

DOI: 10.3724/SP.J/1118.2011.00308

保幼激素拮抗物 KK-42 对凡纳滨对虾 FAMEt 时空表达的影响

夏西超, 王雪参, 李昕, 吕黎, 宁黔冀

河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007

摘要: 保幼激素拮抗物 KK-42 对凡纳滨对虾(*Penaeus schmitti*)的生长具有显著的促进作用, 并已在池塘养殖中得到推广应用, 但其作用机制尚不清楚。为给今后科学合理地使用 KK-42 提供理论依据, 本研究对直接调节甲壳动物生长的重要激素甲基法呢酯(MF)合成的关键酶——法呢酸 *O*-甲基转移酶(FAMEt)的时空表达以及 KK-42 对其表达的影响进行探讨。将体长 3.5 ~ 5.0 cm 凡纳滨对虾幼虾随机分为 2 组, 分别用 1.95×10^{-4} mol/L 的 KK-42 溶液或不含 KK-42 的溶液浸泡处理 1min, 之后在相同条件下常规饲养。不同组织中 FAMEt mRNA 水平定量分析采用 real-time PCR, 血淋巴中 MF 滴度测定采用正相高效液相色谱法。结果显示, 对照组 FAMEt 在眼柄、肌肉组织中的表达模式与大颚器官明显不同: 在实验观察期间, 前者组织中 mRNA 水平相对较低且变化较小, 而在大颚器官则出现明显的波动, 第 2 天、6 天、7 天、8 天 FAMEt mRNA 含量比第 0 天均增加 1 倍以上($P < 0.01$)。实验期间血淋巴中 MF 滴度逐渐升高。KK-42 处理后, 上述 3 个组织中 FAMEt 表达均出现不同程度下调, 尤以大颚器官最为显著, mRNA 水平降低 19.7%~63.4%(第 8 天除外); KK-42 处理也导致 MF 滴度下降。研究表明, KK-42 可显著抑制凡纳滨对虾眼柄、肌肉、特别是大颚器官 FAMEt 转录, 降低血淋巴 MF 滴度, 这可能是其促生长的机制之一。[中国水产科学, 2011, 18(2): 308–313]

关键词: KK-42; 凡纳滨对虾; 大颚器官; 法呢酸 *O*-甲基转移酶

中图分类号: S459

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0308-06

甲基法呢酯(methyl farnesoate, MF)的结构和功能类似于昆虫保幼激素(juvenile hormone, JH), 由甲壳动物大颚器官(mandibular organ, MO)合成并分泌到血淋巴中, 是直接调控甲壳动物生长的重要激素^[1-3], 它在动物体内的滴度受到多种因素的调节^[4-6], 法呢酸 *O*-甲基转移酶(Farnesoic acid *O*-methyltransferase, FAMEt)就是其中重要的调控因子。FAMEt 催化甲基法呢酸转化为 MF, 是 MF 合成的限速酶^[7-8], 也是 MF 合成途径中研究得最为深入的一种酶。据报道, FAMEt 酶活性仅在甲壳动物的 MO 中被检测到^[9-10], 这与早已明确的 MO 是 MF 合成的唯一部位的结论相一致。

但对美洲龙螯虾(*Homarus americanus*)、黄道蟹(*Cancer pagurus*)、远洋梭子蟹(*Portunus pelagicus*)等甲壳动物的研究发现, *famet* 的转录物分布广泛, 除 MO 外, 肌肉、眼柄、肝胰腺、卵巢等多个组织均有表达, 推测可能与 FAMEt 的多种功能尤其是动物的生长及蜕皮调控有关^[11-14]。

咪唑类物质 KK-42 是保幼激素拮抗物的一种, 对昆虫的研究表明, 该类物质作用机理复杂, 其中包括干扰(或抑制)JH 的合成来改变昆虫的生长速率^[15-17]。Ning 等^[18]的前期研究证明, KK-42 对凡纳滨对虾(*Penaeus schmitti*)的生长有显著的促进作用, 已经在河南得到推广应用。为了从分

收稿日期: 2010-04-04; 修订日期: 2010-06-11.

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

作者简介: 夏西超(1977-), 男, 在读博士, 从事甲壳动物激素调控研究. E-mail: xiachao8336@163.com

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

子水平探究其促生长机制, 更为今后科学合理地使用 KK-42 类物质, 本研究采用 real-time PCR 技术, 定量分析了凡纳滨对虾经 KK-42 处理后, FAMEt 的时空表达, 同时结合高效液相色谱方法, 测定了不同时间点血淋巴中 MF 滴度。

1 材料与方法

1.1 凡纳滨对虾的处理

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

1.2 FAMEt mRNA 水平的定量测定

1.2.1 RNA 提取 用 RNAiso Plus(TaKaRa)提取凡纳滨对虾 MO、眼柄和肌肉总 RNA, 总 RNA 的完整性和纯度用凝胶电泳检测, RNA 的浓度根据 A₂₆₀ 进行定量。

1.2.2 cDNA 第一链的合成 按照 PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa)操作说明合成 cDNA 第一链。10 μL 反应体系: 5 × PrimScriptTM Buffer 2 μL, PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 0.5 μL, Oligo dT Primer (50 μmol/L) 0.5 μL, Random 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL, 总 RNA 100 ng。反应条件: 37℃, 15 min, 85℃, 5 s。

1.2.3 PCR 引物设计 根据凡纳滨对虾 *famet* 和 *β-actin* 的 cDNA 序列设计目的基因 FAMEt (AF333042)和内参基因 *β-actin*(AY486466), 引物由上海生工公司合成。目的基因正向引物为 5'-GACTGCCTCACCTACAACCTTCGT-3', 反向引物为 5'-AAGTGTT CATTGGAGGCTGGG-3'。内参基因正向引物为 5'-CATCCACGAGACCACCTACAAC-3', 反向引物为 5'-GAAATACTGCCTCGCTCCC

TC-3'。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 20 μL 体系中包括: SYRB Premix Ex TaqTM (TaKaRa) 10 μL, PCR 上下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA 模板 2 μL, ROX Reference Dye (TaKaRa) 0.4 μL, dH₂O 6.8 μL。反应条件: 95℃ 30 s, 1 cycle; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 40 cycles。

1.3 血淋巴中 MF 滴度测定

血淋巴中 MF 的滴度测定采用正相高效液相色谱法(Normal Phase High Pressure Liquid Chromatography)^[19]。血淋巴(0.5~1.0 mL)中分别加入乙腈 2.5 mL、正己烷 0.5 mL, 用适量的 0.9 % 的 NaCl 调整体积, 使其总体积为 5 mL, 充分混匀, 离心, MF 即存在于最上层的正己烷中。MF 纯品由 Dr. Laufer Hans(Department of Molecular & Cell Biology, University of Connecticut, USA)友情提供。流动相为正己烷, 柱温 25℃, 流速 1.2 mL/min, 检测波长 220 nm。所有试剂均为色谱纯。

2 结果与分析

2.1 KK-42 对凡纳滨对虾大颚器官 FAMEt 基因表达的抑制

对照组 MO 中 FAMEt mRNA 水平呈波动性变化, 和第 0 天相比, 第 2 天增幅达 127.8%($P < 0.01$), 第 3 至 5 天, 呈逐渐下降趋势, 但随后几天 FAMEt mRNA 均保持较高的水平(图 1)。KK-42 处理导致 FAMEt mRNA 水平显著降低, 尤其在第 1 天、3 天、4 天和 6 天, mRNA 含量分别下降了 50.9 %、37.4 %、63.4 %和 55.7 %(图 1), 第 8 天, KK-42 的抑制作用基本消失。

2.2 KK-42 对凡纳滨对虾眼柄和肌肉组织 FAMEt 基因转录的影响

在所观察的实验期间, 对照组眼柄组织 FAMEt mRNA 含量的变化相对较小, 只在第 7 天有一个明显升高; 而肌肉组织中该基因的表达量未出现统计学意义的变化(图 2、图 3)。KK-42 处理能不同程度地抑制 FAMEt 的表达, 在实验过程中的一些时间点, 处理组 mRNA 水平显著低于对照组。

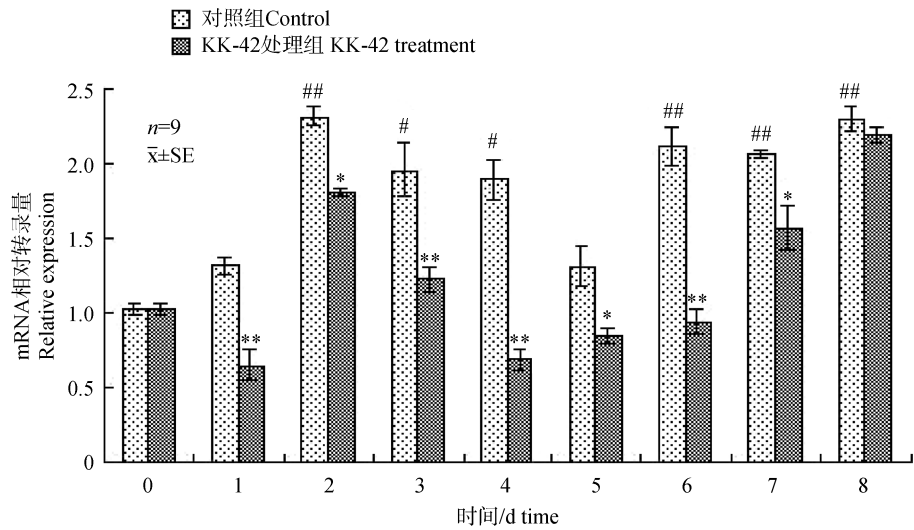


图 1 KK-42 对凡纳滨对虾大颚器官 *FAMeT* 基因表达的抑制

“*”“**”表示与相应对照组相比有显著或极显著差异($P<0.05$, $P<0.01$); “#”“##”分别表示与 0 d 对照组相比有显著或极显著差异($P<0.05$, $P<0.01$).

Fig.1 Time-course inhibition of KK-42 on MO FAMeT mRNA expression in the shrimp *Penaeus schmitti*

“*” $P<0.05$, “**” $P<0.01$, vs control group at the same time. “#” $P<0.05$, “##” $P<0.01$, vs. control group at 0th day.

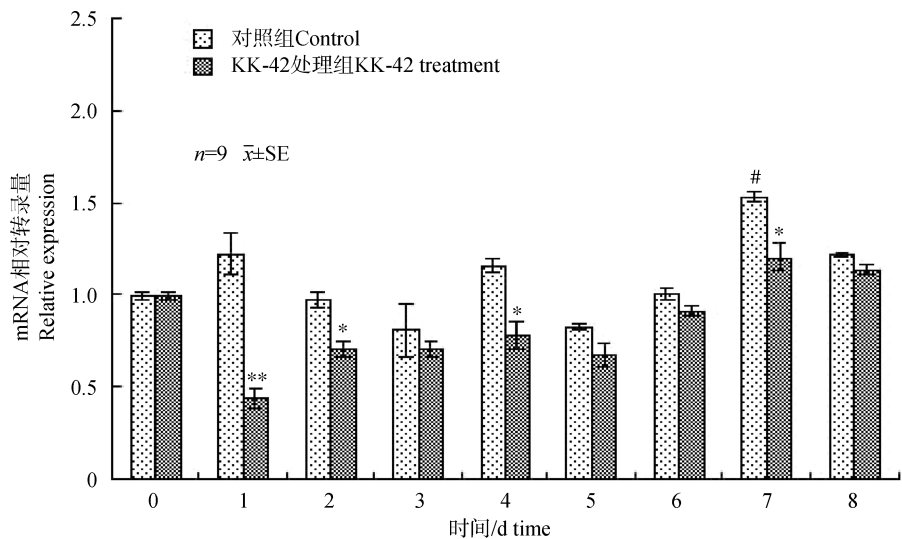


图 2 KK-42 对凡纳滨对虾眼柄 *FAMeT* 基因表达的影响

“*”“**”表示与相应对照组相比有显著或极显著差异($P<0.05$, $P<0.01$); “#”表示与 0 d 对照组相比有显著差异($P<0.05$).

Fig. 2 The time-course change of FAMeT mRNA expression in eyestalks of the shrimp *Penaeus schmitti* after KK-42 treatment.

“*” $P<0.05$, “**” $P<0.01$, vs. control group at the same time. “#” $P<0.05$, vs. control group at 0th day.

2.3 KK-42 处理对凡纳滨对虾血淋巴 MF 滴度的抑制

图 4A 显示 MF 的保留时间为 2.87 min, 纯品 MF 的标准曲线见图 4B。实验期间, 对照组凡纳滨对虾血淋巴中 MF 滴度逐渐升高, 从 40 ng/mL (第 0 天) 升至 73 ng/mL (第 6 天)(表 1)。KK-42 处

理后, MF 滴度逐渐降低, 第 4 天和第 6 天, 分别比对照组减少 18.6 %和 20.8 %(表 1)。

3 讨论

对凡纳滨对虾幼虾的研究结果表明, *FAMeT* 的转录物分布于多种组织中, 不仅在 MO 这唯一能

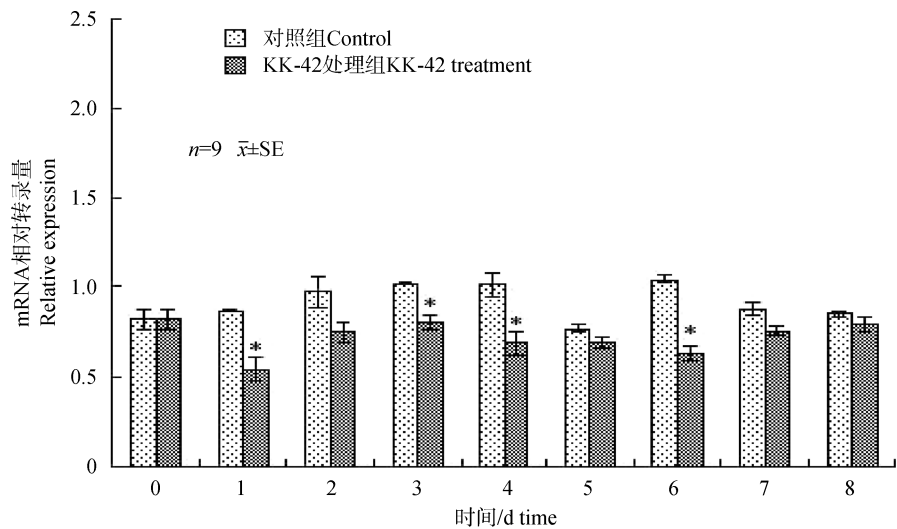


图 3 KK-42 对凡纳滨对虾肌肉 *FAMEt* 基因表达的影响
“*”表示与相应对照组相比有显著差异($P<0.05$)

Fig. 3 The time-course effect of KK-42 on muscle *FAMEt* mRNA expression in the shrimp *Penaeus schmitti*
“*” $P<0.05$, vs. control group at the same time.

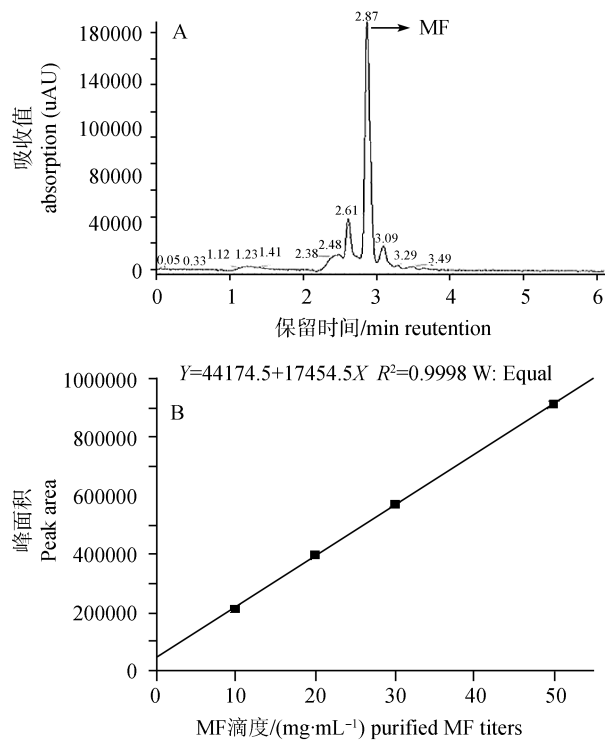


图 4 纯品 MF 的正相高效液相色谱图(A)和 MF 标准曲线(B)
Fig. 4 A representative normal-phase HPLC chromatogram showing purified MF served as the external standard (A) and the standard curve of MF (B)

检测出 *FAMEt* 酶活性的器官^[9-10]中有表达, 在眼柄和肌肉组织也有不同程度的表达, 这与在其他甲壳动物中的研究结果相一致^[11-12]。本研究发现,

FAMEt 的组织表达模式存在明显差异, 在实验期间, 眼柄和肌肉组织 *FAMEt* mRNA 含量的变化幅度不大, 而 MO 中 *FAMEt* mRNA 水平呈波动性变化(图 1), 与血淋巴中 MF 滴度变化趋势基本一致(表 1)。*FAMEt* 是甲壳动物 MF 合成的关键酶, 该结果提示, *FAMEt* 的表达水平可能是影响血淋巴 MF 滴度的重要因素之一。

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

组别 group	ng/mL 血淋巴 hemolymph			
	第 0 天 Day 0	第 2 天 Day 2	第 4 天 Day 4	第 6 天 Day 6
对照组 control	40	44	68	73
处理组 KK-42 treatment	40	43	56	58

本研究结果证明, 保幼激素拮抗物 KK-42 能够抑制不同组织 *FAMEt* 表达, 尤以 MO 最为显著^[11]。在 KK-42 处理后第 1 天和 2 天, MO 中 *FAMEt* mRNA 水平明显抑制(图 1), 而血淋巴 MF 滴度仅有轻微减少(表 1), 表明 MF 滴度的变化滞后于 *FAMEt* mRNA 的改变, 相同现象亦在龙虾中发现^[19]。作为调控信号, 激素的半衰期一般较短,

动物应该不断地合成 MF 才能维持其在血淋巴中的浓度, 据此推测, 尽管 KK-42 能显著抑制 *famet* 的转录, 但在酶活性水平对 FAMeT 影响可能很小; 另外, MF 变化的滞后现象提示, 加工具有酶活性的 FAMeT 可能需要较长的时间。随着实验的进程, FAMeT mRNA 含量始终低于对照组, 而血淋巴中 MF 滴度也不断降低, 进一步提示 FAMeT 的表达与 MF 滴度变化之间可能存在的密切关系。据最新报道, 抑制美洲龙螯虾 MO 中 FAMeT 转录可导致血淋巴 MF 滴度的降低^[19]。KK-42 处理后第 8 天, FAMeT mRNA 水平与对照组相比无统计学差异, 说明 KK-42 的抑制作用主要发生在处理后的早期阶段。

KK-42 对昆虫的作用十分复杂, 它能够刺激保幼激素酯酶表达, 加速保幼激素的降解, 诱导家蚕成熟形态发生^[17]。凡纳滨对虾等甲壳动物的长大与昆虫相似, 生长过程包括身体的增大和蜕皮, 该过程由 MF 和蜕皮激素(蜕皮酮)共同控制。据报道, 在蜕皮酮存在的条件下, 低浓度的 MF 能够促进动物的异速生长^[21-22]。推测 KK-42 通过抑制凡纳滨对虾幼虾某些组织(主要是 MO) FAMeT 表达, 减少血淋巴 MF 滴度, 从而促进了动物的生长, 关于 KK-42 下调 *famet* 转录的途径有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Nagaraju GPC, Reddy PR, Reddy PS. Mandibular organ its relation to body weight sex molt and reproduction in the crab *Oziotelphusa senex senex* Fabricius (1791) [J]. Aquaculture, 2004; 232:603–612.
- [2] Nagaraju GPC, Reddy PR, Reddy PS. In vitro methyl farnesoate secretion by mandibular organs isolated from different molt and reproductive stages of the crab *Oziotelphusa senex senex* [J]. J Fish Sci, 2006, 72: 410–414.
- [3] Reddy PR, Nagaraju GPC, Reddy PS. Involvement of methyl farnesoate in the regulation of molting and reproduction in the freshwater crab *Oziotelphusa senex* [J]. J Crust Biol, 2004, 24:511–515.
- [4] Nagaraju GPC, Prasad GLV, Reddy PS. Isolation and characterization of mandibular organ-inhibiting hormone from the eyestalk of freshwater crab *Oziotelphusa senex senex* [J]. Inter Natl Appl Sci Engg, 2005(3):367–374.
- [5] Loveet DL, Verzi MP, Clifford PD, Borst DW. Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic in the green crab, *Cancer pagurus* [J]. Com Biochem Physiol, 2001, 128: 299–306.
- [6] Wainwright G, Webster SG, Rees HH. Neuropeptide regulation of biosynthesis of the juvenoid, methyl farnesoate in the edible crab, *Cancer pagurus* [J]. Biochem J, 1998, 334: 651–657.
- [7] Holford KC, Edwards KA, Bendena WG, et al. Purification and characterization of a mandibular organ protein from the American lobster *Homarus americanus*: a putative farnesoic acid *O*-methyltransferase [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, 34: 785–798.
- [8] Gunawardene SYIN, Tobe SS, Bendena WG, et al. Function and cellular localization of farnesoic acid *O*-methyltransferase (FAO-MeT) in the shrimp, *Metapenaeus* [J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 3587–3595.
- [9] Borst DW, Tsukimura B, Laufer H, et al. Regional differences in methyl farnesoate production by the lobster mandibular organ [J]. Biol Bull, 1994, 186: 9–16.
- [10] Claerhout T, Bendena W, Tobe SS, et al. Characterization of methyl transferase activity in the mandibular organ of the American lobster *Homarus americanus* [J]. Biol Bull, 1996, 191: 304–308.
- [11] Kuballa AV, Guyatt K, Dixon B, et al. Isolation and expression analysis of multiple isoforms of putative farnesoic acid *O*-methyltransferase in several crustacean species [J]. Gen Comp Endocrinol, 2007, 150: 48–58.
- [12] Jerome HLH, Stephen ST, Chan SM. Characterization of the putative farnesoic acid *O*-methyltransferase (LvFAMeT) cDNA from white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: evidence for its role in molting [J]. Peptides, 2008, 29: 252–260.
- [13] Gunawardene SYIN, Chow BKC, He J, et al. The shrimp FAO-MeT cDNA is encoded for a putative enzyme involved in the methyl farnesoate (MF) biosynthetic pathway and is temporally expressed in the eyestalk of different sexes [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2001, 31: 1115–1124.
- [14] Ruddell CJ, Wainwright G, Geffen A, et al. Cloning, characterization, and developmental Expression of a putative farnesoic acid *O*-methyltransferase in the female edible crab *Cancerpagurus* [J]. Biol Bull, 2003, 205: 308–318.
- [15] Asano S. Anti-juvenile hormone activity of imidazole Compound (KK-42) and its diminution by metoprene in the 4th instar silkworm *Bombyx mori* L. [J]. Appl Entomol Zool, 1986, 21: 63–69.
- [16] Wu JM, Wu ZD, Xu JL, et al. The effect of trimolter inducer KK-42 on the endocrine system in the silkworm *Bombyx mori* [J]. Acta Entomol Sin, 1991, 34: 278–283.
- [17] Hirai M, Kamimura M, Kikuchi K, et al. cDNA cloning and characterization of *Bombyx mori* juvenile hormone esterase: an inducible gene by the imidazole insect growth regulator

- KK-42 [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32: 627–635.
- [18] Ning QJ, Fu SG, Xu XJ, et al. A new and practical application of JH antagonist KK-42 to promoting growth of shrimp *Penaeus schmitti* [J]. *Aquaculture*, 2007, 270: 422–426.
- [19] Borst DW, Tsukimura B. Quantification of methyl farnesoate levels in hemolymph by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1991, 545: 71–78.
- [20] Li S, Friesen JA, Holford KC, et al. Methyl farnesoate synthesis in the lobster mandibular organ: The roles of HMG-CoA reductase and farnesoic acid O-methyltransferase [J]. *Comp Biochem Phys, Part A*, 2010, 155: 49–55.
- [21] Abdu U, Takac P, Laufer H, et al. Effect of methyl farnesoate on late larval development and metamorphosis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae): a juvolid-like effect [J]. *Biol. Bull* 1998; 195: 112–119.
- [22] Laufer H, Ahl J, Rotllant G, et al. Evidence that ecdysteroids and methyl farnesoate control allometric growth and differentiation in a crustacean [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, 32: 205–210.

Effects of juvenile hormone antagonist KK-42 on temporal and spatial expressions of FAMEt in shrimp *Penaeus schmitti*

XIA Xichao, WANG Xueshen, LI Xin, LV Li, NING Qianji

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China

Abstract: It has been demonstrated that the treatment of juvenile hormone antagonist KK-42 can significantly accelerate growth of *Penaeus schmitti*, which has been applied in *P. schmitti* aquaculture, but the mechanism of KK-42 is unclear. To provide the theory support involved in KK-42 application, the temporal and spatial expressions of farnesoic acid O-methyltransferase (FAMEt), a key synthesis enzyme of methyl farnesoate (MF) which is the important hormone regulating directly crustacean growth, was assayed and the effect of KK-42 on the enzyme was researched. The shrimps (*Penaeus schmitti*), 3.5–5.0 cm long, were randomly divided into two groups, soaked in KK-42 solution at a concentration of 1.95×10^{-4} mol/L or in the solution without KK-42 for 1 min, respectively, and then cultured in normal way. The levels of FAMEt mRNA were determined using real-time PCR and hemolymph MF titer was analyzed by normal phase high-performance liquid chromatography. Results showed that the expression pattern of FAMEt derived from the muscle, eyestalk and mandibular organ (MO) tissues varied in control, of which, the mRNA levels in muscle and eyestalk tissues were not only relatively low but also little various during the experiment. However, an obvious fluctuation of mRNA level occurred in MO during the stage of experiment, more than 1-fold of increase in mRNA level was observed on days 2, 6, 7, and 8 comparing to that on day 0. The hemolymph MF content in control shrimps rose during the experiment. Administration of KK-42 resulted in the universal depression on FAMEt expression in three tissues mentioned above; the most significant inhibitory effect occurred in MO where the level of FAMEt mRNA was considerably lower than that in control group from day 1 to day 7; the level even decreased to 50.9% ($P < 0.01$), 63.4% ($P < 0.01$) and 55.7% ($P < 0.01$) on day 1, day 4 and day 6 after KK-42 treatment, respectively. Meanwhile, the amount of hemolymph MF fell in KK-42-treated shrimps compared to that in control ones during the duration of the experiment, which might be involved in *famet* transcription depression in the animal tissues, especially in the MO. Our present study demonstrates that KK-42 can significantly inhibit FAMEt expression in the MO and muscle as well as eyestalk tissues of the shrimp *Penaeus schmitti* and decrease the hemolymph MF titer, which may be one of the growth-promoting mechanisms of KK-42 on *Penaeus schmitti*. [*Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(2):308–313]

Key words: KK-42; *Penaeus schmitti*; mandibular organ; farnesoic acid O-methyltransferase

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