

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.11.015

果蝇脂肪体中 *Piwi* 影响生长发育的新功能鉴定

李广莹, 肖桂然, 吴磊, 闫永平, 纪晓雯, 金礼

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要: *Piwi* (P-element induced wimpy testis) 是一类与生殖相关的蛋白, 主要在生殖系统中表达, 对生殖细胞的形成和维持 DNA 的完整性及稳定性十分重要, 但在其他器官和组织中的功能尚不清楚。文章利用模式生物果蝇进行研究, 发现降低 *Piwi* 在脂肪体中的表达导致果蝇的羽化率、生长周期和寿命出现问题, 并且脂肪体的功能受到严重影响, 说明脂肪体内表达的 *Piwi* 蛋白对于果蝇生长发育是必须的。进一步的研究表明, 在脂肪体细胞内敲低 *Piwi* 基因引起活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的大量产生, 干扰脂肪体细胞的储存功能, 进而影响果蝇的生长发育。该研究为鉴定 *Piwi* 在脂肪体的新功能提供了新思路, 并且对相关疾病的治疗具有重要价值。

关键词: 果蝇; *Piwi* 基因; 脂肪体; 活性氧 (ROS)

中图分类号: Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2023)11-1532-04

Identification of new functions of *Piwi* affecting growth and development in fat body of *Drosophila melanogaster*

LI Guangying, XIAO Guiran, WU Lei, YAN Yongping, JI Xiaowen, JIN Li

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: P-element induced wimpy testis (*Piwi*) is a kind of reproduction-related protein, which is mainly expressed in the reproductive system and plays a very important role in the formation of germ cells and the maintenance of DNA integrity and stability. However, the functions of *Piwi* protein in other systems are still unclear. In this paper, the model organism, *Drosophila melanogaster*, was used for exploration, and it was found that the reduced expression of the *Piwi* in the fat body led to problems in emergence rate, growth cycle and life span of *Drosophila melanogaster*, and the function of the fat body was seriously affected, indicating that the expression of *Piwi* protein in the fat body was necessary for the growth and development of *Drosophila melanogaster*. Further studies showed that the knockdown of *Piwi* gene in fat body caused a large amount of reactive oxygen species (ROS), which interfered with the storage function of fat body cells, thus affecting the growth and development of *Drosophila melanogaster*. This study provides a new way to identify the new function of *Piwi* in the fat body and is valuable for the treatment of related diseases.

Key words: *Drosophila melanogaster*; *Piwi* gene; fat body; reactive oxygen species (ROS)

Piwi (P-element induced wimpy testis) 属于 Argonaute 蛋白家族, 特异性表达于生殖细胞中^[1], 通过与 piRNA (Piwi-interacting, RNA) 进行结合, 形成 piRNA 沉默复合物 (piRNA-in-

duced silencing complex, piRISC), 以维持基因组中转座子的正常沉默状态, 防止转座子爆发而引起相应基因的改变, 对生殖细胞的发育和维持基因组的完整性及稳定性意义重大^[2-4]。研究表明,

收稿日期: 2021-08-02; 修回日期: 2021-08-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31671284); 安徽省科协青年科技人才托举计划资助项目 (RCTJ202001)

作者简介: 李广莹 (1997—), 女, 安徽淮南人, 合肥工业大学硕士生;

肖桂然 (1988—), 女, 山东邹城人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: xiaoguiran.101@163.com.

Piwi 蛋白在哺乳动物和其他昆虫生殖系统内也有表达^[5-6],在多种生物中表现出高度保守的结构和功能特点^[7]。*Piwi/piRNA* 对转座子转座的调控方式是多方面、多层次的,若 *Piwi* 蛋白发生突变或 *piRNA* 通路受阻,则会使生殖细胞发育受到严重阻滞^[8]。另有研究表明,*Piwi* 在其他器官和组织如脂肪体中也有少量分布,但很少有关于 *piRNA* 与 *Piwi* 在脂肪体中功能的研究^[9]。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是机体细胞正常代谢的产物,是一类大分子,属于自由基^[10],具有重要的生理功能,比如激活胞浆内的第二信使参与细胞信号转导^[11]。线粒体内膜上的电子传递链是 ROS 合成的主要场所,正常细胞所产生的 ROS 中有 95% 均来源于此^[12]。但高浓度的 ROS 具有细胞毒性,当机体受到内外环境刺激后,会产生大量的 ROS 分子,其中包括超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢等,这些分子具有极强的氧化能力,破坏细胞内氧化还原系统的平衡,引起氧化应激,攻击 DNA、蛋白质和脂类等生物大分子,给细胞带来严峻的考验^[13-15]。因此,ROS 过量积累会严重干扰相应组织的正常功能。

作为四大经典模式生物之一的黑腹果蝇,已经广泛应用于遗传、发育、生理和行为等领域^[16]。原因在于它具备如下优良特性:果蝇易于培养、生长迅速、繁殖速度快;染色体数目少,但突变性状多,已构建多种基因型的突变体;相关技术成熟,易于进行遗传上的操作^[17-18]。此外,果蝇与哺乳动物在许多方面具有相似性,比如类似的组织和器官结构,其中果蝇的脂肪体(fat body)相当于哺乳动物的脂肪和肝脏^[19]。另外,果蝇具有许多哺乳动物相关蛋白的同源物^[20],因此可利用模式生物果蝇对 *Piwi* 蛋白在脂肪体中的功能进行研究。

本实验主要研究脂肪体中的 *Piwi* 对机体生长发育的影响。研究表明,在脂肪体敲低 *Piwi* 的表达,脂肪体的储存代谢受损,进而影响到果蝇的生长发育,包括羽化率降低、生长周期延长、寿命缩短。进一步的研究表明,敲低 *Piwi* 基因会诱导 ROS 大量生成,导致细胞内代谢紊乱,从而对脂肪体的功能造成损伤。本研究对 *Piwi* 调控相关疾病的发生具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

GAL4-UAS 系统是实现果蝇体内基因特异性敲低的常用手段,该系统由 driver(GAL4)和

responder(UAS)2 个调控元件组成,分别存在于 2 种转基因果蝇中,2 种果蝇杂交产生的后代同时含有这 2 种元件,GAL4 启动 UAS 下游基因细胞的组织特异性表达。

本研究所用的 GAL4 驱动子是 Cg-GAL4,该果蝇来自 Bloomington Drosophila Stock Center,它能特异地在果蝇的脂肪组织中表达,实验中利用该驱动子实现脂肪体中特异性敲低 *Piwi* 基因;研究中所用到的对照组果蝇品系为野生型和 *Piwi-RNAi* 2 个品系的果蝇,均来源于 Vienna Drosophila Research Center(VDRC)。

1.2 实验仪器

酶标仪(澳大利亚 INFINITE M NANO);倒置荧光 DIC 显微镜(日本 Nikon)。

1.3 方法

1.3.1 果蝇饲养条件

果蝇培养基的制备。天平准确称取玉米粉 100 g、大豆粉 10 g、白糖 14.5 g、红糖 40 g、酵母 25 g、琼脂 8 g,蒸馏水 1 L 搅拌均匀并煮沸。冷却至适当温度,加入防腐剂(2%),倒入果蝇培养管,冷却凝固后即可使用。果蝇饲养的温度为 25 °C,湿度为 65%。

1.3.2 果蝇羽化率和生长周期的测定

每只果蝇培养管随机放入 9~12 只羽化 3 d 的 Cg 处女蝇,3~5 只雄性杂交品系果蝇,25 °C 培养下培养 3 d(即交配 3 d),然后将它们转移到葡萄汁培养板上产卵 24 h。新孵化的 1 日龄幼虫被转移到果蝇培养基上进行后续培养。密度控制为每管 50 只幼虫,每组 10 管,统计羽化果蝇的数目和每管果蝇全部羽化所用时间。羽化率计算公式为:

$$\text{羽化率} = (\text{羽化的果蝇数} / 50) \times 100\%$$

1.3.3 果蝇寿命的测定

每只果蝇培养管放入 20 只同一天羽化的雌蝇,每组 10 管。每 2 d 转移到新的培养管(保证食物新鲜与充足),除去管底已死亡的个体并统计记录,直到每管不存在存活个体,29 °C、65% 湿度,每组 10 管。

1.3.4 细胞甘油三酯水平的测定

根据甘油三酯测试盒(南京建成生物工程研究所,货号 A110-1-1)的使用说明,对细胞内甘油三酯水平进行检测。

1.3.5 细胞 ROS 水平的测定

根据活性氧检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号 S0033S)的使用说明,使用绿色

荧光探针 DCFH-DA 对活性氧水平进行检测。

1.4 数据统计与分析

通过 SPSS22.0 软件分析处理实验数据,实验结果表示为(平均值±标准差),组间差异使用 One-Way ANOVA 检验,本实验中显著性水平 $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)。

2 结果与分析

2.1 对果蝇羽化率的影响

羽化率是衡量果蝇生存能力的重要指标。在实验过程中发现 *Piwi* 敲低后果蝇的羽化率显著下降,统计结果如图 1 所示。

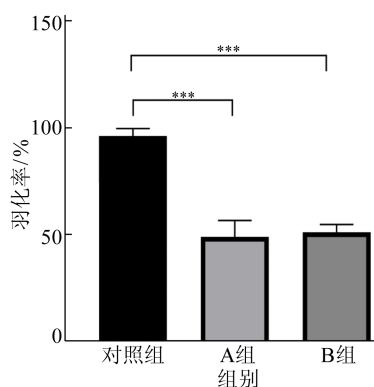


图 1 敲低脂肪体 *Piwi* 对果蝇羽化率的影响

图 1 中, A 组、B 组分别表示 *Piwi*-RNAi 的 2 个品系,下同。由图 1 可知,对照组果蝇羽化率将近 100%,而 *Piwi* 敲低后果蝇的羽化率明显降低,只有 40%~50%。这说明 *Piwi* 所调控的某种机制对果蝇的生长发育有至关重要的作用。

2.2 对果蝇生长周期和寿命的影响

一般饲养环境下正常果蝇从幼虫到羽化约为 10 d, *Piwi* 敲低后果蝇生长迟缓,结果如图 2 所示。

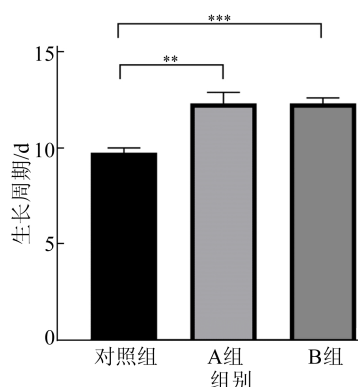


图 2 敲低脂肪体 *Piwi* 对果蝇生长周期的影响

Piwi 敲低组果蝇生长周期与对照组相比延

长,大约比对照组多 2 d。

不同组别果蝇的存活率如图 3 所示。由图 3 可知,与对照组相比, *Piwi* 敲低后果蝇的寿命发生显著缩短, *Piwi*-RNAi 的 2 个品系均在 40 d 左右发生大规模的死亡,分别在 60、70 d 时全部死亡。实验结果表明, *Piwi* 对果蝇的存活十分重要。

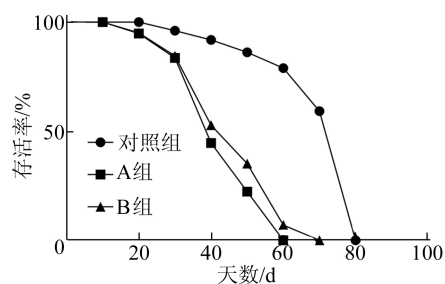


图 3 敲低脂肪体 *Piwi* 对果蝇寿命的影响

2.3 对果蝇脂肪体功能的影响

甘油三酯(triacylglycerol, TAG)是脂质的重要组成部分,果蝇的内源性 TAG 主要分布在脂肪组织中,功能是供给和储存能量^[21]。因此甘油三酯含量是鉴定脂肪体功能的重要指标,反映脂肪体的储存代谢^[22],结果如图 3 所示。与对照组相比, *Piwi* 敲低后果蝇脂肪体 TAG 摩尔分数显著下降,2 个品系均降低到 50%以下。本实验结果表明, *Piwi* 对脂肪体的功能至关重要, *Piwi* 敲低引起脂肪体 TAG 的储存异常。

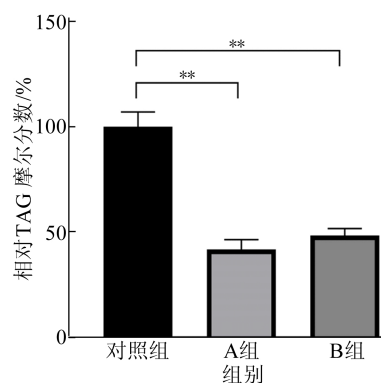


图 4 敲低脂肪体 *Piwi* 对果蝇 TAG 的影响

2.4 果蝇脂肪体细胞的过氧化

为进一步研究脂肪体细胞在 *Piwi* 敲低后受到何种影响,本实验通过使用活性氧检测试剂盒来鉴定果蝇脂肪体细胞内的 ROS 水平,染色结果如图 5 所示。由图 5 可知,与对照组相比, *Piwi*-RNAi 的 2 个品系脂肪体细胞内 ROS 荧光强度

显著增强,说明 *Piwi* 敲低后,脂肪体细胞 ROS 积累过多。ROS 堆积会对脂肪体细胞的储存功能造成严重损伤,这是影响果蝇生长发育的重要原因。

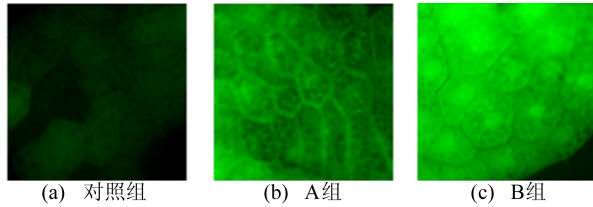


图 5 敲低果蝇脂肪体 *Piwi* 的 ROS 水平

3 结 论

本文以果蝇为模式生物,研究了 *Piwi* 基因在脂肪体表达量降低对果蝇生长发育的危害以及对脂肪体储存功能的干扰。实验结果表明,*Piwi* 敲低导致果蝇脂肪体细胞内产生大量 ROS,引起脂肪体储存 TAG 的功能下调,影响果蝇的生长发育,导致果蝇羽化率下降、发育迟缓以及寿命缩短。本研究发现 *Piwi* 在脂肪组织中的重要功能,为后续研究 *Piwi* 在脂质代谢中发挥的功能提供参考。

[参 考 文 献]

[1] 彭玲,黄昊. piRNA 通路中调控蛋白质研究进展[J]. 生命科学,2016,28(6):712-717.

[2] 成佳,肖丙秀,周辉,等. 新型非编码小 RNA-piRNA 的生物学功能研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2010,32(3):465-470.

[3] 赵爽,刘默芳. PIWI/piRNA 调控基因表达研究的新进展[J]. 生命科学,2015,27(3):344-350.

[4] GONZALEZ J, QI H, LIU N, et al. Piwi is a key regulator of both somatic and germline stem cells in the *Drosophila* testis[J]. Cell Reports,2015,12(1):150-161.

[5] ROSS R J, WEINER M M, LIN H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma [J]. Nature, 2014, 505(7483):353-359.

[6] HAASE A D, FENOGLIO S, MUERDTER F, et al. Probing the initiation and effector phases of the somatic piRNA pathway in *Drosophila*[J]. Genes and Development, 2010, 24(22):2499-2504.

[7] 颜愈佳,邹玲. PIRNA 生物学起源及功能研究进展[J].

中国生物工程杂志,2021,41(5):45-50.

[8] YAMASHIRO H, SIOMI M C. PIWI-interacting RNA in drosophila: biogenesis, transposon regulation, and beyond [J]. Chemical Reviews,2017,118(8):4404-4421.

[9] OZATA D M, GAINETDINOV I, ZOCH A, et al. PIWI-interacting RNAs; small RNAs with big functions[J]. Nature Reviews Genetics,2018,20(2):89-108.

[10] REUTER S, GUPTA S C, CHATURVEDI M M, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 49(11):1603-1616.

[11] HAMANAKA R B, CHANDEL N S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2010, 35(9):505-513.

[12] 张梦如,杨玉梅,成蕴秀,等. 植物活性氧的产生及其作用和危害[J]. 西北植物学报,2014,34(9):1916-1926.

[13] 刘树森. 线粒体呼吸链与活性氧[J]. 生命科学,2008,20(4):519-527.

[14] KLAUNIG J E, WANG Z, PU X, et al. Oxidative stress and Oxidative Damage in chemical carcinogenesis[J]. Toxicology and Applied Pharmacology,2011,254(2):86-99.

[15] VALKO M, IZAKOVIC M, MAZUR M, et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004, 266 (1):37-56.

[16] 万永奇,谢维. 生命科学与人类疾病研究的重要模型-果蝇 [J]. 生命科学,2006,18(5):425-429.

[17] 尚进,薛劲松,叶佳伟,等. 果蝇 *Catsup* 基因在卵巢中表达降低对生殖的影响[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版),2020,43(7):988-991.

[18] XIAO G, ZHOU B. What can flies tell us about zinc homeostasis? [J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2016,611(1):134-141.

[19] ZARNDT R, PILOTO S, POWELL F L, et al. Cardiac responses to hypoxia and reoxygenation in *Drosophila*[J]. American Journal of Physiology Regulatory Integrative & Comparative Physiology,2015,309(11):1347-1357.

[20] WEAVER L N, DANIELA D B. Maintenance of proper germline stem cell number requires adipocyte collagen in adult *Drosophila* females [J]. Genetics, 2018, 209 (4):1155-1166.

[21] 张沛然,郭改会. 高脂血症的发病机制及分类[J]. 中国临床医生杂志,2012,40(3):18-20.

[22] 王慧铭,夏道宗,夏明,等. 香菇多糖降血脂作用及其机制的研究[J]. 浙江中西医结合杂志,2005,15(10):599-602.

(责任编辑 张 镛)