

综述与进展

MicroRNA 及其在昆虫学中的研究进展^{*}

梁 沛^{**} 高希武

(中国农业大学昆虫学系 北京 100193)

摘 要 MicroRNA (miRNA) 是真核生物中对转录后调控起着重要作用的一类非编码单链 RNA 分子, 参与调控胚胎发育、干细胞分化、神经发生及细胞凋亡等几乎所有的生物过程。本文简要总结了 miRNA 的生物合成、命名、表达及功能等方面的研究进展, 同时从昆虫 miRNA 的鉴定、表达及功能、miRNA 的代谢等方面对 miRNA 在昆虫学研究中的最新进展做了综述。

关键词 miRNA, 昆虫, 转录后调控

Progress in research on the application of MicroRNA in entomology

LIANG Pei^{**} GAO Xi-Wu

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that play critical roles in gene expression and regulation at the post-translational regulation level in eukaryotes. They are involved in almost every biological process including embryonic development, stem cell division, neurogenesis and cell apoptosis. In this paper, we summarize the biogenesis, nomenclature, expression and functions of miRNAs, and review recent progress in their identification, expression and metabolic functions.

Key words miRNA, insect, post-translational regulation

1 MicroRNA 简介

MicroRNA (miRNA) 是一类由内源基因编码的长度约为 21 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 由具有发夹结构的约 70~90 个碱基大小的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工后生成。miRNA 广泛存在于真核生物中, 在基因的转录后调控 (post-transcriptional regulation) 中起着非常重要的作用。据估计, 动物中约有 50% 以上编码蛋白的基因的表达都受到 miRNA 的调控 (Krol *et al.*, 2010)。与 siRNA 通过完全配对降解靶基因的 mRNA 不同, miRNA 通过和靶基因 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTRs) 不完全配对而阻碍其翻译。

第 1 个 miRNA *lin-4*, 是 Lee 等于 1993 年在研

究秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 幼虫发育速率过程中发现的, 其序列与 *lin-14* mRNA 的 3' 非翻译区互补, 虽然不影响 *lin-14* mRNA 的表达水平, 但可以显著抑制 *lin-14* 蛋白的累积 (Wightman *et al.*, 1993)。2000 年, 第 2 个 miRNA *let-7* 也在线虫中被发现 (Reinhart *et al.*, 2000)。此后应用随机克隆和测序、生物信息学预测的方式, 又分别在众多生物体如病毒、家蚕和灵长类动物中发现了大量的 miRNAs。到 2006 年共鉴定了 4 361 个 miRNAs。此后被鉴定的 miRNA 的数量快速增长, 到 2011 年 4 月, 在 Sanger microRNA 序列数据库 (miRBase, <http://www.mirbase.org/>) 第 17 版中, 注册的 miRNA 已达 16 772 个, 涵盖 142 个物种。

miRNA 通过碱基互补配对与靶基因 mRNA 3'

^{*} 资助项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (973 计划) (2009CB119200)、国家自然科学基金 (30671389, 30971941, 31171873)、公益性行 (农业) 科研专项 (201203038)。

^{**} 通讯作者, E-mail: liangcau@cau.edu.cn

收稿日期: 2012-01-17, 接受日期: 2012-02-27

非翻译区结合而降解靶基因 mRNA 或抑制其翻译成蛋白的过程 (Bartel, 2004), 从而抑制特定基因的表达。现有研究表明, miRNA 在转录后调控中起着至关重要的作用, 几乎涉及所有的生物过程, 如胚胎发育、组织分化、细胞增殖、细胞凋亡及形态发生等等 (Kloosterman and Plasterk, 2006; Legeai *et al.*, 2010), 以 miRNA 为关键词, 在 PubMed 数据库检索到的相关论文共 10 359 篇, 仅 2010 年发表的就有 4 000 多篇, 可见关于 miRNA 的研究已经成为生命科学领域一个新的热点。本文就 miRNA 及其在昆虫学研究中的最新进展做一综述。

2 miRNA 的生物合成

在哺乳动物中, 约有 50% 的 miRNA 的基因位点与其他 miRNA 的位点非常接近, 也就是说, miRNA 的基因位点成簇 (cluster) 存在, 是同一个多顺反子转录单位 (polycistronic transcription unit, TU) 的转录产物。但也有 miRNA 由单独的基因编码。编码 miRNA 的基因在基因组中的位置有 4 种情况, 分别位于非编码 TU 的内含子区、非编码 TU 的外显子区、编码 TU 的内含子区和编码 TU 的外显子区 (图 1)。大约有 40% 的 miRNA 的基因位于非编码 TU 的内含子区, 10% 位于非编码 TU 的外显子区, 另外约 40% 的 miRNA 基因位于蛋白编码基因的内含子区 (Kim *et al.*, 2009)。

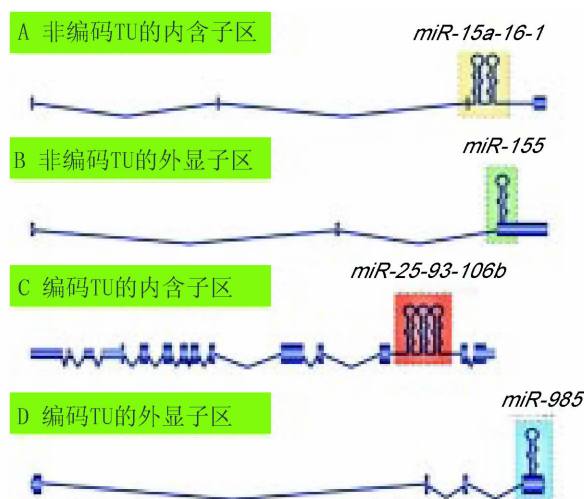


图 1 miRNA 的基因结构 (改自 Kim *et al.*, 2009)

Fig. 1 Gene structure of miRNA (modified from Kim *et al.*, 2009)

从 miRNA 的基因合成成熟的 miRNA 一般分为 4 个步骤 (图 2):

(1) 转录 (transcription)

miRNA 基因的转录通常由 RNA polymerase II (Pol II) 催化。Pol II 先和 miRNA 基因附近的启动子结合, 转录生成具有发夹结构的双链 miRNA, 即 primary miRNA (pri-miRNA), 长几百到几千个核苷酸 (nucleotide, nt)。

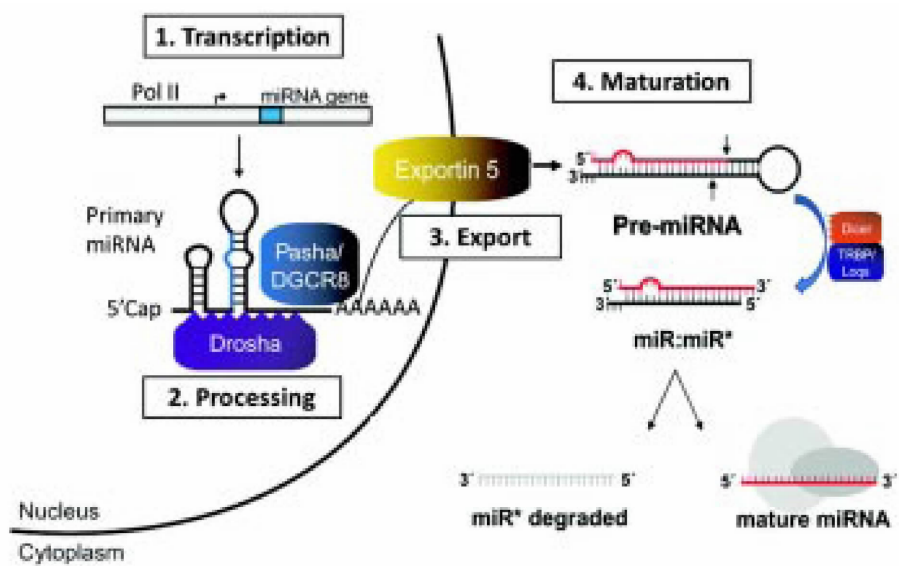


图 2 miRNA 的生物合成 (修改自 Kai and Pasquinelli, 2010)

Fig. 2 Biogenesis of the miRNA (revised from Kai and Pasquinelli, 2010)

(2) 细胞核加工 (nuclear processing)

Pri-miRNA 经 RNase III 家族的 DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR 8, 一种双链 RNA 结合蛋白, 在果蝇和线虫中称为 Pasha) 识别和 Drosha 内切酶剪切后, 产生长约 70 ~ 100 nt 的前体 miRNA (precursor miRNA, Pre-miRNA), 在其 3' 末端有 2 个未配对核苷酸。1 个 Pri-miRNA 一般含有 1 ~ 6 个 pre-miRNA。

(3) 细胞核输出 (nuclear export)

加工好的 pre-miRNA 再由转运蛋白 Exportin-5 从细胞核主动运输到细胞质中。Exportin-5 可特异性识别经 RNase III (Drosha) 剪切后在 3' 末端有 2 个未配对核苷酸的 pre-miRNA。

(4) 细胞质加工 (cytoplasmic processing)

转运到细胞质中的 Pre-miRNA 再进一步被 Dicer (RNase III 家族中专门消化双链 RNA 的酶, 分为 dicer 1 和 dicer 2, 可将长链 dsRNA 剪切成约 21 nt 的短链 dsRNA) 剪切掉环状结构, 产生双链的 miRNA: miRNA*, 即未成熟的 miRNA (imperfect miRNA), 再与以 Argonaute 1 (AGO1) 为核心的一组蛋白 (分别具有 Dicer 酶及解螺旋酶活性) 结合, 双链被打开, 成熟的 miRNA (又称向导链, guide strand) 参与形成 miRNA 诱导的沉默复合体 (miRNA-induced silencing complex, miRISC); 乘客链 (passenger strand, 即 miRNA*) 原来认为大多被降解, 最近的研究表明 miRNA* 通过与不同的 Ago 蛋白结合, 和成熟的 miRNA 一样在调控基因表达中发挥着重要功能。

还有一些来源和上述过程不同的 miRNA, 称为 mirtron。mirtron 由一些小的内含子经过剪接和去分支后可不经过 Drosha 酶切而直接形成 pre-miRNA, 再进一步加工为成熟的 miRNA。

3 miRNA 的命名

经实验验证的 miRNA 在正式发表之前要进行命名。最早发现的几种 miRNA, 如 *lin-4* 和 *let-7* 等是以其调控的基因的名称命名的。后来, Ambros 等 (2003) 和 Griffiths-Jones 等 (2006) 提出了 miRNA 命名系统, 该系统规定, miRNA 的名称由 3 部分组成, 各部分之间以短线连接, 如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *dme-miR-13*。名称前面 3 个字母由该物种种名中第 1 个单词的第 1 个字母和第 2 个单词的前 2 个字母组成, 均为小写; 中间的 3 个字母

miR 代表 miRNA (如果是 mir 则代表前体 miRNA); 最后一部分的数字代表该 miRNA 被发现的顺序。当 2 个或多个 miRNA 的序列只有一个核苷酸差异时, 则分别在数字后加上小写字母 a, b, c 等以示区别, 如 *dme-miR-13a*, *dme-miR-13b* 等。如果同一 miRNA 分布于基因组中的不同位置, 则在名称的最后再用短线连接不同的数字加以区别, 如 *dme-miR-13b-1*, *dme-miR-13b-2*。

在 miRBase 第 17 版发布之前, 如果同一个 pre-miRNA 的 5' 和 3' 臂均能产生成熟的 miRNA 则分别被命名为 miRNA 和 miRNA*, 如 *dme-miR-92b* 和 *dme-miR-92b** (图 3)。从第 17 版开始, 不再以这种方式命名, 而是将 5' 臂上产生的 miRNA 名称后加“-5P”, 3' 臂上产生的加“-3P”。如图 3 中 2 个 miRNA 则分别命名为 *dme-miR-92b-5P* 和 *dme-miR-92b-3P*。另外, 由同一基因的产生的正义 (sense) 和反义 (antisense) miRNA, 原来在命名时统一在反义 miRNA 后加“-as”加以区别, 如 *dme-miR-307* 和 *dme-miR-307-as*。从 miRBase 第 17 版开始规定, 如果其序列相似, 则在名称后加上小写字母 a, b, c 等以示区别, 如 *dme-miR-307a* 和 *dme-miR-307b*; 如果正义和反义 miRNA 序列差别较大, 则分别命名, 如 *rno-miR-151-as* 被重新命名为 *rno-miR-3586*。

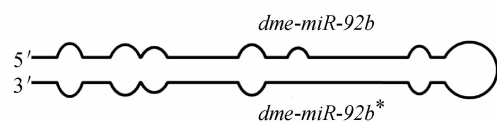


图 3 miRNA 和 miRNA*

Fig. 3 miRNA and miRNA*

4 miRNA 的表达及功能

4.1 miRNA 对基因表达的调控

成熟的 miRNA 只有与 RISC 结合形成 miRISC 复合体后才能实现对靶基因的转录后调控。miRISC 中的 miRNA 主要通过其 5' 端第 2 ~ 8 位核苷酸与靶基因 mRNA 的配对情况来识别靶基因, 因此这 2 ~ 8 位核苷酸被称为种子序列 (seed sequence)。Argonaute (AGO) 是组成 miRISC 的核心蛋白, 在同一物种内可以有多个 AGO 蛋白, 如在哺乳动物中有 AGO1 ~ AGO4, 在果蝇中有

dAGO1 和 dAGO2,在线虫中有 ALG-1 (argonaute-like gene) 和 ALG-2,在拟兰芥 *Arabidopsis thaliana* 中则至少有 10 个 AGO 蛋白 (Krol *et al.*, 2010)。一般都是 AGO2 与 miRNA 结合形成 miRISC 从而抑制靶基因的 mRNA 的表达。

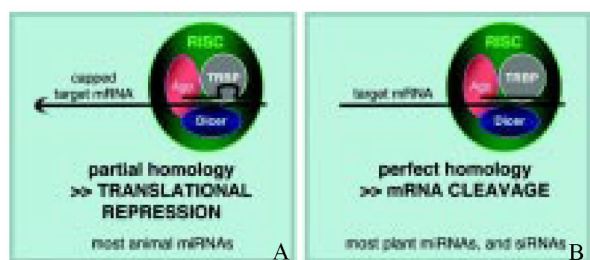


图 4 miRNA 对基因表达调控的 2 种方式

(改自 Saumet and Lecellier, 2006)

Fig. 4 Two models of gene expression regulated by miRNA (from Saumet and Lecellier, 2006)

在动物中,miRNA 主要通过与其特定靶基因 mRNA 的 3'非翻译区不完全配对引导 miRISC 与靶基因结合,阻止靶基因 mRNA 的翻译,从而抑制其表达(图 4:A)。但在植物中,miRNA 能够与靶基因 mRNA 的 3'非翻译区完全配对,并导致靶基因的降解,其原理与 RNA 干扰 (RNAi) 相同(图 4:B)。miRNA 除了与 3'非翻译区结合外,最近, Schnall-Levin 等(2010)利用软件 MinoTar (www.minotar.csail.mit.edu) 预测并通过实验证实,在 mRNA 的编码区和 5'非翻译区也有很多 miRNA 的结合位点,只是与这些位点结合后对基因表达的抑制程度较与 3'非翻译区结合要弱。Moretti 等(2010)也证实果蝇的 miR-2 通过与靶基因 5'非翻译区和编码区结合也可以有效抑制其表达。

由于 miRNA 是通过抑制或降解靶标 mRNA 来调控基因表达,因此,miRNA 表达量的上调会加强对靶基因表达的抑制;反之,其表达量下调则可导致靶基因表达量的增加。事实上,miRNA 对基因的调控机制非常复杂,往往不是一对一的关系,一个 miRNA 可能调控多达数百个靶基因的表达,而一个靶基因也可能由多个 miRNA 协同调控。数量众多的 miRNA 与其不同靶基因之间形成了一个错综复杂的基因表达调控网络 (Yu *et al.*, 2007; Legeai *et al.*, 2010)。

4.2 miRNA 的表达与功能

从已有的研究结果看,有些 miRNA 在生物发育的不同阶段均有表达,但在不同发育阶段的表达水平可能有差异,还有相当一部分 miRNA 只在特定的组织和特定发育阶段表达。正是由于 miRNA 表达的组织特异性和时序性,决定了组织和细胞功能的特异性,表明 miRNA 在细胞生长和发育过程中起着多种作用。对已发现的部分 miRNA 的功能研究表明,miRNA 参与了几几乎所有的生物过程,如胚胎发育、组织分化、细胞增殖、细胞凋亡及形态发生等等 (Kloosterman and Plasterk, 2006; Legeai *et al.*, 2010)。由于 miRNA 具有重要调控作用,因此 miRNA 的异常表达将不可避免的引起生物的发育异常以至死亡,例如,如果小鼠的 Dicer 酶表达不足,引起 miRNA 表达量下降,则会导致小鼠在胚胎发育的 7.5 d 死亡 (Bernstein *et al.*, 2003)。miRNA 的异常表达与多种人类疾病均有密切关系,包括癌症、心血管紊乱、艾滋病、白血病、糖尿病等 (Kloosterman and Plasterk, 2006; Davis-Dusenbery and Hata, 2010)。

除了参与胚胎发育、组织分化及器官形成等生物过程外,miRNA 在调控生物对外界不良环境条件的响应中也起着重要作用。越来越多的证据表明,环境压力可显著影响 miRNA 的表达,而 miRNA 表达量的变化则会影响相关靶标基因的表达,从而使生物更好地适应环境压力 (Lema and Cunningham, 2010)。目前关于植物对重金属、病原菌感染及高温胁迫的响应 (Ding and Zhu, 2009)、小鼠对乙醇和三亚甲基三硝基胺 (RDX) 等有毒化合物胁迫的响应 (Sathyan *et al.*, 2007; Zhang and Pan, 2009) 及小麦对白粉病菌的免疫响应 (Xin *et al.*, 2010) 等的研究都证实了 miRNA 的关键调控作用。在昆虫中, Gundersen-Rindal 和 Pedroni (2010) 研究发现,舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫被寄生蜂 *Glyptapanteles flavicoxis* 寄生后,其体内相关 miRNA 的表达有明显变化。因此,miRNA 对毒理基因组学 (toxicogenomics) 的发展将起到积极的促进作用。

除了调控蛋白编码基因的表达,miRNA 本身的表达也可能受到其他 miRNA 的调控 (Lai *et al.*, 2004)。

4.3 miRNA 的保守性与特异性

miRNAs 在物种进化中相当保守,不同物种中

有相当一部分的 miRNA 是相同或同源的。例如线虫中约 55% 的 miRNA 与人类的 miRNA 同源 (Ibanez-Ventoso *et al.*, 2008)。最早发现的 *let-7* 在至少 55 种不同生物中存在高度同源的 miRNA, 在其中 37 个物种中序列完全一致。在同一 miRNA 家族中, 其种子序列也具有高度保守性, 至多有 1~2 个核苷酸的差异。这种高度的保守性被认为与其功能的重要性有着密切关系, 同时也为生物早期进化的同源性提供了某种证据。

miRNA 也具有明显的特异性。例如 Zhang 和 Pan (2009) 研究发现, 家蚕中有一小部分 miRNA 在高等动物中具有同源序列, 但大部分的 miRNA 为昆虫特异性 miRNA, 还有少部分 miRNA 为家蚕所特有。因此, 作者认为这些种类特异性的 miRNA 在昆虫系统学研究方面也具有应用前景。

4.4 研究 miRNA 功能的策略

关于 miRNA 基因的鉴定和功能研究的基本策略, 主要是通过将实验生物学和生物信息学方法有机结合起来进行, 具体可参见戚晓娴等 (2009) 的综述。

目前研究基因的功能通常是将其从基因组中敲除, 然后观察敲除前后的变化。但研究 miRNA

的功能一般不采用这种策略, 而是通过增强或减弱该 miRNA 的表达来鉴定其功能。针对特定 miRNA, 可运用化学方法合成该 miRNA 的 mimics, 再将其导入生物体内或细胞系中, 增强该 miRNA 在生物体内的表达, 降低靶基因的蛋白表达量, 进行功能获得性 (gain-of-function) 研究。同样, 也可以合成特定 miRNA 的 inhibitors, 特异性的抑制某个 miRNA 的表达, 从而削弱内源 miRNA 对靶基因抑制作用, 提高靶基因的表达量, 进行功能缺失性 (loss-of-function) 研究, 明确该 miRNA 的功能。化学合成 miRNA mimics 和 inhibitors 是近年来研究的一个新热点, 已经成为研究动植物基因家族功能的有用工具。

5 昆虫 miRNA 的研究进展

对昆虫 miRNA 的报道最早是在 2001 年。Lagos-Quintana 等 (2001) 首先从黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中鉴定出了 22 个 miRNA, 随后不断有新的 miRNA 被发现。目前在黑腹果蝇共鉴定出 240 个 miRNA。根据 miRBase 数据库统计, 到 2011 年 11 月, 至少已经从果蝇、家蚕等 24 种昆虫中鉴定出共计 2 633 个 miRNA (表 1)。

表 1 miRBase 数据库注册的昆虫 miRNA 的数量*
Table 1 Number of insect miRNAs registered in miRBase

种类 Species	miRNA 数量 No. of miRNA	种类 Species	miRNA 数量 No. of miRNA
黑腹果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	240	飞蝗 <i>Locusta migratoria</i>	7
拟暗果蝇 <i>Drosophila pseudoobscura</i>	211	赤拟谷盗 <i>Tribolium castaneum</i>	206
印度洋 Seychelles 岛果蝇 <i>Drosophila sechellia</i>	78	丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	53
拟果蝇 <i>Drosophila simulans</i>	136	金小蜂 <i>Nasonia giraulti</i>	32
黑果蝇 <i>Drosophila virilis</i>	74	金小蜂 <i>Nasonia longicornis</i>	28
南美热带果蝇 <i>Drosophila willistoni</i>	77	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	123
嗜菠萝果蝇 <i>Drosophila ananassae</i>	76	埃及伊蚊 <i>Aedes aegypti</i>	101
榕果蝇 <i>Drosophila erecta</i>	81	冈比亚按蚊 <i>Anopheles gambiae</i>	67
<i>Drosophila yakuba</i>	80	意大利蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	174
<i>Drosophila grimshawi</i>	82	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	487
<i>Drosophila mojavensis</i>	71	致倦库蚊 <i>Culex quinquefasciatus</i>	72
<i>Drosophila persimilis</i>	75	诗神袖蝶 <i>Heliconius melpomene</i>	2

* : 根据 miRBase 数据库 2011. 11 第 18.0 版统计。

Data in the table are collected from the miRBase release 18.0.

从目前的进展来看,对昆虫 miRNA 的研究主要集中在以下 3 个方面:

5.1 昆虫中 miRNA 的鉴定及其表达谱研究

这方面的研究工作目前相对较多,主要目的是鉴定不同昆虫种类中 miRNA 的种类及其表达情况,为进一步进行相关 miRNA 的功能研究奠定基础。如 Stark 等 (2007) 利用已公布的 12 个果蝇基因组数据库对其 miRNA 进行了较全面的分析鉴定;Zhang 和 Pan (2009) 通过深度测序 (deep sequencing) 及相关生物信息学软件分析,结合 microarray 技术从家蚕中鉴定出 354 个 miRNA,发现其中 106 个 miRNA 在家蚕的不同发育阶段均有表达,其余 248 个只在卵或蛹中表达。另外, Li 等 (2009) 从埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中鉴定出 86 个 miRNA,并对其表达的时空动态进行了初步研究;Skalsky 等 (2010) 从白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 和致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 中分别鉴定出 65 和 77 个 miRNA; Legeai 等 (2010) 从豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum* 鉴定出 149 个 miRNA。Liu 等 (2010) 则研究了近 100 个 miRNA 在家蚕不同组织部位的分布及在雌雄个体中表达的偏好和分布。Gundersen-Rindal 和 Pedroni (2010) 研究了被寄生蜂 *Glyptapanteles flavicoxis* 寄生后舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫中 miRNA 表达谱的变化。Winter 等 (2007) 从冈比亚按蚊中鉴定出 18 个 miRNA,并证实其中 3 个冈比亚按蚊特有的 miRNA 参与了该虫对疟原虫的防卫反应。

5.2 昆虫 miRNA 功能研究

要研究 miRNA 对靶基因的调控机制,首先要明确不同 miRNA 的靶基因是什么。这方面的研究主要有 2 种情况,一是利用相关生物信息学软件 (如 TargetScanFly 5.1 http://www.targetscan.org/fly_12/ 和 PicTar <http://pictar.mdc-berlin.de/>) 通过 miRNA 5'端种子序列的保守性预测其靶基因,如 Enright 等 (2003) 和 Grün 等 (2005) 对果蝇 miRNAs 靶标基因的预测。但是,由于种子区一般只有 6 个核苷酸,因此这样预测出的靶基因可能存在很多假阳性。如针对果蝇的 *miR-315*, Kheradpour 等 (2007) 应用 TargetScanFly 预测其在 417 个不同 mRNA 上有 667 个结合位点;Grün 等

(2005) 利用 PicTar 预测出 *miR-315* 有 542 个靶 mRNA,而 Griffiths-Jones 等 (2008) 用 Microcosm 预测出 307 个靶 mRNA,而且不同方法预测出的结果重复性较差。到目前为止,经实验验证的 *miR-315* 的靶 mRNA 只有 2 个 (Silver *et al.*, 2007)。因此,用相关软件预测 miRNA 的靶基因只能做为参考,关键还是要通过相关生物学实验进行验证。

另一种情况是通过实验验证相关 miRNA 的靶基因。比较直接的方法就是通过免疫沉淀 (immunoprecipitation) 来验证特定细胞中是否存在 miRNA 的靶基因。例如在果蝇的 S2 细胞系中,通过 Ago1 免疫沉淀 RNA-蛋白复合物成功鉴定出 *miR-1* 和 *miR-184* 的靶基因 (Easow *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2009)。但用这种方法成功发现 miRNA 新靶标 mRNA 的到目前为止仅有一例,就是 Kadener 等 (2009) 从果蝇头部细胞 (非培养的细胞系) 中鉴定出调控昼夜节律的 *bantam* 的靶基因 *clock*。这可能是因为 miRNA 只能在特定组织部位的细胞中和靶 mRNA 结合,因此不能用一个组织的细胞系去验证所有 miRNA 的靶基因。

通过将生物信息学软件预测与分子生物学技术相结合,目前已经明确了果蝇中 22 个 miRNA 的功能及其调控的靶基因 (表 2),主要集中在对器官分化和细胞凋亡等过程的调控。另外 Gomez-Orte 和 Belles (2009) 以德国小蠊为对象,研究了 miRNA 对不全变态昆虫变态过程的影响。Karr 等 (2010) 研究了 *miR-284* 对果蝇谷氨酸受体亚基组成的调控作用。

5.3 昆虫 miRNA 代谢途径的研究

对昆虫 miRNA 本身代谢途径的研究也是 miRNA 研究的一个重要方面,但这方面的研究相对较少。Jaubert-Possamai 等 (2010) 对豌豆蚜部分 miRNA 的代谢途径做了研究,发现在豌豆蚜中各有 2 个拷贝的 miRNA 特异性 Dicer-1 和 ago1 及 4 个拷贝的 pasha 参与了 miRNA 的生物合成。Qian 等 (2011) 克隆了 *bantam*, *miR-276a* 和 *miR-277* 3 个 miRNA 转录子的全长,以及 *miR-8* 的 5'端和 *miR-2b*、*miR-10* 的 3'端,并对其启动子进行了验证。

表 2 经实验验证的黑腹果蝇部分 miRNA 的功能 (引自 Jones and Newbury, 2010)

Table 2 Experimentally verified functions of miRNAs in *Drosophila melanogaster* (from Jones and Newbury, 2010)

黑腹果蝇 <i>Drosophila</i> miRNA	同源物 ^a Homologues	证实的靶标 mRNA Verified mRNA target(s)	定位/生物过程 Location/processes affected
<i>bantam</i>	D	<i>clock</i>	昼夜节律 (Kadener <i>et al.</i> , 2009)
<i>bantam</i>	D	<i>hid</i>	抑制幼虫/器官芽细胞凋亡 (Brennecke <i>et al.</i> , 2003)
<i>miR-315</i>	D	<i>Axin</i> , <i>Notum</i>	上调翅器官芽发育的无翅途径 (Silver <i>et al.</i> , 2007)
<i>miR-8</i>	Hs (<i>miR-141</i> and <i>miR-200</i>), Ce, D	<i>wntless</i> , <i>TCF</i> , <i>CG32767</i>	抑制无翅信号途径 (Kennell <i>et al.</i> , 2008)
<i>miR-8</i>	Hs (<i>miR-141</i> and <i>miR-200</i>), Ce, D	<i>atrophin</i>	防止细胞凋亡/神经退化 (Karres <i>et al.</i> , 2007)
<i>miR-8</i>	Hs (<i>miR-141</i> and <i>miR-200</i>), Ce, D	<i>u-shaped</i>	幼虫脂肪体的胰岛素信号途径和 PI3K 活性 (Hyun <i>et al.</i> , 2009)
<i>miR-9a</i>	Hs (<i>miR-9</i>), D	<i>dLMO</i>	翅发育过程中的细胞凋亡 (Biryukova <i>et al.</i> , 2009; Bejarano <i>et al.</i> , 2010)
<i>miR-9a</i>	Hs (<i>miR-9</i>), D	<i>senseless</i>	翅器官芽中感觉器官前体和神经前体细胞分化 (Li <i>et al.</i> , 2006)
<i>miR-184</i>	Hs, D	<i>saxophone</i>	生殖干细胞分化 (Iovino <i>et al.</i> , 2009)
<i>miR-184</i>	Hs, D	<i>K10</i>	卵壳背腹性形成 (Iovino <i>et al.</i> , 2009)
<i>miR-184</i>	Hs, D	<i>tramtrack</i>	前后胚囊层形成 (Iovino <i>et al.</i> , 2009)
<i>miR-iab-4-5p</i>	<i>Drosophila</i>	<i>Ultrabithorax</i>	翅/平衡棒的分化 (Ronshaugen <i>et al.</i> , 2005)
<i>let-7</i>	Hs, Ce, D	<i>abrupt</i>	神经肌肉重塑及变态的时间结构 (Caygill and Johnston, 2008; Sokol <i>et al.</i> , 2008)
<i>miR-1</i>	Hs, Ce, D	<i>Delta</i>	Notch 信号途径/贛门分化 (Kwon, <i>et al.</i> , 2005)
<i>miR-2</i>	Ce, D	<i>reaper</i> , <i>grim</i> , <i>sickle</i>	胚胎发生过程中的细胞凋亡 (Stark <i>et al.</i> , 2003; Leaman <i>et al.</i> , 2005)
<i>miR-13</i>	Ce, D	<i>reaper</i> , <i>grim</i> , <i>sickle</i>	胚胎发生过程中的细胞凋亡 (Stark <i>et al.</i> , 2003; Leaman <i>et al.</i> , 2005)
<i>miR-11</i>	D	<i>reaper</i> , <i>grim</i> , <i>sickle</i>	胚胎发生过程中的细胞凋亡 (Stark <i>et al.</i> , 2003; Leaman <i>et al.</i> , 2005)
<i>miR-6</i>	D	<i>hid</i>	胚胎发生过程中的细胞凋亡 (Stark <i>et al.</i> , 2003; Leaman <i>et al.</i> , 2005)
<i>miR-308</i>	D	<i>sickle</i> , <i>grim</i>	胚胎发生过程中的细胞凋亡 (Stark <i>et al.</i> , 2003; Leaman <i>et al.</i> , 2005)
<i>miR-7</i>	Hs, Ce, D	<i>hairy</i> , <i>E(spl)</i>	Notch 信号途径/翅的发育 (Stark <i>et al.</i> , 2003; Li <i>et al.</i> , 2009)
<i>miR-7</i>	Hs, Ce, D	<i>yan</i>	光感受器分化 (Li <i>et al.</i> , 2009; Li and Carthew, 2005)
<i>miR-14</i>	D	<i>Ecdysone receptor</i>	蜕皮酮信号途径/生理学和寿命 (Varghese and Cohen, 2007)
<i>miR-14</i>	D	<i>sugarbabe</i>	物质代谢调控 (Varghese <i>et al.</i> , 2010)
<i>miR-133</i>	Hs, D	<i>nPTB</i>	肌肉特异性外显子拼接 (Boutz <i>et al.</i> , 2007)
<i>miR-278</i>	D	<i>expanded</i>	胰岛素信号途径 (Teleman and Cohen, 2006)
<i>miR-279</i>	D	<i>nerfin-1</i>	嗅觉神经元命运决定 (Cayirlioglu <i>et al.</i> , 2008)
<i>miR-310-313</i>	D		控制突触前膜神经递质释放 (Tsurudome <i>et al.</i> , 2010)
<i>miR-310-313</i>	D	<i>Khc-73</i>	突触动态平衡调控 (Tsurudome <i>et al.</i> , 2010)

注:a;同源物是指与人 (*Homo sapiens*, Hs), 线虫 (*Caenorhabditis elegans*, Ce) 和其他果蝇 (*Drosophila*, D) 是否有同源的 miRNA, 如果该同源的 miRNA 名称与黑腹果蝇中的不同则在括号中注明。

Homology with miRNAs in *Homo sapiens* and *Caenorhabditis elegans* and one or more other *Drosophila* is indicated with Hs, Ce and D respectively, with the name in that species given in parentheses if different from *D. melanogaster*.

6 总结

miRNA 的发现对于研究基因的转录后调控具有里程碑式的重要意义。由于 miRNA 对细胞分化、胚胎发育和生长发育等很多生物过程起着关键调控作用,已经成为生命科学领域研究的一个新的热点。对昆虫 miRNA 的研究也已经引起了众多研究者的极大兴趣。随着越来越多的昆虫 miRNA 被发现,以及对不同 miRNA 生物学功能及其自身代谢途径等的进一步深入研究,将会使我们对昆虫基因表达调控网络的理解提高到一个新的水平。同时,也使得通过调控特定 miRNA 的表达充分利用天敌,以及只针对某一类或某一种害虫发展新一代高效、安全的害虫防治新技术成为可能。

参考文献 (References)

- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington, JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T, 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9(3):277—279.
- Bartel DP, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281—297.
- Bejarano F, Smibert P, Lai EC, 2010. *Mir-9a* prevents apoptosis during wing development by repressing *Drosophila LIM-only*. *Dev. Biol.*, 338(1):63—73.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ, 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.*, 35(3):215—217.
- Biryukova I, Asmar J, Abdesselem H, Heitzler P, 2009. *Drosophila mir-9a* regulates wing development via fine-tuning expression of the LIM only factor, dLMO. *Dev. Biol.*, 327(2):487—496.
- Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, Black DL, 2007. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev.*, 21:71—84.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM, 2003. *Bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 113(1):25—36.
- Caygill EE, Johnston LA, 2008. Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the *let-7* and *miR-125* heterochronic microRNAs. *Curr. Biol.*, 18(13):943—950.
- Cayirlioglu P, Kadow IG, Zhan X, Okamura K, Suh GSB, Gunning D, Lai EC, Zipursky SL, 2008. Hybrid neurons in a microRNA mutant are putative evolutionary intermediates in insect CO₂ sensory systems. *Science*, 319(5867):1256—1260.
- Davis-Dusenbery BN, Hata A, 2010. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem.*, 148(4):381—392.
- Ding YF, Zhu C, 2009. The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 386(1):6—10.
- Easow G, Teleman AA, Cohen SM, 2007. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *RNA*, 13:1198—1204.
- Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS, 2003. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.*, 5(1):R1.
- Gomez-Orte E, Belles X, 2009. MicroRNA-dependent metamorphosis in hemimetabolous insects. *PNAS*, 106(512):21678—21682.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ, 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic. Acids Res.*, 34 (Database issue):D140—144.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ, 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic. Acids Res.*, 36: D154—D158.
- Grün D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus K C, Rajewsky N, 2005. MicroRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comput. Biol.*, 1(1):e13.
- Gundersen-Rindal DE, Pedroni MJ, 2010. Larval stage *Lymantria dispar* microRNAs differentially expressed in response to parasitization by *Glyptapanteles flavicoxis* parasitoid. *Arch. Virol.*, 155(5):783—787.
- Hong X, Hammell M, Ambros V, Cohen SM, 2009. Immunopurification of Ago1 miRNPs selects for a distinct class of microRNA targets. *PNAS*, 106(35):15085—15090.
- Hyun S, Lee JH, Jin H, Nam J, Namkoong B, Lee G, Chung J, Kim VN, 2009. Conserved microRNA *miR-8/miR-200* and its target USH/FOG2 control growth by regulating PI3K. *Cell*, 139(11):1096—1108.
- Ibanez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M, 2008. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and

- human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS ONE*, 3:e2818.
- Iovino N, Pane A, Gaul U, 2009. *MiR - 184* has multiple roles in *Drosophila* female germline development. *Dev. Cell*, 17(1):123—133.
- Jaubert-Possamai S, Rispe C, Tanguy T, Gordon K, Walsh T, Edwards O, Tagu D, 2010. Expansion of the miRNA pathway in the hemipteran insect *Acyrtosiphon pisum*. *Mol. Biol. Evol.*, 27(5):979—987.
- Jones CI, Newbury SF, 2010. Functions of microRNAs in *Drosophila* development. *Biochem. Soc. T.*, 38:1137—1143.
- Kadener S, Menet JS, Sugino K, Horwich MD, Weissbein U, Nawathea P, Vagin VV, Zamore PD, Nelson SB, Rosbash M, 2009. A role for microRNAs in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.*, 23:2179—2191.
- Kai ZS, Pasquinelli AE, 2010. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nature Struct. Mol. Biol.*, 17:5—10.
- Karr J, Vagin V, Chen K, Ganesan S, Olenkina O, Gvozdev V, Featherstone DE, 2009. Regulation of glutamate receptor subunit availability by microRNAs. *J. Cell Biol.*, 185(4):685—697.
- Karres JS, Hilgers V, Carrera I, Treisman J, Cohen SM, 2007. The conserved microRNA *MiR - 8* tunes atrophin levels to prevent neurodegeneration in *Drosophila*. *Cell*, 131(1):136—145.
- Kennell JA, Gerin I, MacDougald OA, Cadigan KM, 2008. The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *PNAS*, 105:15417—15422.
- Kheradpour P, Stark A, Roy S, Kellis M, 2007. Reliable prediction of regulator targets using 12 *Drosophila* genomes. *Genome Res.*, 17:1919—1931.
- Kim VN, Han J, Simomi MC, 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 10:126—139.
- Kloosterman WP, Plasterk RHA, 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Developmental Cell*, 11(4):441—450.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W, 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews: Genetics*, 11:599.
- Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D, 2005. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates notch signaling. *PNAS*, 102:18986—18991.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T, 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543):853—858.
- Lai EC, Wiel C, Rubin GM, 2004. Complementary miRNA pairs suggest a regulatory role for miRNA:miRNA duplexes. *RNA*, 10:171—175.
- Leaman D, Chen PY, Fak J, Yalcin A, Pearce M, Unnerstall U, Marks DS, Sander C, Tuschl T, Gaul U, 2005. Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development. *Cell*, 121(7):1097—1108.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin - 4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin - 14*. *Cell*, 75(5):843—854.
- Legeai F, Rizk G, Walsh T, Edwards O, Gordon K, Lavenier D, Leterme N, Mereau A, Nicolas J, Tagu D, Jauber-Possamai S, 2010. Bioinformatic prediction, deep sequencing of microRNAs and expression analysis during phenotypic plasticity in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Genomics*, 11:281—290.
- Lema C, Cunningham MJ, 2010. MicroRNAs and their implications in toxicological research. *Toxicol Lett.* 198(2):100—105.
- Li S, Mead EA, Liang S, Tu Z, 2009. Direct sequencing and expression analysis of a large number of miRNAs in *Aedes aegypti* and a multi-species survey of novel mosquito miRNAs. *BMC Genomics*, 10:581.
- Li X, Carthew RW, 2005. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell*, 123(29):1267—1277.
- Li X, Cassidy JJ, Reinke CA, Fischboeck S, Carthew RW, 2009. A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development. *Cell*, 137(2):273—282.
- Li Y, Wang F, Lee JA, Gao FB, 2006. MicroRNA - 9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 20:2793—2805.
- Liu S, Gao S, Zhang D, Yin J, Xiang Z, Xia Q, 2010b. MicroRNAs show diverse and dynamic expression patterns in multiple tissues of *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 11:85.
- Liu S, Li D, Li Q, Zhao P, Xiang Z, Xia Q, 2010a. MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing. *BMC Genomics*, 11:148.
- Moretti F, Thermann R, Matthias W, Hentze MW, 2010. Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA*, 16:2493—2502.
- Qian J, Zhang Z, Liang J, Ge Q, Duan X, Ma F, Li F,

2011. The full-length transcripts and promoter analysis of intergenic microRNAs in *Drosophila melanogaster*. *Genomics*, 97(5):294—303.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G, 2000. The 21 – nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772):901—906.
- Ronshaugen M, Biemar F, Piel J, Levine M, Lai EC, 2005. The *Drosophila* microRNA *iab - 4* causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. *Genes Dev.*, 19: 2947—2952
- Sathyan P, Golden HB, Miranda RC, 2007. Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium. *J. Neurosci.*, 27(32):8546—8557.
- Saumet A, Lecellier CH, 2006. Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? *Retrovirology*, 3(3):3.
- Schnall-Levin M, Zhao Y, Perrimon N, Berger B, 2010. Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3' UTRs. *PNAS*, 107(36):15751—15756.
- Silver SJ, Hagen JW, Okamura K, Perrimon N, Lai EC, 2007. Functional screening identifies *miR-315* as a potent activator of wingless signaling. *PNAS*, 104:18151—18156.
- Skalsky RL, Vanlandingham D, Scholle F, Higgs S, Cullen BR, 2010. Identification of microRNAs expressed in two mosquito vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *BMC Genomics*, 11:119—135.
- Sokol NS, Xu P, Jan YN, Ambros V, 2008. *Drosophila let - 7* microRNA is required for remodeling of the neuromusculature during metamorphosis. *Genes Dev.*, 22: 1591—1596.
- Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM, 2003. Identification of *Drosophila* microRNA targets. *PLoS Biol.*, 1(3):397—409.
- Stark A, Kheradpour P, Parts L, Brennecke J, Hodges E, Hannon GJ, Kellis M, 2007. Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes. *Genome Res.*, 17:1865—1879.
- Teleman AA, Cohen SM, 2006. *Drosophila* lacking microRNA *miR-278* are defective in energy homeostasis. *Genes Dev.*, 20:417—422
- Tsurudome K, Tsang K, Liao EH, Ball R, Penney J, Yang J, Elazzouzi F, He T, Chishti A, Lnenicka G, Lai EC, Haghighi AP, 2010. The *Drosophila mir - 310* cluster negatively regulates synaptic strength at the neuromuscular junction. *Neuron*, 68(5):879—893.
- Varghese J, Cohen SM, 2007. MicroRNA *miR-14* acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 21:2277—2282.
- Varghese J, Lim SF, Cohen SM, 2010. *Drosophila miR-14* regulates insulin production and metabolism through its target, *sugarbabe*. *Genes Dev.*, 24:2748—2753.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G, 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin - 14* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5): 855—862.
- Winter F, Edaye S, Hüttenhofer A, Brunel C, 2007. *Anopheles gambiae* miRNAs as actors of defense reaction against *Plasmodium* invasion. *Nucl. Acids Res.*, 35(20): 6953—6962.
- Xin M, Wang Y, Yao Y, Xie C, Peng H, Ni Z, Sun Q, 2010. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol.*, 10:123.
- Yu Z, Jian Z, Shen SH, Purisima E, Wang E, 2007. Global analysis of microRNA target gene expression reveals that miRNA targets are lower expressed in mature mouse and *Drosophila* tissues than in the embryos. *Nucl. Acids Res.*, 35(1):152—164.
- Zhang B, Pan X, 2009. RDX induces aberrant expression of microRNAs in mouse brain and liver. *Environ. Health Persp.*, 117:231—240.
- 戚晓娟, 任太军, 李晓梅, 钟国华, 2009. 果蝇 miRNA 的结构与功能及研究策略. *昆虫学报*, 52(4):434—444.