

RagA 和 Nprl2 在果蝇肠道发育中的调节作用关系

牛春梅, 管建文, 孟国强, 周颖, 韦有恒*

扬州大学生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225000

牛春梅, 管建文, 孟国强, 周颖, 韦有恒. RagA 和 Nprl2 在果蝇肠道发育中的调节作用关系[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1747-1758.

NIU Chunmei, GUAN Jianwen, MENG Guoqiang, ZHOU Ying, WEI Youheng. The regulatory relationship between RagA and Nprl2 in *Drosophila* gut development[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1747-1758.

摘要: 动物胃肠道是食物消化和营养吸收器官, 对机体健康至关重要。果蝇与哺乳动物的肠道 在细胞组成、遗传调控等方面高度相似, 是研究肠道发育的良好模型。体外培养细胞中的研究发 现, Nprl2 通过作用于 Rag GTPase, 抑制雷帕霉素靶点复合物 1 (target of rapamycin complex 1, TORC1) 的活性, 参与细胞代谢的调节。前期报道 *nprl2* 突变果蝇具有前胃增大、消化能力降低等 肠道衰老相关表型。但对于 Nprl2 是否通过 Rag GTPase 调控肠道发育等方面尚不清楚。为了探究 Rag GTPase 在 Nprl2 调控果蝇肠道发育中的作用, 本研究利用遗传杂交结合免疫荧光等方法对 *RagA* 敲减和 *nprl2* 突变果蝇的肠道形态、肠道细胞组成等方面进行研究。发现单独敲减 *RagA* 可 以引起肠变粗、前胃增大等表型, 敲减 *RagA* 能挽救 *nprl2* 突变体中肠道变细、分泌型细胞减少的 表型, 但并不能挽救 *nprl2* 突变体中前胃增大的表型。以上结果表明, RagA 在肠道发育中发挥重 要作用, Nprl2 通过作用于 Rag GTPase 调节肠道细胞分化和肠道形态, 但 Nprl2 对前胃发育和肠 道的消化功能的调节可能通过不依赖于 Rag GTPase 的机制实现。

关键词: 果蝇; 肠道; RagA; *nprl2* 突变体; 发育

The regulatory relationship between RagA and Nprl2 in *Drosophila* gut development

NIU Chunmei, GUAN Jianwen, MENG Guoqiang, ZHOU Ying, WEI Youheng*

College of Biological Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225000, Jiangsu, China

Abstract: The gastrointestinal tract is the largest digestive organ and the largest immune organ and detoxification organ, which is vital to the health of the body. *Drosophila* is a classic model

资助项目: 国家自然科学基金(3187120118)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (3187120118).

*Corresponding author. E-mail: yhwei@yzu.edu.cn

Received: 2022-09-15; Accepted: 2022-12-06

organism, and its gut is highly similar to mammalian gut in terms of cell composition and genetic regulation, therefore can be used as a good model for studying gut development. Target of rapamycin complex 1 (TORC1) is a key factor regulating cellular metabolism. Nprl2 inhibits TORC1 activity by reducing Rag GTPase activity. Previous studies have found that *nprl2* mutated *Drosophila* showed aging-related phenotypes such as enlarged foregastric and reduced lifespan, which were caused by over-activation of TORC1. In order to explore the role of Rag GTPase in the developmental defects of the gut of *nprl2* mutated *Drosophila*, we used genetic hybridization combined with immunofluorescence to study the intestinal morphology and intestinal cell composition of *RagA* knockdown and *nprl2* mutated *Drosophila*. The results showed that *RagA* knockdown alone could induce intestinal thickening and forestomach enlargement, suggesting that RagA also plays an important role in intestinal development. Knockdown of *RagA* rescued the phenotype of intestinal thinning and decreased secretory cells in *nprl2* mutants, suggesting that Nprl2 may regulate the differentiation and morphology of intestinal cells by acting on RagA. Knockdown of *RagA* did not rescue the enlarged forestomach phenotype in *nprl2* mutants, suggesting that Nprl2 may regulate forestomach development and intestinal digestive function through a mechanism independent of Rag GTPase.

Keywords: *Drosophila*; intestinal; RagA; *nprl2* mutant; development

动物肠道不仅是消化和吸收的场所,也是机体防御外来入侵物的第一道屏障^[1]。果蝇肠道与小鼠、人类的肠道在发育、细胞组成、遗传调控等方面具有高度的相似性^[2]。果蝇肠道分为3个不同发育起源的离散域(前肠、中肠、后肠),大部分区域为中肠,前肠和后肠相对较短。前肠起源于外胚层包括食道和前胃(crop),其中前胃与哺乳动物的胃类似,具有暂时储存、运输食物的功能;中肠起源于内胚层,主要分为前中肠(anterior midgut)、铜细胞区(copper cell region, CCR)以及后中肠(posterior midgut),主要功能是消化和吸收营养成分^[3-4]。CCR区的主要细胞类型是铜细胞,铜细胞具有吸收铜离子和排放氢离子的功能,因此该区段呈酸性,便于食物的消化^[3-4];后肠起源于外胚层,与哺乳动物结肠类似,具有吸收水分的功能^[5]。果蝇肠道由不同类型的细胞组成,包括具有增殖和分化功能的多功能肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)、由 ISCs 分裂形成的

肠下皮细胞或中间过渡型细胞(enteroblasts, EBs)、主要行使营养吸收功能的肠上皮细胞(enterocytes, ECs)和行使分泌功能的肠内分泌细胞(enteroendocrine cells, EEs)^[6]。在肠道细胞的增殖和分化过程中,ISCs 通过有丝分裂的方式,产生新的干细胞和 EB 细胞^[7],EBs 细胞通过分化形成 ECs 和 EEs,两者分别由 Pdm1 和 Prospero 蛋白标记^[8]。ECs 细胞占肠道总细胞数量的 90%,为八倍体,具有较大细胞核;ISCs、EBs、EEs 细胞为二倍体,具有较小的细胞核^[9]。最近研究发现,为了维持稳态,ISCs 根据 Notch 信号的水平分化为两种不同的瞬时状态,即 EBs 或肠内分泌祖细胞(enteroendocrine progenitor cells, EEPs)。高 Notch 信号促进 ISCs 分化为肠上皮细胞(ISC→EB→EC),而低 Notch 信号促进 ISCs 分化为肠内分泌细胞(ISC→EEP→EE)^[10-13]。果蝇肠道受损时会激活一些信号通路,刺激肠道干细胞增殖和分化,以维持肠道正常功能。肠内分泌细胞能够分泌激素,

对全身起到调控作用。Hippo、JNK、Notch 等信号通路对肠道干细胞的增殖及分化起着重要的调控作用^[14]。研究表明,炎症和老化等应激胁迫条件会促进肠道干细胞的增殖与分化^[15]。

TORC1 具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性,是细胞感受营养和能量状态、调节细胞生长和代谢的关键调控因子^[16],普遍存在于酵母、果蝇、小鼠等真核生物中,具有高度遗传保守性。TORC1 信号通路的激活依赖于生长因子、能量,以及营养的共同刺激。而氨基酸对 TORC1 活性的调节主要是通过 Rag GTPases 实现的。Rag GTPases 属于 Ras 家族成员的 GTP 结合蛋白,通过调节器(regulator)复合物的相互作用将自己锚定在溶酶体上。Rag GTPases 是 RagA 或 B (RagA/B)与 RagC 或 D (RagC/D)组成的异二聚体^[17]。当 RagA/B 与 GTP 结合,RagC/D 与 GDP 结合时,Rag 复合体处于活性状态,招募 TORC1 至溶酶体上,促进 TORC1 活性;而当 RagA/B 与 GDP 结合,RagC/D 与 GTP 结合时,则处于失活状态,不能促进 TORC1 活性^[18-19]。Rag GTPases 的活性受 GAP towards Rags (GATOR)复合体的调节。其中由 DEPDC5、Nprl2 和 Nprl3 组成 GATOR1 复合体^[20],具有 GTP 酶激活蛋白(GTPase-activating protein, GAP)活性,能够促进 RagA 上的 GTP 水解为 GDP,使 TORC1 从溶酶体上解离,从而抑制 TORC1 活性。如果 GATOR1 功能缺失,则不能促进 RagA 上的 GTP 水解为 GDP, TORC1 会处于持续高活性状态。

Nprl2 作为 GATOR1 的组成蛋白,定位于溶酶体膜上,具有抑制 TORC1 活性的功能。在哺乳动物中发现,*nprl2* 基因突变导致 TORC1 活性过高,引起小鼠胚胎致死^[21]。在果蝇中的研究也发现,*nprl2* 突变果蝇的存活率降低, TORC1 活性增加^[22]。我们以前在果蝇肠道中的

研究发现:*nprl2* 突变体果蝇具有伴随食物消化能力减弱的前胃增大、中肠变细、肠道中内分泌细胞减少等表型^[23]。通过与 *Tor* 突变体果蝇杂交或者喂食 TORC1 抑制药物雷帕霉素的方式,发现 *nprl2* 突变体中肠道相关表型与 TORC1 过度激活有关^[23]。虽然在体外培养细胞中的结果提示 GATOR1 通过促进 RagA 上的 GTP 水解为 GDP,进而抑制 TORC1 活性,但是,对 GATOR1 在成体水平上调控 TORC1 活性及功能研究的报道较少。最近发现,Rag GTPase 在脑组织中可以通过作用于 GATOR1 调节 TORC1 的活性^[24],提示在成体水平上 GATOR1 对 TORC1 活性调节机制比较复杂。本课题探究 RagA 在肠道发育中的作用及 GATOR1 的组分蛋白 Nprl2 是否通过 Rag GTPase 调节肠道的发育及功能。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 果蝇食物配方

果蝇培养基配制。电子天平准确称取蔗糖 40 g、酵母 25 g、玉米粉 66.8 g、大豆粉 9.2 g、琼脂粉 6 g、麦芽糖 42.4 g,加入纯化水至 1 L,加热煮沸 5 min,期间需不停搅拌防止食物变质或者粘锅。煮沸后待温度降至 60~70 °C 时加入 1 g 苯甲酸钠、2.5 mL 尼泊金甲酯、6.9 mL 丙酸,充分混匀后,用移液管分装至果蝇培养管中,每管分装 10 mL。待培养基凝固后,塞海绵塞于 4 °C 保存。

1.1.2 品系果蝇

UAS-RagA RNAi (Bloomington 果蝇库存中心,CTCGGAGGCTACGCTAGTCAA 为 RNA 干扰的靶点序列)、*nprl2⁻¹/FM7* (实验室保存)、*Esg-gal4*, *UAS-GFP*, *Tub-gal80^{ts}* (以下简称 *Esg^{ts}-GAL4*, Bloomington 果蝇库存中心)、*UAS-HA-RagA* (实验室制备, RNA 干扰处的靶点序列被

同义突变序列 ATCAGAAGCAACACTTGTAAG 所替代)、*UAS-mCherry RNAi* (Bloomington 果蝇库存中心)、*yw* (Bloomington 果蝇库存中心)。

1.1.3 试剂

1×磷酸盐缓冲液[生工生物工程(上海)股份有限公司]、甲醇(国药集团化学试剂有限公司)、4%多聚甲醛[PFA, 生工生物工程(上海)股份有限公司]、Triton X-100 [生工生物工程(上海)股份有限公司]、正庚烷(上海麦克林生化科技有限公司)、Prospero 抗体(DSHB)、HRP-Mouse 二抗 (Jackson Immuno Research)、DAPI (Beyotime)、快速基因鉴定试剂盒(Bimake)、*Taq Plus Master Mix II (Dye Plus)* (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、qPCR 试剂盒(康为试剂生物科技股份有限公司)、Trizol (北京艾德莱生物科技股份有限公司)、HiScript[®] III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、亮蓝(Solarbio)、蔗糖[生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 PCR 鉴定 *nprl2* 突变体

随机收取 *yw*、*nprl2* 突变体果蝇, 每管 1 只果蝇, 利用快速基因鉴定试剂盒裂解果蝇, 根据其说明书配制新鲜组织消化液, PCR 仪中裂解程序为 55 °C 15 min, 95 °C 5 min, 获得 PCR 反应模板, 再利用 *nprl2* 突变体的鉴定引物进行 PCR 验证。PCR 反应体系为: 1 μL 模板, 5 μL *Taq Plus Master Mix II*, 0.8 μL 引物, 3.2 μL 水。PCR 扩增引物见表 1。扩增程序: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 1 min 15 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像仪拍照记录。

1.2.2 qPCR 检测 *RagA* 干扰效率

GAL4/UAS 是起源于酵母的基因表达调控系统。GAL4 是转录调控因子, 可以特异性

表 1 本文所用的引物信息及序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>nprl2</i> mutant-F	CCGCTTATCCAGTTGGCAGA	917
<i>nprl2</i> mutant-R	TGTGGATGCGGTGATACTGG	917
RagA-F	GCCAGAGCAAGAAGAACC	140
RagA-R	CAATGAAAGCGGCAAAT	140

地与 UAS 序列结合并诱导其下游序列的表达。果蝇中的 RNA 干扰是利用 GAL4 控制 UAS 携带的 dsRNA 的表达, dsRNA 能诱导出一种 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 与 dsRNA 结合, dsRNA 可以特异性识别目的序列的靶标位点, RISC 发挥核酸酶活性, 从而将 mRNA 降解, 达到对目的基因的干扰。在 *Esg^{ts}-GAL4; UAS-RagA RNAi* 或 *Esg^{ts}-GAL4; UAS-RagA* 果蝇中, 肠道前体细胞中表达的 *Esg* 基因启动子控制 GAL4 的表达, 分别使 UAS 序列下游靶向 *RagA* 的 RNA 干扰序列或 *RagA* 的编码序列在肠道细胞中表达, 达到敲减 *RagA* 或过表达 *RagA* 的作用。解剖不同基因型果蝇肠道, Trizol 法提取 RNA, 将 RNA 定量后反转录得到相应的 cDNA, 使用 qPCR 试剂盒和 *RagA* 检测引物进行(real-time quantitative PCR, qPCR)扩增, 扩增程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 20 s, 60 °C 60 s, 40 个循环。qPCR 反应体系: 2×PCR 预混反应液 5 μL, 上下游引物各 0.2 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 补至 10 μL。扩增引物见表 1。实时荧光定量检测对照、*RagA* 干扰和 *RagA* 过表达果蝇中 *RagA* 的相对表达量, 以 *rp49* 为内参基因, 使用 2^{-ΔΔCt} 方法分析基因表达水平。

1.2.3 免疫荧光检测蛋白表达

在 1×磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中解剖不同基因型果蝇肠道, 置于 1 mL 4% PFA 中固定 30 min 后, 加入等体积

的正庚烷和甲醇并晃动 30 s, 用甲醇洗 2 次, 每次 5 min, 再用 0.4% PBST (PBS 溶液中含 0.4% Triton X-100)洗 3 次, 每次 15 min, 加一抗, 室温孵育 4 h 或 4 °C 过夜, 回收一抗, 再用 0.4% PBST 洗 3 次, 每次 15 min。加入荧光二抗, 室温孵育 2 h 或 4 °C 过夜, 回收二抗, 用 0.4% PBST 洗 3 次, 每次 15 min。封片用 ProLong[®] Gold Antifade Reagent with DAPI 显示细胞核, 用 Zeiss 880 共焦显微镜获取图像。

1.2.4 毛细管(CAFE)喂养

取底部加水约 10 mL 的果蝇瓶(提供湿度), 在其中放入果蝇管, 将直径 0.5 mm 毛细管插在果蝇管中间。毛细管中装有 0.5%亮蓝(5%蔗糖溶液中含有 0.5%亮蓝)溶液, 顶部用矿物油密封。每管 10 只果蝇, 24 h 后根据毛细管中亮蓝的消耗量计算每只果蝇的摄食量。5 个生物学重复。

1.2.5 亮蓝染料示踪

配置 0.5%非吸收型亮蓝溶液, 在空果蝇管中加入 200 μL 含有 0.5%亮蓝溶液的滤纸片, 取 50 只雄果蝇放于果蝇管中, 每天更换滤纸片, 72 h 后将果蝇转移至无亮蓝果蝇食物中, 统计果蝇体内无亮蓝果蝇的比例。

1.3 统计学分析

利用 Image J 软件对果蝇前胃大小和肠道宽度测量及统计。运用单因素方差分析法、Tukey 法进行显著性差异分析, 不同字母表示存在显著性差异。

2 结果与分析

2.1 突变及干扰果蝇的验证

实验室保种 *npr12* 突变体果蝇是由 CRISPR/Cas9 基因组编辑所得^[22], 如图 1A 所示, *npr12* 突变体果蝇缺失了绝大部分 *npr12* 的编码区。使用如图所示 1A 的引物, 以果蝇基因组为模板, PCR 鉴定 *npr12* 突变体是否正确。预计对照果

蝇(*yw*)的条带是 2 076 bp, *npr12* 突变体条带是 917 bp, 凝胶电泳结果(图 1B)显示, *yw*、*npr12* 条带大小在预期位置, 表明实验果蝇是 *npr12* 突变体。

荧光定量 PCR 的方法检测 *RagA* 敲减果蝇和 *RagA* 过表达果蝇中 *RagA* 基因在 mRNA 水平表达的改变, 结果如图 1C 所示, 肠道中干扰 *RagA* 时, *RagA* 的表达量显著降低; 而在肠道中过表达 *RagA* 时, *RagA* 的表达量显著增高, 表明 *RagA* 敲减及转基因果蝇均有效。

2.2 HA-RagA 挽救 RagA 干扰的表型

我们前期研究中发现 *npr12* 突变导致果蝇肠道变细, 这与 TORC1 活性过分增加相关。体外培养细胞研究发现, Rag GTPases 参与 Npr12 对 TORC1 活性的调节, 为了研究 Rag GTPase 的组分蛋白 RagA 对肠道发育的调节作用, 我们利用肠道前体细胞表达的 *Esg-GAL4* 驱动 *UAS-RagA RNAi* 的表达(基于 GAL4/UAS 系统), 检测在果蝇肠道中敲减 *RagA* 后, 肠道形态的改变。解剖果蝇肠道, 显微镜下拍照(图 2A–2C), 利用 Image J 对后中肠进行统计, 发现 *RagA* 干扰果蝇肠道后中肠变粗(图 2D)。为了排除 RNA 干扰的脱靶效应, 我们在 *RagA* 干扰的基础上, 过表达 RNA 干扰靶点同义突变的 *RagA*。通过遗传杂交, 得到在 *RagA* 干扰的背景下过表达 *RagA* 的果蝇(*Esg^{ΔS}-GAL4; HA-RagA; UAS-RagAi*), 解剖果蝇肠道对其宽度进行统计。过表达 *RagA* 可以挽救 *RagA* 干扰果蝇肠道变粗的表型(图 2D), 该结果说明 *RagA* 干扰果蝇肠道变粗的表型是由 RagA 缺失所导致。

2.3 RagA 干扰对 npr12 突变体果蝇肠道形态的影响

我们前期研究发现 *npr12* 突变果蝇肠道的后中肠变细, 而 *RagA* 干扰果蝇的肠道变粗。以前的研究表明, Npr12 促进与 RagA 结合的

GTP 水解为 GDP,进而抑制 TORC1 活性。*Nprl2* 可能是通过抑制 Rag GTPase 的活性,进而调节果蝇肠道的发育。为了验证这一假设,我们将 *nprl2⁻/FM7; Esg-gal4, UAS-GFP, Tub-gal80^{ts}/SM6 (nprl2⁻; Esg^{ts}-GAL4)* 处女蝇与 *UAS-RagA*

RNAi 雄果蝇杂交,得到子代果蝇 *Esg^{ts}-GAL4* (对照)、*nprl2⁻; Esg^{ts}-GAL4* (突变 *nprl2*)、*Esg^{ts}-GAL4; UAS-RagAi* (敲减 *RagA*)、*nprl2⁻; Esg^{ts}-GAL4; UAS-RagAi* (敲减 *RagA* 并突变 *nprl2*)。解剖雄果蝇肠道并显微镜下拍照(图 3A–3D), 对不同基

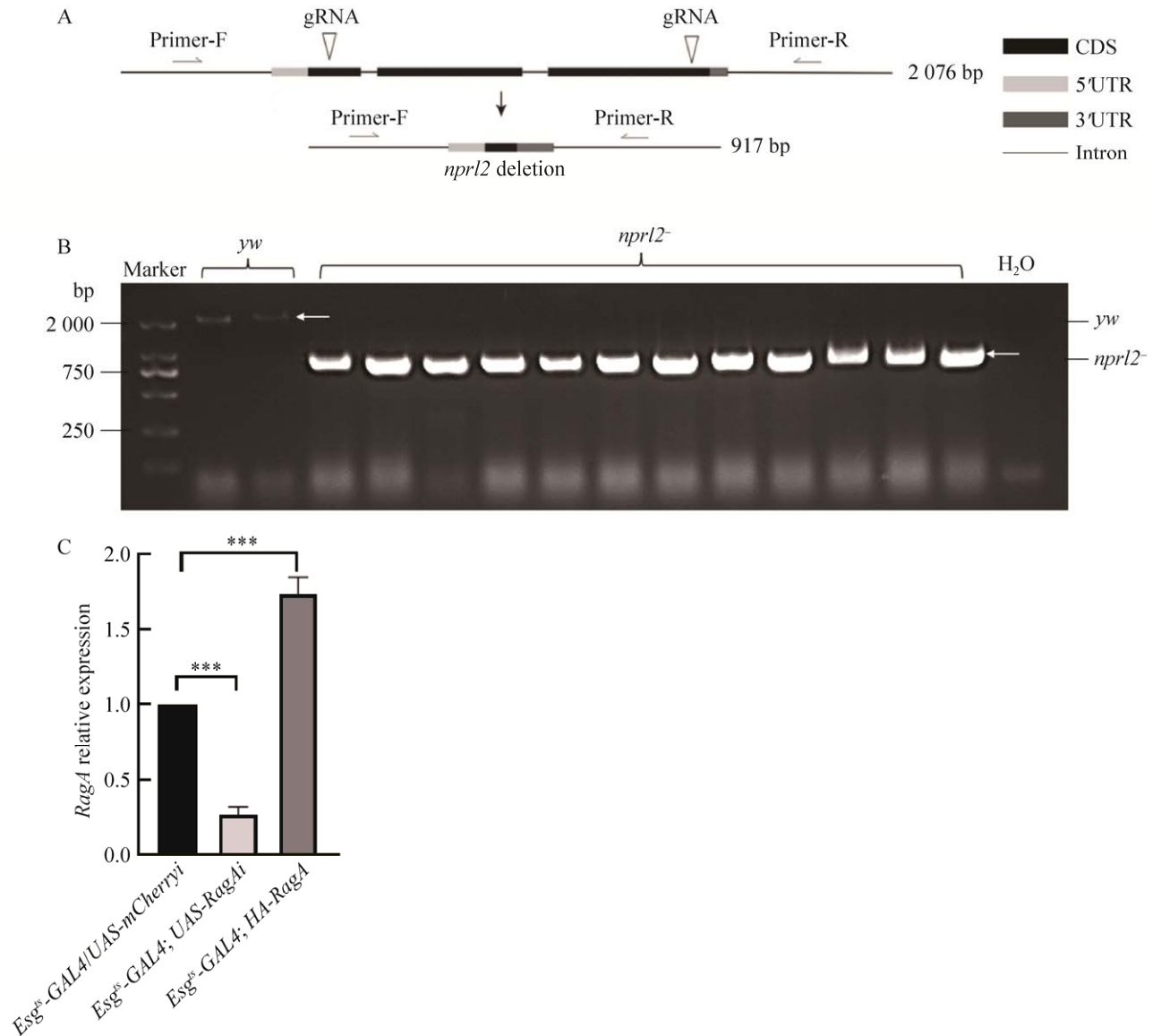


图 1 利用 PCR 鉴定 *nprl2* 突变体以及 qPCR 检测肠道中干扰 *RagA* 的干扰效率

Figure 1 PCR was used to identify *nprl2* mutants and qPCR was used to detect the interference efficiency of *RagA* in intestine. A: Schematic representation of mutant *Drosophila*. B: Gel electrophoresis of *yw* and *nprl2* flies identified by PCR. Left-to-right stripe order: 1 is marker; 2–3 are *yw*; 4–15 are *nprl2⁻*; 16 is H₂O. C: qPCR was used to verify the interference efficiency of *RagA* and the expression level of *RagA* in overexpressed flies. ***: $P < 0.001$.

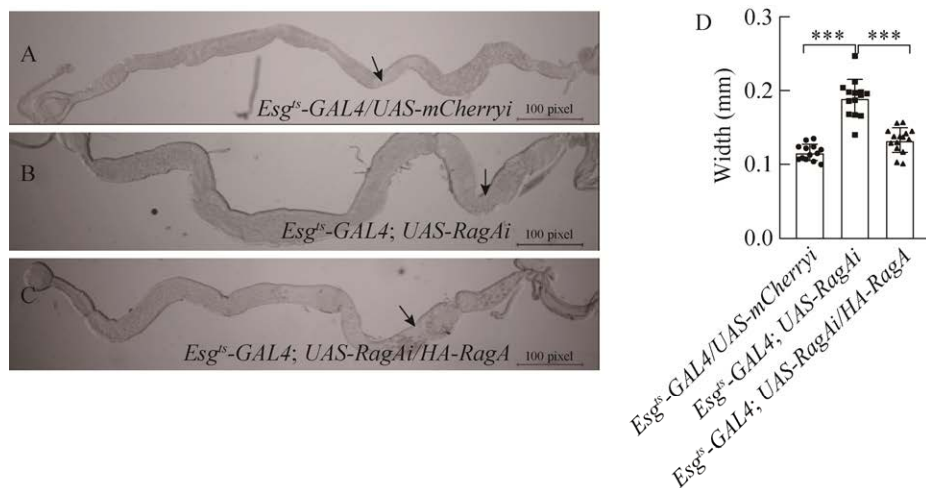


图2 不同基因型肠道形态及过表达 *RagA* 挽救 *RagA* 干扰果蝇肠道形态的统计

Figure 2 Intestinal photographs of different genotypes and statistical maps of intestinal width. A–C: Intestinal morphological maps of different genotypes of *Drosophila*. D: Statistics of posterior midgut width in *Drosophila* genotypes. ***: $P < 0.001$.

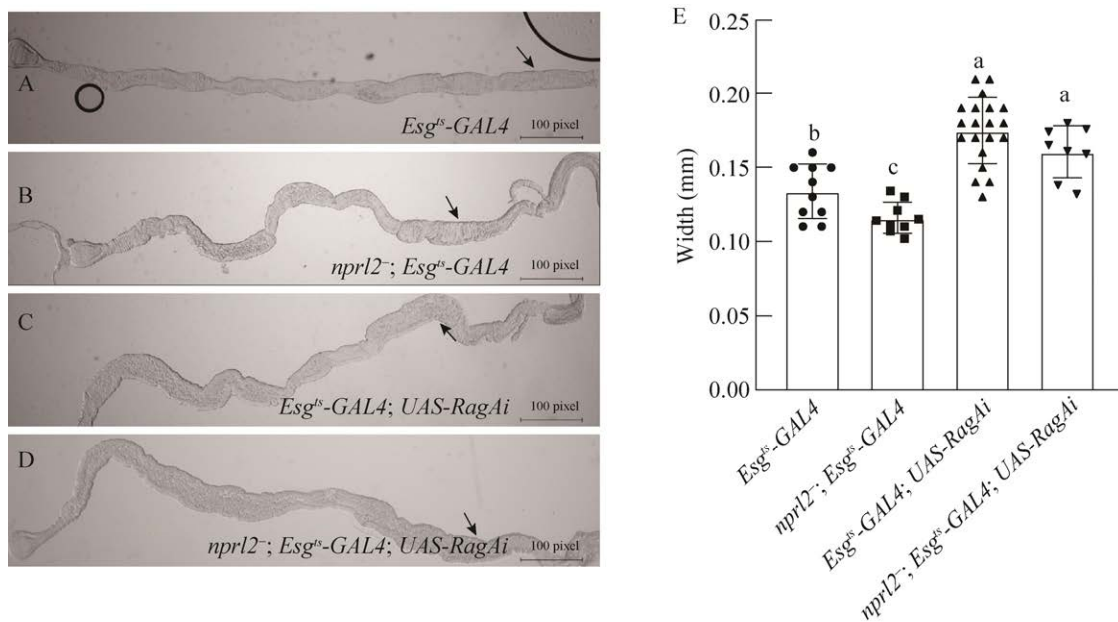


图3 不同基因型肠道形态及 *RagA* 对 *nprl2* 果蝇肠道形态的影响

Figure 3 Intestinal photographs of different genotypes and statistical maps of intestinal width. A–D: Intestinal morphological maps of different genotypes of *Drosophila*. E: Statistics of posterior midgut width in *Drosophila* genotypes. The same letter represent insignificant difference, different letters represent significant differences.

因型果蝇后中肠宽度进行统计。与对照相比，*nprl2* 突变果蝇(*nprl2⁻; Esg^{ts}-GAL4*)的后中肠变细，而敲减 *RagA* 果蝇(*Esg^{ts}-GAL4; UAS-RagAi*)

的后中肠变粗。敲减 *RagA* 并突变 *nprl2* (*nprl2⁻; Esg^{ts}-GAL4; UAS-RagAi*)与单独敲减 *RagA* 类似，果蝇的后中肠呈现变粗的表型(图 3E)。

2.4 *RagA* 干扰对 *nprl2* 突变体果蝇肠道 EE 细胞的影响

我们前期还发现, *nprl2* 突变体中肠 EE 细胞数目变少。为了检测 *Nprl2* 对中肠 EE 细胞数目的调节是否是通过 *Rag* GTPases 实现, 解剖 *Esg^{ts}-GAL4*、*nprl2⁻*; *Esg^{ts}-GAL4*、*Esg^{ts}-GAL4*; *UAS-RagAi*、*nprl2⁻*; *Esg^{ts}-GAL4*; *UAS-RagAi* 雄果蝇肠道, 用 EE 细胞中特异性表达的 Prospero 蛋白抗体进行免疫荧光染色后计数不同基因型果蝇肠道 EE 细胞数目, 统计单位面积中 EE 细胞密度。与对照相比, *nprl2* 突变果蝇中肠 EE 细胞数目变少, *RagA* 干扰果蝇中肠的 EE 细胞增多, 敲减 *RagA* 可以挽救 *nprl2* 突变果蝇中肠 EE 细胞变少的表型(图 4A–4E), 但并不能将 EE 细胞数目增加到与单独敲减 *RagA* 类似的水平。

2.5 *RagA* 干扰对 *nprl2* 突变体果蝇前胃大小的影响

为了研究 *Nprl2* 对前胃体积的调节是否通过抑制 *Rag* GTPases 的活性实现的, 我们解剖了 *Esg^{ts}-GAL4*、*nprl2⁻*; *Esg^{ts}-GAL4*、*Esg^{ts}-GAL4*; *UAS-RagAi*、*nprl2⁻*; *Esg^{ts}-GAL4*; *UAS-RagAi* 雄果蝇前胃并在显微镜下拍照, 利用 Image J 对其前胃面积进行统计。与对照相比, *nprl2* 突变体前胃增大, 单独敲减 *RagA* 果蝇的前胃也变大(图 5A–5D)。敲减 *RagA* 并突变 *nprl2* (*nprl2⁻*; *Esg^{ts}-GAL4*; *UAS-RagAi*) 果蝇前胃的膨大程度与单独突变 *nprl2* 类似(图 5E)。为了排除进食以及代谢对前胃大小造成的影响, 首先采用毛细管喂养法对不同基因型果蝇进食量进行统计^[25], 统计结果显示不同基因型的果蝇进食

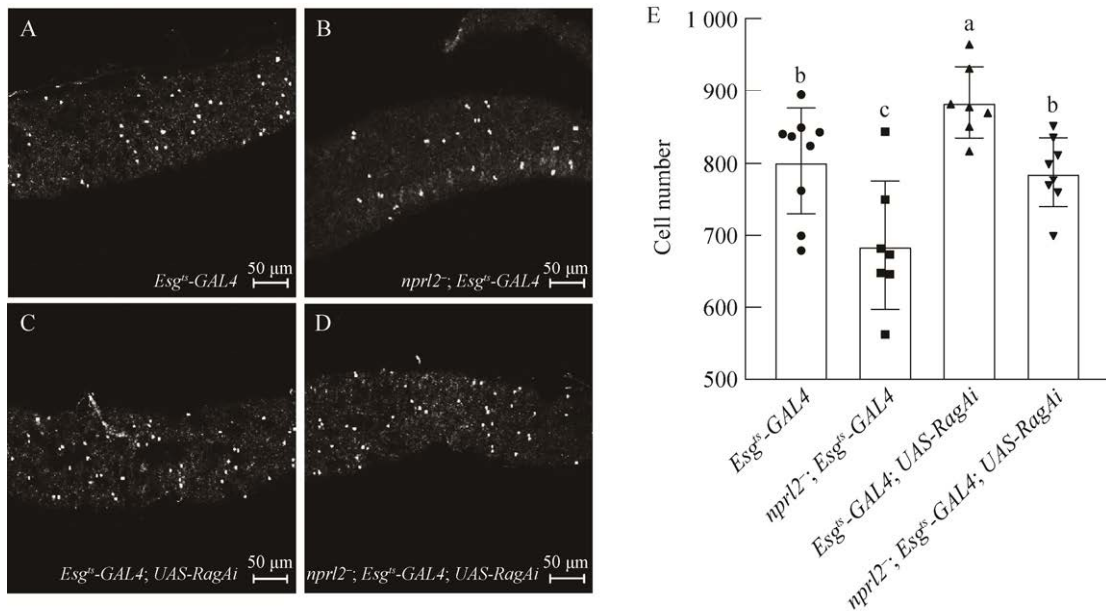


图 4 Prospero 抗体标记不同基因型果蝇肠道肠内分泌细胞及 *RagA* 对 *nprl2* 果蝇肠道单位面积中肠内分泌细胞的影响

Figure 4 Prospero antibody labels different genotypes of *Drosophila* enteroendocrine cells and the effect of *RagA* on enteroendocrine cells per unit area of *nprl2* *Drosophila* gut. A–D: Labeling of intestinal enteroendocrine cells of different genotypes of *Drosophila* with Prospero antibody. E: Statistical graph of enteroendocrine cells per unit area of the gut of *Drosophila* genotypes. The same letter represent insignificant difference, different letters represent significant differences.

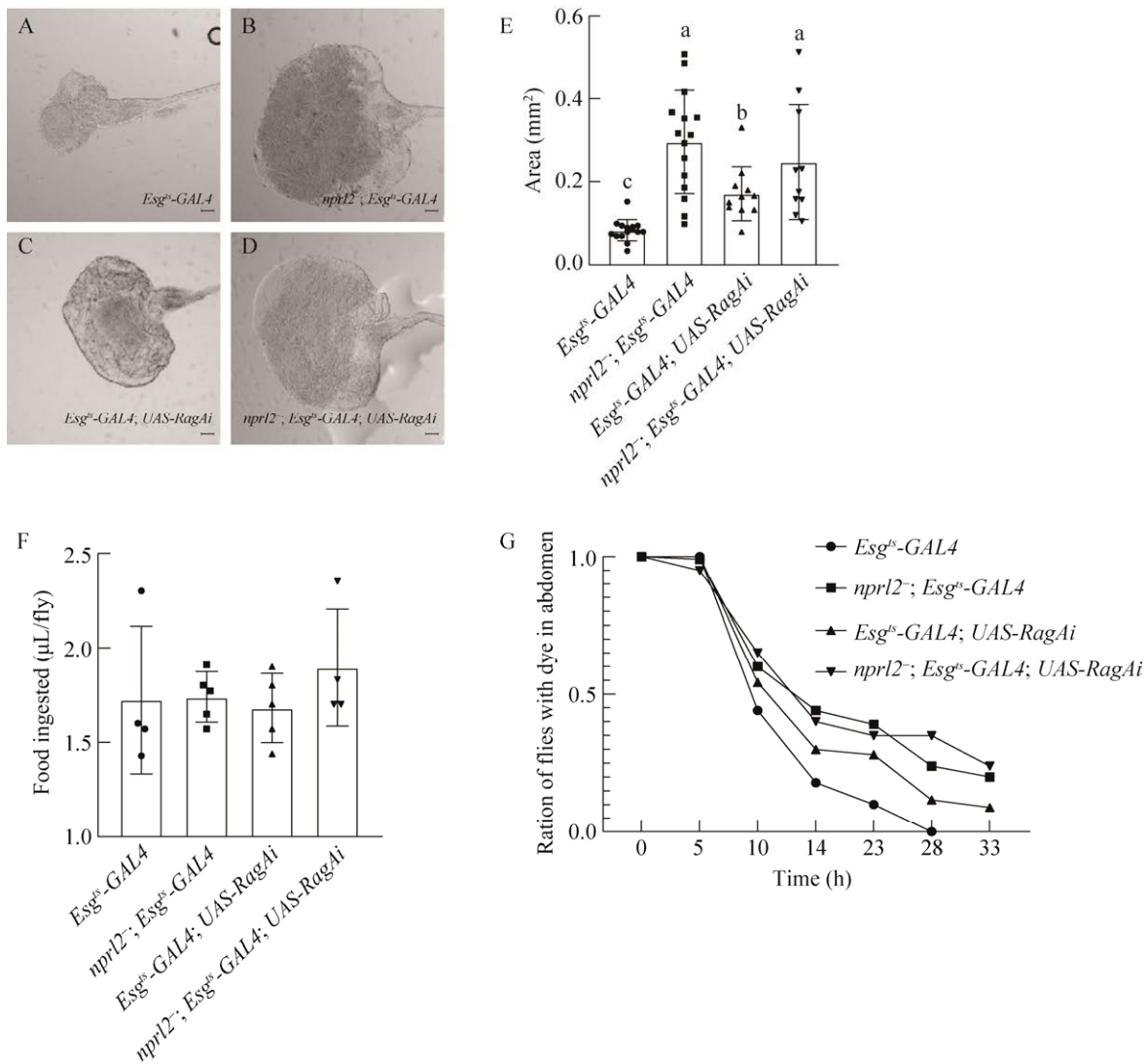


图 5 不同基因型雄果蝇前胃形态及 RagA 对 *nprl2* 果蝇前胃大小的影响

Figure 5 Effects of different genotypes of male *Drosophila* anterior stomach morphology and RagA on the size of the anterior stomach of *nprl2* *Drosophila*. A–D: Morphology of the anterior stomach of *Drosophila* of different genotypes. E: Statistics of the size of the anterior stomach of *Drosophila* of different genotypes. F: CAFE assay to quantify food ingestion. G: The proportion of dye present in *Drosophila* was calculated by brilliant blue dye tracer. Scale label represent 20 pixels. The same letter represent insignificant difference, different letters represent significant differences.

量没有显著差异(图 5F)。接着我们用亮蓝染料示踪的方法发现, *nprl2* 突变果蝇体内的食物滞留时间长; 单干扰 *RagA* 果蝇体内食物滞留时间也比对照长, 但短于 *nprl2* 突变体。敲减 *RagA* 并突变 *nprl2* 果蝇体内食物的滞留时间与单独 *nprl2* 突变体类似(图 5G)。

3 讨论

在体外培养细胞和成体果蝇中的研究发现, 作为 GATOR1 的组分蛋白, Nprl2 促进与 RagA 结合的 GTP 水解为 GDP, 抑制 TORC1 的活性。我们之前的研究发现, Nprl2 通过调节

TORC1 活性, 影响肠道发育^[23], 但是 Rag GTPase 在肠道功能和发育中的作用尚不明确。本实验在此基础上, 研究 Rag GTPase 和 Nprl2 在调节肠道功能和发育方面的作用关系。通过对果蝇肠道形态(宽)、前胃面积大小、EE 细胞数目等的统计结果分析, 我们发现敲减 *RagA* 能够挽救 *nprl2* 突变体肠道变细和肠内分泌细胞数目减少的表型; 但不能挽救 *nprl2* 突变体前胃增大的表型。

我们以前的研究发现, *nprl2* 缺失引起 TORC1 活性增加, 会导致肠道变细。*RagA* 缺失会引起 TORC1 活性降低^[26]。本研究中 *nprl2* 突变果蝇也呈现肠道变细表型, 而与 *nprl2* 突变引起肠道变细的表型相反, 敲减 *RagA* 会引起肠道变粗。重要的是, 同时敲减 *RagA* 和突变 *nprl2* 会引起肠道呈现与单独敲减 *RagA* 类似的肠道变粗表型, 表明 Nprl2 通过作用于 Rag GTPase, 抑制 TORC1 活性, 进而影响肠道发育。本研究提示降低 TORC1 活性促进肠道变粗, 而增加 TORC1 活性使肠道变细, 这与普遍认为的 TORC1 促进细胞生长的预期相反, 可能与我们之前报道的 TORC1 活性增加会引起细胞凋亡相关^[27], 对 RagA 促进肠道变粗的机制还需深入研究。

EE 细胞能够分泌激素, 激素具有微量高效的特点, 对全身起到调控作用。我们前期研究发现 *nprl2* 突变体中的 EE 细胞明显减少, 与 TORC1 过度激活有关^[23]。本研究中, *nprl2* 缺失果蝇的 EE 细胞减少, 而敲减 *RagA* 时 EE 细胞数目增加。敲减 *RagA* 可以挽救 *nprl2* 突变果蝇肠道中的 EE 细胞数目减少的表型。表明 Nprl2 通过作用于 Rag GTPase, 抑制 TORC1 活性, 进而影响 EE 细胞分化。值得注意的是, 单独敲减 *RagA* 不能将 *nprl2* 缺失果蝇中的 EE 细胞恢复至单独敲减 *RagA* 的水平, 这可能是

由于 RagA 的敲减效率不足所致, 也可能是由于 Nprl2 除了通过 RagA, 还有其他机制调节肠道发育。后期需制备 *RagA* 基因缺失果蝇进行确认。

果蝇的前胃具有储存食物的功能。我们前期研究发现, *nprl2* 突变果蝇的前胃增大, 有较多的食物堆积; 进一步发现取食量与对照无差别, 但食物在胃肠道中的滞留时间延长, 这可能是由于 *nprl2* 突变体前胃收缩能力减弱, 导致食物堆积, 引起前胃膨大^[23]。本研究中, 我们统计结果显示 *nprl2* 突变体果蝇前胃膨大。但同时也发现, *RagA* 干扰果蝇也表现出前胃增大的表型。之前的研究表明 Nprl2 通过调节 TORC1 活性, 进而调节前胃发育。本实验发现敲减 *RagA* 并突变 *nprl2* 果蝇呈现与单独突变 *nprl2* 果蝇类似的前胃膨大表型。果蝇取食实验发现进食量无显著差异, 与对照相比其他果蝇肠道中食物滞留时间均延长。表明在促进食物的消化和前胃动力方面, Nprl2 对 TORC1 活性的调节可能不依赖于 Rag GTPases。

4 结论

本研究以果蝇肠道组织作为研究对象, 探究 Nprl2 通过抑制 TORC1 活性, 影响肠道功能和发育的作用是否是通过调节 Rag GTPase 活性实现的。我们的结果初步表明在中肠发育和细胞分化中, Nprl2 通过作用于 Rag GTPase 调节 TORC1 活性实现; 而在前胃动力方面, Nprl2 对 TORC1 活性的调节可能不依赖于 RagA。

REFERENCES

- [1] ZHAI ZZ, BOQUETE JP, LEMAITRE B. Cell-specific imd-NF- κ B responses enable simultaneous antibacterial immunity and intestinal epithelial cell shedding upon bacterial infection[J]. *Immunity*, 2018, 48(5): 897-910.

- [2] LI HJ, JASPER H. Gastrointestinal stem cells in health and disease: from flies to humans[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2016, 9(5): 487-499.
- [3] STRAND M, MICCHELLI CA. Regional control of *Drosophila* gut stem cell proliferation: EGF establishes GSSC proliferative set point & controls emergence from quiescence[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80608.
- [4] MIGUEL-ALIAGA I, JASPER H, LEMAITRE B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*[J]. *Genetics*, 2018, 210(2): 357-396.
- [5] TAKASHIMA S, MKRTCHYAN M, YOUNOSSI-HARTENSTEIN A, MERRIAM JR, HARTENSTEIN V. The behaviour of *Drosophila* adult hindgut stem cells is controlled by Wnt and Hh signalling[J]. *Nature*, 2008, 454(7204): 651-655.
- [6] FERRANDON D. The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2013, 25(1): 59-70.
- [7] REN WY, ZHANG Y, LI M, WU LF, WANG GL, BAEG GH, YOU J, LI ZH, LIN XH. Windpipe controls *Drosophila* intestinal homeostasis by regulating JAK/STAT pathway via promoting receptor endocytosis and lysosomal degradation[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(4): e1005180.
- [8] ZHOU J, FLORESCU S, BOETTCHER AL, LUO LC, DUTTA D, KERR G, CAI Y, EDGAR BA, BOUTROS M. Dpp/Gbb signaling is required for normal intestinal regeneration during infection[J]. *Developmental Biology*, 2015, 399(2): 189-203.
- [9] 刘强, 金丽华. 果蝇肠道干细胞增殖与分化机制及其研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(10): 911-919.
- LIU Q, JIN LH. The functional mechanisms and research progresses of midgut intestinal stem cells in *Drosophila*[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2015, 42(10): 911-919 (in Chinese).
- [10] HUNG RJ, LI JSS, LIU YF, PERRIMON N. Defining cell types and lineage in the *Drosophila* midgut using single cell transcriptomics[J]. *Current Opinion in Insect Science*, 2021, 47: 12-17.
- [11] HUNG RJ, HU YH, KIRCHNER R, LIU YF, XU CW, COMJEAN A, TATTIKOTA SG, LI FG, SONG W, HO SUI S, PERRIMON N. A cell atlas of the adult *Drosophila* midgut[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(3): 1514-1523.
- [12] HE L, SI GW, HUANG JH, SAMUEL ADT, PERRIMON N. Mechanical regulation of stem-cell differentiation by the stretch-activated Piezo channel[J]. *Nature*, 2018, 555(7694): 103-106.
- [13] ZENG XK, HOU SX. Enteroendocrine cells are generated from stem cells through a distinct progenitor in the adult *Drosophila* posterior midgut[J]. *Development*, 2015, 142(4): 644-653.
- [14] SATO T, CLEVERS H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications[J]. *Science*, 2013, 340(6137): 1190-1194.
- [15] LIU Q, JIN LH. The zinc finger protein CG12744 is essential for differentiation and regeneration after infection in the adult *Drosophila* midgut[J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 361(2): 225-235.
- [16] 龚睿. Rag GTPases 蛋白复合物介导氨基酸激活 mTORC1 的分子机制研究[D]. 上海: 复旦大学博士学位论文, 2013.
- GONG R. The molecular mechanism of amino acid activation of mTORC1 mediated by Rag GTPases protein complex[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Fudan University, 2013 (in Chinese).
- [17] ZHU M and WANG XQ. Regulation of mTORC1 by small GTPases in response to nutrients[J]. *The Journal of Nutrition*, 2020, 150(5): 1004-1011.
- [18] KWAK SS, KANG KH, KIM S, LEE S, LEE JH, KIM JW, BYUN B, MEADOWS GG, JOE CO. Amino acid-dependent NPRL2 interaction with Raptor determines mTOR complex 1 activation[J]. *Cellular Signalling*, 2016, 28(2): 32-41.
- [19] LAWRENCE RE, CHO KF, RAPPOLD R, THRUN A, TOFAUTE M, KIM DJ, MOLDAVSKI O, HURLEY JH, ZONCU R. A nutrient-induced affinity switch controls mTORC1 activation by its Rag GTPase-ragulator lysosomal scaffold[J]. *Nature Cell Biology*, 2018, 20(9): 1052-1063.
- [20] ALGRET R, FERNANDEZ-MARTINEZ J, SHI Y, KIM SJ, PELLARIN R, CIMERMANCIC P, COCHET E, SALI A, CHAIT BT, ROUT MP, DOKUDOVSKAYA S. Molecular architecture and function of the SEA complex, a modulator of the TORC1 pathway[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2014, 13(11): 2855-2870.
- [21] DUTCHAK PA, LAXMAN S, ESTILL SJ, WANG CS, WANG Y, WANG YG, BULUT GB, GAO JM, HUANG LJ, TU BP. Regulation of hematopoiesis and

- methionine homeostasis by mTORC1 inhibitor NPRL2[J]. *Cell Reports*, 2015, 12(3): 371-379.
- [22] WEI YH, REVEAL B, CAI WL, LILLY MA. The GATOR1 complex regulates metabolic homeostasis and the response to nutrient stress in *Drosophila melanogaster*[J]. *G3 Genes Genomes Genetics*, 2016, 6(12): 3859-3867.
- [23] XI JM, CAI JD, CHENG Y, FU YY, WEI WH, ZHANG ZB, ZHUANG ZH, HAO Y, LILLY MA, WEI YH. The TORC1 inhibitor Nprl2 protects age-related digestive function in *Drosophila*[J]. *Aging*, 2019, 11(21): 9811-9828.
- [24] FIGLIA G, MÜLLER S, HAGENSTON AM, KLEBER S, ROIUK M, QUAST JP, TEN BOSCH N, CARVAJAL IBAÑEZ D, MAUCERI D, MARTIN-VILLALBA A, TELEMANN AA. Brain-enriched RagB isoforms regulate the dynamics of mTORC1 activity through GATOR1 inhibition[J]. *Nature Cell Biology*, 2022, 24(9): 1407-1421.
- [25] JA WW, CARVALHO GB, MAK EM, NN de la ROSA, FANG AY, LIONG JC, BRUMMEL T, BENZER S. Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(20): 8253-8256.
- [26] EFEYAN A, SCHWEITZER LD, BILATE AM, CHANG S, KIRAK O, LAMMING DW, SABATINI DM. RagA, but not RagB, is essential for embryonic development and adult mice[J]. *Developmental Cell*, 2014, 29(3): 321-329.
- [27] WEI YH, LILLY MA. The TORC1 inhibitors Nprl2 and Nprl3 mediate an adaptive response to amino-acid starvation in *Drosophila*[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2014, 21(9): 1460-1468.

(本文责编 陈宏宇)