# 棉铃虫载脂蛋白受体基因克隆及转录分析

刘香亚[1]， 杨蕊弘[1]， 张 晶[1]， 彭英传[1]， 肖海军[2]， 张万娜[1*]

(1. 江西农业大学，南昌 330045；2. 北京林业大学，北京 100083)

**摘要** 载脂蛋白受体(lipophorin receptor，LpR)在昆虫体内脂质转运中发挥重要作用。为了明确棉铃虫载脂蛋白受体基因在其卵巢发育及饥饿胁迫中的功能，本研究克隆了棉铃虫 *HaLpR* 基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号 KU355886.1)，全长 3 117 bp，开放阅读框为 2 643 bp，编码 880 个氨基酸；其氨基酸序列包含典型的低密度脂蛋白受体结构域，与其他鳞翅目昆虫的 LpR 相似度＞80%。荧光定量 PCR 检测结果显示，*HaLpR* 在雌蛾的卵巢和脂肪体组织中相对转录水平最高；在雌蛾卵子发生期均有转录，在雌蛾羽化后 3 d 表达量达到最高峰；饥饿处理会抑制 *HaLpR* 在雌蛾卵巢和脂肪体中的转录。研究结果有助于解析 HaLpR 参与棉铃虫卵巢发育过程中的脂质转运以及应对饥饿胁迫的作用。

**关键词** 棉铃虫； 载脂蛋白受体； 卵巢； 脂肪体； 饥饿处理

**中图分类号：** Q963 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2022375

# Molecular cloning and transcription analysis of lipoprotein receptor in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera：Noctuidae)

LIU Xiangya[1]， YANG Ruihong[1]， ZHANG Jing[1]， PENG Yingchuan[1]， XIAO Haijun[2]， ZHANG Wanna[1*]

(1. *Jiangxi Agricultural University*，*Nanchang* 330045，*China*；2. *Beijing Forestry University*，*Beijing* 100083，*China*)

**Abstract** The lipophorin receptor (LpR) plays an important role in lipid transport in insects. To investigate the function of LpR in the ovary development and starvation stress in *Helicoverpa armigera*, the cDNA sequence of *HaLpR* was obtained using RT-PCR and RACE technology (GenBank accession no. KU355886.1). The length of cDNA was 3 117 bp including an open reading frame (ORF) of 2 643 bp, encoding 880 amino acids. It had the typical conserved domains of low-density lipoprotein (LDL) receptor family. Multiple sequence alignment revealed that HaLpR shared a high similarity (up to 80%) with other lepidopteran insects. qRT-PCR analysis showed that *HaLpR* was highly expressed in the ovary and fat body of female adult, and it was transcribed during oogenesis at a peak level in the 3-day-old female. Nevertheless, the expression of *HaLpR* in the ovary and fat body was suppressed after starvation. Our findings therefore help understand the roles of HaLpR in lipid transportation and starvation stress during ovarian development in *H. armigera*.

**Key words** *Helicoverpa armigera*； lipophorin receptor； ovary； fat body； starvation

昆虫的生殖与营养状况息息相关[1]，卵巢作为雌虫繁衍的生殖器官，其发育调控关系昆虫的种群密度，解析卵巢发育过程中营养的积累过程，有助于探索针对害虫生殖进行防控的策略来控制害虫种群繁殖。昆虫卵母细胞内需要积累充足糖原、脂质和蛋白质，为胚胎发育提供能量和营养[2]。关于昆虫卵母细胞中蛋白质的积累研究已较为明确[3]，雌性脂肪体内合成的卵黄原蛋白(vitellogenin，Vg)分泌到血淋巴后，通过卵黄原蛋白受体(vitellogenin receptor，VgR)介导的内吞作用，被发育的卵母细胞摄取[4-5]。然而脂质如何在卵母细胞中积累，尤其是脂类运输所依赖受体的转运过程尚不清楚。脂质占昆虫卵干重的 30%～40%[6-7]，昆虫利用脂肪酸合成甘油三酯(triacylglycerol，TAG)，为昆虫胚胎发育提供主要的能量来源[8]，但卵母细胞自身合成脂肪酸的能力非常有限，因此昆虫卵母细胞中积累的

**收稿日期：** 2022-06-29 **修订日期：** 2022-09-05

**基金项目：** 国家自然科学基金(32060642)；江西省自然科学基金(20202ACBL205004，20212BAB205004)；江西农业大学创新创业项目(202210410120)

* 通信作者 E-mail：zhangwanna880210@yeah.net

大部分脂质必须从其他组织摄取。在昆虫卵黄发生过程中,脂肪体中的脂类和卵黄蛋白前体依赖载脂蛋白(lipophorin, Lp)转运至卵巢组织[9],在部分昆虫中,Lp也同脂肪体合成的其他卵黄蛋白一起被卵巢吸收[10-12]。然而Lp完成脂质等物质的运输后,需要细胞表面的载脂蛋白受体(lipophorin receptor, LpR)通过内吞作用介导细胞对脂蛋白的摄取和代谢[9]。由此可见,LpR在脂类物质的转运途径中发挥重要作用。

LpR是一种跨细胞膜的糖蛋白,属于低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)超家族,具有LDLR家族的保守结构域[5]:配体结合域(ligand binding domain, LBD)、表皮生长因子前体同源结构域(EGF-precursor homology domain)、O-糖链结构域(O-sugar linked domain)、跨膜结构域(transmembrane domain, TM)及胞质结构域(cytoplasmic domain)。最早从飞蝗 *Locusta migratoria* 中克隆获得昆虫的 *LpR* 基因,功能分析发现LpR充当Lp以内吞的形式进入细胞的受体蛋白[13]。随后在其他昆虫中陆续鉴定出 *LpR* 基因[14-16]。Lee等[17]在大蜡螟 *Galleria mellonella* 中发现20-羟基蜕皮酮(20E)和胆固醇均能诱导 *LpR* 的表达。Ciudad等[18]分别从德国小蠊 *Blattella germanica* 的脂肪体和卵巢中鉴定出了L亚型和S亚型的LpR,进一步分析表明不同亚型在卵黄发生期的表达模式存在差异,干扰 *LpR* 表达后卵母细胞中脂蛋白的含量显著降低。此外,Parra-Peralbo等在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中也鉴定到两种 *LpR* 基因,并发现其能够介导卵母细胞对中性脂质的摄取[19]。Lu等[20]敲除褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 的 *LpR* 基因导致褐飞虱体内TAG含量降低,卵巢发育受阻以及生殖力下降。Qiao等[21]对豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum LpR* 进行RNA干扰,导致其成虫生殖力显著下降。上述研究表明 *LpR* 对雌虫卵巢成熟至关重要。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)是我国重要的农业害虫,其雌成虫需要通过补充营养促使自身性成熟[22]。棉铃虫VgR调控卵母细胞对Vg的摄取,对卵子成熟和卵巢发育至关重要[23],幼虫面临饥饿胁迫会降低体内脂质和蛋白质的含量[24]。本文通过RT-PCR和RACE技术克隆获得棉铃虫 *HaLpR* 基因,分析其序列特征,进一步通过qRT-PCR检测其在棉铃虫雌成虫卵巢发育期间的表达情况,分析了饥饿胁迫对载脂蛋白受体基因表达的影响。本研究有助于阐明载脂蛋白受体参与棉铃虫卵巢发育过程中的脂类转运及应对饥饿胁迫时的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

棉铃虫种群于2018年9月采自河北廊坊中国农业科学院廊坊中试基地。幼虫置于人工气候箱用人工饲料饲养[25]。培养条件为温度(27±2)℃,相对湿度(70±5)%,光周期 L//D=14 h//10 h。待其化蛹后,将雌雄蛹分开后分别置于养虫笼(长40 cm、宽26 cm、高21 cm)中饲养。成虫羽化后,饲喂10%蜂蜜水。

### 1.2 棉铃虫不同发育阶段和组织的样品准备

为了研究 *HaLpR* 在棉铃虫不同发育阶段的表达情况,分别收集卵约200粒、1龄幼虫50头、2龄幼虫10头、3龄幼虫5头、4龄幼虫3头、5龄幼虫3头、6龄幼虫3头、蛹3头以及雌雄成虫各3头,设为1个生物学重复。另外,分别取羽化后1、2、3、4、5、7、8、9 d的雌成虫各2头,用于研究 *HaLpR* 在棉铃虫雌虫发育阶段的表达模式。取6头2日龄棉铃虫雌成虫,置于冰上解剖,分别收集头、表皮、马氏管、血淋巴、中肠、脂肪体和卵巢组织,用于分析 *HaLpR* 在棉铃虫雌虫不同组织的表达情况,除血淋巴外的各组织均用预冷的无菌水清洗,滤纸吸干多余水分,上述所有样品经液氮冷冻后迅速置于-80℃超低温冰箱保存。试验包含4个生物学重复。

选取刚羽化的棉铃虫雌成虫各20头,分别饲喂10%蜂蜜水和清水,设置为对照组和试验组,饲喂24、48、72 h后每个处理随机选取6头成虫,在冰上解剖收集其脂肪体和卵巢,用无菌水洗净,滤纸吸干多余水分,经过液氮冷冻后置于-80℃冰箱保存,用于分析饥饿处理后 *HaLpR* 基因的表达差异,试验包含4个生物学重复。

### 1.3 总RNA提取和cDNA合成

将棉铃虫样品置于预冷的研钵内,加入液氮研磨成粉末后迅速转移到1.5 mL的RNAase离心管中,然后采用TRIzol法提取总RNA,并使用超微量分光光度计和1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的

纯度及完整性。取 2 μg 总 RNA,使用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser(北京天根生物有限公司)合成第一链 cDNA,保存于-20℃冰箱备用。RACE 扩增所需 cDNA 模板使用 SMARTer® RACE 5′/3′ Kit(宝日医生物技术有限公司)合成。

### 1.4　棉铃虫 *HaLpR* 基因的克隆

根据本实验室所测的棉铃虫转录组结果,搜索棉铃虫转录组数据获得载脂蛋白受体的基因片段,利用 Premier 5.0 软件设计特异性引物进行验证,然后设计 5′ RACE 和 3′ RACE 引物(表 1)通过 Advantage® 2 PCR Kit(宝日医生物技术有限公司)分别扩增获得 3′端和 5′端序列,具体操作按照试剂盒说明书进行。将 PCR 扩增片段切胶回收后,使用连接酶将其与 pGM-T 克隆载体(北京全式金生物技术有限公司)连接,转至大肠杆菌感受态细胞 DH5α 中,经过热激、复性、涂板及 37℃过夜培养,挑选阳性菌落进行测序。然后将所得序列片段拼接得到 cDNA 全长序列。设计特异引物 HaLpR-F 和 HaLpR-R 验证开放阅读框,PCR 反应体系为 cDNA 模板 1 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,PCR Master Mix 12.5 μL,dd$H_2O$ 9.5 μL。扩增条件:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,58℃退火30 s,72℃延伸 2 min,35 个循环;72℃延伸 5 min。

**表 1　本试验使用的引物序列**

**Table 1　Primers used in this study**

| 引物 Primer | 引物序列(5′-3′) Primer sequence | 产物长度/bp Expected size | 用途 Purpose |
|---|---|---|---|
| HaLpR-F1 | TCATCACATCAGACGGCTTG | 960 | 扩增中间片段 |
| HaLpR-R1 | GTGCGTAGCCATTCTTCTCG | | |
| HaLpR-F2 | TGCGGGGATGACAGCGA | 502 | |
| HaLpR-R2 | GATGCTTGTCACACACCTTC | | |
| HaLpR-5RACE | CGAACTCCGATGATATGCAGGGTG | 356 | 5′ RACE 扩增 |
| HaLpR-3RACE | ACCGTAATGTTACATCTATGAACTT | 622 | 3′ RACE 扩增 |
| HaLpR-F | ATGTTCCTTTTGGTGGGCT | 2 643 | *HaLpR* 基因开放阅读框验证 |
| HaLpR-R | CTATACAAAGTCATTTGTACC | | |
| qHaLpR-F | ACTGTCCCGATGGAAGTGAC | 192 | 实时荧光定量 PCR |
| qHaLpR-R | CGTTGTTCTTCTCGCATTCA | | |
| β-actin-F | GCGACATCAAGGAGAAGCTG | 231 | |
| β-actin-R | CGTCGCACTTCATGATGGAG | | |

### 1.5　棉铃虫 HaLpR 序列分析及系统发育树的构建

利用 ORF finder(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)查找完整的开放阅读框,并利用 ExPASy 网站 translate tool(https://web.expasy.org/translate/)对 *HaLpR* 基因的 ORF 序列进行翻译,采用 SignalP 4.1 软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/)和 TMHMM-2.0(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php? TMHMM-2.0)预测信号肽和跨膜区,利用 SMART 软件(http://smart.embl-heidelberg.de/)进行结构域分析。根据翻译得到的氨基酸序列,运用 NCBI 的 BLASTP 工具搜索其他昆虫的 LpR 序列,根据搜索到的其他昆虫中同源性高的 LpR 氨基酸序列,利用 ClustalX 和 Genedoc 软件进行多重比较,使用 MEGA 11 软件采用邻位相接法(neighbor joining,NJ)构建系统发育树,进行 1 000 次重复构建。用于结构域分析及进化树构建的昆虫载脂蛋白基因及登录号见表 2。

**表 2　构建进化树所使用的不同种类昆虫载脂蛋白受体基因及登录号**

**Table 2　Species and GenBank accession no. for phylogenetic analysis in this study**

| 物种 Species | 基因名称 Gene name | GenBank 登录号 GenBank accession no. |
|---|---|---|
| 鳞翅目　Lepidoptera | | |
| 棉铃虫　*Helicoverpa armigera* | *HaLpR* | ANG56609.1 |
| 斜纹夜蛾　*Spodoptera litura* | *SlLpR* | ADN04911 |
| 蜡螟　*Galleria mellonella* | *GmLpR* | ABF20542.1 |
| 脐橙螟　*Amyelois transitella* | *AtLpR* | XP_013194689 |
| 家蚕　*Bombyx mori* | *BmLpR* | BAF51965 |
| 蓖麻蚕　*Samia ricini* | *SrLpR* | ANO58556.1 |
| 黑脉金斑蝶　*Danaus plexippus* | *DpLpR* | EHJ72227 |
| 柑橘凤蝶　*Papilio xuthus* | *PxLpR* | KPI97525 |
| 玉带凤蝶　*Papilio polytes* | *PpLpR* | XP_013134900 |
| 金凤蝶　*Papilio machaon* | *PmLpR* | KPJ11684 |

续表 2 Table 2(Continued)

| 物种 Species | 基因名称 Gene name | GenBank 登录号 GenBank accession no. |
|---|---|---|
| 直翅目 Orthoptera | | |
| 飞蝗 *Locusta migratoria* | *LmLpR* | CAA03855 |
| 蜚蠊目 Blattaria | | |
| 德国小蠊 *Blattella germanica* | *BgLpR* | CAL47126 |
| 马德拉蜚蠊 *Rhyparobia maderae* | *RmLpR* | BAE00010 |
| 半翅目 Hemiptera | | |
| 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* | *NlLpR* | ADE34167 |
| 豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum* | *ApLpR* | XP_008186770.1 |
| 膜翅目 Hymenoptera | | |
| 切叶蚁 *Acromyrmex echinatior* | *AeLpR* | EGI61302 |
| 毕氏卵角蚁 *Ooceraea biroi* | *ObLpR* | EZA59257 |
| 双翅目 Diptera | | |
| 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* | *DmLpR* | NP_733119 |
| 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* | *AaLpRfb* | AAQ16410.1 |
| 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* | *AaLpRov* | AAK72954.1 |

### 1.6 利用实时荧光定量 qRT-PCR 技术对 *HaLpR* 进行表达量分析

根据获得的棉铃虫 *HaLpR* 的 cDNA 序列，设计一对荧光定量引物 q-HaLpR-F/R，以棉铃虫 *β-actin* 基因为内参基因(表 1)，进行扩增效率验证后，利用 qRT-PCR 检测 *HaLpR* 在棉铃虫不同发育阶段和不同组织的表达量。qRT-PCR 采用 SYBR Green 法，25 μL 反应体系：2×qPCR Master Mix 12.5 μL，cDNA 模板 2 μL，10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL，dd$H_2O$ 8.5 μL。反应在 Bio-rad CFX96 荧光定量 PCR 仪中进行，反应程序为：95℃预变性 1 min；95℃变性 5 s，60℃退火 30 s，循环 40 次；熔解曲线 95℃ 15 s，60℃ 15 s，95℃ 15 s。qRT-PCR 结果用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法进行分析[26]。

### 1.7 数据统计与分析

不同发育阶段和不同组织间的基因表达量差异显著性采用单因素方差分析(One-way ANOVA)，并采用 Fisher's LSD 检验进行多重比较($\alpha=0.05$)。对照组和饥饿处理组的基因表达量采用配对 *t*-test 法进行差异显著性分析。数据分析使用 SPSS 17.0 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉铃虫载脂蛋白受体基因基本特征

棉铃虫 *LpR* 基因命名为 *HaLpR*(基因登录号 KU355886.1)，序列全长 3 117 bp，包含 25 bp 的 5′非编码区和 449 bp 的 3′非编码区，开放阅读框为 2 643 bp，编码 880 个氨基酸。预测其蛋白质分子量为 98.67 kD，等电点为 5.01，预测其编码的蛋白质在 N-末端含有 1 个信号肽，剪切位点位于第 31 和第 32 残基。氨基酸结构域分析发现 *HaLpR* 基因编码的蛋白包含典型的低密度脂蛋白受体结构域：8 个富含半胱氨酸的配体结合域、3 个表皮生长因子结构域、5 个低密度脂蛋白受体 YWTD 结构域、1 个跨膜域(795－817 位氨基酸)以及一个网格蛋白包被的凹陷内化基序 FDNPVY(832－837 位氨基酸)。

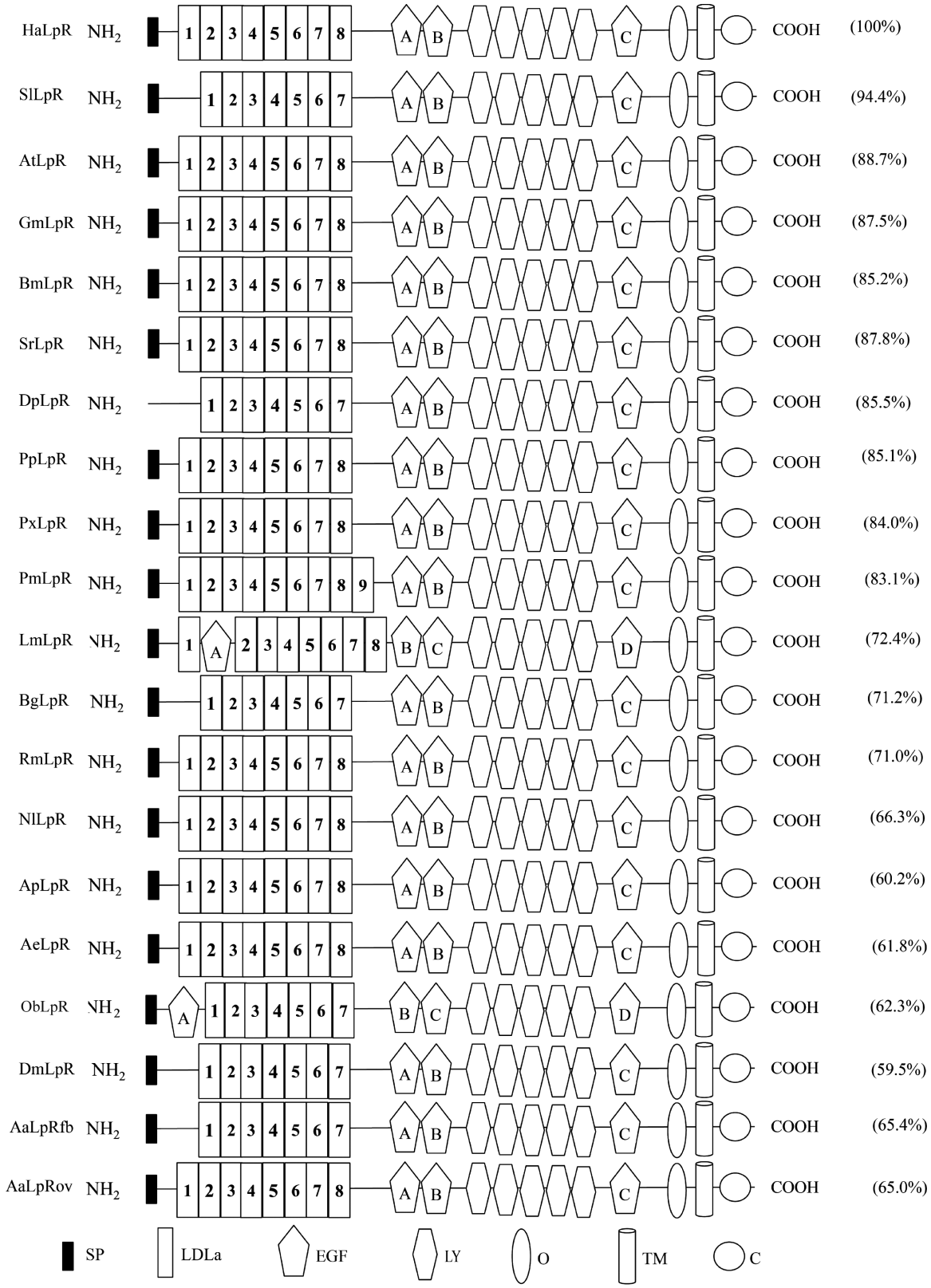
### 2.2 棉铃虫载脂蛋白受体 HaLpR 序列相似性及系统进化树

棉铃虫 *HaLpR* 与其他昆虫 *LpR* 基因编码的氨基酸序列比对表明，LpR 氨基酸序列在不同物种间的保守性较高，都包含低密度脂蛋白受体配体结合域(LDLa)、表皮生长因子结构域(EGF)、低密度脂蛋白受体 YWTD 结构域(LY)等结构域(图 1)。棉铃虫的 HaLpR 与斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 的 LpR 氨基酸序列相似性为 94.4%，与螟蛾科 Pyralidae 脐橙螟 *Amyelois transitella* 和大蜡螟 LpR 的氨基酸序列相似度分别为 88.7%和 87.5%，与蚕蛾科 Bombycidae 家蚕、蓖麻蚕 *Samia ricini* LpR 的相似度分别为 85.2%和 87.8%，与黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*、玉带凤蝶 *Papilio polytes*、金凤蝶 *P. machaon* 和柑橘凤蝶 *P. xuthus* 等鳞翅目蝶类昆虫 LpR 的相似度在 83.1%～85.5%之间，与其他非鳞翅目昆虫的氨基酸序列的相似性在 59.5%～72.4%之间(图 1)。

进化树显示，棉铃虫 *Ha*LpR 与斜纹夜蛾的 LpR 亲缘关系最近，与脐橙螟、大蜡螟、家蚕、蓖麻蚕等昆虫 LpR 的亲缘关系较近，而与黑脉金斑蝶、玉带凤蝶及柑橘凤蝶等昆虫的亲缘关系较远。总体趋势是亲缘关系越近，同源性越高，与氨基酸序列比对结果一致(图 2)。

### 2.3 *HaLpR* 在棉铃虫不同发育时期和组织的表达

*HaLpR* 在卵和雌成虫体内高表达，在幼虫和雄成虫体内表达量较低(图 3a)。*HaLpR* 在雌成虫各个日龄均有表达，表达量在雌成虫羽化后第 3 天到达高峰，随后逐渐降低，在羽化后第 9 天降到最低水平(图 3b)。*HaLpR* 在脂肪体和卵巢中高表达，在血淋巴中次之，而在中肠、表皮、马氏管和头部等组织中表达量较低(图 3c)。

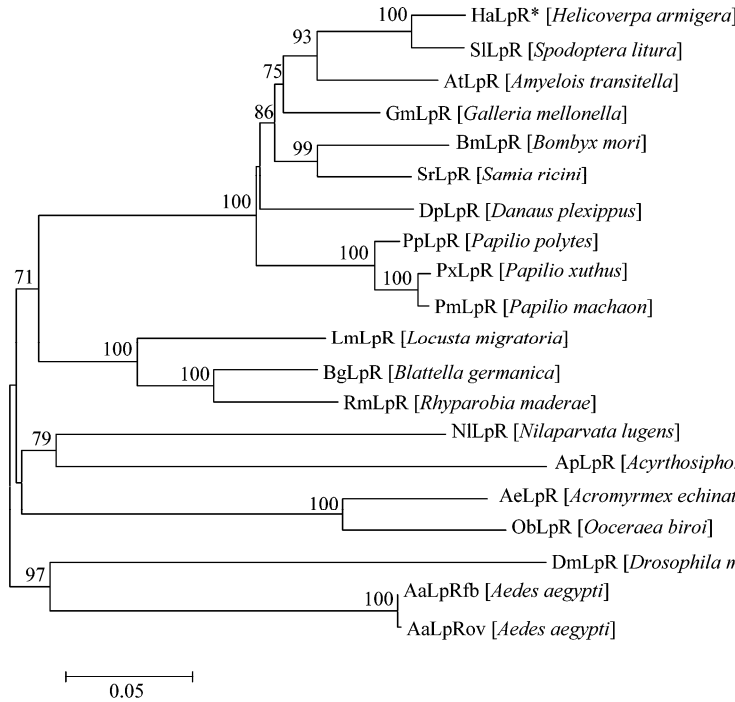



昆虫载脂蛋白受体信息同表2。SP: 信号肽; LDLa: 低密度脂蛋白受体配体结合域; EGF: 表皮生长因子结构域; LY: 低密度脂蛋白受体YWTD 结构域; O: O-糖链结构域; TM: 跨膜域; C: 胞质结构域

The species information of LpR proteins are listed in table 2. SP: Signal peptide; LDLa: Low-density lipoprotein receptor ligand-binding domain A; EGF: Epidermal growth factor-like domain; LY: Low-density lipoprotein-receptor YWTD domain; O: O-sugar linked domain; TM: Transmembrane domain; C: Cytoplasmatic domain

**图 1　棉铃虫及其他昆虫 LpR 氨基酸序列的结构分析与比较**

**Fig. 1　Structure analysis and comparison of LpRs from *Helicoverpa armigera* and other insect species**

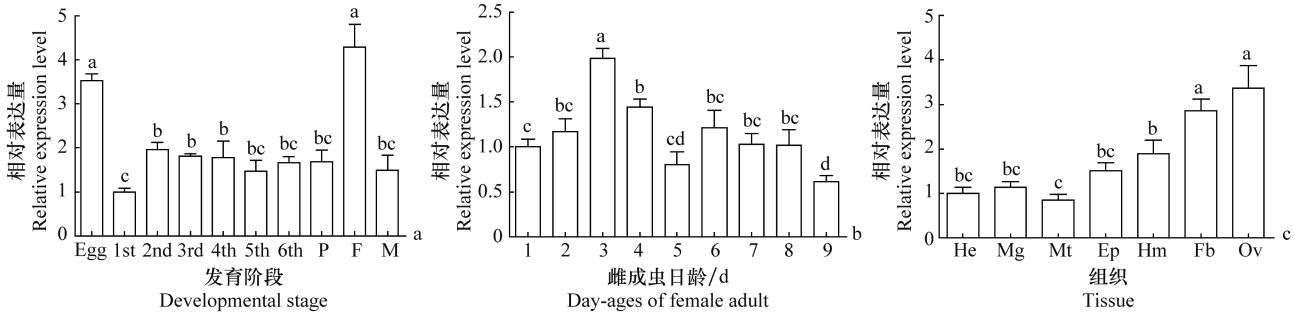



进化树所用物种的LpR GenBank登录号见表2。图中的数值代表bootstrap 1 000次时的支持度值，标尺代表遗传距离

The GenBank accession no. of LpR from different insect species used for phylogenetic analysis are listed in table 2. The number represents the bootstrap support values based on 1 000 replicates, and the scale bar indicates the phylogenetic distance

**图 2　不同昆虫物种 LpR 氨基酸序列的系统进化关系分析**

**Fig. 2　Phylogenetic analysis of LpR amino acid sequences from different insect species**




Egg: 卵; 1st: 1龄幼虫; 2nd: 2龄幼虫; 3rd: 3龄幼虫; 4th: 4龄幼虫; 5th: 5龄幼虫; 6th: 6龄幼虫; P:蛹期; F:雌成虫; M: 雄成虫; He: 头; Mg: 中肠; Mt: 马氏管; Ep: 表皮; Hm: 血淋巴; Fb: 脂肪体; Ov: 卵巢。图中数据为平均值±标准误，不同字母表示*HaLpR*基因在棉铃虫不同发育阶段或不同组织中的表达量具有显著差异，数据分析采用Fisher's LSD 多重比较法，$P<0.05$

Egg: Egg; 1st: 1st instar larva; 2nd: 2nd instar larva; 3rd: 3rd instar larva; 4th: 4th instar larva; 5th: 5th instar larva; 6th: 6th instar larva; P: Pupa; F: Female adult; M: Male adult; He: Head; Mg: Midgut; Mt: Malpighian tube; Ep: Epidermal; Hm: Hemolymph; Fb: Fat body; Ov: Ovary. Data are mean±standard error. Different letters indicate significant differences among different developmental stages or different tissues. Statistical significance was analyzed by Fisher's LSD ($P<0.05$)

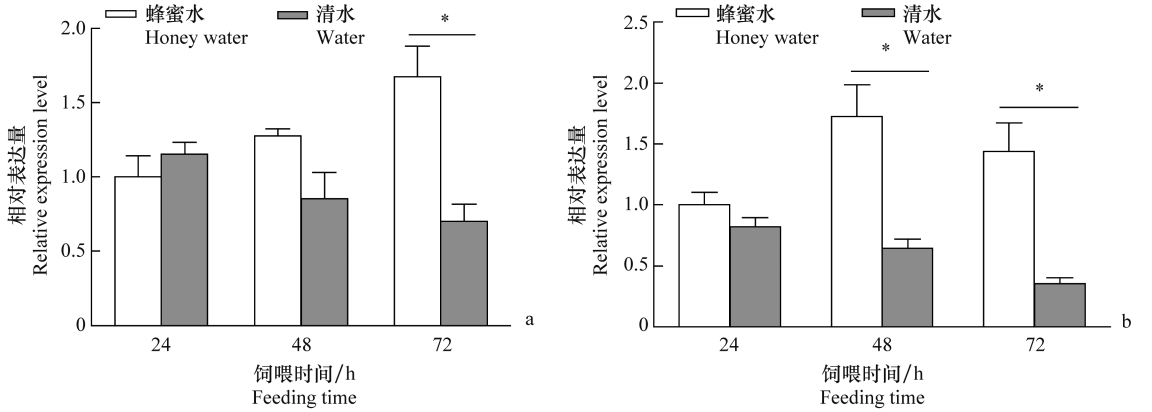
**图 3　*HaLpR* 在棉铃虫不同发育阶段(a)、雌虫不同日龄(b)及雌虫不同组织(c)的表达情况**

**Fig. 3　Expression analysis of *HaLpR* at different developmental stages (a), days after female moth emergence and in different tissues (c) of *Helicoverpa armigera***

## 2.4　饥饿处理对 *HaLpR* 表达的影响

棉铃虫雌成虫经饥饿处理后，卵巢和脂肪体中*HaLpR* 基因的表达量都受到抑制。与饲喂 10%蜂蜜水的对照组相比，饲喂清水的饥饿处理组卵巢中*HaLpR* 的表达量整体呈现下降的趋势，24 h 和 48 h 的表达量分别是对照组的 115.3%和 66.9%，而到 72 h 时其表达量显著低于对照组，仅为对照组表达量的 41.9%($t=3.7$, $df=3$, $P=0.03$)(图 4a)。另一方面，饥饿处理降低 *HaLpR* 在脂肪体中的表达，在饥饿处理 24 h，其表达量是对照组的 82.18%，差异不

显著($t=1.16$, $df=3$, $P=0.33$),在饥饿 48 h 和 72 h 后,其表达量分别是对照组的 37.5%和 24.8%,显著低于对照组(48 h:$t=4.7$, $df=3$, $P=0.018$;72 h:$t=4.7$, $df=3$, $P=0.018$)(图 4b)。




图中数据为平均值±标准误,*表示*HaLpR*在棉铃虫雌蛾饥饿处理和对照间的表达量差异显著,数据分析采用student's *t*-test, $P<0.05$
Data are mean±standard error. * indicates significant difference between the starvation treatment and the control group. Statistical significance was analyzed by student's *t*-test ($P<0.05$)

**图 4　饥饿对棉铃虫雌成虫卵巢(a)和脂肪体(b)组织中 *HaLpR* 基因表达量的影响**

**Fig. 4　Effects of starvation on *HaLpR* expression in the ovary (a) and fat body (b) of *Helicoverpa armigera* female adult**

## 3　结论与讨论

迁飞昆虫羽化时卵巢并未发育成熟,雌成虫通常需要补充包括糖、蛋白、脂肪等营养物质促进其卵巢发育及胚胎成熟[27]。昆虫卵母细胞中积累的蛋白质在脂肪体内合成后通过受体介导的内吞作用转运至卵母细胞,大量研究表明 VgR 是将 Vg 输送到生长中的卵母细胞的关键因子,对昆虫卵巢成熟起着重要的促进作用[3-5],除此之外,昆虫卵母细胞发育也需要积累脂类物质,而载脂蛋白受体 LpR 能与相应的载脂蛋白结合,以内吞作用介导细胞对脂质的摄取与代谢[8-9]。本研究通过 RT-PCR 与 RACE 技术克隆得到棉铃虫 *HaLpR* 的全长序列,发现其具有该基因家族的典型结构域(图 1),通过对多种昆虫 LpR 氨基酸序列结构对比发现,不同物种在低密度脂蛋白受体配体结合域富含半胱氨酸的重复序列存在差异(图 1),然而已有研究表明配体结合域 LDLa 的第 6—8 重复域在与配体结合时不发挥作用[28],因此我们推测不同昆虫的受体与配体结合力无差异。

*HaLpR* 基因时空表达谱分析表明,*HaLpR* 在棉铃虫雌成虫中高表达,推测 *LpR* 可能与棉铃虫雌虫的生殖行为相关,该推测与德国小蠊和褐飞虱的研究结果一致[18-20]。而豌豆蚜 *ApLpR* 在成虫体内的表达量低于幼虫,但在胚胎时期表达量显著高于其他龄期[21],同样的,*HaLpR* 也在棉铃虫卵内高表达,这可能与脂质作为胚胎发育期的重要营养消耗物质相关。另外组织表达谱分析发现棉铃虫 *HaLpR* 在 2 日龄雌虫的脂肪体和卵巢内高表达,从侧面证实昆虫的 LpR 可能参与脂肪体和卵巢组织的脂质运输和摄取。类似表达模式在其他昆虫中也有报道,例如褐飞虱的 *NlLpR* 在脂肪体和卵巢内高表达,而在头部、表皮和中肠的表达量相对较低[20]。飞蝗的 *LmLpR-S* 在卵巢的表达量显著高于其他组织,而飞蝗中的另一个 LpR 亚型 *LmLpR-L* 除了在卵巢内高表达外,还在翅芽中高表达[29]。豌豆蚜的 *ApLpR* 在腹部角质层中高表达,并且通过 RNAi 抑制 *ApLpR* 的表达会降低豌豆蚜表皮羟基化合物和内部碳氢化合物的含量,进而增加对干燥的敏感性[21]。另外,家蚕中的 *LpR*-4 亚型在其脑部及脑神经细胞中特异性地表达[16],果蝇的 *LpR-S* 亚型在幼虫的脑神经高表达,并与星形胶质细胞衍生的载脂蛋白相互作用,介导神经胶质细胞脂质穿梭[30]。由于基因的阶段性或者组织特异性表达往往与其在组织或者阶段的生命活动相关,这表明 LpR 除了参与成虫卵巢发育相关的脂质转运外,还参与了表皮层及神经细胞的脂质运输。

昆虫的繁殖力与成虫期的营养息息相关,饥饿处理显著降低成虫期有营养需求的昆虫的产卵量[31-33],卵母细胞内积累的脂类是维持胚胎发育的主要能量来源,在致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 中发现卵母细胞发育所需的能量 90%以上来自于

脂类[34]，果蝇中95%的脂类主要依靠血淋巴内的载脂蛋白转运[35]。甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 经饥饿处理后体内脂肪含量显著降低[36]，本研究通过实时荧光量 PCR 检测发现棉铃虫经饥饿处理后 *HaLpR* 基因无论在脂肪体还是卵巢组织内表达量都显著降低，这说明饥饿处理抑制了 *HaLpR* 的表达，我们推测饥饿处理导致昆虫产卵量降低可能跟载脂蛋白受体基因表达受到抑制有关。Lu 等利用 RNAi 技术发现干扰 *NlLpR* 基因后褐飞虱体内的甘油三酯含量和 Vg 含量都显著降低，进而导致褐飞虱的产卵量和孵化率显著降低[20]。此外，沉默鱼虱 *Lepeophtheirus salmonis* 的 *LsLpR*，其后代数量下降为对照组的25%[37]。然而在德国小蠊中，干扰 *LpR* 显著降低雌虫脂肪体内的脂质含量，但 *LpR* 干扰组和对照组的生殖力无明显差异[18]。然而在棉铃虫中，饥饿处理降低了雌虫的生殖力，但饥饿 24、48、72 h 后棉铃虫雌虫体内脂肪含量无显著变化(数据未发表)，由于载脂蛋白与组织细胞之间的相互作用可能需要多种组分的参与，棉铃虫 HaLpR 对卵巢发育的具体影响仍需要 RNAi 或者基因编辑技术进一步研究。

## 参考文献


[1] SMYKAL V, RAIKHEL A S. Nutritional control of insect reproduction [J]. Current Opinion in Insect Science, 2015, 11: 31-38.

[2] ZIEGLER R, VAN A R. Lipid uptake by insect oocytes [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 36(4): 264-272.

[3] SAPPINGTON T W, RAIKHEL A S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 28(5/6): 277-300.

[4] TUFAIL M, TAKEDA M. Molecular characteristics of insect vitellogenins [J]. Journal of Insect Physiology, 2008, 54(12): 1447-1458.

[5] TUFAIL M, TAKEDA M. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms [J]. Journal of Insect Physiology, 2009, 55(2): 87-103.

[6] BRIEGEL H. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti* [J]. Journal of Insect Physiology, 1990, 36(3): 165-172.

[7] KAWOOYA J K, OSIR E O, LAW J H. Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(18): 8740-8747.

[8] BEENAKKERS A M T, VAN DER HORST D J, VAN MARREWIJK W J A. Role of lipids in energy metabolism [M]// DOWNER R G H. Energy metabolism in insects. Boston: Springer, 1981, 53-100.

[9] VAN H D, RODENBURG K W, VAN DER HORST D J. Receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking of lipoproteins and transferrin in insect cells [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 35(2): 117-128.

[10] VAN DER HORST D J, VAN HOOF D, VAN MARREWIJK W J, et al. Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002, 239(1/2): 113-119.

[11] PALM W, SAMPAIO J L, BRANKATSCHK M, et al. Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*-assembly, function, and influence on tissue lipid composition [J/OL]. PLoS Genetics, 2012, 8: e1002828. DOI:10.137/journal.pgen.1002828.

[12] KHAN M T, DALVIN S, NILSEN F, et al. Two apolipoproteins in salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*), apolipoprotein 1 knock down reduces reproductive capacity [J/OL]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2021, 28: 101156. DOI: 10.1016/j.bbrep.2021.101156.

[13] DANTUMA N P, POTTERS M, DE WINTHER M P, et al. An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins [J]. Journal of Lipid Research, 1999, 40(5):973-978.

[14] CHEON H M, SEO S J, SUN Jianxin, et al. Molecular characterization of the VLDL receptor homolog mediating binding of lipophorin in oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 31(8): 753-760.

[15] SEO S J, CHEON H M, SUN Jianxin, et al. Tissue-and stage-specific expression of two lipophorin receptor variants with seven and eight ligand-binding repeats in the adult mosquito [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(43): 41954-41962.

[16] GOPALAPILLAI R, KADONO-OKUDA K, TSUCHIDA K, et al. Lipophorin receptor of *Bombyx mori*: cDNA cloning, genomic structure, alternative splicing, and isolation of a new isoform [J]. Journal of Lipid Research, 2006, 47(5):1005-1013.

[17] LEE C S, HAN J H, KIM B S, et al. Wax moth, *Galleria mellonella*, high density lipophorin receptor: alternative splicing, tissue-specific expression, and developmental regulation [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 33(8): 761-771.

[18] CIUDAD L, BELLÉS X, PIULACHS M D. Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein recep-

tors [J/OL]. BMC Molecular Biology, 2007, 8: 53. DOI: 10.1186/1471-2199-8-53.

[19] PARRA-PERALBO E, CULI J. *Drosophila* lipophorin receptors mediate the uptake of neutral lipids in oocytes and imaginal disc cells by an endocytosis-independent mechanism [J/OL]. PLoS Genetics, 2011, 7, e1001297. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001297.

[20] LU Kai, CHEN Xia, LI Yue, et al. Lipophorin receptor regulates *Nilaparvata lugens* fecundity by promoting lipid accumulation and vitellogenin biosynthesis [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2018, 219/220: 28-37.

[21] QIAO Jianwen, FA Yongliang, BAI Tiantian, et al. Lipophorin receptor regulates the cuticular hydrocarbon accumulation and adult fecundity of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* [J]. Insect Science, 2021, 28(4): 1018-1032.

[22] 郭予元. 棉铃虫的研究[M]. 北京: 中国农业出版社,1998.

[23] ZHANG Wanna, MA Long, XIAO Haijun, et al. Molecular characterization and function analysis of the vitellogenin receptor from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae) [J/OL]. PLoS ONE, 2016, 11(5): e0155785. DOI: 10.1371/journal.pone.0155785.

[24] JIANG Ting, MA Long, LIU Xiangya, et al. Effects of starvation on respiratory metabolism and energy metabolism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J/OL]. Journal of Insect Physiology, 2019, 119: 103951. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2019.103951.

[25] 梁革梅, 谭维嘉, 郭予元. 人工饲养棉铃虫技术的改进[J]. 植物保护, 1999, 25(2): 15-17.

[26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[27] 刘鹏程,刁跃珲,郭嘉雯,等. 昆虫迁飞行为及其调控机制[J]. 应用昆虫学报, 2021,58(3): 520-529.

[28] ESSER V, LIMBIRD L E, BROWN M S, et al. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor [J]. Journal of Biological Chemistry, 1988, 263(26): 13282-13290.

[29] 赵艺妍, 赵小明, 杨洋, 等. 飞蝗载脂蛋白受体基因 *LmLPR* 的表达及功能分析[J]. 应用昆虫学报, 2020, 57(2): 310-320.

[30] YIN Jun, SPILLMAN E, CHENG E S, et al. Brain-specific lipoprotein receptors interact with astrocyte derived apolipoprotein and mediate neuron-glia lipid shuttling [J/OL]. Nature Communications, 2021, 12: 2408. DOI: 10.1038/s41467-021-22751-7.

[31] 冯波, 朱晓明, 钟玲, 等. 补充营养对草地贪夜蛾成虫存活和繁殖的影响[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(6): 1172-1178.

[32] 江幸福, 姚瑞, 张蕾, 等. 补充营养对二点委夜蛾成虫生殖与寿命的影响[J]. 植物保护学报, 2015, 42(6): 1004-1008.

[33] 鲍晓文,郑峰,蔡明飞,等. 补充营养对梨小食心虫成虫生殖及寿命的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2010, 38(8):119-123.

[34] HANDEL E V. Fuel metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) embryo [J]. Journal of Insect Physiology, 1993, 39(10): 831-833.

[35] KÜHNLEIN R P. The contribution of the *Drosophila* model to lipid droplet research [J]. Progress in Lipid Research, 2011, 50(4): 348-356.

[36] 王竑晟,徐洪富,崔峰. 高温处理对甜菜夜蛾雌虫成虫期生殖力及卵巢发育的影响 [J]. 西南农业学报, 2004,17(1): 34-37.

[37] KHAN M T, DALVIN S, WAHEED Q, et al. Molecular characterization of the lipophorin receptor in the crustacean ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis* [J/OL]. PLoS ONE, 2018, 13(4): e0195783. DOI: 10.1371/journal.pone.0195783.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 212 页)

[21] YAO Shuangyan, ZHANG Yunhui, CHANG Yanpeng, et. Pyruvate kinase is required for sex pheromone biosynthesis in *Helicoverpa armigera* [J/OL]. Frontiers in Physiology, 2021, 12: 707389. DOI: 10.3389/fphys.2021.707389.

[22] ZHANG Songdou, AN Shiheng, LI Zhen, et al. Identification and validation of reference genes for normalization of gene expression analysis using qRT-PCR in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Gene, 2015, 555(2): 393-402.

[23] YAO Shuangyan, ZHOU Shuai, LI Xiang, et al. Transcriptome analysis of *Ostrinia furnacalis* female pheromone gland: esters biosynthesis and requirement for mating success [J/OL]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 736906. DOI: 10.3389/fendo.2021.736906.

[24] 杨晓冰. 家蚕自噬基因表达与 BmCPV 病毒感染模型的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2003.

[25] BURKITT M D, WILLIAMS J M, DUCKWORTH C A, et al. Signaling mediated by the NF-κB sub-units NF-κB1, NF-κB2 and c-Rel differentially regulate *Helicobacter felis*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice [J]. Oncogene, 2013, 32(50): 5563-5573.

[26] DU Mengfang, LIU Xiaoming, LIU Xiaoguang, et al. Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase is required for PBAN-induced sex pheromone biosynthesis in *Bombyx mori* [J/OL]. Scientific Reports, 2015, 5:8110. DOI: 10.1038/srep08110.

[27] 孔凡,胡隐月,杜家纬. 斜纹夜蛾性信息素通讯系统[J]. 昆虫学报,2001,45(3):404-407.

(责任编辑: 杨明丽)