2023, 60(3): 783-797.

ACBP 和 5-羟色胺对蜜蜂上颚腺合成 10-羟基-2-癸烯酸的影响^{*}

谢子涵** 张晓静** 夏振宇 李云畅 郝 悦*** 彭文君*** (资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室,中国农业科学院蜜蜂研究所,北京 100093)

摘要【目的】本研究旨在探究酰基辅酶 A 结合蛋白(ACBP)和胺类信号分子 5-羟色胺(5-HT)对意大利蜜蜂上颚腺分泌 10-羟基-2 癸烯酸(10-HDA)的影响。【方法】 以饲喂非特异性 dsRNA 和糖水为对照,通过饲喂 acbp 特异性的双链 RNA(dsRNA)敲低工蜂 acbp 的表达;对以上处理组和对照组分别进行上颚腺腺体形态观察,转录组测序和筛选差异基因(P-adjust<0.05);对差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析;结合脂肪酸代谢和色氨酸代谢的关键基因表达检测结果以及上颚腺 10-HDA 含量的检测结果,系统研究 ACBP 和 5-HT 对工蜂上颚腺 10-HDA 合成的影响。【结果】 acbp 敲低导致上颚腺 10-HDA 含量显著下降约 20%;转录组学比较分析结果发现 488 个差异基因,主要参与脂肪酸降解、PPAR 信号通路和多种氨基酸代谢通路。有趣的是,色氨酸代谢通路的 and, aldh 等差异基因的变化可能导致 5-HT 的积累。然后通过外源 5-HT 饲喂哺育蜂,发现上颚腺的 10-HDA 的产量显著下降约 30%。外源 5-HT 引起上颚腺的 5-HT1、5-HT2α、5-HT2β 受体编码基因上调表达,并显著抑制编码脂肪酸跨膜运输蛋白的线粒体 cpt2和过氧化物酶体 abcd3 的表达。【结论】 ACBP 主要通过脂肪酸降解和氨基酸代谢两方面影响上颚腺不饱和脂肪酸的合成,并与色胺类信号分子 5-HT 的正常代谢有关; 5-HT 抑制上颚腺合成 10-HDA,并且显著影响细胞内肉碱棕榈酰转移酶(CPTs)。

关键词 蜜蜂;上颚腺; 10-羟基-2-癸烯酸; 转录组; 酰基辅酶 A 结合蛋白; 5-羟色胺; 肉碱棕榈酰转 移酶

The effect of ACBP and 5-HT on the synthesis of 10-hydroxy-2 decenoic acid

XIE Zi-Han^{**} ZHANG Xiao-Jing^{**} XIA Zhen-Yu LI Yun-Chang HAO Yue^{***} PENG Wen-Jun^{***}

(State Key Laboratory of Resource Insects, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract [Objectives] To explore the role of the ACBP protein and the amine signaling molecules 5-HT in the secretion of 10-HDA from the mandibular glands of *Apis mellifera*. **[Methods]** The treatment group of worker bees was fed *acbp* dsRNA to knockdown expression of the *acbp* gene, whereas the control group was fed sugar syrup. The morphology of the mandibular glands, transcriptome sequences, and the enrichment (KEGG and GO) of differentially expressed genes (*P*-adjust<0.05, DEGs) was compared between the treatment and control groups. The function of ACBP and 5-HT on the synthesis of 10-HDA in the mandibular gland was inferred based on the expression of the core gene in fatty acid and tryptophan metabolism according to transcriptome data, and the level of 10-HDA in the mandibular gland. **[Results]** Knockdown of *acbp* led to a significant, 20% decrease in 10-HDA. 488 DEGs were identified from the transcriptome data, most of which participated in fatty acid degradation, the PARP signaling pathway and multiple amino acid metabolism. Interestingly, altered DEG *amd* and *amdh* from

^{*}资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目(32072800); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2022) **共同第一作者 Co-first authors, E-mail: x18513977600@163.com; 15624955894@163.com

^{***}共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: pengwenjun@caas.cn; haoyue01@caas.cn

收稿日期 Received: 2023-04-06; 接受日期 Accepted: 2023-05-04

the tryptophan metabolic pathway may cause the accumulation of 5-HT. The feeding of exogenous 5-HT to nurse bees led to a significant, 30% decrease in 10-HDA in the mandibular gland. Exogenous 5-HT increased the mRNA expression level of the 5-HT1 $_{\times}$ 5-HT2 α_{\times} 5-HT2 β receptors in the mandibular gland, and significantly inhibited the expression of *cpt2* and *acbp3*. **[Conclusion]** ACBP influences the synthesis of unsaturated fatty acids in the mandibular gland through fatty acid degradation and amino acid metabolism. Tryptamine signaling molecules, such as 5-HT, are also involved in this metabolic process. 5-HT inhibits the synthesis of 10-HDA in the mandibular gland, and influences intracellular Carnitine palmitoyl transferase (CPTs).

Key words honeybee; mandibular gland; 10-hydroxy-2-decenoic acid; transcriptome; Acyl-CoA binding protein; 5-hydroxytryptamine; carnitine palmitoyl transferase

工蜂上颚腺的主要功能是分泌蜂王浆中的 脂肪酸,这些脂肪酸的含量占蜂王浆脂类物质组 成的 80%-90%,其中 10-羟基-2-癸烯酸 (10-Hydroxy-2-decenoic acid, 10-HDA)占脂 肪酸总量的一半以上(Sabatini *et al.*, 2009)。 10-HDA 是一种中短链羟基化不饱和脂肪酸,不 但是蜂群食物中的重要营养成分,还具有抑菌、 抗炎、免疫调节和抗肿瘤发生等活性,对人类健 康具有积极作用(Cornara *et al.*, 2017)。10-HDA 在自然界只有工蜂上颚腺可以合成,因此蜜蜂上 颚腺可能具有特殊的脂肪酸代谢调控机制。

同位素标记实验和组学比较分析结果揭示 工蜂上颚腺中不饱和脂肪酸的生物合成主要包 括以下几个重要步骤:乙酰辅酶 A 经过脂肪酸 从头合成和碳链延伸形成 18 碳的长链脂肪酸 (硬脂酸); 在 CYP450 的介导下, 硬脂酸的 ω 位发生羟基化反应;羟基化的硬脂酸通过不完全 β-氧化形成中短链羟基化脂肪酸;以及脂肪酸去 饱和 (Plettner et al., 1998; Malka et al., 2014)。 其中,中长链脂肪酸的活化和运输是上述过程的 关键步骤,即在酰基辅酶 A 的作用下将中长链 脂肪酸转化为脂肪酸酰基辅酶 A (LCACOAs), 并通过酰基辅酶 A 结合蛋白(Acyl-CoA binding protein, ACBP)运送到细胞内的特定细胞器进 行脂肪酸氧化等代谢过程(Yurchenko et al., 2009; Lei et al., 2010; Arya et al., 2013; Bouyakdan *et al.*, 2015) $_{\circ}$

ACBP,最初作为地西泮结合抑制因子 (Diazepam binding inhibitor,DBI)被发现 (Iversen, 1977),是一种广泛表达且在物种间 具有高度保守性的蛋白(Burton *et al.*, 2005; Bouyakdan et al., 2015)。ACBP 在细胞内发挥调 节脂质代谢的重要作用(Alquier et al., 2021)。 研究发现 ACBP 可有效阻止 LCACoAs 对线粒 体酰基辅酶 A 合成酶、乙酰辅酶 A 羧化酶等的 抑制作用,并且可以保护 LCACoA 免于水解, 充当 LCACoAs 的细胞内池形成器(Wang et al., 2021)。ACBP 也可以刺激酰基辅酶 A 的活性和 合成极长脂肪酸链(Gaigg et al., 2005)、神经酰 胺(Ferreira et al., 2017)和类固醇(Boujrad et al., 1993)。除了对脂肪酸合成的刺激, ACBP 还可 以将 LCACoAs 直接提供给肉碱棕榈酰转移酶 I (CPTI),从而增强线粒体 β-氧化(Hostetler et al., 2011)。哺乳动物细胞实验结果揭示 ACBP 的敲 低或敲除显著降低脂肪酸的氧化(Harris et al., 2014)。同时, 真核生物的 ACBP 还是一种非常 规分泌途径中的分泌蛋白(Anjard and Loomis, 2005; Bouyakdan et al., 2019)。作为神经肽前体, ACBP 的分泌响应自噬诱导条件和 TORC1 信号 抑制剂,分泌机制较依赖于细胞类型和功能 (Pedro et al., 2019)。显然 ACBP 的主要功能有 两方面,一是在脂质代谢中结合并运输中长链脂 肪酸酰基辅酶 A (Neess et al., 2015); 二是与 A 型 γ-氨基丁酸受体 (GABA_A)结合并置换苯二 氮卓类地西泮,在神经调控方面发挥作用 (Christian et al., 2013; Farzampour et al., 2015). 最近在昆虫中发现 ACBP 可能具有食欲刺激因 子的功能 (Pedro et al., 2019)。

本研究采用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)技术敲低上颚腺 *acbp* 的表达,并从腺体 形态,蜜蜂存活率,10-HDA 含量,差异基因的 功能等方面进行了系统分析。发现 ACBP 不但影

响上颚腺脂肪酸代谢的重要通路——PPAR 信号 通路和脂肪酸降解通路,还与多种氨基酸代谢相 关。有趣的是, acbp 的敲低促进了 5-HT 和色胺 等色氨酸衍生的信号分子合成。我们还发现外源 5-HT 的引入导致哺育蜂初期的 10-HDA 合成显 著下降,这可能与 CPT 和 ABCD 等线粒体和过 氧化物酶体的脂肪酸跨膜运输蛋白有关。

1 材料与方法

1.1 试验蜂种

意大利蜜蜂 Apis mellifera ligustica 来自中国 农业科学院蜜蜂研究所香山蜂场(东经 116°E, 北纬 40°N)。蜜蜂样品于 2021-2022 年的 5-8 月 取自中国农业科学院蜜蜂研究所香山蜂场的 3 个健康强群。

1.2 样品采集与制备

从 3 群意大利蜜蜂中取即将出房的封盖子 脾(每群取 2-3 张脾,刷掉子脾上的蜜蜂),置 入恒温恒湿培养箱中(温度 34.5 ℃,相对湿度 60%)。12 h后收集出房工蜂进行标记或者杯笼 饲养。杯养条件如下:每组处理准备 3-5 杯蜜蜂, 每杯饲养 50 只,培养箱条件同上。用注射器提 供足量的 50%的蔗糖溶液和蜂粮,每 3 d 天更换 蔗糖和蜂粮以保证食物新鲜。

dsRNA 饲喂:将 acbp 基因特异性 dsRNA (acbp-dsRNA)和非特异性 dsRNA(ns-dsRNA) 分别溶于 50%的蔗糖溶液中(dsRNA 终浓度为 60 µg/mL),从0日龄起杯养饲喂至 10 日龄,快 速将蜜蜂置于液氮中,并冻存在 - 80 ℃ 冰箱中 直至解剖取样。

5-HT 饲喂:用油漆笔在出房蜜蜂背部标记 并放回原蜂群。4 d 后收集标记的蜜蜂,并混合 分配到杯笼。将新鲜配备 5-HT 溶液稀释到 50% 的蔗糖溶液(5-HT 终浓度分别为 10 mmol·L⁻¹ 和 20 mmol·L⁻¹),在杯笼中饲喂培养蜜蜂。24 h 后收集蜜蜂样品:快速将蜜蜂置于液氮中,并冻 存在 - 80 ℃ 冰箱中直至解剖取样。

上颚腺的解剖:冰置蜡盘,用解剖针将蜜蜂

固定在蜡盘上。在体视显微镜下使用解剖镊子剥 离头部的几丁质外壳和触角,然后轻扯上颚,然 后从上颚根部取走上颚腺。

1.3 总 RNA 的提取和质量检测

采用 TRIzol 法对上颚腺的总 RNA 进行提 取。用 Nanodrop2000 (Thermo, USA) 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测,琼脂糖凝胶电泳 检测 RNA 完整性, Agilent2100 (Agilent Technologies, USA)测定 RIN 值。所有样品均 满足 OD260/280 > 2.0、OD260/230 > 1.8 及 RIN > 8.0。

1.4 转录组测序方法

文库构建和上机测序方法如下:使用 NEBNext[®] UltraTM RNA Library Prep Kit for Illumina[®](NEB, USA)进行构建:用带有 Oligo (dT)的磁珠与 mRNA 的 ployA 进行 A-T 配 对从而从总 RNA 中分离出 mRNA,用于分析 转录组信息。随后将 mRNA 片段化为 300 bp 左右的小片段,并以之为模板逆转录合成第一 链 cDNA,随后合成第二链。双链 cDNA 使用 AMPure XP beads 进行纯化。纯化的双链 cDNA 再经过末端修复、加 A 尾、连接测序接头和 PCR 富集,再用 2%琼脂糖凝胶回收目的条带。得 到的 cDNA 文库经过 TBS380 定量,按数据比 例混合上机,用 Illumina novaseq 6000 平台进 行测序。

测序数据质控和序列比对组装方法如下:原 始测序数据经过 fastp 软件过滤(去除接头序列, 去除序列末端低质量碱基,去除含 N 比率超过 10%的 reads,舍弃经过以上修剪后长度小于 50 bp 的序列),获得质控后数据。用软件 TopHat2 (http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml) 将质控后的数据与蜜蜂参考基因组(*Amel_ HAv3.1*)进行比对,获得后续分析的 mapped reads。 使用软件 Cufflinks(http://cole-trapnelllab.github. io/cufflinks/)将 mapped reads 进行组装拼接。

1.5 基因表达水平定量分析和差异分析

用软件 RSEM (http://deweylab.github.io/

RSEM/) 计算基因表达水平,衡量标准为 TPM (Transcripts per million)。用软件 Deseq2 (http://www.bioconductor.org/packages/release/bi oc/html/DESeq2.html)进行样本间基因的表达差 异分析(*P*-adjust<0.05)。

1.6 10-HDA 的检测

每种处理设置 8 个重复,每个重复包含 3 只 蜜蜂。将蜜蜂头部剪下收集到 1.5 mL 离心管, 加入 100 μL 0.03 mol·L⁻¹的盐酸和 200 μL 超纯 水。在冰上充分研磨后低温高速离心(12 000 r/min, 4 ℃) 15 min,将上清全部转移到 5 mL 容量瓶中。再用 1 mL 无水乙醇洗涤沉淀,再次 低温高速离心并充分转移上清到容量瓶。加无水 乙醇至刻度线附近,室温超声 15 min,待液体温 度降至室温后定容。样品经 0.22 μm 滤膜过滤后 上机检测。

用超高效液相色谱仪(Agilent 1290 Infinity Ⅱ) 串联三重四极杆(Agilent 6495B)(LC-MS)

对样品的 10-HDA 含量进行检测。采用 ZORBAX Eclipse XDB C18 column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm)进行色谱分离,流动相由乙腈和 0.1% 甲酸水溶液按照体积比 1:1 组成,流速为 0.5 mL/min。进样量为 5 μL, 10-HDA 的检测波 长为 210 nm。

1.7 荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR)

使用 NovoScript[®] Plus All-in-one 1st Strand cDNA synthesis SuperMix (gDNA Purge) (Novoprotein, China)试剂盒进行反转录得到 cDNA, 然后稀释 10 倍,取 1.5 μL 作为 qPCR 模板。qPCR 实验使用试剂盒 NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus (Novoprotein, China),每 个反应设 3 个技术重复。基因的表达量用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算 (Livak and Schmittgen, 2001)。使用 *β-actin*(LOC406122)做内参基因。荧光定量 PCR 所用引物序列见表 1。

	Table	1 Finners used in this experiment	
基因名称 Gene name	NCBI 库基因编号 Entrez ID	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增片段大小(bp) Product size (bp)
actin	406122	F: AGGAATGGAAGCTTGCGGTA	180
		R: AATTTTCATGGTGGATGGTGC	
Amd	410639	F: TGGGATCGAAGGTATCCAAA	172
		R: TCGATCGATAAGCTCCTTGG	
5-HT2α	411323	F: CGGAGAATATCGGCCGTGAA	168
		R: CCAACACCTTGCTGGCTTTC	
5-HT2β	552518	F: ACGTACTGAACGACACCGTC	237
		R: GCATTACAAGCACGGCTACG	
5-HT1	410435	F: TCGCGGTCGACAGATATTGG	191
		R: ATCCTGCGACACCAGACAAG	
<i>5-HT7</i>	726702	F: CCTGCATTAGTCTGCCACCA	219
		R: AATGGCTCTGCGCTCTTCTT	
aldh	550687	F: TGGATGCTTCTCAACGAGGT	155
		R: TCGCAATGTGGCTATACTGC	
srebp	413422	F: TCTGTTACACCAGCACCCAC	185
		R: ACTAACAGCTTGCGACCCTC	

表 1 本实验所用引物序列 Table 1 Primers used in this experiment

基因名称 Gene name	NCBI 库基因编号	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增片段大小(bp) Product size (bn)
ahcd1	411685	F• CACGCGCCACAATATGCACTA	183
wordd		R. AGTCCAACCACCTTCTCCATCG	100
abcd3	552495	F: TCTACATTCCTCAGCGTCCT	195
		R: CATCCCAACCTTGTCCTTCG	
<i>E75</i>	410309	F: GTGAACTCGTTGCGGTTGTC	238
		R: GTTTCTCCGAGTGGAGGGTG	
acbp	411272	F: AGCGTCAGATGCTGATTTGC	150
		R: GCATCTTGACTCATACCCTTCCT	
kat	724239	F: AGAAAGCTGTCCGGGAAGAA	176
		R: ACCTCCTCGAAGTGCAAGAA	
cpt1	550695	F: CTCCATCTCCTGTACGCCTCC	170
		R: TGCATCCGGTGACATTGAATT	
cpt2	411473	F: ATTAGATGATGTTTGTGTTGGCA	163
		R: AGCTACTCCATCTCCCCATGA	

续表 1 (Table 1 continued)

F: 上游引物; R: 下游引物。F: Forward primer; R: Reverse primer.

1.8 蛋白免疫印迹(Western blot)

将处理组和对照组每 10 只蜜蜂的上颚腺为 一个样品并用 TRIzol 法提取蛋白, 用 BCA 法检 测样品的蛋白浓度。取 15 µg 蛋白样品与等体积 蛋白上样缓冲液 (含 5%BME) 混合, 95 ℃加热 10 min 使蛋白变性, 然后晾至室温。使用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。用孔径为 0.45 μm 的 PVDF 膜湿法转膜:转膜缓冲液为含 20%甲醇的 Tris-glycine 溶液;转膜条件为 100 V, 15 min, 再 200 mA 恒定电流 30 min。转膜后先 用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1 h, 然后加入一抗(1:1000稀释)4℃过夜孵育。 用 TBST 缓冲液温和洗涤 10 min, 3 次, 然后加 入二抗(1:5000稀释)室温孵育1h。进一步 用 TBST 溶液洗涤 3 次,采用 ECL 显色液(普 利莱, P1020-25)显色,化学发光成像仪(Tanon, 5200)对其显像。实验中所用抗体信息如下: ACBP (ImmunoWay, YT0073); β -tubulin (Abcam, ab6046), HRP 抗体 (Proteintech, SA00001-2).

1.9 数据分析

对所得数据均先通过正态检验(Normality and lognormality tests)和成组配对 t 检验 (Independent samples t-test),所有数据均符合 高斯分布且方差均为齐性,数据具有统计学意 义。荧光定量计算采用qRT-PCR 计算公式2^{- $\Delta\Delta$ CT} (Livak 法)(Livak and Schmittgen, 2001),检 测结果(荧光定量,10-HDA,5-HT)的组间差 异分析采用 t检验进行显著性分析,P<0.05 表示 差异显著,P<0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 ACBP 参与工蜂上颚腺脂肪酸代谢

上颚腺中包括 10-HDA 在内的多种中短链 羟基化脂肪酸的合成主要包括 4 个过程,即棕榈 酸(碳链长度为 16)的从头合成和延伸为硬脂 酸(碳链长度为 18),硬脂酸的羟基化和羟基化 脂肪酸的不完全 β-氧化。脂肪酸活化为脂肪酸辅 酶 A 是脂肪酸代谢的必要步骤。其中,中长链 脂肪酸(碳链长度介于 14-22 之间)活化后需要 以 ACBP 为载体进行细胞内的输运。尤其是长链 脂肪酸氧化过程,需要 ACBP 和 CPT, ABCD 等蛋白的配合才能进入线粒体或过氧化物酶体 (图 1: A)。 *acbp* 基因在工蜂上颚腺的表达量在 出房蜂中最高(图 1: B)。

脊椎动物 ACBP 蛋白被分为三类: L型、T

型和 B 型(Burton et al., 2005)。果蝇基因组有 6 个 acbp 基因,蜜蜂基因组仅编码 1 个 acbp 基因 (LOC411272)。蜜蜂、人类、小鼠和果蝇 ACBP 蛋白序列一致性分析结果显示蜜蜂的 ACBP 与 哺乳动物的 B 型 ACBP 的蛋白序列更相近,氨 基酸位点的分析结果显示蛋白质稳定性位点和 配体结合位点在各物种中高度保守(图1:C)。





A. ACBP 参与工蜂上颚腺脂肪酸代谢; B. *acbp* 基因在出房蜂(NEB), 哺育蜂(NB)和采集蜂(FB)中的表达量。 FPKM 值:转录组测序分析结果(组学数据未发表); C. ACBP 的蛋白质序列功能位点。%:蛋白稳定性位点; #: 配体结合位点; *: 二者兼有。比对所用 ACBP 序列 ID 如下:蜜蜂 A.mel(XP_006564597.1);

人类 H.sap (L型: NP 001073331.1; B型: AAH29526.1); 黑腹果蝇 D.mel (1. NP 609187.1;

2. NP_729218.1; 3.NP_648083.1; 4. NP_648081.1; 5. NP_648255.1; 6. NP_648082.1 $)_{\circ}$

A. ACBP is involved in various steps of fatty acid biosynthesis, elongation and β-oxidation; B. Comparison of *acbp* gene expression in newly-emerged bees (NEB), nurse bees (NB) and forage bees (FB); C. ACBP protein sequence alignment. % represents for important for ACBP stability, # represents for ligand binding site, * represents for both. The sequence used for alignment are: A.mel: *Apis mellifera* (XP_006564597.1), H.sap: *Homo sapiens* (L-type: NP_001073331.1; B-type: AAH29526.1), D.mel: *Drosophila melanogaster* (1. NP_609187.1; 2. NP_729218.1; 3.NP_648083.1; 4. NP_648081.1; 5.NP_648255.1; 6. NP_648082.1).

2.2 敲低 acbp 抑制工蜂上颚腺 10-HDA 的合成

为探明 ACBP 在上颚腺 10-HDA 代谢中的 作用,本研究通过饲喂 acbp 特异性的双链 RNA

敲低 *acbp* 基因的表达量。上颚腺的形态学观察 结果显示与对照组(ctrl)和非特异性 dsRNA 处理组(ns)相比, *acbp* dsRNA 处理后的蜜蜂 的上颚腺变得更加透明和干瘪(图 2: A)。同 时 dsRNA 处理工蜂的存活率没有显著差异 *P>* 0.05 (图 2: B)。qPCR 和 Western blot 实验结 果显示 *acbp* 处理组的 *acbp* 基因表达和蛋白水平

显著降低(图 2: C, D)。进一步检测上颚腺的 代表性脂肪酸 10-HDA 的含量,发现敲低 *acbp* 基因后,10-HDA 含量显著降低约 20%(图 2: E)。



图 2 敲低 acbp 对上颚腺形态、工蜂存活率、ACBP 表达量以及 10-HDA 含量的影响 Fig. 2 The effects of acbp RNAi on the morphology of mandibular gland, the survival rate, the expression of acbp, and the content of 10-HDA of the worker bees

A. 解剖显微镜下腺体形态; B. 工蜂存活率分析; C. acbp 基因表达量的荧光定量 PCR 分析;
D. ACBP 蛋白水平的免疫印迹分析; E. 10-HDA 含量分析。ctrl: 对照, 50%蔗糖溶液; ns: 非特异性 dsRNA;
acbp: acbp 特异性 dsRNA。下图同。比例尺=1 mm。*表示 P<0.05, ** P<0.01 (t 检验)。
A. Mandibular gland morphology under anatomical microscope; B. Survival rate analysis of worker bees; C. Fluorescence

A. Manufoural grand morphology under anatomical interoscope, B. Survival face analysis of worker occs, C. Futorescence quantitative PCR analysis of *acbp* gene expression; D. Western blot analysis of ACBP protein; E. Content analysis of 10-HDA. ctrl: Control, 50% sucrose solution; ns: Nonspecific dsRNA; *acbp*: *acbp* specific dsRNA. Scale bar=1 mm. * P<0.05, ** P<0.01 (*t*-test). The same below.

2.3 转录组学结果揭示敲低 *acbp* 对上颚腺基因 表达的影响

为解析 acbp 基因对上颚腺脂肪酸代谢的影响,我们对饲喂 acbp dsRNA 的处理组(acbp)和对照组(ctrl)进行了转录组测序。转录组各样品 clean data 均达到 6.54 Gb 以上,Q30 碱基百分比在 92.8%以上,与参考基因组序列比对率从 93%到 95%不等。检测到表达基因 11 557 个。 基因表达量差异分析结果显示 acbp 处理组与对照组间的差异基因有 488 个(P-adjust<0.05),其中处理组相对于对照组上调两倍以上的有 152 个基因,下调两倍以上的有 40 个基因(P-adjust< 0.05,图3:A)。*acbp*的表达量在处理组中下调26%(*P*-adjust<0.01,图3:A)。

对差异基因(*P*-adjust<0.05)进行 GO 功能 注释分析,发现 *acbp*与 ctrl 组之间的差异基因 共富集到 35个 GO 条目上,包括生物过程 (Biological process, BP)类目 11条,细胞组 成(Cellular component, CC)类目 13条,分子 功能(Molecular function, MF)类目 11条。图 3(B)中显示每个分类下显著性排名前五的 GO 条目(FDR < 0.05)。为挖掘影响蜜蜂上颚腺脂 肪酸合成的关键调控因子,我们重点关注了"转 录因子活性"条目(图 3: B,下划线)。该条目 下共有 11 个基因编码转录因子(表 2),包括: C/EBP、COUP-TFII、RFX7、Dl、Pokkuri、Slp1、 Omb 、 DDB_G0282963 、 Cycle 、 Maf 、 XP_006562667.1(由 LOC100576878 编码,含有 基本亮氨酸拉链结构域 bzip)。其中 *RFX7、 dorsal*、LOC100576878 在 *acbp* 处理组中下调 (*P*-adjust< 0.05);其余 8 种转录因子的编码基 因在在 *acbp*处理组中显著上调(*P*-adjust< 0.05)。 根据 KEGG 通路的注释,Pokkuri 调控"背腹轴 形成";Pokkuri 和 Omb 参与 MAPK 信号通路; Dl 参与 TOLL 信号通路;Cycle 在"节律"调控 中发挥重要作用(表 2)。

通过 KEGG 功能富集分析,发现差异基因 映射到的通路中涉及"内分泌系统","脂质代 谢","氨基酸代谢"所占比例最高(至少6个差 异基因富集到该条目),主要通路包括"PPAR 信号通路","脂肪酸降解",以及氨基酸代谢通 路,如"缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解","精 氨酸和脯氨酸代谢"、"甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸 代谢","色氨酸代谢"等(图3:C)。其中"脂 肪酸降解"和"PPAR信号通路"是关于脂肪酸 代谢的重要通路。acbp 敲低后,"PPAR 信号通 路"上的脂肪酸活化(acsbg2, acs)、转运(acbp, fabp, fatp)、去饱和(delta11)、氧化(acadm) 等基因表达发生显著变化(表3)。"脂肪酸降 解"通路上的差异基因包括5个线粒体β氧化 基因,2个脂肪酸活化基因和一个乙醇代谢基因 (表4)。



图 3 acbp 基因敲低后上颚腺的差异基因功能分析

Fig. 3 Functional analysis of DEGs in the mandibular gland after the knocking-down of *acbp* gene

A. 基因表达量差异散点图。小窗展示了 acbp 基因的 FPKM 值; B. 差异基因的 GO 富集分析结果(其中"转录调控活性"条目用下划线指示); C. 差异基因的 KEGG 富集分析结果; D. 色氨酸代谢通路上的差异基因。
A. Scatter plot of DEGs. The small window showed the expression (FPKM) of acbp gene in treatment group and control group; B. GO enrichment analysis results of DEGs (underlined terms indicate transcriptional regulatory activity); C. KEGG enrichment analysis of DEGs; D. DEGS in tryptophan metabolism pathway.

基因编号 Gene ID	基因全名(转录因子) Gene name (transcriptional factor)	变化倍数 Fold change (acbp/ctrl)	显著性 <i>P</i> -adj	调控 Regulation
LOC411207	CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)	1.72	3.11×10^{4}	上调 Up
LOC408872	COUP transcription factor 2 (COUP-TFII)	2.12	1.34×10^{3}	上调 Up
LOC100576369	ets DNA-binding protein pokkuri, transcript variant X1(Pokkuri)	2.33	2.29×10^3	上调 Up
LOC726165	fork head domain transcription factor slp1, transcript variant $X1(\mbox{Slp1})$	2.09	8.97×10^{3}	上调 Up
LOC726842	optomotor-blind protein, transcript variant X1 (Omb)	1.73	2.84×10^4	上调 Up
LOC100577795	probable serine/threonine-protein kinase DDB_G0282963 (DDB_G0282963)	2.63	2.84×10^{4}	上调 Up
LOC725614	protein cycle, transcript variant X1 (Cycle)	1.59	7.18×10^4	上调 Up
LOC724861	transcription factor Maf, transcript variant X1 (Maf)	2.53	1.13×10^{3}	上调 Up
LOC724622	DNA-binding protein RFX7 (RFX7)	0.67	2.60×10^{2}	下调 Down
LOC406086	dorsal, transcript variant X3 (Dl)	0.71	1.32×10^{3}	下调 Down
LOC100576878	uncharacterized LOC100576878, transcript variant X1 (XP_006562667.1)	0.74	9.70×10^{3}	下调 Down

表 2 差异表达的转录因子 Table 2 Differently expressed transcription factors

表 3 PPAR 信号通路上的差异基因 Table 3 DEGs in PPAR signaling pathway

基因编号 Gene ID	基因全名(基因名) Gene name (symbol)	代谢过程 Metabolic process	变化倍数 Fold change (acbp/ctrl)	显著性 <i>P</i> -adj	调控 Regulation
LOC408567	probable medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (<i>acamd</i>)	脂肪酸β氧化 FAβ-oxidation	0.69	1.28×10^{3}	下调 Down
LOC411272	putative acyl-CoA-binding protein (acbp)	脂酰辅酶 A 转运 FA-acyl-CoA transporter	0.74	5.42×10^{3}	下调 Down
LOC408689	fatty acid binding protein, transcript variant X1 (<i>fabp</i>)	脂肪酸运输 FA transporter	0.55	3.51×10^4	下调 Down
LOC408564	long-chain fatty acid transport protein 4, transcript variant X2 (<i>fatp</i>)	脂肪酸运输 FA transporter	2.43	6.15×10^{10}	上调 Up
LOC409261	glycerol kinase, transcript variant X1 (gk)	甘油代谢 Glycerol metabolism	1.69	2.11×10^{2}	上调 Up
LOC412166	acyl-CoA Delta(11) desaturase, transcript variant X2 (<i>delta11</i>)	脂肪酸去饱和 FA desaturation	3.66	1.06×10^{11}	上调 Up
LOC551527	acyl-CoA Delta(11) desaturase, transcript variant X2 (<i>delta11</i>)	脂肪酸去饱和 FA desaturation	2.64	5.00×10^{14}	上调 Up
LOC551837	long-chain-fatty-acidCoA ligase ACSBG2, transcript variant X1 (<i>acsbg2</i>)	FA activation	2.46	3.86×10^{5}	上调 Up
LOC409515	long-chain-fatty-acidCoA ligase 4, transcript variant X1 (acs)	FA activation	1.58	4.96×10^{3}	上调 Up

FA: 脂肪酸 Fatty acid.

涉及"色氨酸代谢"的绝大多数差异基因在 acbp处理组中显著上调,包括 amd, kat, acat 和 gcdh (图 3: D,表 5)。 amd 显著上调 4.19 倍, *a m d* 的功能为促进色氨酸代谢为色胺 (Tryptamine)和 5-羟色胺(5-HT)。*kat*上调 3.54 倍,其促进色氨酸转化为犬尿喹啉酸

	基因编号 Gene ID	基因全名(基因名) Gene name (symbol)	代谢过程 Metabolic process	变化倍数 Fold change (acbp/ctrl)	显著性 <i>P-</i> adj	调控 Regulation
L	OC408567	probable medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (<i>acadm</i>)	β氧化 β-oxid. (1)	0.69	1.28×10^{3}	下调 Down
L	OC408291	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial (thiolase)	β氧化 β-oxid. (4)	0.64	4.32×10^{5}	下调 Down
L	OC411697	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (<i>acads</i>)	β氧化 β-oxid.(1)	0.76	3.25×10^{2}	下调 Down
L	OC550687	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (aldh2)	乙醇代谢 alcohol metab.	0.49	5.23×10^{6}	下调 Down
L	OC409515	long-chain-fatty-acidCoA ligase 4, transcript variant X1 (acs)	脂肪酸活化 FA activation	1.58	4.96×10^{3}	上调 Up
L	OC551837	long-chain-fatty-acidCoA ligase ACSBG2, transcript variant X1 (acsbg2)	脂肪酸活化 FA activation	2.46	3.86×10^{5}	上调 Up
L	OC410254	glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (gcdh)	β氧化 β-oxid.(1)	2.16	3.39×10^{2}	上调 Up
L	OC551395	acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic (acat2)	β氧化 β-oxid.(4)	1.69	8.83×10^{4}	上调 Up

表 4 脂肪酸降解通路上的差异基因 Table 4 DEGs in fatty acid degradation pathway

表 5 色氨酸代谢通路上的差异基因 Table 5 DEGs in Tryptophan metabolism pathway

基因编号 Gene ID	基因全名(基因名) Gene name (symbol)	变化倍数 Fold change (<i>acbp</i> /ctrl)	显著性 <i>P-</i> adj	调控 Regulation
LOC725529	kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial, transcript variant $X1(kat)$	2.04	9.03×10^{3}	上调 Up
LOC551395	acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic (acat2)	1.69	8.83×10^4	上调 Up
LOC410254	glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (gcdh)	2.16	3.39×10^2	上调 Up
LOC724239	kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial (kat)	3.54	1.94×10^{19}	上调 Up
LOC410639	alpha-methyldopa hypersensitive protein, transcript variant X1 (amd)	4.19	2.03×10^4	上调 Up
LOC550687	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (aldh)	0.49	5.23×10^{6}	下调 Down

(Kynurenate)和黄尿酸(Xanthurenate)。aldh 基因编码乙醛脱氢酶,可进一步将 5-HT 转化为 5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA),在 acbp 处理组上显 著下调 2 倍(图 3: D,表 5)。acat 和 gcdh 显著 上调约 2 倍,促进色氨酸代谢产生的中间体 3-羟基邻氨基苯甲酸(3-hydroxy-anthranilate)最 终代谢为乙酰辅酶 A,进入糖酵解途径(表 5)。

2.4 5-HT 抑制工蜂上颚腺脂肪酸代谢

由图3(D)结果推测,在acbp处理组中,

amd 基因的上调和 aldh 基因的下调可能导致 5-HT 的积累。5-HT 是色氨酸代谢的中间产物, 也是一种重要的信号分子。为验证 5-HT 是否影 响上颚腺脂肪酸代谢,我们收集哺育蜂初期(5 日龄),中期(8日龄)和中后期(12日龄)的 工蜂,分别饲喂含有 10 μmol·L⁻¹ 和 20 μmol·L⁻¹ 5-HT 的蔗糖溶液(以 50%蔗糖溶液为对照,12 日龄的工蜂只进行了对照和 20 μmol·L⁻¹ 的处 理),24 h 后收集样品检测上颚腺的 10-HDA 含 量(各组处理下工蜂的存活率为 100%)。如图 4 (A)所示,5日龄的工蜂经 5-HT 处理后, 10-HDA 含量分别显著下降 34.8%和 28.7% (*P*< 0.05);8日龄和 12日龄的工蜂经过 5-HT 处理 后,10-HDA 含量有下降趋势,但是没有达到显 著(*P*=0.14, *P*=0.38)。

为探明上颚腺的 5-HT 受体是否响应外源 5-HT 的刺激,我们检测了蜜蜂基因组编码的 5-HT 受体基因的表达量,包括 5-ht1、5-ht2α、 5-ht2β和 5-ht7。其中 5-ht1,5-ht2α和 5-ht2β的 基因表达在处理组中显著升高(P<0.05,图4: B);5-ht7 在对照组和处理组中的表达量极低 (CT>30,数据未显示)。

qPCR 结果说明 5-HT 处理后, *acbp*, *e75* 和 *srebp* 的表达量没有发生显著变化(图 4: C)。

我们进一步检测了位于线粒体外膜和内膜的 CPT1 和 CPT2 以及位于过氧化物酶体外膜的 ABCD1 (ATP-binding cassette, sub-family D member 1)和 ABCD3 (ATP-binding cassette, sub-family D member 3)的编码基因的表达。发 现在 5-HT 处理组中, *cpt1*和 *cpt2*的表达显著下 调; *abcd1*的表达显著上调,而 *abcd3*的表达显 著下调(图 4: C)。

此外,上颚腺色氨酸代谢通路上合成色胺和 5-HT 的关键基因 amd 上调,合成犬尿酸和黄 尿酸的 kat 下调(P-adjust<0.05)(图 4:D)。 aldh 基因编码的蛋白介导 5-HT 进一步衍生,在 5-HT 的刺激下,该基因表达发生显著下调(图 4:D)。





A. 5-HT 抑制哺育蜂初期的 10-HDA 的合成; B. 5-HT 激活工蜂上颚腺 5-HT 受体 5-ht1, 5-ht2α 和 5-ht2β 的表达; C. 5-HT 影响 cpt1, cpt2, abcd1 和 abcd2 的表达; D. 5-HT 促进 amd 表达,

抑制 aldh 和 kat 表达, *表示 P<0.05, ** P<0.01 (t 检验)。

A. 5-HT inhibited the 10-HDA production in young nurse bees; B. 5-HT receptor genes in mandibular gland were activated by the feeding of 5-HT; C. 5-HT affected the expression of *cpt1*, *cpt2*, *abcd1*, and *abcd3* significantly; D. 5-HT promoted the expression of *amd* and inhibited the expression of *aldh* and *kat*. * *P*<0.05, ** *P*<0.01 (*t*-test).

3 讨论

工蜂上颚腺的重要功能之一是合成以 10-HDA 为代表的中短链不饱和脂肪酸。一般认 为上颚腺的脂肪酸主要来自不完全β氧化,即长 链脂肪酸,一般认为是十八碳的硬脂酸,进入线 粒体或过氧化物酶体,通过脱氢、水合、再脱氢 和硫解达到碳链缩短。目前,上颚腺脂肪酸代谢 的调控机理还不清楚。ACBP 是真核生物细胞中 广泛存在的 LCACoA 结合蛋白, 在细胞内保护 和运输中长链脂肪酸,对脂肪酸氧化具有重要作 用。ACBP将 LCACoAs 从细胞质运送到线粒体 和过氧化物酶体外膜附近,促进其跨膜完成β氧 化(图1:A)。在工蜂上颚腺中, acbp 的转录水 平超过 90%的基因 (图 1:B), 且编码的蛋白序 列高度保守(图1:C)。在蜜蜂中,关于ACBP 在上颚腺脂肪酸代谢中发挥的作用还不清楚。本 研究通过饲喂 acbp 序列特异的 dsRNA, 敲低上 颚腺 acbp 的表达 (图 2: C), 从腺体形态和存 活率(图 2: A, B), 主要脂肪酸含量(图 2: D), 差异表达的基因(图3,图4;表2-表5)等方 面进行了系统分析(图2)。

为探明 ACBP 在上颚腺脂肪酸代谢过程中 的作用,我们对转录组进行了比较分析,发现 *acbp* 敲低后工蜂上颚腺有 488 个差异基因 (*P*-adjust < 0.05),包括9个差异显著的转录因 子(表 2)。有的转录因子在哺乳动物中调控脂 肪细胞分化(C/EBP)(Linhart *et al.*, 2001),调 控脂肪酸β-氧化(Coup)(Ashraf *et al.*, 2018), 调控脂质代谢的关键转录调控因子(Slp1) (Zhang, 2020),但在昆虫中还缺少相关的实验 依据。

从基因簇功能富集的角度来看,acbp的敲低 主要影响"脂肪酸降解通路","PPAR信号通路", 以及多种氨基酸代谢通路(图3:C)。在哺乳动 物中,PPAR(过氧化物酶体增殖物激活受体) 是由脂肪酸及其衍生物激活的核激素受体,可与 RXR形成异二聚体(Poulsen et al., 2012)。虽然 蜜蜂中该信号通路的注释仍然缺失,但已知蜜蜂 基因组编码与 PPAR/RXR 同源的异二聚体 E75/USP (Ament et al., 2012)。acbp 基因的敲低 导致 PPAR 信号通路中的很多基因差异表达,包 括 acbp, fatp, fabp, acsl, mcad 和 delta11 (表 3)。在哺乳动物中, acbp 的基础转录由 PPAR 和 SREBP 调控(Neess et al., 2006)。本研 究观测到 5-HT 的饲喂抑制哺育蜂上颚腺的 10-HDA 合成(图 4: A),但是没有发现 acbp 及其转录因子编码基因 srebp 和 e75 的显著变化 (图 4: C)。说明 5-HT 对上颚腺脂肪酸代谢的 影响可能通过除 PPAR 信号通路以外的其它 途径。

ACBP 向线粒体和过氧化物酶体传送 LCACoA,并协同 CPT 等膜蛋白帮助中长链脂 肪酸跨膜进入细胞器(Hostetler *et al.*, 2011)。本 研究将 *acbp* 敲低后,发现参与线粒体β-氧化的 第一步"脱氢"(ACADM, ACADS)以及第四 步"硫解"(Thiolase)的基因显著下调;乙醇代 谢相关的 ALDH 显著下调;脂肪酸活化基因 ACS 和 ACSBG2 显著上调(表 4)。ACS 和 ACSBG2 同时也被富集到"色氨酸代谢通路"(表 5),将 色氨酸衍生的 3-羟基邻氨基苯甲酸等分子进一 步代谢,进入糖酵解途径。以上结果说明 *acbp* 的敲低主要抑制线粒体而非过氧化物酶体的β-氧化,同时促进有机分子最终代谢产生 ATP。

根据代谢归宿,富集通路中涉及的9种氨基 酸中有6种充当葡萄糖形成的糖异生的前体(缬 氨酸,精氨酸,脯氨酸,甘氨酸,丝氨酸和苏氨 酸);一种可分解形成酮体(亮氨酸);两种既可 生糖又可生酮,包括异亮氨酸和色氨酸。说明 *acbp* 基因的抑制对氨基酸来源的能量代谢产生 了较大影响。

除了构成蛋白质,动植物中某些氨基酸还作为信号分子发挥作用,例如丝氨酸, 伽马氨基 丁酸(GABA),苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸 (Häusler *et al.*, 2014)。丝氨酸作为信号分子主 要调控细胞增殖(Benstein *et al.*, 2013; Locasale and Jason, 2013)。GABA 是神经递质抑制剂,与 特定受体结合发挥信号传导作用(Olsen and Sieghart, 2008)。携带苯环的氨基酸,如苯丙氨 酸,酪氨酸,色氨酸是信号分子前体。苯丙氨酸 经衍生产生新木脂素脱氢二松柏醇葡糖苷 (DCG),在植物中发挥细胞分裂素的作用;羟 基肉桂酰胺(HCAA)的合成源自胺与苯丙素类 对香豆酸的汇集,参与植物防御反应(Liu et al., 2022),且在发育过程中充当信号分子(Facchini et al., 2002)。本研究发现 acbp 基因的抑制导致 "色氨酸代谢通路"上 amd, kat 等基因表达上调, 可能促进色氨酸衍生为次级化合物 5-HT,色胺 等信号分子(图3:D)。

昆虫 5-HT 作为信号分子调节多种生理和行 为过程 (Blenau and Thamm, 2011)。在蜜蜂 (Lai et al., 2020)、蚂蚁(Josens et al., 2021)及蟋蟀 (Cooper and He, 1994)等多种昆虫中发现 5-HT 调节进食相关过程。在蜜蜂和果蝇中发现脑部注 射 5-HT 影响攻击性,睡眠,节律和学习记忆等 (Blenau and Thamm, 2011)。5-HT 在昆虫中的 不同作用由各种受体亚型介导。在工蜂上颚腺 中,我们发现 5-HT1, 5-HT2_α和 5-HT2_β受体响 应 5-HT 饲喂 (图 4B), 而 5-HT7 受体的表达量 极低(qPCR CT>30, 数据未显示)。各种受体 功能与它们对 G-蛋白的偏好有关: 5-ht1 受体偏 好 Gi/o 蛋白, 抑制 cAMP 的合成, 而 5-ht2 受体 偏好 Gq/11 蛋白促进胞内钙离子水平(Blenau and Thamm, 2011)。在哺乳动物中已经发现 5-HT 调 控肝脏, 白色脂肪细胞, 灰色脂肪细胞的脂类代 谢以及肌肉的糖类代谢(Martin et al., 2017; Choi et al., 2020), 在昆虫中, 已知神经肽类信 号分子,例如 ILP 和 AKH,是影响脂类代谢的 重要信号分子(Toprak et al., 2020)。研究揭示 5-HT 可能影响昆虫的脂类代谢基因 (Alves-Bezerra et al., 2010), 但是否作为胺类信 号分子调控脂类代谢,还没有相关报导。本研究 揭示了工蜂上颚腺的 3 种 5-HT 受体响应外源 5-HT 信号 (图 4: B), 并观察到该信号分子对 哺育峰初期的上颚腺脂肪酸合成发挥抑制作用 (图 4: A), 笔者推测 5-HT 对上颚腺脂肪酸代 谢的调控可能不是通过 ACBP 及其相关调控基 因,而是与位于线粒体外膜和内膜的 ACBP 的协 同蛋白 CPT 有关 (图 4: C)。关于 ACBP 是否 与过氧化物酶体外膜蛋白协同作用还没有文献 报导,但我们的实验结果表明 ABCD 的编码基 因在 5-HT 的影响下发生了显著变化(图 4: C)。 此外外源 5-HT 的引入诱导 5-HT 合成基因 amd 表达上调,降解基因 aldh 和犬尿酸,黄尿酸的 合成基因表达下调(图 4: D)。结合以上分析我 们推测外源 5-HT 可能进一步引起上颚腺细胞内 5-HT 的积累,形成正反馈信号。本文为研究胺 类信号分子在昆虫脂质代谢中的调控作用提供 了依据,相关的分子机理有待进一步验证。

参考文献 (References)

- Alquier T, Christian-Hinman CA, Alfonso J, Frgeman NJ, 2021. From benzodiazepines to fatty acids and beyond: Revisiting the role of ACBP/DBI. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 32(11): 890–903.
- Alves-Bezerra M, Majerowicz D, Grillo L, Tremonte H, Almeida CB, Braz G, Sola-Penna M, Paiva-Silva GO, Gondim KC, 2010. Serotonin regulates an acyl-CoA-binding protein (ACBP) gene expression in the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 40(2): 119–125.
- Ament SA, Wang Y, Chen CC, Blatti CA, Hong F, Liang ZS, Negre N, White KP, Rodriguez-Zas SL, Mizzen CA, 2012. The transcription factor ultraspiracle influences honey bee social behavior and behavior-related gene expression. *PLoS Genetics*, 8(3): e1002596.
- Anjard C, Loomis WF, 2005. Peptide signaling during terminal differentiation of Dictyostelium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(21): 7607–7611.
- Arya R, Sundd M, Kundu S, 2013. Structural and functional aspects of Acyl-coenzyme A binding proteins (ACBPs): A comprehensive review. *Journal of Proteins and Proteomics*, 3(1): 61–71.
- Ashraf UM, Sanchez ER, Kumarasamy S, 2018. COUP-TFII revisited: Its role in metabolic gene regulation. *Steroids*, 141: 63–69.
- Benstein RM, Ludewig K, Wulfert S, Wittek S, Gigolashvili T, Frerigmann H, Gierth M, Flugge UI, Krueger S, 2013. arabidopsis phosphoglycerate dehydrogenase1 of the phosphoserine pathway is essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *The Plant Cell*, 25(12): 5011–5029.
- Blenau W, Thamm M, 2011. Distribution of serotonin (5-HT) and its

receptors in the insect brain with focus on the mushroom bodies: Lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arthropod Structure & Development*, 40(5): 381–394.

- Boujrad N, Hudson JR, Papadopoulos V, 1993. Inhibition of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured Leydig tumor cells by a cholesterol-linked phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to diazepam-binding inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(12): 5728–5731.
- Bouyakdan K, Martin H, Liénard F, Budry L, Taib B, 2019. The gliotransmitter ACBP controls feeding and energy homeostasis via the melanocortin system. *Journal of Clinical Investigation*, 129(6): 2417–2430.
- Bouyakdan K, TaïB B, Budry L, Zhao S, Rodaros D, Neess D, Mandrup S, Faergeman NJ, Alquier T, 2015. A novel role for central ACBP/DBI as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 133(2): 253–265.
- Burton M, Rose TM, FæRgeman NJ, Knudsen J, 2005. Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). *Biochemical Journal*, 392(2): 299–307.
- Choi W, Moon JH, Kim H, 2020. Serotonergic regulation of energy metabolism in peripheral tissues. *Journal of Endocrinology*, 245(1): R1–R10.
- Christian C, Herbert A, Holt R, Peng K, Sherwood K, Pangratz-Fuehrer S, Rudolph U, Huguenard J, 2013. Endogenous positive allosteric modulation of GABAA receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron*, 78(6): 1063–1074.
- Cooper PD, He PH, 1994. Control of foregut contraction in the black field cricket, *Teleogryllus commodus* Walker (Gryllidae, Orthoptera). *Journal of Insect Physiology*, 40(6): 475–481.
- Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B, 2017. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 412.
- Facchini PJ, Hagel JM, Zulak KG, 2002. Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Botany*, 80(6): 577–589.
- Farzampour Z, Reimer RJ, Huguenard J, 2015. Endozepines. Advances in Pharmacology (San Diego, Calif), 72: 147–164.
- Ferreira NS, Engelsby H, Neess D, Kelly SL, Volpert G, Merrill AH, Futerman AH, Faergeman NJ, 2017. Regulation of very-long acyl chain ceramide synthesis by acyl-CoA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 292(18): 7588.
- Gaigg B, Timischl B, Corbino L, Schneiter R, 2005. Synthesis of

sphingolipids with very long chain fatty acids but not ergosterol is required for routing of newly synthesized plasma membrane ATPase to the cell surface of yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23): 22515–22522.

- Harris FT, Rahman S, Hassanein M, Qian J, Hoeksema M, Chen H, Eisenberg R, Chaurand P, Caprioli RM, Shiota M, 2014. Acyl-coenzyme A-binding protein regulates Beta-oxidation required for growth and survival of non-small cell lung cancer. *Cancer Prevention Research*, 7(7): 748–757.
- Häusler RE, Ludewig F, Krueger S, 2014. Amino acids-A life between metabolism and signaling. *Plant Science*, 229: 225– 237.
- Hostetler HA, Dan L, Tan Y, Dai J, Kelzer MS, Martin GG, Woldegiorgis G, Kier AB, Schroeder F, 2011. Acyl-CoA binding proteins interact with the acyl-CoA binding domain of mitochondrial carnitine palmitoyl transferase I. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 355(1/2): 135–148.
- Iversen L, 1977. Anti-anxiety receptors in the brain? *Nature*, 266(5604): 678–678.
- Josens R, Giacometti A, Giurfa M, 2021. Inhibition of serotonergic signaling induces higher consumption of both sucrose solution and toxic baits in carpenter ants. *Scientific Reports*, 11(1): 1–10.
- Lai Y, Elodiesandoz JC, Songkunsanchez, Maria Gabriela De Britogiurfa M, 2020. Degradation of an appetitive olfactory memory via devaluation of sugar reward is mediated by 5-HT signaling in the honey bee. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173(1): 107278.
- Lei OL, Klett EL, Coleman RA, 2010. Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(3): 246–251.
- Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ, 2001. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22): 12532–12532.
- Liu S JJ, Ma Z, Et Al, 2022. The role of hydroxycinnamic acid amide pathway in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 13: 922119.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 25(4): 402–408.
- Locasale JW, 2013. Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle. *Nature Reviews Cancer*, 13(8):

572-583.

- Malka O, Niño E, Grozinger CM, Hefetz A, 2014. Genomic analysis of the interactions between social environment and social communication systems in honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 47(1): 36–45.
- Martin AM, Young RL, Leong L, Geraint B, Spencer, NJ, Jessup CF, Keating DJ, 2017. The diverse metabolic roles of peripheral serotonin. *Endocrinol*, 158(5): 1049–1063.
- Neess D, Bek S, Engelsby H, Gallego SF, FæRgeman NJ, 2015. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: Role of acyl-CoA binding proteins. *Progress in Lipid Research*, 59: 1–25.
- Neess D, Kiilerich P, Sandberg MB, Helledie T, Nielsen R, Mandrup S, 2006. ACBP —a PPAR and SREBP modulated housekeeping gene. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 284(1/2): 149–157.
- Olsen RW, Sieghart W, 2008. GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1): 141–148.
- Pedro BS, Sica V, Martins I, Pol J, Kroemer G, 2019. Acyl-CoA-binding protein is a lipogenic factor that triggers food intake and obesity. *Cell Metabolism*, 30(4): 754–767.
- Plettner E, Slessor K, Winston M, 1998. Biosynthesis of mandibular acids in honey bees (*Apis mellifera*): De novo synthesis, route of fatty acid hydroxylation and caste selective β-oxidation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(1): 31–42.

- Poulsen LLC, Siersbk M, Mandrup S, 2012. PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 23(6): 631–639.
- Sabatini AG, Marcazzan GL, Caboni MF, Bogdanov S, Almeida-Muradian L, 2009. Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1): 1–6.
- Toprak U, Hegedus D, Doan C, Güney G, 2020. A journey into the world of insect lipid metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 104(10): e21682.
- Wang J, Wang W, Wei Q, Zhang J, Zhang M, Wang C, Wang Y, Qu R, Yang G, 2021. A ratiometric fluorescent biosensor reveals dynamic regulation of long-chain fatty acyl-CoA esters metabolism. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(25): 13996–14004.
- Yurchenko OP, Nykiforuk CL, Moloney MM, Ståhl U, Banaś A, Stymne S, Weselake RJ, 2009. A 10-kDa acyl-CoA-binding protein (ACBP) from Brassica napus enhances acyl exchange between acyl-CoA and phosphatidylcholine. *Plant Biotechnology Journal*, 7(7): 602–610.
- Zhang X, 2020. Study on the function of acyl coenzyme A binding protein (ACBP) and its regulatory factor SLP2 at the maternal fetal interface. Doctoral dissertation. Chongqing: Chongqing Medical University. [张雪, 2020. 脂酰辅酶 A 结合蛋白 (ACBP)及其调控因子 SLP2 在母胎界面的功能研究. 博士 学位论文. 重庆: 重庆医科大学.]