



过表达和敲降 *ace-miR-3759-y* 对中华蜜蜂幼虫靶基因表达及体重的影响*

吴 鹰^{1**} 叶亚萍^{1**} 钱加琚¹ 张佳欣¹ 顾小雨¹ 牛庆生³
陈大福^{1,2***} 郭 睿^{1,2***}

(1. 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福州 350002; 2. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002;
3. 吉林省养蜂科学研究所, 吉林 132000)

摘要 【目的】 miRNA 在昆虫的生长、发育和代谢等诸多生物学进程中发挥关键调控作用。本研究对 *ace-miR-3759-y* 进行表达和序列验证, 并通过过表达与敲降 *ace-miR-3759-y* 探究其对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 幼虫靶基因表达及重量的影响, 以期对 *ace-miR-3759-y* 调控幼虫发育的分子机理研究提供依据。【方法】通过 Stem-loop RT-PCR 和 Sanger 测序验证 *ace-miR-3759-y* 的表达和序列。通过饲喂模拟物(Mimic)和抑制物(Inhibitor)对中华蜜蜂幼虫血淋巴中的 *ace-miR-3759-y* 进行过表达和敲降。利用 RT-qPCR 检测 *ace-miR-3759-y* 的过表达和敲降效果及靶基因相对表达量。利用电子天平对幼虫进行称重。【结果】*ace-miR-3759-y* 在中华蜜蜂幼虫肠道和血淋巴中真实存在和表达。相较于 Mimic-NC 组, *ace-miR-3759-y* 在 Mimic-*ace-miR-3759-y* 组 4 日龄和 5 日龄幼虫血淋巴中显著上调 ($P < 0.05$), 在 6 日龄幼虫血淋巴中上调表达但组间差异不显著 ($P > 0.05$)。相较于 Inhibitor-NC 组, Inhibitor-*ace-miR-3759-y* 组 4、5 和 6 日龄幼虫血淋巴中均显著下调表达 ($P < 0.05$)。过表达 *ace-miR-3759-y* 后, *CIC* 在 4、5 和 6 日龄幼虫血淋巴中的表达量均显著下调 ($P < 0.05$); *CKI* 在 4 日龄和 5 日龄幼虫血淋巴中的表达量显著下调 ($P < 0.05$), 在 6 日龄幼虫血淋巴中下调表达但组间差异不显著 ($P > 0.05$)。敲降 *ace-miR-3759-y* 后, *CIC* 在 5 日龄幼虫血淋巴中显著上调表达 ($P < 0.05$), 在 4 日龄和 6 日龄幼虫血淋巴中上调表达但组间差异不显著 ($P > 0.05$); *CKI* 在 4 日龄幼虫血淋巴中显著上调表达 ($P < 0.05$), 在 5 日龄和 6 日龄幼虫血淋巴中上调表达但组间差异不显著 ($P > 0.05$)。此外, 与 Mimic-NC 组相比, Mimic-*miR-3759-y* 组的 6 日龄幼虫的体重下降, 但组间差异不显著 ($P > 0.05$); 与 Inhibitor-NC 组相比, Inhibitor-*miR-3759-y* 组的 6 日龄幼虫体重上升, 但组间差异不显著 ($P > 0.05$)。【结论】通过饲喂 Mimic 和 Inhibitor 的方法在中华蜜蜂幼虫血淋巴中实现了 *ace-miR-3759-y* 的有效过表达及敲降, *ace-miR-3759-y* 负调控 *CIC* 和 *CKI* 的表达, *ace-miR-3759-y* 对幼虫体重无显著影响。

关键词 中华蜜蜂; 幼虫; 血淋巴; miRNA; *ace-miR-3759-y*; 过表达; 敲降

Impact of *ace-miR-3759-y* overexpression and knockdown on target gene expression and body weight of *Apis cerana cerana* larvae

WU Ying^{1**} YE Ya-Ping^{1**} QIAN Jia-Jun¹ ZHANG Jia-Xin¹ GU Xiao-Yu¹
NIU Qing-Sheng³ CHEN Da-Fu^{1,2***} GUO Rui^{1,2***}

(1. College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金 (202210389136, 202210389121); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-44-KXJ7); 福建农林大学硕士生导师团队项目 (郭睿); 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)科研扶持项目 (郭睿); 福建省大学生创新创业训练计划 (202210389136, 202210389121)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: wy569703@163.com; 15259907927@163.com

***共同通讯作者 Co-corresponding authors, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn; dfchen826@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-01-10; 接受日期 Accepted: 2022-05-12

2. Apitherapy Research Institute, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. Jilin Province Institute of Apicultural Science, Jilin 132000, China)

Abstract [Objectives] To determine the role of ace-miR-3759-y in target gene expression and body weight of *Apis cerana cerana* larvae in order to provide a foundation for further study of the ace-miR-3759-y-regulated molecular mechanism underlying larval development. **[Methods]** The expression and sequence of ace-miR-3759-y were confirmed by Stem-loop RT-PCR and Sanger sequencing. *A. cerana cerana* larvae were fed Mimic and Inhibitor to overexpress and knockdown ace-miR-3759-y in larval hemolymph. RT-qPCR was then used to determine the effect of ace-miR-3759-y overexpression and knockdown on the target genes *CIC* and *CKI*, and on larval weights which were measured using electronic scales. **[Results]** ace-miR-3759-y was both present and expressed in the hemolymph of *A. cerana cerana* larvae. Treatment with Mimic significantly up-regulated its expression in 4- and 5-day-old larvae relative to the control group. It was also upregulated in 6-day-old larvae, but this was not significant. Conversely, treatment with Inhibitor significantly down-regulated ace-miR-3759-y expression in 4-, 5- and 6-day-old larvae relative to the control. After overexpression of ace-miR-3759-y, the expression of *CIC* in 4-, 5- and 6-day-old larvae was significantly down-regulated, whereas that of *CKI* was significantly down-regulated in 4- and 5-day-old larvae. It was also down-regulated in 6-day-old larvae, but not significantly so. Knockdown of ace-miR-3759-y significantly up-regulated the expression of *CIC* in 5-day-old larvae. Expression was also up-regulated in 4- and 6-day-old larvae but this was not significant. Knockdown of ace-miR-3759-y also up-regulated *CKI* in 4-, 5- and 6-day-old larvae, although the degree of upregulation in the latter two age classes was not significant. Moreover, treatment with Mimic caused a non-significant decrease in the body weight of 6-day-old larvae relative to the Mimic control group and treatment with Inhibitor caused a non-significant increase in the body weight of 6-day-old larvae relative to the Inhibitor control group. **[Conclusion]** Effective overexpression and knockdown of ace-miR-3759-y in *A. cerana cerana* larvae can be achieved by feeding mimic and inhibitor. ace-miR-3759-y negatively regulates expression of *CIC* and *CKI* but has insignificant effects on body weight.

Key words *Apis cerana cerana*; larvae; hemolymph; miRNA; ace-miR-3759-y; overexpression; knockdown

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是东方蜜蜂 *Apis cerana* 的指名亚种,也是我国养蜂生产使用的主要蜂种之一,具有特殊的生态和经济价值 (Zhao *et al.*, 2020)。miRNA 是一类长度介于 18-25 nt 的内源性小 RNA (small RNA, sRNA) 分子 (Griffiths-Jones *et al.*, 2006), 可抑制靶 mRNA 翻译或使其降解,进而在转录后水平发挥负调控作用 (Samad *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020)。随着研究的不断深入,一些 miRNA 被证实能通过正调控基因表达发挥功能 (Sontheimer and Carthew, 2005; Fabian *et al.*, 2010)。前人在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Wei *et al.*, 2018)、家蚕 *Bombyx mori* (Wang *et al.*, 2014)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (Dennison *et al.*, 2015) 和蜜蜂 (熊翠玲等, 2018) 等昆虫中鉴定到大量 miRNA。

目前,主要通过饲喂或注射模拟物 (Mimic) 或激动剂 (Agomir)、抑制物 (Inhibitor) 或拮抗剂 (Antagomir) 来进行昆虫 miRNA 的功能研究

(Cristino *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2017)。对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的 miRNA 进行过表达和敲降的研究已见诸报道,例如 Michely 等 (2017) 曾对西方蜜蜂工蜂注射 miR-12 和 miR-124 的 Inhibitor,发现 miR-12 和 miR-124 的表达量被有效敲降,上述 2 个 miRNA 对工蜂短暂记忆和持久记忆的早期阶段形成确有影响。祝智威等 (2022) 通过饲喂 Mimic 和 Inhibitor 的方法成功实现了 ame-miR-13b 在意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 幼虫个体水平的过表达和敲降,并证实 ame-miR-13b 负调控表皮生长因子基因 *Egfr* 的表达。然而,东方蜜蜂 miRNA 的过表达和敲降研究迄今仍然缺失。

此前,西方蜜蜂的 ame-miR-3759 已被鉴定和报道 (Chen *et al.*, 2010)。但东方蜜蜂的 ace-miR-3759-y 迄今未见报道且功能未明。熊翠玲等 (2020) 利用 small RNA-seq (sRNA-seq) 技术对中华蜜蜂 4-6 日龄幼虫肠道进行测序和分析,发现 ace-miR-3759-y 的表达量在幼虫肠道发

育过程中持续降低 (TPM 值分别为: 571.46, 279.47 和 201.13), 并且与转录因子 *Capicua* 基因 *CIC* 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂基因 *CKI* 等 69 个基因间存在潜在靶向关系。本研究对前期预测到的 *ace-miR-3759-y* 进行表达和序列验证, 通过饲喂 Mimic 和 Inhibitor 对中华蜜蜂幼虫血淋巴中的 *ace-miR-3759-y* 进行过表达和敲降, 进而检测靶基因表达量和幼虫体重变化, 以期明确 *ace-miR-3759-y* 对靶基因 *CIC* 和 *CKI* 表达及幼虫体重的影响。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

中华蜜蜂工蜂幼虫取自福建农林大学动物科学学院 (蜂学学院) 蜜蜂保护课题组的实验蜂群。

1.2 *ace-miR-3759-y* 的 Stem-loop RT-PCR 与 Sanger 测序验证

采用 Stem-loop RT-PCR 对 *ace-miR-3759-y* 进行验证, 根据 *ace-miR-3759-y* 的序列, 利用 DNAMAN 软件设计特异性 Stem-loop 引物和上游引物 (F) 以及通用下游引物 (R) (表 1)。使用 RNA 抽提试剂盒 (Permoga, 中国) 分别提取中华蜜蜂工蜂幼虫 (6 日龄) 肠道样品和血淋巴样品的总 RNA 作为模板, 然后利用 Stem-loop 引物进行反转录, 得到的 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增 (翌圣, 中国), 产物经 1.8% 的琼脂糖凝胶电泳。切胶回收目的片段, 然后连接 pMD-19T 载体 (TaKaRa, 中国), 转化大肠杆菌 DH5 α (天根, 中国), 挑单菌落置于 LB 液体培养基 (氨苄抗性) 振荡培养 12 h, 取少量菌液进行 PCR 鉴定, 结果阳性的菌液送至上海生工进行 Sanger 测序 (单端测序, M13 引物)。

1.3 *ace-miR-3759-y* 的过表达和敲降

1.3.1 *ace-miR-3759-y* 的过表达和幼虫的人工饲养 参照郭睿等 (2018) 的技术流程进行 *ace-miR-3759-y* 的过表达和敲降及中华蜜蜂幼虫的人工饲养, 步骤简述如下: (1) 选取 3 个外

观健康且群势较强的中蜂蜂群作为实验蜂群, 每个蜂群内有 5 张巢脾, 利用蜂王产卵控制器将蜂王限制于空脾上, 自然产卵 12 h 后取出蜂王, 然后迅速将上述巢脾提至实验室, 用移虫针将发育至 2 日龄的幼虫小心移至已预置 100 μ L 饲料 (蜂王浆 63%, 蜂蜜 6%, 酵母粉 1%, 无菌水 30%) 的 6 孔细胞培养板中, 每孔放入 20-30 头幼虫, 置于恒温恒湿箱, 在 (35 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 和相对湿度 (RH) 95% 的条件下饲养 1 d; 次日将 3 日龄幼虫均分为 4 组, 小心移至新的 48 孔细胞培养板中 (已预置 40 μ L 饲料)。(2) 预先分别配制含 Mimic-*ace-miR-3759-y*、Mimic-NC (无义 Mimic)、Inhibitor-*ace-miR-3759-y* 和 Inhibitor-NC (无义 Inhibitor) 的饲料, 使其预混饲料的终浓度为 40 pmol/g; 每 12 h 在各组的每孔中加入新配置的 40 μ L 预混饲料 (终浓度均为 40 pmol/g), 连续饲喂 6 次; 在适宜条件下饲养幼虫至 6 日龄。Mimic-*ace-miR-3759-y*、Mimic-NC、Inhibitor-*ace-miR-3759-y* 和 Inhibitor-NC 委托上海吉玛制药技术有限公司合成, 序列信息详见表 1。

1.3.2 幼虫血淋巴制备和 *ace-miR-3759-y* 过表达效果检测 参照 Borsuk 等 (2017) 报道的方法, 使用无菌的 PBS 缓冲液反复漂洗幼虫表面以洗尽饲料, 再用干净滤纸小心吸干幼虫表面残留液体, 然后在超净工作台用干净的毛细玻璃管将幼虫口器扎破, 轻轻按压的同时小心吸取血淋巴, 每 3 头幼虫的血淋巴样品置于 1 个 RNA-Free EP 管, 液氮速冻后超低温冰箱保存备用。上述实验分别对 4、5 和 6 日龄幼虫进行取样, 每个日龄取 3 次生物学重复。

根据 *ace-miR-3759-y* 的序列 (GACTCACGTCGACTGGGTGTCCG), 参照郭睿等 (2019) 的方法设计特异性的茎环 (Stem-loop) 引物和上游引物及通用下游引物 (表 1), 委托上海生工生物工程公司进行合成。利用 RNA 抽提试剂盒 (Promega, 美国) 分别提取 4-6 日龄幼虫血淋巴的总 RNA, 均分为两份, 一份 RNA 利用 Stem-loop 引物进行反转录, 得到的 cDNA 作为模板进行 *ace-miR-3759-y* 的 qPCR; 另一份 RNA 利用 Oligo DT 引物进行反

表 1 模拟物、抑制物和引物的详细信息
Table 1 Detailed information about mimics, inhibitors and primers

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
Mimic-ace-miR-3759-y-sense	GACUCACGUCGACUGGGUGUCCG	ace-miR-3759-y 的模拟物
Mimic-ace-miR-3759-y-antisense	GACACECAGUCGACGUGAGUCUU	ace-miR-3759-y mimic
Inhibitor-ace-miR-3759-y	CGGACACECAGUCGACGUGAGUC	ace-miR-3759-y 的抑制物 ace-miR-3759-y inhibitor
Mimic-NC-sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	模拟物的阴性对照
Mimic-NC-antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	Negative control mimic
Inhibitor-NC	CAGUACUUUUGUGUAGUACAA	抑制物的阴性对照 Negative control inhibitor
ace-miR-3759-y-F	ACACTCCAGCTGGGGACTCACGTCGACTG	ace-miR-3759-y 的 qPCR
ace-miR-3759-y-R	CTCAACTGGTGTCTGTGGA	qPCR of ace-miR-3759-y
ace-miR-3759-y-Loop	CTCAACTGGTGTCTGTGGAGTCGGCAATTC AGTTGAGCGGACACE	ace-miR-3759-y 的反转录 Reverse transcription of ace-miR-3759-y
<i>U6</i> -F	CCAGGAGATGAAGTGGATACTC	<i>U6</i> 的 qPCR
<i>U6</i> -R	CTTGCTTGAAGTGTCTGCTT	qPCR of <i>U6</i>
<i>actin</i> -F	TTCCGCTATTTACTCCG	<i>actin</i> 的 qPCR
<i>actin</i> -R	ATACTTTGGCTACGCTTG	qPCR of <i>actin</i>
<i>CIC</i> -F	CCTATTTCTGATGCTGGC	<i>CIC</i> 的 qPCR
<i>CIC</i> -R	CTCCTTTGTAACGGTGCT	qPCR of <i>CKI</i>
<i>CKI</i> -F	GCAGGAATTTGGGTGGAG	
<i>CKI</i> -R	GGGCATAGGGTTCGGGTA	

转录, 得到的 cDNA 作为模板进行 ace-miR-3759-y 的靶基因 (*CIC* 和 *CKI*) 和内参基因 *actin* (Gene ID: LOC107999330) 和 *U6* (Gene ID: LOC107994478) 的 qPCR。

参照 SYBR Green 试剂盒的说明书, 在 ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 系统 (ABI 公司, 美国) 上进行 ace-miR-3759-y 的 qPCR 反应。反应体系和程序参照祝智威等 (2022) 的报道进行设置。每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 ace-miR-3759-y 的相对表达量。通过 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析并绘图。

1.3.3 ace-miR-3759-y 的敲降及效果检测 参照 1.3.1 节的方法通过饲喂 Inhibitor-ace-miR-3759-y 对 ace-miR-3759-y 进行敲降, 按照 1.3.2 节的方

法进行 ace-miR-3759-y 的 qPCR 检测, 反应体系和反应程序同上。每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 ace-miR-3759-y 的相对量。采用 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析及绘图, 数据进行 Student's *t* 检验。

1.4 ace-miR-3759-y 过表达和敲降后中华蜜蜂幼虫的形态观察及重量统计

分别取 Mimic-ace-miR-3759-y、Mimic-NC、Inhibitor-ace-miR-3759-y 和 Inhibitor-NC 组的 6 日龄幼虫, 通过 PBS 缓冲液反复漂洗去除幼虫体表残留的饲料, 再用滤纸小心吸尽体表液体。利用 FA2004 超精细电子天平 (舜宇恒平, 上海) 分别对上述 4 组中 6 日龄幼虫进行称重 (3 头为一组, 进行 3 次生物学重复), 计算各组幼虫的

平均体重后并利用 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析并绘图。

1.5 ace-miR-3759-y 的靶基因表达量检测

通过 qPCR 检测 ace-miR-3759-y 过表达和敲降后靶基因 *CIC* 和 *CKI* 的相对表达量。以 *actin* (Gene ID: LOC107999330) 作为内参基因。反应体系和条件参照祝智威等 (2022) 的报道进行设置。每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。利用 GraphPad Prism 7 软件进行数据分析并绘图。

2 结果与分析

2.1 ace-miR-3759-y 的表达和序列验证

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在中华蜜蜂 6 日龄幼虫的肠道和血淋巴中均可扩增出符合预期的目的片段 (约 100 bp) (图 1: A), 而阴性对照未扩增出片段。进一步的 Sanger 测序结果显示, 扩增片段的序列与预测出的 ace-miR-3759-y 序列一致 (图 1: B)。以上结果证实了 ace-miR-3759-y 表达和序列的真实性。

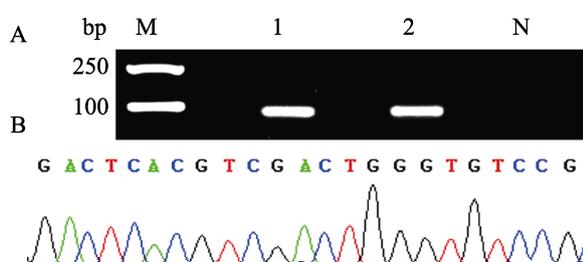


图 1 中华蜜蜂幼虫肠道和血淋巴中 ace-miR-3759-y 的表达和序列验证

Fig. 1 Validation of expression and sequence of ace-miR-3759-y in gut and hemolymph of *Apis cerana cerana* larvae

A. Stem-loop RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳;
B. ace-miR-3759-y 扩增片段的 Sanger 测序。泳道 M: DNA marker; 泳道 1: 6 日龄幼虫肠道; 泳道 2: 6 日龄幼虫血淋巴; 泳道 N: 阴性对照 (无菌水)。
A. Agarose gel electrophoresis for amplified products from Stem-loop RT-PCR; B: Sanger sequencing of segment amplified from ace-miR-3759-y.
Lane M: DNA marker; Lane 1: 6-day-old larval gut; Lane 2: 6-day-old larval hemolymph; Lane N: Negative control (sterile water).

2.2 中华蜜蜂幼虫血淋巴中 ace-miR-3759-y 的过表达和敲降效果检测

RT-qPCR 结果显示, 相较于 Mimic-NC 组, Mimic-ace-miR-3759-y 组 4 日龄幼虫血淋巴中 ace-miR-3759-y 的表达量显著上调表达 ($P < 0.05$) (图 2: A), 5 日龄幼虫血淋巴中其表达量显著上调 ($P < 0.01$) (图 2: B), 6 日龄幼虫血淋巴中其表达量上调但组间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 2: C); 相较于 Inhibitor-NC 组, Inhibitor-ace-miR-3759-y 组 4 日龄和 6 日龄幼虫血淋巴中 ace-miR-3759-y 均显著下调表达 ($P < 0.05$) (图 2: A, C); 5 日龄幼虫血淋巴中 ace-miR-3759-y 极显著下调表达 ($P < 0.01$) (图 2: B)。

2.3 过表达和敲降 ace-miR-3759-y 对幼虫血淋巴中靶基因 *CIC* 和 *CKI* 相对表达量的影响

基于前期获得的高质量测序数据, 联用 RNAhybrid, miRanda 和 TargetScan 软件进行 ace-miR-3759-y 靶基因的预测, 软件参数默认。靶向预测结果显示 ace-miR-3759-y 共靶向 146 条 mRNA, 对应 69 个基因。进一步分析发现这些靶 mRNA 可注释到 119 条通路, 包括氨基糖和核苷酸糖代谢, 周期蛋白依赖的丝氨酸/苏氨酸激酶活性调节, 氨基酸代谢, 蛋白质磷酸化和有机物代谢及细胞代谢等通路。根据 Nr 注释, 挑选出与幼虫生长发育相关的靶基因转录因子 Capicua *CIC* (LOC108000904) 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 *CKI* (LOC108002888) 进行 RT-qPCR 检测。

RT-qPCR 结果显示相较于 Mimic-NC 组, Mimic-ace-miR-3759-y 组 4 日龄 ($P < 0.01$)、5 日龄 ($P < 0.05$) 和 6 ($P < 0.01$) 日龄幼虫血淋巴中 *CIC* 的表达量均显著下调 (图 3: A); *CKI* 在 4 日龄 ($P < 0.01$) 和 5 日龄 ($P < 0.01$) 日龄幼虫血淋巴中显著下调表达, 在 6 日龄血淋巴中下调表达但组间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 3: B)。相较于 Inhibitor-NC 组, Inhibitor-ace-miR-3759-y 组 5 日龄幼虫血淋巴中 *CIC* 的表达量显著上调 ($P < 0.01$) (图 3: A), 4 日龄和 6 日龄幼虫血淋巴中 *CIC* 上调表达但组间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 3: A);

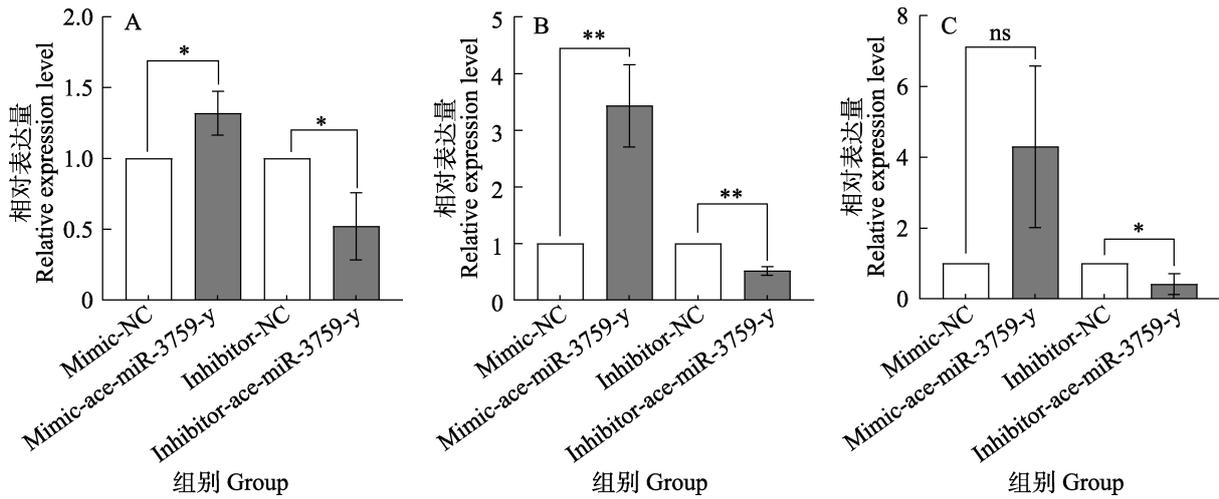


图 2 过表达和敲降 ace-miR-3759-y 后其在中华蜜蜂幼虫血淋巴中的相对表达量
 Fig. 2 Relative expression level of ace-miR-3759-y in hemolymph of *Apis cerana cerana* larvae after overexpression and knockdown

A. 4 日龄幼虫; B. 5 日龄幼虫; C. 6 日龄幼虫。ns 代表差异不显著 ($P>0.05$, Student's *t* 检验)。*代表差异显著 ($P<0.05$, Student's *t* 检验); **代表差异极显著 ($P<0.01$, Student's *t* 检验)。图 3, 图 4 同。
 A. 4-day-old larva; B. 5-day-old larva; C. 6-day-old larva. ns represents no significant difference ($P>0.05$), * represents significant differences ($P<0.05$), ** represents extremely significant differences by Student's *t*-test ($P<0.01$).
 The same as Fig.3 and Fig. 4.

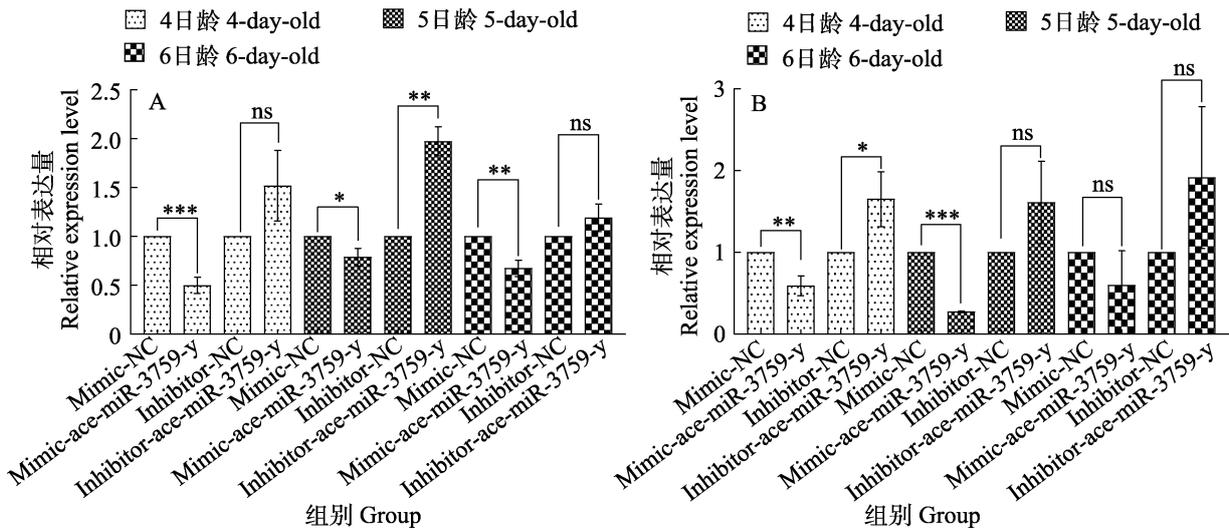


图 3 过表达和敲降 ace-miR-3759-y 后靶基因 *CIC* (A) 和 *CKI* (B) 在中华蜜蜂幼虫血淋巴中的相对表达量
 Fig. 3 Relative expression levels of target genes *CIC* (A) and *CKI* (B) after overexpression and knockdown of ace-miR-3759-y in hemolymph of *Apis cerana cerana* larvae

CKI 在 4 日龄幼虫血淋巴中显著上调表达 ($P<0.05$), 在 5 日龄和 6 日龄幼虫血淋巴中上调表达但组间差异不显著 ($P>0.05$) (图 3: B)。

2.4 过表达和敲降 ace-miR-3759-y 对幼虫体重的影响

重量统计结果显示, Mimic-ace-miR-3759-y

组 6 日龄幼虫的平均体重为 0.144 4 g, 小于 Mimic-NC 组 6 日龄幼虫的平均体重 (0.167 1 g), 但两组间差异不显著 ($P>0.05$); Inhibitor-ace-miR-3759-y 组 6 日龄幼虫的平均体重为 0.174 5 g, 大于 Inhibitor-NC 组 6 日龄幼虫的平均体重 (0.162 4 g), 但两组间差异不显著 ($P>0.05$) (图 4)。

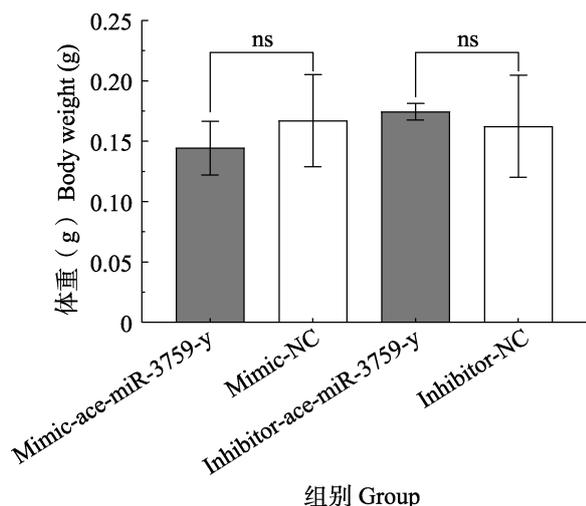


图 4 过表达和敲降 ace-miR-3759-y 的中华蜜蜂 6 日龄幼虫体重

Fig. 4 Weight of *Apis cerana cerana* 6-day-old larvae after overexpression and knockdown of ace-miR-3759-y

3 讨论

目前, miRBase 数据库仅收录西方蜜蜂的 259 个 miRNA, 未收录中华蜜蜂等其他蜂种的 miRNA (杨婕等, 2021)。本研究通过 Stem-loop RT-PCR 和 Sanger 测序证实了 ace-miR-3759-y 在中华蜜蜂幼虫肠道和血淋巴中真实存在和表达, 为东方蜜蜂 miRNA 信息提供了补充。在成年蜜蜂上通过注射 Mimic 和 Inhibitor 进行 miRNA 的过表达和敲降的方法已见诸报道 (Freitas *et al.*, 2017; Michely *et al.*, 2017)。相比于成年蜜蜂, 蜜蜂幼虫较为脆弱, 作者前期通过多次预实验发现利用微量注射器对蜜蜂幼虫进行注射产生的机械损伤极易导致幼虫死亡, 故本研究采用饲喂法对中华蜜蜂幼虫进行 ace-miR-3759-y 的过表达和敲降。本研究中, 与 Mimic-NC 组相比, Mimic-ace-miR-3759-y 组 4 日龄和 5 日龄幼虫血淋巴中 ace-miR-3759-y 的表达量显著上调, 6 日龄幼虫血淋巴中 ace-miR-3759-y 上调表达; 与 Inhibitor-NC 组相比, Inhibitor-ace-miR-3759-y 组在 4、5 和 6 日龄幼虫血淋巴中 ace-miR-3759-y 的表达量均显著下调 (图 2)。这一结果表明通过饲喂 Mimic 和 Inhibitor 可实现中华蜜蜂幼虫血淋巴中 ace-miR-3759-y 的有效过表达和敲降。祝智威等 (2022) 通过饲喂 Mimic 和 Inhibitor

在成功实现意大利蜜蜂幼虫肠道内 miRNA 的过表达和敲降。以上结果为进一步深入探究蜜蜂幼虫肠道和血淋巴中 miRNA 的功能和调控机制提供了基础。

本研究中, miR-3759-y 共靶向 *CIC* 和 *CKI* 等 69 个基因。转录因子 *Capicua* (*CIC*) 属于 HMG-box 家族, 是一个进化保守的转录抑制因子, 也是一个受 Ras/MAPK 信号调控的重要细胞生长调节剂 (Simón-Carrasco *et al.*, 2018), 可与靶基因中特定的 DNA 位点结合从而抑制酪氨酸激酶受体的信号通路 (Simón-Carrasco *et al.*, 2018)。*CIC* 最初在果蝇 *Drosophila* 中被发现, 并被证实与果蝇的器官生长、组织形成和胚胎发育等过程密切相关 (Jiménez *et al.*, 2000)。另外, 在哺乳动物中, *CIC* 高度保守且参与肺发育, 胚胎发育期间腹壁关闭及脑发育和功能等重要生理过程 (Kim *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2018)。Zhou 等 (2019) 在研究耐药原发性卵巢癌组织时鉴定到 miR-1307, 并证实其结合下游靶基因 *CIC*, miR-1307 可能通过调节 *CIC* 表达参与卵巢癌对化疗药物的耐药性。本研究发现过表达 ace-miR-3759-y 后, *CIC* 在 4、5 和 6 日龄幼虫血淋巴中的表达量均显著下调 (图 3: A); 敲降 miR-3759-y 后, *CIC* 在 5 日龄幼虫血淋巴中的表达量显著上调, 在 4 和 6 日龄幼虫血淋巴中上调表达但组间差异不显著 (图 3: A)。

CKI 是细胞周期蛋白依赖性激酶 (*CDK*) 的抑制剂, 可与细胞周期蛋白依赖性激酶-细胞周期蛋白 (*Cyclin*) 复合物结合并抑制 *CDK* 活性 (Tang *et al.*, 2018), 进而在特定阶段介导细胞周期阻滞, 并调节生物的生长和发育 (Foley *et al.*, 1999)。Lane 等 (1996) 曾在果蝇中鉴定到 1 个与胚胎发育 G1 状态相必需的 *CKI-Dacapo*。在家蚕 *Bombyx mori* 中, *CKI* 可能发挥胚胎致死、幼虫发育迟缓和死亡等功能 (Tang *et al.*, 2018)。研究表明 *CKI* 还与哺乳动物的昼夜节律调节以及行为、生理、生长发育和新陈代谢等有关 (Lee and Lee, 2019)。本研究中发现过表达 ace-miR-3759-y 后, *CKI* 在 4 日龄和 5 日龄幼虫血淋巴中的表达量显著下调, 在 6

日龄幼虫血淋巴中下调表达但组间差异不显著 (图 3: B); 敲降 *ace-miR-3759-y* 后, *CKI* 在 4 日龄幼虫血淋巴中显著上调表达, 在 5 日龄和 6 日龄幼虫血淋巴中上调表达但组间差异不显著 (图 3: B)。

4 结论

通过饲喂 Mimic 和 Inhibitor 的方法可实现中华蜜蜂幼虫血淋巴中 *ace-miR-3759-y* 的有效过表达及敲降, *ace-miR-3759-y* 负调控 *CIC* 和 *CKI* 的表达, *ace-miR-3759-y* 对幼虫体重无显著影响 (图 4)。

参考文献 (References)

- Borsuk G, Ptaszyńska AA, Olszewski K, Domaciuk M, Krutmuang P, Paleolog J, 2017. A new method for quick and easy hemolymph collection from apidae adults. *PLoS ONE*, 12(1): e0170487.
- Chen E, Chen Z, Li S, Xing D, Guo H, Liu J, Ji X, Lin Y, Liu S, Xia Q, 2020. Bmo-miR-2739 and the novel microRNA miR-167 coordinately regulate the expression of the vitellogenin receptor in *Bombyx mori* oogenesis. *Development.*, 147(8): dev183723.
- Chen X, Yu X, Cai Y, Zheng H, Yu D, Liu G, Zhou Q, Hu S, Hu F, 2010. Next-generation small RNA sequencing for microRNAs profiling in the honey bee *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 19(6): 799–805.
- Cristino AS, Barchuk AR, Freitas FC, Narayanan RK, Biergans SD, Zhao Z, Simoes ZL, Reinhard J, Claudianos C, 2014. Neuroligin-associated microRNA-932 targets actin and regulates memory in the honeybee. *Nat. Commun.*, doi.org/10.1038/ncomms6529.
- Dennison NJ, BenMarzouk-Hidalgo OJ, Dimopoulos G, 2015. MicroRNA-regulation of *Anopheles gambiae* immunity to *Plasmodium falciparum* infection and midgut microbiota. *Dev. Comp. Immunol.*, 49(1): 170–178.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W, 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, 79: 351–379.
- Foley E, O'Farrell PH, Sprenger F, 1999. Rux is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) specific for mitotic cyclin-Cdk complexes. *Curr. Biol.*, 9(23): 1392–1402.
- Freitas FC, Pires CV, Claudianos C, Cristino AS, Simões ZL, 2017. MicroRNA-34 directly targets pair-rule genes and cytoskeleton component in the honey bee. *Sci. Rep.*, 7: 40884.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ, 2006. MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.*, doi.org/10.1093/nar/gkj112.
- Guo R, Du Y, Tong XY, Xiong CL, Zheng YZ, Xu GJ, Wang HP, Geng SH, Zhou DD, Guo YL, Wu SZ, Chen DF, 2019. Differentially expressed microRNAs and their regulation networks in *Apis mellifera ligustica* larval gut during the early stage of *Ascospaera apis* infection. *Sci. Agric. Sin.*, 52(1): 166–180. [郭睿, 杜宇, 童新宇, 熊翠玲, 郑燕珍, 徐国钧, 王海朋, 耿四海, 周丁丁, 郭意龙, 吴素珍, 陈大福, 2019. 意大利蜜蜂幼虫肠道在球囊菌感染前期的差异表达 microRNA 及其调控网络. *中国农业科学*, 52(1): 166–180.]
- Guo R, Du Y, Xiong CL, Zheng YZ, Fu ZM, Xu GJ, Wang HP, Chen HZ, Geng SH, Zhou DD, Shi CY, Zhao HX, Chen DF, 2018. Differentially expressed microRNA and their regulation networks during the developmental process of *Apis mellifera ligustica* larval gut. *Sci. Agric. Sin.*, 51(21): 4197–4209. [郭睿, 杜宇, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 徐国钧, 王海朋, 陈华枝, 耿四海, 周丁丁, 石彩云, 赵红霞, 陈大福, 2018. 意大利蜜蜂幼虫肠道发育过程中的差异表达 microRNA 及其调控网络. *中国农业科学*, 51(21): 4197–4209.]
- Jiménez G, Guichet A, Ephrussi A, Casanova J, 2000. Relief of gene repression by torso RTK signaling: Role of capicua in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev.*, 14(2): 224–231.
- Kim Y, Andreu MJ, Lim B, Chung K, Terayama M, Jiménez G, Berg CA, Lu H, Shvartsman SY, 2011. Gene regulation by MAPK substrate competition. *Dev. Cell*, 20(6): 880–887.
- Lane ME, Sauer K, Wallace K, Jan YN, Lehner CF, Vaessin H, 1996. Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell*, 87(7): 1225–1235.
- Lee H, Lee JW, 2019. The roles of CKI in circadian rhythm. *Future Med. Chem.*, 11(20): 2621–2624.
- Michely J, Kraft S, Müller U, 2017. MiR-12 and miR-124 contribute to defined early phases of long-lasting and transient memory. *Sci. Rep.*, 7(1): 7910.
- Samad A, Rahnamaie-Tajadod R, Sajad M, Jani J, Murad A, Noor N M, Ismail I, 2019. Regulation of terpenoid biosynthesis by miRNA in *Persicaria minor* induced by *Fusarium oxysporum*. *BMC genomics*, 20(1): 586.
- Simón-Carrasco L, Jiménez G, Barbacid M, Drosten M, 2018. The Capicua tumor suppressor: A gatekeeper of Ras signaling in development and cancer. *Cell Cycle*, 17(6): 702–711.
- Sontheimer EJ, Carthew RW, 2005. Silence from within:

- Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*, 122(1): 9–12.
- Tan Q, Brunetti L, Rousseaux M, Lu HC, Wan YW, Revelli JP, Liu Z, Goodell MA, Zoghbi HY, 2018. Loss of Capicua alters early T cell development and predisposes mice to T cell lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 115(7): E1511–E1519.
- Tang XF, Zhou XL, Zhang Q, Chen P, Lu C, Pan MH, 2018. *Bombyx mori* cyclin-dependent kinase inhibitor is involved in regulation of the silkworm cell cycle. *Insect Mol. Biol.*, 27(3): 404–413.
- Wang X, Tang SM, Shen XJ, 2014. Overview of research on *Bombyx mori* microRNA. *J. Insect Sci.*, doi:10.1093/jis/14.1.133.
- Wei G, Sun L, Qin S, Li R, Chen L, Jin P, Ma F, 2018. Dme-Hsa Disease Database (DHDD): Conserved human disease-related miRNA and their targeting genes in *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(9): 2642.
- Xiong CL, Du Y, Chen DF, Zheng YZ, Fu ZM, Wang HP, Geng SH, Chen HZ, Zhou DD, Wu SZ, Shi CY, Guo R, 2018. Bioinformatic prediction and analysis of miRNAs in the *Apis mellifera ligustica* larval gut. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 55(6): 1023–1033. [熊翠玲, 杜宇, 陈大福, 郑燕珍, 付中民, 王海朋, 耿四海, 陈华枝, 周丁丁, 吴素珍, 石彩云, 郭睿, 2018. 意大利蜜蜂幼虫肠道的 miRNAs 的生物信息学预测及分析. *应用昆虫学报*, 55(6): 1023–1033.]
- Xiong CL, Du Y, Feng RR, Jiang HB, Shi XY, Wang HP, Fan XX, Wang J, Zhu ZW, Fan YC, Chen HZ, Zhou DD, Zhen YZ, Chen DF, Guo R, 2020. Differential expression pattern and regulation network of microRNAs in *Ascosphaera apis* invading *Apis cerana cerana* 6-day-old larvae. *Acta Microbiol. Sin.*, 60(5): 992–1009. [熊翠玲, 杜宇, 冯睿睿, 蒋海宾, 史小玉, 王海朋, 范小雪, 王杰, 祝智威, 范元婵, 陈华枝, 周丁丁, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿, 2020. 侵染中华蜜蜂 6 日龄幼虫的蜜蜂球囊菌的微小 RNA 差异表达谱及调控网络. *微生物学报*, 60(05): 992–1009.]
- Yang J, Xie M, Xu XJ, Bai JL, You MS, 2021. Research progress of insect miRNAs. *Acta Entomol. Sin.*, 64(2): 259–280. [杨婕, 谢苗, 徐雪娇, 白建林, 尤民生, 2021. 昆虫 miRNA 研究进展. *昆虫学报*, 64(2): 259–280.]
- Zhao G, Wang C, Wang Y, Wang L, Xu B, Guo X, 2020. Role of *Apis cerana cerana* N-terminal asparagine amidohydrolase (aceNtan1) in oxidative stress. *J. Biochem.*, 168(4): 337–348.
- Zhou YY, Wang M, Shuang T, Liu YS, Zhang YQ, Shi C, 2019. MiR-1307 influences the chemotherapeutic sensitivity in ovarian cancer cells through the regulation of the CIC transcriptional repressor. *Pathol. Res. Pract.*, 215(10): 152606.
- Zhu ZY, Wang J, Long Q, Xu YJ, Fen RR, Liu JM, Zhao HD, Zhu LR, Hou HQ, Chen DF, Guo R, 2022. Impaction of overexpression and knockdown of ame-miR-13b on the expression of genes in *Apis mellifera ligustica* larval gut. *Acta Entomol. Sin.*, 65(4): 460–468. [祝智威, 王杰, 隆琦, 许雅静, 冯睿睿, 刘佳美, 赵浩东, 朱乐冉, 侯海青, 陈大福, 郭睿, 2022. 过表达和敲减 ame-miR-13b 对意大利蜜蜂幼虫肠道内基因表达的影响. *昆虫学报*, 65(4): 460–468.]