



飞蝗载脂蛋白受体基因 *LmLPR* 的表达及功能分析*

赵艺妍^{1,2**} 赵小明¹ 杨 洋^{1,2} 马恩波¹ 张建珍¹ 刘卫敏^{1***}

(1. 山西大学应用生物学研究所, 太原 030006; 2. 山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘 要 【目的】载脂蛋白受体 (Lipophorin receptor, LPR) 在昆虫体内脂类物质的转运中发挥着重要的作用。基于飞蝗转录组数据库获得飞蝗载脂蛋白受体基因 *LmLPR*, 分析其基因特性和表达特征, 并通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术对其生物学功能进行分析, 探究 *LmLPR* 在飞蝗脂类物质转运中的作用。【方法】基于课题组飞蝗转录组数据库, 获得载脂蛋白受体基因, 结合飞蝗基因组数据库, 获得其全长开放阅读框 (ORF) 序列, 克隆验证后对其编码蛋白序列特性进行分析; 利用 GENEDOC 软件将该蛋白氨基酸序列与其他物种 LPR 氨基酸序列进行多序列比对, 并使用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 方法, 将该序列与其它物种的同源序列进行聚类分析; 通过 RT-qPCR 方法对其在 5 龄第 2 天飞蝗不同组织部位和不同发育天数表皮中的表达特性进行分析; 通过 RNAi 技术及伊红染色方法对其生物学功能进行分析。【结果】通过克隆和序列分析获得两种飞蝗 LPR 基因, 即长型 (*LmLPR-L*) 和短型 (*LmLPR-S*), 序列特征分析发现 *LmLPR-L* 和 *LmLPR-S* 均有 1 个信号肽, 4 个表皮生长因子结构域, 5 个低密度脂蛋白受体 YWTD 结构域, 以及 1 个跨膜域。不同于 *LmLPR-L*, *LmLPR-S* 在 N 端比 *LmLPR-L* 多一个低密度脂蛋白受体结构域 (*LmLPR-L* 含有 6 个, *LmLPR-S* 含有 7 个), 而在 C 端缺失 38 个氨基酸序列。系统进化树分析显示 *LmLPR-L* 和 *LmLPR-S* 与蜚蠊目德国小蠊 *Blattella germanica* BgLPR-L 和 BgLPR-S 聚为一支。RT-qPCR 结果显示 *LmLPR-S* 在卵巢中高表达, 在其他组织部位的表达量较低, 而 *LmLPR-L* 在翅芽和卵巢中均高表达, 在其他组织部位的表达量较低; 时期表达显示 *LmLPR-S* 和 *LmLPR-L* 在蜕皮后表达量均呈现先升高后降低的趋势, 分别在第 2 天和第 3 天的表达量最高。在 4 龄期通过 RNAi 抑制 *LmLPR* 的表达后, 发现飞蝗能够正常蜕皮, 伊红染色结果显示表皮通透性没有显著改变。【结论】飞蝗载脂蛋白受体基因 *LmLPR* 主要在翅芽和卵巢中高表达, 其下调表达后不影响若虫的正常生长发育以及表皮的通透性。研究结果为深入探究载脂蛋白受体在昆虫表皮脂类物质转运过程中的作用机制提供了基础。

关键词 飞蝗; 载脂蛋白受体; *LmLPR*; 表皮

Expression and functional analysis of the *Locusta migratoria* lipophorin receptor gene, *LmLPR*

ZHAO Yi-Yan^{1,2**} ZHAO Xiao-Ming¹ YANG Yang^{1,2} MA En-Bo¹
ZHANG Jian-Zhen¹ LIU Wei-Min^{1***}

(1. Institute of Applied Biology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract [Objectives] The Lipophorin receptor (LPR) plays an important role in lipid transport in insects. The lipophorin receptor gene of *Locusta migratoria* (*LmLPR*) was obtained from the transcriptome database, and its characteristics and expression was analyzed. RNA interference (RNAi) technology was used to explore the role of *LmLPR* in lipid transport. [Methods] Based on a transcriptome database from our lab, *LmLPR* and its full-length Open Reading Frame (ORF) sequence

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金国际 (地区) 合作与交流项目 (31761133021); 国家自然科学基金项目 (31701794); 山西省应用基础研究计划项目 (201601D202057)

**第一作者 First author, E-mail: 490051225@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: liuweimin@sxu.edu.cn

收稿日期 Received: 2019-01-10; 接受日期 Accepted: 2019-07-18

were obtained and compared with the *L. migratoria* genomic database. Characteristics of the encoded protein sequence were analyzed after cloning and verification. The amino acid sequence of this protein was aligned with LPR amino acid sequences of other species using GENEDOC software. A phylogenetic tree of the relationship between *LmLPR* and homologous sequences from other species was constructed using the Neighbor-Joining method in MEGA 5.1 software. The expression pattern in different tissues of 2-day-old fifth-instar nymphs and different developmental stages were analyzed with RT-qPCR. The biological function of *LmLPR* was analyzed with RNAi technology and eosin staining. **[Results]** Two types of *L. migratoria* LPR, namely a long type (*LmLPR-L*) and a short type (*LmLPR-S*), were obtained by cloning and sequence analysis. Sequence analysis revealed that both *LmLPR-L* and *LmLPR-S* have one signal peptide, four epidermal growth factor domains, five low-density lipoprotein receptor YWTD domains, and one transmembrane domain. Whereas *LmLPR-L* has 6 low-density lipoprotein receptor domains at the N-terminus, *LmLPR-S* has 7. A 38 amino acid sequence was detected at the C-terminus. The phylogenetic tree showed that *LmLPR-L* and *LmLPR-S* clustered together with the homologous *BgLPR-L* and *BgLPR-S* from *Blattella germanica*. The results of RT-qPCR showed that expression of *LmLPR-S* was high in ovarian tissue but low in other tested tissues. Expression of *LmLPR-L* was high in the wing pads and ovary but low in other tested tissues. The expression levels of *LmLPR-S* and *LmLPR-L* both first increased in the early stage of fifth instar, then decreased. Expression was highest on days 2 and 3 (N5D1 and N5D2), respectively. After silencing the expression of *LmLPR* by injecting *dsLmLPR* into 4th instar larvae, treated nymphs were able to complete the molt normally, as did the control group. The results of eosin staining found no evidence of significant change in cuticle permeability in both *dsLmLPR* and *dsGFP*-injected nymphs. **[Conclusion]** The lipophorin receptor gene *LmLPR* is highly expressed in ovarian tissue, and down-regulating its expression did not affect the normal growth and development of nymphs, or the permeability of cuticle. These results provide a basis for further investigation of the role of the lipophorin receptor in the transport of insect cuticular lipids.

Key words *Locusta migratoria*; lipophorin receptor; *LmLPR*; integument

昆虫体壁主要由上表皮 (Epicuticle)、原表皮 (Procuticle) 以及皮细胞层 (Epidermal cell) 组成, 其主要成分为几丁质、蛋白质、酚类及脂类。昆虫表皮具有较强的疏水性和保水作用, 能够使虫体更好地适应相对干燥的陆地环境 (Chapman, 2013)。而表皮中脂类物质的结构和含量是决定其能否在干燥、高温等逆境中生存的主要因素 (Gibbs, 2011)。表皮脂类物质主要存在于上表皮中, 占表皮总成分的 1%-2% (Klowden, 2013)。目前对昆虫表皮几丁质及蛋白质的成分及功能研究比较多, 而相比之下, 对表皮脂类物质的功能研究较少, 尤其脂类物质到表皮的转运过程尚不清楚。

昆虫表皮脂类物质合成后, 需要转运到上表皮进行沉积。目前关于脂类物质转运的分子途径研究报道较少。有一种假说认为: 脂类物质在绛色细胞中合成后, 以脂滴的形式存在, 与载脂蛋白结合后, 释放到血淋巴中, 然后运输到真皮细胞表面, 与真皮细胞表面的载脂蛋白受体结合, 并进入真皮细胞 (Parra-Peralbo and Culi, 2011)。在真皮细胞中经过一系列的加工修饰, 最后由孔

道输送到上表皮进行沉积 (Moussian, 2013)。在此过程中, 需要多种因子的参与结合, 其中载脂蛋白及其受体发挥着不可或缺的作用。

载脂蛋白受体 (Lipophorin receptor, LPR) 是一类跨细胞膜的糖蛋白, 能与相应的载脂蛋白结合, 以内吞作用介导细胞对载脂蛋白的摄取与代谢。第一条 LPR 序列于 1999 年由 Dantuma 等 (1999) 在飞蝗 *Locusta migratoria* 脂肪体中被克隆并测序。之后在其他物种中也被鉴定出来, 如埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中存在两条 LPR 序列 (LPRov 和 LPRfb), 分别在卵巢和脂肪体中表达 (Cheon *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2003)。家蚕 *Bombyx mori* 存在 4 种不同形式的载脂蛋白受体 (LpR1, LpR2, LpR3 和 LpR4), 并且这 4 种蛋白都是来源于单个基因通过选择性剪接编码 (Gopalapillai *et al.*, 2006)。Van Hoof 等 (2003) 在飞蝗中发现载脂蛋白受体介导脂肪体细胞中高密度脂蛋白 (HDLp) 的内吞作用, 并且 LPR 的表达受脂质体脂肪组织需求的调节。Lee 等 (2003) 在鳞翅目昆虫蜡螟 *Galleria mellonella* 中鉴定了载脂蛋白受体 *GmLPR*, 并证实 20-羟基

蜕皮激素 (20-HE) 和胆固醇均能诱导 *LPR* 的表达。Parra-Peralbo 和 Culi (2011) 在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定了 *LPR1* 和 *LPR2*, 并发现其能够介导卵母细胞和翅芽细胞中的中性脂质的摄取。Lu 等 (2018) 对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* *LpR* 进行 RNA 干扰, 最终导致三酰基甘油 (TAG) 含量降低, 卵巢发育延迟和繁殖力降低。可见, *LPR* 在昆虫脂类物质的摄取中发挥着重要的作用。然而, 上述研究均是关于昆虫脂肪体细胞和生殖细胞等部位的脂质转运和摄取, 对昆虫表皮脂类物质的转运和摄取的研究报道较少。

飞蝗是一种重要的世界性农业害虫 (马世俊, 1958; 王正军等, 2002), 具有分布范围广、危害性强等特点 (陈永林等, 2000)。本研究以飞蝗为研究对象, 鉴定载脂蛋白受体基因 *LmLPR*, 并对其进行基因特征和表达特性分析。进一步通过 RNA 干扰结合伊红染色方法对其生物学功能进行分析, 以期为深入探究载脂蛋白受体在昆虫表皮脂类物质转运过程中的作用机制研究提供一定的生物学基础。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

飞蝗虫卵购自河北沧州蝗虫养殖公司, 将虫卵置于恒温人工气候培养箱中, 待其孵化成 1 龄若虫时移至纱网笼中, 并放置于人工气候培养箱中, 每天饲喂新鲜的小麦苗, 直至飞蝗长至 3 龄时辅以麦麸饲喂。人工气候培养箱温度保持在 (30±2) °C, 相对湿度为 40%±5%, 光周期为: 光照 14 h, 黑暗 10 h。

1.2 基因的获得及分子特性分析

基于课题组飞蝗转录组数据库, 获得载脂蛋白受体基因 *LmLPR*, 结合飞蝗基因组数据库 (Wang *et al.*, 2014), 获得其全长 ORF 序列, 并进行克隆验证和基因结构分析。序列相似性分析使用 BLAST 软件在 NCBI 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行。利用 ExPASy 网站 translate tool 对其 ORF 序列进行翻译, 并预测蛋白质分子量大小及等电点 (pI)。利用 SignalP4.1

server 分析其信号肽, 利用 SMART 分析其结构域。利用 GENEDOC 软件对飞蝗 *L. migratoria*、德国小蠊 *Blattella germanica* 及埃及伊蚊 *A. aegypti* 的 *LPR* 序列进行比对。

1.3 系统进化树分析

根据飞蝗 *LPR* 氨基酸序列, 运用 NCBI 的 BLAST 工具搜索其同源序列并进行比对, 下载来源于德国小蠊、黑腹果蝇、褐飞虱等昆虫物种的 *LPR* 序列, 使用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 方法, 将飞蝗 *LPR* 氨基酸序列与其它物种的同源序列进行聚类分析, 独立分析 1 000 次, 数值代表 bootstrap 估算值, 构建系统进化树。用于构建进化树的不同目物种的载脂蛋白受体序列的 GenBank 登录号见表 1。

表 1 构建进化树的不同目物种的载脂蛋白受体序列的 GenBank 登录号

Table 1 Species and GenBank accession no. for phylogenetic tree used in this study

物种 Species	基因名称 Gene name	GenBank 登录号 GenBank accession no.
飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	<i>LmLPR-S</i>	CAA03855.1
飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	<i>LmLPR-L</i>	MH891838
褐飞虱 <i>Nilaparvata lugens</i>	<i>NILPR</i>	ADE34167.2
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	<i>BmLPR-1</i>	BAE71406.1
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	<i>BmLPR-2</i>	BAE71407.1
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	<i>BmLPR-3</i>	BAE71408.1
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	<i>BmLPR-4</i>	BAE71409.1
蜡螟 <i>Galleria mellonella</i>	<i>Gm-LPR</i>	ABF20542.1
菜粉蝶 <i>Pieris rapae</i>	<i>PrLPR-L</i>	XP_022117475.1
菜粉蝶 <i>Pieris rapae</i>	<i>PrLPR-S</i>	XP_022117489.1
德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>	<i>BgLPR-L</i>	CAL47125.1
德国小蠊 <i>Blattella germanica</i>	<i>BgLPR-S</i>	CAL47126.1
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	<i>AaLPRov</i>	AAK72954.1
埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	<i>AaLPRfb</i>	AEY84776.1
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	<i>DmLPR-1</i>	ABW08774.2
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	<i>DmLPR-2</i>	ABW08770.1

1.4 样品制备

为了分析 *LmLPR* 在飞蝗不同发育时期及不同组织部位的表达特性, 解剖 5 龄第 1 天到第 8 天飞蝗若虫的表皮以及 5 龄第 2 天若虫的 10 个组织部位, 包括: 体壁、翅芽、前肠、胃盲囊、中肠、后肠、马氏管、脂肪体、精巢和卵巢。设置 4 个生物学重复, 每个生物学重复取 3 头虫子。使用 RNAiso Plus (TaKaRa) 提取每个重复中的总 RNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的质量, Nanodrop2000 对总 RNA 进行定量, 然

后以 1 μg 总 RNA 为模板, 依据 TaKaRa 公司反转录试剂说明书合成 cDNA 模板。

1.5 RT-qPCR 分析

通过 RT-qPCR 方法分析 *LmLPR* 在飞蝗不同发育时期及不同组织部位的表达。以各发育时期以及各组织部位的 cDNA 为模板, 以飞蝗 *EF1- α* 基因作为内参进行 RT-qPCR, 每个样本做 2 个技术重复。采用 ABI Prism 7300 SDS 1.1 软件对数据进行分析并记录。引物见表 2 (由上海生物工程有限公司合成)。

表 2 本研究所用到的引物
Table 2 The primers used in this study

用途 Application	引物名 Primer names	引物序列 Sequence of primers (5'-3')	产物长度 Length of product (bp)
dsRNA synthesis	ds <i>LmLPR</i> -F	taatacgaactcactatagggGGCACCTATTGATGAAGG	574
	ds <i>LmLPR</i> -R	taatacgaactcactatagggCATGTGTGTTGCTGTTATTGCA	
	ds <i>GFP</i> -F	taatacgaactcactatagggGTGGAGAGGGTGAAGG	571
	ds <i>GFP</i> -R	taatacgaactcactatagggGGGCAGATTGTGTGGAC	
RT-qPCR analysis	<i>LmLPR</i> -S-F	ACGGCCACTGCATCCCT	83
	<i>LmLPR</i> -S-R	GCAGACTGCGTTTGTCTCGTC	
	<i>LmLPR</i> -L-F	ACTACAGAAGAAGATTGGGATT	94
	<i>LmLPR</i> -L-R	TGGTCTGGGTACGTGAAT	
	<i>EF1α</i> -F	AGCCCAGGAGATGGGTAAAG	155
	<i>EF1α</i> -R	CTCTGTGGCCTGGAGCATC	

1.6 RNA 干扰

根据 *LmLPR* 和绿色荧光蛋白 (*GFP*) 的 cDNA 序列, 通过 <http://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/> 网站设计引物, 引物见表 2。使用 PCR MasterMix (天根公司) 进行 PCR 扩增, 反应体系为: 25 μL PCR MasterMix, 10 μL 上游/下游引物, 2 μL 整虫 cDNA, 加去离子水至 50 μL , PCR 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。产物用 E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit 按照说明进行回收, 然后参照 T7 RiboMAX[™] Express RNAi System 试剂盒说明书体外合成 dsRNA。

随机挑选飞蝗 4 龄第 1 天 (N4D1) 若虫进行 dsRNA 注射, 每头注射 10 μg dsRNA, 对照组注射等量 ds*GFP*, 每组注射 30 头。在相同饲

养条件下饲养观察发育情况, 蜕皮至下一龄期的若虫用于伊红染色实验。

1.7 伊红染色

为研究 *LmLPR* 对飞蝗表皮渗透性的影响, 根据 Wang 等 (2016) 提出的方法, 进行伊红染色。将若虫转移到含有 1.5 mL 0.5% 伊红染料溶液 (W/V, Sigma, 红色水溶性染料, 分子质量为 691.86 u) 的 2 mL 离心管中, 45 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 用水清洗 3 次, 最后用 Epson Scan 软件扫描蝗虫, 具体参考 Yu 等 (2017) 的方法。

1.8 数据分析

运用 SPSS Statistics 单因素方差分析 (ANOVA) 对 *LmLPR*-S 和 *LmLPR*-L 不同组织部位和不同发育时期表达差异进行分析, 并运用 Duncan's 法进行显著性差异检验, $P < 0.05$ 为差

异显著, 字母 (a, b, c, d 和 e) 代表差异显著性; 采用 Student *t*-test 方法对沉默效率进行分析, *** $P < 0.001$, 表示差异极显著。文中的图形则都运用 Adobe Illustrator CS6 软件制作。

2 结果与分析

2.1 *LmLPR* 特性分析

根据课题组飞蝗转录组数据库获得基因 *LmLPR*, 结合飞蝗基因组序列获得其 cDNA 序列并克隆、测序验证, 结果显示 *LmLPR* 有长型 (*LmLPR-L*) 和短型 (*LmLPR-S*) 2 种形式, 其中 *LmLPR-S* 的 ORF 序列长 2 652 bp, 其含有 14 个外显子 (图 1: A), 编码 883 个氨基酸, 预测分子量为 98.3 ku, 等电点为 4.69, 其编码的蛋白含有一个信号肽, 7 个低密度脂蛋白受体结构域, 4 个表皮生长因子结构域, 5 个低密度脂蛋

白受体 YWTD 结构域, 以及 1 个跨膜域 (图 1: B)。 *LmLPR-L* 的 ORF 序列长 2 601 bp, 含有 14 个外显子 (图 1: A), 编码 866 个氨基酸, 预测分子量为 96.8 ku, 等电点为 4.72, 其编码的蛋白与 *LmLPR-S* 相比少一个低密度脂蛋白受体结构域, 但在 C 端多了 38 个氨基酸序列 (图 1: B)。与德国小蠊、埃及伊蚊的 LPR 序列进行比对发现, 与 LPR-L 相比, LPR-S 在 C 端均有部分氨基酸缺失 (图 2)。LPR 在不同物种间的保守性较强, 表皮生长因子结构域 (EGF)、低密度脂蛋白受体结构域 (LDLa)、低密度脂蛋白受体 YWTD 结构域 (LY) 等结构域均较为保守, 其中飞蝗 *LmLPR-L* 与德国小蠊 BgLPR-L、埃及伊蚊 AaLPRov 的相似度分别为 80% 和 73%, *LmLPR-S* 与 BgLPR-S、AaLPRfb 的相似度分别为 82% 和 66% (图 2)。

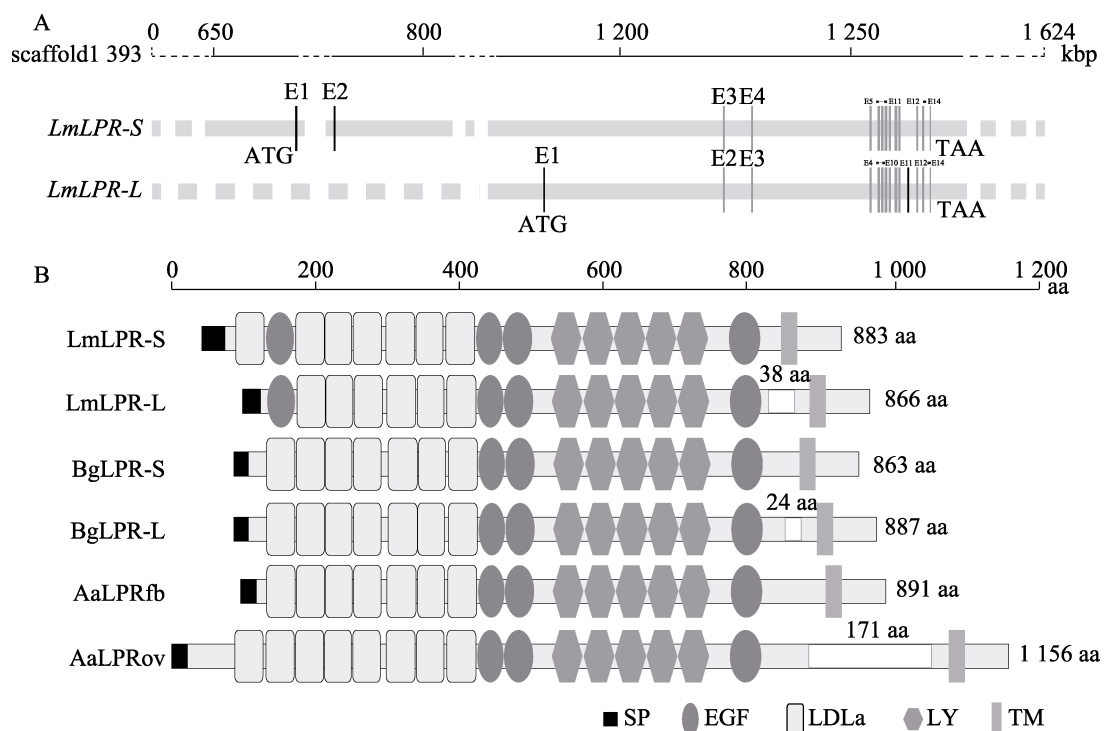


图 1 *LmLPR* 的基因结构图及其与其他物种 LPR 的结构分析与比较

Fig. 1 Genetic structure of *LmLPR* and structure analysis and comparison of *LmLPR* and other species' LPR

A. *LmLPR* 的基因结构分析; B. *LmLPR* 与其他物种 LPR 的结构分析及比较。

A. The genetic structure analysis of *LmLPR*; B. The structure analysis and comparison of *LmLPR* and other species' LPR.

SP: 信号肽; EGF: 表皮生长因子结构域; LDLa: 低密度脂蛋白受体结构域;

LY: 低密度脂蛋白受体 YWTD 结构域; TM: 跨膜域。

SP: Signal peptide; EGF: Epidermal growth factor-like domain; LDLa: Low-density lipoprotein receptor domain class A;

LY: Low-density lipoprotein-receptor YWTD domain; TM: Transmembrane region.

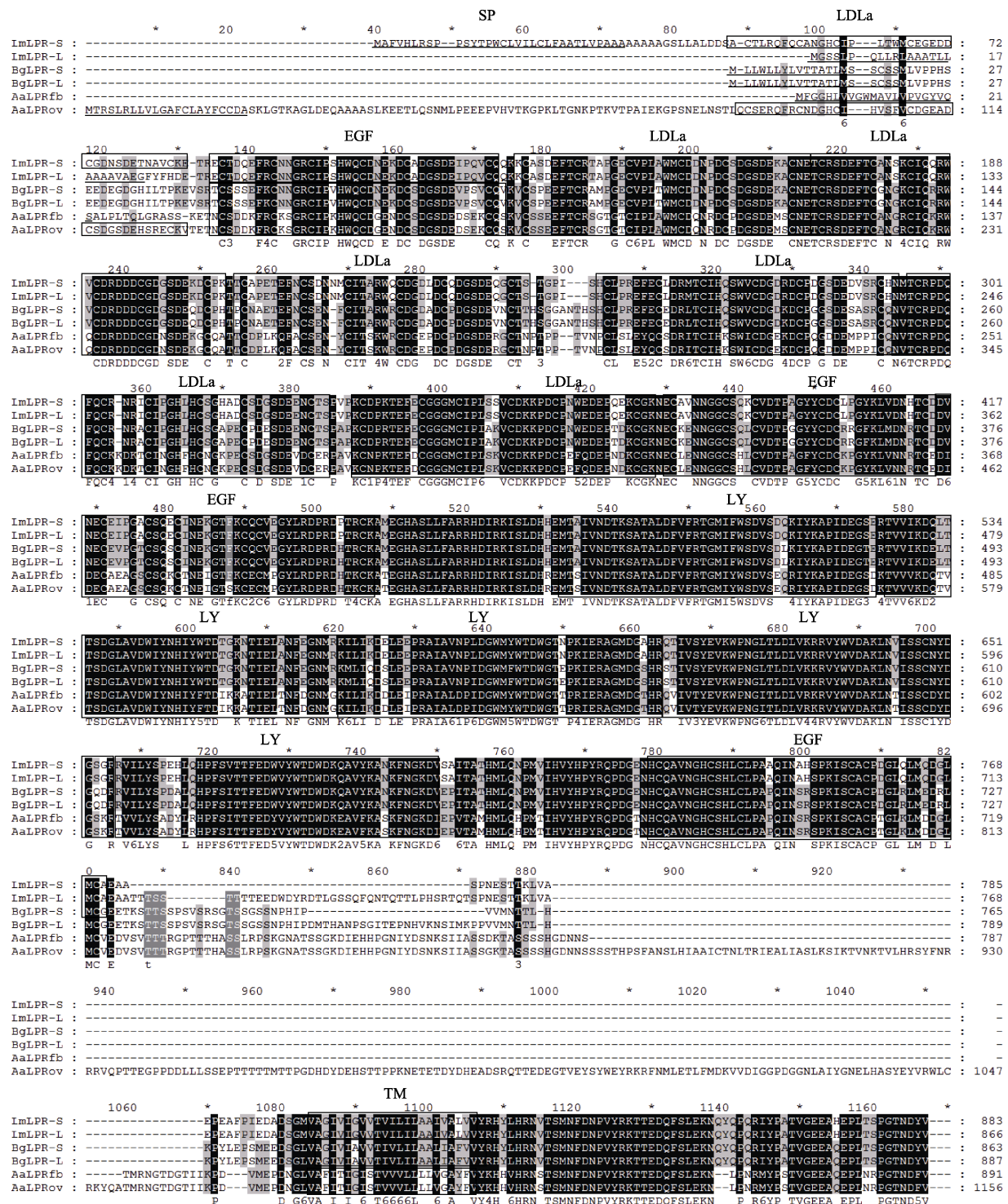


图2 *LmLPR-L* 和 *LmLPR-S* 与其他昆虫物种 *LPR-L* 和 *LPR-S* 的氨基酸序列比对分析
Fig. 2 Alignment analysis of *LmLPR-L* and *LmLPR-S* with *LPR-L* and *LPR-S* from other insect species

2.2 系统进化树分析

将获得的飞蝗 *LPR-L* 和 *LPR-S* 氨基酸序列与家蚕、德国小蠊、褐飞虱、埃及伊蚊、黑腹果

蝇等昆虫的 *LPR* 氨基酸序列进行聚类分析, 聚类结果显示, 飞蝗 *LPR-L* 和 *LPR-S* 首先相聚, 然后与蜚蠊目德国小蠊的 *LPR-L* 和 *LPR-S* 聚为一支 (图 3), 表现出较近的亲缘关系。

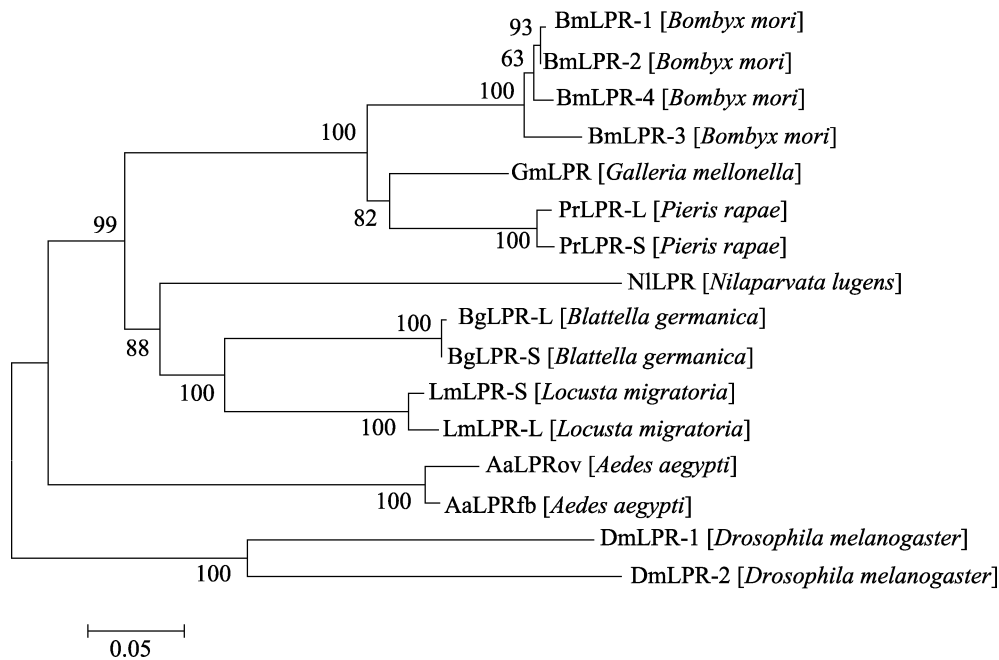


图 3 LmLPR 与其他昆虫载脂蛋白受体 LPR 系统聚类分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of LmLPR and LPR from other insect species

2.3 LmLPR 的组织 and 时期表达特性分析

利用 RT-qPCR 方法检测了 *LmLPR-S* 和 *LmLPR-L* 在 5 龄飞蝗不同组织部位及不同发育时期的表达特性。组织表达显示, *LmLPR-S* 在卵巢中高表达, 表皮、翅芽、前肠、中肠、后肠和马氏管中表达次之, 而在其他组织部位的表达量较低(图 4: A)。 *LmLPR-L* 在翅芽和卵巢中高表达, 后肠和马氏管中表达次之, 在其他组织部位的表达量较低(图 4: C)。时期表达发现, *LmLPR-S* 在蜕皮后表达量逐渐升高且在第 2 天(N5D2)达到峰值, 随后表达量逐渐降低并趋于稳定表达直到成虫蜕皮前(N5D3-N5D8)(图 4: B)。 *LmLPR-L* 在蜕皮后第 3 天(N5D3)的表达量最高, 其余时期表达均较低且趋于平稳。(图 4: D)。

2.4 基于 RNAi 的 LmLPR 的生物学功能分析

为了进一步研究 *LmLPR* 对飞蝗生长发育的影响, 我们利用 *LmLPR-L* 和 *LmLPR-S* 公共区域序列设计引物并合成 dsRNA (ds*LmLPRCOM*)。首先向 4 龄第 1 天若虫注射 10 μ g ds*LmLPRCOM*, 以注射 ds*GFP* 为对照。结果发现与对照组相比, 注射 ds*LmLPRCOM* 的飞蝗 *LmLPR* 的表达能够被显著抑制, 沉默效率达到 80% 以上(图 5: A),

但飞蝗均能够正常蜕皮至 5 龄(图 5: B)。为了探讨 *LmLPR* 的沉默是否影响表皮的渗透性, 利用伊红染色的方法分别对 ds*LmLPRCOM* 和 ds*GFP* 个体进行染色。在 45 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min 后, 发现与对照组结果类似, 注射 ds*LmLPRCOM* 的飞蝗腹部背面和腹面均不能被伊红着色(图 5: C), 表明 *LmLPR* 的沉默不影响表皮的渗透性。

3 讨论

近年来, 载脂蛋白受体已在不同昆虫物种中被鉴定并分析。Dantuma 等(1999)人报道了飞蝗 LPR 序列, 但在其它物种中发现 2 个 LPR 基因, 如德国小蠊, 埃及伊蚊, 果蝇等。本文利用飞蝗转录组数据库和基因组数据库对飞蝗 LPR 进行搜索, 克隆得到 2 条 LPR 序列, 其编码蛋白与德国小蠊 BgLPR-L 和 BgLPR-S 聚为一支(图 3), 因此将其命名为 *LmLPR-L* 和 *LmLPR-S*, 其中 *LmLPR-S* 与 Dantuma 等(1999)人报道的 LPR 编码序列一致。进一步基因结构分析发现, *LmLPR-L* 和 *LmLPR-S* 均位于 scafflod1393 上, 且均有 14 个外显子, 其中 *LmLPR-S* 的第 3-14 外显子(E3-E14)对应于 *LmLPR-L* 的第 2-10 外显子(E2-E10)和第 12-14 外显子(E12-E14),

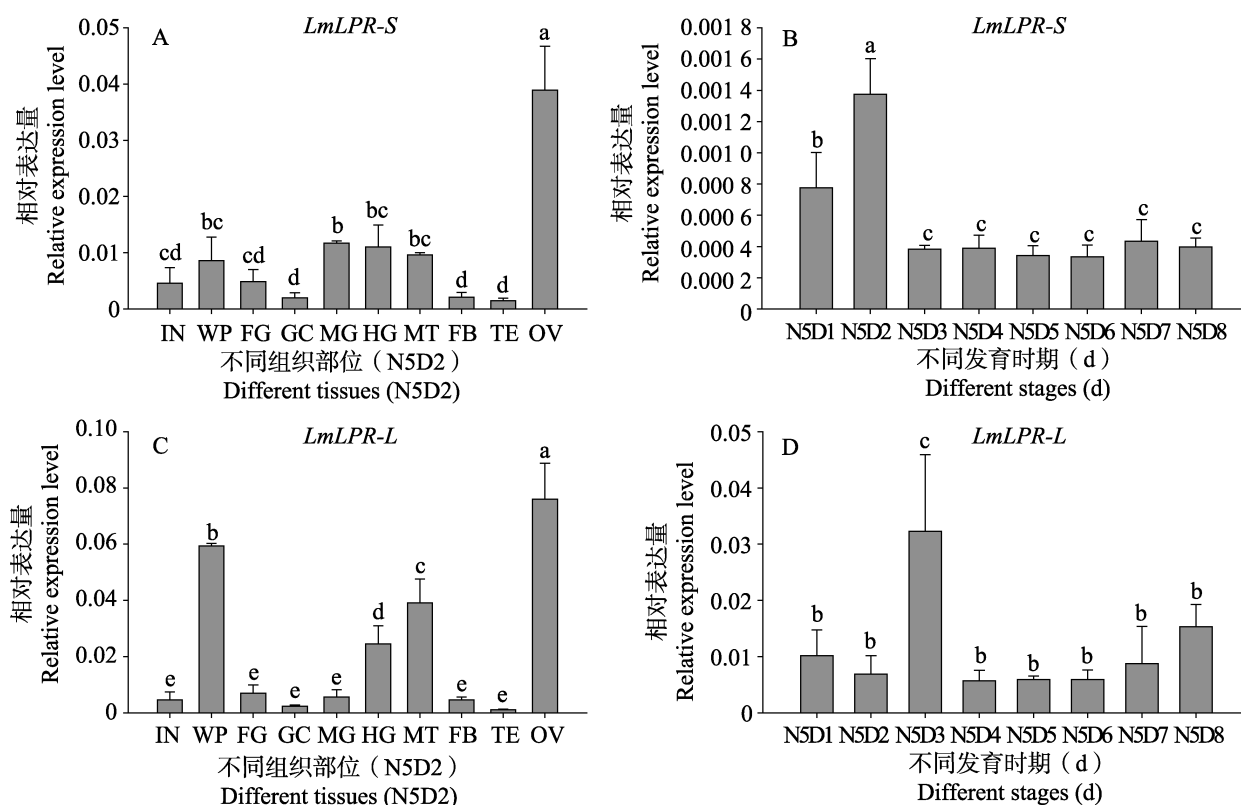


图 4 *LmLPR* 在 5 龄飞蝗不同组织部位及不同发育天数的表达

Fig. 4 The relative expression of *LmLPR* in different tissues and different days of 5th instar nymphs

A, C. *LmLPR-S* 和 *LmLPR-L* 在飞蝗 5 龄第 2 天若虫不同组织部位的表达; B, D. *LmLPR-S* 和 *LmLPR-L* 在 5 龄飞蝗不同发育天数的表达。IN: 体壁; WP: 翅芽; FG: 前肠; GC: 胃盲囊; MG: 中肠; HG: 后肠; MT: 马氏管; FB: 脂肪体; TE: 精巢; OV: 卵巢; N5D1-N5D8: 5 龄第 1-8 天。

柱上标有不同字母表述差异显著 ($P < 0.05$) (Duncan's 多重比较)。

A, C. The relative expression of *LmLPR-S* and *LmLPR-L* in different tissues of 5th instar nymphs; B,

D. The relative expression of *LmLPR-S* and *LmLPR-L* in different days of 5th instar nymphs.

IN: Integument; WP: Wing pads; FG: Foregut; GC: Gastric caeca; MG: Midgut; HG: Hindgut; MT: Malpighian tubules; FB: Fat body; TE: Testis; OV: Ovary; N5D1-N5D8: 1st-8th day of 5th instar nymphs.

Histograms with different letters indicate significant difference at the 0.05 level by Duncan's test.

而 *LmLPR-S* 的第 1 和 2 外显子 (E1 和 E2) 与 *LmLPR-L* 的第 1 和 11 外显子 (E1 和 E11) 位于不同区域, 且 *LmLPR-L* 的第 11 外显子 (E11) 编码 C 端增加的 38 个氨基酸序列 (图 1: A, B)。在不同的昆虫物种中, LPR 的组织分布具有多样性, 其中大多数研究是关于载脂蛋白受体在昆虫脂肪体细胞和生殖细胞等部位的脂质转运和摄取作用。如利用 RT-PCR 和蛋白质印迹分析方法分别检测到采采蝇 *Glossina morsitans morsitans* *GmmLpR* 在中肠、头部、脂肪体、卵巢中含有相应的转录产物和蛋白质, 而在唾液腺、马氏管和生殖腺中未检测到相应的信号 (Benoit et al.,

2011)。德国小蠊 *B. germanica* *BgLpR* 在不同的组织 (脂肪体、卵巢、脑、中肠、肌肉) 中均有表达 (Ciudad et al., 2007)。褐飞虱 *NILpR* 在脂肪体和卵巢中高度表达, 而在头部、表皮和中肠的表达水平相对较低 (Lu et al., 2018)。在飞蝗 *L. migratoria* 中, Dantuma 等 (1999) 鉴定出了低密度脂蛋白 (LDL) 受体家族的新成员, 其除了在飞蝗卵母细胞和脂肪体中表达, 在脑和中肠中也有表达。本文在 Dantuma 等 (1999) 的基础上鉴定了 2 种形式的 *LmLPR*, 不同组织表达检测发现 *LmLPR-S* 和 *LmLPR-L* 均在卵巢中有高表达, 在表皮、翅芽、前肠、中肠、后肠和马氏管

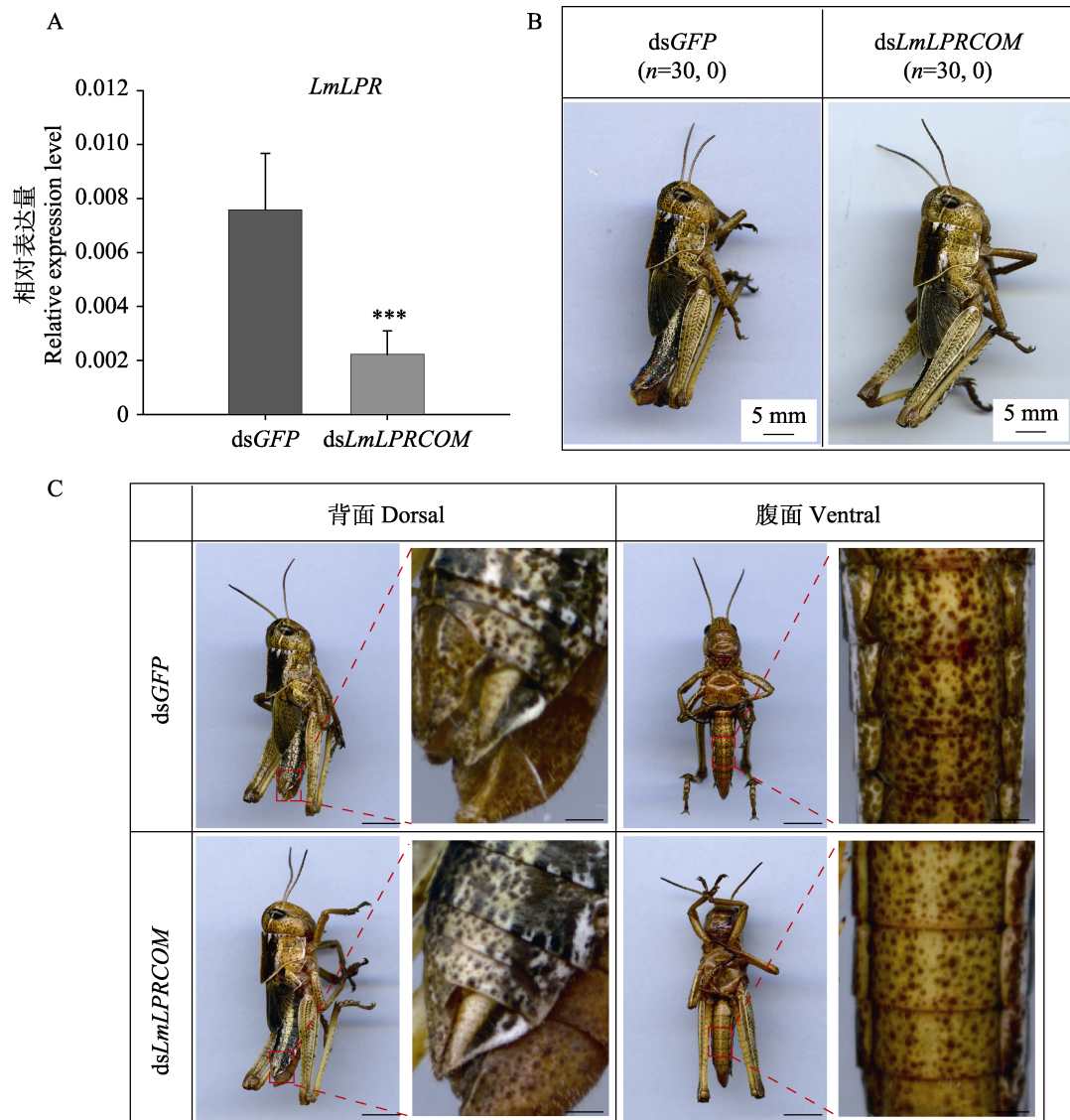


图 5 注射 dsLmLPR 对飞蝗发育及表皮渗透性的影响
Fig. 5 Effect of dsLmLPR injection to *Locusta migratoria*

A. 注射 dsLmLPR 对 *LmLPR* 的沉默效率, n 为注射头数, 标尺为 5 mm; B. 注射 dsLmLPR 对飞蝗发育的影响;
C. 注射 dsLmLPR 对飞蝗表皮渗透性的影响。标尺为 5 mm。

A. The silence efficiency of dsLmLPR injection to *LmLPR*, n is the injection number, scale bar = 5 mm;
B. Effect of dsLmLPR injection to the locust development; C. Effect of dsLmLPR injection to the cuticular permeability of the locust. Scale bar = 5 mm.

中也均有表达, 这与 Benoit 等 (2011) 的研究结果基本一致。

在昆虫表皮中, 表皮脂类物质主要以蜡的形式存在于上表皮中, 并且成分多种多样, 包括碳水化合物、脂肪醇、脂肪酸、酯类等 (Cerkowniak *et al.*, 2013)。表皮脂类物质的转运主要是在蜕皮前后完成, 蜕皮后脂类物质迅速转运到上表皮进行沉积, 以发挥其重要的生理功能。时期表达

分析发现, *LmLPR* 在蜕皮后表达量先升高后降低, 这与脂类物质转运的时期基本一致。

我们利用 RNAi 技术, 对 *LmLPR* 进行干扰。发现在沉默 *LmLPR* 后, 没有出现肉眼可见的表型。同时通过伊红染色发现, *LmLPR* 不能影响虫体的渗透性。最近有研究报道 *LpR* 在昆虫繁殖中起关键作用。在褐飞虱 *N. lugens* 中, 使用 dsRNA 抑制 *NILpR* 的表达导致三酰基甘油

(TAG) 含量降低, 从而引起卵巢发育延迟和繁殖力降低, 进一步的功能分析显示, NILpR 在卵黄发生和卵母细胞发育过程中调节卵黄蛋白原 (Vg) 生物合成 (Lu *et al.*, 2018)。此外, Khan 等 (2018) 在鱼虱 *Lepeophtheirus salmonis* 中鉴定出一个载脂蛋白受体 LsLPR, 研究发现 *LsLPR* 的沉默能够影响鱼虱的繁殖能力, 雌性虱子比对照虱子产生的后代减少 72%。因此, 我们推测 *LmLPR* 的沉默在飞蝗中没有出现肉眼可见的表型可能是由于它发挥着与生殖有关的作用, 如卵巢发育和繁殖能力。在 Benoit 等 (2011) 的研究中发现, 通过 RNA 干扰敲除采采蝇 *G. morsitans* *GmmLPR* 没有显著降低血淋巴脂质水平或卵子发生持续时间, 只延长了幼虫发育的时间, 说明干扰内吞 LpR 的作用是有限的。此外, LPR 可能并不是载脂蛋白与组织相互作用的唯一蛋白质。例如, 在家蚕中, CD-36 相关蛋白 Cameo2 以某种方式参与从载脂蛋白到丝腺中类胡萝卜素的转移 (Sakudoh *et al.*, 2010)。在大锥蝽 *Panstrongylus megistus* 中, β -ATPase 在卵巢中起到非内吞载脂蛋白受体的作用, 介导脂肪酸从载脂蛋白向卵母细胞的转移 (Frutero *et al.*, 2017)。这些结果表明, 载脂蛋白与细胞之间的相互作用可能需要多种组分的参与。因此, 我们推测在飞蝗中可能也存在其他因子, 能够介导脂类物质从载脂蛋白到真皮细胞的转运。

参考文献 (References)

- Benoit JB, Yang G, Krause TB, Patrick KR, Aksoy S, Attardo GM, 2011. Lipophorin acts as a shuttle of lipids to the milk gland during tsetse fly pregnancy. *Journal of Insect Physiology*, 57(11): 1553–1561.
- Cerkowniak M, Puckowski A, Stepnowski P, Golebiowski M, 2013. The use of chromatographic techniques for the separation and the identification of insect lipids. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 937: 67–78.
- Chapman RF, 2013. *The Insects: Structure and Function*, 5th ed. New York: Cambridge University Press. 463–500.
- Chen YL, 2000. Main achievement of research and management of migratory locust in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 37(1): 50–58. [陈永林, 2000. 中国的飞蝗研究及其治理的主要成就. 昆虫知识, 37(1): 50–58.]
- Cheon H, Seo S, Sun J, Sappington T, Raikhel A, 2001. Molecular characterization of the VLDL receptor homolog mediating binding of lipophorin in oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(8): 753–760.
- Ciudad L, Belles X, Piulachs MD, 2007. Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors. *BMC Molecular Biology*, 8(1): 53.
- Dantuma N, Potters M, De Winther M, Tensen C, Kooiman F, Bogerd J, Van der Horst D, 1999. An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. *J. Lipid Res.*, 40(5): 973–978.
- Frutero LL, Leyria J, Ramos FO, Stariolo R, Settembrini BP, Canavoso LE, 2017. The process of lipid storage in insect oocytes: The involvement of beta-chain of ATP synthase in lipophorin-mediated lipid transfer in the chagas' disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Insect Physiology*, 96: 82–92.
- Gibbs AG, 2011. Thermodynamics of cuticular transpiration. *Journal of Insect Physiology*, 57(8): 1066–1069.
- Gopalapillai R, Kadono-Okuda K, Tsuchida K, Yamamoto K, Nohata J, Ajimura M, Mita K, 2006. Lipophorin receptor of *Bombyx mori*: cDNA cloning, genomic structure, alternative splicing, and isolation of a new isoform. *Journal of Lipid Research*, 47(5): 1005–1013.
- Khan MT, Dalvin S, Waheed Q, Nilsen F, Male R, 2018. Molecular characterization of the lipophorin receptor in the crustacean ectoparasite *Lepeophtheirus salmonis*. *PLoS ONE*, 13 (4): e0195783.
- Klowden MJ, 2013. *Physiological Systems in Insects*, 3rd ed. the United States of America: Academic Press. 96–112.
- Lee CS, Han JH, Kim BS, Lee SM, Hwang JS, Kang SW, Lee BH, Kim HR, 2003. Wax moth, *Galleria mellonella*, high density lipophorin receptor: Alternative splicing, tissue-specific expression, and developmental regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(8): 761–771.
- Lu K, Chen X, Li Y, Li W, Zhou Q, 2018. Lipophorin receptor regulates *Nilaparvata lugens* fecundity by promoting lipid accumulation and vitellogenin biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 219/220: 28–37.
- Ma SJ, 1958. The population dynamics of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis* Meyen) in China. *Chinese Journal of Acta Entomologica Sinica*, 8(1): 1–40. [马世俊, 1958. 东亚飞蝗 (*Locusta migratoria manilensis* Meyen) 在中国的发生动态. 昆虫学报, 8(1): 1–40.]

- Moussian B, 2013. The Arthropod Cuticle//Minelli A, Boxshall G, Fusco G(eds.). *Arthropod Biology and Evolution: Molecules, Development, Morphology*. New York Dordrecht London: Springer Heidelberg. 171–196.
- Parra-Peralbo E, Culi J, 2011. *Drosophila* lipophorin receptors mediate the uptake of neutral lipids in oocytes and imaginal disc cells by an endocytosis-independent mechanism. *PLoS Genetics*, 7(2): e1001297.
- Sakudoh T, Iizuka T, Narukawa J, Sezutsu H, Kobayashi I, Kuwazaki S, Banno Y, Kitamura A, Sugiyama H, Takada N, Fujimoto H, Kadono-Okuda K, Mita K, Tamura T, Yamamoto K, Tsuchida K, 2010. A CD36-related transmembrane protein is coordinated with an intracellular lipid-binding protein in selective carotenoid transport for cocoon coloration. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(10): 7739–7751.
- Seo SJ, Cheon HM, Sun J, Sappington TW, Raikhel AS, 2003. Tissue-and stage-specific expression of two lipophorin receptor variants with seven and eight ligand-binding repeats in the adult mosquito. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(43): 41954–41962.
- Van Hoof D, Rodenburg KW, van der Horst DJ, 2003. Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells. *Journal of Lipid Research*, 44(8): 1431–1440.
- Wang X, Fang X, Yang P, Jiang X, Jiang F, Zhao D, Li B, Cui F, Wei J, Ma C, Wang Y, He J, Luo Y, Wang Z, Guo X, Guo W, Wang X, Zhang Y, Yang M, Hao S, Chen B, Ma Z, Yu D, Xiong Z, Zhu Y, Fan D, Han L, Wang B, Chen Y, Wang J, Yang L, Zhao W, Feng Y, Chen G, Lian J, Li Q, Huang Z, Yao X, Lv N, Zhang G, Li Y, Wang J, Wang J, Zhu B, Kang L, 2014. The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. *Nature Communications*, 5: 2957.
- Wang Y, Yu Z, Zhang J, Moussian B, 2016. Regionalization of surface lipids in insects. *Proceedings. Biological Sciences*, 283(1830): 20152994.
- Wang ZJ, Qin QL, Hao SG, Chen YL, Li HC, Li DM, 2002. Present status of locust outbreak and its sustainable control strategies in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 39(3): 172–175. [王正军, 秦启联, 郝树广, 陈永林, 李鸿昌, 李典谟, 2002. 我国蝗虫爆发成灾的现状及其持续控制对策. 昆虫知识, 39(3): 172–175.]
- Yu Z, Wang Y, Zhao X, Liu X, Ma E, Moussian B, Zhang J, 2017. The ABC transporter *ABCH-9C* is needed for cuticle barrier construction in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87: 90–99.