

保幼激素拮抗物 KK-42 对凡纳滨对虾 HMGR 表达的抑制

夏西超¹, 王文锋^{1,2}, 李昕¹, 宁黔冀^{1*}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007;

2. 新乡医学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 为研究保幼激素拮抗物 KK-42 促生长的分子机制, 实验克隆出甲基法呢酯(MF)合成的关键酶——3-羟-3-甲基-戊二酰还原酶 A(HMGR)部分 mRNA 序列, 并研究该基因时空表达以及 KK-42 对其表达的影响。将体长 3.5~5.0 cm 凡纳滨对虾幼虾随机分为 2 组, 分别用 1.95×10^{-4} mol/L 的 KK-42 溶液或不含 KK-42 的溶液浸泡处理 1 min, 之后在相同条件下常规饲养。不同组织中 HMGR mRNA 水平定量分析采用 real-time PCR, 血淋巴中 MF 滴度测定采用正相高效液相色谱法。结果显示, HMGR mRNA 水平在大颚器官(MO)最高, 其次是眼柄, 肌肉和肝胰腺水平最低。在实验观察期间, 眼柄与 MO 两种组织中 HMGR 的表达模式明显不同, 前者各时间点 mRNA 水平变化较小, 无统计学差异($P > 0.05$); 后者 mRNA 含量分别在第 1、7 天显著高于第 0 天; 实验期间血淋巴 MF 滴度逐渐升高。KK-42 处理可显著抑制 HMGR 表达, 但眼柄和 MO 中 HMGR 转录的下调模式仍不相同, 前者 mRNA 水平在各时间点之间没有明显差异($P > 0.05$); 而在 MO 下调幅度出现明显波动, 其中在第 1 和 7 天, mRNA 含量分别下降了 82.5% 和 90.7%; 血淋巴 MF 滴度逐渐下降。结果表明, KK-42 可显著抑制凡纳滨对虾多种组织(尤其是 MO 和眼柄)HMGR 转录, 降低血淋巴 MF 滴度, 这可能是其促生长的机制之一。

关键词: 凡纳滨对虾; 大颚器官; 保幼激素拮抗物 KK-42; 3-羟-3-甲基-戊二酰还原酶 A
中图分类号: Q 459; S 917 **文献标识码:** A

3-羟-3-甲基-戊二酰还原酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMGR) 是萜类物质合成的关键酶, 该酶催化形成的异戊二烯为保幼激素(juvenile hormone III, JH III)等萜类物质合成提供起始底物^[1-2], 因此, HMGR 表达水平与 JH 含量有密切关系^[2-4], 该酶基因序列、组织分布和表达调控已在多种昆虫中得到研究^[5-7]。甲壳动物大颚器官(mandibular organ, MO)分泌的甲基法呢酯(methyl farnesoate, MF), 其结构类似 JH III 同属萜类物质, 是直接调控甲壳动物生长的重要激素之一^[8-10]。鉴于昆虫 JH III 和甲壳动物 MF 前体合成均有相同途径, 甲壳动物体内 HMGR 研究逐步引起学者的重视。据报道, HMGR 在美洲螯龙虾(*Homarus*

americanus)不同组织表达水平差异较大, MO 表达水平最高, 推测可能与该酶合成 MF 功能有密切关系^[11-12]; 龙虾体内 HMGR 活性高低与淋巴中 MF 滴度变化趋势一致^[12-13]。

咪唑类物质保幼激素拮抗物(KK-42)可减少昆虫体内 JH 滴度, 促使成熟形态发生^[14-16]。我们前期研究首次发现, KK-42 能够促进凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)生长, 并对 MO 的发育有一定的抑制作用^[17]。经济甲壳动物凡纳滨对虾在国内外都有广泛的养殖, 研究 KK-42 这类物质的作用机理不仅具有理论价值, 而且还有重要的实际意义。鉴于 MF 在凡纳滨对虾等甲壳动物生长中的作用以及 HMGR 与 MF 合成的关系, 我们推测 KK-42 作用的靶分子之一可能

收稿日期:2010-04-20 修回日期:2010-05-29

资助项目:国家自然科学基金项目(30940008);高等学校博士学科点专项科研基金(20094104110003);河南省高校科技创新人才支持计划(2009HASTIT022)

通讯作者:宁黔冀, Tel:0373-3326340, E-mail:ningqianji1964@163.com

是 HMGR, 据此, 我们首次克隆出部分 HMGR 序列, 用 real-time PCR 分析了 HMGR 在凡纳滨对虾中的时空表达, 结合高效液相色谱测定了血淋巴中 MF 滴度。

1 材料与方法

1.1 凡纳滨对虾的处理

凡纳滨对虾养殖于巩义市黄河生态渔业产业园。在面积 2 664 m², 水深 1.5 m 的池塘中, 架设 2 个面积 60 m²、深 1.5 m 的网箱, 从池塘中采集健康幼虾(体长 3.5~5.0 cm) 800 头, 随机分成 2 组, 其中一组用 1.95 × 10⁻⁴ mol/L 的 KK-42(烟台大学应用化学系提供, 纯度 ≥ 95%) 溶液浸泡处理 1 min^[17], 取出, 空气中静置数秒, 立刻投入到网箱中, 按正常方式养殖; 对照组用不含 KK-42 的溶液处理, 方法同上。KK-42 处理后不同时间, 取处理组及对照组凡纳滨对虾, 分别解剖各组织, 液氮速冻, -80 °C 保存, 血淋巴于 -18 °C 保存。

1.2 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

用 RNAiso Plus (TaKaRa) 提取凡纳滨对虾 MO、眼柄和肌肉总 RNA, 总 RNA 的完整性和纯度用凝胶电泳检测, RNA 的浓度根据 A₂₆₀ 进行定量。按照 PrimeScriptTM RT 试剂盒 (TaKaRa) 操作说明合成 cDNA 第一链。

1.3 HMGR 部分 mRNA 序列克隆

根据 HMGR 氨基酸高度保守区域设计兼并引物, 正向引物为 5'-CCNATGGCNACNACN GARGG-3', 反向引物为 5'-CATRTTCANCC-CATNGCRTCNCC-3'。50 μL PCR 反应体系: TaKaRa Taq (5 U/μL) 0.25 μL, 10 × PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL, dNTP 4 μL, cDNA 2.5 ng, 引物各 1 μL, 灭菌水补至 50 μL。PCR 循环条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸

10 min。PCR 扩增产物进行检测纯化, 按照 T₄ DNA Ligase Kit (Promega) 要求连接在 pGEM-T 载体上进行转化测序。

1.4 HMGR mRNA 水平的定量测定

凡纳滨对虾 HMGR 和 β-actin 的 cDNA 序列设计目的基因 HMGR (GU969105) 和内参基因 β-actin (AY486466), 引物由上海生工公司合成。目的基因正向引物为 5'-TCCTCTGGCTGCTGTT-3', 反向引物为 5'-CCGTAGGAGGTGGTG GAGTTG-3'。内参基因正向引物为 5'-CATCCACGAGACCACCTACAAC-3', 反向引物为 5'-GAAA TACTGCCTCGCTCCCTC-3'。Real-time PCR 按照 SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa, Japan) 要求进行。

1.5 血淋巴中 MF 滴度测定

血淋巴中 MF 的滴度测定采用正相高效液相色谱法 (normal phase high performance liquid chromatography)^[18]。血淋巴 (0.5~1.0 mL) 中分别加入乙腈 2.5 mL、正己烷 0.5 mL, 用适量的 0.9% 的 NaCl 调整体积, 使其总体积为 5 mL, 充分混匀, 离心, MF 即存在于最上层的正己烷中。MF 纯品由 Dr. Laufer Hans (Department of Molecular & Cell Biology, University of Connecticut, USA) 友情提供。流动相为正己烷, 柱温 25 °C, 流速 1.2 mL/min, 检测波长 220 nm。所有试剂均为色谱纯。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 仅出现一条与目的扩增产物相同条带, 测序为 308 bp (图 1)。序列进行 BLAST 证实为凡纳滨对虾 HMGR 部分 mRNA, 现已在 NCBI 注册 (GU969105)。

```

CCAATGATGG ATGTATAGTT GACTCAATTA ACCGTGGCTG CAAGGCGATC ACCTCCTCTG GCGGCTGCTG
TTCTGTTGTG CTGAAAGATG CTATTACACG TGCCCATGT GTTCGCACGC CTTATGCGAT GCGTGCTGCA
GCTGTGAAGC GATGGGTTTC TGTCCGTGAT ACCTATGGTC AGTTGGAAGA GGCTTTCAAC TCCACCACCT
CCTACGGTAG ACTTGAATCA CTGGATGCAA CAGTTGCTGG TCGTAACGTC TACTTGCGTA TTTATTGTAT
GTCCACAGAT GTCATGGGGA TCCACATG

```

图 1 凡纳滨对虾 HMGR cDNA 部分序列

Fig. 1 Part sequence of HMGR cDNA in *L. vannamei*

2.2 HMGR 基因在凡纳滨对虾的空间表达

HMGR 在凡纳滨对虾 MO, 眼柄, 肌肉和肝胰腺都有表达, 其 mRNA 水平在 MO 最高, 其次是眼柄, 肌肉和肝胰腺最低 (图 2)。

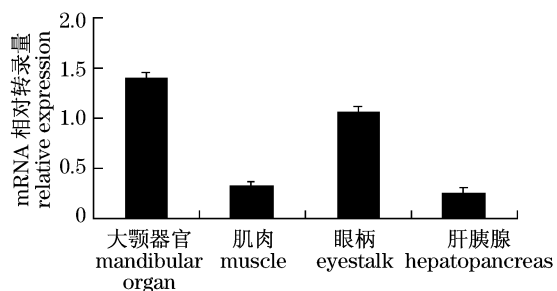


图 2 凡纳滨对虾 HMGR 基因的空间表达

每组数据来源于 3 只动物, 重复 3 次。

Fig. 2 Spatial expression of HMGR in *L. vannamei*

The bars represent means \pm SD for three replicate experiments using 3 shrimp at each tissue.

2.3 KK-42 对凡纳滨对虾大颚器官 HMGR 基因表达的抑制

对照组 MO 中 HMGR mRNA 水平呈明显波动性变化, 和第 0 天相比, 第 1 和 7 天增幅分别达 55.5% 和 51.7% ($P < 0.05$) (图 3)。KK-42 处理后, 各时间点 mRNA 水平降低 34.7% 以上 ($P < 0.05$), 其中第 1 和 7 天, mRNA 含量分别下降了 82.5% 和 90.7% ($P < 0.01$) (图 3)。

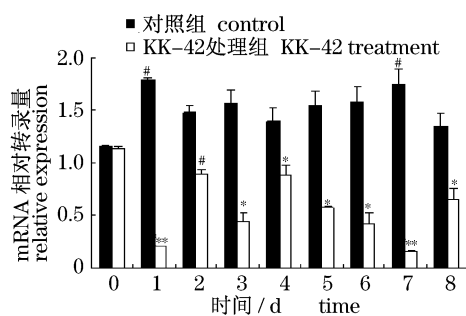


图 3 KK-42 对凡纳滨对虾大颚器官 HMGR 基因表达的抑制

$n = 9$ /组/时间点, “*”“**”表示与相应对照组相比有显著或极显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); “#”表示与 0 d 对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 Time-course inhibition of KK-42 on MO HMGR expression in *L. vannamei*

$n = 9$ /each group/each time point. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs control group at the same time; # $P < 0.05$ vs. control group at 0th day.

2.4 KK-42 对凡纳滨对虾眼柄 HMGR 基因转录的下调

实验期间, 对照组眼柄组织 HMGR mRNA 含量的变化相对较小, 各时间点与第 0 天相比未出现统计学意义的变化 (图 4)。KK-42 处理能显著下调 HMGR 的表达, 但不同时间点降低的幅度无显著性差异。

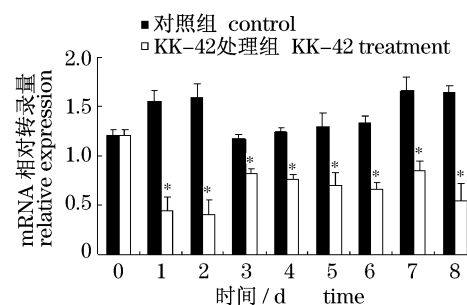


图 4 KK-42 对凡纳滨对虾眼柄 HMGR 基因表达的影响

$n = 9$ /组/时间点; “*”表示与相应对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 Time-course change of HMGR mRNA expression in eyestalks of the shrimp *L. vannamei* after KK-42 treatment

$n = 9$ /each group/each time point; * $P < 0.05$ vs. control group at the same time.

2.5 KK-42 对凡纳滨对虾血淋巴 MF 滴度的影响

图 5 显示 MF 的保留时间为 2.87 min, 纯品 MF 标准曲线方程式为: $y = 1745.5x + 44174.5$, y 代表吸收峰面积, x 代表 MF 滴度变化 ($R^2 = 0.9998$)。实验期间, 对照组血淋巴 MF 滴度逐渐

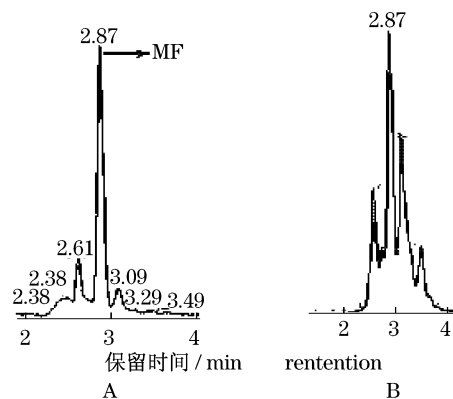


图 5 MF 的正相高效液相色谱图

A: 纯品; B: 样品。

Fig. 5 A representative normal-phase HPLC chromatogram showing MF

A: purified MF; B: sample.

升高,从 40 ng/mL(第 0 天)升至 73 ng/mL(第 6 天)(表 1)。KK-42 处理后,MF 滴度逐渐降低,第 4 天和第 6 天,分别比对照组减少 18.6% 和 20.8%。

表 1 KK-42 对凡纳滨对虾血淋巴中 MF 滴度影响
Tab.1 Effect of KK-42 on MF titers in hemolymph of *L. vannamei*

组别 group	第 0 天 day 0	第 2 天 day 2	第 4 天 day 4	第 6 天 day 6
对照组 control	40	44	68	73
处理组 KK-42 treatment	40	43	56	58
抑制率(%) inhibition percentage	0	2.2	17.6	20.5

注:n=50/组/时间点,[MF]单位:ng/mL 血淋巴。

Notes:For all the groups n=50/each time point,[MF]:ng/mL hemolymph.

3 讨论

MF 在调节甲壳动物生长中起着重要作用,MO 是合成 MF 的唯一部位^[8-10]。结果显示,HMGR 在凡纳滨对虾 4 种组织有不同表达水平,在 MO 最高,这与 Li 等^[13]在龙虾中的研究结果一致。HMGR 在 MO 波动性的变化与血淋巴 MF 滴度的变化呈现一致的趋势(图 3,表 1),对龙虾研究也得到类似的结果,反映了 HMGR 是影响 MF 合成的关键酶^[12-13]。至于 HMGR 在眼柄中的高表达,因在实验观察期间,其水平的变化无显著差异(图 4),推测对 MF 合成作用不大,可能有其它生理学意义。对昆虫研究显示,HMGR 除了在咽侧体合成 JH 外,还参与合成糖基化蛋白和信息素等^[1,19-22]。

KK-42 处理导致凡纳滨对虾 MO HMGR 表达抑制,血淋巴 MF 滴度降低,但二者的变化趋势并不完全一致。KK-42 处理后第 1 天,HMGR mRNA 水平降低 82.5%(图 3),而 MF 滴度变化不大,这种滞后现象提示,从起始物合成到最终产物 MF 形成需要一个复杂反应过程。另外,实验过程中 HMGR mRNA 下调幅度存在波动性(图 3),而 MF 滴度不断降低(表 1),表明影响 MF 合成和/或分泌的因素较多,HMGR 仅是其中之一。我们最近的研究发现,KK-42 对 MF 合成途径最后一步的酶法呢酸 O-甲基转移酶(Farnesoic acid O-methyltransferase, FAMEt)也有明显的抑

制作用(结果未示)。处理组 HMGR 在 MO 和眼柄中表达模式存在明显差异,推测 KK-42 对这两种组织中 HMGR 基因转录的抑制途径可能不同,有待进一步研究。对哺乳动物和昆虫的研究显示,调控 HMGR 表达的机制有多种^[23-25];某些甲壳动物的眼柄提取物(虽然具体的物质尚不明确)可以抑制 MO 中 HMGR 表达,降低血淋巴 MF 滴度^[12-13]。

参考文献:

- [1] Feyereisen R, Farnsworth D E. Characterization and regulation of HMG-CoA reductase during a cycle of juvenile hormone synthesis [J]. Mol Cell Endocrinol, 1987, 53:227-238.
- [2] Bellés X, Martin D, Piulachs M D. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects [J]. Annu Rev Entomol, 2005, 50: 181-199.
- [3] Couillaud F, Feyereisen R. Assay of HMG-CoA synthase in *Diptera punctata* corpora allata [J]. Insect Biochemistry, 1991, 21:131-135.
- [4] Mane-Padros D, Cruz J, Vilaplana L, Pascual N, et al. The nuclear hormone receptor BgE75 links molting and developmental progression in the direct-developing insect *Blattella germanica* [J]. Developmental Biology, 2008, 315:147-160.
- [5] Gertler F B, Chiu C Y, Richter-Mann L, et al. Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-HMG CoA reductase [J]. Molecular and Cellular Biology, 1988, 8:2713-2721.
- [6] Martfnez-Gonzalez J, Buesa C, Piulachs M D, et al. Molecular cloning, developmental pattern and tissue expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of the cockroach *Blattella germanica* [J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 3: 33-241.
- [7] Duportets L, Belles X, Rossignol F, et al. Molecular cloning and structural analysis of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase of the moth *Agrotis ipsilon* [J]. Insect Molecular Biology, 2000, 9: 385-392.
- [8] Nagaraju G P C, Reddy P R, Reddy P S. Mandibular organ its relation to body weight sex molt and reproduction in the crab *Ozotelpusa senex senex* Fabricius (1791) [J]. Aquaculture, 2004, 232:

- 603 – 612.
- [9] Nagaraju G P C, Reddy P R, Reddy P S. *In vitro* methyl farnesoate secretion by mandibular organs isolated from different molt and reproductive stages of the crab *Oziotelphusa senex senex*[J]. J Fish Sci, 2006, 72:410 – 414.
- [10] Reddy P R, Nagaraju G P C, Reddy P S. Involvement of methyl farnesoate in the regulation of molting and reproduction in the freshwater crab *Oziotelphusa senex senex*[J]. J Crust Biol, 2004, 24: 511 – 515.
- [11] Li S, Wagner CA, Friesen J A, *et al.* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the lobster mandibular organ: regulation by the eyestalk[J]. Gen Comp Endocrinol, 2003, 134: 147 – 155.
- [12] Li S, Friesen J A, Fei H, *et al.* The lobster mandibular organ produces soluble and membrane-bound forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase [J]. Biochem, 2004, 381: 831 – 840.
- [13] Li S, Friesen J A, Holford K C, *et al.* Methyl farnesoate synthesis in the lobster mandibular organ: the roles of HMG-CoA reductase and farnesoic acid O-methyltransferase [J]. Comp Biochem Physiol, 2010, 155: 49 – 55.
- [14] Asano S. Anti-juvenile hormone activity of imidazole compound(KK-42) and its diminution by metoprene in the 4th instar silkworm *Bombyx mori* L [J]. Appl Entomol Zool, 1986, 21: 63 – 69.
- [15] Wu J M, Wu Z D, Xu J L, *et al.* The effect of trimolter inducer KK-42 on the endocrine system in the silkworm *Bombyx mori* [J]. Acta Entomol Sin, 1991, 34: 278 – 283.
- [16] Hirai M, Kamimura M, Kikuchi K, *et al.* cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: an inducible gene by the imidazole insect growth regulator KK-42[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32: 627 – 635.
- [17] Ning Q J, Fu S G, XU X J, *et al.* A new and practical application of JH antagonist KK-42 to promoting growth of shrimp *L. vannamei* [J]. Aquaculture, 2007, 270: 422 – 426.
- [18] Borst D W, Tsukimura B. Quantification of methyl farnesoate levels in hemolymph by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1991, 545: 71 – 78.
- [19] Goldstein J L, Basu S K, Brown M S. Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein in culture cells[J]. Methods in Enzymology, 1983, 98: 241 – 260.
- [20] Casals N, Buesa C, Piulachs M D, *et al.* Coordinated expression and activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and reductase in the fat body of *Blattella germanica* (L.) during vitellogenesis [J]. Insect Biochem Mol Biol, 1996, 26: 837 – 843.
- [21] Casals N, Martin D, Buesa C, *et al.* Expression and activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and reductase in the fat body of ovariectomized and allatectomized *Blattella germanica*[J]. Physiol Entomol, 1997, 22: 6 – 12.
- [22] Tittiger C, Blomquist G J, Ivarsson P, *et al.* Juvenile hormone regulation of HMG-R gene expression in the dark beetle *Ips paraconfusus* (Coleoptera: Scolytidae): implications for male aggregation pheromone biosynthesis [J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55: 121 – 127.
- [23] Ravid T, Doolman R, Avner R, *et al.* The ubiquitin-proteasome pathway mediates the regulated degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 35840 – 35847.
- [24] Moriyama T, Sather S K, McGee T P, *et al.* Degradation of HMG-CoA reductase *in vitro*. Cleavage in the membrane domain by a membrane-bound cysteine protease[J]. J Biol Chem, 1998, 273: 22037 – 22043.
- [25] Omkumar V, Rodwell V W. Phosphorylation of Ser871 impairs the function of His865 of Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase [J]. J Biol Chem, 1994, 269: 16862 – 16866.

The inhibitory effect of juvenile hormone antagonist KK-42 on HMGR expression in *Litopenaeus vannamei*

XIA Xi-chao¹, WANG Wen-feng^{1,2}, LI Xin¹, NING Qian-ji^{1*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Methyl farnesoate (MF) is an important hormone controlling crustacean growth. Our previous study has demonstrated that the treatment of juvenile hormone antagonist KK-42 can accelerate growth of *Litopenaeus vannamei*. In order to research the possible molecular mechanism of KK-42 growth-promoting effect on *L. vannamei*, a part of mRNA sequence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGR), a key enzyme of MF precursor production, was cloned and the spatial and temporal expressions of HMGR and the effect of KK-42 on the expressions were assayed. The shrimps (*L. vannamei*), 3.5–5.0 cm long, were soaked for 1 min in KK-42 solution at a concentration of 1.95×10^{-4} mol/L or in the solution without KK-42, and then cultured in normal way. The HMGR mRNA levels derived from tissues were assayed using real-time PCR and hemolymph MF titer was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Results showed that the highest level of HMGR transcript occurred in mandibular organ (MO), then in eyestalk and the lowest in muscle and hepatopancreas. The expression pattern of HMGR derived from eyestalk and MO tissues varied in control group during the experiment, of which no statistical difference in the mRNA level was observed in the eyestalk, but the mRNA content rose significantly on day 1 and day 7 compared to day 0 in the MO; the MF titer gradually increased during the experiment and was observed. Administration of KK-42 resulted in important depression on HMGR expression, and the change trend of the down-regulated mRNA levels, however, differed in the two tissues mentioned. For eyestalk, the HMGR mRNA levels at all time points had no statistical difference, but those fluctuated and even reduced by 80.2% ($P < 0.01$) and 90.7% ($P < 0.01$) on day 1 and day 7 after KK-42 treatment, respectively, in MO. Meanwhile, the amount of hemolymph MF fell in KK-42-treated shrimps compared to that in control ones during the experiment. Our present study demonstrates that treatment of KK-42 significantly inhibits HMGR expression in different tissues especially in MO, and decreases the hemolymph MF titer, which is likely one of mechanisms of KK-42 growth-promoting effect on *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; mandibular organ; KK-42; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

Corresponding author: NING Qian-ji. E-mail: ningqianji1964@163.com