

棉铃虫Cathepsin L参与细胞免疫并受蜕皮激素调控

张鑫 汲鸿利 张世松 马汝莹 王刚*

(潍坊医学院生命科学与技术学院, 潍坊 261053)

摘要 半胱氨酸蛋白酶参与昆虫的许多生理过程, 但是其调控机制还不完全清楚, 该文利用实时定量RT-PCR(qRT-PCR)、免疫组织化学、基因干扰(RNAi)等方法对棉铃虫组织蛋白酶L基因(*HacatL*)进行了系统研究。结果表明, *HacatL*在棉铃虫血细胞中的浆血细胞和颗粒细胞中大量表达, 在蜕皮和变态时期表达量上升。细菌免疫刺激能明显诱导*HacatL*的表达上调; 在幼虫体内将*HacatL*基因沉默后能明显降低血细胞的伸展性和对细菌的清除能力。蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)能通过其受体(ecdysone receptor, EcR)及配体蛋白(ultraspiracle, USP)诱导*HacatL*的表达。这些结果说明*HacatL*基因受到蜕皮激素信号转导途径调控并参与昆虫细胞免疫反应。该研究结果有助于人们理解蜕皮激素调控昆虫细胞免疫的机制, 同时也可作为高等动物激素调控免疫反应的研究提供新的思路。

关键词 细胞免疫; 组织蛋白酶L; 棉铃虫; 蜕皮激素

Cathepsin L is Involved in Cellular Immune Response and Induced by Ecdysone in *Helicoverpa armigera*

ZHANG Xin, JI Hongli, ZHANG Shisong, MA Ruying, WANG Gang*

(School of Life Science and Technology, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

Abstract Insect cysteine proteinases play important roles in many physiological processes, but the molecular mechanism is not fully understood. In this study, qRT-PCR (real-time quantitative RT-PCR), immunohistochemistry, RNAi (gene interference) were used to systematically study the cathepsin L proteinase gene (*HacatL*) in *Helicoverpa armigera*. The results indicate that *HacatL* gene is highly expressed in plasmatocytes and granulocytes, and its expression increases during molting and metamorphosis. Bacterial immune stimulation induced the *HacatL* expression. Silencing of *HacatL* *in vivo* significantly increased bacterial load in larval hemolymphs and reduced the plasmatocyte spread. Ecdysone 20E (20-hydroxyecdysone) can induce *HacatL* expression through its EcR (ecdysone receptor) and its partner USP (ultraspiracle). These results suggest that *HacatL* gene is regulated by ecdysone signaling pathway and is involved in cellular immune response in insects. This results contribute to the understanding of regulatory mechanism of ecdysone regulating cellular immunity in insects, and also provide new insights into how hormones regulating immune response in mammals.

Keywords cellular immunity; cathepsin L; *Helicoverpa armigera*; ecdysone

收稿日期: 2023-02-23 接受日期: 2023-04-03

国家自然科学基金青年项目(批准号: 31601902)和山东省自然科学基金(批准号: ZR2022MC167)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0536-8462491, E-mail: gangw@wfmc.edu.cn

Received: February 23, 2023

Accepted: April 3, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31601902) and the Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No.ZR2022MC167)

*Corresponding author. Tel: +86-536-8462491, E-mail: gangw@wfmc.edu.cn

组织蛋白酶在生物的许多生理学过程如酶原活化、抗原修饰、细胞凋亡、蛋白酶修饰、肿瘤入侵和转移、免疫反应等^[1-3]中都起到广泛且重要的作用。按照蛋白酶催化底物的特异性, 可将蛋白酶分为肽链内切、肽链外切酶、氨基肽酶和羧肽酶等; 按照蛋白水解机制及蛋白酶作用位点的不同, 又可将其分为丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶^[4]。

在昆虫中, 组织蛋白酶也被广泛研究, 如在柞蚕中组织蛋白酶O参与免疫反应和变态发育^[5]。吸血昆虫猎蝽的脂肪体和卵巢可以合成组织蛋白酶D与血脂素相互作用参与卵母细胞内化过程^[6]。褐尾麻蝇组织蛋白酶B在变态时期的血细胞中高表达, 并且参与脂肪体的分解^[7]。在棉铃虫中组织蛋白酶D能被蜕皮激素诱导促进细胞凋亡^[8]。这些结果说明, 组织蛋白酶能参与昆虫的生长、发育、变态代谢以及免疫反应等许多生理学过程。但是对这些组织蛋白酶的调控机制还不完全清楚。

我们在棉铃虫中鉴定并得到了组织蛋白酶L(cathepsin L), 将其命名为HacatL, 并将其编码基因命名为*HacatL*。我们研究表明, *HacatL*在棉铃虫血细胞中的浆血细胞和颗粒细胞中大量表达, 不同发育阶段表达模式研究表明*HacatL*在蜕皮和变态时期表达量上升; 细菌刺激能诱导*HacatL*的表达, 幼虫体内*HacatL*的沉默降低了浆血细胞的伸展性和血细胞对细菌的清除能力; 蜕皮激素(20-hydroxyecdysone, 20E)能够通过其受体(ecdysone receptor, EcR)及配体蛋白(ultraspiracle, USP)诱导*HacatL*的表达, 这些结果说明*HacatL*受到蜕皮激素信号通路的诱导, 并且参与棉铃虫的细胞免疫反应。

1 材料与方法

1.1 材料

棉铃虫卵由中国科学院武汉病毒研究所提供, 人工饲料常规饲养^[9]。RNA提取使用的TRIzol试剂、反转录试剂盒、Lipofectamine 2000以及羊抗兔荧光二抗购自ThermoFisher Scientific公司。dsRNA合成试剂盒MEGAscript® RNAi Kit是Ambion公司(Texas, USA)的产品。引物序列由上海生工生物工程技术有限公司提供。*HacatL*基因qRT-PCR引物HacatLF和HacatLR、dsRNA合成引物HacatLRNAiF和HacatLRNAiR、*EcR-B1*(GenBank No.EU526831)基因dsRNA合成引物EcR-B1RNAiF和EcR-B1RNAiR以及*USP1*(GenBank No.EU526832)基因dsRNA合成引物USP1RNAiF和USP1RNAiR见表1。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR检测 剪开棉铃虫下腹部腹足收集血淋巴细胞, 分离表皮、脂肪体和中肠组织。向每100 mg组织中加入1 mL RNA提取试剂TRIzol, 按照提取试剂盒说明书提取总RNA。以总RNA为模板, 按照反转录试剂盒说明书反转录cDNA。qRT-PCR反应程序为: 95 °C预热2 min; 95 °C变性5 s, 60 °C退火15 s, 72 °C延伸15 s, 40个循环; 72 °C延伸10 min, 10 °C保存。

1.2.2 免疫组织化学 利用*HacatL*基因序列体外表达多肽, 按照以前的方法免疫兔子制备多克隆抗体^[10]。取6龄72 h幼虫血淋巴滴在载玻片上, 室温放置3 h后PBS洗3次, 蛋白酶K消化10 min后PBS洗3次, 37 °C封闭30 min后滴加1:100稀释的抗血清, 对照组滴加免疫前兔血清, 湿盒中4 °C过夜; PBS洗3次后

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
HacatLF	GTA CCT GGT GTC GCT GTC GG
HacatLR	CCT TGA TGT ACT TGA AGG CC
HacatLRNAiF	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAC CAG GGC AAG TGC GGC TCC
HacatLRNAiR	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCG AGT TCT TCA CCA GCC AGT
EcR-B1RNAiF	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA TTG CCC GTC AGT ACG A
EcR-B1RNAiR	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG AGC TTC TCA TTG AGG A
USP1RNAiF	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA TTG CCC GTC AGT ACG A
USP1RNAiR	GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG AGC TTC TCA TTG AGG A

加入1:1 000稀释的羊抗兔荧光二抗, 室温孵育2 h后PBS洗3次, DAPI反应液染色5 min, 封片观察。

1.2.3 虫体的细菌刺激 大肠杆菌培养过夜后2 000 r/min离心5 min, PBS洗3次后重悬。6龄24 h幼虫放置冰上麻醉, 将5 μ L的大肠杆菌液(10^5 个)沿着幼虫腹部侧面注射进幼虫体腔。对照组注射等量无菌PBS, 注射后0 h、3 h、6 h、12 h和24 h解剖幼虫收取血淋巴细胞提取总RNA, 反转录后qRT-PCR检测*HacatL*的表达。

1.2.4 RNA干扰(RNAi) *HacatL*、*EcR-B1*和*USP1* dsRNA合成参照Ambion MEGAscript transcription kit说明书进行。虫体干扰: 6龄12 h幼虫放置冰上麻醉, 从腹部侧面注射ds*HacatL* 6 μ g(5 μ L PBS)到幼虫体腔, 28 $^{\circ}$ C温度下正常饲养48 h, 分别在6龄24 h和6龄36 h重复注射。解剖分离血淋巴细胞提取总RNA, qRT-PCR检测*HacatL*的表达是否被抑制。细胞干扰: 6龄24 h幼虫用无菌水冲洗3次, 75%的酒精浸泡5 s, 剪断一只腹足将大约100 μ L血淋巴滴加到2 mL的Grace培养液(含10% FBS、2 mg/mL还原型谷胱甘肽、100 U庆大霉素)中摇匀, 于25 $^{\circ}$ C条件下6孔板中培养。待细胞贴壁后, 细胞在底部铺展密度为40%时, 吸去培养液加入不含还原型谷胱甘肽的Grace液, 静置培养1 h后将8 μ g的ds*HacatL*与5 μ L脂质体Lipofectamine 2000加入到250 μ L Grace液中混匀, 滴加在血细胞培养板内, 对照组滴加相同浓度的dsGFP, 继续培养12 h后提取总RNA, qRT-PCR方法检测干扰结果。

1.2.5 激素诱导*HacatL*水平的检测 蜕皮激素20E(Sigma, St, Louis, MO)用PBS稀释至0.1 mg/mL。6龄24 h幼虫冰上麻醉后注射20E(500 ng/头), 分别在0 h、1 h、3 h、6 h、12 h和24 h提取血淋巴总RNA, qRT-PCR方法来检测*HacatL*基因表达。

1.2.6 细菌清除实验 6龄12 h幼虫注射ds*HacatL* 48 h后注射5 μ L的大肠杆菌液(10^5 个), 对照组注射dsGFP, 3 h后将收集的血淋巴加入含抗凝剂的PBS中稀释10倍, 100 μ L稀释液涂在LB固体培养基上37 $^{\circ}$ C培养过夜, 检测菌落数量。

1.2.7 浆细胞伸展率检测 6龄12 h幼虫注射ds*HacatL* 48 h后注射大肠杆菌(10^5 个), 3 h后收集血淋巴细胞, 生理盐水稀释10倍, 取50 μ L稀释后血淋巴细胞滴在载玻片上, 潮湿环境中附着30 min后用PBS洗3次, 于显微镜下检测每100个浆细胞中伸展浆细胞

的比例。

1.2.8 统计学分析 所有实验独立重复3次, 使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。两组间数据比较应用*t*检验, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 棉铃虫*HacatL*蛋白高度保守

我们利用MEGA 7软件将*HacatL*蛋白序列(*Helicoverpa armigera*, XM_021329213.2)与烟草天蛾(*Manduca sexta*, XP_030033788.2)、家蚕(*Bombyx mori*, NP_001037464.2)、斑马鱼(*Danio rerio*, NP_997749.1)、小鼠(*Mus musculus*, NP_034114.1)、牛(*Bos. taurus*, NP_776457.1)和人类(*Homo sapiens*, NP_001903.1)序列进行比对, 结果显示*HacatL*从昆虫到人类是高度保守的, 分别有81%、77%、53%、50%、52%、和51%的相似度(图1)。

2.2 *HacatL*在血细胞的蜕皮和变态时期高表达

我们利用qRT-PCR研究*HacatL*基因在5龄蜕皮时期表皮、脂肪体、血淋巴、中肠4种组织中的表达模式, 结果表明*HacatL*在血淋巴中的表达量显著高于其他组织(图2A), 表明*HacatL*基因可能在血细胞中发挥重要作用。为了检测*HacatL*基因在不同发育阶段的表达模式, 我们分离了5龄12 h到6龄120 h之间9个时间点的幼虫血细胞总RNA, qRT-PCR检测*HacatL*基因的表达量, 结果显示*HacatL*基因在幼虫蜕皮时期的5龄36 h, 以及变态时期的6龄72 h~120 h表达量升高(图2B)。

为了进一步研究*HacatL*基因功能, 我们制备了*HacatL*蛋白抗体, 采用Western blot方法检测了抗体特异性, 结果显示抗体能特异性地识别体外表达的切除GST标签的大小约为38 kDa的*HacatL*蛋白(图3A)。鳞翅目昆虫血细胞有浆血细胞、颗粒细胞、原血细胞、珠血细胞和类绛色细胞五种类型, 不同类型血细胞形态和功能也不同, 其中原血细胞是血细胞中的干细胞, 数量稀少^[11-12]。根据Ribeiro描述的血细胞形态标准^[11], 我们利用免疫组织化学方法检测*HacatL*蛋白在不同类型血细胞中的分布。结果显示, *HacatL*蛋白信号主要在浆血细胞和颗粒细胞中, 而在珠血细胞和类绛色细胞中的信号很弱(图3B)。这些结果说明, *HacatL*可能参与浆血细胞和颗粒细胞的生理学功能。

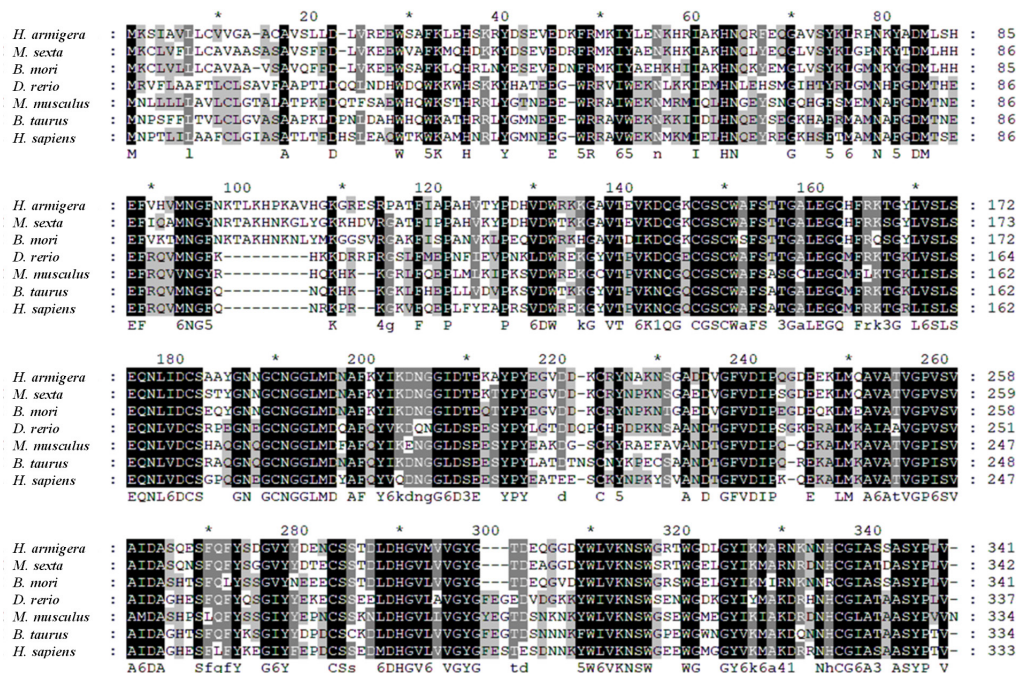
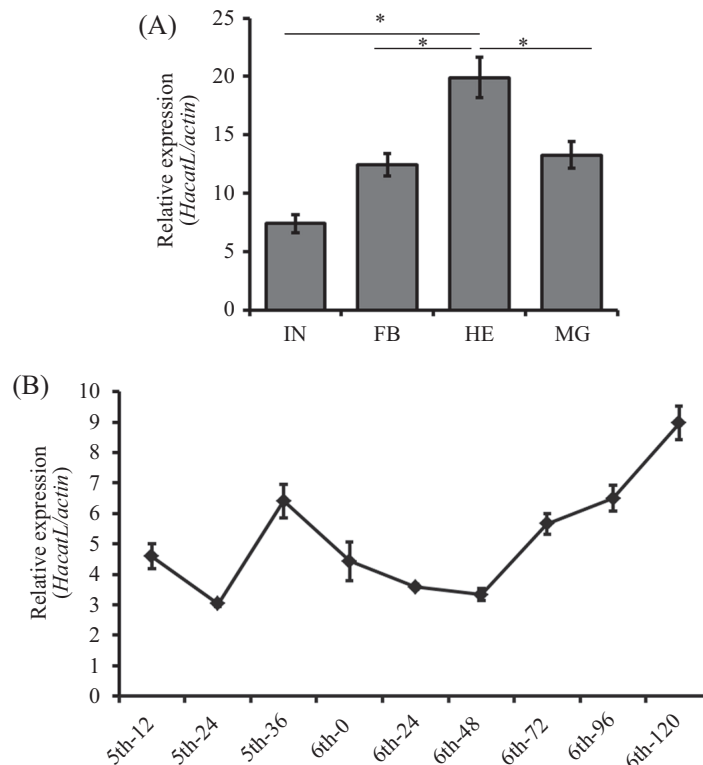


图1 HacaL与不同物种同源蛋白序列比对

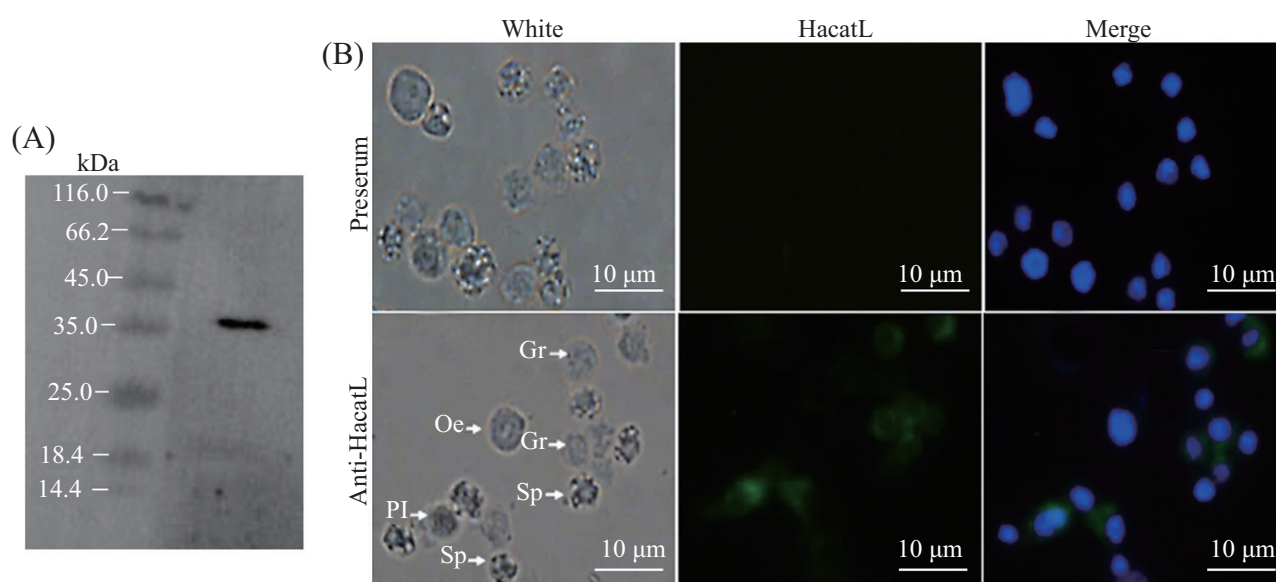
Fig.1 Multiple alignment of HacaL with homologs of different species



A: *HacaL*基因在表皮(IN)、脂肪体(FB)、血淋巴(HE)和中肠(MG)等4种组织中的表达模式。B: *HacaL*基因在血细胞不同发育阶段的表达模式。
* $P < 0.05$ 。

A: expression patterns of *HacaL* in integument (IN), fat body (FB), hemocytes (HE) and midgut (MG). B: expression profile of *HacaL* in hemocytes during larval development. * $P < 0.05$.

图2 *HacaL*基因在不同组织不同发育阶段的表达模式Fig.2 Expression patterns of *HacaL* in different tissues and at different developmental stages



A: Western blot方法检测抗体特异性; B: 免疫组织化学方法检测HacatL蛋白在血细胞中的分布, 绿色荧光代表HacatL蛋白, 蓝色代表细胞核。PI: 浆血细胞, Sp: 珠血细胞, Gr: 颗粒细胞, Oe: 类绦色细胞。

A: Western blot was used to detect the specificity of the antibody; B: the distribution of HacatL in hemocytes was detected by immunohistochemistry. Green portions indicate HacatL detected with anti-HacatL. Blue portions indicate nuclei. PI: plasmotocyte, Sp: spherulocytes, Gr: granulocyte, Oe: oencytoids.

图3 HacatL蛋白在幼虫血细胞中的分布

Fig.3 Localization of HacatL protein in the hemocytes of larvae

2.3 大肠杆菌刺激诱导HacatL的表达

考虑到浆血细胞和颗粒细胞是参与昆虫细胞免疫反应的重要血细胞, HacatL主要在这两种血细胞中的表达是否与它们的免疫调节功能有关呢? 为了证实这一猜想, 我们用大肠杆菌刺激6龄取食期幼虫后检测HacatL的表达模式。结果显示, HacatL基因在免疫接种3 h后表达明显上调, 12 h到达高峰, 24 h表达量有所下降(图4A), 说明大肠杆菌的免疫刺激能够明显上调HacatL基因的表达。

2.4 HacatL基因干扰显著增加体内细菌数量且降低血细胞伸展性

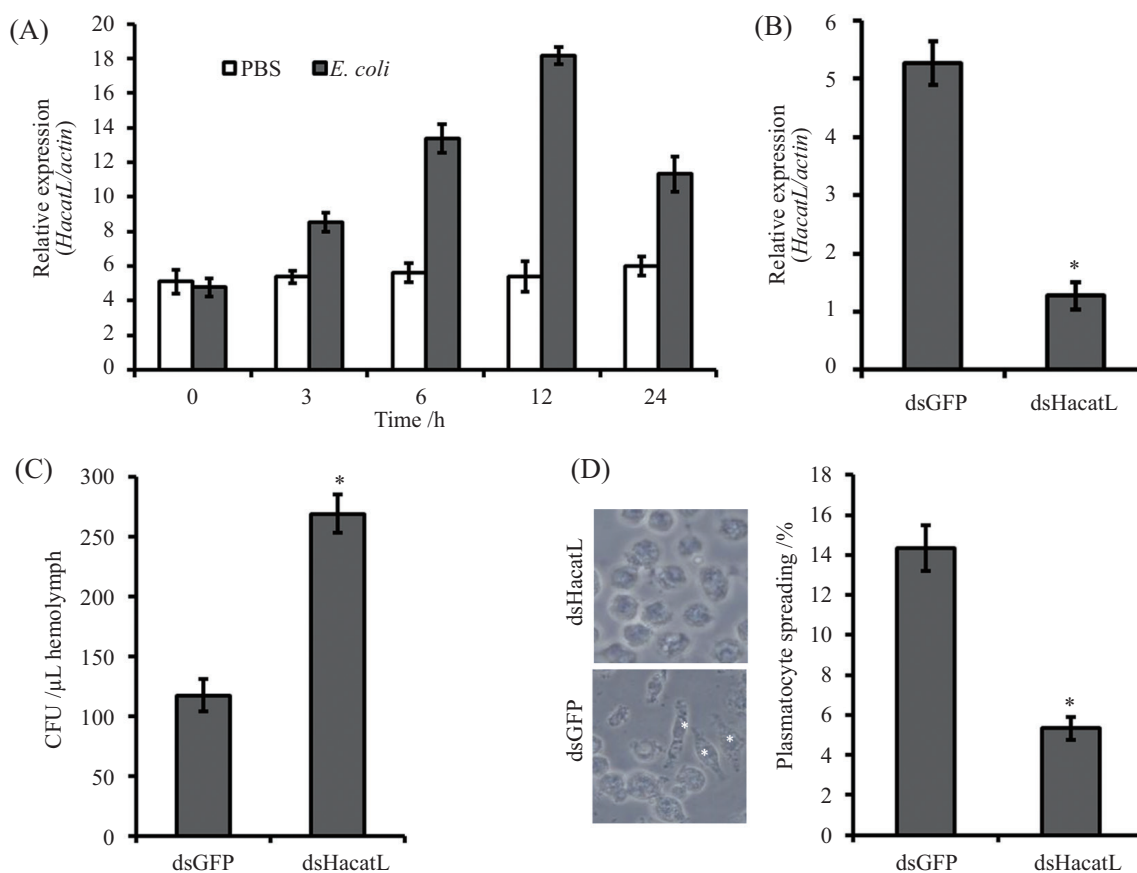
为了进一步验证HacatL基因是否参与免疫反应, 我们做了体内HacatL基因干扰实验。6龄取食期幼虫注射dsRNA 48 h后qRT-PCR检测HacatL基因的表达, 结果显示, HacatL基因表达水平显著低于对照组, 说明HacatL被成功抑制(图4B)。HacatL基因沉默的幼虫接种大肠杆菌3 h后检测体内大肠杆菌数量发现, HacatL基因沉默的幼虫体内大肠杆菌的数量明显高于对照组(图4C), 说明HacatL基因有助于虫体对细菌的清除。

HacatL基因沉默的幼虫接种大肠杆菌3 h后, 利用显微镜检测幼虫浆血细胞的伸展性, 计算伸展浆血细胞的比率。结果显示, HacatL基因沉默的幼虫浆血细胞的伸展比率明显低于对照组, 说明HacatL基因有助于浆血细胞的伸展(图4D)。

2.5 蜕皮激素信号通路调控HacatL基因的表达

不同发育阶段表达模式显示, HacatL在蜕皮和变态时期表达量增加, 而蜕皮激素是调控幼虫蜕皮和变态的重要激素。为了检测蜕皮激素是否影响HacatL基因的表达, 我们对6龄取食期的幼虫注射20E后检测HacatL基因的表达量, 结果显示, 注射20E后3 h HacatL基因表达量开始增加, 12 h表达量到达高峰, 然后逐渐下降(图5A), 说明20E能明显诱导HacatL基因表达上调。

在调控幼虫发育过程中20E的受体是EcR和USP, 为了检测20E对HacatL基因的调控是否通过其受体, 我们在体外培养的血细胞中将EcR-B1或者USP1干扰后滴加20E, 检测HacatL基因的表达是否受到影响。结果显示, 滴加dsEcR-A或者dsUSP1后与对照组相比, EcR-B1或者USP1的表达明显被



A: 细菌刺激后*HacatL*的表达模式; B: *HacatL*表达被dsRNA抑制; C: 幼虫注射dsRNA和大肠杆菌后的细菌清除实验; D: 细菌刺激后浆血细胞伸展检测, 星号指示伸展的浆血细胞。* $P < 0.05$, 与dsGFP处理的对照组相比。

A: expression profiles of *HacatL* after a challenge by bacteria; B: confirmation of RNAi effect of *HacatL*; C: bacterial clearance assay after larvae were injected with dsRNA and challenged with *E. coli*; D: plasmotocyte-spreading assay after bacterial challenge, asterisks indicate spreading plasmotocyte. * $P < 0.05$ compared with dsGFP-treated controls.

图4 *HacatL*参与昆虫细胞免疫

Fig.4 *HacatL* involves in insect cellular immunity

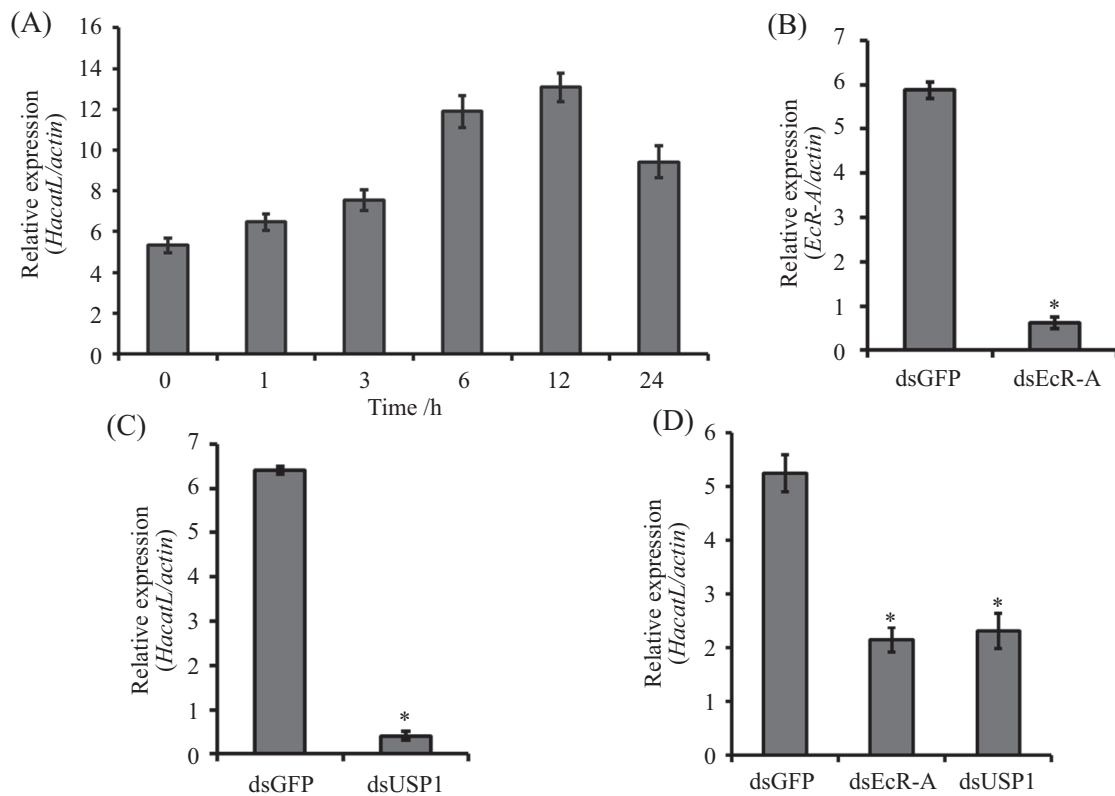
抑制, 说明 *EcR-B1* 或者 *USP1* 被成功干扰 (图 5B 和图 5C); 检测 *HacatL* 基因的表达发现 *EcR-B1* 或者 *USP1* 被沉默都能显著降低 20E 对 *HacatL* 基因的诱导作用, 说明蜕皮激素通过其受体 EcR 和 USP 调控 *HacatL* 基因的表达。

3 讨论

本研究对棉铃虫组织蛋白酶 L 基因 (*HacatL*) 作了系统研究。*HacatL* 属于半胱氨酸蛋白酶超家族, 进化上比较保守; *HacatL* 在棉铃虫血细胞中的浆血细胞和颗粒细胞中大量表达; 不同发育阶段表达模式研究表明 *HacatL* 在幼虫蜕皮和变态时期表达上升; 细菌刺激能诱导 *HacatL* 的表达上调; 体内将 *HacatL* 沉默后浆血细胞伸展性降低、血细胞对细菌的清除能力下降; 蜕皮激素能够通过其受体 EcR 和

USP 诱导 *HacatL* 的表达, 这些结果说明, *HacatL* 是受蜕皮激素信号通路调控并参与昆虫的细胞免疫反应的下游效应基因。

前人对昆虫组织蛋白酶 L 的研究大部分集中在昆虫组织降解等发育方面, 认为组织蛋白酶 L 体内干扰会导致昆虫变态时期血细胞不能颗粒化从而不能参与脂肪体重建和翅的发育^[13], 说明组织蛋白酶 L 参与昆虫变态时期血细胞调控的脂肪体重建过程。我们研究结果表明, *HacatL* 在血细胞中表达量最高, 而且主要在血细胞的浆血细胞和颗粒细胞中表达, 浆血细胞和颗粒细胞是参与细胞免疫的主要血细胞类型, 可以通过吞噬和包裹作用清除入侵病原微生物^[14]。我们在体内沉默 *HacatL* 后, 此操作会影响浆血细胞吞噬时的伸展性和虫体对细菌的清除作用。这些结果说明, *HacatL* 不但具有调控组织重建的作用, 还参



A: 20E处理后*HacatL*的表达模式。B: *EcR-A*表达被dsRNA抑制。C: *USP1*表达被dsRNA抑制。D: *EcR*或者*USP*干扰抑制蜕皮激素对*HacatL*的诱导。
* $P < 0.05$, 与dsGFP处理的对照组相比。

A: *HacatL* expression after 20E treatment. B: *EcR-A* expression was inhibited by dsRNA. C: *USP1* expression was inhibited by dsRNA. D: *EcR* or *USP* silencing suppressed the *HacatL* induction by 20E. * $P < 0.05$ compared with dsGFP-treated controls.

图5 蜕皮激素诱导*HacatL*表达需要EcR和USP

Fig.5 Ecdysone inducing *HacatL* expression requires EcR and USP

与调控血细胞的细胞免疫。

蜕皮激素是调控昆虫蜕皮和变态发育的重要激素,越来越多的研究表明,蜕皮激素在调控昆虫的先天免疫反应中也发挥重要的作用^[15-16],蜕皮激素可以通过其受体EcR和USP诱导抗菌肽的表达和增强细胞免疫反应^[17-18],但其作用机制目前还不清楚。本研究发现蜕皮激素可以诱导*HacatL*的表达上调,蜕皮激素的受体EcR和USP的沉默均能抑制蜕皮激素对*HacatL*的诱导作用,说明*HacatL*是昆虫蜕皮激素信号转导途径调控的下游效应基因并且参与细胞免疫反应。

总之,我们的研究表明,棉铃虫半胱氨酸蛋白酶基因*HacatL*受蜕皮激素信号转导途径的调控,不但参与昆虫的发育过程,也在细胞免疫反应中发挥重要的功能。本研究结果有助于我们理解蜕皮激素调控昆虫细胞免疫的机制,同时也为高等动物激素调控免疫反应的研究提供了新的思路。

参考文献 (References)

- [1] BHARDWAJ M, LEE J J, VERSACE A M, et al. Lysosomal lipid peroxidation regulates tumor immunity [J]. J Clin Invest, 2023, doi: 10.1172/JCI164596.
- [2] OKAMOTO M, SUGIMOTO A, LEUNG K P, et al. Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis* [J]. Oral Microbiol Immunol, 2004, 19(2): 118-20.
- [3] YANG L, SUN Y, CHANG M, et al. RNA interference-mediated knockdown of Bombyx mori haemocyte-specific cathepsin L (Cat L)-like cysteine protease gene increases bacillus thuringiensis kurstaki toxicity and reproduction in insect cadavers [J]. Toxins, 2022, 14(6): 228.
- [4] RAWLINGS N D, BARRETT A J, BATEMAN A. MEROPS: the peptidase database [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Database issue): D227-33.
- [5] SUN Y X, ZHU B J, TANG L, et al. Cathepsin O is involved in the innate immune response and metamorphosis of *Antheraea pernyi* [J]. J Invertebr Pathol, 2017, 150: 6-14.
- [6] LEYRIA J, FRUTTERO L L, LIGABUE-BRAUN R, et al. Dm-CatD, a cathepsin D-like peptidase of the hematophagous insect *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae): purification, bioinformatic analyses and the significance of its interaction with

- lipophorin in the internalization by developing oocytes [J]. *J Insect Physiol*, 2018, 105: 28-39.
- [7] YANO T, TAKAHASHI N, KURATA S, et al. Regulation of the expression of cathepsin B in *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) at the translational level during metamorphosis [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 234(1): 39-43.
- [8] DI Y Q, HAN X L, KANG X L, et al. Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis [J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1170-92.
- [9] ZHAO X F, AN X M, WANG J X, et al. Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development [J]. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2005, 58(1): 39-46.
- [10] SUI Y P, LIU X B, CHAI L Q, et al. Characterization and influences of classical insect hormones on the expression profiles of a molting carboxypeptidase A from the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) [J]. *Insect Mol Biol*, 2009, 18(3): 353-63.
- [11] RIBEIRO C, BREHELIN M. Insect haemocytes: what type of cell is that [J]? *J Insect Physiol*, 2006, 52(5): 417-29.
- [12] LAVINE M D, STRAND M R. Insect hemocytes and their role in immunity [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32(10): 1295-309.
- [13] WANG L F, CHAI L Q, HE H J, et al. A cathepsin L-like proteinase is involved in moulting and metamorphosis in *Helicoverpa armigera* [J]. *Insect Mol Biol*, 2010, 19(1): 99-111.
- [14] ELROD-ERICKSON M, MISHRA S, SCHNEIDER D. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila* [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(13): 781-4.
- [15] SUN W, SHEN Y H, ZHOU L X, et al. Ecdysone titer determined by 3DE-3beta-reductase enhances the immune response in the silkworm [J]. *J Immunol*, 2016, 196(4): 1646-54.
- [16] WANG G J, WANG W W, LIU Y, et al. Steroid hormone 20-hydroxyecdysone promotes CTL1-mediated cellular immunity in *Helicoverpa armigera* [J]. *Insect Sci*, 2021, 28(5): 1399-413.
- [17] FLATT T, HEYLAND A, RUS F, et al. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster* [J]. *J Exp Biol*, 2008, 211(Pt 16): 2712-24.
- [18] REYNOLDS R A, KWON H, ALVES E S T L, et al. The 20-hydroxyecdysone agonist, halofenozide, promotes anti-Plasmodium immunity in *Anopheles gambiae* via the ecdysone receptor [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 21084.