挥着重要作用。MMPs 参与维持血脑屏障的完整性，通过降解 BM 中的 TJ 增加血脑屏障的通透性，进而影响脑的健康状态^[73]。TJ 是由多种蛋白组成的复合物，主要由闭锁蛋白(Occludin)、密封蛋白(Claudin)、膜周蛋白家族(Zona Occludens, ZO)等^[74]。而且 MMPs 在疾病进展中可能发挥关键作用。例如，在阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病中，MMPs 的表达异常升高，可能导致血脑屏障损伤、炎症反应加剧以及神经细胞死亡等病理变化，进而推动疾病的发展^[75]。因此，研究 MMPs 在脑和血脑屏障生理和病理过程中的作用机制，有助于揭示大脑疾病的发生机制，并为治疗提供新的思路和方法^[76]。

1.2.3 葡萄糖为脑的发育提供能量

葡萄糖，作为一种简单而重要的碳水化合物，是生物体细胞获取能量的主要来源^[77]。在人体内，葡萄糖经过一系列的代谢过程，生成 ATP 分子，为细胞提供能量，维持其正常的生理功能^[78]。对于大脑和神经系统来说，葡萄糖更是不可或缺的能源，因为它直接参与大脑的信息处理和神经元之间的信号传递。大脑对葡萄糖的需求量极大，约占人体总能量需求的 20%，这也使得大脑对葡萄糖水平的变化极为敏感^[79]。葡萄糖水平的短暂下降，就可能导致大脑功能受损，出现认知能力下降、注意力不集中、情绪波动等症状^[80]。因此，保持葡萄糖水平的稳定，对维持大脑的正常功能和神经系统的健康至关重要。脑中的葡萄糖主要来源于血淋巴，葡萄糖需要穿过血脑屏障进入脑中，然而，葡萄糖需要借助细胞膜上的葡萄糖转运蛋白(Glucose transporters, GLUTs)才能进入细胞^[81]。GLUTs 作为一种跨膜蛋白，能够将葡萄糖从细胞外转运到细胞内，为细胞提供能量和原料。根据转运机制的不同，葡萄糖转运可以分为主动运输和协助扩散两种类型^[82]。当细胞外的钠离子浓度较高时，钠依赖葡萄糖转运体会被激活从而主动运输促进葡萄糖的转运，这种方式转运葡萄糖的速率较快，但转运量受到细胞外钠离子浓度的限制。协助扩散不需要消耗细胞内能量，葡萄糖转运体直接通过细胞膜上的通道蛋白介导葡萄糖的转运，这种方式的转运速率相对较慢^[83]。葡萄糖经糖酵解反应产生的大量 ATP 分子，这些 ATP 分子是细胞内能量的主要来源，对于维持正常的生理功能至关重要。这个过程在人体内发挥着至关重要的作用^[84]。研究表明，在果蝇衰老过程中，果蝇脑中神经元细胞内葡萄糖含量减少，葡萄糖转运蛋白表达量降低，糖酵解的相关基因表达减少，反应的速率减缓，产生的 ATP 分子数量减少，这对果蝇的生理和行为产生重要影响，减少的 ATP 分子会影响神经元的活动，导致认知和运动能力的下降，减少的糖酵解反应会导致果蝇体内代谢产物的积累，从而对健康产生负面影响^[85]。这一发现说明神经元通过增加葡萄糖摄取，维持细胞内 ATP 水平，延缓衰老。

谷氨酸是一种重要的氨基酸，是脑中最丰富的游离氨基酸，在神经系统功能方面具有显著作用^[86]。谷氨酸参与脑中的突触传递、兴奋性神经递质的释放以及抑制性神经递质的合成，在正常的神经信号传导过程中发挥重要作用，能够调节神经元的兴奋性和抑制性^[87]。研究表明，果蝇神经系统中的 *mir-263a* 能够通过精确调控谷氨酸受体水平，向神经胶质细胞传递信号，维持中枢神经系统的健康。谷氨酸也是脑中重要的供能物质，谷氨酸可以通过三羧酸循环（Tricarboxylic acid cycle, TCA 循环）产生能量^[88]。脑中的谷氨酸含量高，但是谷氨酸难以通过血脑屏障，脑内谷氨酸大多来源于自身合成，包括葡萄糖的代谢作用和谷氨酰胺的转化^{[89] [90]}。平衡谷氨酸水平对大脑健康非常重要，过多或过少的谷氨酸都会对大脑产生不利影响，从而影响脑功能：当脑内谷氨酸水平过高时，会引发一系列生理反应，如细胞兴奋性增加、神经递质释放增加等，会导致神经元过度兴奋^[91]。而低水平则会影响神经元之间的通信，导致认知障碍和学习记忆能力下降^[92]。

1.3 20E 调控变态发育

昆虫的发育过程是一个复杂而精细的生物学现象，受到多种激素的调控。其中，20E 和胰岛素（Insulin）是两种重要的激素，两者协同作用影响基因网络的级联反应和相互作用，调控生长发育和代谢途径^[93]。20E 是一种非常重要的类固醇激素，广泛存在于昆虫体内，能够诱导昆虫进行蜕皮变态，促进昆虫幼虫的生长发育。20E 的作用机制是通过与细胞膜受体结合后引起钙离子的释放^[94]。钙离子在细胞内具有重要的信号传导作用，它的释放能够触发一系列生化反应，调控核受体复合物 EcR-USP 形成，启动基因转录，从而影响昆虫的生长发育。20E 不仅可以启动蜕皮变态过程，还能够通过促进组织分解，释放出营养物质和能量，以支持昆虫变态发育的需要，同时促进增殖、自噬和凋亡相关基因的表达，通过调控它们的表达，20E 能够影响昆虫的生命周期^[95]。同时，20E 还具有调节昆虫代谢过程和食物消耗的功能，从而启动增殖，对于维持细胞内稳态和清除老化、损伤的细胞器具有重要作用。胰岛素在昆虫发育过程中也起着重要的作用，它可以调控 *Foxo* 的磷酸化和定位，从而影响昆虫发育过程中的代谢途径^[96]。*Foxo* 是一个关键的转录因子，可以调控昆虫生长发育和代谢途径的重要基因的表达。胰岛素通过调控 *Foxo* 的磷酸化和定位，可以抑制 *Foxo* 入核，从而抑制其转录活性和功能，从而影响昆虫的生长发育和代谢^[93]。昆虫发育过程中的激素调控是一个复杂的过程，多种激素之间存在着密切的联系和相互作用^[97]。

20E 在胚后幼虫神经系统向成体神经系统转化中发挥着关键作用^[95]。20E 通过调控神经发生，使昆虫的神经系统不断更新和发育，从而实现从幼虫到成虫的转变，而且 20E 还参与调控树突的生长，树突是神经元的重要组成部分，它们负责接收其他神经元传来

的信号^[24]。20E 通过调控树突生长，使神经元之间的突触连接更加流畅，提高神经系统的传输效率，使神经元能够更好地接收和处理外部信息，提高神经系统的功能，而且通过调节基因表达的时间程序，促进神经系统早期和末期生长发育^[94]。

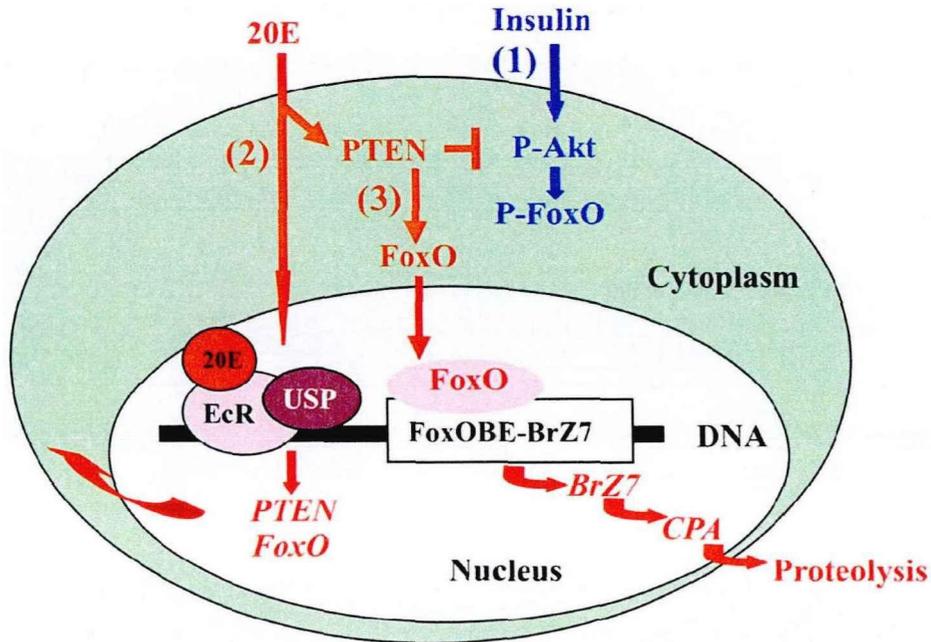


图 1-3 棉铃虫发育过程受到激素调控^[93]

Fig. 1-3 The development of *Helicoverpa armigera* is regulated by hormones.

1.4 本论文的科学问题及研究方案

综上所述，MMPs 的主要功能是水解细胞间的基质，为组织生长提供可塑性，但 MMP2 在昆虫变态期脑发育中的功能、作用机制及表达调控尚不清楚。本文以棉铃虫为实验材料，通过 qRT-PCR 筛选出在脑中变态期高表达的 MMP2；通过蛋白免疫印迹分析 MMP2 表达水平的时空特异性；通过脑整体免疫组织化学证明 MMP2 在脑中的定位；通过虫体干扰实验探究 MMP2 在脑的发育中发挥的作用；通过检测葡萄糖含量分析 MMP2 对脑中营养物质运输的影响；通过虫体激素刺激和荧光素酶报告系统检测 20E 对 MMP2 的转录调控。通过以上实验阐明 20E 通过 MMP2 促进棉铃虫变态期脑发育的分子机制，为理解动物脑胚后发育提供新的知识，为害虫控制提供新的靶标基因。

2 20-羟基蜕皮酮通过上调基质金属蛋白酶 2 表达促进棉铃虫变态时期 脑的发育

2.1 引言

基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteases, MMPs) 是一类蛋白水解酶。在结构上具有高度同源性^[15]。MMPs 在多个水平上受到调控。在黑腹果蝇中, MMPs 被证明是参与组织重塑的关键细胞蛋白酶。在哺乳动物中, MMPs 参与神经系统的发育过程和多种神经疾病的发生^[13]。白细胞、小胶质细胞、神经元和星形胶质细胞能够分泌 MMPs 促进神经轴突的发育, 同时有助于神经血管基底膜的重塑。这表明, MMPs 对脑至关重要。然而, MMPs 在脑中的作用机制尚未完全明了^[24]。

昆虫脑在胚后发育过程, 特别是在幼虫向成虫过渡的变态发育过程中, 形态和大小会发生巨大变化^[59]。在幼虫生长过程中, 脑体积增大, 幼虫中枢和外周神经元与幼虫本身同步生长。一些幼虫神经元会在变态初期或变态末期死亡, 但更多的神经元会被成虫脑进行改造和利用。同时, CNS 中的成体特异性神经元也会增殖。然而目前昆虫胚后脑发育的机制尚不完全清楚^[50]。

棉铃虫是广泛分布的世界性农业害虫, 属于完全变态昆虫, 是良好的研究昆虫脑发育的实验模型, 而且棉铃虫在变态发育过程中会收到多种激素的调控^[97]。本研究以鳞翅目昆虫棉铃虫为实验材料, 探讨了 MMP2 在昆虫变态期脑发育中的作用及其在蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 作用下的表达调控。

2.2 实验材料

2.2.1 实验动物

实验所用动物是杂食性农业害虫棉铃虫，用大豆粉、面粉、酵母粉、复合维生素、蔗糖和酪蛋白等配制饲料^[93]，进行人工饲养，饲养温度为 25 °C-27 °C，饲养湿度为 50%-70%，每天光照时长约 14 h。

2.2.2 实验试剂

Trizol 试剂、HIFI 酶、HIFI buffer I、HIFI buffer II、Taq 酶、Taq buffer、dNTPs（全式金，北京，中国）；引物序列合成、丙基硫代-β-D-半乳糖苷 IPTG、卡那霉素、蛋白酶抑制剂 PMSF、氨苄青霉素（生工生物，上海，中国）；焦碳酸二乙酯 DEPC、葡萄糖含量检测试剂盒（碧云天，上海，中国）；5×ALL-IN-One RT Master Mix 反转录试剂盒（爱必梦，镇江，中国）；二甲基亚砷 DMSO、曲拉通 TritonX-100、DNA 提取液、RNA 抽提酚试剂、谷氨酸含量检测试剂盒（索莱宝，北京，中国）；2×SYBR PCR Mix（艾德莱，北京，中国）；质粒提取试剂盒、DNA marker、胶回收试剂盒（捷瑞，上海，中国）；蛋白胨、酵母提取物（赛默飞，苏格兰，英国）；T4 DNA 连接酶（纽英伦生物，新英格兰，美国）；RNA 酶抑制剂、限制性内切酶、蛋白 marker（赛默飞世尔，马萨诸塞州，美国）；吐温 20（鼎国，北京，中国）；多聚甲醛（塞维尔，武汉，中国）；琼脂粉（US Everbright，加州，美国）；牛血清白蛋白 BSA（爱博泰克，武汉，中国）；细胞转染试剂（博奥龙，北京，中国）；20E（Caymanchem，密歇根州，美国）；双荧光素酶报告基因检测试剂盒（宇恒生物，苏州，中国）。

辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔 IgG（中杉金桥，北京，中国）；ACTB、GFP 和 RFP 单克隆抗体、Alexa Fluor 488 羊抗兔 IgG（爱博泰克，武汉，中国）。

2.2.3 实验仪器

PCR 仪（柏恒科技，杭州，中国）；qRT-PCR 仪（耶拿分析仪器，耶拿，德国）；超声破碎仪（新芝，宁波，中国）；核酸电泳仪、蛋白电泳仪（凯元，上海，中国）；金属浴（天根生化科技，北京，中国）；摇床（捷德生物，上海，中国）；多功能酶标仪（帝肯贸易，上海，中国）；高速冷冻离心机（Eppendorf，德国）。

2.3 实验方法

2.3.1 生物信息学分析

在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 找到人、果蝇、家蚕、小鼠和埃及伊蚊中的 MMPs 家族蛋白，以此为路标，在棉铃虫基因组中查找到 MMPs 家族所有蛋白，通过 MEGA 7.0 进行系统发育树的构建，通过 DNAMAN 进行序列比对，通过 SMART

网站 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行结构域分析, 通过 JASPAR 网站 (<https://jaspar.elixir.no/>) 进行启动子结合位点的预测。

2.3.2 虫体 RNA 提取

分别取棉铃虫的表皮、脂肪体、中肠和脑组织, 用 1×PBS 漂洗后放入匀浆器中。加入 Trizol 裂解液, 冰上充分研磨, 10000 ×g 冷冻离心 10 min 去除不溶性物质, 取上清在冰上放置 5 min, 并加入 200 μL 氯仿剧烈振荡, 冷冻离心 15 min, 取上清加入异丙醇静置 10 min, 10000 ×g 冷冻离心 10 min, 去除上清。随后用 75%乙醇 (DEPC 水稀释) 洗涤, 通风干燥 5 min。最后加入 20 μL DEPC 水, 在 65 °C 条件下溶解 10 min 得到 RNA。

2.3.3 cDNA 合成

以提取的 RNA 为模板, 加入 2 μL Accu Reaction Mix (4×), 加入 6 μL 无 RNA 酶水, 置于 42 °C, 孵育 2 min, 加入试剂盒中试剂, 然后置于 25 °C, 孵育 10 min, 然后置于 42 °C, 孵育 20 min, 最后置于 85 °C, 孵育 5 min, 直接用于后续实验或者 -20 °C 保存。

2.3.4 基因克隆

根据 NCBI 网站在线设计引物, 以得到的 cDNA 为模板, 按表 2-1 配置体系, 按表 2-2 运行程序, 运行 35 个循环, 得到 PCR 产物。

表 2-1 PCR 反应体系

Tab. 2-1 PCR reaction system

反应体系	25 μ L
cDNA	1 μ L
ddH ₂ O	17.375 μ L
HIFI	0.125 μ L
HIFI buffer II	2.5 μ L
F 引物 (10 μ M)	1 μ L
R 引物 (10 μ M)	1 μ L
dNTPs (2.5 mM)	2 μ L

表 2-2 PCR 反应程序

Tab. 2-2 PCR reaction program

程序	
95 $^{\circ}$ C	3 min
95 $^{\circ}$ C	30 sec
50-60 $^{\circ}$ C (根据引物 T _m 值确定)	30 sec
72 $^{\circ}$ C	1000 bp/min (根据基因长度确定)
72 $^{\circ}$ C	10 min

2.3.5 PCR 产物酚-氯仿抽提

将 PCR 得到的产物加灭菌水至总体积为 200 μ L, 等体积加入 200 μ L DNA 提取液, 振荡 15 s, 混匀, 离心取上清, 加入乙酸钠和无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 过夜沉降, 4 $^{\circ}$ C, 10000 \times g, 离心 10 min, 去上清, 加入 100 μ L 80%乙醇洗涤, 用 30 μ L 37 $^{\circ}$ C 灭菌水溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.3.6 qRT-PCR

以稀释后的 cDNA 为模板, 按表 2-3 配置反应体系, 以 β -Actin 作为内参, 全程避光操作, 在 qRT-PCR 仪进行反应, 用得到的 ct 值进行数据分析。

表 2-3 qRT-PCR 反应程序

Tab. 2-3 qRT-PCR reaction program

反应体系	10 μ L
cDNA	1 μ L
F 引物 (1 μ M)	1 μ L
R 引物 (1 μ M)	1 μ L
2 \times SYBR PCR Mix	5 μ L
反应体系	10 μ L

2.3.7 兔源多克隆抗体制备

根据 *Mmp2* 的全长序列，在 NCBI 网站在线设计上下游引物，以 cDNA 为模板，得到的 PCR 产物用核酸电泳检测片段长度，酚-氯仿抽提得到 500 bp 左右的 DNA 片段。取 3 μg 抽提的 DNA 和 PET-32a (+) 质粒，按表 2-4 配置酶切体系，37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 1.5 h，4 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。然后将连接产物转入 50 μL DH5 α 感受态细胞中。第二天 PCR 扩增检测，将重组质粒转到 BL21 菌株中，得到阳性菌落。

表 2-4 质粒酶切体系

Tab. 2-4 Plasmid digestion system

酶切体系	20 μL
质粒 (片段)	2 μg
内切酶 1	1 μL
内切酶 2	1 μL
10 \times Fast	2 μL
ddH ₂ O	补足至 20 μL

表 2-5 连接体系

Tab. 2-5 Connection system

连接体系	10 μL
质粒	50 ng
片段	100 ng
T4 DNA Ligase	0.5 μL
T4 DNA Ligase buffer	1 μL
ddH ₂ O	补足至 10 μL

取 4 mL 阳性菌液加入 400 mL 含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇 4 h，加入 IPTG，37 $^{\circ}\text{C}$ 摇 5 h，超声破碎离心，取 100 μL 上清作为破碎后上清样品，用 100 μL 1 \times PBS 将部分沉淀悬起，作为破碎后包涵体样品，将四种样品加入 50 μL 蛋白处理液，置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 15 min，电泳检测蛋白表达，加入 8M 脲使蛋白变性，亲和纯化后复性浓缩后，即可得到抗原蛋白。

从还未进行注射的新西兰大白兔耳缘静脉处取血 1 mL 作为前血清，注射两针，多点注射至皮下，7 d 后取 1 mL 耳缘静脉血进行抗体检测，检测效果良好，7 d 后取血。

2.3.8 免疫印迹

首先提取组织蛋白和细胞蛋白。提取组织蛋白时，分别取棉铃虫的表皮、脂肪体、中肠和脑组织，用1×PBS漂洗后放入匀浆器，加入500 μL 40 mM的Tris-HCl和PMSF，置于冰上充分匀浆，离心取上清，加入蛋白处理液，置于100 °C煮15 min，得到组织蛋白。提取细胞蛋白时，将培养基吸出，用1×DPBS洗涤两次，加入500 μL 1×DPBS和5 μL 1 mM的蛋白酶抑制剂PMSF，刮取细胞，收集到EP管中，4 °C，3000 ×g，离心5 min，取上清，加入60 μL 1×DPBS，将沉淀悬起，加入30 μL蛋白处理液，置于100 °C煮15 min，得到细胞蛋白，可用于后续实验。

取组织蛋白30 μg和细胞蛋白20 μg，以100V电压进行电泳，随后转膜，封闭1 h，加入抗体，MMP2抗体1:500稀释，ACTB、GFP和RFP抗体1:3000稀释，4 °C孵育过夜，用1×TBST（TBS中加入0.02%的Tween）洗膜8 min，重复三次，加入二抗（山羊抗兔IgG）孵育，洗膜三次，用1×TBS（10 mM Tris-HCl，150 mM NaCl，pH 7.5）洗膜10 min，避光添加发色液，在仪器下成像。

2.3.9 免疫组织化学

解剖虫体，得到脑组织，放入96孔板中，每孔加入200 μL 4%多聚甲醛，4 °C放置1 h，用PBS冲洗15 min，重复四次。用加入5%的BSA的0.5% TritonX-100作为封闭液，每孔加入200 μL，室温封闭2 h，加入一抗，4 °C放置3 d，用0.5% TritonX-100冲洗15 min，重复四次，加入二抗，室温摇动2 h，用0.5% TritonX-100冲洗15 min，重复四次，用DAPI-Fluoromount-G荧光封片剂封片，4 °C平放过夜，凝固后再竖立放置于切片盒。

2.3.10 虫体干扰

按表2-6配置体系，混匀后放置37 °C过夜，加入10 μL DNase I、10 μL DNase I buffer和300 μL DEPC水，混匀后放置37 °C，消化1 h，将上述消化体系加DEPC水补足至400 μL，分别加200 μL RNA提取液和200 μL 氯仿，振荡15 s，4 °C，10000 ×g，离心15 min，取上清，加400 μL 氯仿，振荡15 s，4 °C，10000 ×g，离心15 min，取上清，加750 μL无水乙醇和30 μL 3M乙酸钠，混匀后放置-20 °C过夜，4 °C，10000 ×g，离心30 min，去上清，加入75%乙醇洗涤，通风干燥5 min，加20 μL DEPC水溶解，得到*dsRNA*。

表 2-6 *dsRNA* 合成体系

Tab. 2-6 *dsRNA* synthesis system

合成体系	50 μ L
cDNA	3 μ g
T7 polymerase buffer	20 μ L
T7 polymerase	4 μ L
RNA inhibitor	2 μ L
ATP、UTP、GTP、CTP	各 2.4 μ L
DEPC 水	补足至 50 μ L

将 *dsRNA* 稀释至 500 ng/ μ L，选取 60 只 5 龄幼虫，分为对照组 *dsGfp* 组和实验组 *dsMmp2* 组，在 6 龄 6 小时 (6th-6 h) 注射第一针，每只幼虫注射 5 μ L，24 h 后注射第二针，48 h 后注射第三针，共注射三针。注射完成 6 h 后提取各组织 RNA 和蛋白质用于后续实验。

2.3.11 谷氨酸含量检测

称取虫体脑组织约 2 mg，加入 200 μ L 裂解液冰浴匀浆，8000 \times g 离心 10 min，取上清和标准溶液，分别加入四种试剂混匀，340 nm 测定 20 s 时和 5 min20 s 时的吸光度，计算谷氨酸的含量。

2.3.12 葡萄糖含量检测

称取虫体脑组织约 2 mg 加入 20 μ L 裂解液匀浆，12,000 \times g 常温离心 5 min，取上清。将 20,000 mg/dl 葡萄糖标准品稀释为 0、5、10、20、50、100、200、400、800、1200、1600 和 2000 mg/dl 的葡萄糖标准溶液，取出 Glucose Assay Reagent，融解、混匀并恢复至室温。取 5 μ L 标准品或样品至 PCR 管加入 185 μ L Glucose Assay Reagent，使最终体积为 190 μ L。涡旋混合后，5000 \times g 离心数秒使液体沉降至管底。PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 加热 8 min，并降温至 4 $^{\circ}$ C。降温至 4 $^{\circ}$ C 后，即可取出 PCR 管。每管吸出 180 μ L 液体至一洁净的 96 孔板中，转移液体时注意避免产生气泡，630 nm 测定吸光度，计算样品中的葡萄糖浓度。

2.3.13 20E 虫体激素刺激

用 DMSO 将 20E 从 20 mM 稀释到 2 mM (10 mg/mL), 再用 PBS 稀释为 20 ng/ μ L、40 ng/ μ L、60 ng/ μ L 和 100 ng/ μ L 四种不同浓度。取 6th-6 h 的幼虫 50 只, 分为五组, 其中四组幼虫分别注射 5 μ L/只幼虫不同浓度的 20E, 对照组注射每只幼虫 5 μ L 等比例稀释的 DMSO, 6 h 后取其脑组织提取 RNA, 进行基因表达量检测, 完成浓度梯度实验。取 6th-6 h 的幼虫 40 只, 每只幼虫注射 5 μ L 100 ng/ μ L 的 20E, 分为四组, 1 h、3 h、6 h 和 12 h 后取其脑组织提取 RNA, 进行基因表达量检测, 完成时间梯度实验。

2.3.14 细胞重组质粒构建以及细胞系转染

扩增 *Mmp2* 5' 上游序列包括 FOXO 结合位点在内的 2000 bp, 构建 *pMmp2-LUCI-GFP-His* 重组质粒。

取 3 μ g 重组质粒溶于 100 μ L 0.9% 的生理盐水中, 把 10 μ L 转染试剂溶于 100 μ L 0.9% 的生理盐水, 将两者混匀, 过表达 48 h 后可通过显微镜观察其发光状态, 72 h 后可提取细胞蛋白用于后续实验。

2.3.15 Luciferase 检测

将重组质粒 *pMmp2-LUCI-GFP-His*, 转染到六孔板的表皮细胞中, 设计四组实验, 其中两组转染 RFP-His, 12 h 后分别添加 2 μ L DMSO 和 2 μ L 20E (2 mM) 处理, 另外两组转染 FOXO-RFP-His, 12 h 后分别添加 2 μ L DMSO 和 2 μ L 20E (2 mM) 处理, 72 h 后提取细胞蛋白, 通过蛋白免疫印迹检测 Luciferase 表达水平。将重组质粒 *pMmp2-LUCI-GFP-His*, 转染到 24 孔板中, 同时转染内参质粒 pRL-TK, 处理同上, 通过双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测转录活性。

2.3.16 统计

所有实验均重复三次。实验结果采用 Graph Pad 9、Image J 和 Ai 软件分析作图, *t* 检验统计方法分析差异的显著性水平 (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001), 多组之间有显著差异用不同字母表示。

表 2-7 实验所用引物序列表

Tab. 2-7 Primers used in the experiments

Primer name	Sequence (5' -3')
Exp- <i>Mmp2</i> -F	TACTCAGGATCCTACCCGAGCAATCCCAGACC
Exp- <i>Mmp2</i> -R	TACTCAGTCGACCAACACGACCTTTTTCCTCAT
<i>Mmp2</i> -RTF	AAAGAGGGTTGAGGCTGACG
<i>Mmp2</i> -RTR	AACAACACCACGACGGCTAT
<i>Mmp2</i> -RNAiF	ACCGCAATGGTATCCAGCAA
<i>Mmp2</i> -RNAiR	GTGGTGGTCGTTGTTCGTTG
<i>Gfp</i> -RNAiF	GCGTAATACGACTCACTATAGGGATGGTCCCAATTCTCGTGGAAC
<i>Gfp</i> -RNAiR	GCGTAATACGACTCACTATAGGGACTTGAAGTTGACCTTGATGCC

注：MMP2: XP021185411.2; c-Myc: AHN95658.1; WNT: AHN95659.1; β -Actin: ALP73405.1。

2.4 实验结果

2.4.1 棉铃虫 MMP2 的鉴定

为了鉴定棉铃虫的 MMPs，以人类、小鼠、黑腹果蝇、家蚕和埃及伊蚊为路标，在 NCBI 数据库中搜索了棉铃虫基因组中的 MMPs。在棉铃虫基因组中发现 3 种 MMPs，基因组中分别命名为基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2)、基质金属蛋白酶 14 (matrix metalloproteinase 14, MMP14) 和基质金属蛋白酶 25 (matrix metalloproteinase 25, MMP25) (图 2-1)。通过构建 MMPs 进化树发现，棉铃虫、家蚕、果蝇和埃及伊蚊的 MMP2 聚为一支，同时和人的膜型 MMPs: MMP17 和 MMP25 聚为一支。

随后通过 SMART 分析了棉铃虫、果蝇、家蚕和埃及伊蚊的 MMP2 以及人的 MMP2 和 MMP25，发现他们有相似的结构域，但是人的 MMP2 不含跨膜结构域，MMP25 含 DUF 结构域 (膜型基质金属蛋白酶 C 端的跨膜结构域)，棉铃虫的 MMP2 有 2 个跨膜结构域，因此棉铃虫中的 MMP2 属于膜型 MMP (图 2-2)，又分析了棉铃虫中三种 MMP 的序列，发现 MMP2 的序列与 MMP25 和 MMP14 的一致性分别为 17.8% 和 23.59% (图 2-3)。

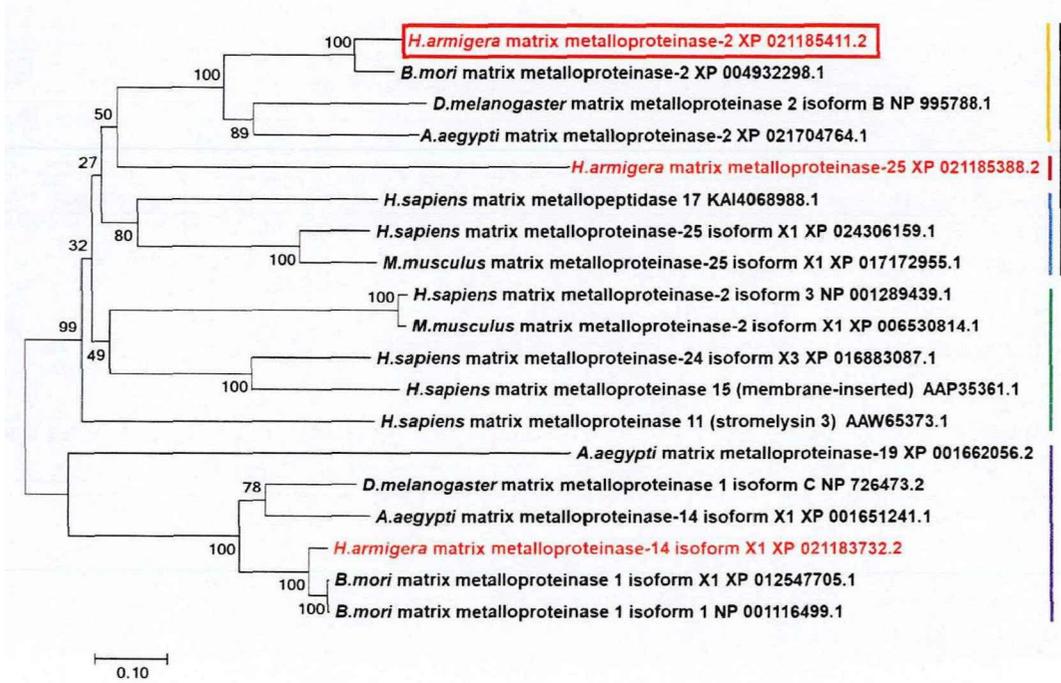


图 2-1 MEGA7.0 构建 MMP 系统进化树

Fig. 2-1 The phylogenetic tree of MMP constructed by MEGA 7.0

注：在棉铃虫基因组中鉴定到了三个 MMP，红色方框标记靶标基因 *Mmp2*。 *H. armigera*: 棉铃虫； *B. mori*: 家蚕； *D. melanogaster*: 果蝇； *A. aegypti*: 埃及伊蚊； *H. sapiens*: 智人； *M. musculus*: 小鼠。黄色线条：棉铃虫、家蚕、果蝇和埃及伊蚊的 MMP2 聚为一支，红色线条：棉铃虫的 MMP25 单独聚为一支，蓝色线条：人和小鼠的膜型 MMP17 和 MMP25 聚为一支，黑色线条：人和小鼠的膜型 MMP17、MMP2 同时也和棉铃虫、家蚕、果蝇和埃及伊蚊的 MMP2 聚为一大支，绿色线条：人和小鼠的其他 MMP 聚为一支，紫色线条：棉铃虫、果蝇、家蚕和埃及伊蚊的 MMP14 和 MMP1 聚为一支。

Notes: Three MMPs were identified in the *H. armigera*, with the target gene *Mmp2* marked by the red box. *H. armigera*: *Helicoverpa armigera*; *B. mori*: *Bombyx mori*; *D. melanogaster*: *Drosophila melanogaster*; *A. aegypti*: *Aedes aegypti*; *H. sapiens*: *Homo sapiens*; *M. musculus*: *Mus musculus*. Yellow line: MMP2 of *H. armigera*, *B. mori*, *D. melanogaster* and *A. aegypti* is clustered into one, red line: MMP25 of *H. armigera* is clustered into one, blue line: membrane-type MMP17 and MMP25 of *H. sapiens* and *M. musculus* are clustered into one, black line: The membrane MMP17 and MMP2 of *H. sapiens* and *M. musculus* are also clustered together with the MMP2 of *H. armigera*, *B. mori*, *D. melanogaster* and *A. aegypti*. The green line is clustered together with other MMP of *H. sapiens* and *M. musculus*, and the purple line is clustered together with MMP14 and MMP1 of *H. armigera*, *B. mori*, *D. melanogaster* and *A. aegypti*.

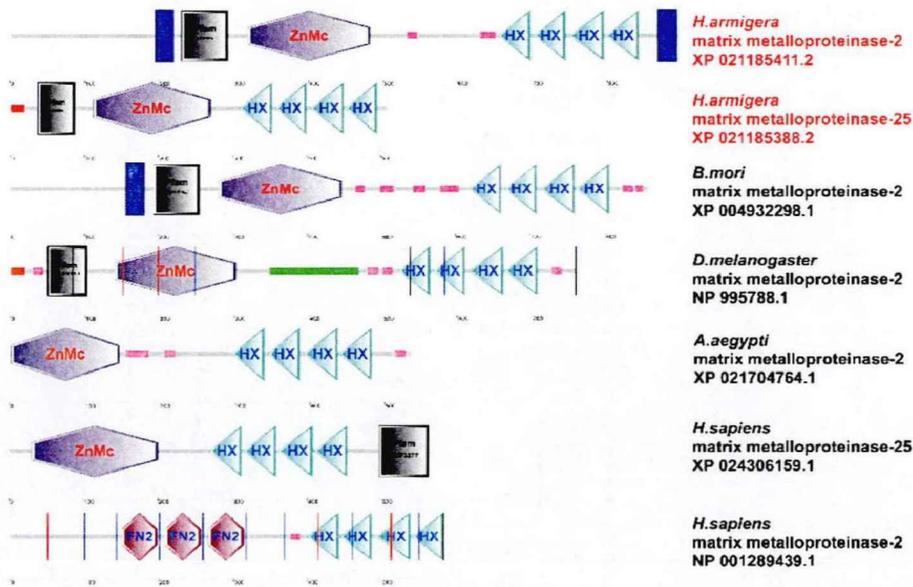


图 2-2 SMART 分析 MMPs 结构域

Fig. 2-2 Analysis of MMPs structural domains by SMART

注：蓝色区域表示跨膜区，DUF 结构域表示膜型基质金属蛋白酶 C 端的跨膜结构域。

Notes: The blue area indicates transmembrane region. The DUF domain represents the C-terminal transmembrane domain of membrane matrix metalloproteinases.

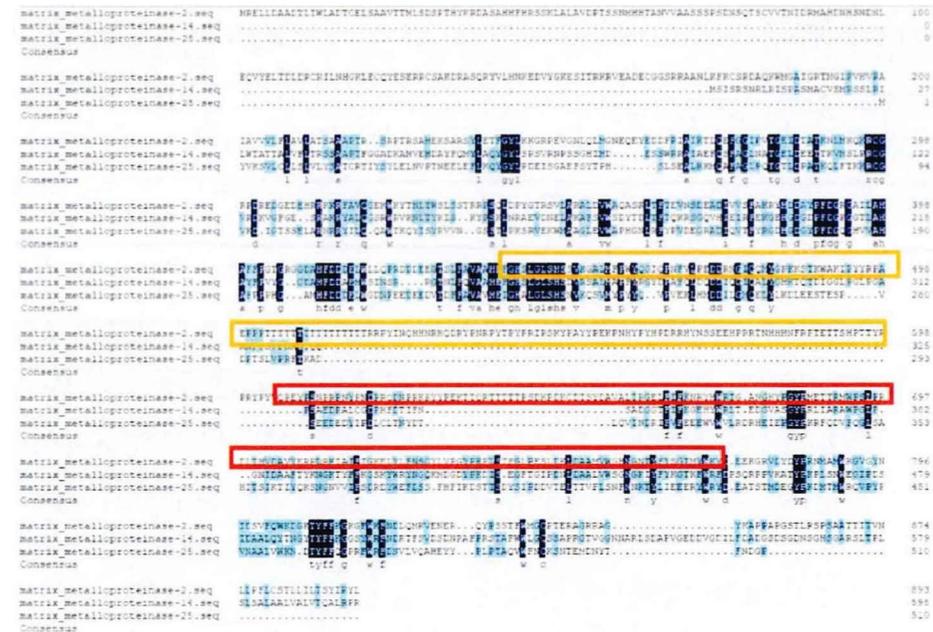


图 2-3 利用 DNAMAN 对棉铃虫 MMPs 序列进行比对

Fig. 2-3 Sequence alignment of the MMPs of *H. armigera* by DNAMAN

注：红框中的序列是制备抗体所用序列，橙色框中的序列是干扰 RNA 所用序列。

Notes: The Sequences in red boxes are prepared antibody Sequences. The Sequences in the orange box is the interference Sequences.

2.4.2 基筛选差异性表达的 *Mmp2*

为了筛选在变态发育过程中参与脑发育的 *Mmps*, 检测了 *Mmp2*, *Mmp14* 和 *Mmp25* 在取食期 6 龄 24 小时 (6th-24 h) 和变态期 6 龄 96 小时 (6th-96 h) 在脑中的转录水平, 发现仅 *Mmp2* 在变态期高表达。因此, 将 *Mmp2* 作为研究目标 (图 2-4)。

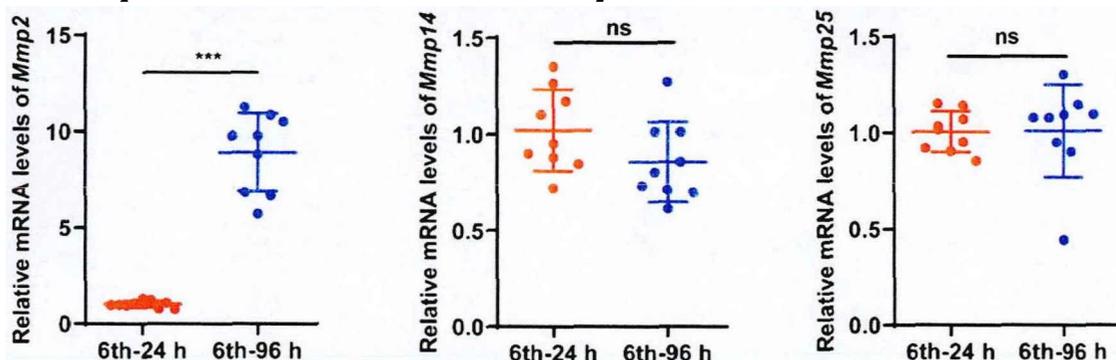


图 2-4 棉铃虫 *Mmps* 的基因筛选

Fig. 2-4 Genetic Screening of *Mmps* of *H. armigera*

注: qRT-PCR 检测棉铃虫中的三种 *Mmps* 在取食期和变态期的表达量, 选取 6th-24 h 代表取食期, 6th-96 h 代表变态期。实验均满足三次生物学重复, 误差线表示平均值 ± SD, *t* 检验分析显著性差异 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

Notes: qRT-PCR was detected the expression of the three *Mmps* during the feeding and metamorphosis stages, and selected 6th-24 h for the feeding stage and 6th-96th h for the metamorphosis stage. The error lines indicate mean ± SD and the *t*-tests were used to analyze significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.4.3 MMP2 的原核表达及抗体制备

为了检测 MMP2 在不同龄期表达水平的变化, 制备其兔源多克隆抗体。选取 MMP2 中第 606-778 位氨基酸序列, 克隆扩增 *Mmp2* 中该序列片, 构建原核表达载体制备抗原, 取诱导前后样品待测, 诱导表达后取菌液破碎离心, SDS-PAGE 检测, 发现单一抗原条带 (图 2-5A), 制备 MMP2 的兔源多克隆抗体。随后用变态期 6th-96 h 的脑组织蛋白检测抗体, 发现抗体特异性识别 MMP2 的酶原 (103 kDa) 和活化的 MMP2 (67 kDa) (图 2-5B), 说明抗体具有特异性。

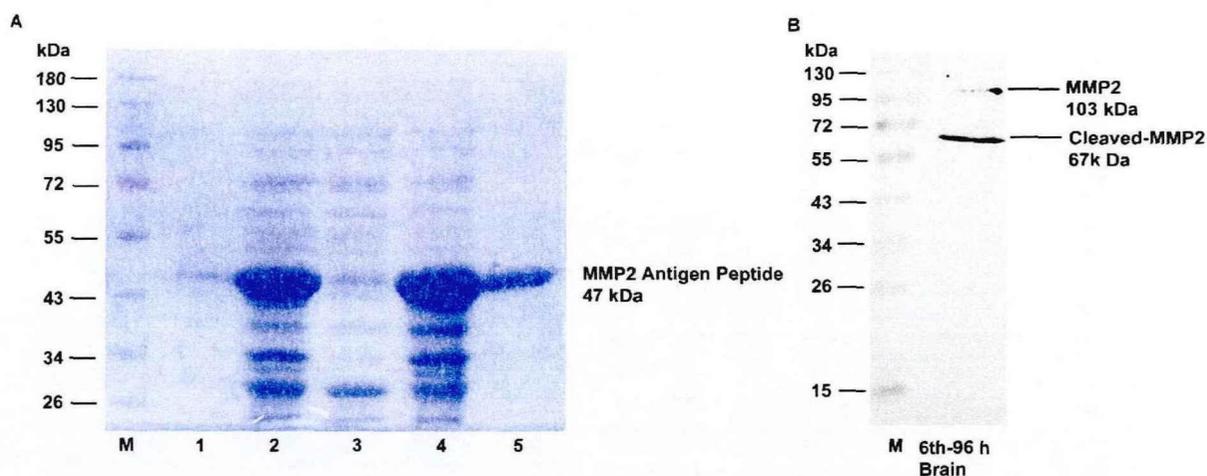


图 2-5 MMP2 的原核表达、纯化以及抗体特异性检测

Fig. 2-5 Prokaryotic expression, purification and antibody specificity detection of MMP2

注：（A）MMP2 的原核表达以及纯化。（B）抗体特异性检测。

Notes: (A) Prokaryotic expression as well as purification of MMP2. (B) Antibody specificity assay.

2.4.4 MMP2 在脑中表达水平最高，在变态期表达增加

为了验证 MMP2 在脑中的表达，检测了发育过程中四种组织中 MMP2 的表达模式，包括表皮，中肠，脂肪体和脑，Western blot 实验显示，不同发育阶段 MMP2 的表达出现明显变化，与其他组织相比，MMP2 在脑中的表达水平最高（图 2-6A）。qRT-PCR 的结果获得了相似的表达模式（图 2-6B）。这表明 MMP2 在脑变态发育过程中发挥作用。

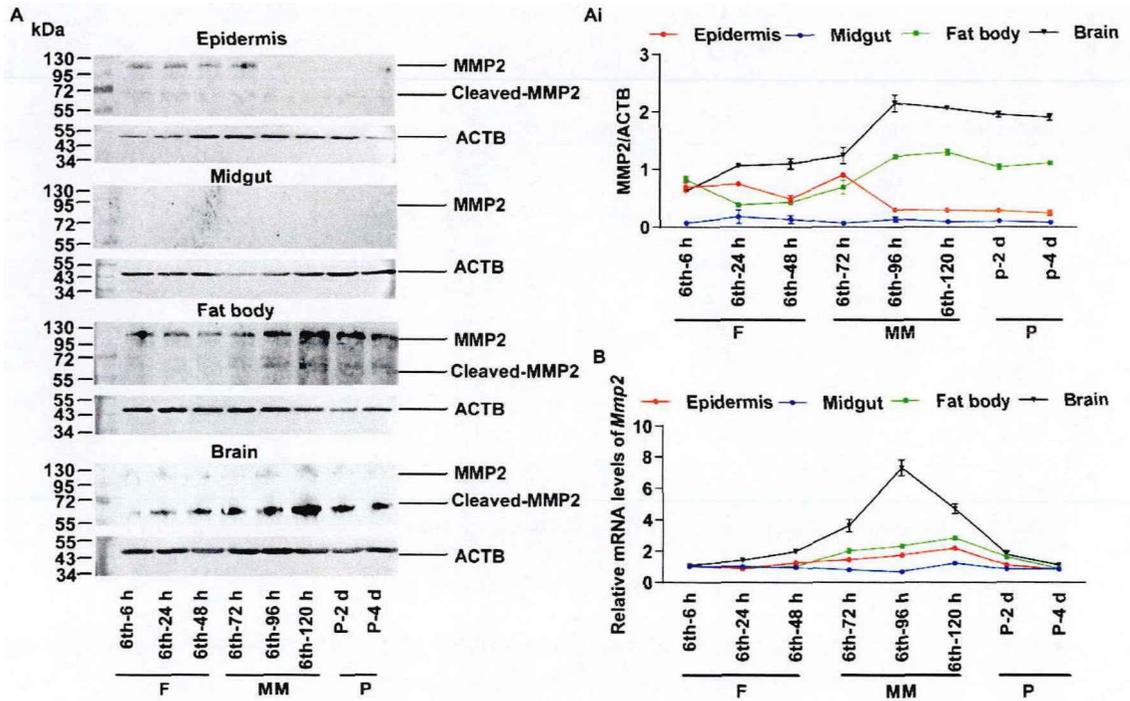


图 2-6 发育过程中 MMP2 的表达模式

Fig. 2-6 The expression profiles of MMP2 during development

注：（A）检测不同时期 MMP2 在脑、表皮、中肠和脂肪体中蛋白水平的表达模式，ACTB 为内参蛋白，所用胶浓度为 12.5%，每个泳道加入 5 μg 蛋白质。（Ai）ImageJ 对（A）图结果进行定量统计，误差线表示平均值 \pm SD。（B）qRT-PCR 检测不同时期 *Mmp2* 在脑、表皮、中肠和脂肪体中 mRNA 水平的表达模式。

Notes: (A) The protein levels of MMP2 in brain, epidermis, midgut and fat body at different developmental ages, ACTB was the internal reference protein. The concentration of the gel was 12.5%. Add 5 μg protein per lane. (Ai) Quantitative statistics of the results of (A) graph by ImageJ. The bars indicate the mean \pm SD. (B) qRT-PCR to detect the expression mRNA levels of *Mmp2* in tissues.

2.4.5 MMP2 定位于脑中

为了探究 MMP2 在虫体中的定位，本研究进行了免疫组织化学实验，以前血清作为对照，绿色荧光显示 MMP2 定位情况，结果显示，前血清组没有观察到绿色荧光，在取食期 6th-24 h 的脑中观察到了少量绿色荧光，在变态期 6th-96 h 的脑中观察到了大量绿色荧光（图 2-7），表明 MMP2 在脑中发挥作用。

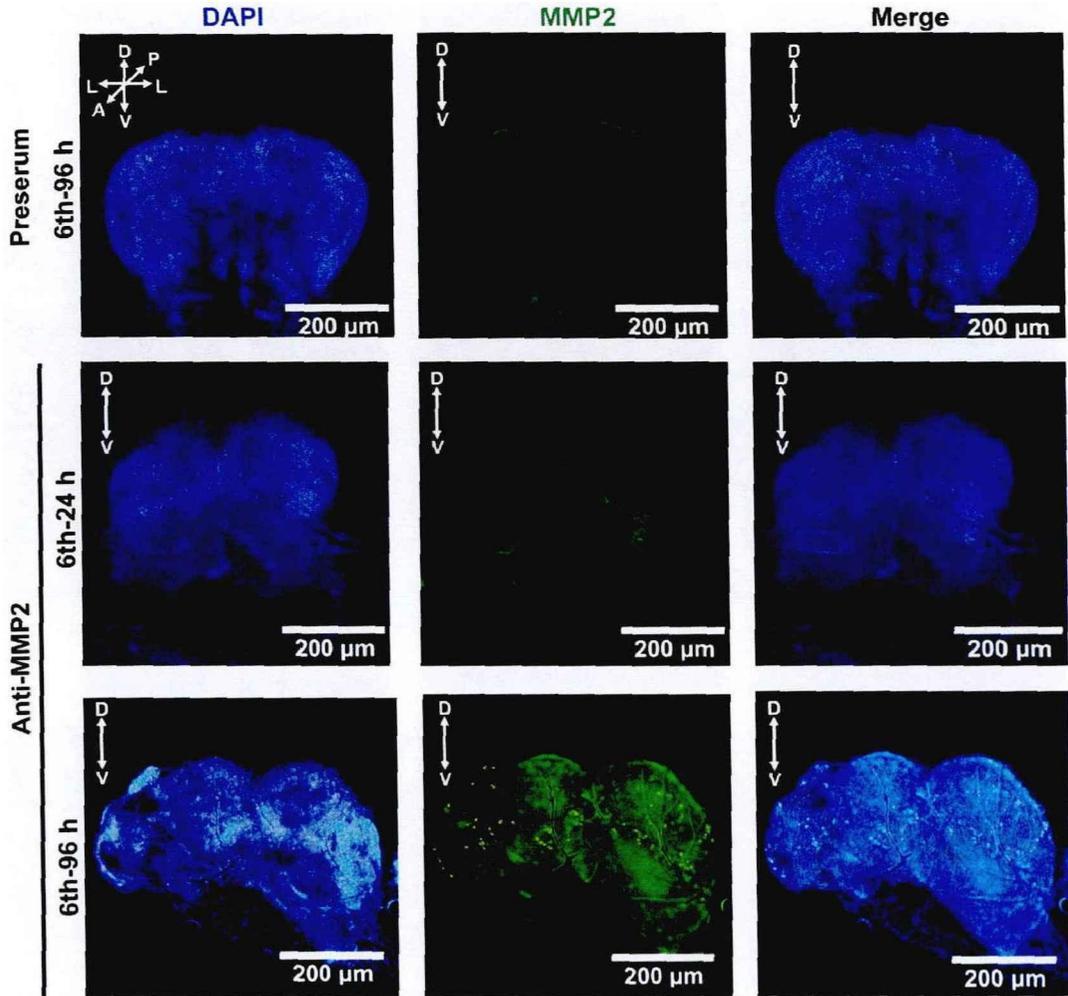


图 2-7 MMP2 定位于变态期的脑中

Fig. 2-7 MMP2 is abundant in the brain at 6th-96 h during metamorphosis

注：Preserum：前血清，绿色荧光：MMP2，蓝色荧光：DAPI，Merge：合并。A：前向；D：背向；L：侧向；P：后向；V：腹向。

Notes: Green fluorescence: MMP2, blue fluorescence: DAPI. A: Anteri, D: Dorsal, L: Lateral, P: Posterior, V: Ventral.

2.4.6 虫体敲降 *Mmp2* 抑制了成虫脑的发育及变态发育

为了探究棉铃虫脑的发育，选取了 8 个时间段，包含取食期、变态期和蛹期，观察其脑形态的变化（图 2-8），发现从取食期到变态期再到蛹期，脑的形态有了明显变化，脑的体积和两个脑半球的直径明显增加。

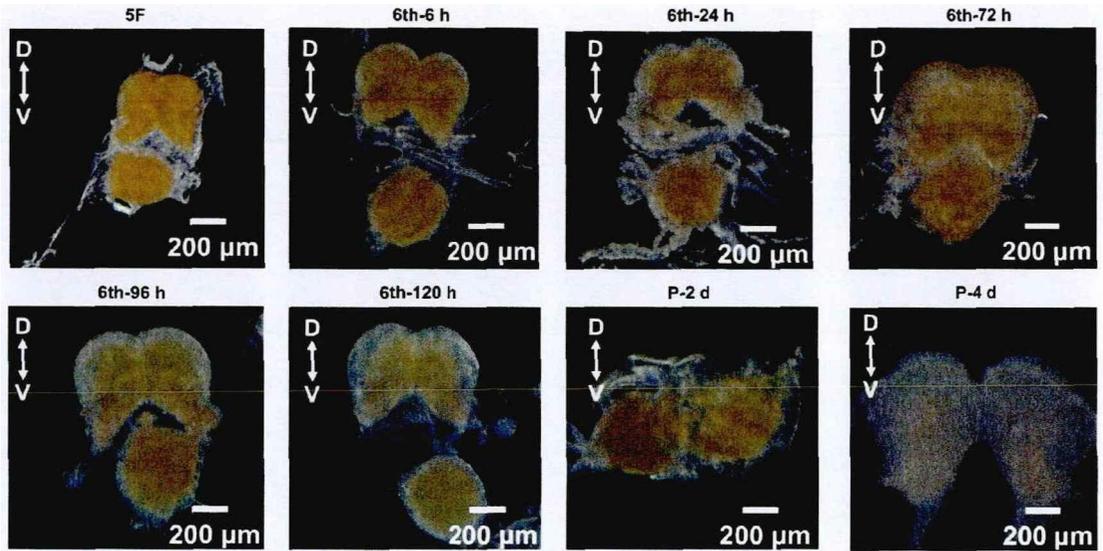


图 2-8 不同时期脑的发育形态

Fig. 2-8 Morphology of brain at different ages

为了进一步探究 MMP2 在虫体中的功能,对 *Mmp2* 进行干扰,实验分为两组, *dsGfp* 组和 *dsMmp2* 组, 每组 30 只幼虫, 6th-6 h 注射第一针, 每 24 h 后注射一针, 共三针。从第一次注射后 48 h、90 h、120 h 到 144 h, 四个时间段观察脑的形态。发现注射 *dsMmp2* 组脑的体积相比 *dsGfp* 组小 (图 2-9A, Ai), 化蛹时间平均延长 20 h 左右 (图 2-9B), *dsMmp2* 组有 26.25% 的幼虫死亡和 32.5% 的化蛹延迟 (图 2-9C, D), 注射完成 24 h 后提取 RNA, qRT-PCR 检测干扰效率, 发现 *Mmp2* 表达量显著下降, 说明干扰成功, 而且没有脱靶影响其他两个 *Mmps* (图 2-9E), 这表明 *Mmp2* 在变态期脑发育中起着重要作用。

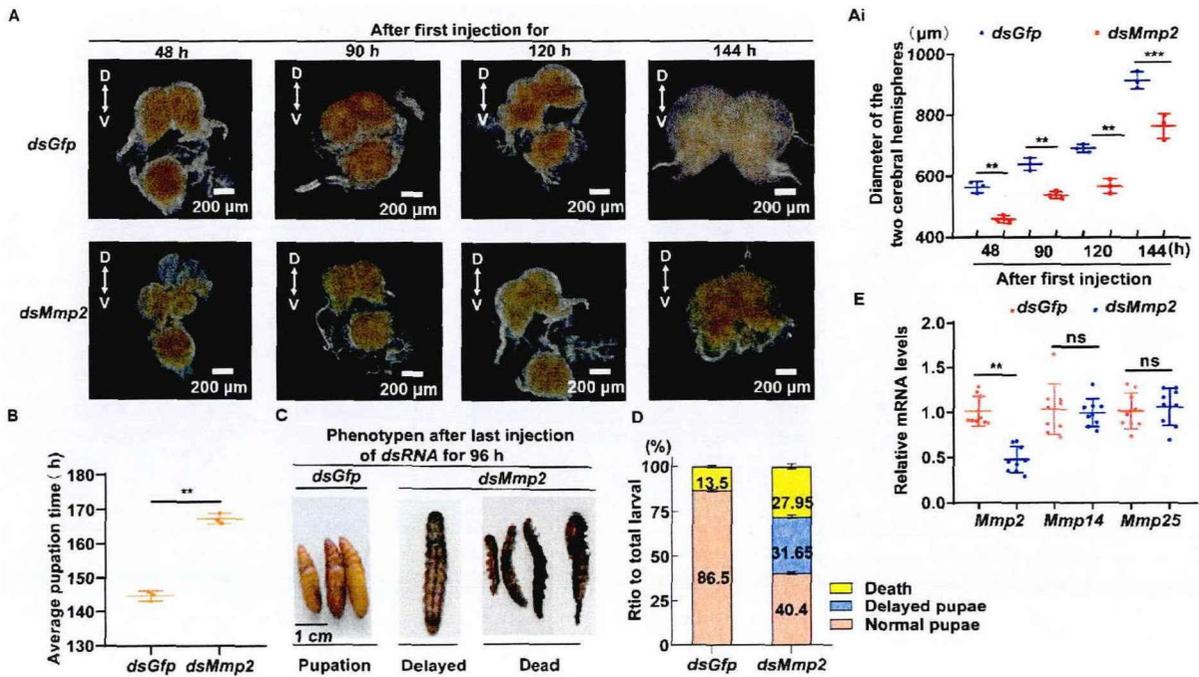


图 2-9 敲降 *Mmp2* 抑制了幼虫脑的发育和化蛹

Fig. 2-9 The knockdown of *Mmp2* repressed development of adult brain and pupation

注：（A）注射 *dsGfp* 和 *dsMmp2*，48 h、90 h、120 h 和 144 h 后脑的形态。（Ai）通过测量对（A）图的结果进行定量统计。（B）注射 *dsGfp* 和 *dsMmp2* 后统计蛹的化蛹时间。（C）注射 *dsGfp* 和 *dsMmp2*，72 h 后的虫体表型。（D）注射 *dsGfp* 和 *dsMmp2* 后的表型统计。（E）注射 *dsGfp* 和 *dsMmp2*，72 h 后提取 RNA，qRT-PCR 进行干扰效率检测和脱靶检测。

Notes: (A) Morphologies of the brain after injection of *dsRNA* for 48 h、90 h、120 h and 144 h. (Ai) Quantitative statistics of the results of (A) graph. The bars indicate the mean \pm SD. (B) The pupation time after injection. (C) Phenotypes after injection of *dsRNA* for 72 h. qRT-PCR was detected the interference efficiency after injection of *dsGfp* and *dsMmp2*. (D) Statistics of Phenotypes after injection of *dsGfp* and *dsMmp2*. (E) qRT-PCR was detected the interference efficiency and off-target detection after injection of *dsGfp* and *dsMmp2*.

2.4.7 敲降 *Mmp2* 导致脑中葡萄糖和谷氨酸水平降低

为了阐明敲降 *Mmp2* 抑制脑发育的分子机制，分析了脑中的葡萄糖和谷氨酸的水平，结果显示从取食期到变态期，葡萄糖和谷氨酸的含量都是逐渐升高的（图 2-10A，B），提示在变态发育中脑中的葡萄糖和谷氨酸需要增加输入或合成。但当干扰 *Mmp2* 之后，脑中谷氨酸和葡萄糖含量均显著下降（图 2-10C，D），说明 MMP2 与脑中葡萄糖和谷氨酸运输或合成有关。

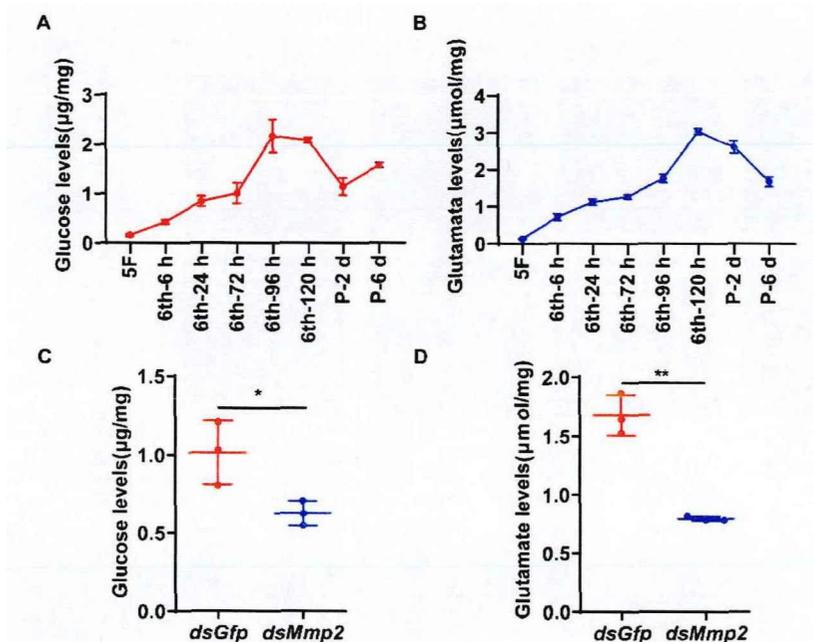


图 2-10 不同发育阶段以及干扰 *Mmp2* 后脑内葡萄糖和谷氨酸水平

Fig. 2-10 Glutamate and glucose levels in the brain at different developmental stages and after knockdown of *Mmp2*

注：(A) 脑内不同阶段的葡萄糖水平。(B) 脑内不同阶段的谷氨酸水平。(C) *Mmp2* 敲降 3 d 后脑中的葡萄糖水平。(D) *Mmp2* 敲降 3 d 后脑中的谷氨酸水平。

Notes: (A) Glucose levels in the brain at different stages. (B) Glutamate levels in the brain at different stages. (C) Glucose levels in the brain after knockdown of *Mmp2* three days. (D) Glutamate levels in the brain after knockdown of *Mmp2* three days.

2.4.8 敲降 *Mmp2* 抑制脑细胞增殖并引起脑细胞自噬、降低 GLUT 和 GT 表达

本研究从棉铃虫基因组找到了 4 种葡萄糖转运蛋白 (GLUT): Glucose transporter member 1 (GLUT1)、Glucose transporter member 2 (GLUT2)、Glucose transporter member 3 (GLUT3) 和 Glucose transporter type (GLUT-T), 2 种谷氨酸转运蛋白 (GT): Glutamate transporter 1 isform X1 (GT-X1) 和 Glutamate transporter 1 isform X2 (GT-X2)。随后通过 qRT-PCR 实验检测了葡萄糖和谷氨酸转运蛋白在取食期和变态期的表达量, 发现 *Glut1*、*Glut2* 和 *Glut-t* 在变态期脑中高表达 (图 2-11), 而且干扰 *Mmp2* 之后 *Glut1*、*Glut2* 和 *Glut-t* 的表达量在下降 (图 2-12), 与干扰 *Mmp2* 导致的葡萄糖水平降低一致, 提示 GLUT1、GLUT2 和 GLUT-T 与转运葡萄糖入脑有关, 而 GLUT3 在脑中不发挥作用。

Gt-x1 在变态期脑中并没有差异表达, 而 *Gt-x2* 在变态期脑中检测到了表达量较取食期脑中有所增加 (图 2-11), 干扰 *Mmp2* 之后只有 *Gt-x2* 表达量下降 (图 2-12), 与干扰 *Mmp2* 之后谷氨酸水平下降一致, 提示脑中的谷氨酸可通过 GT-X2 转运入脑, 也可

以在脑内合成。

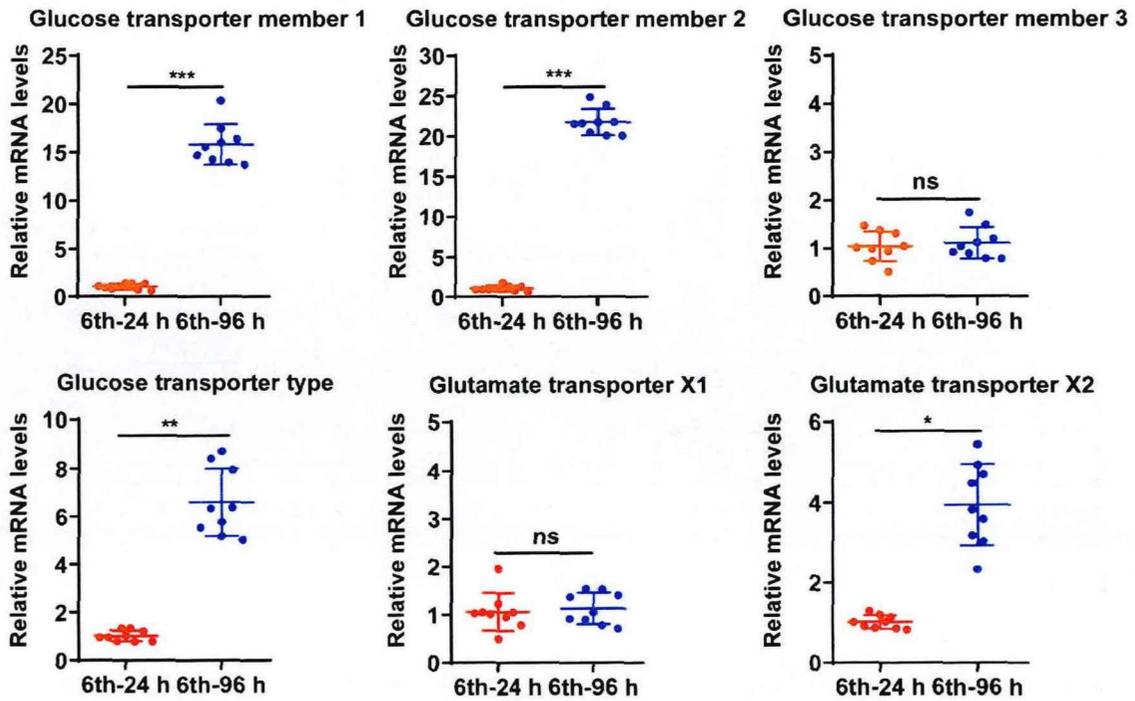


图 2-11 取食期和变态期脑中谷氨酸和葡萄糖转运蛋白的表达水平

Fig. 2-11 The expression levels of glutamate and glucose transporters in brain during the feeding and metamorphosis stages

注：qRT-PCR 检测取食期和变态期脑中谷氨酸和葡萄糖转运蛋白的表达水平，选取 6th-24 h 代表取食期，6th-96 h 代表变态期。

Notes: qRT-PCR to detect the expression levels of glutamate and glucose transporters in brain during the feeding and metamorphosis stages, and selected 6th-24 h for the feeding stage and 6th-96th h for the metamorphosis stage.

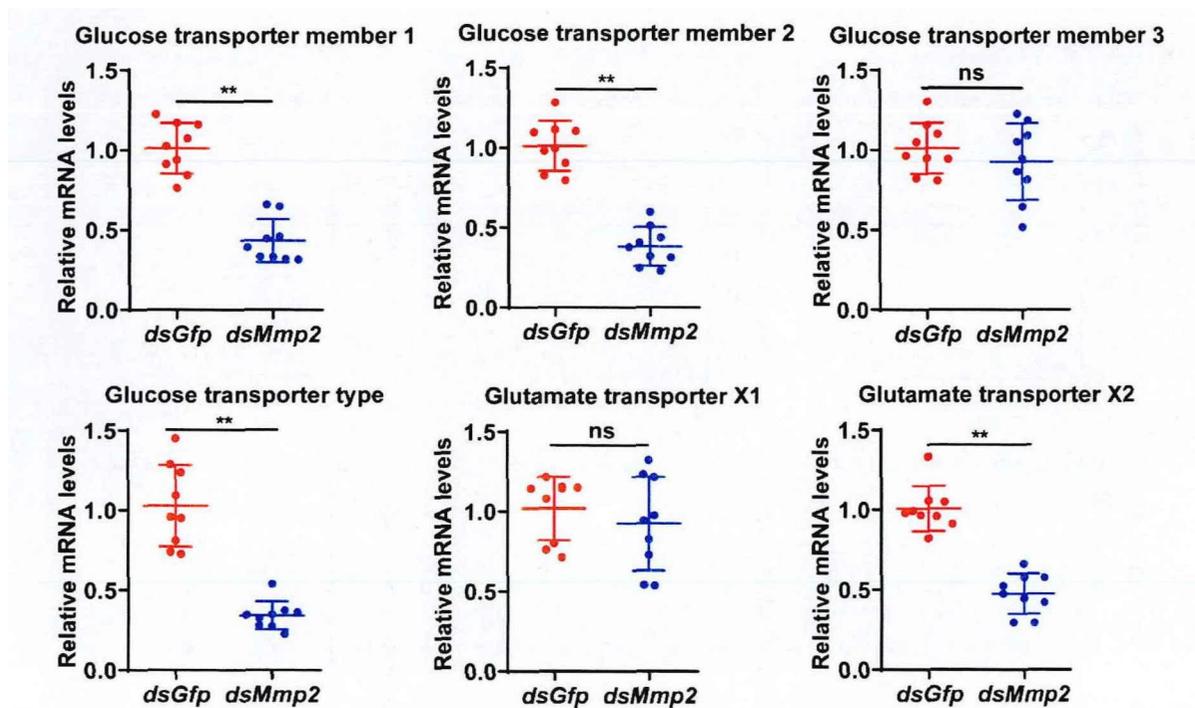


图 2-12 干扰 *Mmp2* 后脑内谷氨酸和葡萄糖转运体的表达水平

Fig. 2-12 The expression levels of glutamate and glucose transporters in the brain after knockdown of *Mmp2*

注：qRT-PCR 检测 *Mmp2* 敲降 3 d 后脑中谷氨酸和葡萄糖转运体的表达水平。

Notes: qRT-PCR to detect the expression levels of glutamate and glucose transporters in brain after knockdown of *Mmp2* three days.

为了阐明敲降 *Mmp2* 基因导致葡萄糖和谷氨酸运输受阻的分子机制，检测了磷酸化组蛋白 H3 (P-H3) 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3-II)，因为 P-H3 和 LC3-II 分别指示细胞增殖和自噬。结果显示，敲降 *Mmp2* 后，LC3-II 增加 (图 2-13A)。相反，敲降 *Mmp2* 后 P-H3 降低 (图 2-13B)，表明 *Mmp2* 对脑细胞增殖和阻止自噬是必需的。

随后检测了增殖相关基因 *Wnt*、*c-Myc* 和自噬相关基因 *Atg8* 表达的变化，结果显示干扰 *Mmp2* 后 *Wnt* 表达下降，而 *Atg8* 表达增加 (图 2-13C)。这些数据表明 *Mmp2* 在脑中具有促进脑细胞增殖和抑制脑细胞自噬的功能，提示 *Mmp2* 促进细胞增殖，从而产生更多的葡萄糖和谷氨酸转运蛋白，进而促进葡萄糖和谷氨酸进入脑中，为脑的生长发育提供营养物质和能量供给。

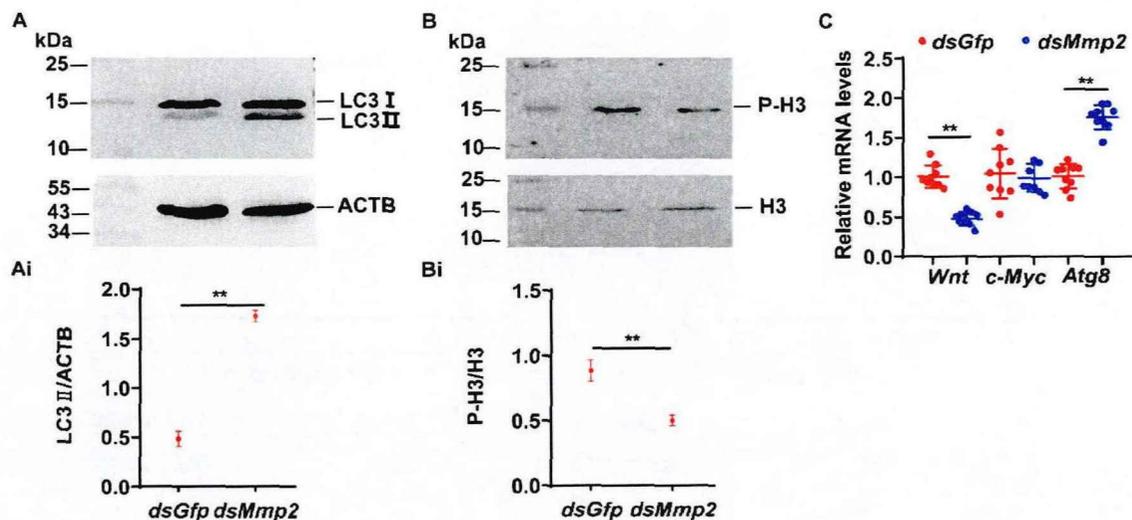


图 2-13 敲低 *Mmp2* 抑制细胞增殖并引起自噬

Fig. 2-13 Knockdown of *Mmp2* repressed cell proliferation and caused autophagy

注：(A)，(B) 免疫印迹法检测 LC3-II 和 P-H3 的变化。(Ai)，(Bi) 通过 ImageJ 对 (A) 和 (B) 图的结果进行定量统计。(C) qRT-PCR 检测 *Wnt*、*c-Myc* 和 *Atg8* 的表达变化。

Notes: (A) and (B) Detection of changes of LC3-II and P-H3 by immunoblotting assay. (Ai) and (Bi) Quantitative statistics of the results of (A) and (B) graph by ImageJ. (C) Detection of changes in the expression of *Wnt*, *c-Myc* and *Atg8* by qRT-PCR. All experiments were repeated at least three times.

2.4.9 20E 通过 FOXO 上调 *Mmp2* 的转录表达

为了阐明 MMP2 在变态期表达量增加的分子机制，在虫体上进行了 20E 激素刺激实验，因为 20E 是促进变态发育的激素。实验结果显示，对每只幼虫注射 200 ng、300 ng 和 500 ng 浓度的 20E 6 h 后，*Mmp2* 的表达量均会被上调；对每只幼虫注射 500 ng 浓度的 20E，时间处理 3 h、6 h 和 12 h 之后，*Mmp2* 的表达量也会被上调（图 2-14A, B）。这说明 20E 能够上调 *Mmp2* 的表达。而虫体干扰了 20E 的核受体 *Ecr* 和转录因子 *Foxo*，并叠加 20E，发现在干扰掉 *Ecr* 和 *Foxo* 之后，*Mmp2* 的表达量显著下降，进一步说明 20E 通过 *Ecr* 和 *Foxo* 上调 *Mmp2* 表达（图 2-14C, D）。

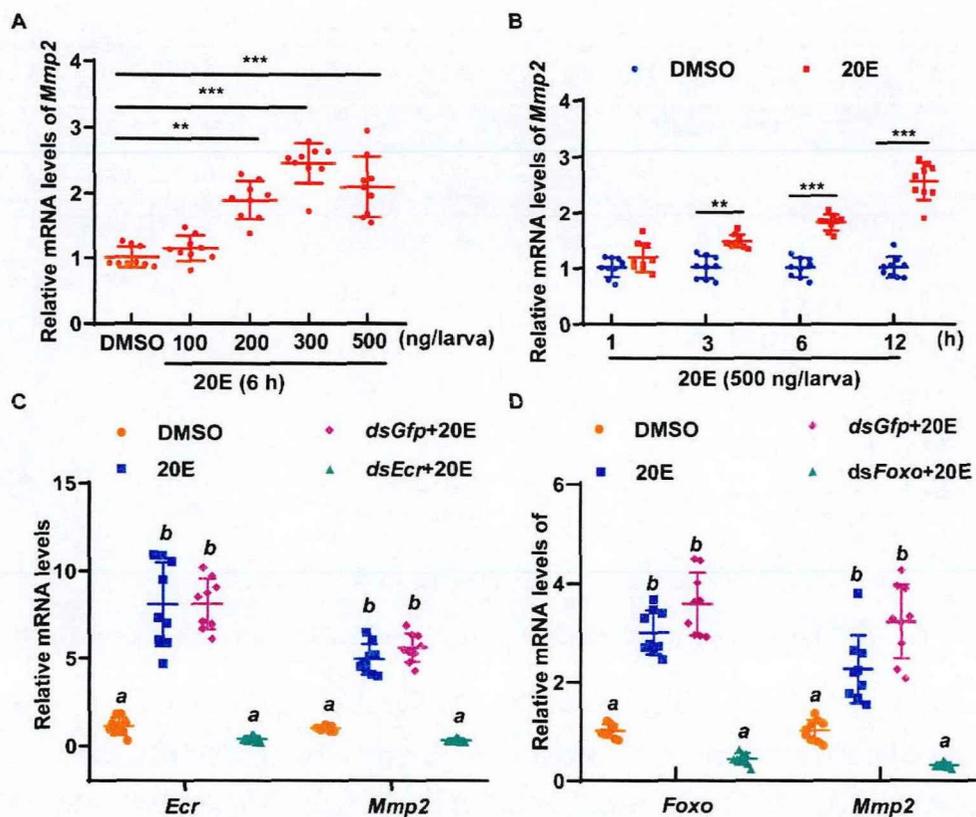


图 2-14 20E 上调 *Mmp2* 的表达

Fig. 2-14 20E up-regulates the expression of *Mmp2*

注：（A）qRT-PCR 检测虫体注射不同浓度 20E 6 h 后 *Mmp2* 的表达水平，对照组注射等量的 DMSO。（B）qRT-PCR 检测注射每只幼虫 500 ng 20E 后 1、3、6、12 h 时间处理后 *Mmp2* 的表达水平。对照组注射等量 DMSO。（C）qRT-PCR 检测敲降 *Ecr* 后 *Mmp2* 的表达水平。（D）qRT-PCR 检测敲降 *Foxo* 后 *Mmp2* 的表达水平。

Notes: (A) qRT-PCR to detect the expression level of *Mmp2* after worm injection of different concentrations of 20E for 6 h. (B) qRT-PCR to detect the expression level of *Mmp2* after time-treated for 1 h, 3 h, 6 h, and 12 h after larvae were injected with 500 ng 20E /larva. (C) qRT-PCR to detect the expression level of *Mmp2* after knockdown of *Ecr*. (D) qRT-PCR to detect the expression level of *Mmp2* after knockdown of *Foxo*.

因为已有文献报道过 20E 通过 *Ecr* 调控 *Foxo* 转录^[95], 因此本文仅检测了 FOXO 对 *Mmp2* 的转录调控。通过 JASPER 网站分析 *Mmp2* 的 5' 上游序列, 预测 FOXO 结合元件 (FOXOBE, ttgtttac), 预测到 *Mmp2* 的 5' 上游序列区含有多个 FOXO 的结合位点, 其中, 序列 ttgttttc 和棉铃虫 Brz7 的 FOXOBE 结合位点序列 ttgtttac 相似性高^[96], 推测 FOXO 是 *Mmp2* 的上游转录因子 (图 2-15B)。本研究构建了 *pMmp2-LUCI-GFP-His* 报告质粒, 同时过表达 FOXO-RFP-His (图 2-15A)。双荧光素酶报告实验结果显示 FOXO-RFP-His 在 20E 调控下显著增加 *pMmp2-LUCI-GFP-His* 报告蛋白 LUCI-GFP-His 的表达 (图 2-15C)。蛋白免疫印迹实验结果显示, 在 HaEpi 细胞系中共表达 *pMmp2-LUCI-GFP-His* 和 RFP-His, DMSO 和 20E 处理下都没有检测到 LUCI-GFP-His 的表达; 但在 HaEpi 细胞系中共表达 *pMmp2-LUCI-GFP-His* 和 FOXO-RFP-His 之后检测到了 LUCI-GFP-His 的表达, 而且在 20E 的处理下, LUCI-GFP-His 的表达显著增加 (图 2-15D)。这些数据表明, 20E 通过 FOXO 上调 *Mmp2* 的转录。

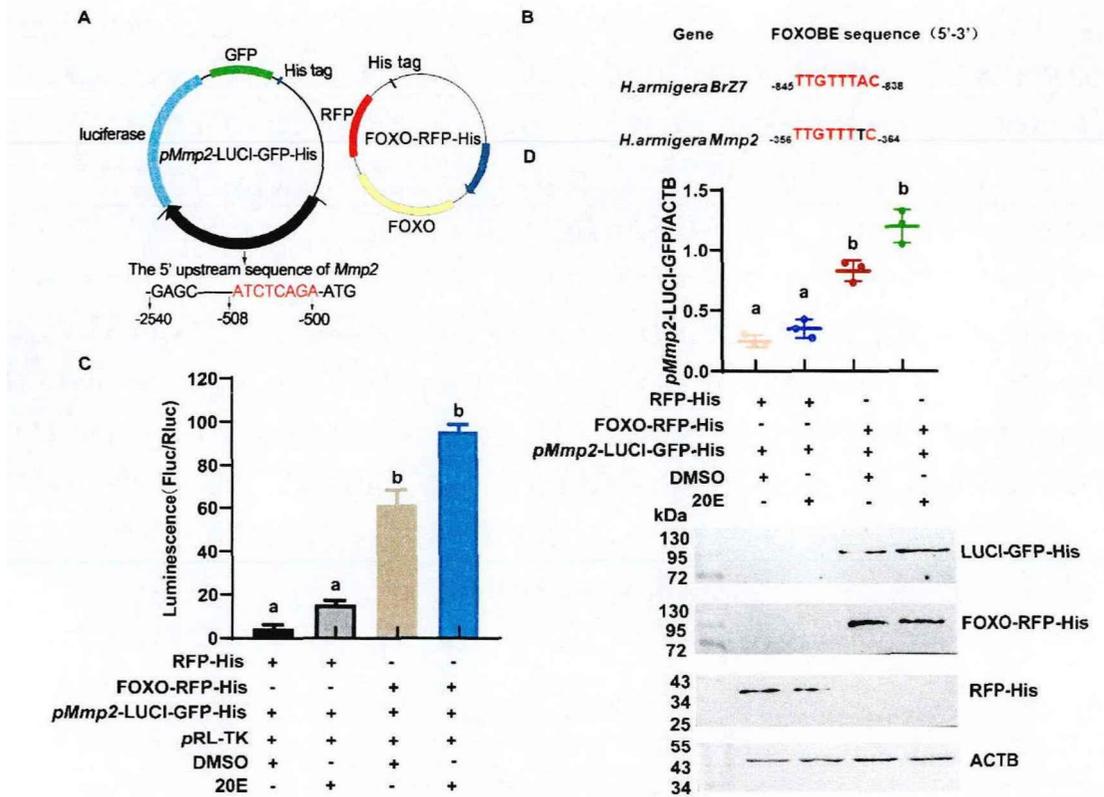


图 2-15 FOXO 显著增加 20E 诱导的 *Mmp2* 转录

Fig. 2-15 FOXO significantly increased 20E-induced transcription of *Mmp2*

注：(A) *pMmp2-LUCI-GFP-His* 和 *FOXO-RFP-His* 质粒的质粒图谱。(B) 棉铃虫 *Brz7* 和 *Mmp2* 启动子区 FOXOBE 序列比较。(C) 双荧光素酶报告实验检测含 FOXOBE 序列的转录活性。(D) 蛋白印迹法检测在 20E 调控下 LUCI-GFP-His 的表达。采用 Image J 软件对条带进行统计学分析。

Notes: (A) Plasmid mapping of *pMmp2-LUCI-GFP-His* and *FOXO-RFP-His* plasmids. (B) Sequence comparison of FOXOBE in the promoter regions of Cotton bollworm *Brz7* and *Mmp2*. (C) Dual luciferase reporter assay to detect transcriptional activity of FOXOBE containing sequence. (D) Protein western blot to detect the expression of LUCI-GFP-His by FOXO under 20E regulation.

2.5 讨论

动物脑的胚后发育的调控机制是生命科学研究的难点。本文发现类固醇激素 20E 可以通过转录因子 FOXO 促进 MMP2 的表达，MMP2 以其水解细胞外基质的特性水解细胞间连接，为脑生长发育提供可塑性，为脑细胞增殖提供空间，而细胞增殖导致葡萄糖转运蛋白和谷氨酸转运蛋白增加，可以运输更多的葡萄糖和谷氨酸入脑，增加脑发育的营养物质供应，保障脑的细胞增殖和生长发育。

2.5.1 MMP2 为脑细胞增殖提供空间

MMP2 作为一种基质金属蛋白酶, 参与多种组织中 ECM 的水解, 增加组织在生理和病理条件下的可塑性^[94]。在生理过程中, MMP2 可以维持 ECM 的正常结构和功能, 并在 ECM 降解、胚胎发生、形态发生和血管生成等组织重塑和器官发育中发挥重要作用^[98]。在从幼虫到成虫的变态发育过程中, 昆虫的脑在形态和大小上发生了巨大的变化, 脑发育过程中不仅涉及细胞程序性死亡和细胞增殖等组织重塑过程, 还包括细胞间基质的降解和基底膜的重塑^[99]。细胞间基质的降解可以为细胞增殖提供空间, 为脑的长大提供可塑性。例如, 在果蝇变态发育过程中, MMPs 能够通过水解细胞外基质为细胞增殖提供空间^[100, 101]。在脊椎动物脂肪体中也看到类似的结果, 蛋白多糖和基质蛋白被 MMPs 不断水解, 以增加细胞增殖空间^[101]。研究还表明, MMP2 对脑中的细胞增殖是至关重要的, 推测其机制可能是 MMP2 降解 ECM, 使细胞失去黏附, 从而为细胞增殖和脑生长发育提供空间^[102]。本论文的研究也发现干扰 *Mmp2* 导致脑细胞不能增殖, 说明 MMP2 可以保障脑生长发育中的细胞增殖, MMPs 通过水解细胞间基质为脑细胞增殖提供空间及可塑性的功能在动物中具有保守性。

2.5.2 MMP2 增加脑的营养供给

脑发育需要营养供给和能量来源, 但脑存在血脑屏障, 淀粉、蛋白质和脂类等大分子不能通过血脑屏障进入脑提供能量, 只能依靠葡萄糖作为脑中主要的营养物质。体内的葡萄糖主要来自于食物中的淀粉分解、糖异生或其他代谢转化, 可以以糖原的形式储存与肝脏和肌肉等组织在需要时分解动用^[103]。脑没有产生和储存葡萄糖的功能, 脑中的葡萄糖是由脑外的血液循环持续提供的。葡萄糖进入细胞的方式有多种, 包括自由扩散、协助扩散和主动运输等, 但自由扩散的效率低, 主要还是借助于细胞膜上的相关转运蛋白进行^[104]。神经细胞主要通过 GLUTs 家族蛋白以协助扩散的方式实现葡萄糖的跨膜运输。本研究观察到棉铃虫变态期脑中葡萄糖水平增加, 同时 GLUT1 和 GLUT2 表达量也增加, 而干扰 *Mmp2* 则导致脑中葡萄糖水平和 *Glut1*、*Glut2* 和 *Glut-t* 都减少, 提示葡萄糖是由 GLUT1、GLUT2 和 GLUT-T 转运到脑中的。本研究还发现, 虫体干扰 *Mmp2* 导致脑细胞增殖受阻, 并且发生自噬, 同时 *Glut1* 和 *Glut2* 的表达量下降, 说明 *Glut1*、*Glut2* 和 *Glut-t* 的表达量是随细胞增殖而增加的。这些结果表明变态期高表达的 MMP2 保障了脑细胞增殖, 从而增加了 GLUT1、GLUT2 和 GLUT-T 的表达量, 增加了葡萄糖的转运入脑。

谷氨酸可以帮助脑进行学习和记忆, 而这些复杂的生理过程是通过突触传递谷氨酸并结合其受体实现的。此外, 谷氨酸还是脑中重要的替代性能源物质, 在葡萄糖不足的情况下为脑提供能量^[105]。谷氨酸通过 GDH, 一种双向催化谷氨酸和 α -KG 的酶, 脱氨生成 α -KG 进入 TCA 循环产生 ATP, 为神经细胞提供能量^[79]。然而, 大脑通过血脑屏障

摄取的谷氨酸较低，脑中的谷氨酸主要是由脑中神经胶质细胞的葡萄糖代谢及后续的 TCA 循环产生的 α -KG 在 GDH 催化下生成的^[106]。研究表明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 α -KG^[107]。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 α -KG 转变成谷氨酸，从而使血淋巴中的谷氨酸大量增加^[54]。本研究观察到棉铃虫变态期脑中谷氨酸水平增加，同时 GT-X2 表达量也增加，而干扰 *Mmp2* 则导致脑中谷氨酸水平和 GT-X2 都减少，提示谷氨酸可以由 GT-X2 转运到脑中。虫体干扰 *Mmp2* 导致脑细胞增殖受阻，同时 GT-X2 的表达量下降，说明 GT-X2 的表达量是随细胞增殖而增加的。本研究发现变态期脑中谷氨酸的增加依赖于谷氨酸转运蛋白，说明变态期脑中的谷氨酸不仅能由脑中的葡萄糖代谢转化而来，还能够通过血淋巴入脑。

2.5.3 20E 通过 FOXO 促进 *Mmp2* 的转录

目前关于 *Mmp2* 转录调控的报道较少。在哺乳动物中，*Mmp2* 的转录受到细胞因子和生长因子的正向调控，TNF α 和 IL-17 通过 AP-1 和 NF- κ B 正向刺激脑中 MMP-9 的转录，转录因子神经胶质相关癌基因蛋白 2 (GLI2) 调控 MMP7 的表达促进卵巢癌侵袭与转移^[54]。在果蝇中，JH 和 20E 能够协调控制 MMPs 诱导脂肪体细胞解离的发育时间，在幼虫-蛹转化过程中，*Kr-h1* 转导 JH 信号抑制 MMPs 诱导的脂肪体细胞分离，当 JH 滴度下降时，20E 通过 *E75* 和 *Blimp-1* 促进 MMPs 诱导的脂肪体细胞分离^[25]。本研究发现类固醇激素 20E 能够通过转录因子 FOXO 在转录水平上促进 *Mmp2* 的表达，这为其他生物中 MMPs 的转录调控的研究提供了参考。

2.6 结论及创新点总结

在昆虫变态过程中，类固醇激素 20E 通过转录因子 FOXO 促进 MMP2 的表达。MMP2 定位于脑中。MMP2 依靠其水解细胞间基质的特性疏松细胞间连接，增加脑的可塑性，为脑细胞增殖提供空间，进而增加葡萄糖和谷氨酸通道的表达，转运更多的葡萄糖和谷氨酸进入脑中，或增加脑中谷氨酸的合成，为脑的生长发育提供能量物质，而丰富的能量供给又正反馈促进脑细胞增殖，保障脑在变态发育过程中的生长发育。

本文的创新点:

1. 发现 MMP2 在变态时期的脑中高表达。
2. MMP2 使脑的胚后发育具有可塑性，为脑细胞增殖提供空间，增加脑中的营养物质供给。
3. 20E 通过转录因子 FOXO 促进 *Mmp2* 转录。

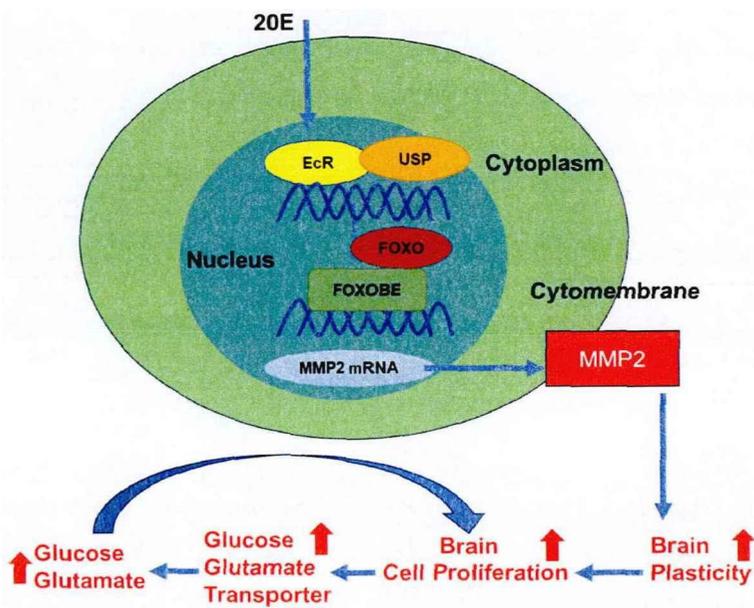


图 2-16 20E 通过 MMP2 促进变态期脑发育的分子机制

Fig. 2-16 The hypothesized mechanism of MMP2 expression and function in brain development

注：20E 通过促进 MMP2 的表达来促进脑发育，从而使脑在变态发育过程中具有细胞增殖和营养供应的可塑性。

Notes: 20E promotes brain development by promoting MMP2 expression to give brain plasticity for cell proliferation and nutrients supply during metamorphic development.

参考文献

- [1] Akol I, Kalogeraki E, Pieleckafortuna J, *et al.* MMP2 and MMP9 activity is crucial for adult visual cortex plasticity in healthy and stroke-affected mice [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2022, 42(1): 16-32.
- [2] Azpurua J, Mahoney RE, Eaton BA. Transcriptomics of aged *Drosophila* motor neurons reveals a matrix metalloproteinase that impairs motor function [J]. *Aging Cell*, 2018, 17(2): e12729.
- [3] Bond ND, Nelliott A, Bernardo MK, *et al.* β FTZ-F1 and Matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila* [J]. *Developmental Biology*, 2011, 360(2): 286-96.
- [4] Cabralpacheco GA, Garzaveloz I, Castruitade C, *et al.* The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9739.
- [5] Madzharova E, Kastl P, Sabino F, *et al.* Post-Translational modification-dependent activity of matrix metalloproteinases [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12):3077.
- [6] Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, *et al.* Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(19): 12727-34.
- [7] Copenhaver GP, Deady LD, Shen W, *et al.* Matrix metalloproteinase 2 is required for ovulation and corpus luteum formation in *Drosophila* [J]. *PLOS Genetics*, 2015, 11(2): e1004989.
- [8] Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases [M]. *Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in health and disease: cardiovascular remodeling*. 2017, 147:1-73.
- [9] Devault L, Li T, Izabel S, *et al.* Dendrite regeneration of adult *Drosophila* sensory neurons diminishes with aging and is inhibited by epidermal-derived matrix metalloproteinase 2 [J]. *Genes & Development*, 2018, 32(5-6): 402-14.
- [10] Dicarlo A. Matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in sera and urine of patients with renal carcinoma [J]. *Oncology Letters*, 2014, 7(3): 621-6.
- [11] Du J, Zhao P, Wang J, *et al.* Pupal diapause termination and transcriptional response of *Antheraea pernyi* (lepidoptera: saturniidae) triggered by 20-hydroxyecdysone [J]. *Frontiers in*

Physiology, 2022, 13: 888643.

[12] Fanjul-fernández M, Folgueras AR, Fueyo A, *et al.* Matrix metalloproteinase mmp-1a is dispensable for normal growth and fertility in mice and promotes lung cancer progression by modulating inflammatory responses [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(20): 14647-56.

[13] Glasheen BM, Robbins RM, Piette C, *et al.* A matrix metalloproteinase mediates airway remodeling in *Drosophila* [J]. *Developmental Biology*, 2010, 344(2): 772-83.

[14] Gore SV, James EJ, Huang LC, *et al.* Role of matrix metalloproteinase-9 in neurodevelopmental deficits and experience-dependent plasticity in *Xenopus laevis* [J]. *eLife*, 2021, 10: e62147.

[15] Hatan M, Shinder V, Israeli D, *et al.* The *Drosophila* blood brain barrier is maintained by GPCR-dependent dynamic actin structures [J]. *Journal of Cell Biology*, 2011, 192(2): 307-19.

[16] Hayashi S, Kondo T. Development and function of the *Drosophila* tracheal system [J]. *Genetics*, 2018, 209(2): 367-80.

[17] Hearst S, Bednářová A, Draughn B, *et al.* Expression of *Drosophila* matrix metalloproteinases in cultured cell lines alters neural and glial cell morphology [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 610887.

[18] Hecht E, Freise C, Websky KV, *et al.* The matrix metalloproteinases 2 and 9 initiate uraemic vascular calcifications [J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2016, 31(5): 789-97.

[19] Hertz L, Peng L, Dienel GA. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2006, 27(2): 219-49.

[20] Hincá SB, Salcedo C, Wagner A, *et al.* Brain endothelial cells metabolize glutamate via glutamate dehydrogenase to replenish TCA-intermediates and produce ATP under hypoglycemic conditions [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2020, 157(6): 1861-75.

[21] Hua H, Li M, Luo T, *et al.* Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68(23): 3853-68.

[22] Huanna T, Tao Z, Xiangfei W, *et al.* GALNT14 mediates tumor invasion and migration in breast cancer cell MCF-7 [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2014, 54(10): 1159-71.

[23] Hughes CJR, Turner S, Andrews RM, *et al.* Matrix metalloproteinases regulate ECM accumulation but not larval heart growth in *Drosophila melanogaster* [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2020, 140: 42-55.

[24] Jia Q, Liu S, Wen D, *et al.* Juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone coordinately control the developmental timing of matrix metalloproteinase-induced fat body cell dissociation [J].

Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(52): 21504-16.

[25]Jia Q, Liu Y, Liu H, *et al.* Mmp1 and mmp2 cooperatively induce *Drosophila* fat body cell dissociation with distinct roles [J]. Scientific Reports, 2014, 4(1): 7535.

[26]Karaca M, Frigerio F, Migrenne S, *et al.* GDH-Dependent glutamate oxidation in the brain dictates peripheral energy substrate distribution [J]. Cell Reports, 2015, 13(2): 365-75.

[27]Kawasaki H, Manickam A, Shahin R, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase genes during basement membrane degradation in the metamorphosis of *Bombyx mori* [J]. Gene, 2018, 638: 26-35.

[28]Labrador JP, Raza QS, Vanderploeg JL, *et al.* Matrix metalloproteinases are required for membrane motility and lumenogenesis during *Drosophila* heart development [J]. Plos One, 2017, 12(2): e0171905.

[29]Lafever KS, Wang X, Page-mccaw P, *et al.* Both *Drosophila* matrix metalloproteinases have released and membrane-tethered forms but have different substrates [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 44560.

[30]Liu Y, Mu Y, Li Z, *et al.* Extracellular matrix metalloproteinase inducer in brain ischemia and intracerebral hemorrhage [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 986469.

[31]Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs [J]. Cardiovascular Research, 2006, 69(3): 562-73.

[32]Niu H, Li Y, Li H, *et al.* Matrix metalloproteinase 12 modulates high-fat-diet induced glomerular fibrogenesis and inflammation in a mouse model of obesity [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 20171.

[33]Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity [J]. Matrix Biology, 2007, 26(8): 587-96.

[34]Ramsbeck D, Hamann A, Schlenzig D, *et al.* First insight into structure-activity relationships of selective meprin β inhibitors [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 27(11): 2428-31.

[35]Rempe RG, Hartz AMS, Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: versatile breakers and makers [J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2016, 36(9): 1481-507.

[36]Rikimaru A, Komori K, Sakamoto T, *et al.* Establishment of an MT4 - MMP - deficient mouse strain representing an efficient tracking system for MT4 - MMP/MMP - 17 expression in vivo using β -galactosidase [J]. Genes to Cells, 2007, 12(9): 1091-100.

[37]Rosell A, Cuadrado E, Ortega-aznar A, *et al.* MMP-9-Positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type iv collagen degradation

- during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2008, 39(4): 1121-6.
- [38] Shay G, Lynch CC, Fingleton B. Moving targets: emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis [J]. *Matrix Biology*, 2015, 44-46: 200-6.
- [39] Shin JI, Song KS, Kim H, *et al.* The gene expression profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors in children with Henoch-Schönlein purpura [J]. *British Journal of Dermatology*, 2011, 164(6): 1348-55.
- [40] Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia [J]. *Glia*, 1997, 21(1): 2-21.
- [41] Wang X, Khalil R A. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease [M]. *Vascular Pharmacology: Cytoskeleton and Extracellular Matrix*. 2018, 81: 241-330.
- [42] Wang X, Page-mccaw A. A matrix metalloproteinase mediates long-distance attenuation of stem cell proliferation [J]. *Journal of Cell Biology*, 2014, 206(7): 923-36.
- [43] Wei T, Ji X, Yu Q, *et al.* Fear-of-intimacy-mediated zinc transport controls fat body cell dissociation through modulating mmp activity in *Drosophila* [J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(10): 874.
- [44] Wei Y, Zhou XL, Liu TH, *et al.* A matrix metalloproteinase mediates tracheal development in *Bombyx mori* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11) :5618.
- [45] Wen D, Chen Z, Zhang Z, *et al.* The expression, purification, and substrate analysis of matrix metalloproteinases in *Drosophila melanogaster* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 171: 105629.
- [46] Wilinski D, Winzeler J, Duren W, *et al.* Rapid metabolic shifts occur during the transition between hunger and satiety in *Drosophila melanogaster* [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4052.
- [47] Winer A, Adams S, Mignatti P. Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: turning past failures into future successes [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2018, 17(6): 1147-55.
- [48] Almeida-carvalho MJ, Berh D, Braun A, *et al.* The Olimpiad: concordance of behavioural faculties of stage 1 and stage 3 *Drosophila* larvae [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2017, 220(13): 2452-75.
- [49] Biffar L, Stollewerk A. Conservation and evolutionary modifications of neuroblast expression patterns in insects [J]. *Developmental Biology*, 2014, 388(1): 103-16.
- [50] Bowman SK, Rolland V, Betschinger J, *et al.* The tumor suppressors brat and numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila* [J]. *Developmental Cell*, 2008,

14(4): 535-46.

- [51]Koniszewski NDB, Kollmann M, Bigam M, *et al.* The insect central complex as model for heterochronic brain development—background, concepts, and tools [J]. *Development Genes and Evolution*, 2016, 226(3): 209-19.
- [52]Boyan G, Williams L. Embryonic development of the insect central complex: Insights from lineages in the grasshopper and *Drosophila* [J]. *Arthropod Structure & Development*, 2011, 40(4): 334-48.
- [53]Carney TD, Miller MR, Robinson KJ, *et al.* Functional genomics identifies neural stem cell sub-type expression profiles and genes regulating neuroblast homeostasis [J]. *Developmental Biology*, 2012, 361(1): 137-46.
- [54]Okamoto N, Viswanatha R, Bittar R, *et al.* A membrane transporter is required for steroid hormone uptake in *Drosophila* [J]. *Developmental Cell*, 2018, 47(3): 294-305.e7.
- [55]Ono H. Ecdysone differentially regulates metamorphic timing relative to 20-hydroxyecdysone by antagonizing juvenile hormone in *Drosophila melanogaster* [J]. *Developmental Biology*, 2014, 391(1): 32-42.
- [56]Ono H, Rewitz KF, Shinoda T, *et al.* Spook and spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in *Diptera* [J]. *Developmental Biology*, 2006, 298(2): 555-70.
- [57]Ou Y, Chwalla B, Landgraf M, *et al.* Identification of genes influencing dendrite morphogenesis in developing peripheral sensory and central motor neurons [J]. *Neural Development*, 2008, 3(1): 16.
- [58]Pinto-teixeira F, Konstantinides N, Desplan C. Programmed cell death acts at different stages of *Drosophila* neurodevelopment to shape the central nervous system [J]. *FEBS Letters*, 2016, 590(15): 2435-53.
- [59]Roy B, Singh AP, Shetty C, *et al.* Metamorphosis of an identified serotonergic neuron in the *Drosophila* olfactory system [J]. *Neural Development*, 2007, 2(1):20.
- [60]Winding M, Pedigo BD, Barnes CL, *et al.* The connectome of an insect brain [J]. *Science*, 2023, 379(6636): eadd9330.
- [61]Librizzi L, Decutis M, Janigro D, *et al.* Cerebrovascular heterogeneity and neuronal excitability [J]. *Neuroscience Letters*, 2018, 667: 75-83.
- [62]Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, *et al.* Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier [J]. *Cell*, 2015, 163(5): 1064-78.
- [63]Weis SM, Cheresch DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability [J]. *Nature*, 2005, 437(7058): 497-504.

- [64]Roschel H, Gualano B, Ostojic SM, *et al.* Creatine supplementation and brain health [J]. *Nutrients*, 2021, 13(2) :586.
- [65]Parker KR, Migliorini D, Perkey E, *et al.* Single-Cell analyses identify brain mural cells expressing CD19 as potential off-tumor targets for CAR-T immunotherapies [J]. *Cell*, 2020, 183(1): 126-42. e17.
- [66]Banks WA. From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016, 15(4): 275-92.
- [67]Kang XL, Li YX, Li YL, *et al.* The homotetramerization of a GPCR transmits the 20-hydroxyecdysone signal and increases its entry into cells for insect metamorphosis [J]. *Development*, 2021, 148(5): dev196667.
- [68]Schwabe T, Bainton RJ, Fetter RD, *et al.* GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2005, 123(1): 133-44.
- [69]Wonga M, Montan Y, Ramírez J, *et al.* JM-20 treatment prevents neuronal damage and memory impairment induced by aluminum chloride in rats [J]. *Neuro Toxicology*, 2021, 87: 70-85.
- [70]Tsartsalis S, Sleven H, Fancy N, *et al.* A single nuclear transcriptomic characterization of mechanisms responsible for impaired angiogenesis and blood-brain barrier function in Alzheimer’s disease [J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1) :2243.
- [71]Zhang SL, Lahens NF, Yue Z, *et al.* A circadian clock regulates efflux by the blood-brain barrier in mice and human cells [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1) :617.
- [72]Daneman R, Prat A. The blood–brain barrier [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2015, 7(1): a020412.
- [73]Spampinato SF, Merlo S, Sano Y, *et al.* Astrocytes contribute to A β -induced blood-brain barrier damage through activation of endothelial MMP9 [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2017, 142(3): 464-77.
- [74]Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, *et al.* Microglia instruct subventricular zone neurogenesis [J]. *Glia*, 2006, 54(8): 815-25.
- [75]Fourgeaud L, Boulanger LM. Synapse remodeling, compliments of the complement system [J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1034-6.
- [76]Andreone BJ, Lacoste B, Gu C. Neuronal and vascular interactions [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2015, 38(1): 25-46.
- [77]Aoyama K. Glutathione in the brain [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9) :5010.
- [78]Aw SS, Lim IK, Tang MX, *et al.* A glio-protective role of mir-263a by tuning sensitivity

- to glutamate [J]. *Cell Reports*, 2017, 19(9): 1783-93.
- [79] Bentsen MA, Mirzadeh Z, Schwartz MW. Revisiting how the brain senses glucose-and why [J]. *Cell Metabolism*, 2019, 29(1): 11-7.
- [80] Boyko M, Gruenbaum SE, Gruenbaum BF, *et al.* Brain to blood glutamate scavenging as a novel therapeutic modality: a review [J]. *Journal of Neural Transmission*, 2014, 121(8): 971-9.
- [81] Cacciatore M, Grasso EA, TRIPODI R, *et al.* Impact of glucose metabolism on the developing brain [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13: 1047545.
- [82] Goyal MS, Raichle ME. Glucose requirements of the developing human brain [J]. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2018, 66(S3): S46-S49.
- [83] Iijima KM, Besson MT, Alegría K, *et al.* Enhanced neuronal glucose transporter expression reveals metabolic choice in a HD *Drosophila* model [J]. *Plos One*, 2015, 10(3): e0118765.
- [84] Kanner BI. Glutamate transporters from brain [J]. *FEBS Letters*, 2001, 325(1-2): 95-9.
- [85] Li Y, Hou X, Qi Q, *et al.* Scavenging of blood glutamate for enhancing brain-to-blood glutamate efflux [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(1): 305-10.
- [86] Macdonald AJ, Yang YH, Cruz AM, *et al.* Brain-Body control of glucose homeostasis-insights from model organisms [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12:662769.
- [87] Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, *et al.* Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function [J]. *Trends in Neurosciences*, 2013, 36(10): 587-97.
- [88] Oka M, Suzuki E, Asada A, *et al.* Increasing neuronal glucose uptake attenuates brain aging and promotes life span under dietary restriction in *Drosophila* [J]. *iScience*, 2021, 24(1):101979.
- [89] Perkins LA, Holderbaum L, Tao R, *et al.* The transgenic rnaï project at harvard medical school: resources and validation [J]. *Genetics*, 2015, 201(3): 843-52.
- [90] Rooijackers HM, Wieggers EC, Tack CJ, *et al.* Brain glucose metabolism during hypoglycemia in type 1 diabetes: insights from functional and metabolic neuroimaging studies [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2015, 73(4): 705-22.
- [91] Smith HQ, Li C, Stanley CA, *et al.* Glutamate dehydrogenase, a complex enzyme at a crucial metabolic branch point [J]. *Neurochemical Research*, 2017, 44(1): 117-32.
- [92] Tomé D. The roles of dietary glutamate in the intestine [J]. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2018, 73(Suppl. 5): 15-20.
- [93] Cai MJ, Zhao WL, Jing YP, *et al.* 20-hydroxyecdysone activates Forkhead box O to promote proteolysis during *Helicoverpa armigera* molting [J]. *Development*, 2016 ,

143(6):1005-15.

- [94] Yamanaka N, Rewitz KF, O'connor MB. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research [J]. Annual Review of Entomology, 2013, 58(1): 497-516.
- [95] Truman JW, Riddiford LM, Carlson JR. *Drosophila* postembryonic nervous system development: a model for the endocrine control of development [J]. Genetics, 2023, 223(3): iyac184.
- [96] Wang XP, Sun SP, Li YX, *et al.* 20-hydroxyecdysone reprograms amino acid metabolism to support the metamorphic development of *Helicoverpa armigera* [J]. Cell Reports, 2023, 42(6): 112644.
- [97] Di YQ, Han XL, Kang XL, *et al.* Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis [J]. Autophagy, 2020, 17(5): 1170-92.
- [98] Yang H, Zhang R, Zhang Y, *et al.* Cathepsin-L is involved in degradation of fat body and programmed cell death in *Bombyx mori* [J]. Gene, 2020, 760:144998.
- [99] Zakiyanov O, Kalousova M, Zima T, *et al.* Matrix metalloproteinases in renal diseases: a critical appraisal [J]. Kidney and Blood Pressure Research, 2019, 44(3): 298-330.
- [100] Zhang Q, Lu YX, Xu WH. Integrated proteomic and metabolomic analysis of larval brain associated with diapause induction and preparation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* [J]. Journal of Proteome Research, 2012, 11(2): 1042-53.
- [101] Ting CY, Lee CH. Visual circuit development in *Drosophila* [J]. Current Opinion in Neurobiology, 2007, 17(1): 65-72.
- [102] Volkenhoff A, Weiler A, Letzel M, *et al.* Glial glycolysis is essential for neuronal survival in *Drosophila* [J]. Cell Metabolism, 2015, 22(3): 437-47.
- [103] Segarra M, Aburto MR, Hefendehl J, *et al.* Neurovascular interactions in the nervous system [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2019, 35(1): 615-35.
- [104] Tsuyama T, Kishikawa JI, Han YW, *et al.* In vivo fluorescent adenosine 5' -triphosphate (ATP) imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(16): 7889-96.
- [105] Hagenbuch B, Stieger B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2013, 34(2-3): 396-412.
- [106] Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(5): 3177-84.
- [107] Wang XP, Huang Z, *et al.* Krüppel-like factor 15 integrated autophagy and

gluconeogenesis to maintain glucose homeostasis under 20-hydroxyecdysone regulation [J].
PLOS Genetics, 2022, 18(6): e1010229.