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 *amd*，*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、5-HT2α、5-HT2β 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）。

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 $mmol \cdot L^{-1}$ 和 20 $mmol \cdot L^{-1}$），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® Ultra™ 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/bioc/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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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。

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 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	
5-HT7	726702	F：CCTGCATTAGTCTGCCACCA	219
		R：AATGGCTCTGCGCTCTTCTT	
aldh	550687	F：TGGATGCTTCTCAACGAGGT	155
		R：TCGCAATGTGGCTATACTGC	
srebp	413422	F：TCTGTTACACCAGCACCCAC	185
		R：ACTAACAGCTTGCGACCCTC	

续表 1 (Table 1 continued)

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)
abcd1	411685	F：CACGCGCCACAATATGCACTA	183
		R：AGTCCAACCACCTTCTCCATCG	
abcd3	552495	F：TCTACATTCCTCAGCGTCCT	195
		R：CATCCCAACCTTGTCCTTCG	
E75	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	

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∶1 000 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∶5 000 稀释）室温孵育 1 h。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）。

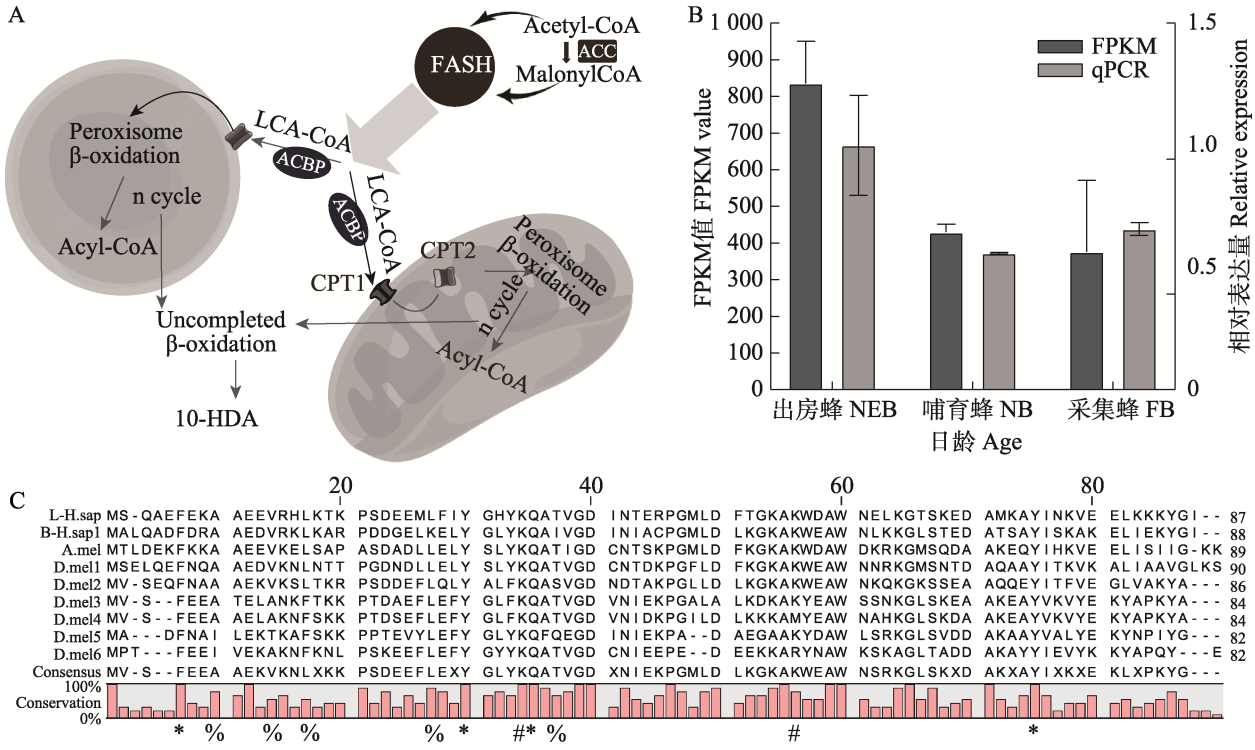

图 1　ACBP 脂肪酸代谢及蛋白序列功能位点分析

Fig. 1　Analysis of ACBP fatty acid metabolism and protein sequence functional sites

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）。

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）。

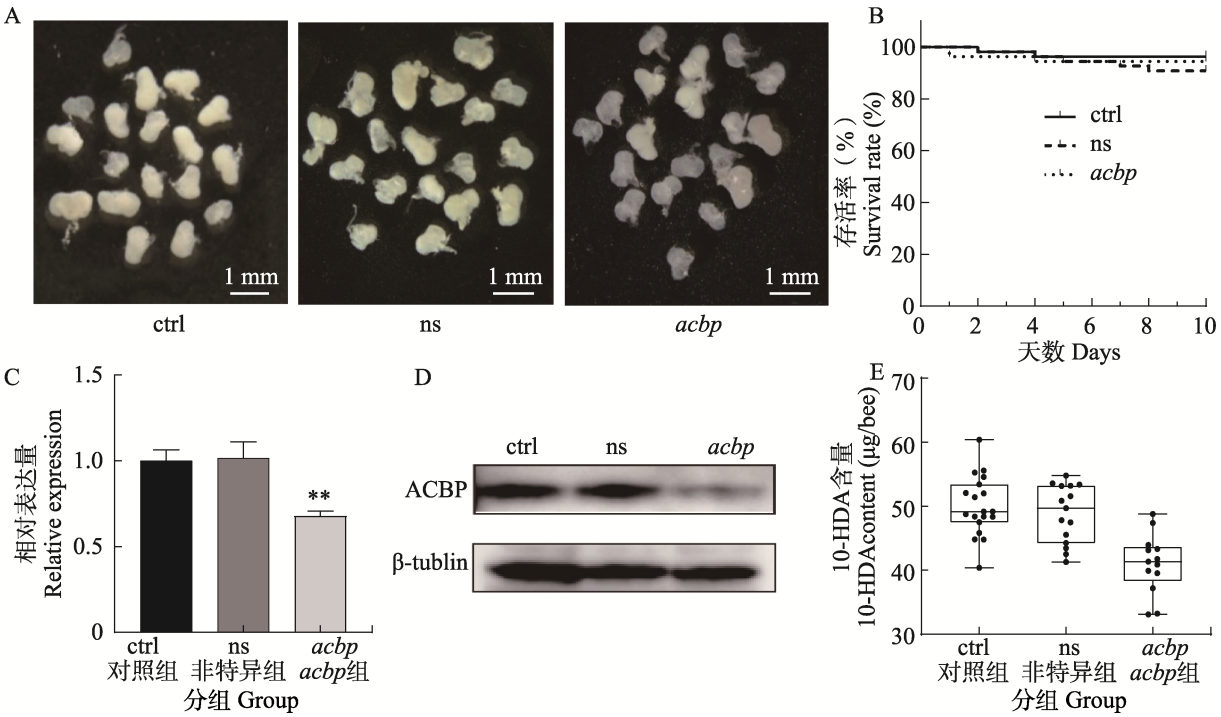

图 2　敲低 *acbp* 对上颚腺形态、工蜂存活率、ACBP 表达量以及 10-HDA 含量的影响

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 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）。

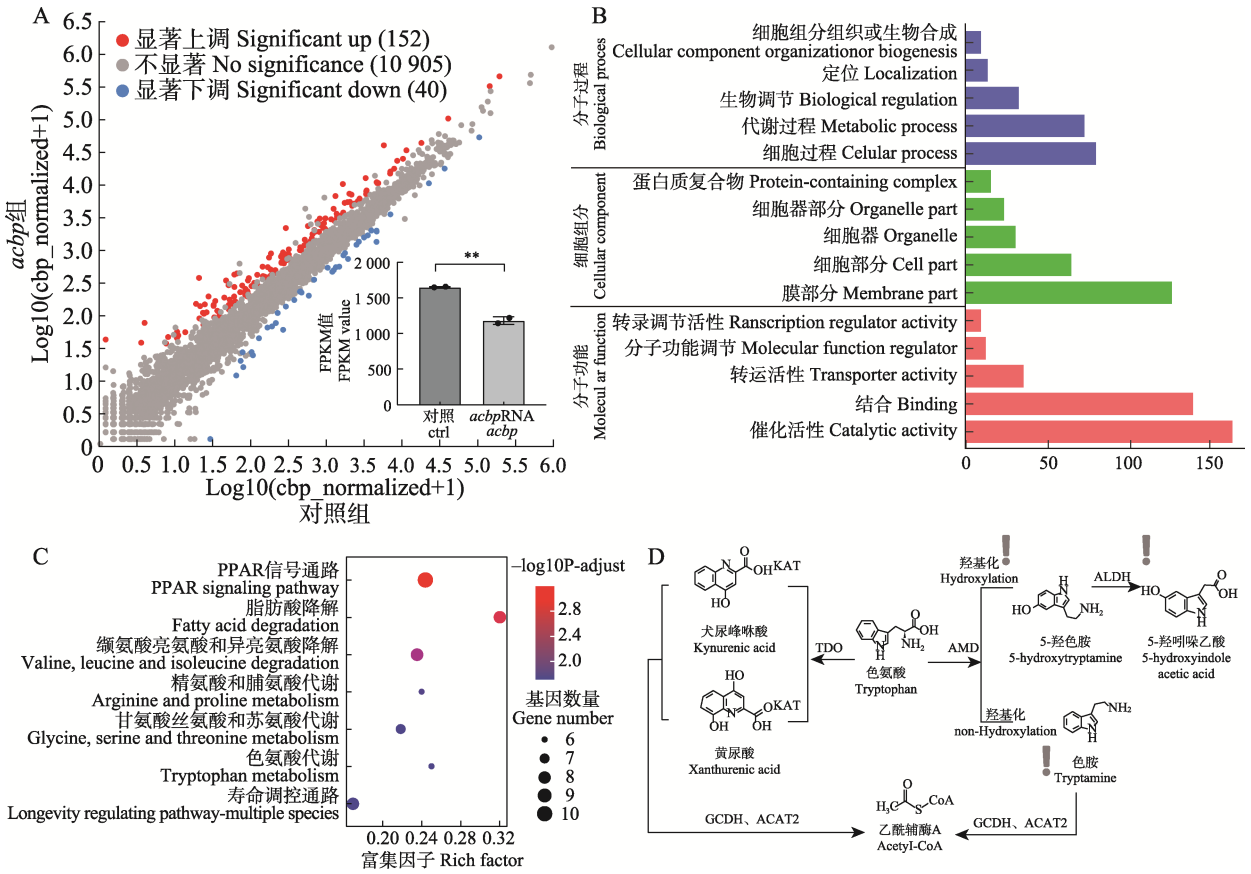

图 3　*acbp* 基因敲低后上颚腺的差异基因功能分析

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.

表 2　差异表达的转录因子

Table 2　Differently expressed transcription factors

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 *P*-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(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 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 *P*-adj	调控 Regulation
LOC408567	probable medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (*acamd*)	脂肪酸 β 氧化 FA β-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 (*fabp*)	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（*fatp*)	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 (*delta11*)	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 (*delta11*)	脂肪酸去饱和 FA desaturation	2.64	5.00×10^{14}	上调 Up
LOC551837	long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2, transcript variant X1 (*acsbg2*)	FA activation	2.46	3.86×10^{5}	上调 Up
LOC409515	long-chain-fatty-acid--CoA 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，*amd* 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

表 4 脂肪酸降解通路上的差异基因

Table 4 DEGs in fatty acid degradation 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 *P*-adj	调控 Regulation
LOC408567	probable medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (*acadm*)	β 氧化 β-oxid.（1）	0.69	1.28×10^{3}	下调 Down
LOC408291	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial (*thiolase*)	β 氧化 β-oxid.（4）	0.64	4.32×10^{5}	下调 Down
LOC411697	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (*acads*)	β 氧化 β-oxid.（1）	0.76	3.25×10^{2}	下调 Down
LOC550687	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial (*aldh2*)	乙醇代谢 alcohol metab.	0.49	5.23×10^{6}	下调 Down
LOC409515	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4, transcript variant X1 (*acs*)	脂肪酸活化 FA activation	1.58	4.96×10^{3}	上调 Up
LOC551837	long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2, transcript variant X1 (*acsbg2*)	脂肪酸活化 FA activation	2.46	3.86×10^{5}	上调 Up
LOC410254	glutaryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (*gcdh*)	β 氧化 β-oxid.（1）	2.16	3.39×10^{2}	上调 Up
LOC551395	acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic (*acat2*)	β 氧化 β-oxid.（4）	1.69	8.83×10^{4}	上调 Up

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 (*acbp*/ctrl)	显著性 *P*-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）。

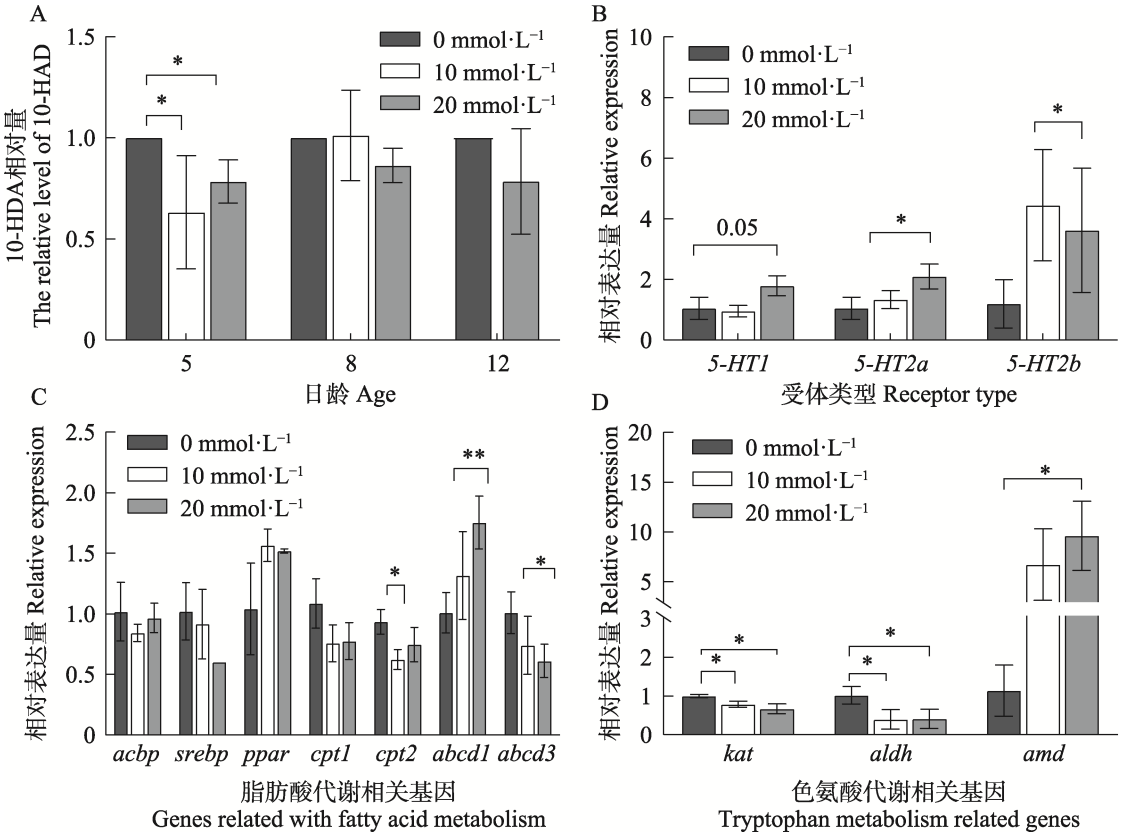

图 4　5-HT 对工蜂上颚腺脂肪酸代谢和色氨酸代谢的影响

Fig. 4　The effect of 5-HT on the fatty acid metabolism in the mandibular gland of worker bees

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$_{\alpha}$ 和 5-HT2$_{\beta}$ 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.]