

交配对棉铃虫雌成虫抗菌肽表达水平的影响*

范荫荫** 杜孟芳 王 琼 刘孝明 安世恒 李为争 郭线茹 原国辉***

(河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘 要 【目的】 探明交配对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 雌成虫抗菌肽表达水平的影响, 为深入研究交配与雌成虫免疫反应的关系提供依据。【方法】 利用实时荧光定量 PCR 技术, 分析了天蚕素 3、天蚕素 D、家蚕抗菌肽、攻击素、葛佬素、防御素和蚕幼抗菌肽共 7 个抗菌肽基因在棉铃虫处女雌虫和已交配雌虫腹部的表达情况。【结果】 结果表明, 棉铃虫雌成虫交配后, 除了天蚕素 3 基因表达量下降外, 其他 6 种抗菌肽基因的表达量均显著上调, 但表达高峰时间有所不同。其中葛佬素和蚕幼抗菌肽基因表达水平变化趋势相似, 均在交配后 1 h 迅速达到高峰; 家蚕抗菌肽、攻击素和防御素基因表达水平变化趋势相似, 交配后表达量逐渐增加, 到交配后 3 h 时达到高峰, 此后开始下降; 天蚕素 D 基因则在交配后 1 h 表达量没有明显变化, 在交配 3 h 时显著增加, 此后又逐渐减少。【结论】 除了天蚕素 3 基因外, 6 种供试抗菌肽基因表达量显著上调的高峰期均发生在雌成虫交配后 3 h 以内。

关键词 棉铃虫, 交配, 抗菌肽, 交配后反应, 实时荧光定量 PCR

The effect of mating on the expression of antimicrobial peptides in female *Helicoverpa armigera*

FAN Yin-Yin** DU Meng-Fang WANG Qiong LIU Xiao-Ming AN Shi-Heng
LI Wei-Zheng GUO Xian-Ru YUAN Guo-Hui***

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, 450002, China)

Abstract [Objectives] To investigate the effect of mating on the expression of antimicrobial peptides (AMPs) in female *Helicoverpa armigera*, and provide a basis for further research on the relationship between mating and female immune responses. [Methods] The relative expression of seven AMP genes, *Cecropin 3*, *Cecropin D*, *Moricin*, *Attacin*, *Gloverin*, *Defensin* and *Lebocin*, in the abdomens of virgin and mated *H. armigera* females were measured using real time quantitative PCR. [Results] With the exception of *Cecropin D*, expression of the other 6 genes generally increased within three hours of mating, although the timing of peak expression differed. The temporal trend in the expression of *Gloverin* and *Lebocin* was similar, with expression of both genes peaking just 1 h after mating. Temporal expression of *Moricin*, *Attacin* and *Defensin* was also similar, with expression increasing gradually to peak 3 h after mating, then declining. The expression of *Cecropin D* differed from that of the other genes in that there was no apparent change in expression 1 h after mating. Expression of this gene had obviously increased 3 h after mating, then gradually declined. [Conclusion] With the exception of *Cecropin 3*, expression of six other AMP genes generally occurred within 3 h of mating.

Key words *Helicoverpa armigera*, mating, antimicrobial peptide, postmating response, real time quantitative PCR

抗菌肽 (Antimicrobial peptides, AMPs) 是昆虫天然免疫系统的重要组成部分 (初源等, 2013)。由于昆虫抗菌肽具有较强的热稳定性、

水溶性和广谱高效的抗菌活性, 在农业、医药、食品等领域展现出广阔的开发应用前景 (高琳琳和李卫东, 2010)。迄今为止, 已经从昆虫中分

* 资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31301916)

**第一作者 First author, E-mail: yy_19890117@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: hnndygh@126.com

收稿日期 Received: 2014-12-04, 接受日期 Accepted: 2015-05-08

离鉴定出超过 150 种抗菌肽, 根据其氨基酸组成和结构特征可分为 α -螺旋肽 (α -helical peptide)、富含甘氨酸肽 (Glycine-rich peptides)、富含半胱氨酸肽 (Cysteine-rich peptides) 和富含脯氨酸肽 (Proline-rich peptides) 四大类 (Yi *et al.*, 2014)。这些抗菌肽主要在脂肪体细胞内合成, 在上皮细胞、生殖道、马氏管和气管等处也有分泌, 当昆虫感染细菌、真菌等病原物后, 可随即引起体内抗菌肽的诱导表达, 然后分泌到淋巴液中执行相关功能 (Lemaitre and Hoffmann, 2007)。因此, 探明抗菌肽在昆虫天然免疫反应中的发生和作用机制, 不仅可以为研究更复杂的高等动物天然免疫反应提供相关的研究线索, 而且也可为了保护益虫和防治害虫提供重要科学依据 (张明明等, 2012)。

交配是两性生殖昆虫的重要生命行为。已有的研究表明, 交配不仅可以诱导昆虫雌虫的生殖、活动和取食等交配后反应 (Postmating responses, PMRs) 发生一系列变化 (华荣胜等, 2010), 而且也会改变已交配雌虫的免疫应答 (Lawniczak *et al.*, 2007)。如交配可引起黄粉虫 *Tenebrio molitor* 雌虫的酚氧化酶活性降低 (Rolff and Siva-Jothy, 2002), 但能促进地蟋 *Allonemobius socius* 雌虫酚氧化酶活性的升高 (Fedorka *et al.*, 2004), 推测与不同昆虫的免疫与生殖间的权衡 (Trade off) 机制有关 (McNamara *et al.*, 2013)。对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的研究发现, 交配能够诱导雌虫多种抗菌肽基因的转录 (Lawniczak and Begun, 2004; McGraw *et al.*, 2004), 这似乎预示着雌虫在交配后具有更高的免疫能力 (Domanitskaya *et al.*, 2007); 但最近研究发现, 来自雄蝇的精液成分反而降低已交配雌蝇的免疫水平 (Short *et al.*, 2012)。通过转录组数据分析家蚕 *Bombyx mori* 已交配雌虫和处女雌虫性信息素腺体 (Pheromone glands, PGs), 发现性信息素腺体内抗菌肽基因在交配后短时间内迅速上调, 此后又持续下降 (Zhang *et al.*, 2014)。显然, 进一步探明抗菌肽基因在已交配雌虫体内的表达情况, 对于揭示交配与抗菌肽表达水平的关系等具有重要价值。为此, 本研究以重

要农业害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 为试验材料, 利用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 分析了四大类 7 种抗菌肽基因在已交配棉铃虫雌成虫体内的表达水平。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

棉铃虫为室内饲养种群。饲养条件为 (27 ± 1) °C, RH 75 %, 光周期 16 L : 8 D。蛹期鉴定雌雄后, 分别放置在不同的羽化笼内。

1.2 样品制备

成虫羽化后取同日羽化的 2 日龄雌虫和雄虫, 分别配对放入不同的透明塑料杯中, 任其自由交配。选取交配后 1、3、6 和 12 h 雌成虫, 另取同一日龄的处女雌成虫作为对照, 分别剪取腹部后立即放入无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中, 加入 400 μ L trizol, 然后置于 - 80 °C 保存备用。所有样品均重复 3 次。

1.3 试剂

总 RNA 抽提试剂 (trizol) 购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser)、荧光定量试剂盒 (SYBR Primer Script RT-PCR Kit) 和 DL2000 Marker 购自 TaKaRa 公司; 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 酶购自百泰克公司; 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.4 总 RNA 提取与 cDNA 合成

所有样品均按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA, 根据 TaKaRa 反转录试剂盒说明书获得第一链 cDNA, 以此作为 PCR 模板。

1.5 引物设计与合成

根据 GenBank 已经登录和本实验室克隆得到的棉铃虫抗菌肽相关基因, 共选用四大类 7 种抗菌肽基因。其中 α -螺旋抗菌肽选用天蚕素 3 (Cecropin 3)、天蚕素 D (Cecropin D) 和家蚕抗菌肽 (Moricin) 共 3 种; 富含甘氨酸抗菌肽选用攻击素 (Attacin) 和葛佬素 (Gloverin) 共 2 种; 富含半胱氨酸和富含脯氨酸抗菌肽分别选

用防御素 (Defensin) 和蚕幼抗菌肽 (Lebocin) 各 1 种。共设计 7 种抗菌肽基因引物, 以棉铃虫 18S rRNA 为内参基因, NCF 和 NCR 为内参基因引物 (表 1), 引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.6 抗菌肽基因的表达分析

用 gDNA Eraser 处理 1.4 提取的总 RNA, 以消除基因组 DNA 的影响。以各样品的反转录

cDNA 为模板, 在 Mastercycler®ep realplex real-time PCR 检测系统上进行操作。荧光定量 PCR 扩增条件为: 95℃ 1 min, 95℃ 15 s, 58℃ 15 s, 72℃ 20 s, 共 40 个循环; 溶解曲线参数设置为默认, 以检测每次试验产物的特异性。试验共重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析荧光定量 PCR 基因的转录差异: $\Delta C_t = C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ 实验组}} - \Delta C_{t \text{ 对照组}}$ (Livak and Schmittgen, 2001)。

表 1 用于荧光定量检测的基因引物
Table 1 Primers designed for qRT-PCR research

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence	基因登陆号 Accession number
HarmCecropin 3 F	TGGTGGCAGCGTGCAGCGT	GU182910
HarmCecropin 3 R	ACTTTGAACATTATTGCTTA	
HarmCecropin D F	TGTTTGCTTGGTTCCTGGTT	EU041763
HarmCecropin D R	TTTTCTTCCGAGCTGTCGT	
HarmMoricin F	TGGAAGTAATTAGAATCATG	GU182911
HarmMoricin R	TGGCTTGAAGAATGTGTAGA	
HarmAttacin F	TTAACCCTGTTCGTGGTGAGT	AY948540
HarmAttacin R	GCTTGTAAGTGCTTGTTCCTAT	
HarmGloverin F	TTAGCCCTTACGGTGACAG	本实验克隆, 已注册, 正在等待申请号
HarmGloverin R	ATCCAAGTTGCCTCCCCTGAT	
HarmDefensin F	TAAGCCCTTGAGCAATGAG	本实验克隆, 已注册, 正在等待申请号
HarmDefensin R	CTACAAGTATGACTAACGCAT	
HarmLebocin F	ACCCGTCCCTGCCTTCAGTCA	本实验克隆, 已注册, 正在等待申请号
HarmLebocin R	GGAAGTCATACCCTGGCAGAT	
NCF	GCATCTTTCAAATGTCTGC	AB620126
NCR	TACTCATTCCGATTACGAG	

2 结果与分析

2.1 交配对 3 种 α-螺旋抗菌肽基因表达水平的影响

利用 qRT-PCR 分别检测交配对棉铃虫腹部天蚕素 3、天蚕素 D 和家蚕抗菌肽 3 种 α-螺旋抗菌肽基因表达水平的影响, 结果如图 1 所示。雌成虫交配后, 不同 α-螺旋抗菌肽的基因表达水平有不同的变化。其中天蚕素 3 基因随着雌虫交配时间的推移逐渐降低, 至交配后 6 h 达到最低值,

交配后 12 h 基本恢复到处女雌虫的水平; 天蚕素 D 基因在处女雌虫腹部没有表达, 交配后 3 h 出现表达高峰, 此后又逐渐消失; 家蚕抗菌肽基因在处女雌虫腹部有少量表达, 交配后表达量增加, 交配后 3 h 达到高峰, 6 h 后下降恢复到处女雌虫的水平。

2.2 交配对 2 种富含甘氨酸抗菌肽基因表达水平的影响

通过 qRT-PCR 分别检测交配对棉铃虫腹部

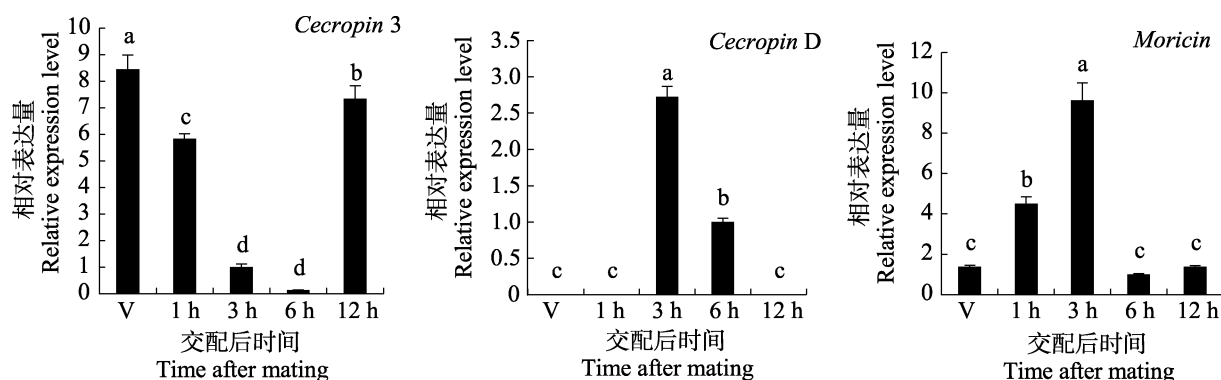


图 1 α -螺旋抗菌肽基因在棉铃虫雌虫腹部的相对表达水平

Fig. 1 The relative gene expression level of α -helical antimicrobial peptides in the abdomen of female *Helicoverpa armigera*

V: 处女雌虫; 1 h: 交配后 1 h; 3 h: 交配后 3 h; 6 h: 交配后 6 h; 12 h: 交配后 12 h。

图中数据为平均值±标准误差 ($n=3$); 采用 Duncan's 多重比较检验法比较, 柱形图上标

有不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下图同。

V: Virgin female; 1 h: 1 h after mating; 3 h: 3 h after mating; 6 h: 6 h after mating; 12 h: 12 h after mating. The data represent the mean values±SE of three biological replicates; histograms with different letter indicate significant difference at 0.05 level by Duncan's multiple-range test. The same blow.

攻击素和葛佬素两种富含甘氨酸抗菌肽基因表达水平的影响, 从图 2 可以看出, 两种富含甘氨酸抗菌肽基因在棉铃虫处女雌成虫腹部均有表达, 且交配后表达量均显著上调。其中攻击素在交配后 1 h 开始上调, 至 3 h 表达水平最高, 此后迅速下降, 在 6 h 时几乎检测不到; 葛佬素则在交配后 1 h 迅速上调到最高表达水平, 在 3 h 时迅速下降, 交配 6 h 后维持在低于处女雌虫的表达水平。

2.3 交配对富含半胱氨酸和脯氨酸抗菌肽基因表达水平的影响

利用 qRT-PCR 分别检测交配对棉铃虫腹部防御素和蚕幼抗菌肽两种抗菌肽基因表达水平的影响, 从图 3 可以看出, 富含半胱氨酸的防御素在交配后 1 h 表达量开始上升, 至交配后 3 h 达到高峰, 此后表达量开始降低。富含脯氨酸的蚕幼抗菌肽在交配后 1 h 迅速上调, 并达到最高,

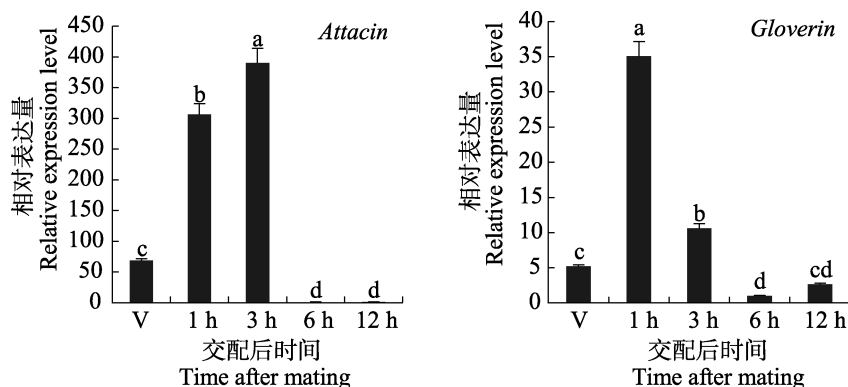


图 2 富含甘氨酸抗菌肽基因在棉铃虫雌虫腹部的相对表达水平

Fig. 2 The relative expression level of Glycine-rich antimicrobial peptides in the abdomen of female *Helicoverpa armigera*

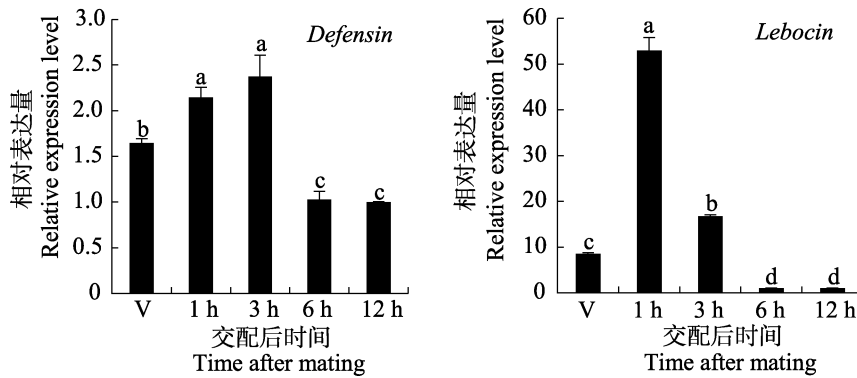


图3 富含半胱氨酸和脯氨酸抗菌肽基因在棉铃虫雌虫腹部的相对表达水平

Fig. 3 The relative expression level of Cysteine-rich and Proline-rich antimicrobial peptides in the abdomen of female *Helicoverpa armigera*

此后又迅速下降, 交配 6 h 后维持在低于处女雌虫的表达水平。

3 讨论

交配可以诱导昆虫许多基因的表达发生改变 (Avila *et al.*, 2011)。本研究也表明, 交配能够引起棉铃虫雌虫腹部四大类抗菌肽表达水平的变化, 除天蚕素 3 外, 所检测的其他 6 种抗菌肽的表达水平均在交配后 1~3 h 显著上调, 其中表达量在 3 h 内一直处于持续上升的有家蚕抗菌肽、天蚕素 D、攻击素和防御素; 而葛佬素和蚕幼抗菌肽表达量在 1 h 时先显著上调, 在 3 h 时上升相对减弱。表明棉铃虫雌虫交配后, 检测的四大类抗菌肽在腹部总体表达趋势是短时间内迅速上调, 随后下调, 这一结果与对果蝇的研究结果相似 (McGraw *et al.*, 2008)。对家蚕的最新研究也表明, 交配能够引起性信息素腺体内抗菌肽基因在交配后短时间内迅速上调, 随后持续下降 (Zhang *et al.*, 2014)。关于交配后抗菌肽基因表达水平变化的原因, 目前的研究主要集中在模式昆虫果蝇, 一般认为与来自雄成虫的精液蛋白密切相关, 其中雄虫附腺蛋白中的性肽 (Sex peptide, SP) 起关键作用 (Short *et al.*, 2012)。性肽主要通过两种信号途径诱导抗菌肽的转录, 一是由真菌和大部分革兰氏阳性菌激活的 Toll 途径 (Toll pathway), 目前研究较多; 二是由革兰氏阴性菌激活的 Imd 途径 (Immune deficiency pathway), 目前研究较少 (Peng *et al.*,

2005)。至于性肽诱导的抗菌肽表达水平变化, 可能是性肽通过羟脯氨酸位点与某种模式识别受体相互作用的结果 (Domanitskaya *et al.*, 2007), 也可能是通过激活不同转录因子来调控不同抗菌肽基因的表达, 有待更广泛的研究予以证实 (Zhong *et al.*, 2012)。

交配后抗菌肽基因表达水平的变化是否与免疫防御直接相关, 目前尚无定论。一般认为, 抗菌肽是昆虫体液免疫体系的重要组成部分, 抗菌肽基因表达量的上调通常预示着免疫能力的增强 (张明明等, 2012)。但也有证据表明, 与处女果蝇相比, 交配后雌果蝇的免疫水平反而明显降低 (Short *et al.*, 2012)。估计交配后抗菌肽表达量短期上调不是针对某种特定感染, 而是一种非特异性反应, 以此预防来自雄虫精液成分的生理伤害或在交配过程中带来的病原菌。此外, 雌虫也可能利用抗菌肽上调来控制可用的精子数量或者储存的精子数量, 从而完成对精子的选择 (Avila *et al.*, 2011)。显然, 要确切了解交配后抗菌肽表达量上调与免疫反应的关系, 应进一步开展不同免疫反应的评估。

昆虫如何实现交配成功与免疫力下降间的权衡是值得探讨的科学问题。交配可以引起雌成虫从处女状态的体内生理平衡, 迅速跨越到成熟卵形成的新的生理状态, 推测交配与免疫之间的生理权衡可能部分由一个多效性的信号分子来介导 (Flatt *et al.*, 2005)。如对果蝇的研究表明, 性肽能够在体外刺激保幼激素 III (Juvenile

hormone III-bisepoxide, JHB3) 的合成 (Moshitzky *et al.*, 1996), 不仅在控制卵的形成过程中具有重要作用, 而且在细胞培养物中也能降低果蝇抗菌肽基因的表达式 (Flatt *et al.*, 2008), 说明保幼激素信号可能同时有助于交配后诱导的总体防御能力和抗菌肽基因表达水平的降低, 而这种遗传方面改变的生理上权衡很可能处于进化生活史权衡的中心, 有待更深入的研究予以探明。

参考文献 (References)

- Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD, Wolfner MF, 2011. Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 56: 21–40.
- Chu Y, Zhou F, Zhang MM, An CJ, 2013. Frontiers of research on the innate immune response in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(2): 311–320. [初源, 周帆, 张明明, 安春菊, 2013. 昆虫天然免疫反应研究前沿. 应用昆虫学报, 50(2): 311–320.]
- Domanitskaya EV, Liu H, Chen S, Kubli E, 2007. The hydroxyproline motif of male sex peptide elicits the innate immune response in *Drosophila* females. *FEBS J.*, 274(21): 5659–5668.
- Fedorka KM, Zuk M, Mousseau TA, 2004. Immune suppression and the cost of reproduction in the ground cricket, *Allonemobius socius*. *Evolution*, 58(11): 2478–2485.
- Flatt T, Heyland A, Rus F, Porpiglia E, Sherlock C, Yamamoto R, Garbuzov A, Palli SR, Tatar M, Silverman, 2008. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.*, 211(Pt 16): 2712–2724.
- Flatt T, Tu MP, Tatar M, 2005. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays*, 27(10): 999–1010.
- Gao LL, Li WD, 2010. Advances in reseach on the use of antibacterial peptides. *Journal of Pathogen Biology*, 5(9): 710–713. [高琳琳, 李卫东, 2010. 昆虫抗菌肽及其应用研究进展. 中国病原生物学杂志, 5(9): 710–713.]
- Hua RS, Qi ZL, Shi LG, 2010. Advance of insect mating factor. *Bulletin of Science and Technology*, 26(4): 556–559. [华荣胜, 戚志良, 时连根, 2010. 昆虫交配因子的研究进展. 科技通报, 26(4): 556–559.]
- Lawniczak MK, Barnes AI, Linklater JR, Boone JM, Wigby S, Chapman T, 2007. Mating and immunity in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.*, 22(1): 48–55.
- Lawniczak MK, Begun DJ, 2004. A genome-wide analysis of courting and mating responses in *Drosophila melanogaster* females. *Genome*, 47(5): 900–910.
- Lemaitre B, Hoffmann J, 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 697–743.
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25: 402–408.
- McGraw LA, Clark AG, Wolfner MF, 2008. Post-mating gene expression profiles of female *Drosophila melanogaster* in response to time and to four male accessory gland proteins. *Genetics*, 179(3): 1395–1408.
- McGraw LA, Gibson G, Clark AG, Wolfner MF, 2004. Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.*, 14(16): 1509–1514.
- McNamara KB, Wedell N, Simmons LW, 2013. Experimental evolution reveals trade-offs between mating and immunity. *Biol. Lett.*, 9(4): 20130262.
- Moshitzky P, Fleischmann I, Chaimov N, Saudan P, Klauser S, Kubli E, Applebaum SW, 1996. Sex-peptide activates juvenile hormone biosynthesis in the *Drosophila melanogaster* corpus allatum. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32(3/4): 363–374.
- Peng J, Zipperlen P, Kubli E, 2005. *Drosophila* sex peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Curr. Biol.*, 15(18): 1690–1694.
- Rolff J, Siva-Jothy MT, 2002. Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(15): 9916–9918.
- Short SM, Wolfner MF, Lazzaro BP, 2012. Female *Drosophila melanogaster* suffer reduced defense against infection due to seminal fluid components. *J. Insect Physiol.*, 58(9): 1192–1201.
- Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ, 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(13): 5807–5822.
- Zhang MM, Chu Y, Zhao ZW, An CJ, 2012. Progress in the molecular mechanisms of the innate immune responses in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 55(10): 1221–1229. [张明明, 初源, 赵章武, 安春菊, 2012. 昆虫天然免疫反应分子机制研究进展. 昆虫学报, 55(10): 1221–1229.]
- Zhang SD, Liu XM, Zhu B, Yin XM, Du MF, Song QS, An SH, 2014. Identification of differentially expressed genes in the pheromone glands of mated and virgin *Bombyx mori* by digital gene expression profiling. *PLoS ONE*, (9)10: e111003
- Zhong X, Xu XX, Yi HY, Lin C, Yu XQ, 2012. A Toll-Spätzle pathway in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42(7): 514–524.