意大利蜜蜂 *amPFK* 基因的克隆与表达分析*

郑相相** 徐文凯 刘丽霞 欧阳霞辉***

（西北民族大学，生命科学与工程学院，兰州 730030）

摘 要 【**目的**】本研究旨在明确意大利蜜蜂磷酸果糖激酶（*amPFK*）基因的序列特征及表达模式，为进一步研究 *amPFK* 在生殖和发育中的功能奠定理论基础。【**方法**】采用 RT-PCR 技术克隆了 *amPFK* 基因，并对其氨基酸序列和蛋白结构进行了分析；通过 RT-qPCR 检测了 *amPFK* 基因在意大利蜜蜂不同品级不同发育时期的表达模式。【**结果**】克隆获得了意大利蜜蜂 *amPFK* 的全长 cDNA 序列，其中开放阅读框（ORF）2 486 bp，编码 757 个氨基酸。序列分析表明，*amPFK* 在进化过程中具有较高的保守性，可能存在两个磷酸果糖激酶结构域；*amPFK* 蛋白主要由 α-螺旋构成，是一个稳定的亲水性蛋白，具有 1 个可能的互作蛋白 Vha44。表达模式显示，*amPFK* 基因在意大利蜜蜂不同品级、不同发育时期的表达量差异显著(P<0.05)；雄蜂、蜂王不同时期 *amPFK* 的表达量均呈现出先升高后降低再升高的趋势，羽化成虫后表达量最高；不同品级的幼虫第一日龄 *amPFK* 的表达量明显较高，而且羽化成虫后蜂王和雄蜂的表达量明显高于工蜂。【**结论**】意大利蜜蜂 *amPFK* 在蜂王、雄蜂的幼虫初期和成虫期的高表达量可能与其胚后发育初期和生殖发育中细胞增殖的能量代谢有关。

关键词 意大利蜜蜂；磷酸果糖激酶；分子特征；表达模式；生殖调控

Cloning and expression of the *amPFK* gene in *Apis mellifera*

ZHENG Xiang-Xiang** XU Wen-Kai LIU Li-Xia OUYANG Xia-Hui***

(College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Abstract **[Objectives]** To provide a theoretical basis for research on the function of the *amPFK* gene in *Apis mellifera*. [**Methods**] The cDNA sequence of the *amPF*K gene was cloned by RT-PCR, and its amino acid sequence and protein structure analyzed using bioinformatic methods. RT-qPCR was used to detect the expression of the *amPFK* gene in different castes and developmental stages of *A. mellifera*. [**Results**] The open reading frame (ORF) of the *amPFK* gene is 2 486 bp, encoding 757 amino acids. Sequence analysis indicates that *amPFK* has been highly conserved, and may have two phosphate fructose kinase domains. The *amPFK* protein is mainly composed of an α-helix, which is a stable hydrophilic protein that may interact with Vha44. RT-qPCR indicated that expression of the *amPFK* gene is significantly different in different castes and developmental stages. The expression of *ampfk* in different drone and queen age classes tended to first increase, decrease, then increase. Expression was highest in adults. Among larvae of different ages expression of *ampfk* was significantly higher in one day-old larvae, and expression in queens and drones was significantly higher than that in workers. **[Conclusion]** The relatively high expression of *amPFK* in the early larval and adult stages of queens and drones may be related to the energy metabolism associated with cell proliferation in the early stages of postembryonic and reproductive development.

Key words *Apis mellifera*; phosphofructokinase; molecular characteristics; expression pattern; reproductive regulation

*资助项目 Supported projects：国家自然基金项目（31660628）；甘肃省自然基金项目（1606RJZA058）；西北民族大学研究生科研创新项目（Yxm2019141）

**第一作者 First author，E-mail：2578958063@qq.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：oyxhui316@126.com

收稿日期 Received：2019-12-17；接受日期 Accepted：2020-05-28

磷酸果糖激酶（Phosphofructokinase，PFK）是糖酵解途径（EMP）中的关键酶与限速酶（Chitlaaru and Pick and Pick，2001）。PFK 有两个类型：PFK-1 和 PFK-2，可将 6-磷酸果糖分别催化为 1,6-二磷酸果糖和 2,6-二磷酸果糖。PFK-1 有 3 种亚型，每种亚型在机体不同器官内以组成方面有差异的四聚体形式存在。PFK 与己糖激酶、丙酮酸激酶所催化的反应同为 EMP 途径中 3 个不可逆反应，在 EMP 调节中起主要作用（郑集和陈钧辉，2007）。PFK 属于磷酸果糖激酶 B（PfkB）类糖激酶（Shirakihara and Ebans，1988）。

研究发现，*PFK* 基因的过表达可使 6-磷酸果糖激酶酶活力提高两倍左右(从 7.1 U/OD_{600} 增到 14.5 U/OD_{600})，对糖酵解的速度有很大的影响（Maria and Nicholaos，2011）。磷酸果糖激酶亚型中 PFK-1 与恶性肿瘤关系最密切，在很多肿瘤组织中，通过改变 PFK-1 的活性来调节糖酵解途径的强弱（邹志伟，2016）。脂酰辅酶 A 与 PFK1 结合进而促进肿瘤的糖酵解来满足肿瘤细胞的能量需求（Enkins *et al.*，2011）。核氧化还原蛋白 NRX 能与 PFK1 相互作用，能直接与 PFK1 结合促进肿瘤的糖酵解（Funato *et al.*，2013）。运动员可通过调节 PFK 活性来调控糖酵解能量供应能力（隋波，2014）。PFK2 可通过影响 2，6-二磷酸果糖水平实现对糖酵解通路调节，以满足肿瘤细胞增殖对能量的快速需求（Liu and Kong，2012）。目前 *PFK* 在哺乳动物中能量代谢方面的研究较多，而在昆虫中的相关研究较少，膜翅目昆虫尤其缺乏。对果蝇的研究发现，*PFK* 也与果蝇生殖发育过程中的细胞增殖的能量代谢有关（Luo *et al.*，2003）。蜜蜂作为一种资源共享、精细分工、信息高度交流的社会群体（曾志将，2020），有其重要的研究意义，我国有着丰富的蜜蜂蜂种多样性（张炫等，2012），故而本研究以意大利蜜蜂为研究对象，对其 *amPFK* 基因进行了克隆和生物信息学分析，并通过 qPCR 检测了该基因在意大利蜜蜂不同品级不同发育阶段的表达谱，明确了 *amPFK* 的分子结构特征和表达模式，以期为初步阐明 *amPFK* 参与意大利蜜蜂生殖发育的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

意大利蜜蜂采自甘肃省兰州市五泉王氏养蜂场，采样如下：工蜂取第 2 天的卵，第 3 天孵化期幼虫，幼虫期第 5、7、9、11 天的幼虫，蛹期的预蛹、白眼蛹、红眼蛹，羽化成虫；雄蜂取第 2 天的卵，第 3 天孵化期幼虫，幼虫期第 4、6、8、10、12 天的幼虫，蛹期的预蛹、白眼蛹、红眼蛹，羽化成虫；蜂王取第 2 天的卵，第 3 天孵化期幼虫，幼虫期第 4、5、6、7 天的幼虫，蛹期的预蛹、白眼蛹、红眼蛹，羽化成虫。

Trizol 购自 Invitrogen 公司；反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、克隆载体 pMD18-T、大肠杆菌 DH5α 感受态细胞、TB Green Premix Ex Taq II（Tli RNaseH Plus）均购自大连宝生物工程公司；胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自索莱宝（北京）有限公司；引物合成和 DNA 序列测定由生工生物工程（上海）股份有限公司完成；其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 采用 Trizol 法提取意大利蜜蜂的总 RNA（秦秋红，2013），通过反转录试剂盒 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 按照说明将 RNA 反转录成 cDNA。根据 GenBank 中 PFK 已有同源序列（XM_016914361.1），利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物（表 1），以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为：上游、下游引物各 0.2 μL，EX Taq 酶 5 μL，模板 0.5 μL，最后用 ddH_2O 补足至 10 μL。PCR 反应程序为：95 ℃预变性 5 min，98 ℃变性 10 s，52 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 180 s，共 30 个循环，72 ℃延伸 10 min，4 ℃保存。经琼脂糖凝胶鉴定的目的片段利用胶回收试剂盒回收，且与 pMD18-T 载体连接，转化至 Ecoli DH5α，接种于 LB 平板培养基上培养后，挑斑、摇菌，经 PCR 扩增验证目的基因的片段大小，提取重组质粒 pMD18-T-amPFK，送至生工生物工程（上海）股份有限公司测定，将正确的序列提交至 GenBank。

表 1　引物序列
Table 1　Primer sequences for different PCR

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
amPFK	pfk(F)	ATGAATGCAGCAGTTCGAGCA
	pfk(R)	AACGATACGTGTGTGCATGA
amPFK	q-pfk(s)	TGACCCGTCTGAAAGCAC
	q-pfk(a)	TTCCGTCACAAATACCATAAAC
amβ-actin	qβ-actin-2F	TGCCAACACTGTCCTTTCTG
	qβ-actin-2R	AGAATTGACCCACCAATCCA

1.2.2　序列分析　采用 ORF finder 搜索开放阅读框，翻译成氨基酸序列。采用 DNAStar 进行序列同源性比对，通过 MEGA5.0 软件基于 NJ 法构建系统进化树。采用 Protparam 和 ProtScale 分析 *amPFK* 的理化性质；采用 Interpro 预测 *amPFK* 的结构域；利用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 预测 *amPFK* 结构；采用 Antibody Epitope Prediction 预测 B 细胞抗原表位；采用 STRING 预测互作蛋白。

1.2.3　实时荧光定量 PCR 分析意大利蜜蜂表达模式　以意大利蜜蜂 *β*-actin（登陆号：NM_001185146.1）为内参基因（引物序列见表 1），使用伯乐荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR 检测。以意大利蜜蜂不同品级不同时期样品的 cDNA 为模板，每个样品设 3 个重复。实时荧光定量 PCR 反应体系（20 μL）为：TB Green Premix Ex Taq II（Tli RNaseH Plus）（2×）10 μL，上下引物各 0.8 μL，cDNA 2 μL，RNase Free H_2O 6.4 μL；反应程序为：95 ℃预变性 1 min，95 ℃变性 10 s，58 ℃退火 30 s，40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行基因相对表达量计算，应用 SPSS 21 进行单因素方差分析和多重比较，并利用 GraphPad Prism 7 软件绘图。

2　结果与分析

2.1　*amPFK* 基因的克隆

经 RT-PCR 扩增，最终获得一条 2 486 bp 的目的条带（图 1），经克隆测序，比对鉴定，确定是意大利蜜蜂 *PFK* 基因序列，命名为 *amPFK*，将序列提交 GenBank，登录号为：MK713970。该序列包含一个 2 274 bp 的开放阅读框，编码一个由 757 个氨基酸组成的蛋白质。

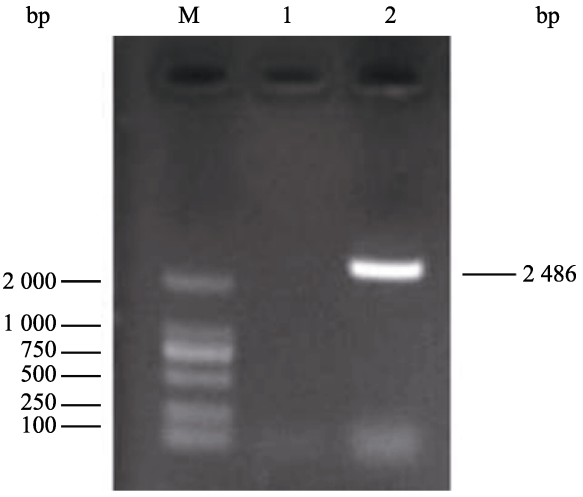

图 1　意大利蜜蜂 *amPFK* PCR 扩增结果
Fig. 1　PCR amplification of *amPFK* gene in *Apis mellifera*

M：2000 Marker；1：阴性对照；
2：*amPFK* 基因的 PCR 产物。
M: 2000 Marker; 1: Negative control;
2: PCR product of *amPFK* gene.

2.2　*amPFK* 理化性质分析

理化性质分析表明，意大利蜜蜂与中蜂、美洲东部熊蜂及欧洲熊蜂的 PFK 蛋白氨基酸组成基本一致，都是较稳定的亲水性蛋白，含量最多的氨基酸均为 Gly，是一种非必需氨基酸，在体内由葡萄糖转变生成。

2.3　*amPFK* 序列比对分析

序列同源性比对结果显示，意大利蜜蜂

amPFK 基因与中蜂 *Apis cerana*（XM_017065122.1）、美洲东部熊蜂 *Bombus impatiens*（XM_012391619.2）、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*（XM_012312901.2）、回条蜂 *Habropoda laboriosa*（XM_017935298.1）、造纸胡蜂 *Polistes dominula*（XM_015329664.1）、印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*（XM_011142331.3）、嗜凤梨果蝇 *Drosophila_ananassae*（XM_001956408.2）的 *PFK* 基因的序列相似度分别为 86.9%、85.5%、85.1%、81.5%、79.1%、34.2%、33.4%，可见 *amPFK* 基因与中蜂 *PFK* 基因的序列相似度最高，其次是美洲东部熊蜂、欧洲熊蜂、回条蜂、造纸胡蜂，最后是印度跳蚁和嗜凤梨果蝇。

利用 MEGA6.0，基于 NJ（Neighbor-Joining）法对已报道的昆虫 *PFK* 序列进行系统发育分析，结果显示，意大利蜜蜂与中蜂的亲缘关系最近，并与其它几种蜜蜂聚成一个大类，与印度跳蚁和嗜凤梨果蝇的关系比较远，这与物种的实际进化历程相符，说明 *PFK* 基因在进化过程中非常保守（图 2）。

2.4 结构域及二级结构

Interpro 预测显示，*amPFK* 在第 1-294、379-663 位点的氨基酸处分别存在着一个磷酸果糖激酶结构域（图 3）。SOPMA 预测 *amPFK* 二级结构，其中 α-螺旋（Alpha helix）占 45.18%、β-转角（Beta turn）占 7.00%、延伸链（Extended strand）占 16.51%、无规卷曲（Random coil）占 31.31%。α-螺旋、β-转角化学键键能比较高，不易变性，能够维持蛋白的高级结构，稳定蛋白。意大利蜜蜂 *amPFK* 二级结构中 α-螺旋占主要部分，推测 amPFK 蛋白为一个较稳定蛋白。

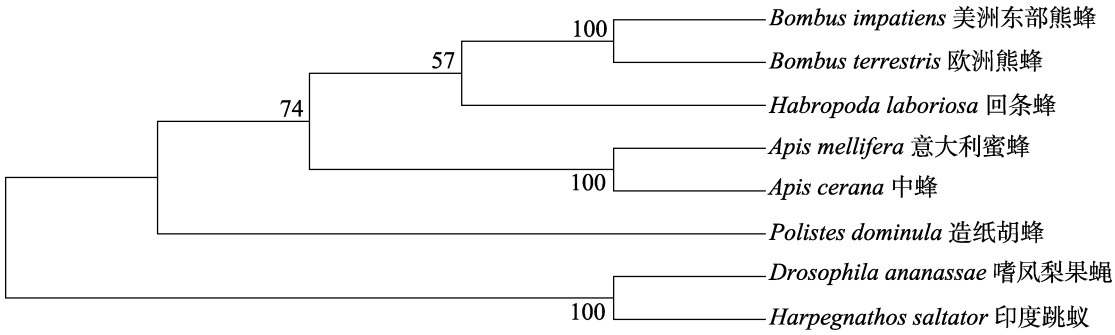

图 2 基于意大利蜜蜂 amPFK 与其他昆虫 PFK 氨基酸序列的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of amPFK from *Apis mellifera* and PFK from other insects

图 3 预测的 *amPFK* 蛋白结构域

Fig. 3 Predicted domains in the *amPFK* protein

2.5 三级结构

通过 SWISS MODEL 软件以 4xz2.1.B 为模板对 amPFK 进行三级结构的同源建模，结果如图 4 所示，由 α-螺旋构成主要结构，模型呈四面体形，由 N 端和 C 端 2 个结构相近的区域组成，每个区域包含 1 个 PFK 结构域，底物果糖-6-磷酸结合于 N 端结构域。Antibody Epitope Prediction 预测显示，*amPFK* 有 35 个 B 细胞抗原表位，其中有 7 个比较显著（图 4，图 5）。B 细胞抗原表位为亲水性肽段，一般位于抗原三维大分子的氨基酸长链折叠处，说明 amPFK 蛋白是一个亲水性蛋白。

2.6 *amPFK* 互作蛋白分析

使用 STRING 数据库构建 *amPFK* 的蛋白互作网络，结果显示有 1 个预测的功能蛋白 Vha44 与 *amPFK* 相互作用（图 6）。

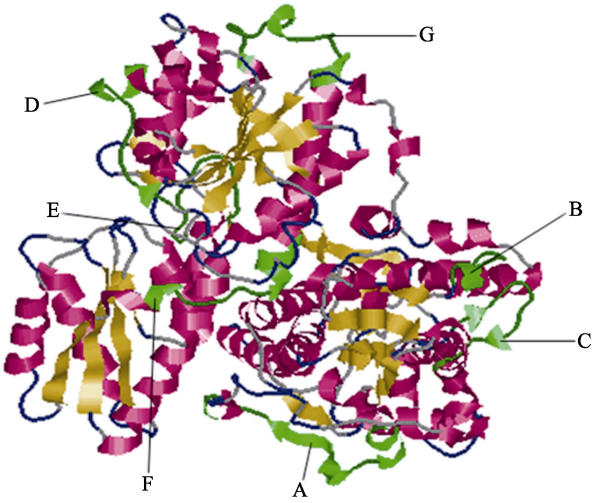

图 4　意大利蜜蜂 amPFK 蛋白三级结构
（绿色部分为 B 细胞抗原表位）

Fig. 4　Tertiary structure of amPFK protein in *Apis mellifera* (Green parts show the epitope of B cell antigen)

A：27-42 位氨基酸；B：203-212 位氨基酸；
C：237-247 位氨基酸；D：445-456 位氨基酸；
E：506-516 位氨基酸；F：640-651 位氨基酸；
G：668-683 位氨基酸。

A: 27-42 amino acids; B: 203-212 amino acids;
C: 237-247 amino acids; D: 445-456 amino acids;
E: 506-516 amino acids; F: 640-651 amino acids;
G: 668-683 amino acids.

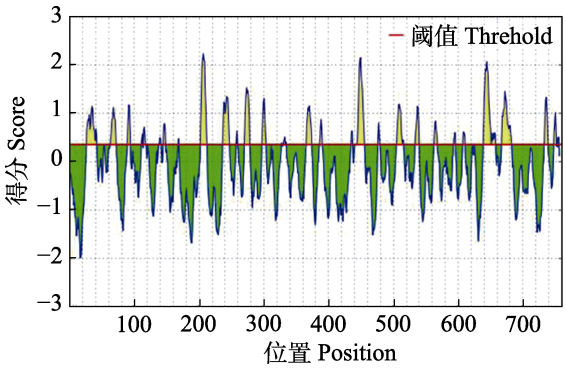

图 5　amPFK 蛋白 B 细胞抗原表位分析

Fig. 5　Analysis of B cell antigen epitopes of amPFK protein

图 6　预测的 *amPFK* 的互作蛋白

Fig. 6　Predicted interaction protein of *amPFK*

2.7　实时荧光定量 PCR

amPFK 基因在不同品级不同发育时期都有表达，且有显著差异(P<0.05)。工蜂羽化成虫时表达量基本稳定；雄蜂、蜂王在卵期、幼虫期、蛹期、成虫期的表达量均呈现出先升高后降低再升高的趋势，羽化成虫后表达量最高（图 7）。不同品级不同发育时期比较发现，*amPFK* 基因在不同品级的幼虫第一日龄的表达量明显较高，而且羽化成虫后蜂王和雄蜂明显高于工蜂（图 8）。

3　讨论

生物体的生长、繁殖等生命活动都需要消耗能量，其大部分由 ATP 提供，而糖代谢是最主要的 ATP 生成途径。糖异生的逆反应是糖酵解（杨康丽等，2016）。糖酵解途径中最重要的限速酶是磷酸果糖激酶。磷酸果糖激酶可以被 ATP 抑制，被 AMP 激活（Garrett and Kim，2012）。在有氧条件下，正常细胞通过线粒体呼吸链的氧化磷酸化获取能量，在缺氧时主要依赖糖酵解途径，而肿瘤细胞即使在有氧条件下也主要通过糖酵解获取能量，因此称为“有氧糖酵解”。磷酸果糖激酶几个亚型中 *PFK*-1 与恶性肿瘤关系最密切（Weber，1977）。*PFK*-1 在一些肿瘤组织中的表达显著增强，在肿瘤细胞的糖酵解和细胞增殖方面发挥重要作用（Zancan *et al.*，2010；Moon *et al.*，2011）。

目前，关于 *PFK* 的研究主要集中在哺乳动物肿瘤细胞等方面，而在蜜蜂等昆虫中的研究较少。本研究克隆得到了意大利蜜蜂 *amPFK* 基因，序列全长 248 6 bp，编码 757 个氨基酸。同源分析表明，*amPFK* 与其他昆虫，特别是与中蜂 *PFK* 具有较高的序列相似性，说明 *amPFK* 在进化过程中具有较高的保守性。*amPFK* 中 α-螺旋、β-转角占 52.18%，α-螺旋、β-转角化学键键能比较高，不易变性，能够维持蛋白的高级结构，稳定蛋白；B 细胞抗原表位为亲水性肽段，一般位于抗原三维大分子的氨基酸长链折叠处，*amPFK* 有 35 个 B 细胞抗原表位，并且亲水系数为 - 0.141，由此推测 *amPFK* 蛋白是一个稳定的亲

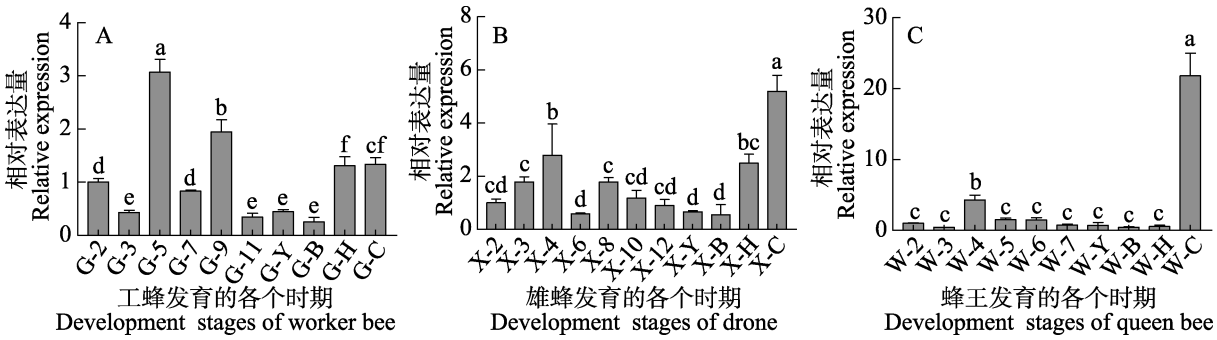

图 7 *amPFK* 基因不同品级不同发育时期的相对表达

Fig. 7 Relative expression quantity of the *amPFK* gene in different grades and different developmental stages of *Apis mellifera*

A. *amPFK* 基因在工蜂不同发育时期的相对表达；B. *amPFK* 基因在雄蜂不同发育时期的相对表达；C. *amPFK* 基因在蜂王不同发育时期的相对表达。

G-2，G-3：为工蜂 2、3 日龄卵期；G-5，G-7，G-9，G-11：工蜂 5、7、9、11 日龄幼虫期；G-Y：预蛹；G-B：白眼蛹；G-H：红眼蛹；G-C：成虫。X-2，X-3：雄蜂 2、3 日龄卵期；X-4，X-6，X-8，X-10，X-12：雄蜂 4、6、8、10、12 日龄幼虫期；X-Y：预蛹；X-B：白眼蛹；X-H：红眼蛹；X-C：成虫。W-2，W-3：蜂王 2、3 日龄卵期；W-4，W-5，W-6，W-7：蜂王 4、5、6、7 日龄幼虫期；W-Y：预蛹；W-B：白眼蛹；W-H：红眼蛹；W-C：蜂王成虫。柱上标有不同字母表示经单因素方差分析差异显著（P<0.05，Duncan 氏多重比较法）。

A. Relative expression of *amPFK* gene in different developmental stages of worker bee; B. Relative expression of *amPFK* gene in different developmental stages of drone; C. Relative expression of *amPFK* gene in different developmental stages of queen bee.

G-2, G-3: Egg stage of 2 and 3 days old; G-5, G-7, G-9, G-11: Larval stage of 5, 7, 9, 11 days old; G-Y: Prepupa; G-B: White eye pupa; G-H: Red eye pupa; G-C: Adult stage; X-2, X-3: Drones 2, 3 days old egg stage; X-4, X-6, X-8, X-10; X-12: Drones 4, 6, 8, 10, 12 days old larva stage; X-Y: Prepupa; X-B: White eye pupa; X-H: Red eye pupa; X-C: Adult stage. W-2, W-3: Queen bees 2, 3 days old egg stage; W-4, W-5, W-6, W-7: Queen bees 4, 5, 6, 7 days old larva stage; W-Y: Prepupa; W-B: White eye pupa; W-H: Red eye pupa; W-C: Adult stage. Histograms with different letters indicate significant difference in variance analysis of single factors (P<0.05, Duncan's multiple comparison).

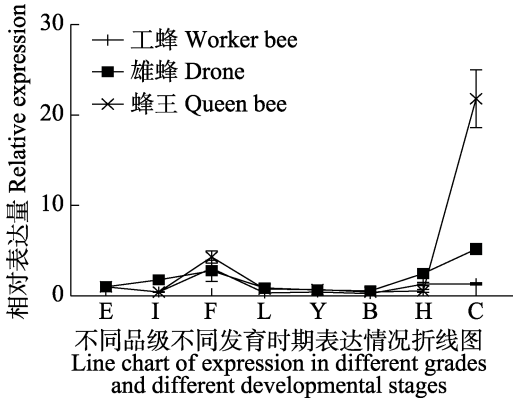

图 8 *amPFK* 基因在意大利蜜蜂不同品级不同发育时期表达情况折线图

Fig. 8 Line chart of *amPFK* gene expression in different grades and different developmental stages of *Apis mellifera*

E：卵期；I：孵化期；F：幼虫第一日；L：幼虫最后一日；Y：预蛹；B：白眼蛹；H：红眼蛹；C：成虫。

E: Egg stage; I: Incubation stage; F: The first day of the larva; L: The last day of the larva; Y: Prepupa; B: White-eyed pupa; H: Red-eyed pupa; C: Adult.

水性蛋白。*amPFK* 单体具有 2 个磷酸果糖激酶结构域，这与其它物种一致，在细菌、酵母和哺乳动物中以同源四聚体的形式存在，每种单体都有两个相似的结构域。以成虫果蝇翅膀上皮细胞为体内模型系统，证明了 C 亚基果蝇同源基因 Vha44 的过度表达在翅膀上皮细胞中引起肿瘤样组织转化（Petzoldt *et al.*，2013）。过表达细胞被排除在上皮之外，并具有侵袭性，同时表现出较高的凋亡率，阻断这些细胞的凋亡，就会增强细胞增殖，导致过度生长（Petzoldt *et al.*，2013）。本研究预测到 Vha44 可能是 *amPFK* 的互作蛋白，推测 *PFK* 可能与细胞增殖有关。

amPFK 基因在不同品级不同生长发育时期都有表达，但在每个品级的幼虫初期的表达都显著升高，这与果蝇 *PFK* 突变导致海藻糖水平升高，进一步证明 *PFK* 在幼体期碳水化合物分解代谢中具有重要作用的结果一致（Tennessen

et al.，2011），碳水化合物代谢的增加不是为了产生 ATP，而是促进氨基酸、脂类和核苷酸的合成，从而支持细胞增殖，所以从卵期到幼虫初期 *amPFK* 基因的高表达可能与这一时期细胞增殖的能量代谢密切相关。

研究证实，哺乳动物生殖发育中细胞增殖的能量代谢方式与肿瘤细胞的一样，但前者只是为了生殖细胞的正常发育。雄蜂与蜂王在羽化成虫后 *amPFK* 基因的表达水平都显著高于其它发育时期，而且明显高于工蜂，结合哺乳动物 *PFK* 在肿瘤细胞增殖的能量代谢方面发挥重要作用的结果，我们推测 *PFK* 在意大利蜜蜂生殖蜂的高表达可能与哺乳动物一样，主要与卵巢和精巢发育过程中细胞增殖的能量代谢有关，本研究结果能够为进一步研究 *amPFK* 在生殖发育中的功能奠定理论基础。

参考文献 (References)

Chitlaaru E, Pick U, 2001. Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in dunaliella. *Plant Physiology*, 96(1): 50–60.

Enkins CM, Yang J, Sims HF, Gross RW, 2011. Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by acy1-CoA: A mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism. *J. Biol. Chem.*, 286(14): 11937–11950.

Funato Y, Hayashi T, Irino Y, Takenawa T, Miki H, 2013. Nucleoredoxin regulates glucose metabolism via phosphofructokinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 440(4): 737–742.

Garrett RG, Kim JC, 2012. Outcomes measures for patients with facial nerve injury. *Operative Techniques in Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 23(4): 306–316.

Liu J, Kong QP, 2012. Variation of genes related to energy metabolic pathway and adaptive evolution of tumor cells. *Zoological Research*, 33(6): 557–565.

Luo J, Sladke R, Carrier J, Bader JA, Richard D, Giguere V, 2003. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α. *Molecular and Cellular Biology*, 23(22): 7947–7956.

Maria P, Nicholaos A, 2011. Lactococcus lactis as a cell factory: A twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2): 197–202.

Moon JS, Kin HE, Koh E, Park SH, Jin WJ, Park BW, Park SW, Kim KS, 2011. Kruppel-like factor 4(KLF4) activates the transcription of the gene for the platelet isoform of phosphofructokinase (PFKP) in breast cance. *J. Biol. Chem*., 286(27): 23808–23816.

Petzoldt AG, Gleixner EM, Fumagalli A, Vaccari T, Simons M, 2013. Elevated expression of the V-ATPase C subunit triggers JNK-dependent cell invasion and overgrowth in a *Drosophila epithelium*. *Dis. Model. Mech*., 6(3): 689–700.

Qin QH, 2013. Comparison of learning and memory between oriental honeybee and western honeybee and analysis of molecular mechanism related to learning and memory of honeybee. Master dissertation. Nanchang: *Jiangxi Agricultural University*. [秦秋红, 2013. 东方蜜蜂与西方蜜蜂学习记忆比较及蜜蜂学习记忆相关分子机理分析. 硕士学位论文. 南昌: 江西农业大学.]

Shirakihara Y, Evans PR, 1988. Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol*., 204(4): 973–994.

Sui B, 2014. Study on the effect of sports training on the activities of serum phosphofructose kinase and isocitrate dehydrogenase in elite athletes. Sports Physiology and Biochemistry Branch of Chinese Sports Science Society. Proceedings of 2014 Chinese academic Conference on Sports Physiology and Biochemistry. Sports Physiology and Biochemistry Branch of Chinese Sports Science Society. Guiyang. 208–209. [隋波, 2014. 运动训练对优秀运动员血清磷酸果糖激酶、异柠檬酸脱氢酶活性影响的研究. 2014 年中国运动生理生化学术会议论文集. 中国体育科学学会运动生理与生物化学分会. 贵阳. 208–209.]

Tennessen JM, Baker KD, Lam G, Evans J, Thummel CS, 2011. The drosophila estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell Metabolism*, 13(2): 139–148.

Weber G, 1977. Enzymology of cancer cells (second of two parts). *New England Journal of Medicine*, 296(10): 541–551.

Yang KL, Yu ZJ, Li JJ, Kan QC, 2016. Metabolic mechanism of malignant tumor based on Warburg effect. *Henan Medical Research*, 25(3): 467–468. [杨康丽, 余祖江, 李晶晶, 阚全程, 2016. 以 Warburg 效应为轴心的恶性肿瘤代谢机制. 河南医学研究, 25(3): 467–468.]

Zheng J, Chen JH, 2007. General Biochemistry. The Third Edition. Beijing: Higher Education Press. 377–378. [郑集, 陈钧辉, 2007. 普通生物化. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社. 377–378.]

Zou ZW, 2016. NOS1 regulates the glycolysis of ovarian cancer cells promoted by PFK1. Master dissertation. Guangzhou: *Southern Medical University*. [邹志伟, 2016. NOS1 调控 PFK1 促卵巢癌细胞糖酵解的研究. 硕士学位论文. 广州: 南方医科大学.]

Zancan P, Sola-Penna M, Furtado CM, Silva DD, 2010. Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(4): 372–378.

Zhang X, Chen YP, He SY, 2012. Advances in honeybee virology. *Journal of Applied Entomology*, 49 (5): 1095–1116. [张炫, 陈彦平, 和绍禹, 2012. 蜜蜂病毒学研究进展. 应用昆虫学报, 49(5): 1095–1116.]

Zeng ZW, 2020. Research progress of honeybee biology in China in the past 70 years. *Journal of Applied Entomology*, 57(2): 259–264. [曾志将, 2020. 中国 70 年来蜜蜂生物学研究进展. 应用昆虫学报, 57(2): 259–264.]