

分类号: Q78

密 级:

单位代码: 10422

学 号: 202112479



山东大学
SHANDONG UNIVERSITY

硕士学位论文

Thesis for Master Degree

论文题目: 琥珀酰化修饰对过氧化氢酶在昆虫变态发育
中功能的调节机制研究

**The regulatory mechanism of catalase function in insect
metamorphosis by succinylation**

作者姓名	侯明叶
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	董杜鹃 副教授
合作导师	

2024 年 5 月 30 日

目 录

1 前言.....	1
1.1 过氧化氢酶.....	1
1.1.1 过氧化氢的双重作用.....	1
1.1.2 过氧化氢酶负责维持过氧化氢的正常浓度.....	1
1.1.3 过氧化氢酶活性失调引发多种生理问题.....	2
1.1.4 过氧化氢酶的活性调节.....	2
1.2 琥珀酰化.....	3
1.2.1 琥珀酰化的功能.....	3
1.2.2 琥珀酰化的发生.....	4
1.2.3 琥珀酰化的去除.....	6
1.3 昆虫变态发育.....	7
1.4 存在的科学问题、研究内容和研究意义.....	8
2 琥珀酰化修饰调节 CAT 的活性参与昆虫变态.....	10
2.1 引言.....	10
2.2 实验材料.....	10
2.2.1 实验动物.....	10
2.2.2 实验细胞.....	10
2.2.3 实验试剂.....	10
2.2.4 实验仪器.....	11
2.3 实验方法.....	11
2.3.1 基因克隆及生物信息学分析.....	11
2.3.2 DNA 抽提.....	11
2.3.3 RNA 提取.....	11
2.3.4 反转录.....	12
2.3.5 实时定量 PCR.....	12
2.3.6 dsRNA 合成.....	12
2.3.7 RNA 干扰.....	12
2.3.8 TA 克隆.....	13
2.3.9 多克隆抗体制备.....	13
2.3.10 CAT 活性及 H ₂ O ₂ 浓度的测定.....	13
2.3.11 蛋白提取.....	13
2.3.12 蛋白质免疫印迹.....	14
2.3.13 过表达质粒的构建与细胞系过表达.....	14
2.3.14 Ni ²⁺ 柱纯化细胞中的重组蛋白.....	14

2.3.15 Protein A 纯化虫体蛋白	15
2.3.16 双荧光素酶报告实验.....	15
2.3.17 统计方法.....	15
2.4 实验结果.....	17
2.4.1 棉铃虫 catalase 基因的鉴定	17
2.4.2 变态期 CAT 活性上升	19
2.4.3 敲降 Cat 抑制成虫组织增殖	20
2.4.4 CAT 在不同发育阶段的蛋白水平无明显差异.....	22
2.4.5 CAT 翻译后修饰水平的变化	23
2.4.6 去除琥珀酰化修饰后,CAT 活性上升.....	24
2.4.7 SIRT5 负责去除 CAT 琥珀酰化修饰.....	25
2.4.8 20E 通过 EcR 在转录水平上调 Sirt5 表达	27
2.5 讨论.....	29
2.5.1 琥珀酰化修饰去除后 CAT 活性升高,促进细胞增殖.....	29
2.5.2 CAT 的功能受到多重因素的协同调节	31
2.6 结论.....	32
参考文献.....	33

摘 要

研究背景、科学问题及研究意义

多数生物需要有氧呼吸为生命活动提供能量,但在此过程中会产生活性氧,活性氧有多种形式,过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 是其中一种。高浓度的 H_2O_2 会对机体造成氧化损伤,而适量浓度的 H_2O_2 可以作为信号分子参与多种生理过程。过氧化氢酶 (catalase, CAT) 负责清除过量的 H_2O_2 , 维持 H_2O_2 在合适的浓度范围,是生物防御氧化应激的主要效应器。CAT 活性调节紊乱会使机体因 H_2O_2 浓度升高等因素引发代谢异常及疾病发生。那么 CAT 活性受到什么因素调节呢? 翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 是修饰基团通过共价键结合在氨基酸上,从而调节蛋白功能以适应周边环境变化的快速调节方式。琥珀酰化是发生在赖氨酸上的一种 PTM,其供体琥珀酰基来自基础代谢途径三羧酸循环,与细胞代谢状态密切相关,且该修饰使赖氨酸发生较大的质量和电荷变化,对靶标蛋白的活性和亚细胞定位有较大影响。琥珀酰化的发生可以通过酶促或非酶促的方式,琥珀酰化的去除则可以由沉默信息调节蛋白 2 相关酶 5 (sir2-related enzyme 5, SIRT5) 负责。琥珀酰化参与多个物种的多种生理过程的调节,但其上游调节机制尚不清楚。综上所述,提出科学问题,CAT 的活性是否受到琥珀酰化修饰调节,具体调节机制如何?

昆虫从幼虫向成虫转变的变态过程中,代谢状态差异较大,且不仅外观形态发生显著变化,内部器官如中肠和脂肪体也要发生解离和重塑,是研究琥珀酰化调节蛋白功能的良好模型。因此,我们拟以完全变态昆虫棉铃虫为研究对象,对变态启动前后 CAT 的活性进行比较,探索琥珀酰化对 CAT 在变态发育过程中功能的调节及上游机制。研究成果可丰富 CAT 通过 PTM 改变活性以响应细胞环境变化的机制研究,并为害虫防治和疾病治疗提供新的靶标。

研究结果

我们首先在棉铃虫中克隆并鉴定了 *Cat* 基因。随后检测了不同龄期 H_2O_2 浓度和 CAT 活性的变化,发现在变态期 H_2O_2 含量上升,CAT 活性上升。利用 RNA 干扰技术,敲降 *Cat*,结果表明敲降 *Cat* 后,成虫组织的增殖受到抑制,导致变态过程受阻。为探究 CAT 活性的调节因素,制备了多克隆抗体。免疫印迹实验显示 CAT 在不同组织中均有表达,且在不同龄期的表达量没有明显差异。接着,通过免疫沉淀实验检测了 CAT 的几种 PTM 在变态启动前后的变化,结果显示,与取食期相比,变态期磷酸化和乙酰化修饰水平没有变化,而琥珀酰化修饰水平下降。随后,我们根据琥珀酰化修饰组学的结果,构建质粒,将可能发生琥珀酰化的 7 个赖氨酸位点突变为精氨酸,模拟去琥珀酰化的状态,在

棉铃虫表皮细胞系中进行过表达。结果显示, K96、K241 和 K456 这三个位点突变后, 突变体的琥珀酰化修饰水平下降, 酶活性和促增殖能力显著上升。进一步, 通过 RNA 干扰和免疫共沉淀实验, 证明了 SIRT5 可直接与 CAT 结合, 负责其琥珀酰化修饰的去除, 并通过双荧光素酶报告实验证明 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 可通过转录因子蜕皮激素核受体 (ecdysone nuclear receptor, EcR) 在转录水平促进 *Sirt5* 的表达。

结论

在幼虫取食期, CAT 以琥珀酰化修饰状态存在, 酶活性较低, 使 H_2O_2 可以较低浓度存在; 进入变态期, H_2O_2 浓度升高, 同时 20E 通过 EcR 上调 *Sirt5* 的表达, SIRT5 使 CAT 去除琥珀酰化修饰, 酶活性上升, 去除多余的 H_2O_2 , 促进成虫组织的增殖, 进而促进昆虫变态发育。

关键词: 过氧化氢酶; 琥珀酰化修饰; 20-羟基蜕皮酮; 沉默信息调节蛋白 2 相关酶 5; 昆虫变态

ABSTRACT

Research background, scientific problem and research significance

Most organisms need aerobic respiration to provide energy for life activities, but reactive oxygen species are produced in this process, hydrogen peroxide (H_2O_2) is one of the various forms of reactive oxygen species. High concentration of H_2O_2 will cause oxidative damage to the body, while appropriate concentration of H_2O_2 can be used as a signal molecule to participate in a variety of physiological processes. Catalase (CAT) is responsible for clearing excess H_2O_2 in order to maintain H_2O_2 in the appropriate concentration, and CAT is the main effector required for biological defense against oxidative stress. The disturbance of CAT activity can cause metabolic abnormalities and diseases due to the increase of H_2O_2 concentration. So, what factors regulate CAT activity? Post-translational modification (PTM) is a rapid way in which modification groups are bound to amino acids through covalent bonds, thereby regulating protein function to adapt to changes in the surrounding environment. Succinylation is a kind of PTM that occurs on lysine. Succinyl group comes from the tricarboxylic acid cycle, which is closely related to the metabolic state of cells. This modification causes changes in mass and charge, then changes the activity or subcellular localization of target proteins. Succinylation can occur by enzymatic or non-enzymatic means, and removal of succinylation has been reported to be regulated by sir2-related enzyme 5 (SIRT5). Succinylation is involved in the regulation of multiple physiological processes in multiple species, but its upstream regulatory mechanisms are unclear. Therefore, the scientific question was raised: Is the activity of CAT regulated by succinylation and what is the detailed mechanism?

During the metamorphosis of insects from larva to adult, the metabolic state is quite different, and not only the morphology changes significantly, but also the internal organs such as midgut and fat body are dissociated and reshaped, which provides a good model for exploring the mechanism of succinylation regulating protein function. In this paper, we intend to detect the CAT activity fluctuation during metamorphosis in *Helicoverpa armigera*, a complete metamorphosis insect, to explore the regulation and upstream mechanism of succinylation on CAT function. The results can enrich the research on the mechanism of CAT altering activity through PTM in response to changes in the cellular environment and provide new targets for pest control and disease treatment.

Results

Firstly, we cloned and identified *Cat* gene in *H.armigera*. Then, we detected the changes of H_2O_2 content and CAT activity at different ages, and it was found that the content of H_2O_2 and activity of CAT increased during metamorphosis. RNA interference technology was used to knock down *Cat*, and the results showed that the proliferation of adult tissues was inhibited after knocking down *Cat*, which led to the obstruction of metamorphosis. To explore the regulatory factors of CAT activity, polyclonal antibodies were prepared. Western blot showed that CAT was expressed in different tissues, and there was no significant difference in expression levels at different ages. Then, we detected the changes of several PTMs of CAT before and after the initiation of metamorphosis by immunoprecipitation. The results showed that phosphorylation and acetylation levels did not change compared with the feeding stage, while the succinylation decreased. Subsequently, based on the results of succinylation modification omics, we constructed plasmids that mutated 7 lysine sites likely to undergo succinylation into arginine, simulated the desuccinylation state, and overexpressed them in *Helicoverpa armigera* epidermal cell line. The results showed that the succinylation levels of K96R, K241R and K456R mutants decreased, meanwhile the enzyme activity and ability of promoting proliferation increased significantly. Further, through RNAi and co-immunoprecipitation, it was demonstrated that SIRT5 could directly bind to CAT and be responsible for the removal of its succinylation. Dual-Luciferase reporter assay confirmed that 20-hydroxyecdysone (20E) could promote the transcription of *Sirt5* through the transcription factor ecdysone nuclear receptor (EcR).

Conclusion

During the feeding stage, CAT exists in succinylated state with low activity, so that H_2O_2 can exist in low concentration. During metamorphosis, the concentration of H_2O_2 increases. At the same time, 20E up-regulates the transcription of *Sirt5* through EcR. SIRT5 directly binds to CAT to remove the succinylation of CAT, increases the CAT activity. Then, CAT can remove excess H_2O_2 , promote the proliferation of adult tissues and the metamorphosis of insects.

Key words: CAT; Succinylation; 20-hydroxyecdysone; SIRT5; Metamorphosis

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
CAT	catalase	过氧化氢酶
BLAST	Basic Local Alignment Search TOOL	序列对比工具
SIRT5	sir2-related enzyme 5	沉默信息调节蛋白 2 相关酶 5
ExPASy	Expert Protein Analysis System	专业蛋白质分析系统
bp	base pair	碱基对
NaCl	sodium chloride	氯化钠
ddH ₂ O	double distilled H ₂ O	双蒸水
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DPBS	dulbecco's phosphate buffered saline	杜氏磷酸盐缓冲液
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
DEPC	diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
BSA	bovine serum albumin	牛血清蛋白
20E	20-hydroxyecdysone	20-羟基蜕皮酮
DMSO	dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
6F	feeding stage of sixth instar larvae	6 龄取食期幼虫
6M	metamorphic molting stage of sixth instar larvae	6 龄变态期幼虫
P	pupa	蛹
FBS	fatal bovine serum	胎牛血清
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
RFP	red fluorescent protein	红色荧光蛋白
IPTG	isopropylthio- β -D-galactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
kDa	kilodalton	千道尔顿
L	liter	升
M	mol per liter	摩尔每升
mg	milligram	毫克
ml	milliliter	毫升
min	minute	分钟

续表 1-1 符号说明

Tab. 1-1 Symbol description (continued)

缩略语	英文全称	中文全称
TBS	tris-buffered saline	Tris 盐缓冲液
Tris-HCl	tris-hydrochloride	Tris 盐酸盐
WB	Western blot	免疫印迹
Co-IP	co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
IP	immunoprecipitation	免疫沉淀
ECR	ecdysone nuclear receptor	蜕皮激素核受体
ECRE	ecdysone response element	蜕皮激素响应元件
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
HaEpi	<i>Helicoverpa armigera</i> epidermal cell line	棉铃虫表皮细胞系
IM	imaginal midgut	成虫中肠
LM	larval midgut	幼虫中肠
qRT-PCR	quantitative real time PCR	实时定量 PCR
PTM	post-translation modification	翻译后修饰
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应

1 前言

1.1 过氧化氢酶

1.1.1 过氧化氢的双重作用

大多数生物体都需要氧气来维持其基本的生命活动, 有氧呼吸可为需氧生物的各项生命活动提供能量^[1]。但在此过程中有一些电子会与氧气发生反应, 形成活性氧 (reactive oxygen species, ROS)^[2]。ROS 是具有高反应性的一类含氧物质的总称^[3], 包括两大类型, 一是自由基类型, 如羟自由基、脂质自由基和超氧阴离子自由基等; 二是非自由基类型, 如过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2)、臭氧和单线态氧和等^[4]。最初, 人们认为 ROS 是生物体代谢的有害产物, 它们不断进行各种氧化反应, 破坏生物体内具有重要生物功能的分子^[5]。例如, ROS 会氧化氨基酸, 破坏蛋白质结构, 致使蛋白质活性降低^[6]; 还会氧化鸟嘌呤, 使原本与腺嘌呤配对的鸟嘌呤与胞嘧啶配对, 引发基因突变, 甚至导致基因双链断裂^[7]等。后来, 人们逐渐认识到 ROS 有利的一面, 如适量浓度的 ROS 可以通过氧化半胱氨酸残基, 灭活自噬相关蛋白酶, 来促进细胞自噬^[8]; ROS 还可以通过氧化还原敏感信号转导途径, 介导细胞内信号转导, 参与多种生理生化反应^[9]。

H_2O_2 是活性氧的一种, 属于非自由基类型, 过量 H_2O_2 对机体有害, 如 H_2O_2 通过氧化靶标蛋白上半胱氨酸残基, 破坏蛋白质功能^[10]; H_2O_2 还可通过抑制核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 的磷酸化, 阻碍 NF- κB 的 DNA 结合, 阻断肿瘤坏死因子诱导的 NF- κB 活化, 进而抑制下游存活基因的转录, 引发细胞死亡^[11]等。另一方面, 由于 H_2O_2 具有不带电、在生理条件下相对稳定、有酶促生成和降解等特点, 在发挥信号转导作用时具有独特优势, 与 Ca^{2+} 和 ATP 类似, 是信号分子的前沿^[12]。例如 H_2O_2 可以作为损伤信号, 引发免疫细胞的募集, 参与伤口愈合的初始过程^[13]。除此之外, H_2O_2 可以通过酶促的方式转化为氨基酸衍生的过氧化物, 从而避免被还原失活, 进而参与蛋白激酶 G 的选择性氧化激活, 产生氧化还原信号^[14]。综上, 包括 H_2O_2 在内的 ROS 需维持适宜浓度, 使其既可发挥有益作用又免于过量对机体造成有害损伤。

1.1.2 过氧化氢酶负责维持过氧化氢的正常浓度

在生理系统中, ROS 的产生与抗氧化防御协同存在, 若其生成与降解之间严重失衡, 会导致生物分子过度氧化, 发生损伤, 称为氧化应激^[15]。机体的 ROS 要维持一个合适浓度, 既能发挥有益作用, 又不引起氧化应激。这一工作由生物体内的保护酶系统完成。保护酶系统包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和过氧化物酶^[16]。CAT 是保护酶系统中的关键酶, SOD 将超氧化物转化为 H_2O_2 ^[17],

CAT 负责将过量的 H_2O_2 转变为无毒的水和氧气,并能保持细胞中 H_2O_2 的最佳水平,这是 H_2O_2 发挥细胞信号传导作用所必需的^[18]。

CAT 包括三种类型:典型的或者真正的 CAT、过氧化氢酶-过氧化物酶和锰过氧化氢酶。前两个类型结合血红素作为辅基,第三个类型不结合血红素,活性位点结合锰离子^[19]。典型的 CAT 仅可以催化底物进行氧化还原反应,分布范围广泛,包括真细菌、古细菌、原生菌、真菌、植物和动物,它是最丰富的一类;而过氧化氢酶-过氧化物酶不仅可以催化底物还原,还表现出过氧化物活性,它在植物和动物中不存在;第三类,只在细菌中发现的锰过氧化氢酶,它是一个小型细菌蛋白质家族,在活性位点结合两个锰离子,被称为非血红素含锰催化酶^[20]。真正的 CAT 在进化过程中又发展出了不同的分支。细菌,藻类和部分植物中的 CAT 属于分支 1,其亚基较小 (55-69 kDa);分支 2 包括重组细菌和部分真菌中的 CAT,其具有较大的亚基 (75-84 kDa);分支 3 是三个分支中最丰富的,包括古细菌、部分真菌、原生生物、部分植物和动物中的 CAT^[21]。

1.1.3 过氧化氢酶活性失调引发多种生理问题

CAT 缺乏或者活性降低会因 H_2O_2 无法正常清除而导致多种疾病发生。如阿尔茨海默病患者体内 β -淀粉样蛋白与 CAT 相互作用,抑制了 CAT 的活性,导致 H_2O_2 的浓度升高,机体氧化损伤增加^[22]。在小鼠中,CAT 的活性降低后, H_2O_2 浓度升高,导致严重的氧化应激,引起细胞损伤,促进脂肪性肝病的发展^[23]。此外,细胞的生长依赖于 CAT,与野生型的前列腺癌人源细胞系相比,将 *Cat* 敲低之后,突变型细胞系对 H_2O_2 的敏感性上升,增殖能力显著下降;再进行挽救实验,即过表达有功能的 CAT 后,表型得以逆转^[24]。

但是, H_2O_2 的过渡清除对机体也是不利的。例如, H_2O_2 是甲状腺中碘化物氧化和甲状腺激素合成的必需辅助因子,缺乏 H_2O_2 会致使甲状腺激素合成和分泌减少,甲状腺的功能发生衰退^[25]。

因此,CAT 的活性需要受到严格地调控,一方面要能及时清除过量的 H_2O_2 ,否则, H_2O_2 就会引起氧化应激,对机体造成损伤;另一方面又不能完全清除 H_2O_2 ,要保持 H_2O_2 在一个适当的浓度,使其能发挥信号分子或者辅助因子的作用。

1.1.4 过氧化氢酶的活性调节

研究表明,过表达 CAT 并不会降低心脏中 H_2O_2 的标准水平,只有当 H_2O_2 水平升高时,过表达的 CAT 才会发挥作用清除多余的 H_2O_2 ,维持 H_2O_2 的正常水平^[26]。由此可以看出,CAT 的活性受到精确的调控,可将 H_2O_2 维持在适宜浓度,那么 CAT 的活性受到什么因素影响呢?

一方面,CAT 发挥活性需要多聚体的形成。人过氧化氢酶是同源四聚体,包含四个相同的亚基,每个亚基包含四个不同的结构域和一个血红素辅基^[27]。这四个不同的结构

域分别为：(1) 含有远端组氨酸的 N 末端臂结构域，组氨酸是 CAT 发挥作用所必需氨基酸；(2) 含有结合血红素基团的酪氨酸残基的连接域；(3) β 桶结构域，这是 CAT 的疏水核心；(4) 负责与还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸结合的 α 螺旋结构域^[21]。

另一方面，除了聚合形式影响 CAT 的活性，CAT 的亚细胞定位也会影响其活性。CAT 主要位于过氧化物酶体中，众所周知，CAT 是过氧化物酶体中含量最多的酶，可以作为过氧化物酶体的标志物。除了定位于过氧化物酶体，在细胞质基质中也发现 CAT 的存在^[28]。CAT 的定位可能决定了其保护细胞免受氧化损伤的功效，研究证实细胞质基质定位的 CAT 比位于过氧化物酶体的 CAT 对 H_2O_2 的消除作用更显著^[29]。而且在外添加 H_2O_2 的情况下，细胞质基质定位的 CAT 减少时，会导致细胞的活力降低^[30]，这表明 CAT 进入细胞质基质可能是改善急性氧化应激的功能机制。所以，为了更好地应对氧化应激，过氧化物酶体生物发生因子 14 磷酸化后，会选择性地抑制过氧化物酶体生物发生因子 5 介导的过氧化氢酶复合物的形成，阻止 CAT 进入过氧化物酶体，使 CAT 定位于细胞质基质中^[31]。

此外，过氧化氢酶活性还受到酶蛋白数量的调节。过往对于过氧化氢酶蛋白量的调节主要集中在对过氧化氢酶的转录调节，一方面，有研究证明，转录因子核因子^[32]、特异性蛋白 1^[32]和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ^[33]等都可以调控过氧化氢酶基因的转录。但是另一方面，也有研究显示，过氧化氢酶基因具有管家基因的所有关键特征，包括没有 TATA 盒，无起始元件序列，启动子 GC 含量高等^[34]，说明过氧化氢酶基因可以持家表达。那么在持家表达即蛋白表达量一致的情况下，CAT 如何调节其活性使其在过氧化氢浓度过高时清除过氧化氢，过氧化氢浓度适宜时又不发挥活性呢？除表达调控外，CAT 的活性还受到什么因素调节，以及这些调节因素和 CAT 的聚合和亚细胞定位有什么关系，目前尚不清楚。

1.2 琥珀酰化

翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 指在靶标蛋白质的氨基酸上，通过共价键连接修饰基团的翻译后加工过程。细胞代谢中间产物如乙酰基、琥珀酰基等都是常见的修饰基团。PTM 将蛋白功能与细胞环境的改变连接在一起，可通过调节蛋白质亚细胞定位、蛋白间相互作用、蛋白构象与活性等方式快速调节蛋白功能以迅速应答外界环境变化。

1.2.1 琥珀酰化的功能

常见翻译后修饰的靶标氨基酸有很多，而赖氨酸是名副其实的明星靶标，可以通过添加不同的酰基来进行修饰，如甲基化、琥珀酰化、丙二酰化、乙酰化、戊二酰化等^[35]。

与甲基化和乙酰化相比,琥珀酰化修饰后会带来更大的改变。一方面,琥珀酰化修饰发生更大的质量变化。发生单甲基化修饰后,赖氨酸残基相对分子质量增加 14 Da; 发生乙酰化修饰后,赖氨酸残基相对分子质量增加 40 Da; 与前两者相比,琥珀酰化修饰的供体—琥珀酰辅酶 A 可以使赖氨酸残基相对分子质量增加 100 Da。另一方面,琥珀酰化修饰使赖氨酸的电荷性质也发生了扭转。在生理 pH 条件下,赖氨酸侧链带一个正电荷,发生单甲基化修饰后,赖氨酸残基的电荷状态不发生改变; 发生乙酰化修饰后,赖氨酸残基的电荷状态从+1 变为 0; 与前两者相比,琥珀酰化修饰可以使赖氨酸残基的电荷状态从+1 变为-1,扭转赖氨酸的电荷性质^[36]。因此,琥珀酰化修饰比已知具有重要细胞作用的甲基化修饰和乙酰化修饰,更能诱导靶标氨基酸化学性质发生实质性的变化,所以可能对相应蛋白功能产生更大的影响。

已有报道,琥珀酰化修饰通过调节靶蛋白的功能,参与多种基本的细胞代谢活动,包括氨基酸代谢^[37]、葡萄糖代谢^[38]和脂肪酸代谢^[39]等。琥珀酰化修饰调节蛋白功能的方式很多,常见的方式包括影响蛋白的稳定性、酶活性以及蛋白的细胞定位等。研究表明,组蛋白发生琥珀酰化修饰后,会降低与 DNA 之间的亲和力,进而降低核小体和染色体的稳定性,影响基因的表达^[40]。在利用组蛋白 3 (histone 3, H3) 在 NaCl 溶液中的溶解度的高低,来象征核小体稳定性的实验中,以表达野生型组蛋白 H3 作为对照,与对照组相比,表达组蛋白 H3 K122E 模拟琥珀酰化修饰状态时,组蛋白 H3 在 NaCl 溶液中的溶解度显著升高,而在表达组蛋白 H3 K122R 模拟去琥珀酰化修饰状态时,溶解度下降,这说明,去除琥珀酰化修饰有利于核小体的稳定性^[41]。此外,琥珀酰化修饰状态对不同的癌症细胞有不同的影响。在胃癌组织中,乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase A, LDHA) 在第 222 位赖氨酸被琥珀酰化修饰后,会减少泛素化状态的 LDHA,阻碍其与整合体 1 的结合,导致 LDHA 溶解减少,促进胃癌细胞的生长和迁移,对胃癌患者产生显著的负面影响^[42]。相反的,在食管鳞状细胞癌中,靶蛋白赖氨酸位点琥珀酰化修饰的增加,会抑制肿瘤的生长和迁移^[43]。

赖氨酸琥珀酰化在细菌、昆虫以及哺乳动物中都具有进化保守性^[44]。在哺乳动物中已有较多的报道,琥珀酰化修饰可以参与到癌症的发生和发展^[45]、细胞免疫反应^[40]等,但是在昆虫的变态发育过程中,琥珀酰化修饰的作用报道还比较少。

1.2.2 琥珀酰化的发生

细胞内蛋白琥珀酰化修饰水平会随细胞代谢的波动而发生动态变化^[46]。在三羧酸循环、糖酵解和呼吸电子传递链受损的情况下,细胞整体的琥珀酰化修饰水平可能会降低; 与此相反,在氧浓度较低并且存在高浓度葡萄糖的条件下,细胞整体琥珀酰化修饰水平可能会增加^[47]。赖氨酸的琥珀酰化修饰可通过非酶促方式发生^[48]。在有机体生理代谢的过程中,化学反应会形成许多活性酯,活性酯可以与赖氨酸残基反应,其中琥珀酰辅酶

A 的酰化速率最高, 是乙酰辅酶 A 的 150 倍^[49]。并且有研究证明, 碱性 pH 和高浓度琥珀酰辅酶 A 足以引发蛋白赖氨酸非酶促琥珀酰化的发生^[50]。此外, 也有研究表明, 琥珀酰辅酶 A 作为一种高反应性的内源性代谢物, 可以在很宽的 pH 范围内修饰蛋白质赖氨酸残基^[49]。常见的误解认为琥珀酰辅酶 A 仅在线粒体基质中产生, 事实上, 除了线粒体基质, 琥珀酰辅酶 A 还可以在过氧化物酶体中生成, 并且过氧化物酶体中产生的琥珀酰辅酶 A 不同于线粒体基质中产生的, 前者产生的琥珀酰辅酶 A 可能会进入细胞质基质中^[51]。

除了上述的非酶促发生机制, 琥珀酰化修饰也可以通过酶促反应发生。催化赖氨酸发生琥珀酰化修饰的常见酶包括 α -酮戊二酸脱氢酶复合物 (α -ketoglutarate dehydrogenase complex, α -KGDHC)、肉碱棕榈酰转移酶 1A (carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A) 和赖氨酸乙酰转移酶 2A (lysine acetyltransferase 2A, KAT2A) 等^[52]。

α -KGDHC 不仅可以催化自身琥珀酰化, 也可以催化 TCA 循环中包括延胡索酸水化酶、异柠檬酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶复合物等其他酶的琥珀酰化, 进而改变这些酶活性, 影响细胞代谢^[53]。 α -KGDHC 除了直接通过酶促的方式催化底物蛋白发生琥珀酰化修饰, 还可以通过调节琥珀酰辅酶 A 的水平, 通过非酶促的方式促进靶标蛋白琥珀酰化修饰的发生^[54]。

KAT2A 属于 GCN5 相关 N-乙酰转移酶超家族, 被归类为组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HAT), 可与乙酰辅酶 A 结合并将其乙酰基团转移到组蛋白上, 促进组蛋白发生乙酰化修饰^[55]。但最近的研究表明, 在与不同蛋白形成的复合物中, KAT2A 不仅可以作为 HAT, 还可以发挥琥珀酰转移酶的作用。例如, KAT2A 与细胞核中的 α -KGDHC 相互作用, 即 α -KGDHC 偶联的 KAT2A 可以催化组蛋白 H3 发生琥珀酰化修饰^[56]; KAT2A 还可与丙酮酸激酶 M2 直接相互作用, 使其在第 475 位赖氨酸发生琥珀酰化修饰, 琥珀酰化的发生抑制其活性, 加速糖酵解过程, 从而促进胃癌的发展^[57]; KAT2A 还可以催化 C 末端结合蛋白 1 在 K46 和 K280 位点发生琥珀酰化, 降低了 C 末端结合蛋白 1 对钙粘蛋白 1 转录的抑制活性, 从而起到了癌基因的作用, 促进前列腺癌的发展^[58]。

除了上述的琥珀酰基转移酶, CPT1A 也能利用琥珀酰辅酶 A 作为底物, 在体外和体内作为琥珀酰转移酶发挥作用。亚细胞分布研究表明, CPT1A 催化发生琥珀酰化修饰的蛋白质中, 几乎 50% 是胞质蛋白质^[59], 而且可以促进多种癌症的发展。例如, CPT1A 催化烯醇化酶 1 发生琥珀酰化修饰, 降低烯醇化酶 1 的酶活性, 进而促进乳腺癌细胞的增殖^[59]; CPT1A 促进线粒体裂变因子 K302 处的琥珀酰化, 从而阻止泛素-蛋白酶体降解线粒体裂变因子, 以促进卵巢癌的发展^[60]。除此之外, 还可以促进胃癌的发展。CPT1A 与 S100 蛋白相互作用, 使 S100 蛋白发生琥珀酰化, 抑制 S100 蛋白的泛素化, 进而抑制泛素化后的蛋白酶体降解, 促使 S100 蛋白积累, 增加了细胞侵袭和迁移, 促进胃癌

的发展^[61]。

1.2.3 琥珀酰化的去除

目前报道沉默信息调节蛋白 2 相关酶 5 (sir2-related enzyme 5, SIRT5) 和沉默信息调节蛋白 2 相关酶 7 (sir2-related enzyme 7, SIRT7) 负责去除不同蛋白的琥珀酰化修饰^[62]。SIRT5 和 SIRT7 都属于沉默信息调节蛋白家族 (silence information regulators, sirtuins, SIRTs)。SIRTs 是酵母 Sir2 蛋白酶同系物, 具有高度保守性, 依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸才能发挥作用, 属于第三类组蛋白脱乙酰酶^[63]。SIRTs 是细胞生长和分化、自噬和凋亡、代谢和衰老等各种生理过程的关键调节因子, 而且对 PTMs 的去除至关重要^[64]。SIRTs 共包括 SIRT1-7, 7 个蛋白成员。在整个进化过程中, 虽然这 7 个蛋白成员负责发挥催化作用的核心结构域具有保守性, 但是由于它们的 N 端和 C 端区域在结构上的不同, 造成了它们在亚细胞定位以及底物特异性方面有明显的不同^[65]。例如, 在细胞定位方面, SIRT1 和 SIRT2 位于细胞核和细胞质基质中; SIRT3、SIRT4 和 SIRT5 主要穿梭于线粒体中, 但在细胞质基质中也有存在; SIRT6 和 SIRT7 主要定位于细胞核中^[66]。在功能方面, SIRT1、SIRT3 和 SIRT3 具有强大的脱乙酰基酶活性, 负责去除靶标蛋白的乙酰化修饰; 而 SIRT4、SIRT5、SIRT6 和 SIRT7 没有检测到或只有非常弱的脱乙酰基酶活性^[67]。

其中, SIRT5 去乙酰基能力较低, 但具有较强的去琥珀酰化活性^[68]。亚细胞定位显示, SIRT5 部分定位于线粒体中, 还有部分存在于线粒体外的细胞质基质中^[37]。研究表明, 当 *Sirt5* 被敲除后, 所有组织中的蛋白琥珀酰化修饰水平均会上升^[69]。SIRT5 的底物蛋白已有较多的报道。SIRT5 对膜联蛋白 1 (Annexin A1, ANXA1) 的去琥珀酰化会促进 ANXA1 核定位并减少 ANXA1 膜募集^[70]。SIRT5 还可以介导 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 2 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2, HMGCS2) 去琥珀酰化, 激活 HMGCS2, 提高其催化活性, 以促进肝脏产生酮体^[71]。

SIRT5 去除琥珀酰化修饰的作用对线粒体功能有显著影响, 抑制 SIRT5 的表达, 会导致细胞凋亡诱导因子线粒体相关 1 (apoptosis inducing factor mitochondria associated 1, AIFM1) 琥珀酰化修饰增加, 抑制 AIFM1 与胆固醇酯转移蛋白之间的相互作用, 导致线粒体功能障碍^[72]。而且, SIRT5 介导 SOD1 和过氧化还原蛋白 3 (peroxiredoxin 3, PRDX3) 的琥珀酰化修饰的去除, 可以提高 SOD1^[73]和 PRDX3^[74]的活性, 缓解线粒体氧化应激。

此外, SIRT5 去除琥珀酰化修饰与癌症的发展密切相关。SIRT5 使 LDHA 去琥珀酰化, 降低 LDHA 的活性, 减少乳酸的产生, 从而显著减少前列腺癌细胞的迁移和侵袭^[75]。SIRT5 通过调节 c-myc 的去琥珀酰化来促进脊索瘤的恶性发展^[76]。

琥珀酰化修饰参与从低等到高等多个物种的多种生理过程, 但是负责改变琥珀酰化修饰状态的酶, 尤其是这些酶的上游调节机制还有待进一步探索。

1.3 昆虫变态发育

昆虫占我们所知物种数量的一半以上, 是世界上最繁盛的生物^[77]。昆虫之所以能够达到如此繁多的种类的数量, 离不开其发育过程中的两个环节—蜕皮和变态。在生长发育过程中, 为了适应环境, 昆虫进化出坚硬的外骨骼, 但外骨骼限制其生长, 为此, 昆虫需要通过 20-羟基蜕皮酮 (20-hydroxyecdysone, 20E) 滴度的激增导致的蜕皮来实现生长^[78]。新角质层的形成, 旧角质层的脱落, 这一过程, 称之为蜕皮。

变态是昆虫生长过程中另一个重要的现象, 主要指幼虫向成虫的转变过程, 在这个过程中, 昆虫体内的代谢和营养状况发生显著变化, 可以帮助昆虫更好的适应环境的改变。昆虫的变态发育为昆虫从一个小而不为人知的土壤动物群体转变为数量庞大的陆地优势群体提供了条件^[79]。

完全变态类的昆虫一生要经历由卵、到幼虫、到蛹和最后成虫 4 个发育阶段, 幼虫与成虫不仅在外观上有较大的差别, 而且体内幼虫组织发生自噬凋亡^[80], 成虫组织经历增殖重建^[81], 包括唾液腺^[82]、中肠^[83]和脂肪体^[84]等组织, 都会经历自噬凋亡和增殖。

脂肪体是昆虫的代谢中心, 是一种疏松、动态的组织, 类似于脊椎动物的脂肪组织和肝脏, 是调节昆虫发育和行为的主要组织之一, 不同的昆虫有形态各异的脂肪体^[85]。在完全变态昆虫的变态过程中, 幼虫脂肪体经历脂肪体重塑过程来形成成虫脂肪体。具体来说, 是在 20E 等激素和物质的刺激下, 基质金属蛋白酶初步解离幼虫脂肪体细胞, 适当解离后, 通过细胞自噬凋亡发生组织完全分解, 此时幼虫脂肪体的大小、形态和功能都已发生巨变, 形成成虫脂肪体^[86]。在果蝇中, 取食期呈现多边形的脂肪体细胞紧密排列在一起, 进入变态期后, 脂肪体细胞逐渐解离, 最后完全分离成分布疏松的单个脂肪体细胞, 呈絮状, 进入预成虫期, 离散分布的脂肪体细胞逐渐形成棒状结构^[87]。并且在这个过程中, 虫体内的营养状况发生显著变化。在幼虫期, 脂肪体细胞摄入大量的蛋白质、脂质和糖类等营养成分, 并存储起来^[88]。在成虫脂肪体形成的过程中, 就会分解利用储备在幼虫脂肪体中的营养物质作为能量来源^[89]。

昆虫胃肠道复杂且适应性强, 由前肠、中肠和后肠组成^[90]。其中中肠是食物消化和糖类、脂质和蛋白质等营养吸收的主要部位, 也是大多研究主要关注的部位^[91]。在完全变态昆虫的变态过程中, 中肠也会发生重塑, 大致过程为幼虫中肠通过自噬凋亡消失, 成虫中肠通过细胞增殖分化形成^[92]。一旦幼虫停止进食, 自噬就会被激活, 接着由自噬引发细胞凋亡; 同时, 位于中肠单层上皮细胞基部的小圆形细胞, 也就是干细胞就会增殖分化, 形成成虫的中肠^[93]。并且, 在这个过程中, 幼虫中肠细胞被新形成的上皮细胞移位, 并推向管腔, 随后被完全消化^[94]。幼虫中肠的自噬可以为成虫中肠的增殖提供营养物质^[83]。

昆虫的变态发育受到 20E 滴度的调节。20E 滴度的高低是指导昆虫生命周期中每个

主要发育阶段转变的关键信号，完全变态昆虫的蜕皮和变态过程受到 20E 滴度的严格调控^[95]。在果蝇中，三龄幼虫龄末期，20E 到达第一次高滴度，起始变态和预蛹期，触发蛹的形成；第二次高滴度是在大概化蛹 10 h 后，触发成虫头部外翻，并且标志着蛹向成虫的转变^[96]。

20E 发挥作用既可以进入细胞核中与异二聚体结合，由蜕皮激素核受体 (ecdysone nuclear receptor, EcR) 和超气门蛋白 1 (ultraspiracle 1, USP1) 结合形成，介导基因组信号途径^[97]，也可以通过与细胞膜上的各种 G 蛋白偶联受体结合，介导非基因组信号途径^[98]。其中，EcR 是一种类固醇激素核受体，可以结合靶标基因的上游启动子等，从而激活下游基因的转录过程，它将 20E 不同的峰值转变为蜕皮的不同阶段^[99]。其实，无论是基因组信号途径的 EcR、USP1 等，还是非基因组的各种 G 蛋白偶联受体，它们本身都会受到翻译后修饰的调节，翻译后修饰可以影响它们的细胞定位，抑制或者激活它们的功能。例如，USP1 可以在第 35 位丝氨酸发生磷酸化，当磷酸化水平下降时，USP1 下游基因的转录过程会受到抑制^[100]；并且已有研究证明，只有乙酰化状态的 USP1 才能与 EcR 形成异二聚体，从而发挥作用^[101]。

昆虫在激素的调控下，从幼虫向成虫转变的过程中，营养状况发生显著变化，中肠和脂肪体等组织要经历自噬、凋亡、增殖的重塑过程，可以作为探索琥珀酰化修饰调节蛋白功能的良好模型。

1.4 存在的科学问题、研究内容和研究意义

由上述综述可知，高浓度的 H_2O_2 会对机体造成损害，而适量浓度的 H_2O_2 可以作为信号分子，参与细胞信号转导通路。CAT 负责清除过量的 H_2O_2 ，维持 H_2O_2 在一个合适的浓度水平。若 CAT 活性调节紊乱，会使机体因细胞增殖或 H_2O_2 浓度升高等因素引发代谢异常及疾病发生。那么 CAT 活性受到什么因素的调节？翻译后修饰是调节蛋白功能适应周边环境变化的快速方式，琥珀酰化是发生在赖氨酸上的一种翻译后修饰，其供体琥珀酰基是三羧酸循环的中间产物，与生物体内的营养状态密切相关，且该修饰使赖氨酸发生较大的质量变化和电荷变化，对靶标蛋白的聚合和亚细胞定位有较大影响。琥珀酰化参与多个物种的多种生理过程的调节，但其上游调节机制尚不清楚。完全变态昆虫在变态过程中，幼虫与成虫阶段的营养状态差异较大，且不仅外观形态发生显著变化，内部器官如中肠和脂肪体也要发生解离和重塑，是研究琥珀酰化调节蛋白功能的良好研究模型。综上，提出科学问题：CAT 的活性是否受到琥珀酰化修饰调节，具体调节机制如何。

因此，我们拟以完全变态昆虫、鳞翅目害虫棉铃虫为研究对象，首先检测变态过程中 CAT 的活性是否发生变化，然后通过免疫印迹和免疫沉淀检测 CAT 的琥珀酰化修饰

水平是否发生变化。并且在细胞系中过表达野生型和琥珀酰化修饰位点突变的质粒，探索琥珀酰化修饰调节 CAT 活性的具体机制。最后通过 RNA 干扰，双荧光素酶报告实验等方法检测琥珀酰化修饰的上游调控机制。

本研究可以阐明琥珀酰化修饰调节 CAT 活性的详细机制，为害虫防治提供新的靶标，并为 CAT 相关疾病的治疗提供理论参考。

2 琥珀酰化修饰调节 CAT 的活性参与昆虫变态

2.1 引言

CAT 是生物体保护酶系统成员, 负责将 H_2O_2 的浓度维持在合适的水平。但 CAT 的活性调节机制尚不清楚。琥珀酰化修饰是一种与细胞营养状态密切相关的翻译后修饰。我们以昆虫变态为模型, 探索琥珀酰化修饰对 CAT 活性的调节机制。

2.2 实验材料

2.2.1 实验动物

本研究以鳞翅目完全变态昆虫棉铃虫作为研究对象。棉铃虫人工饲养在专门的动物养虫房, 饲料的成分包括大豆粉、面粉、复合维生素、葡萄糖和蔗糖等^[102]。生长过程中, 保持温度 $26\text{ }^\circ\text{C}$ 左右, 湿度 60-70%, 光照 14 h, 黑暗 10 h。

2.2.2 实验细胞

实验中所用的细胞均为棉铃虫表皮细胞系。细胞所用的培养基是含 10%胎牛血清的 Grace 培养基, 培养于 $27\text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温培养箱中。

2.2.3 实验试剂

胎牛血清 (Biological Industries, 以色列), 昆虫 Grace 培养基 (Gibico, 纽约, 美国), 二甲基亚砜 (索莱宝, 北京, 中国), 20E (Caymanchem, 密歇根州, 美国), 蛋白酶抑制剂 (康为世纪, 北京, 中国), HiFi 酶、Easy taq DNA 聚合酶及对应的 buffers、2×SYBR real-time PCR pre-mixture、dNTP、RNA 提取试剂 Transzol (全式金, 北京, 中国), T4 DNA 连接酶 (New England Biolabs, 马萨诸塞州, 美国), dsRNA 合成试剂盒、限制性内切酶及 buffer、蛋白 marker 26616 (Thermo Fisher Scientific, 马萨诸塞州, 美国), 转染试剂 Quick Shuttle-enhanced (博奥龙, 北京, 中国), CAT 酶活检测试剂盒 (BC0205)、 H_2O_2 含量检测试剂盒 (BC3595) (索莱宝, 北京, 中国), 质粒提取试剂盒 (捷瑞, 上海, 中国), 组蛋白提取试剂盒 (BB-3117) (索莱宝, 北京, 中国), GST 柱、His 柱 (天地人和, 常州, 中国), Protein A/G (Santa Cruz, 得克萨斯州, 美国), ECL 化学发光液 (天能, 上海, 中国), IPTG、各种抗生素、引物 (生工, 上海, 中国), ACTB 兔单克隆抗体 (AC026)、His (AE003)/GFP (AE030)/RFP (AE020) 鼠单克隆抗体 (Abclonal, 武汉, 中国), 丝氨酸

磷酸化单克隆抗体 (ab9332)、组蛋白 H3 (17168-1-AP)、P-H3 单克隆抗体 (Ser10) (9701S) (Cell Signaling Technology, 麻省, 美国), 乙酰化多克隆抗体 (ICP0380) (Immunechem, 不列颠哥伦比亚, 加拿大), 泛琥珀酰化单克隆抗体 (PTM-401) (景杰生物, 杭州, 中国), 辣根标记山羊抗兔/鼠 IgG (中杉金桥, 北京, 中国), 胶回收试剂盒 (捷瑞, 上海, 中国), 其他实验过程中常用试剂均为国产。

2.2.4 实验仪器

荧光定量 PCR 仪 (Analytik Jane, 德国), PCR 仪 (Biometra T-Gradient Thermblock, 德国), 金属浴、半干转膜仪、蛋白电泳槽 (凯奥, 北京, 中国), SDS-PAGE 电泳槽 (凯元, 上海, 中国), Infinite M200PRO NanoQuant 分光光度计、Tanon 5200 全自动化学发光成像分析系统 (天能, 上海, 中国), 电泳仪 (六一仪器, 北京, 中国), 移液枪、高速冷冻离心机 (Eppendorf, Hamburg, 德国)、多功能酶标仪 (帝肯贸易, 上海, 中国)。

2.3 实验方法

2.3.1 基因克隆及生物信息学分析

从 NCBI 中获得棉铃虫 *Cat* mRNA 的序列, MEGA 7.0 软件进行多物种过氧化氢酶蛋白质序列比对, 并针对多物种的 *Cat* 基因构建系统进化树。SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测过氧化氢酶的结构域。Expert Protein Analysis System (<http://web.expasy.org/translate/>) 确定 *Cat* 的开放阅读框 (ORF) 序列。

2.3.2 DNA 抽提

向 PCR 产物中加入等体积的 DNA 提取液, 振荡器剧烈震荡 15 s, 冰上静置 2 min, 后 13,000 g, 4 °C 离心 15 min, 转移上清到新的离心管中, 加入 0.1 倍体积的 3M 乙酸钠 (pH=4.5), 混匀再加入 2.5 倍体积的无水乙醇, 混匀, -20 °C 沉淀 40 min。完成沉淀后, 13,000 g, 4 °C 离心 20 min, 弃上清, 沉淀中加入 100 μ l 80% 的乙醇洗涤, 离心后弃上清, 风干, 加入 20 μ l 无菌水。测浓度, 直接进行后续实验或者于 -20 °C 保存。

2.3.3 RNA 提取

解剖经过不同处理或者处于不同龄期的棉铃虫, 分离虫体各组织, 包括表皮、中肠和脂肪体, 放入磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) (pH=7.4, 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄) 中冲洗干净, 去除血淋巴。称 100 mg 组织放入无 RNAase 的 1.5 ml 离心管中, 先加入 400 μ l Trizol 试剂, 用研磨器充分研磨。研磨充分后, 再加入 600 μ l Trizol 试剂, 后在冰上静置 10 min, 使组织充分裂解。裂解

完成后, 在 4 °C, 13,000 g, 离心 10 min, 收集上清至新的无 RNAase 的离心管中室温放置 5 min。每 ml Trizol 对应加入 200 μ l 的氯仿, 振荡器剧烈震荡 15 s, 13,000 g, 4 °C 离心 15 min, 取上清并加入等体积预冷后的异丙醇, 上下温和混匀 6 次, 完成后室温静置 10 min, 13,000 g, 4 °C 离心 10 min, 去上清, 沉淀用 75% 的乙醇洗涤, 离心后弃上清, 风干, 加入 20 μ l 焦磷酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水, 于 65 °C 金属浴中孵育 10 min。测浓度后, 直接进行反转录或者于 -80 °C 保存。

2.3.4 反转录

以提取的 2-3 μ g RNA 为模板, 加入 2 μ l 4 \times AccuRT Reaction Mix, 补加 DEPC 水至总体积为 8 μ l。混匀后放到 42 °C, 2 min。再加入 5 \times AccuRT Reaction Stopper 2 μ l 混匀后, 加入 5 \times All-In-One RT Master Mix 4 μ l 和 DEPC 水 6 μ l。混匀后, 依次 25 °C 放置 10 min, 42 °C 放置 18 min, 85 °C 放置 5 min。-20 °C 保存。

2.3.5 实时定量 PCR

整个实验过程要注意全程在避光的条件下进行, 以反转录得到的 cDNA 为模板, 实验所用引物见表 2.1。实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT PCR) 反应体系如下: 1 μ l cDNA 模板, 上下游引物各 2 μ l, 5 μ l 2 \times SYBR real-time PCR pre-mixture。混匀后离心, 进行反应。qRT PCR 反应条件: 95 °C 反应 15 min; 95 °C 反应 15 s; 60 °C 持续 1 min; 78 °C 反应 2 s, 共循环 40 次; 于 65 °C ~ 95 °C 进行熔解曲线的分析, 间隔为 0.5 °C。

2.3.6 dsRNA 合成

在目的基因的 mRNA 序列中选择长度为 400 bp 左右的片段, 设计相应的上下游引物 (见表 2.1)。注意全程要在冰上操作。先进行 PCR, 得到 RNAi 片段的 DNA。再以 DNA 为模板合成相应的 dsRNA。操作步骤如下: 第一天, ATP、UTP、GTP、CTP (10 mM) 各 2.4 μ l, 20 μ l 5 \times 转录缓冲液, 4 μ l T7 RNA 聚合酶 (20 U/ μ l), 3 μ l RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ l), 最后补加 DEPC 水至总体积为 50 μ l, 37 °C 孵育过夜后加入 10 μ l DNAase I buffer (1 U/ μ l), 10 μ l DNAase I 和 30 μ l DEPC 水, 37 °C 孵育 1 h。经 RNA 提取酚和氯仿抽提, 乙醇和乙酸钠沉淀后, 离心洗涤风干, 加入 20 μ l DEPC 水溶解。1:10 稀释后, 检测浓度并通过凝胶电泳检测 dsRNA 纯度。

2.3.7 RNA 干扰

挑选 60 只适当龄期的幼虫, 随机平均分成两组, 各 30 只, 一组注射 5 μ l dsRNA (用无菌的 1 \times PBS 稀释至 600 ng/ μ l), 另一组注射等量的 dsGfp 作为对照。分别在第二天和第三天再次注射。注射三针后, 实验组和对对照组分别随机选取 3 只棉铃虫提取各组织

RNA 检测干扰效率。观察记录并统计两组虫子的表型。

2.3.8 TA 克隆

软件设计基因的上下游引物 CAT-OEF 和 CAT-OER (表 2.1), 利用虫体总 cDNA 作为模板, 通过 PCR 扩增 *Cat* mRNA 全长, 测序验证。得到 PCR 产物后, 进行琼脂糖凝胶电泳。将 PCR 产物胶回收后, 与购买的 pMD-19T 载体, 16 °C 连接 30 min, 然后进行转化。次日, 进行 PCR 菌落筛选, 得到阳性克隆, 并进行保种, 用于后续实验。

2.3.9 多克隆抗体制备

设计引物 CAT-OEF 和 CAT-OER (表 2.1) 扩增 *Cat* 的开放阅读框的 cDNA 片段, 并通过胶回收后与空载质粒 pGEX-4T-1 连接, 构建重组质粒。现将重组质粒转入大肠杆菌 DH5 α 中表达, 再提取质粒, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行大规模表达。重组的 CAT 蛋白形成包涵体, 从 7.5% 的凝胶上切下相应大小的重组 CAT 蛋白。充分研磨所切凝胶, 后与等量完全佐剂或不完全佐剂混匀后 (第一针为完全佐剂, 后两针为不完全佐剂), 注射免疫兔子 (由青岛康大爱博生物科技有限公司完成), 第一针与第二针间隔 3 周, 第二针和第三针间隔 2 周, 共注射三针。每次注射后, 间隔一周取血, 检测抗体效价。

2.3.10 CAT 活性及 H₂O₂ 浓度的测定

根据 H₂O₂ 在 240 nm 处有特异的吸收峰, 过氧化氢酶可以分解 H₂O₂, 所以可以将含有 H₂O₂ 的溶液作为底物, 根据其在特异吸收峰处值的变化计算出组织或细胞中 CAT 的活性。按照试剂盒说明, 取不同龄期虫体的脂肪体, 在提取液中进行冰浴匀浆, 离心后取上清, 按比例加入样本和工作液, 在 240 nm 下记录吸光度的变化。

根据 H₂O₂ 与硫酸钛化合物发生反应后, 会生成黄色的复合物, 该复合物在 415 nm 处有特征的吸收峰的原理。按照试剂盒说明, 取样后冰上匀浆, 离心取上清, 按顺序加入不同试剂后, 在 415 nm 处测定吸光值, 计算 H₂O₂ 浓度。

2.3.11 蛋白提取

虫体蛋白: 解剖分离幼虫脂肪体和中肠等组织各 100 mg, 先在 1×PBS 冲洗干净, 后分别在 500 μ l、400 μ l、350 μ l 1×PBS (已提前加入 1% 的蛋白酶抑制剂混合物) 缓冲液中冰上匀浆, 4 °C, 13,000 g 离心 15 min 收集上清液, 加入蛋白处理液, 100 °C 煮 10 min, 得到组织总蛋白。

细胞蛋白: 细胞蛋白提取时先用杜氏磷酸盐缓冲液 (dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) (pH=7.4, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 溶于 1 L ddH₂O 中) 洗涤细胞一次, 每孔加入 1 ml 1×DPBS (已提前加入 1% 的蛋白酶抑制剂混合物) 用细胞刮收集细胞, 用移液枪转移细胞至 EP 管中。然后 4 °C, 1,000 g 离心 5 min,

弃上清获取细胞，每孔加入 40 μl 的 1 \times DPBS (已提前加入 1%的蛋白酶抑制剂混合物)，悬起细胞，加入 20 μl 蛋白处理液，100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 10 min。

组蛋白提取：按照试剂盒的说明进行操作。收集细胞蛋白，或者研磨虫体蛋白后，在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，1,000 g 条件下离心 10 min，吸干上清，每组中加入 500 μl 蛋白提取液 A (已提前加入蛋白酶抑制剂混合物)，混匀后，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下轻轻振荡 10 min。振荡完成后，在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，16,000 g 条件下离心 15 min，弃上清，在沉淀中加入 100 μl 组蛋白提取液 B，用 200 μl 枪头反复吹打混匀后，放 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜存放。次日，4 $^{\circ}\text{C}$ ，16,000 g 条件下离心 10 分钟，收集上清。在上清中加入 10 μl 试剂 C 充分混匀。加入一半体积的蛋白处理液混匀后煮沸，得到组蛋白。

2.3.12 蛋白质免疫印迹

取蛋白样品加样到适宜浓度的 SDS-PAGE 胶中 (本文所用浓度为 7.5%到 15%，具体浓度均标注在对应图注中)，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后，利用转膜仪将蛋白从凝胶转移到硝酸纤维素膜上。转膜完成后，用 5%的脱脂奶粉或者 3%的牛血清蛋白 (均用 1 \times TBST 配置) 室温下震荡封闭孵育 1 h。倒掉封闭液，将膜与适宜浓度的一抗 (用封闭液稀释) 在室温震荡 10 min，然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。次日，先用 1 \times TBST (TBS 中加入 0.02% Tween) 洗涤 3 次，每次 6 min 后，将膜与适宜浓度的二抗 (用封闭液稀释) 室温下震荡孵育 30 min，后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱孵育 30 min。结束后，用 1 \times TBST 洗 3 次，每次 6 min，最后用 1 \times TBS (pH=7.5, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) 洗 10 min。使用 ECL 化学发光方法进行检测。先利用 Image J 软件计算膜上的条带，得到数值后，再使用 GraphPad Prism 8 软件进行分析。

2.3.13 过表达质粒的构建与细胞系过表达

利用过表达引物 CAT-OEF 和 CAT-OER (表 2.1) 将基因的开放阅读框序列插入到带有 IE 启动子的质粒 pIEx-4-His 或 pIEx-4-GFP/RFP-His 中，构建基因的过表达质粒。通过测序或双酶切验证构建的质粒的准确性。

将细胞进行传代培养，等待细胞密度达到 80%左右时进行转染。准备 A, B 两个离心管，A 管中加入 5 μg 过表达质粒和 100 μl 0.9% NaCl，B 管中加入 8 μl 转染试剂与 100 μl 0.9% NaCl (这是六孔板的用量，24 孔板要相应减半)。A 管和 B 管混匀于同一离心管中，加入到适宜密度的细胞培养液中，24 h 或 48 h 时可以观察是否发出荧光，72 h 左右可以提取细胞蛋白。

2.3.14 Ni²⁺柱纯化细胞中的重组蛋白

将六孔板中的培养液吸走，加入 1 ml 无菌的 1 \times DPBS 慢慢摇晃洗净残留的培养液。按照每孔加入 200 μl RIPA 细胞裂解液 (已经提前加入 1%的蛋白酶抑制剂混合物) 的比

例，加入相应量的细胞裂解液，用刮刀收集细胞，在 4 °C 摇床裂解 40 min，充分裂解细胞。在裂解细胞的同时，吸取 100 μl Ni²⁺柱料，加入 650 μl 去离子水洗涤 2 次，即 4 °C 摇床旋转 5 min 后，4 °C，1,000 g 离心 5 min，弃上清，重复 2 次。再用 650 μl Lysis buffer 洗涤，重复 3 次，起到活化作用。细胞裂解完成后，4 °C，13,000 g 离心 15 min。将上清移至含有 Ni²⁺柱料的离心管中，于 4 °C 摇床孵育 55 min。结束后，4 °C，1000 g 离心 5 min，弃上清。加入 650 μl Wash buffer，重复 2 次，目的是洗去非特异性吸附。洗涤完成后，加入 40 μl Elution buffer，与柱料轻轻混合后，于 4 °C 摇床旋转 5 min，加入 20 μl 蛋白处理液，100 °C 煮 12 min，得到目的蛋白。注意全程在冰上操作。

2.3.15 Protein A 纯化虫体蛋白

按照上述提取虫体蛋白的方法提取虫体脂肪体组织的蛋白，离心获得蛋白上清液后加入已用预冷的 1×PBS 洗涤 3 遍的 10 μl Protein A 柱料中，在 4 °C 摇床孵育 1 h，对柱料进行非特异性吸附处理，去除其中的杂质。完成后，4 °C，1,000 g 离心 5 min，转移上清到一个新的离心管中，按照 1:10/1:100 加入不同抗体，于 4 °C 摇床孵育 3 h。完成后，4 °C，1,000 g 离心 5 min，转移上清到已弯沉预先洗涤的 20 μl Protein A 柱料中，4 μl 摇床孵育过夜。次日，用预冷的 1×PBS 洗涤 3 遍后，加入 40 μl 1×PBS，用手指轻击管底，混匀后加入 20 μl 蛋白处理液，100 °C 煮 12 min，得到目的蛋白。注意全程在冰上操作。

2.3.16 双荧光素酶报告实验

在棉铃虫表皮细胞系中转染 pRL-TK 质粒作为内参质粒，然后将构建好的含有 EcR 结合位点的 *pSirt5*-Luciferase-GFP-His 报告质粒 (*pSirt5*-LUCI-GFP-His) 与 EcR-RFP-His 质粒共转染，以 *pSirt5*-LUCI-GFP-His 质粒和 RFP-His 质粒作为对照。按照双荧光素酶检测试剂盒步骤进行后续实验，检测 *Sirt5* 的非翻译区转录活性。

2.3.17 统计方法

本论文中实验至少重复三次。误差线表示三次实验平均值±SD。采用双尾 *Student's t-test* 方法对两组数据 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)，或者 ANOVA 方法对多组数据进行多重比较 (不同字母表示两组之间存在显著差异 $p < 0.05$)，来进行差异分析。

表 2-1 实验所用引物序列

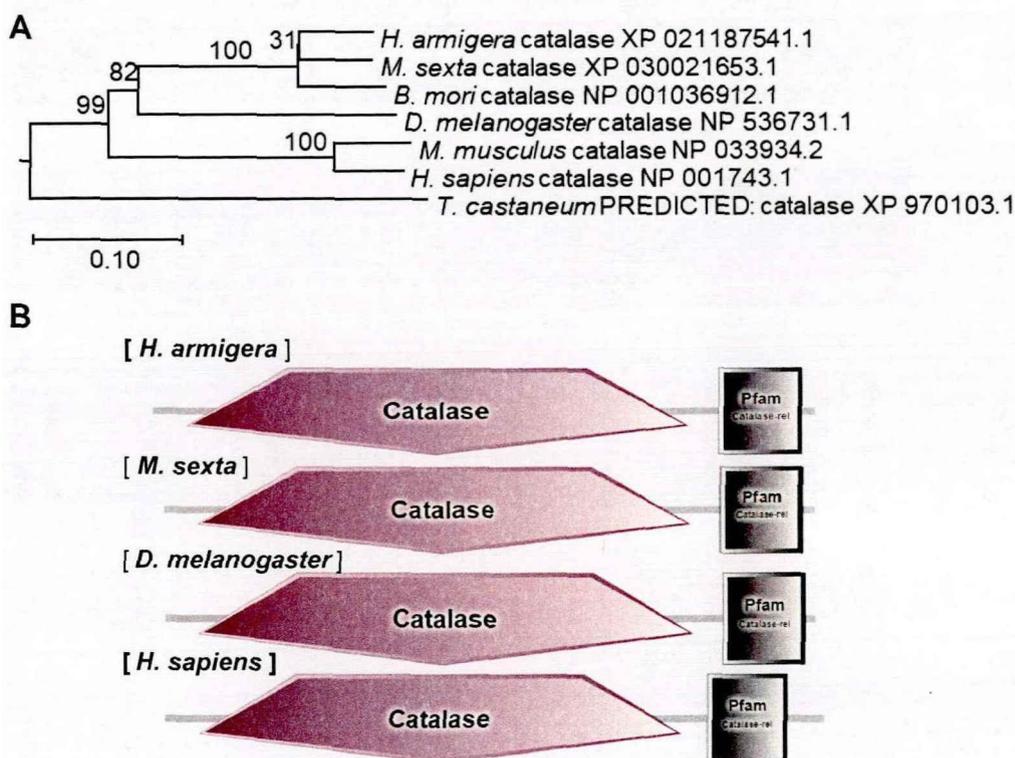
Tab. 2-1 Sequence of primers used in experiments

Primer's name	Sequence (5'-3')	GenBank accession number
Primers for quantitative Real-time PCR		
EcR-RTF	aattgcccgctcagtacga	ACD74807.1
EcR-RTR	tgagcttctcattgagga	
ACTB-RTF	cctggtattgctgaccgtatgc	EU52707
ACTB-RTR	ctgttgaaggtggagagggaa	
CAT-RTF	aaaggctggtgaactggcat	110374239
CAT-RTR	cagctctctgcttgagccat	
Primers for double-stranded RNA		
<i>dsSirt5-F</i>	gcgtaatacgaactcactatagggaaatcatggcttcgcggcaat	110378146
<i>dsSirt5-R</i>	gcgtaatacgaactcactatagggcatctggggcacctcttct	
<i>dsCat-F</i>	gcgtaatacgaactcactataggggtcccctggttacatcact	
<i>dsCat-R</i>	gcgtaatacgaactcactataggggttctgctgggttcttctt	
<i>dsGfp-F</i>	gcgtaatacgaactcactatagggatggccaattctcgtggaac	
<i>dsGfp-R</i>	gcgtaatacgaactcactatagggactgaagttgacctgatgcc	
Primers for expression		
CAT-OEF	tactcagagctcatggcttcaagggaccc	
CAT-OER	tactcagtcgaccaaattggcatggtatttcttg	
CAT GST-F	tactcagagctcatggcttcaagggaccc	
CAT GST-R	tactcactcgagcaaattggcatggtatttcttg	
SIRT5-luc-F	tactcaccgggattcatcctcactctaatg	
SIRT5-luc-R	tactcagagctccaccatggtctccagaaccaccagcacc	

2.4 实验结果

2.4.1 棉铃虫 *catalase* 基因的鉴定

在棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*, *H.armigera*) 基因组中共找到 1 个 *catalase* (GenBank ID: 110374239)。该基因 ORF 全长 1524 bp, 编码 507 个氨基酸。通过 ExPASy 网站预测该蛋白分子量为: 56 kDa。与家蚕 (GenBank ID: 692456)、果蝇 (GenBank ID: 40048)、小鼠 (GenBank ID: 12359) 和人 (GenBank ID: 847) 等不同物种的序列进行进化树分析, 发现棉铃虫中的 CAT 与斜纹夜蛾 (GenBank ID: 115441151) 的亲缘关系最近, 聚在一支 (图 2.1.A); 在 SMART 网站结构分析发现该蛋白结构域保守 (图 2.1.B)。序列比对结果表明, 不同物种中, 序列相似度较高 (图 2.1.C)。这些结果显示, *catalase* 在不同物种进化过程中比较保守。



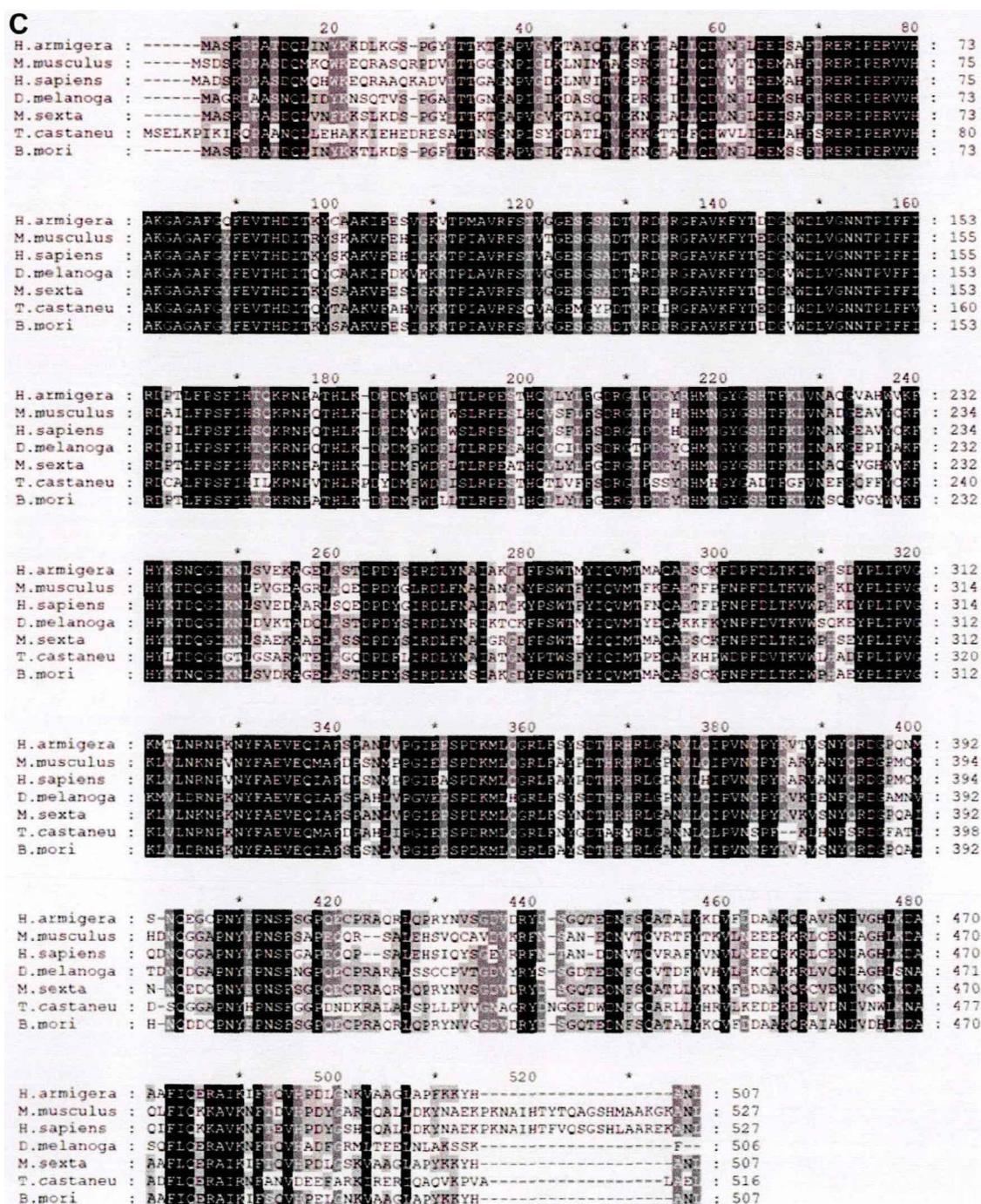


图 2.1 基因鉴定棉铃虫的 catalase

Figure 2.1. Genetic identification of catalase in *H. armigera*

(A) catalase 的进化树; (B) catalase 的结构域对比; (C) catalase 的序列对比。图中所示名称与基因组中一致。

(A) The phylogenetic tree of catalase. (B) The domain Comparison of catalase. (C) The Sequence comparison of catalase. The names are same as their names in genome.

2.4.2 变态期 CAT 活性上升

蜕皮事件的发生将棉铃虫幼虫时期划分为 6 个龄期，进入 6 龄后，前 60 小时左右幼虫大量进食，称为取食期 (feeding stage, F)；从 72 小时起进食减少，进入不吃少动的变态蜕皮期 (metamorphosis molting stage, MM)，直到约 144 小时化蛹；蛹期持续约 10-11 天，蛹期结束后羽化为成虫。其中，从变态蜕皮期到成虫的阶段合称为变态期。为探索 CAT 在昆虫变态发育过程的功能，我们首先检测取食期、变态蜕皮期、蛹期 H_2O_2 浓度和 CAT 活性的变化。

取不同龄期虫体的脂肪体，检测虫体内 H_2O_2 浓度的变化。结果表明， H_2O_2 从 6 龄 48 小时开始上升，6 龄 72 小时 H_2O_2 浓度最高，约为 6 龄 24 小时的 2.5 倍。高浓度一直持续到蛹中期，至蛹第 8 天开始下降，与 6 龄 24 小时浓度接近 (图 2.2.A)。

相应的，取不同龄期虫体的脂肪体，使用 CAT 活性检测试剂盒，在 240 nm 下记录吸光度的变化，检测不同龄期的 CAT 活性的变化。结果显示，与 6 龄 24 小时和 6 龄 48 小时相比，CAT 活性在变态蜕皮期和蛹期显著上升，约为取食期活性的 2 倍 (图 2.2.B)。

这些结果提示我们，幼虫取食期， H_2O_2 浓度较低，CAT 活性也较低，维持 H_2O_2 的低浓度状态；变态蜕皮期和蛹期 H_2O_2 浓度上升，CAT 活性也相应上升，分解多余的 H_2O_2 ，避免氧化应激对机体的损害。

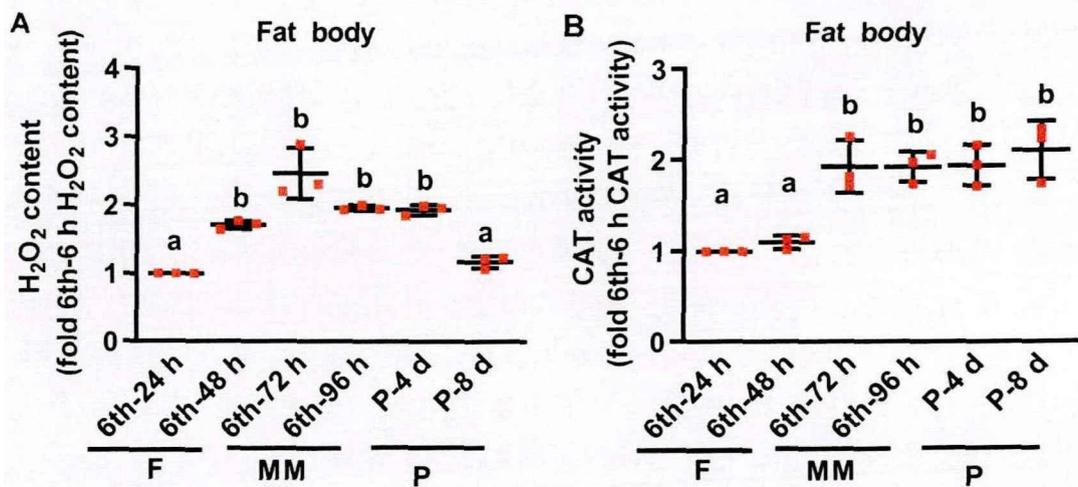


图 2.2. H_2O_2 浓度及 CAT 活性变化

Figure 2.2. Changes of H_2O_2 content and CAT activity

(A) H_2O_2 含量在不同龄期的变化；(B) CAT 活性在不同龄期的变化。多重比较进行差异分析分析。实验均满足三次生物学重复。

(A) Changes of H_2O_2 content at different stages. (B) Changes of CAT activity at different stages. Multiple comparisons were made for difference analysis. All the experiments satisfied three biological replicates.

2.4.3 敲降 *Cat* 抑制成虫组织增殖

在变态蜕皮期和蛹期, CAT 的活性上升, 那么它在昆虫变态发育过程中具有什么作用呢? 为探索 CAT 的功能, 利用 RNAi 技术在虫体上敲降 *Cat*。从 6 龄 48 小时注射 *dsCat*, 每隔 24 h 小时注射一针, 共三针。注射最后一针 24 h 后, 为了检测干扰效率, 提取对照组和实验组虫体表皮、中肠和脂肪体的 mRNA, 进行 qPCR 检测。结果显示, 三个组织中, 实验组 *Cat* 的 mRNA 水平相对于对照组明显降低, 这说明干扰效果良好 (图 2.3.A)。同时检测了干扰 *Cat* 后, 虫体内 H_2O_2 浓度的变化, 结果显示, 实验组虫体内 H_2O_2 浓度是对照组的 3 倍 (图 2.3.B), 说明干扰 *Cat* 后 H_2O_2 无法及时清除。干扰 *Cat* 后 H_2O_2 浓度升高对昆虫变态发育表型的影响如图 2.3.C 所示, 与对照组相比, 干扰 *Cat* 导致 60.7% 的幼虫延迟化蛹 (图 2.3.D), 干扰 *Cat* 后平均化蛹时间为 159 h, 比对照组 (143 h) 延迟 16 小时左右 (图 2.3.E)。实验组进入蛹期后, 有 62.6% 的蛹, 最终羽化为较小成虫或者不正常的成虫, 无法像对照组一样正常迁飞 (图 2.3.F)。

为探究化蛹延迟并最终没有形成正常成虫的原因, 我们根据外型选取两个时间点对虫体进行解剖, 并观察中肠形态: 一是停止取食并开始围绕食物游走阶段, 二是足缩短马上化蛹的预蛹期。解剖图显示, 停止取食时, 对照组的中肠已经变红, 而实验组的中肠依然和取食期类似, 呈现白色; 在预蛹期, 对照组中肠非常细小, 而实验组颜色虽然已经变红但还略粗一点 (图 2.3.G)。对上述两个时期中肠组织进行石蜡切片, HE 染色结果显示, 在预蛹期对照组的成虫中肠干细胞已经开始增殖, 形成成虫中肠细胞, 但敲降 *Cat* 后, 实验组成虫中肠细胞的增殖受到抑制 (图 2.3.H)。然后对蛹的第 6 天和第 8 天的脂肪体进行观察, 发现在蛹后期对照组脂肪体开始聚合, 逐渐形成棒状结构, 而实验组 P 期脂肪体一直处于松散状态, 呈絮状 (图 2.3.I)。这些结果提示我们, 在敲降 *Cat* 后, 成虫组织的增殖可能受到了抑制, 进而使得化蛹延迟, 最终无法羽化为正常的成虫。

为了验证 CAT 促增殖的作用, 在蛹后期提取实验组和对照组虫体的脂肪体蛋白, 检测 P-H3 蛋白水平的表达。免疫印迹结果表明, 干扰 *Cat* 后, P-H3 的表达下降, 说明虫体增殖能力下降 (图 2.3.J, K)。以上结果说明, CAT 在变态期活性升高, 去除多余 H_2O_2 , 促进成虫中肠和脂肪体组织增殖进而促进昆虫的变态发育。

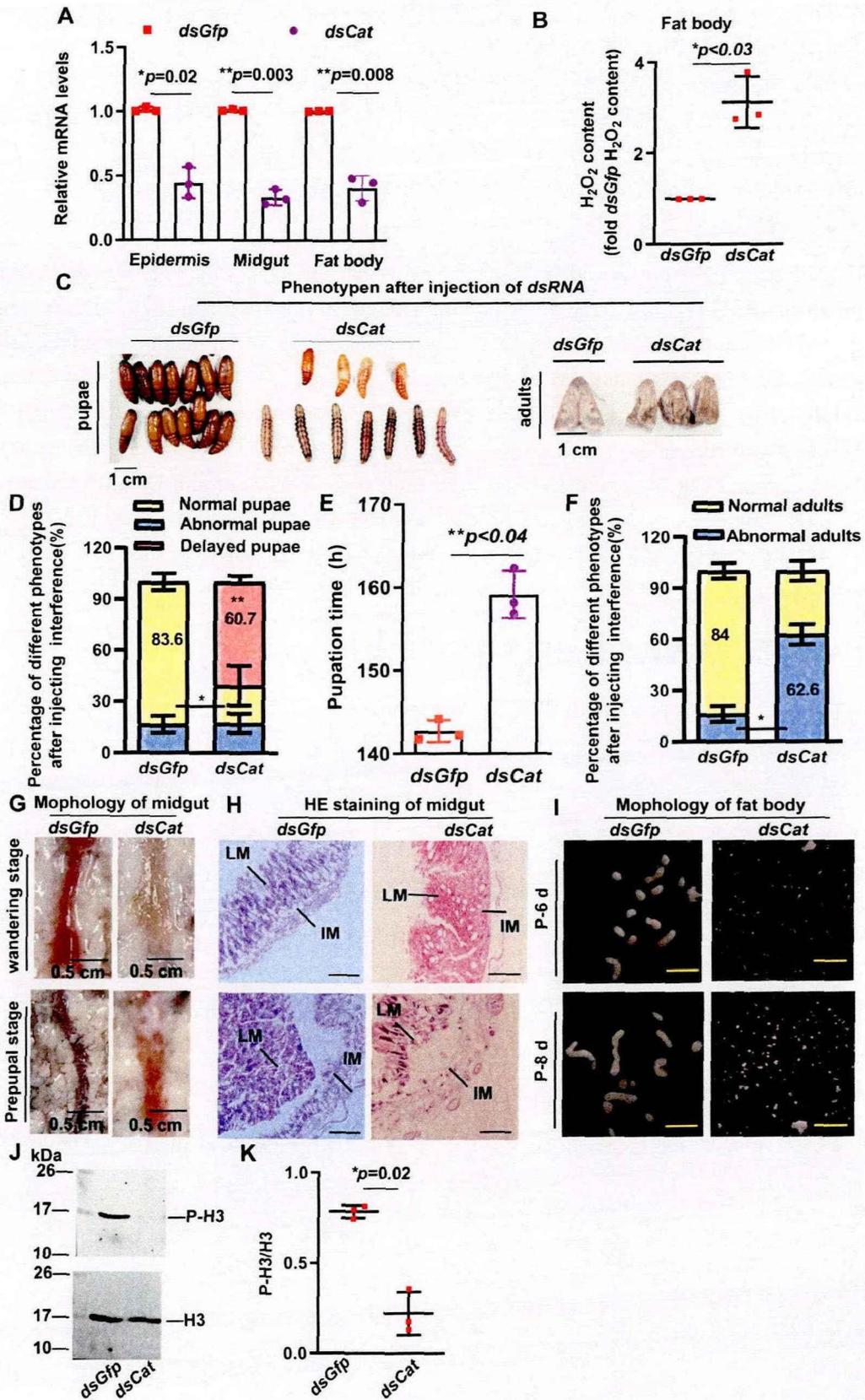


图 2.3. 注射 *dsCat* 抑制成虫组织增殖

Figure 2.3. knockdown *Cat* inhibit proliferation of adult tissue

(A) 提取表皮、中肠和脂肪体 mRNA, qPCR 检测 *Cat* 干扰效率。(B) *dsCat* 和 *dsGfp* 后虫体内 H_2O_2 浓度比较。(C) *dsCat* 和 *dsGfp* 后虫体形态比较。(D) 统计 (C) 中蛹的表型。(E) *dsCat* 和 *dsGfp* 后幼虫化蛹时间差异。(F) 统计 (C) 中成虫的表型。(G) *dsCat* 和 *dsGfp* 后游走阶段及预蛹期的中肠形态比较。(H) *dsCat* 和 *dsGfp* 中肠的 HE 切片, 标尺为 100 μm 。(I) *dsCat* 和 *dsGfp* 后, P-6 d 及 P-8 d 脂肪体形态比较, 标尺为 60 μm 。(J) *dsCat* 和 *dsGfp* 后, P-H3 的变化。(K) Image J 统计 (J) 中 P-H3 和 H3 条带密度的比值。IM: 成虫中肠; LM: 幼虫中肠。实验均满足三次生物学重复, 误差线表示平均值 \pm SD, t 检验分析显著性差异 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

(A) mRNA of epidermis, midgut and fat body was extracted, and *dsCat* efficiency was detected by qPCR. (B) Comparison of H_2O_2 concent after injection of *dsCat* and *dsGfp*. (C) Comparison of insect morphology after injection of *dsCat* and *dsGfp*. (D) Statistical phenotypes of pupae in (C). (E) The difference in pupation time between *dsCat* and *dsGfp*. (F) Statistical phenotypes of adults in (D). (G) Comparison of midgut morphology in wandering stage and prepupal stage after injection of *dsCat* and *dsGfp*. (H) HE of the midgut of *dsCat* and *dsGfp*. The scale is 100 μm . (I) Comparison of fat body morphology in P-6 d and P-8 d after injection of *dsCat* and *dsGfp*. The scale is 60 μm . (J) Changes in P-H3 after injection of *dsCat* and *dsGfp*. (K) Image J was used to calculate the ratio of P-H3 and H3 band density in (J). IM: imaginal midgut; LM: larval midgut. All the experiments met three biological replicates. The mean value of the error line was \pm SD. Significant differences were analyzed by *T-test* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

2.4.4 CAT 在不同发育阶段的蛋白水平无明显差异

CAT 在变态期活性升高是否与该阶段其蛋白水平表达的变化有关呢? 要检测 CAT 在蛋白水平的表达模式, 首先需要制备抗体。扩增 *Cat* 全长序列插入 pGEX-4T-1 质粒, 构建原核表达质粒, 表达了一段大小为 82 kDa 的 CAT 多肽作为抗原 (图 2.4.A), 随后免疫新西兰兔制备多克隆抗体。选取 6 龄 24 小时虫体的中肠组织进行免疫印迹检测, 验证得到的多克隆抗体的特异性。结果显示, 该抗体能特异性识别棉铃虫中一个大小约为 56 kDa 的蛋白, 与 CAT 的预测分子量相符, 说明该抗体特异性良好, 可以用于后续实验 (图 2.4.B)。

获得 CAT 多克隆抗体后, 提取不同龄期不同组织的蛋白, 包括从 5 龄取食到蛹的第 8 天的背部表皮、中肠和脂肪体组织, 检测 CAT 的蛋白水平时空表达模式。免疫印迹结果显示, CAT 在不同组织不同龄期均有表达, 并且表达趋势在不同龄期没有显著变化 (图 2.4.C)。这说明在棉铃虫中 CAT 并不存在组织特异性分布, 并且不同龄期的表达量没有显著变化。

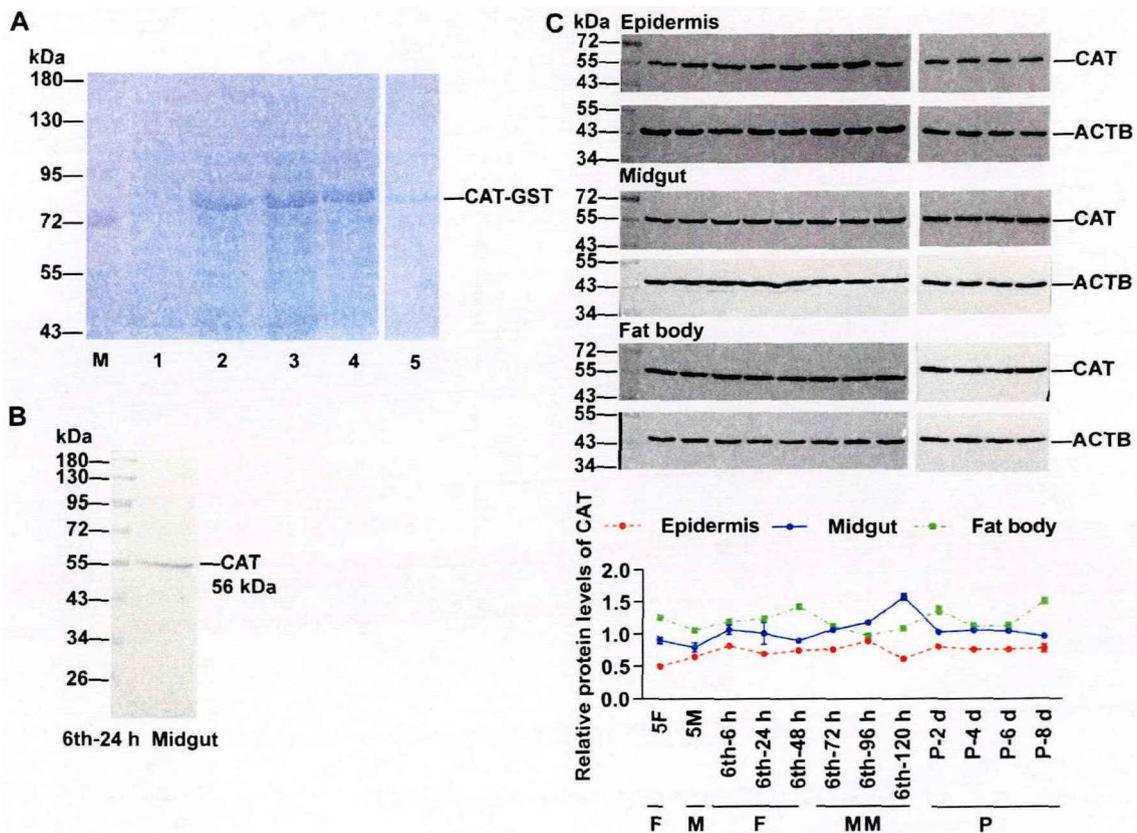


图 2.4. 免疫印迹分析 CAT 的虫体蛋白水平表达模式及酶活性变化

Figure 2.4. The expression pattern of CAT was analyzed by immunoblotting

(A) CAT 的原核表达及纯化。(B)WB 检测抗体特异性, 用 6th-24 h 中肠作为检测蛋白。(C) CAT 在不同时期的表皮、中肠和脂肪体中的蛋白水平。ACTB 作为内参蛋白。所用胶浓度分别为 7.5%或 10%。实验均满足三次生物学重复。

(A) Prokaryotic expression and purification of CAT. (B) Antibody specific detection, using the 6th-24 h midgut as the detection protein. (C) CAT protein levels in the epidermis, midgut and fat body at different periods. ACTB is the internal reference protein. The gel concentration used were 7.5% or 10%, respectively. All the experiments satisfied three biological replicates.

2.4.5 CAT 翻译后修饰水平的变化

CAT 在全龄期蛋白水平表达无明显差异, 但是 CAT 酶活性在变态期上升, 是否存在翻译后修饰水平的调节? 为验证这一猜测, 分别提取从 6 龄 24 小时到蛹的第 8 天共六个龄期虫体的脂肪体总蛋白, 利用 CAT 的抗体, 通过免疫沉淀得到 CAT 蛋白。

鉴于已经有关于 CAT 丝氨酸磷酸化修饰的报道, 检测了 CAT 丝氨酸磷酸化在不同龄期的变化, 发现丝氨酸磷酸化修饰在取食期和变态期没有变化; 实验室前期琥珀酰化组学检测发现 CAT 可能存在琥珀酰化修饰, 用琥珀酰化抗体检测 CAT 琥珀酰化修饰的变化, 发现变态期琥珀酰化水平明显下降; 鉴于乙酰化修饰与琥珀酰化修饰的靶标氨基

酸都是赖氨酸，所以，同时检测了 CAT 的乙酰化修饰，结果表明，CAT 虽然存在乙酰化修饰，但在发育阶段修饰水平没有变化 (图 2.5.A, B)。

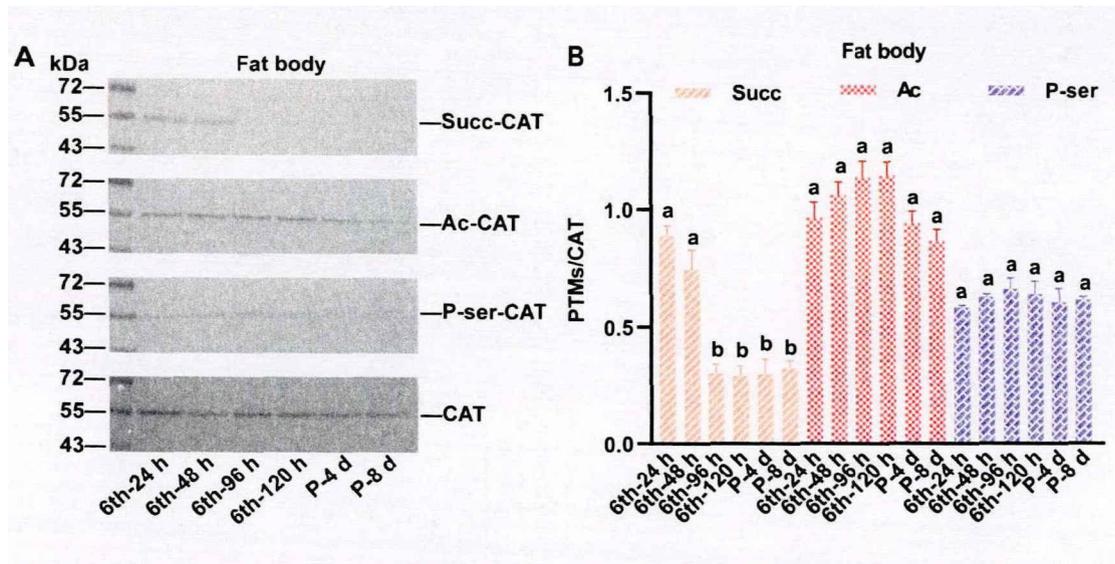


图 2.5. 免疫印迹分析 CAT 的翻译后修饰水平表达模式

Figure 2.5. The post-translational modification level expression pattern of CAT was analyzed by WB

(A) 分别取不同龄期脂肪体总蛋白，经免疫沉淀，利用免疫印迹检测 CAT 的丝氨酸磷酸化、乙酰化和琥珀酰化修饰。所用胶浓度均为 10%。(B) Image J 统计 (A) 中丝氨酸磷酸化、乙酰化和琥珀酰化修饰的 CAT 蛋白条带与纯化的 CAT 蛋白条带的比值。多重比较进行差异分析。实验均满足三次生物学重复。

(A) Total fat body protein was collected at different stages. After immunoprecipitation, serine phosphorylation, acetylation and succinylation of CAT were detected by Western blot. The concentration of glue used is 10%. (B) Image J calculated the ratio of serine phosphorylated, acetylated and succinylated CAT protein bands to purified CAT protein bands in (A). Multiple comparisons were made for difference analysis. All the data came from three biological repetitions.

2.4.6 去除琥珀酰化修饰后，CAT 活性上升

变态期 CAT 活性上升，检测的几种翻译后修饰中只有琥珀酰化修饰水平变化，那么，CAT 活性是否受琥珀酰化修饰调节呢？为探索这一问题，我们首先在 CAT 中筛选琥珀酰化可能发生的位点。实验室琥珀酰化修饰组学中鉴定到了 CAT 的 7 个可能的赖氨酸 (Lysine, K) 琥珀酰化位点，分别为 K36, K91, K96, K241, K456, K480, K492。

我们构建 CAT 在 HaEpi 细胞系中的过表达质粒 CAT-GFP，并将 CAT 可能的 7 个琥珀酰化位点的赖氨酸分别突变为精氨酸 (Arginine, R)，精氨酸与赖氨酸都是带正电荷的碱性氨基酸，可以模拟 CAT 去琥珀酰化状态 (图 2.6.A)。

在 HaEpi 细胞系中的过表达野生型和 7 个突变质粒，检测 CAT 活性的变化。结果显示，与野生型相比，K96R, K241R, K456R 三个突变体中 CAT 活性显著上升，是野

生型的 1.5 倍左右 (图 2.6.B)。随后, 利用 Ni²⁺柱纯化细胞重组蛋白, 检测突变体中 CAT 的琥珀酰化修饰状态变化, 免疫印迹结果显示, 这三个突变体的琥珀酰化修饰水平显著下降 (图 2.6.C)。这提示我们, 这三个位点的琥珀酰化修饰可能与 CAT 活性相关, 在去除琥珀酰化修饰后, CAT 的活性上升。

我们同时检测了 CAT 活性变化对细胞增殖的影响, 免疫印迹结果显示, 相比于野生型, 过表达突变质粒的细胞的 P-H3 水平显著上升, 大约是野生型 P-H3 的 2 倍。这提示, CAT 活性增强后可以进一步促进细胞增殖 (图 2.6.D), 与虫体实验结果一致。

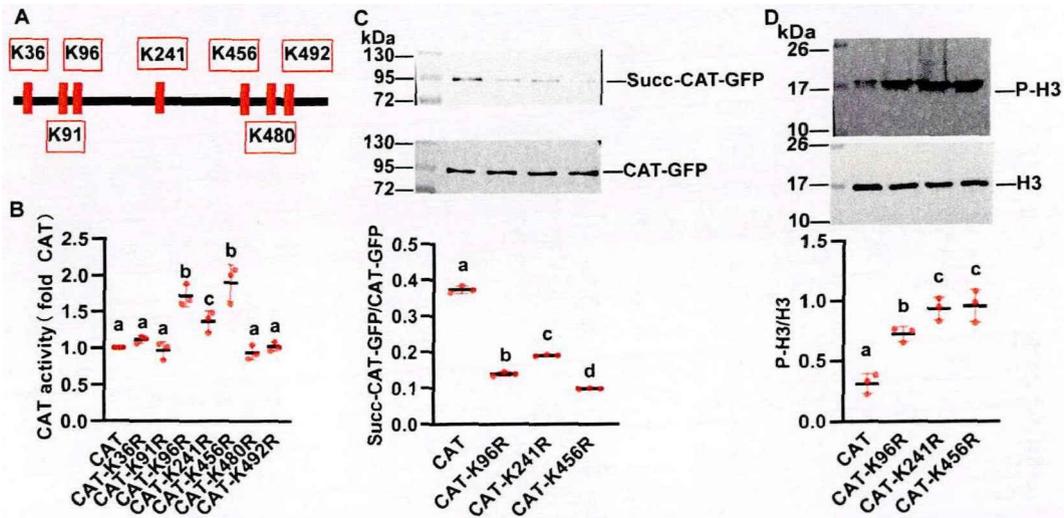


图 2.6. 检测突变体的酶活以及琥珀酰化修饰的变化

Figure 2.6. Detection of activity and changes in succinylation modification of the mutant

(A) 组学鉴定到的可能的琥珀酰化位点。(B) 野生型以及各突变体的酶活检测。(C) 突变体琥珀酰化修饰水平变化的检测。(D) 突变体对 P-H3 表达的影响。所用胶浓度为 10% 或者 15%。多重比较进行差异分析。实验均满足三次生物学重复。

(A) Possible succinylation sites identified by omics. (B) Enzyme activity of wild type and each mutant. (C) detection of changes in the level of succinylation modification in the mutant. (D) Effect of the mutant on P-H3 expression. The concentration of glue used is 10% or 15%. Multiple comparisons were made for difference analysis. Three biological replicates were satisfied in all experiments.

2.4.7 SIRT5 负责去除 CAT 琥珀酰化修饰

CAT 在幼虫变态期琥珀酰化水平降低, 负责去除琥珀酰化的酶是谁呢? 根据前言可知, SIRT5 可以使细胞质蛋白去除琥珀酰化修饰。那么 CAT 琥珀酰化修饰的去除是否受 SIRT5 调控呢?

为解决这一问题, 我们首先检测了 SIRT5 在取食期和变态蜕皮期蛋白水平的表达情况。WB 结果显示, 在中肠和脂肪体组织, 取食期, SIRT5 表达量很低, 但是到了变态蜕皮期, SIRT5 的表达量显著上升 (图 2.7.A)。

随后，利用 RNAi 技术在虫体注射 *dsRNA* 敲降 *Sirt5*。为了检测干扰效率，提取对照组和实验组的虫体蛋白，WB 结果显示，干扰 *Sirt5* 后，其蛋白水平的表达量显著下降，说明 *Sirt5* 被成功敲降 (图 2.7.B)。利用 CAT 抗体对 CAT 蛋白进行纯化，WB 检测显示，*Sirt5* 被敲降后，CAT 琥珀酰化无法去除，维持琥珀酰化状态 (图 2.7.B)，这说明 CAT 琥珀酰化的去除由 SIRT5 负责。

SIRT5 对 CAT 的作用，是直接与 CAT 结合还是一种间接作用呢？我们进一步利用 CAT 的抗体，通过免疫共沉淀实验，结果显示，CAT 的抗体可以沉淀到 SIRT5 与 CAT 结合 (图 2.7.C)。

以上结果说明 SIRT5 可以直接作用于 CAT，使其去除琥珀酰化修饰。

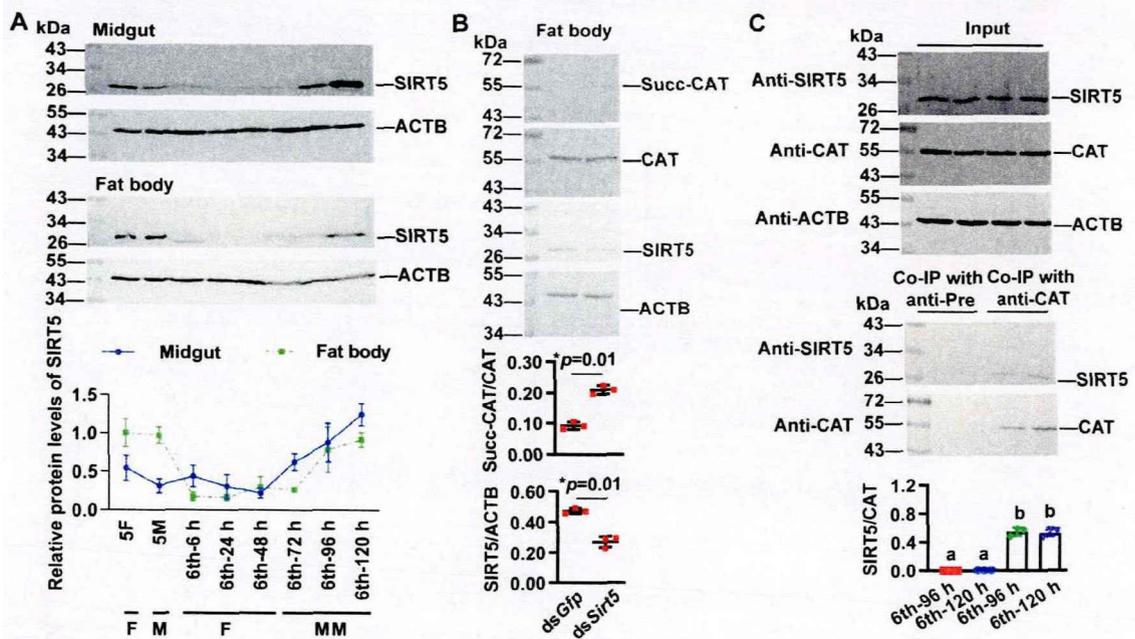


图 2.7. SIRT5 调节 CAT 去琥珀酰化

Figure 2.7. SIRT5 modulates CAT desuccinylation

(A) SIRT5 在不同时期中肠和脂肪体中的蛋白水平。ACTB 作为内参蛋白。(B) 敲降 *Sirt5* 检测 CAT 琥珀酰化。提取对照组和实验组的脂肪体蛋白，利用 WB 检测 SIRT5 的干扰效率和 CAT 的琥珀酰化状态。(C) Co-IP 检测 SIRT5 与 CAT 是否直接结合。各取变态期的两个龄期，用前血清作为对照，利用 CAT 抗体，通过 Co-IP 实验，检测 SIRT5 与 CAT 的直接结合。SDS-PAGE 胶的浓度是 10%。误差线表示平均值±SD，t 检验分析显著性差异 (* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$)。多重比较进行差异分析分析。实验均满足三次生物学重复。

(A) SIRT5 protein levels in the midgut and fat body at different periods. ACTB is the internal reference protein. (B) Knockdown *Sirt5* to detect CAT succinylation. The fat body proteins of the control group and the experimental group were extracted, and the interference efficiency of SIRT5 and the succinylation state of CAT were detected by WB. (C) Co-IP detected whether SIRT5 was directly bound to CAT. Two instars of each metamorphosis stage were taken, and the former serum was used as the control, and the direct

binding of SIRT5 and CAT was detected by Co-IP assay using CAT antibody. The concentration of SDS-PAGE glue is 10%. The error line represents the mean SD, and the *T-test* analyses significant differences ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$). Multiple comparisons were made for difference analysis. All the experiments satisfied three biological replicates.

2.4.8 20E 通过 EcR 在转录水平上调 *Sirt5* 表达

SIRT5 是负责 CAT 去除琥珀酰化的酶，那么 SIRT5 上游受到什么因素调节呢？由于 SIRT5 在游走期高表达，这时 20E 滴度较高，其表达可能受到 20E 的调节。我们在虫体内进行 20E 时间梯度和浓度梯度的激素刺激。提取虫体 RNA，进行 qPCR 检测。结果表明，*Sirt5* mRNA 表达量随 20E 刺激浓度和时间的增加而增加，并在 300 ng 和 3 h 刺激后达到最高值 (图 2.8.A, B)。

那么，20E 如何调控 *Sirt5* 的表达？是否通过核受体 EcR？

在 JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>) 网站预测到 *Sirt5* 启动子区域含有 EcR 的 DNA 结合位点 (ecdysone response element, EcRE) (图 2.8.C)。并且，在虫体干扰 *Ecr* 后，通过 q-PCR 来检测 *Sirt5* 表达量的变化。结果表明，与对照组相比，干扰 *Ecr* 后，即使叠加 20E，*Sirt5* 的表达量也不会再上升，说明 20E 对 *Sirt5* 的上调是通过 EcR 的 (图 2.8.D)。那么这种调控是直接的还是间接的呢？

为了进一步研究 EcR 对 *Sirt5* 的转录调控，我们构建了含有 EcRE 的 *pSirt5*-Luciferase-GFP-His 报告质粒 (*pSirt5*-LUCI-GFP-His) (图 2.9.E)。双荧光素酶报告实验结果显示，当 *pSirt5*-LUCI-GFP-His 报告质粒与 RFP-His 空载质粒共转染至细胞系后，无论是否叠加 20E，荧光强度都较弱；报告质粒与 EcR-RFP-His 质粒共转染至细胞系时，荧光强度较强，再叠加 20E，荧光强度明显上升 (图 2.9.F)。同时，还进行了免疫印迹检测，与双荧光素酶报告实验结果一致，当报告质粒与 RFP-His 空载质粒共转染至细胞系后，无论是否叠加 20E，都没有检测到报告质粒的表达；报告质粒与 EcR-RFP-His 质粒共转染时，可以显著上调报告质粒的表达 (图 2.9.G)。

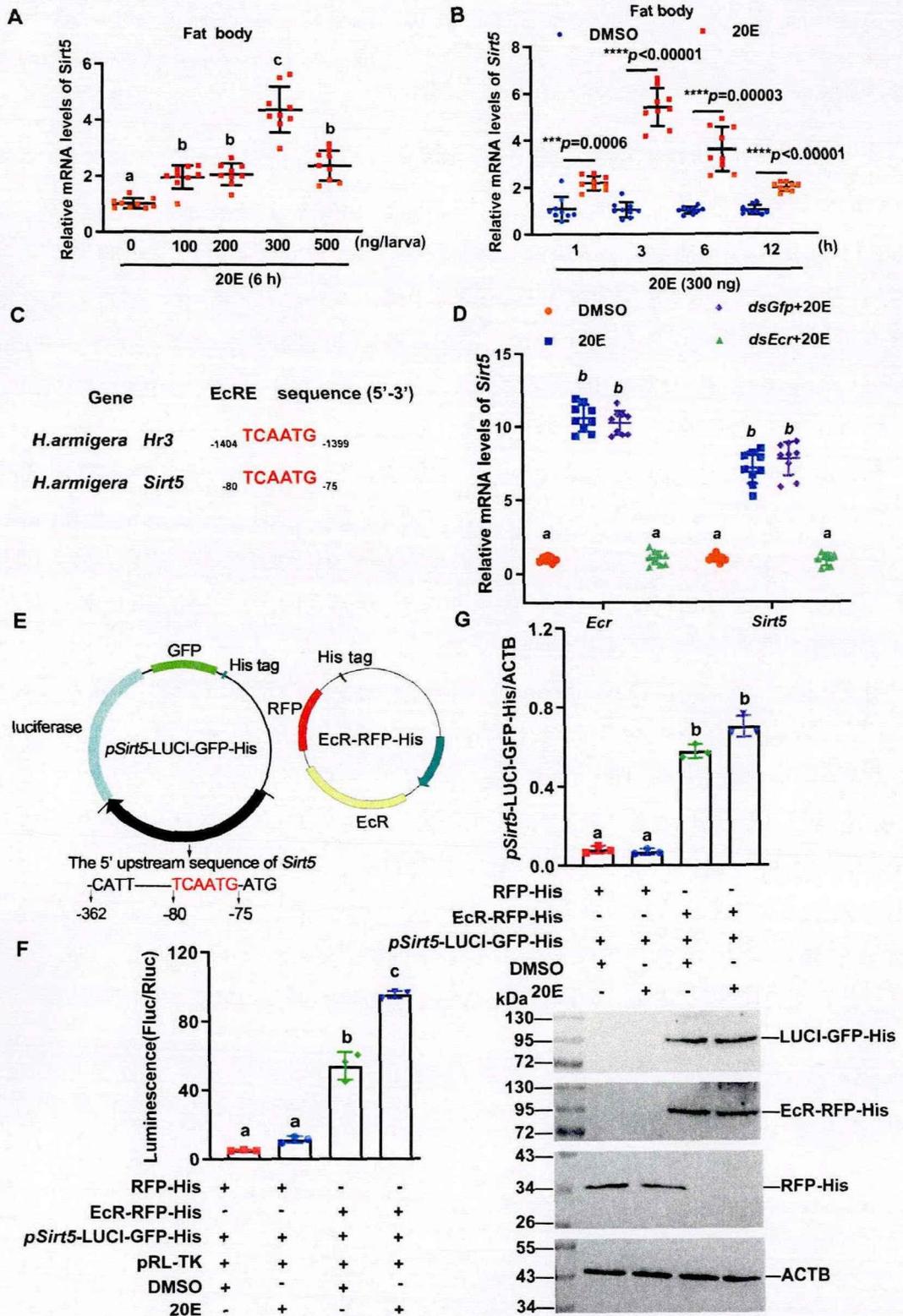


图 2.8. 20E 调控 *Sirt5* 的表达

Figure 2.8. 20E regulates the expression of *Sirt5*

(A) 不同浓度的 20E 刺激, 通过 qPCR 检测虫体脂肪体中 *Sirt5* mRNA 水平的变化。(B) 同一浓度不同时间的 20E 刺激, 通过 qPCR 检测虫体脂肪体中 *Sirt5* mRNA 水平的变化。(C) 棉铃虫 *Hr3* 和 *Sirt5* 启动子 EcRE 序列的对比。(D) 敲降 *Ecr* 后用 qPCR 检测虫体脂肪体中 *Sirt5* mRNA 水平的变化。(E) *pSirt5*-LUCI-GFP-His 和 EcR-RFP-His 的质粒图谱。在图谱下方显示 *Sirt5* 5' 上游序列中 EcRE 的位置。(F) Luciferase 实验测定荧光强度, 确定转录活性。(G) 免疫印迹检测报告质粒的表达情况, 并用 Image J 进行统计分析。误差线表示平均值 \pm SD, t 检验分析显著性差异 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。多重比较进行差异分析。实验均满足三次生物学重复。

(A) The changes of *Sirt5* mRNA levels in the fat body were detected by qPCR at different concentrations of 20E stimulation. (B) The changes of *Sirt5* mRNA levels in the fat body were detected by qPCR at the same concentration and different times of 20E stimulation. (C) Comparison of EcRE sequences of *Hr3* and *Sirt5* promoters in *H. armigera*. (D) qPCR was used to detect *Sirt5* mRNA levels in the fat body after *Ecr* knockdown. (E) Plasmid profiles of *pSirt5*-LUCI-GFP-His and EcR-RFP-His. The position of EcRE in the sequence 5' upstream of *Sirt5* is shown below the map. (F) Luciferase assay was used to determine the fluorescence intensity and transcriptional activity. (G) The expression of reporter plasmids was detected by WB and statistically analyzed by Image J. The mean value of the error line was \pm SD. Significant differences were analyzed by *T*-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Multiple comparisons were made for difference analysis. Three biological replicates were satisfied in all experiments.

2.5 讨论

CAT 清除昆虫体内过剩的 H_2O_2 , 与细胞增殖^[103]、免疫反应^[104]、氧化应激^[105]等多种生理过程有关, 但是昆虫中关于 CAT 的翻译后修饰研究却鲜有报道。翻译后修饰是调节蛋白功能的重要方式, 尤其是琥珀酰化修饰可以扭转其修饰氨基酸—赖氨酸的电荷性质, 对所修饰的蛋白性质及相应的功能产生更大的影响。目前, CAT 是否存在琥珀酰化修饰以及这种修饰对 CAT 功能的调节机制是未知的。在本研究中, 利用棉铃虫这一完全变态昆虫作为研究对象, 对琥珀酰化修饰如何调节 CAT 的功能, 进而如何影响昆虫的变态发育进行了研究。研究结果表明, CAT 存在琥珀酰化修饰, 并且这种修饰在变态期下调, 修饰下调后, CAT 的活性上升, 进而促进成虫组织的增殖。SIRT5 为负责去除 CAT 琥珀酰化的酶, 其在转录水平受到 20E 的上调。

2.5.1 琥珀酰化修饰去除后 CAT 活性升高, 促进细胞增殖

最初, 人们认为 H_2O_2 是机体代谢过程中有毒的副产物, 会攻击核酸、蛋白质和脂质, 对机体造成损伤, 细胞必须通过保护机制消除它。但是, 最近越来越多的证据表明适量的 H_2O_2 可以作为有效的信号分子, 参与到细胞的多种信号转导通路^[106]。 H_2O_2 对于细胞是敌是友, 关键点在于 H_2O_2 的局部浓度, 高浓度水平的 H_2O_2 参与衰老和细胞凋亡, 而低浓度水平的 H_2O_2 作为信号分子介导生理代谢反应, 包括细胞增殖和基因表达等^[107]。我们的研究结果表明, 在取食期, 虫体内 H_2O_2 浓度较低; 而在变态期, 虫体内新陈代谢反应剧烈, 代谢产物 H_2O_2 浓度升高。相应的, CAT 活性在取食期较低, 可以使 H_2O_2

的浓度维持在一个较低的水平；在 H_2O_2 浓度升高时，CAT 的活性也会升高，分解过量的 H_2O_2 ，防止其对机体造成损伤。

研究表明，CAT 广泛分布于家蚕幼虫时期的组织中^[108]。在棉铃虫中也有类似的结果，蛋白水平的 CAT 在棉铃虫各组织中均有分布，并且在整个发育阶段，CAT 蛋白水平的表达量没有变化，那是什么调节了 CAT 的酶活性？已有的研究表明，在哺乳动物中，发生磷酸化后，CAT 的活性会上升^[109]，但是在我们的研究中，在昆虫的不同发育阶段，丝氨酸磷酸化水平并没有显著差异。但是，通过检查 CAT 在取食期和变态期的琥珀酰化修饰水平的变化，发现相比于取食期，变态期 CAT 的琥珀酰化修饰明显下调。

去除琥珀酰化修饰后，蛋白活性升高的例子已有较多的报道。例如，研究表明，线粒体苹果酸酶 2 (malic enzyme 2, ME2) 可以发生琥珀酰化修饰，被修饰后，ME2 活性下降；SIRT5 被鉴定为 ME2 的去琥珀酰化调节酶，并且谷氨酰胺剥夺会直接增强 SIRT5 与 ME2 的相互作用，促进 SIRT5 介导的 ME2 的去琥珀酰化过程，激活 ME2 的酶活性，被激活后的 ME2 会显著增强线粒体呼吸，从而平衡谷氨酰胺剥夺对癌细胞造成的影响，促进细胞增殖和肿瘤的发生^[110]。此外，SIRT5 通过去除异柠檬酸脱氢酶 2 (isocitrate dehydrogenase 2, IDH2) 的琥珀酰化，提高其活性，增强肝脏细胞的抗氧化防御能力，缓解肝缺血和再灌注损伤^[111]。本文也发现了类似的现象，在细胞系上将 CAT K96, K241, K456 突变为精氨酸后，CAT 活性显著上升，证明了琥珀酰化修饰的下调与 CAT 酶活性的上升之间有必然的联系，并且通过 RNAi 以及 Co-IP 实验证实了 SIRT5 可以直接结合 CAT，去除 CAT 的琥珀酰化修饰。

那么琥珀酰化修饰是如何影响 CAT 的酶活性的呢？琥珀酰化修饰会改变赖氨酸的电荷状态，进而可能改变亚基之间的聚合，从而影响 CAT 的酶活。琥珀酰化修饰是否调节 CAT 亚基的聚合还需要进一步探究。此外，组学中还鉴定到了其他的琥珀酰化修饰位点，这些位点突变后并不会影响 CAT 的酶活性，但它们可能与 CAT 的亚细胞定位或其他性质有关，这些也需要后续工作继续探索。

CAT 活性升高后会促进细胞增殖。在大鼠平滑肌细胞中的研究表明，过氧化氢酶缺乏的细胞系增殖和存活率下降，再过表达过氧化氢酶进行补救实验时，可以扭转局面促进细胞增殖，提高细胞的存活率，细胞状态接近野生型细胞系水平^[112]。在大鼠心肌细胞系中，CAT 的过表达还可以抑制百草枯引起的氧化应激，从而促进细胞增殖，增加细胞数量^[113]。在本研究中也得到了相似的结论：变态期 CAT 活性上升后，其促增殖能力也上升，可以促进成虫中肠和脂肪体的增殖。将变态期的 *Cat* 敲低后，成虫的中肠和脂肪体的增殖受到抑制，成虫不能正常形成。但 RNA 干扰实验敲降了所有形式的 CAT，包括不带翻译后修饰和带有其他翻译后修饰的 CAT。CAT 在变态过程中的作用是否主要受到琥珀酰化的调节还需要通过基因编辑实验来进一步验证。可以通过基因编辑实验，在虫体内将 CAT 琥珀酰化修饰位点中影响酶活性的 K96, K241, K456 突变为谷氨酸，

模拟琥珀酰化修饰状态,检测琥珀酰化修饰对 CAT 功能的调节及在昆虫变态发育中的影响。这些需要后续实验来进一步探索。

2.5.2 CAT 的功能受到多重因素的协同调节

CAT 功能的调控是多层次协同调控的网络。上文我们已经讨论过 CAT 的活性在变态时期去除琥珀酰化修饰后而升高,受到翻译后修饰水平的调节。在探索 CAT 的琥珀酰化修饰的上游调节机制时我们发现,负责去除 CAT 琥珀酰化修饰的酶 SIRT5 在转录水平受到蜕皮激素 20E 的上调,并且 20E 的作用是由蜕皮激素核受体 EcR 介导的。在小鼠细胞中的研究也有类似结果:过氧化物酶体增植物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 调控 *Sirt5* 转录,并且这需要依赖于 PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 和雌激素相关受体 α (estrogen-related receptor α , ERR α) 的表达^[114]。雌激素与 20E 都属于甾醇类激素,ERR α 在雌激素信号通路中所发挥的作用也与 EcR 在 20E 信号通路中类似。这些都说明 CAT 的活性除翻译后修饰水平的调节外,还间接受到 20E 在转录水平的调节。在本篇论文中,侧重于探讨 SIRT5 负责 CAT 的去除琥珀酰化修饰,但是,是否还存在其他的酶也负责这一过程还有待进一步探索。

营养状态和激素水平是昆虫变态发育的两大关键调控因子。动物摄食后,就会激活胰岛素信号通路,从而促进生物体的生长。20E 促进昆虫的蜕皮和变态过程,是调控昆虫变态的关键激素之一^[115]。营养状态调控昆虫的生长速率,而 20E 水平调控昆虫重要生长阶段的时间,如蜕皮和变态,两个途径在多个层次存在串扰。在本文中,棉铃虫在幼虫取食期大量进食,从摄食的食物中获得能量,促进幼虫的生长发育,幼虫体型明显增大;进入变态蜕皮期后,20E 滴度上升,抑制昆虫进食,幼虫开始不吃少动,减少能量的散失,并且体内代谢发生显著差异^[116]。琥珀酰化修饰的供体—琥珀酰辅酶 A 可以通过三羧酸循环产生,作为三羧酸循环的产物和反应物反应着体内的营养代谢状态^[117]。研究表明,在高浓度的琥珀酰辅酶 A 条件下,琥珀酰化的发生可以通过非酶促的方式发生^[48]。与本文中观察到的现象类似:在取食期,幼虫大量摄食,虫体内营养丰富,琥珀酰辅酶 A 浓度高,CAT 发生琥珀酰化修饰,酶活性较低;而在变态期,20E 浓度上升,虫体不吃少动,使体内营养状态改变,CAT 去除琥珀酰化修饰,酶活性上升。而 CAT 酶活性的上升又受到 20E 的调节。这也是营养代谢与激素信号协同调控昆虫发育的一种方式。

所以 CAT 作为一种在从低等到高等生物中都十分保守的,在有氧代谢中发挥重要作用的酶,其功能受到翻译后修饰、转录等不同水平,以及营养状态和激素信号等多种因素的协同调控,显示了生命体对于生理活动的精细调控,也说明对于 CAT 活性调节机制的研究对于昆虫发育机制和疾病治疗都有重要参考价值。

2.6 结论

取食期，CAT 发生琥珀酰化修饰，酶活性较低，维持 H_2O_2 的低浓度存在；进入变态期， H_2O_2 浓度升高，20E 通过 EcR 上调 *Sirt5* 的表达，SIRT5 与 CAT 直接结合，使 CAT 去除琥珀酰化修饰，酶活性上升，去除过量的 H_2O_2 ，促进成虫中肠和脂肪体组织的增殖，从而促进昆虫变态发育。

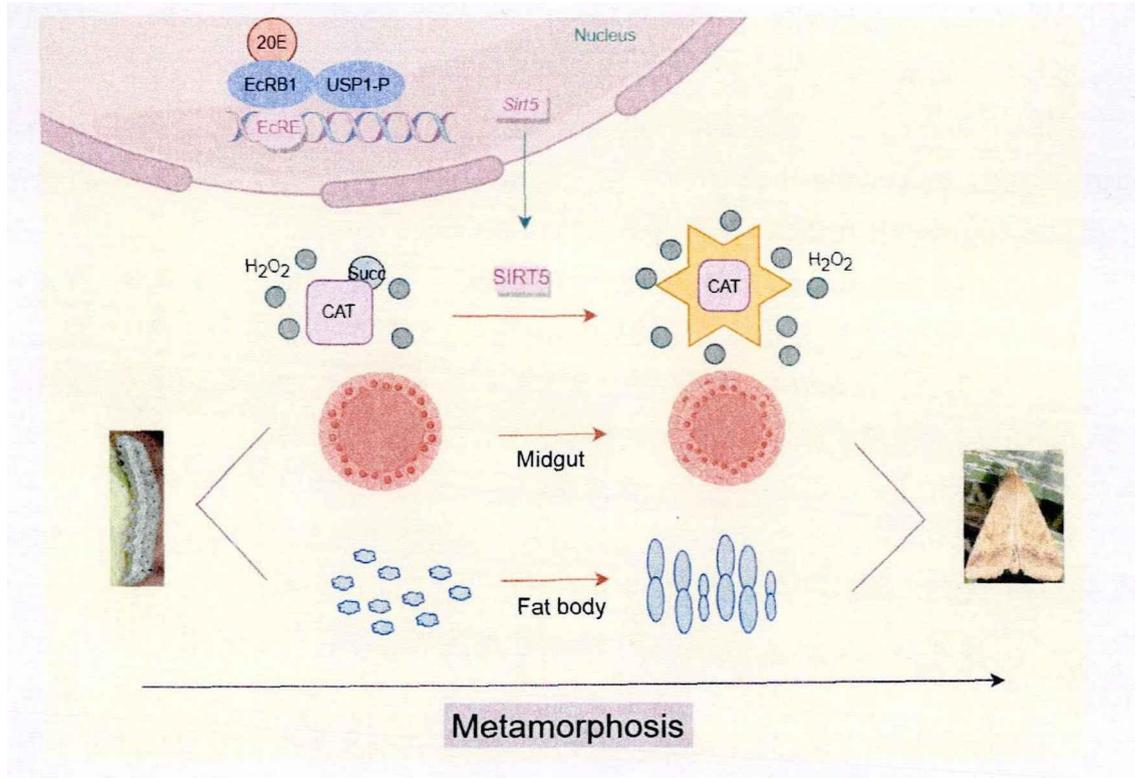


图 2.9. 总结图 (本图由 Figdraw 绘制，导出 ID: PTYIU4ccc9)

Figure 2.9. Summary diagram (By Figdraw, ID: PTYIU4ccc9)

总结：20E 通过 EcR 上调 *Sirt5* 的表达，SIRT5 与 CAT 直接结合，使 CAT 去除琥珀酰化修饰，酶活性上升，去除多余的 H_2O_2 ，促进成虫中肠和脂肪体组织的增殖，从而促进昆虫变态发育。

Summary: 20E up-regulates the expression of *Sirt5* through EcR, and SIRT5 directly binds to CAT, which removes succinylation of CAT, increases enzyme activity, removes excess H_2O_2 , and promotes the proliferation of midgut and fat body tissues of adult insects, thus promoting insect metamorphosis and development.

参考文献

- [1] Povea-cabello S, Brischigliaro M. Emerging mechanisms in the redox regulation of mitochondrial cytochrome c oxidase assembly and function[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2024, 52(2): 873-885.
- [2] Cheung EC, Vousden KH. The role of ROS in tumour development and progression[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2022, 22(5): 280-297.
- [3] Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: A Jekyll and Hyde signalling molecule[J]. *Cell Death and Disease*, 2011, 2(10): 1-8.
- [4] Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. *Current Biology*, 2014, 24(10): R453-R462.
- [5] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, *et al.* Oxygen radicals and human disease. Davis conference[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1987, 107(4): 526-545.
- [6] Sohal RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33(1): 37-44.
- [7] Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations[J]. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 292(1): 18-36.
- [8] Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, *et al.* Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg 4[J]. *EMBO Journal*, 2007, 26(7): 1749-1760.
- [9] Mailloux RJ. An update on methods and approaches for interrogating mitochondrial reactive oxygen species production[J]. *Redox Biology*, 2021, 45: 102044.
- [10] Rhee SG. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling[J]. *Science*, 2006, 312: 1882-1884.
- [11] Yang L, Zheng XL, Sun H, *et al.* Catalase suppression-mediated H₂O₂ accumulation in cancer cells by wogonin effectively blocks tumor necrosis factor-induced NF- κ B activation and sensitizes apoptosis[J]. *Cancer Science*, 2011, 102(4): 870-876.
- [12] Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress[J]. *Redox Biology*, 2017, 11: 613-619.
- [13] Cordeiro JV, Jacinto A. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(4): 249-262.

- [14]Queiroz RF, Stanley CP, Wolhuter K, *et al.* Hydrogen peroxide signaling via its transformation to a stereospecific alkyl hydroperoxide that escapes reductive inactivation[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6626.
- [15]Wang J, Song H, Huang Y, *et al.* Protective effect of crocin on peroxidation-induced oxidative stress and apoptosis in IPEC-J2 cells[J]. *Environmental Toxicology*, 2024, 39(6): 3537-3547.
- [16]Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. Catalase and its mysteries[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2018, 140: 5-12.
- [17]Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiological Reviews*, 2007, 87(1): 245-313.
- [18]Nandi A, Yan LJ, Jana C K, *et al.* Role of catalase in oxidative stress-and age-associated degenerative diseases[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 9613090.
- [19]Goyal MM, Basak A. Human catalase: Looking for complete identity[J]. *Protein and Cell*, 2010, 1(10): 888-897.
- [20]Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans[J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2008, 10(9): 1527-1547.
- [21]Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach[J]. *Biological Chemistry*, 2017. 398(10): 1095-1108.
- [22]Habib LK, Lee M TC, Yang J. Inhibitors of catalase-amyloid interactions protect cells from β -amyloid-induced oxidative stress and toxicity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(50): 38933-38943.
- [23]Shin SK, Cho HW, Song SE, *et al.* Catalase and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 2018, 470(12): 1721-1737.
- [24]Giginis F, Wang J, Chavez A, *et al.* Catalase as a novel drug target for metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. 2023, 13(6): 2644-2656.
- [25]Song Y, Driessens N, Costa M, *et al.* Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease[J]. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2007, 92(10): 3764-3773.
- [26]Schriner SE, Linford NJ. Extension of *mouse* lifespan by overexpression of catalase[J]. *Age*, 2006, 28(2): 209-218.
- [27]Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, *et al.* Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism[J]. *Journal of Molecular Biology*. 2000. 296(1): 295-309.
- [28]Fujiki Y, Bassik MC. A new paradigm in catalase research[J]. *Trends in Cell Biology*.

2021, 31(3): 148-151.

[29]Dubreuil MM, Morgens DW, Okumoto K, *et al.* Systematic identification of regulators of oxidative stress reveals non-canonical roles for peroxisomal import and the pentose phosphate pathway[J]. *Cell Reports*, 2020, 30(5): 1417-1433.

[30]Hosoi KI, Miyata N, Mukai S, *et al.* The VDAC2-BAK axis regulates peroxisomal membrane permeability[J]. *Journal of Cell Biology*, 2017, 216(3): 709-721.

[31]Okumoto K, El Shermely M, Natsui M, *et al.* The peroxisome counteracts oxidative stresses by suppressing catalase import via pex14 phosphorylation[J]. *eLife*, 2020, 9: 1-52.

[32]Neno M, Ichimura S, Yukawa O, *et al.* Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(15): 5885-5894.

[33]Girnun GD, Domann FE, Moore S A, *et al.* Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the *rat* catalase promoter[J]. *Molecular Endocrinology*, 2002, 16(12): 2793-2801.

[34]Murray MG, Thompson WF. Nucleic acids research nucleic acids research[J]. *Methods*. 1980, 12(21): 8235-8251.

[35]Peng C, Lu Z, Xie Z, *et al.* The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2011, 10(12): M111.012658.

[36]Zhang Z, Tan M, Xie Z, *et al.* Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(1): 58-63.

[37]Park J, Chen Y, Tishkoff DX, *et al.* SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways[J]. *Molecular Cell*, 2013, 50(6): 919-930.

[38]Zhang N, Gao R, Yang J, *et al.* Quantitative global proteome and lysine succinylome analyses reveal the effects of energy metabolism in renal cell carcinoma[J]. *Proteomics*, 2018, 18(19): e1800001.

[39]Yuan HF, Zhao M, Zhao LN, *et al.* PRMT5 confers lipid metabolism reprogramming, tumour growth and metastasis depending on the SIRT7-mediated desuccinylation of PRMT5 K387 in tumours[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, 43(9): 2373-2385.

[40]Shen R, Ruan H, Lin S, *et al.* Lysine succinylation, the metabolic bridge between cancer and immunity[J]. *Genes and Diseases*, 2023, 10(6): 2470-2478.

[41]Liu J, Shangguan Y, Tang D, *et al.* Histone succinylation and its function on the nucleosome[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(15): 7101-7109.

[42]Li X, Zhang L, Zhang Y, *et al.* Review of NIR spectroscopy methods for nondestructive quality analysis of oilseeds and edible oils[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2020.

101: 172-181.

[43]Guo Z, Pan F, Peng L, *et al.* Systematic proteome and lysine succinylome analysis reveals enhanced cell migration by hyposuccinylation in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2021, 20: 100053.

[44]Weinert BT, Schölz C, Wagner SA, *et al.* Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation[J]. *Cell Reports*, 2013, 4(4): 842-851.

[45]Wang X, Shi X, Lu H, *et al.* Succinylation inhibits the enzymatic hydrolysis of the extracellular matrix protein fibrillin 1 and promotes gastric cancer progression[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(27): 1-13.

[46]Chen H, Xu H, Potash S, *et al.* Mild metabolic perturbations alter succinylation of mitochondrial proteins[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2017, 95(11): 2244-2252.

[47]Yang Y, Gibson GE. Succinylation links metabolism to protein functions[J]. *Neurochemical Research*, 2019, 44(10): 2346-2359.

[48]Simithy J, Sidoli S, Yuan ZF, *et al.* Characterization of histone acylations links chromatin modifications with metabolism[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1141.

[49]Wagner GR, Bhatt DP, O'Connell TM, *et al.* A class of reactive acyl-coA species reveals the non-enzymatic origins of protein acylation[J]. *Cell Metabolism*, 2017, 25(4): 823-837.

[50]Wagner GR, Payne RM. Widespread and enzyme-independent N ϵ -acetylation and N ϵ -succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(40): 29036-29045.

[51]Chinopoulos C. The mystery of extramitochondrial proteins lysine succinylation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 6085.

[52]Lu W, Che X, Qu X, *et al.* Succinylation regulators promote clear cell renal cell carcinoma by immune regulation and RNA N6-methyladenosine methylation[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 1-17.

[53]McKenna MC, Rae CD. A new role for α -ketoglutarate dehydrogenase complex: Regulating metabolism through post-translational modification of other enzymes[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 134(1): 3-6.

[54]Gibson GE, XuH, Chen HL, *et al.* Alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex-dependent succinylation of proteins in neurons and neuronal cell lines[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 134(1): 86-96.

[55]Dong Z, He W, Lin G, *et al.* Histone acetyltransferase KAT2A modulates neural stem cell differentiation and proliferation by inducing degradation of the transcription factor PAX6[J].

- Journal of Biological Chemistry, 2023, 299(3): 103020.
- [56]Wang Y, Guo YR, Liu K, *et al.* KAT2A coupled with the α -KGDH complex acts as a histone H3 succinyltransferase[J]. Nature, 2017, 552(7684): 273-277.
- [57]Zhang C, Huang Z. KAT2A promotes the succinylation of PKM2 to inhibit its activity and accelerate glycolysis of gastric cancer[J]. Molecular Biotechnology, 2023, 6(1): 628.
- [58]Zhou J, Yan X, Liu Y, *et al.* Succinylation of CTBP1 mediated by KAT2A suppresses its inhibitory activity on the transcription of CDH1 to promote the progression of prostate cancer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2023, 650: 9-16.
- [59]Kurmi K, Hitosugi S, Wiese EK, *et al.* Carnitine palmitoyltransferase 1A has a lysine succinyltransferase activity[J]. Cell Reports, 2018, 22(6): 1365-1373.
- [60]Zhu Y, Wang Y, Li Y, *et al.* Carnitine palmitoyltransferase 1A promotes mitochondrial fission by enhancing MFF succinylation in ovarian cancer[J]. Communications Biology, 2023, 6(1): 618.
- [61]Wang C, Zhang C, Li X, *et al.* CPT1A-mediated succinylation of S100A10 increases human gastric cancer invasion[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019, 23(1): 293-305.
- [62]Sreedhar A, Wiese EK, Hitosugi T. Enzymatic and metabolic regulation of lysine succinylation[J]. Genes and Diseases, 2020, 7(2): 166-171.
- [63]Silva RFe, Bassi G, Câmara NOS, *et al.* Sirtuins: Key pieces in the host response to pathogens' puzzle[J]. Molecular Immunology, 2023, 160: 150-160.
- [64]Avilkina V, Chauveau C, Ghali Mhenni O. Sirtuin function and metabolism: Role in pancreas, liver, and adipose tissue and their crosstalk impacting bone homeostasis[J]. Bone, 2022, 154: 116232.
- [65]Tao Z, Jin Z, Wu J, *et al.* Sirtuin family in autoimmune diseases[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1186231.
- [66]Carafa V, Rotili D, Forgione M, *et al.* Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic[J]. Clinical Epigenetics, 2016, 8(1): 61.
- [67]Du J, Zhou Y, Su X, *et al.* Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase[J]. Science, 2011, 334(6057): 806-809.
- [68]Wang Y, Chen H, Zha X. Overview of SIRT5 as a potential therapeutic target: Structure, function and inhibitors[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 236: 114363.
- [69]Sadhukhan S, Liu X, Ryu D, *et al.* Metabolomics-assisted proteomics identifies succinylation and SIRT5 as important regulators of cardiac function[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(16): 4320-4325.

- [70] Xia Q, Gao S, Han T, *et al.* Sirtuin 5 aggravates microglia-induced neuroinflammation following ischaemic stroke by modulating the desuccinylation of annexin-A1[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 1-21.
- [71] Xu Y, Ye X, Zhou Y, *et al.* Sodium butyrate activates HMGCS2 to promote ketone body production through SIRT5-mediated desuccinylation[J]. *Frontiers of Medicine*, 2023, 17(2): 339-351.
- [72] Mao J, Wang D, Wang D, *et al.* SIRT5-related desuccinylation modification of AIFM1 protects against compression-induced intervertebral disc degeneration by regulating mitochondrial homeostasis[J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2023, 55(1): 253-268.
- [73] Lin ZF, Xu HB, Wang JY, *et al.* SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 441(1): 191-195.
- [74] Hu Y, Tian X, Zhao Y, *et al.* Sirtuin 5 alleviates liver ischemia/reperfusion injury by regulating mitochondrial succinylation and oxidative stress[J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2024, 40(10-12): 616-631.
- [75] Kwon O K, Bang I H, Choi SY, *et al.* SIRT5 is the desuccinylase of LDHA as novel cancer metastatic stimulator in aggressive prostate cancer[J]. *Genomics Proteomics and Bioinformatics*, 2023, 21(1): 177-189.
- [76] Jiang M, Huang Z, Chen L, *et al.* SIRT5 promote malignant advancement of chordoma by regulating the desuccinylation of c-myc[J]. 2024, 24(1): 386.
- [77] Truman JW, Riddiford LM. The origins of insect metamorphosis[J]. *Nature*, 1999, 401(6752): 447-452.
- [78] Smykal V, Daimon T, Kayukawa T, *et al.* Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose[J]. *Developmental Biology*, 2014, 390(2): 221-230.
- [79] Truman JW. The evolution of insect metamorphosis[J]. *Current Biology*, 2019, 29(23): R1252-R1268.
- [80] 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.
- [81] Ryoo HD, Baehrecke EH. Distinct death mechanisms in *Drosophila* development[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2010, 22(6): 889-895.
- [82] Baehrecke EH. Steroid regulation of programmed cell death during *Drosophila* development[J]. 2000, 7(11): 1057-1062.
- [83] Holtof M, Lenaerts C, Cullen D, *et al.* Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut[J]. *Cell and Tissue Research*, 2019, 377(3): 397-414.

- [84]Liu H, Wang J, Li S. E93 predominantly transduces 20-hydroxyecdysone signaling to induce autophagy and caspase activity in *Drosophila* fat body[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 45(1): 30-39.
- [85]Meschi E, Delanoue R. Adipokine and fat body in *flies*: connecting organs[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2021, 533: 111339.
- [86]Skowronek P, Wójcik Ł, Strachecka A. Fat body—multifunctional insect tissue[J]. *Insects*, 2021, 12(6): 547.
- [87]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]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 1-14.
- [88]Li S, Yu X, Feng Q. Fat body biology in the last decade[J]. *Annual Review of Entomology*, 2019, 64: 315-333.
- [89]Zheng H, Yang X, Xi Y. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*[J]. *Life Sciences*, 2016, 167: 22-31.
- [90]Zhao X, Karpac J. The *Drosophila* midgut and the systemic coordination of lipid-dependent energy homeostasis[J]. *Current Opinion in Insect Science*. 2020, 41: 100-105.
- [91]Miguel-Aliaga I, Jasper H, Lemaitre B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*[J]. *Genetics*, 2018, 210(2): 357-396.
- [92]Caccia S, Casartelli M, Tettamanti G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions[J]. *Cell and Tissue Research*, 2019, 377(3): 505-525.
- [93]Tettamanti G, Grimaldi A, Casartelli M, *et al.* Programmed cell death and stem cell differentiation are responsible for midgut replacement in *Heliothis virescens* during prepupal instar[J]. *Cell and Tissue Research*, 2007, 330(2): 345-359.
- [94]Tettamanti G, Casartelli M. Cell death during complete metamorphosis[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2019, 374(1783): 1-11.
- [95]Zhang X, Wang QR, Wu Q, *et al.* Cytoplasmic FKBP is involved in molting and metamorphosis through regulating the nuclear localization of EcR[J]. *Insect Science*, 2023: 1-14.
- [96]Clever U. Actinomycin and puromycin: Effects on sequential gene activation by ecdysone[J]. *Science*, 1964, 146(3645): 794-795.
- [97]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): 80.
- [98]Wang D, Zhao WL, Cai MJ, *et al.* G-protein-coupled receptor controls steroid hormone

- signaling in cell membrane[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 1-11.
- [99] Beckstead RB, Lam G, Thummel CS. The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis.[J]. *Genome biology*, 2005, 6(12): R99.
- [100] Wang S, Wang J, Sun Y, *et al.* PKC-mediated USP phosphorylation at Ser35 modulates 20-hydroxyecdysone signaling in *Drosophila*[J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(12): 6187-6196.
- [101] Jing YP, Liu W, Wang JX, *et al.* The steroid hormone 20-hydroxyecdysone via nongenomic pathway activates Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II to regulate gene expression[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(13): 8469-8481.
- [102] Zhao XF, An XM, Wang JX, *et al.* Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2005, 58(1): 39-46.
- [103] Zhang L, Wang YW, Lu ZQ. Midgut immune responses induced by bacterial infection in the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 2015, 16(10): 875-882.
- [104] Qian Y, Li Y, Liu X, *et al.* Evidence for CAT gene being functionally involved in the susceptibility of COVID-19[J]. *FASEB Journal*, 2021, 35(4): 1-6.
- [105] Fang Y, Wang H, Zhu W, *et al.* Antioxidative capacity in the fat body of *Bombyx mori* is increased following oral administration of 4-methylumbelliferone[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-C Toxicology and Pharmacology*, 2014, 159(1): 31-37.
- [106] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach?[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, 8(7): 579-591.
- [107] Lee WJ. Bacterial-modulated host immunity and stem cell activation for gut homeostasis[J]. *Genes and Development*, 2009, 23(19): 2260-2265.
- [108] Yamamoto K, Banno Y, Fujii H, *et al.* Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: Gene sequence, distribution, and overexpression[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 35(4): 277-283.
- [109] Rafikov R, Kumar S, Aggarwal S, *et al.* Endothelin-1 stimulates catalase activity through the PKC δ -mediated phosphorylation of serine 167[J]. *Free Radic Biol Med*. 2014, 67:255-264.
- [110] Teng P, Cui K, Yao S, *et al.* SIRT5-mediated ME2 desuccinylation promotes cancer growth by enhancing mitochondrial respiration[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2024, 31(1): 65-77.

- [111] Zheng DF, Zeng QW, He D, *et al.* SIRT5 alleviates hepatic ischemia and reperfusion injury by diminishing oxidative stress and inflammation via elevating SOD1 and IDH2 expression[J]. *Experimental Cell Research*, 2022, 419(2): 113319.
- [112] Woo HA, Yim SH, Shin DH, *et al.* Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling[J]. *Cell*, 2010, 140(4): 517-528.
- [113] Chang ZS, Xia JB, Wu HY, *et al.* Forkhead box O3 protects the heart against paraquat-induced aging-associated phenotypes by upregulating the expression of antioxidant enzymes[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(5): 1-14.
- [114] Buler M, Aatsinki SM, Izzi V, *et al.* SIRT5 is under the control of PGC-1 α : and AMPK and is involved in regulation of mitochondrial energy metabolism[J]. *FASEB Journal*, 2014, 28(7): 3225-3237.
- [115] Yamanaka N, Rewitz KF, O' Connor MB. Ecdysone control of developmental transitions: Lessons from *Drosophila* research[J]. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58: 497-516.
- [116] 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.
- [117] Burch JS, Marcero JR, Maschek JA, *et al.* Glutamine via α -ketoglutarate dehydrogenase provides succinyl-CoA for heme synthesis during erythropoiesis[J]. *Blood*, 2018, 132(10): 987-998.