东方蜜蜂微孢子虫诱导蜜蜂中肠蛋白差异表达研究*

王静琳[1**] 陈 胜[1] 敖塘堰[1] 张素贞[1] 马振刚[1***] 周泽扬[1,2]

（1. 农业农村部长江上游传粉昆虫资源保护与利用重点实验室，重庆市媒介昆虫重点实验室，动物生物学重庆市重点实验室，重庆师范大学，重庆 401331；2. 微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室，西南大学，重庆 400715）

摘 要 【**目的**】为探讨东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 感染蜜蜂后的形态学影响、各组织的感染情况及对中肠组织蛋白质的影响，初步探索蜜蜂自身免疫应答调控。【**方法**】分别提取中华蜜蜂/意大利蜜蜂实验组与对照组的蜜蜂中肠组织总蛋白，通过 SDS-PAGE 电泳技术筛选差异蛋白条带，LC-MS/MS 质谱分析技术鉴定差异蛋白质，利用半定量和荧光定量 RT-PCR 技术验证筛选出的差异蛋白质。【**结果**】蜜蜂受东方蜜蜂微孢子虫感染后，中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius 和意大利蜜蜂 *Apis mellifera* Ligustica 的体重均未出现显著性差异，而二者受感染的中肠组织形态变化均较为明显。其次，对意大利蜜蜂而言，被筛选出的两条较明显的中肠差异表达蛋白质条带经质谱分析共鉴定到 35 个候选蛋白质。筛选出的两条中华蜜蜂中肠差异蛋白条带经质谱分析技术共鉴定到 11 个候选蛋白质。经验证，在感染 *N. ceranae* 后的第 4 天，筛选出的意大利蜜蜂精氨酸激酶（AK）和甘油三磷酸脱氢酶（GPDH）及中华蜜蜂硫氧还原蛋白还原酶（TrxR）及精氨酸激酶（AK）的蛋白表达量分别是对照组的 2.02 倍、2.21 倍、1.72 倍和 1.88 倍，均呈现上调表达，与蛋白质差异表达趋势一致。【**结论**】在东方蜜蜂微孢子虫感染意大利蜜蜂或中华蜜蜂后，筛选获得差异表达的蛋白质条带并进行鉴定。其中与蜜蜂中肠组织基本代谢、免疫应答、氧化应激与能量代谢相关蛋白质（如意大利蜜蜂的 AK 和 GPDH、中华蜜蜂的 AK 和 TrxR）的表达量被显著上调，暗示这些差异蛋白可能参与了蜜蜂中肠组织的免疫防御。本研究为深入探讨蜜蜂中肠对蜜蜂微孢子虫的免疫与代谢应答方式提供了丰富的数据基础。

关键词 东方蜜蜂微孢子虫；蜜蜂；中肠；差异表达蛋白；鉴定；定量分析

Differential expression of honeybee midgut proteins after infection by the microsporidian *Nosema ceranae*

WANG Jing-Lin[1**] CHEN Sheng[1] AO Tang-Yan[1] ZHANG Su-Zhen[1]
MA Zhen-Gang[1***] ZHOU Ze-Yang[1,2]

(1. Key Laboratory of Conservation and Utilization of Pollinator Insect of the Upper Reaches of Yangtze River of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing Key Laboratory of Vector Insect, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Microsporidia Infection and Control, Chongqing 400715, China)

Abstract **[Objectives]** To investigate the morphological effects of infection of honeybees by *Nosema ceranae*, including the main tissues infected, the effects on protein expression in the midgut and the regulation of the honeybee immune response. **[Methods]** Total honeybee midgut proteins were extracted and screened using SDS-PAGE and differentially expressed proteins identified using LC-MS/MS. Differential expression of proteins was verified with semi-quantitative, and quantitative, RT-PCR. **[Results]** There was no significant difference in the body weight of infected and uninfected (control) *Apis cerana cerana* Fabricius or *Apis mellifera* Ligustica. However, there were significant differences in the intestinal morphology of

*资助项目 Supported projects：重庆市教委科学技术项目（KJQN202100543）；国家现代农业产业技术体系建设项目（CARS-44-KXJ21）

**第一作者 First author，E-mail：1351983557@qq.com

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

收稿日期 Received：2022-01-28；接受日期 Accepted：2023-01-28

infected and uninfected bees. Furthermore, two differentially expressed midgut protein bands were identified in *A. mellifera* and *A. cerana cerana*. Thirty-five candidate proteins were obtained by MS in *A. mellifera* and 11 in *A. cerana cerana*. Four days after infection, expression levels of arginine kinase (AK) and glycerol triphosphate dehydrogenase (GPDH) in *A. mellifera*, were up-regulated 2.02 times, 2.21 times, respectively, relative to the control group, whereas thioredoxin reductase (TrxR) and arginine in *A. cerana cerana* were up-regulated 1.72 times, and 1.88 times, respectively. All data were consistent with the results of SDS-PAGE analysis. **[Conclusion]** The expression of proteins related to basic metabolism, immune response, oxidative stress and energy metabolism in the honeybee midgut (such as AK and GPDH in *A. mellifera* and AK and TrxR in *A. cerana cerana*) were significantly up-regulated after infection by *N. ceranae*, suggesting that these proteins may be involved in the immune defense of intestinal tissues. This study provides a rich data base for in-depth study of the immune and metabolic responses of the honeybee midgut to infection by *N. ceranae.*

Key words *Nosema ceranae*; honeybee; midgut; differentially expressed protein; identification; quantitative analysis

蜜蜂是一类对多种农作物授粉起关键作用的传粉昆虫，是作物生产的基石，能给农业生产带来巨大的经济效益（杜夏等，2021）。蜜蜂还给人类提供了大量的蜂产品，如蜂蜜、蜂蜡和蜂王浆等。蜂群的衰退会严重影响农业生产，除环境因素外，寄生虫及病原体的感染是造成蜂群衰退的重要原因（Goulson *et al*., 2015；吴志豪等，2021)。蜜蜂微孢子虫病是由蜜蜂微孢子虫侵入并感染蜜蜂中肠上皮细胞而引起的消化道传染性疾病。其仅危害成蜂，对幼虫和蛹均不致病，是世界上养蜂国家主要的检疫性病害之一（欧阳红燕等，2002）。东方蜜蜂微孢子虫在蜂群中的传染性较强，可以使患病蜜蜂表现出较高的致病率（Aufauvre *et al*.，2012）。目前，已被发现并能感染蜜蜂的蜜蜂微孢子虫分别是 1909 年国外研究者在西方蜜蜂体内发现的西方蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis*（Zander, 1909）。与 1914 年 Fantham 等在熊蜂中分离鉴定出的熊蜂蜜蜂微孢子虫 *Nosema bombi*（Fantham and Porter, 1914），及 1996 年 Fries 等在中国北京中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* Fabricius 蜂群中发现的东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*（Fries *et al*., 1996）。从 1996 年 Fries 等在东方蜜蜂体内首次发现东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 以来，世界上众多国家和地区已报道了在意大利蜜蜂 *Apis mellifera* Ligustica 中检测到了东方蜜蜂微孢子虫（Higes *et al*., 2009，2010；Chen and Huang, 2010），东方蜜蜂微孢子虫病成为了危害蜜蜂生产最为重要的病原微生物之一（Aufauvre *et al*., 2012; Graystock *et al*., 2020）。

受到东方蜜蜂微孢子虫感染的成年工蜂会出现消化系统紊乱，寿命缩短，采集能力下降，易受病菌感染等现象，最终导致蜂群数量下降，甚至出现蜂群崩溃（秦浩然等，2012）。Martín-Hernández 等（2009）研究发现在 33 ℃条件下进行蜜蜂体内微孢子虫侵染，发现蜜蜂体内东方蜜蜂微孢子虫的不成熟孢子数量多于西方蜜蜂微孢子虫，表明东方蜜蜂微孢子虫在蜜蜂体内繁殖的更迅速，也进一步证明了流行病学的研究（Martín-Hernández *et al*., 2009; Aufauvre *et al*., 2012）。因此，关于东方蜜蜂微孢子虫病原生物学与致病机理的研究越来越受到蜂业工作者的关注。

研究发现，*N. ceranae* 不仅破坏肠道上皮细胞，还破坏基部细胞，可能导致肠道阻挡层丧失抵抗病毒等其他病原体侵染的能力，使得病毒等其他病原体可能在蜜蜂体内大量繁殖，所以 *N. ceranae* 在一定程度上可能打开了肠道病毒、细菌或真菌进入体腔的大门，最终导致蜜蜂蜂群衰竭而亡（丁桂玲和石巍，2008）。东方蜜蜂微孢子虫的感染始于蜜蜂中肠上皮细胞，成熟的孢子在中肠内发芽并将具有侵染性的胞原质注入宿主细胞，在其中完成大规模增殖（Higes *et al*., 2007）。因此，深入探究宿主肠道免疫机制及病原对宿主肠道的侵染机理可为肠道感染性病原的防治提供丰富的参考。Candas 等（2003）研究发现敏感印度谷螟 *Plodia interpunctella* 通过上调表达中肠组织中氧化代谢的蛋白质（细胞色

素 C 氧化酶亚基 N 和 NADH 脱氢酶亚基 O）和增强谷胱甘肽利用的蛋白质（GSH 转移酶）提高自身抗逆性；高坤等（2013）分析了家蚕感染质型多角体病毒（BmCPV）后中肠组织的差异蛋白质，结果表明其中肠阴离子通道孔蛋白的下调表达以及与细胞凋亡相关基因上调表达，推测家蚕在BmCPV感染的过程中可能启动了细胞凋亡的抗病毒机制；2014 年，研究者分别通过转录组学和蛋白质组学研究方法分析了西方蜜蜂感染东方蜜蜂微孢子虫后的差异表达基因与蛋白，结果表明东方蜜蜂微孢子虫可以诱导强烈的中肠免疫应答，以及影响表皮修饰和海藻糖代谢；诱导了与能量产生、先天免疫（活性氧应激）和蛋白质调节相关的关键蛋白质表达量发生改变（Aufauvre *et al*., 2014; Vidau *et al*., 2014）；2015 年，研究者利用转录组学研究方法分析了家蚕肠道对微孢子虫感染早期的应答模式，鉴定获得了免疫应答相关的差异表达基因（Yue *et al*., 2015）；Games 等（2016）研究发现库蚊中肠部分蛋白参与了对自身有害物质的抵御；郭睿等（2018）利用 RNA-seq 技术分析了意大利蜜蜂工蜂中肠响应 *N. ceranae* 胁迫的高表达基因，系统揭示了 *N. ceranae* 胁迫意大利蜜蜂工蜂中肠过程中的基因表达谱信息；2019 年通过 RNA-seq 技术探索了 *N. ceranae* 在侵染意大利蜜蜂过程的基因表达谱及高表基因的功能，发现 MAPK 和 cAMP 信号通路可能在孢子的环境应激和侵染过程中行使重要功能（熊翠玲等，2019）；为了探究微孢子虫对蜜蜂肠道屏障的早期影响，Houdelet 等（2020）通过西方蜜蜂肠道解剖部分的蛋白质组学研究揭示了宿主对微孢子虫不同分离株（*Nosema apis* 和 *Nosema ceranae*）的不同早期应答反应，鉴定获得了一系列的代谢通路相关的差异表达蛋白，尤其是 8 个氧化磷酸化途径相关蛋白。由此可见，昆虫的肠道在昆虫先天性免疫等过程中扮演重要的角色。蜜蜂微孢子虫对宿主的侵染起始于蜜蜂中肠，对于蜜蜂微孢子虫引起宿主应答的研究也有所报道，但主要集中在转录组学、蛋白质组学引起的宿主应答，而从蜜蜂微孢子虫-宿主相互作用角度入手，筛选与病原互作的宿主关键蛋白质的研究却鲜有报道。因此，基于病原-宿主互作的研究方法，鉴定获得蜜蜂中肠在抵抗蜜蜂微孢子虫侵染过程中的关键因子，于解析蜜蜂抵御微孢子虫侵染的分子机制具有重要的意义；同时能够为检测东方蜜蜂微孢子虫感染蜜蜂提供了标记和靶标。

1 材料与方法

1.1 材料和实验仪器

材料：意大利蜜蜂和中华蜜蜂的子脾来自重庆市畜牧科学院，东方蜜蜂微孢子感染的患病蜂采自重庆东南部酉阳县蜜蜂养殖场。

实验仪器：高速离心机、5417R 高速冷冻离心机和梯度 PCR 仪采购于 Eppendorf 公司；高速组织破碎仪采购于宁波新芝生物科技股份有限公司；荧光定量 PCR 仪、蛋白电泳仪和凝胶成像仪采购于 Bio-rad 公司；核酸电泳仪采购于北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 东方蜜蜂微孢子虫的鉴定 取患病蜂的腹部进行研磨，通过差速离心分离和 percoll 密度梯度离心等方法最终获得纯化东方蜜蜂微孢子虫的成熟孢子（耿四海，2020）。利用 CTAB 法提取蜜蜂微孢子虫总 DNA，根据何超等（2014）报道的蜜蜂微孢子虫小亚单位核糖体 DNA（*16s rDNA*）及核糖体转录间隔区（*ITS*）基因的 PCR 引物序列扩增上述微孢子虫的 *16s rDNA* 和 *ITS* 片段，由生工公司进行合成。*16s rDNA* 基因的 PCR 扩增程序：94 ℃ 3 min；94 ℃ 40 s，45 ℃ 40 s，72 ℃ 1 min，35 个循环；72 ℃ 10 min；12 ℃保存。*ITS* 基因引物熔解温度为 55 ℃，其它程序一样。PCR 产物经测序后在 NCBI 数据库进行比对与鉴定分析。

1.2.2 *N. ceranae* 感染后的蜜蜂形态观察和组织感染情况分析 意大利蜜蜂和中华蜜蜂的子脾在温度为 34 ℃，相对湿度为 75%的培养箱中培养中培养至出房（韩旭等，2014）。待蜜蜂出房 3-5 d 时，意大利蜜蜂和中华蜜蜂设置对照组和

实验组（各取 200 只蜜蜂）进行实验。24 h 饥饿处理后实验组喂食含孢子量为 2×10^7 个的 *N. ceranae* 50%蔗糖溶液，每日利用显微镜检法检测蜜蜂中肠中东方蜜蜂微孢子虫的增殖情况。于添食后的第 4、6 和 8 天，对照组和实验组中各选取 9 只蜜蜂，分别测量其体重，观察体色；并在添食后第 4、6、8 天，分别收集蜜蜂头部、胸部及中肠组织，待研磨后制作临时装片以用于微孢子虫感染情况的观察。为了进一步仔细观察孢子在中肠细胞中的增殖情况，收集感染后第 8 天的蜜蜂中肠，按照贺元莉（2012）所述的方法，利用感染第 8 天后的蜜蜂中肠制作组织超薄切片，随后用 DAPI 染色 10-15 min，用 PBST 缓冲液清洗 3 次，待稍干燥后滴加 1 μL 抗荧光淬灭剂，盖上盖玻片，封片，观察拍照。

1.2.3　*N. ceranae* 诱导蜜蜂中肠蛋白质差异表达分析

1.2.3.1　中肠样品的制备　分别在接种 *N. ceranae* 后的第 2、4 和 6 天，从意大利蜜蜂组和中华蜜蜂组的对照组和实验组中分别随机选取 30 只蜜蜂，于冰上解剖并取其中肠并放置于无菌 ddH_2O 中，去除中肠内的围食膜及食物，每 10 条中肠收集于一个 1.5 mL 的离心管中，每组共 3 管，保存于 - 80 ℃备用。

1.2.3.2　*N. ceranae* 感染和未感染组蜜蜂中肠的差异蛋白质条带分析　利用不锈钢珠结合 PBS 缓冲液处理法分别进行意大利蜜蜂组和中华蜜蜂组的中肠组织总蛋白提取（张素贞等，2015）。分别取出上述收集的中肠样品，每个 1.5 mL 离心管内加入 200 μL 预冷并含有终浓度为 1 mmol/L PMSF 的 PBS 缓冲液，随后加入 0.4 g 直径为 0.05 mm 的不锈钢珠，在高速组织捣碎机内剧烈震荡 2 min 后，于冰水中冷却数秒，再次进行震荡破碎 2 min，重复操作 2 次；最后将样品放置于 4 ℃下裂解 1 h，加入蛋白质电泳上样缓冲液，沸水浴中处理 10 min。在 4 ℃下 12 000 r/min 离心 10 min，分别吸取实验组与对照组上清进行 SDS-PAGE 电泳检测，以筛选差异蛋白条带。

1.2.3.3　中肠差异蛋白质条带的质谱分析　将实验组和对照组的中肠电泳条带进行比较，获得两组间的差异蛋白质条带，用甲醇预处理的切胶刀片切取目标蛋白质，并放置在甲醇处理过的 1.5 mL 离心管中。将目标蛋白送往公司，利用毛细管高效液相色谱方法进行质谱鉴定，并对采集的质谱数据进行 Go 分类分析与 KEGG 代谢通路分析。

1.2.4　中肠差异表达蛋白质的表达谱以及荧光定量 PCR 验证　将第 2、4、6 天的意大利蜜蜂和中华蜜蜂实验组和对照组蜜蜂中肠作为实验材料，根据李江红等（2012）的描述进行意大利蜜蜂内参 *actin* 基因的引物设计，*actin*-Y-F：TCCTGCTATGTATGTCGC，*actin*-Y-R：AGTTGCCATTTCCTGTTC；根据刘俊峰等（2012）的描述进行中华蜜蜂内参 *actin* 基因的引物设计，β-*actin*-Z-F：GGCTCCCGAAGAACATCC，β-*actin*-Z-R：TGCGAAACACCGTCACCC。搜索数据库 UniProt，获取意大利蜜蜂精氨酸激酶（AK）、意大利蜜蜂甘油三磷酸脱氢酶（GPDH）、中华蜜蜂硫氧还原蛋白还原酶（TrxR）、中华蜜蜂精氨酸激酶（AK）4 种蛋白质相对应的 mRNA 序列，然后用 BioXM 2.6 和 Premier Primer 5 软件分别设计针对该 4 条序列的普通 PCR 引物及荧光定量 PCR 引物，具体设计情况见表 1 和表 2。将设计的引物送至金斯瑞生物科技公司进行合成。

利用 Trizol 法进行意大利蜜蜂组和中华蜜蜂组的中肠样品总 RNA 的提取，利用 TAKARA 公司的 PrimeScript^{TM} RT cDNA reagent Kit 试剂盒进行 cDNA 的合成。使用 NANO DROP1000 核酸浓度测定仪进行 cDNA 浓度的测定。以反转录 cDNA 作为模板，用相应的内参基因引物进行多次 PCR 扩增，调整模板的用量直至内参基因的表达量一致，并以此模板量进行目的基因的转录情况分析。25 μL 普通 PCR 反应体系：2.5 μL 10×PCR buffer；2.0 μL dNTP mix；1 μL cDNA；0.5 μL 引物-F；0.5 μL 引物-R；0.25 μL rTaq 酶；18.25 μL ddH_2O。PCR 扩增程序：95 ℃ 4 min；95 ℃ 50 s，退火温度(Tm) 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃ 10 min；4 ℃保存。另外，实

表 1 目的基因 PCR 引物设计
Table 1 PCR primer design of target gene

基因名称 Gene name	引物序列 (5′-3′) Primer sequence (5′-3′)	退火温度（℃）Melting temperature, (Tm, ℃)	产物长度（bp）Product length (bp)
AK *Apis cerana cerana* /*Apis mellifera*	F：GCGCGGATCCATGGTTGACCAAGCTGTTTT	59.22	1 093
	R：ATATCTCGAGAAGTTCCTTTTCGAGTTTAA	59.14	
GPDH *Apis mellifera*	F：GCGCGGATCCATGGCAGAAAAACTACGTAT	59.21	1 076
	R：ATATCTCGAGCATGTATTCTGGATGATTGC	59.16	
TrxR *Apis cerana cerana*	F：GCGCGGATCCATGCCACCAATTGCTGATCA	59.23	1 518
	R：ATATCTCGAGACTGCAACAACTTTGTGGCT	59.18	

表 2 目的基因荧光定量 PCR 引物设计
Table 2 qRT-PCR primer design of target gene

基因名称 Gene name	引物序列 (5′-3′) Primer sequence (5′-3′)	退火温度（℃） Melting temperature (Tm, ℃)	产物长度（bp） Product length (bp)
AK *Apis mellifera*	F：CTGACAAGCATCCACCAA	54.00	322
	R：AGAAGCGGCAAGCATT	48.00	
GPDH *Apis mellifera*	F：GGAAAAGGAAATGTTGAA	48.00	179
	R：TCTGGATGATTGCGTAAG	52.00	
TrxR *Apis cerana cerana*	F：GGTCGTAAACCACTCACA	48.00	235
	R：GCTACATTCACATAATCCAT	52.00	
AK *Apis cerana cerana*	F：TTGGATTCTGGCGTTG	54.00	127
	R：GTCTTTTGGTGGGTGCT	54.00	

验使用 ABI StepOne Plus™ 进行 qPCR 扩增反应。根据 AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix（Vazyme 染料法荧光定量 PCR 预混液）试剂盒的使用说明进行实验操作，稀释处理每份 cDNA 至终浓度为 25 mg/L，保证检测的未知样品的 Ct 值尽量处于 20-28 范围内，检测设计的内参基因和目的基因的引物对是否具有特异性。每个基因重复 3 次。20 μL 荧光定量 PCR 反应体系：10 μL AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix；0.4 μL Primer1（10 μmol·L^{-1}）；0.4 μL Primer2（10 μmol·L^{-1}）；0.4 μL ROX Reference Dye1；2 μL cDNA；6.8 μL ddH_2O。荧光定量 PCR 反应程序：预变性 95 ℃ 5 min；循环反应 95 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，40 个循环；95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，95 ℃ 15 s。将扩增所得到的数据按照 AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix 试剂盒使用说明书所述公式计算目的基因的表达情况。设定 Ct^{A1} 为 1 号样本目的基因的 Ct 值，Ct^{B1} 为 1 号样本内参基因的 Ct 值；设定 Ct^{A2} 为 2 号样本目的基因的 Ct 值，Ct^{B2} 为 2 号样本的内参基因的 Ct 值；则 1 号样本和 2 号样本目的基因表达水平比值可粗略推算为：$\Delta\Delta Ct = (Ct^{A2}–Ct^{B2}) – (Ct^{A1}–Ct^{B1}) = X$，即 2 号样本目的基因的表达水平为 1 号样本目的基因的 2^{-x}。

1.3 数据统计分析

每个实验条件下计算获得 3 组平行实验数据，使用 SPSS22. 0 软件对不同实验条件下所获取的数据进行 *T* 检测，分析数据差异是否具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *N. ceranae* 感染后的蜜蜂形态观察和组织感染情况分析

对实验组与对照组的蜜蜂体重数据进行统计，结果表明中华蜜蜂的体重在感染后第 4、6、8 天均无显著性的差别（图 1：A）；意大利蜜蜂

的体重在感染后第 6 和第 8 天较对照组也无明显的差异（图 1：B）。对各组蜜蜂的体表进行观察，发现感染 *N. ceranae* 后的蜜蜂外部形态、体表颜色等均无明显的改变（图 1：C，D）。

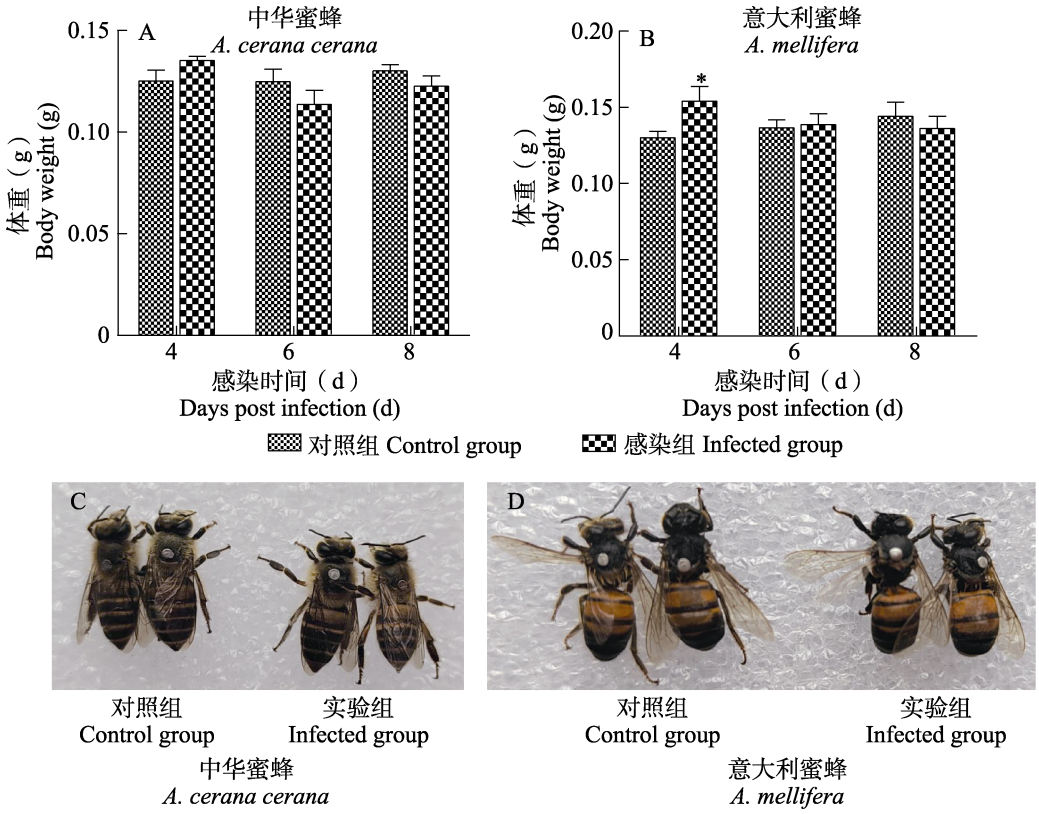

图 1　蜜蜂体重分析与体表观察

Fig. 1　The statistical analysis of honeybee body weight and observation of body surface features

*表示差异显著（$P<0.05$，T 检验）。

* represents significant differences ($P<0.05$, Student's T- test).

随后，对 *N. ceranae* 感染后第 4、6、8 天的意大利蜜蜂和中华蜜蜂中微孢子虫组织分布情况进行分析。首先，分别对感染组中华蜜蜂和意大利蜜蜂的头和胸部进行显微观察，发现随着感染时间的延长，在蜜蜂的头部和胸部组织中均检测不到蜜蜂微孢子虫成熟孢子（图 2：A-D）。这表明蜜蜂头部和胸部不是 *N. ceranae* 增殖的主要组织。随后，对感染不同时间下的蜜蜂中肠进行解剖观察，发现至感染第 8 天蜜蜂中肠组织膨大且失去光泽与弹性（图 3：A，C），表明蜜蜂中肠组织可能受到的微孢子虫的侵染。对中肠组织进行显微观察，结果表明意大利蜜蜂和中华蜜蜂在感染 *N. ceranae* 后第 4 天起，均能检测到成熟孢子。随着时间的增长，孢子数目呈增加的趋势（图 3：B，D）。对感染第 8 天后的蜜蜂中肠组织超薄切片的 DAPI 染色观察结果表明，实验组蜜蜂的中肠组织细胞中发现有大量的成熟微孢子虫，其细胞核发出明亮的蓝光点状信号（图 3：A，C）。由上可知，中华蜜蜂与意大利蜜蜂实验组蜜蜂中肠均已被 *N. ceranae* 感染，可以作为后续中肠差异表达蛋白筛选实验的材料。

2.2　东方蜜蜂微孢子虫的鉴定

为了确定感染组蜜蜂中肠中微孢子虫的类型，依照前述方法，对蜜蜂中肠组织中的成熟微孢子虫进行分离与纯化，利用 CTAB 法提取微孢子虫的总基因组 DNA（图 4：A），获取的条带清晰单一；以其为模板扩增获得微孢子虫的 *ITS* 和 *16S rDNA* 基因（图 4：B，C）。随后，将获

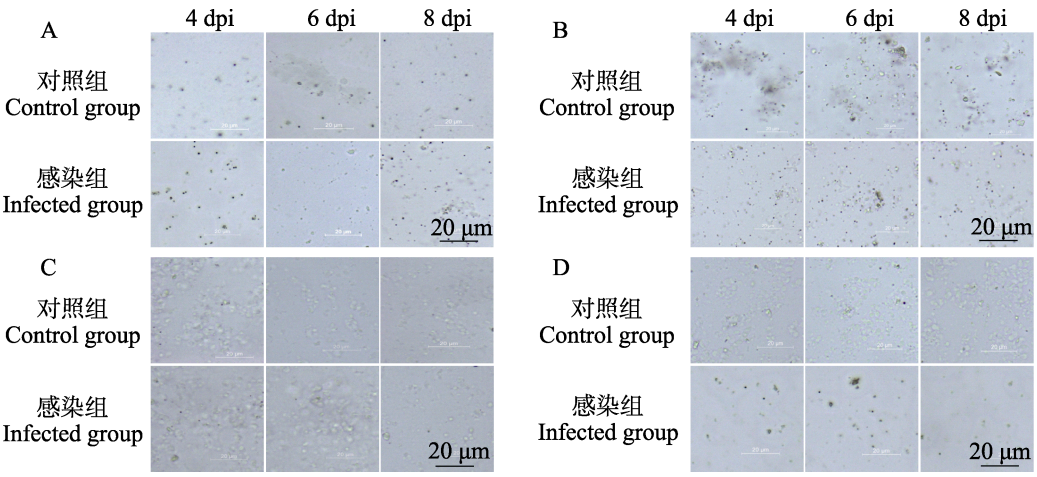

图 2　中华蜜蜂和意大利蜜蜂的头和胸部蜜蜂微孢子虫的显微镜检观察

Fig. 2　Microscopic observation of the head and thorax of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera*

A. 意大利蜜蜂感染组中头部内孢子的显微观察；B. 中华蜜蜂感染组中头部内孢子的显微观察；C. 意大利蜜蜂感染组中胸部内孢子的显微观察；D. 中华蜜蜂感染组中胸部内孢子的显微观察。dpi：感染后的天数。下图同。

A. Microscopic observation of spores in head of *A. mellifera* infection group; B. Microscopic observation of spores in head of *A. cerana cerana* ; C. Microscopic observation of spores in chest of *A. mellifera* infection group; D. Microscopic observation of spores in chest of *A. cerana cerana* infection group. dpi: Days post infection. The same below.

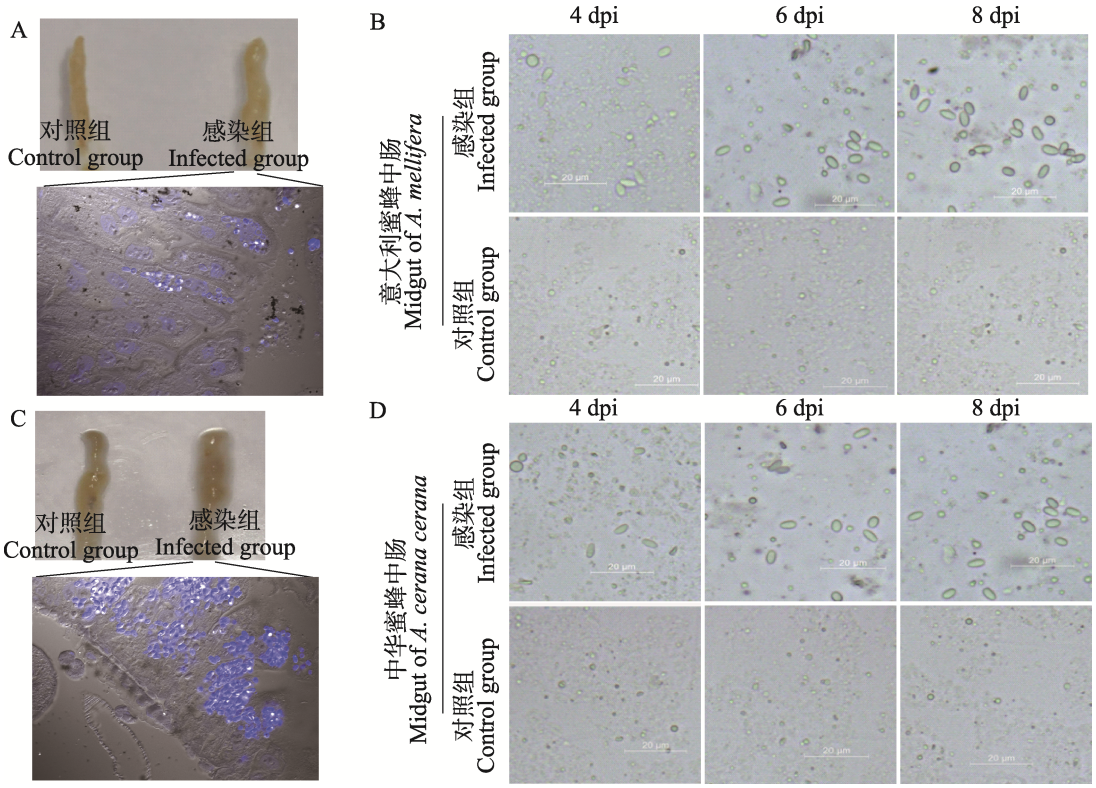

图 3　意大利蜜蜂和中华蜜蜂中肠组织的形态观察和显微镜检分析

Fig.3　Morphological observation and microscopic examination of mid-gut tissue of *Apis mellifera* and *Apis cerana cerana*

A. 意大利蜜蜂中肠的显微观察及 DAPI 染色结果；B. 意大利蜜蜂感染组中肠内孢子的显微观察结果；C. 中华蜜蜂中肠的显微观察及 DAPI 染色结果；D. 中华蜜蜂感染组中肠内孢子的显微观察结果。

A. Microscopic observation and DAPI staining results of midgut of *A. mellifera*; B. Microscopic observation of spores in midgut of *A. mellifera* infection group; C. Microscopic observation and DAPI staining results of midgut of *A. cerana cerana*; D. Microscopic observation of spores in midgut of *A. cerana cerana* infection group.

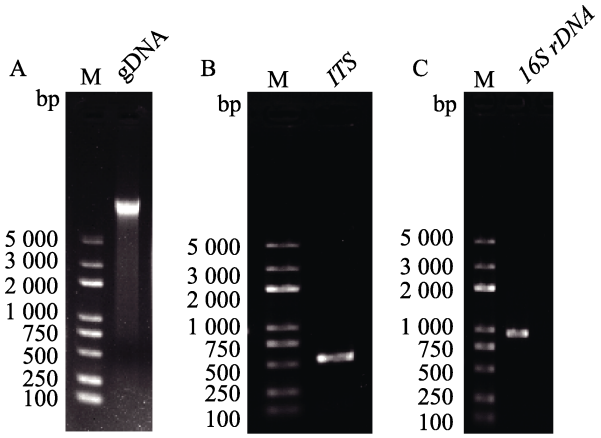

图 4　感染蜜蜂中肠内微孢子虫的 *ITS* 与 *16S rDNA* 基因扩增

Fig. 4　Amplification of *ITS* and *16S rDNA* genes of microsporidia isolated from the midgut of infected honeybees

A. 微孢子虫总 DNA 的电泳检测；B. 微孢子虫 *ITS* 基因的扩增；C. 微孢子虫 *16S rDNA* 基因的扩增。M：BM5000 DNA marker；gDNA：微孢子虫总 DNA；*ITS*：糖体转录间隔区（ITS）基因；*16S rDNA*：小亚单位核糖体基因。

A. Electrophoretic detection of total DNA of islated microsporidia; B. Amplification of *ITS* gene; C. Amplification of *16S rDNA* gene. M: BM5000 DNA marker; gDNA: Total DNA of microsporidia; *ITS*: The intergenic transcribed spacer region; *16S rDNA*: Small subunit ribosomal gene.

得的基因片段送至上海生工公司进行序列测定，将获得的序列在NCBI的GenBank数据库中进行Blastn 比对分析，结果现实扩增获得的基因分别与东方蜜蜂微孢子虫的 ITS 序列（GenBank 登录号为 DQ078785.1）与核糖体小亚基基因序列（GenBank 登录号为 U26534.1）比对一致，表明感染组蜜蜂中肠组织中的微孢子虫为东方蜜蜂微孢子虫。

2.3　*N. ceranae* 诱导蜜蜂中肠蛋白质差异表达

2.3.1　实验组与对照组蜜蜂中肠的差异蛋白质条带分析

按上述方法进行蜜蜂中肠总蛋白提取，分别取意大利蜜蜂和中华蜜蜂实验组与对照组上清样品进行 12% SDS-PAGE 电泳检测，以筛选获得差异蛋白条带，结果见图 5。由图 5 可知，通过比较意大利蜜蜂的对照组与实验组的蛋白质条带，发现在 *N. ceranae* 感染意大利蜜蜂后第 2 天，实验组中出现了 1 条明显上调表达的差异条带 N4-0，蛋白分子量大小约 42 kD；而在 *N. ceranae* 感染后的第 4 天，实验组中产生了 5 条上调表达的差异蛋白质条带，其分子量主要集中在 30-60 kD，分别标记为 N4-1、N4-2、N4-3、N4-4 和 N4-5，其中 N4-0 与 N4-3 分子量一致，N4-3 和 N4-4 条带差异最为明显，如图 5（A）所示。因此，选择 N4-3 和 N4-4 两条差异蛋白条带进行质谱鉴定及后续分析。

另外，比较中华蜜蜂的对照组与实验组的中肠总蛋白质条带，发现 *N. ceranae* 感染中华蜜蜂后第 2 天，两组的总蛋白质条带浓度基本上相当，且未发现有明显的差异条带。在 *N. ceranae* 感染中华蜜蜂后第 4 天，实验组样品中出现了 1 条明显的蛋白质差异条带，分子量在 35-45 kD 之间，标记为 Nc4d。而在对照组中，有 1 条分子量在 25-35 kD 之间的蛋白条带在受 *N. ceranae* 感染后被下调，标记该条带为 C4d，如图 5（B）所示。因此，选择 Nc4d 和 C4d 两条蛋白差异条带进行质谱鉴定分析。

2.3.2　蜜蜂中肠差异蛋白质条带的 LC-MS/MS 质谱分析

选取意大利蜜蜂的中肠组织差异蛋白质条带N4-3和N4-4以及中华蜜蜂的中肠组织差异蛋白质条带 C4d 和 Nc4d，经质谱鉴定分析分别鉴定得到 24 种、11 种、6 种和 7 种候选蛋白质。根据差异蛋白质条带的分子量大小以及覆盖度进行复筛，确定以下蛋白作为候选蛋白质（表 3）。由表 3 可知，鉴定获得的差异蛋白包括：意大利蜜蜂的中肠差异蛋白 N4-3 条带筛选出的天冬氨酸转氨酶、主要王浆蛋白 2、α 淀粉酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶和无脊椎连接蛋白 5 种表达量上调的蛋白质；意大利蜜蜂的中肠差异蛋白 N4-4 条带中筛选出的精氨酸激酶、sn-甘油-3-磷酸脱氢酶和无脊椎连接蛋白 3 种表达量上调的蛋白质；中华蜜蜂的中肠差异蛋白条带 C4d 中筛选出的果糖二磷酸醛缩酶、磷酸甘油酸变位酶、ATP 合成酶亚基和谷胱甘肽硫转移酶 4 种表达量下调的蛋白质；在中华蜜蜂的中肠差异蛋白

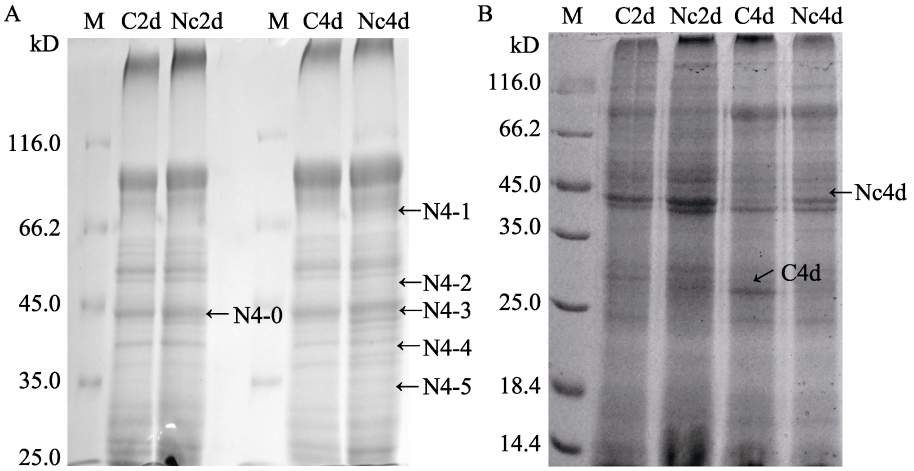

图 5 蜜蜂中肠差异表达蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of differentially expressed proteins in honeybee midgut

A. 意大利蜜蜂感染 *N. ceranae* 后中肠总蛋白。M：蛋白质 marker；Nc2d：*N. ceranae* 感染意大利蜜蜂 2 d 后中肠总蛋白；C2d：对照组 2 d 后的意大利蜂中肠总蛋白；Nc4d：*N. ceranae* 感染意大利蜜蜂 4 d 后的中肠总蛋白；C4d：对照组 4 d 后的意大利蜜蜂中肠总蛋白；B. 中华蜜蜂感染 *N. ceranae* 后中肠总蛋白。M：蛋白质 marker；Nc2d：*N. ceranae* 感染中华蜜蜂 2 d 后中肠总蛋白；C2d：对照组 2 d 后中华蜜蜂中肠总蛋白；Nc4d：*N. ceranae* 感染中华蜜蜂 4 d 后中肠总蛋白；C4d：对照组 4 d 后中华蜜蜂中肠总蛋白。

A. Total midgut protein of *A. mellifera* after infection with *N. ceranae*. M: Protein maker; Nc2d: The mid-gut proteins of infected *A. mellifera* after 2 days; C2d: The mid-gut proteins of *A. mellifera* in control group after 2 days; Nc4d: The mid-gut proteins of infected *A. mellifera* after 4 days; C4d: The mid-gut proteins of *A. mellifera* in control group after 4 days; B. Total midgut protein of *A. cerana cerana* after infection with *N. ceranae*. M: Protein maker; Nc2d: The mid-gut proteins of infected *A. cerana cerana* after 2 days; C2d: The mid-gut proteins of *A. cerana cerana* in control group after 2 days; Nc4d: The mid-gut proteins of infected *A. cerana cerana* after 4 days; C4d: The mid-gut proteins of *A. cerana cerana* in control group after 4 days.

表 3 蛋白质差异条带质谱鉴定结果

Table 3 The mass spectrometry identification result of protein differential band

条带 Band	蛋白质名称 Protein name	搜索号 Reference	肽段数 Pepcount	特异性肽段数 Uniquepepcount	覆盖率 Cover percent	相对分子量 (kD)Relative molecular weight (kD)	等电点 Isoelectric point
N4-3	天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase	H9JZX5	46	17	0.414 9	48 049.00	9.27
	主要王浆蛋白 2 Major royal jelly protein 2	O77061	11	9	0.245 6	51 073.33	6.83
	α 淀粉酶 α-amylase	Q8N0N7	16	9	0.237 3	56 009.19	7.22
	磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase	H9K5C7	4	3	0.089 4	47 338.72	8.50
	无脊椎连接蛋白 Innexin	H9KQT7	4	3	0.094 7	50 580.16	5.87
N4-4	精氨酸激酶 Arginine kinase	O61367	9	5	0.177 5	40 008.39	5.66
	sn-甘油-3-磷酸脱氢酶 sn-Glycerol-3-phosphate dehydrogenase	O61368	2	1	0.027 5	41 572.00	6.67
	无脊椎连接蛋白 Innexin	H9KAA8	1	1	0.025 1	41 572.7	6.40
C4d	果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase	V9IF40	7	6	0.271 2	39 632.3	7.57
	磷酸甘油酸变位酶 Phosphoglycerate mutase	Q6UGB7	8	5	0.232 3	28 962.26	8.40

续表 3 (Table 3 continued)

条带 Band	蛋白质名称 Protein name	搜索号 Reference	肽段数 Pepcount	特异性肽段数 Uniquepepcount	覆盖率 Cover percent	相对分子量 (kD)Relative molecular weight (kD)	等电点 Isoelectric point
C4d	ATP 合成酶亚基 ATP synthase subunit gamma	V9IF60	5	2	0.081 1	32 835.88	9.46
	谷胱甘肽硫转移酶 Glutathione *S*-transferase	S4S5K4	2	2	0.147 1	23 737.49	8.75
Nc4d	精氨酸激酶 Arginine kinase	V9IDW3	25	13	0.457 2	42 059.54	5.58
	V 型质子 ATP 酶亚基 c V-type proton atpase subunit c	V9IAX8	8	4	0.131 4	44 678.06	8.59
	硫氧蛋白还原酶 Thioredoxin reductase	D7PBZ6	2	1	0.028 3	54 321.34	6.90
	泛素 Ubiquitin	V9I6X1	2	1	0.048 1	21 320.48	6.18

条带 Nc4d 中筛选出的精氨酸激酶、V 型质子 ATP 酶亚基 c、硫氧蛋白还原酶和泛素 4 种表达量上调的蛋白质。

对条带 N4-3、N4-4 经质谱分析得到的 35 个上调表达的基因进行 GO 分类分析，结果表明其主要涉及细胞成分，分子功能和生物学过程等路径。涉及到的细胞组分包括构成膜结构组分、构成细胞内组分和维持膜系统完整性等；涉及到的分子功能主要包括细胞粘附、催化活性等；涉及到的生物学过程包括生物学调控、细胞新陈代谢和物质传递等。对条带 C4d、Nc4d 经质谱分析得到的 6 个下调表达差异蛋白基因和 7 个上调表达差异蛋白的基因进行 GO 分类分析。结果表明，6 个下调基因主要涉及到的细胞组分功能包括构成膜结构、构成细胞内组分等；涉及到的分子功能主要包括细胞粘附、催化活性、转运等；涉及到的生物学过程包括细胞新陈代谢、物质传递等，其中细胞新陈代谢基因占百分率最大。7 个上调基因涉及到的细胞组分包括构成膜结构、构成细胞内组分和构成细胞外组分等；涉及到的分子功能主要包括抗氧化性、细胞粘附、催化活性、转运调控等；涉及到的生物学过程包括生物学调控、细胞新陈代谢、物质传递等。再对以上 42 个表达上调基因的 GO 分类统计进行分析，我们发现其参与催化活性的基因占总的基因的百分率最大，且主要是一些酶类基因。在这些差异蛋白中，随机筛选出 4 种差异表达的酶类蛋白进一步进行中肠组织表达谱分析及荧光定量 PCR 验证，即意大利蜜蜂精氨酸激酶、意大利蜜蜂甘油三磷酸脱氢酶、中华蜜蜂硫氧还原蛋白还原酶、中华蜜蜂精氨酸激酶。

2.3.3　差异表达蛋白质的转录谱以及荧光定量 PCR 验证　Trizol 法提取第 2、4、6 天的意大利蜜蜂和中华蜜蜂实验组和对照组总 RNA 后利用试剂盒合成 cDNA，以肌动蛋白基因 *actin* 作为内参基因进行目的基因的表达量情况分析。先利用设计的特异性引物和合成的 cDNA 进行半定量 PCR，调整模板的用量直至各组（实验组和对照组）模板相对量一致，电泳结果如图 6 所示。由图 6 可知，在 *N. ceranae* 感染意大利蜜蜂第 4 天的实验组中，精胺酸激酶 *AK* 基因和 sn-甘油-3-磷酸脱氢酶 *GPDH* 基因的表达水平呈现明显上调（图 6：A）；在 *N. ceranae* 感染中华蜜蜂第 2 天的实验组中，*AK* 基因的表达量与对照组相当，而在第 4 天时其基因的表达水平呈现明显上调（图 6：B）；硫氧蛋白还原酶 *TrxR* 基因的表达水平也是在 *N. ceranae* 感染第 4 天时表现出明显上调（图 6：B），其结果与蛋白质诱导表达结果一致。随后，以上述调整的模板体积和设计的特异性引物进行意大利蜜蜂目的基因 *GPDH* 和 *AK*、中华蜜蜂目的基因 *TrxR* 和 *AK* 的荧光定量 PCR，检测目的基因的相对表达量。结果在 *N. ceranae* 感染意大利蜜蜂的第 4 天时，实验组 *AK*（*AK* 1）和 *GPDH* 基因的表达量分别是对照组的 2.02 倍和 2.21 倍；而在 *N. ceranae* 感染中华蜜蜂的第 4 天时，实验组 *AK*（*AK* 2）和 *TrxR* 基

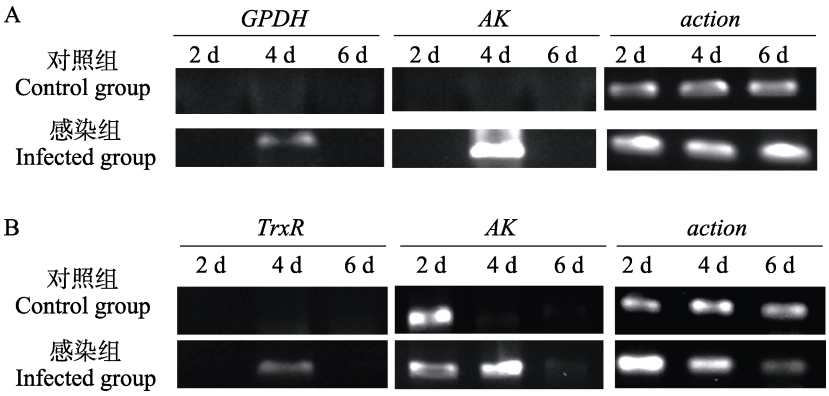

图 6 目的基因和内参 *actin* 基因的转录表达情况分析

Fig. 6 Transcriptional expression analysis of target gene and reference gene transcription

A. 意大利蜜蜂目的基因和 *actin* 基因；B. 中华蜜蜂目的基因和 *β-actin* 基因。

A. Target gene and *actin* of *A. mellifera*; B. Target gene and *β-actin* of *A. cerana cerana.*

因的表达量分别是对照组的 1.88 倍和 1.72 倍(图 7), 这一结果与基因的表达谱分析及蛋白质诱导表达分析趋势相同, 表明蛋白质差异表达分析结果具有较好的可靠性。

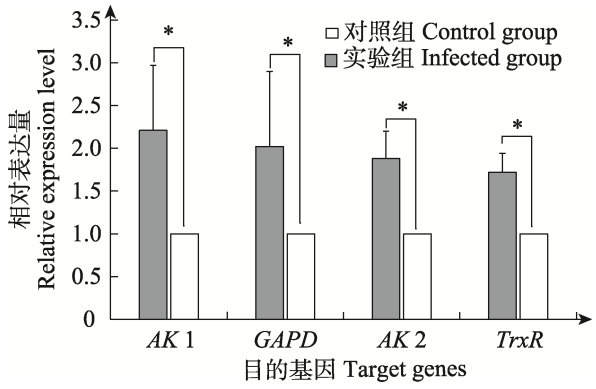

图 7 意大利蜜蜂和中华蜜蜂中目的基因表达量的 qRT-PCR 验证分析

Fig. 7 qRT-PCR analysis of target genes transcription of *Apis mellifera* and *Apis cerana cerana*

*表示差异显著（$P<0.05$，T 检验）。

* represents significant differences ($P<0.05$, Student's T- test).

3 讨论

本实验通过添食的方法使实验组的蜜蜂感染东方蜜蜂微孢子虫,在蜜蜂受感染的前 8 d 内, 观察未发现其外部形态有明显的变化; 光学显微镜下镜检，发现实验组蜜蜂的头、胸部在第 4、6、8 天均未检测到 *N. ceranae* 的存在，而中肠组织在第 4 天就可以检测到有东方蜜蜂微孢子虫的存在，且随添食时间的延长，蜜蜂的受感染程度也随之加剧; 并在西蜂实验组中观察到更多的微孢子虫, 表明东方蜜蜂微孢子虫主要感染蜜蜂的中肠组织。观察实验组蜜蜂中肠组织的外部形态变化和行为改变, 被感染蜜蜂大多数趴伏在饲养笼的底部，行动迟缓、翅膀发抖，其中肠组织膨大并失去光泽、弹性，呈灰白色或乳白色。这些特征可以对蜜蜂是否受到 *N. ceranae* 感染进行初步判定。

利用不锈钢珠结合 PBS 缓冲液的方法提取实验组和对照组蜜蜂的中肠组织总蛋白，SDS-PAGE 电泳结果显示意大利蜜蜂和中华蜜蜂受 *N. ceranae* 感染后其中肠蛋白的表达存在一定的差异性。选择了意大利蜜蜂中肠组织差异蛋白质条带其中的两条和中华蜜蜂的中肠组织差异蛋白质条带进行 LC-MS/MS 质谱鉴定分析，鉴定分别得到 35、13 种差异蛋白质。根据差异蛋白质条带的分子量大小以及覆盖度, 确定意大利蜜蜂中肠差异蛋白条带筛选出的天冬氨酸转氨酶、主要王浆蛋白 2、α 淀粉酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、2 种无脊椎连接蛋白、精氨酸激酶及 sn-甘油-3-磷酸脱氢酶共 8 种上调表达蛋白和中华蜜蜂的中肠差异蛋白条带筛选出的 4 种上调表达蛋白（精氨酸激酶、V 型质子 ATP 酶亚基 c、硫氧蛋白还原酶、泛素）、4 种下调表达蛋白(果糖二磷酸醛缩酶、磷酸甘油酸变位酶、ATP

合成酶亚基、谷胱甘肽硫转移酶）作为候选蛋白质。再筛选出 2 个意大利蜜蜂候选蛋白质，即精氨酸激酶、sn-甘油-3-磷酸脱氢酶，其主要参与磷酸甘油酯的代谢、能量代谢及抗性调节；2 个中华蜜蜂候选蛋白质，即硫氧还原蛋白还原酶、精氨酸激酶，前者是硫氧还原蛋白系统的主要成分，参与氧化应激反应；后者主要参与能量代谢以及抗性调节。通过对差异蛋白质进行了半定量和荧光定量 PCR 检测，进一步验证了筛选到的 3 种差异蛋白质均为上调表达。

精氨酸激酶是昆虫体内唯一的磷酸源激酶，类似于脊椎动物中的肌酸激酶（Laino *et al*., 2017），与昆虫的飞行活动、生长发育等方面息息相关，其时序分布和空间分布存在显著差异，在能量需求大的地方或发育阶段表达量高（魏玉红等，2019）。它能缓冲 ATP 水平，对能量代谢的调控起到非常重要的作用（魏玉红等，2019）。本实验中，意大利蜜蜂和中华蜜蜂受到 *N. ceranae* 胁迫时，精氨酸激酶表达量上调可能是为了通过增加相对酶的活力维持体内能量代谢平衡，进而能进行正常的生命活动。其它昆虫在受到胁迫时也表现出相同情况，比如：姚翠鸾等（2008）研究发现，在细角滨对虾 *Penaeus stylirostris* 感染 WSSV 病毒后，其精氨酸激酶的表达量比对照组高出 2.84 倍；中国明对虾体内也发现了类似的情况（Miranda *et al*., 2006）。候选蛋白 sn-甘油-3-磷酸脱氢酶、α 淀粉酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、天冬氨酸转氨酶同样与意大利蜜蜂的能量代谢息息相关。sn-甘油-3-磷酸脱氢酶是具有高度种属保守序列的酶，它在组织中表达量很高且通常表达量恒定。在物质代谢途中它是一种重要的脱氢酶，催化合成 3-磷酸甘油，这是一种重要的代谢物，在脂肪和碳水化合物代谢途径中起关键作用，是合成脂肪酸、胆固醇和其它有机化合物的原料，另外，GPDH 催化反应的过程中会产生 NADH 和 H+，这些物质可以用来提供能量，从而支持细胞的代谢过程它是重要（刘景等，2020）。研究表明，果蝇体内的 GPDH 具有递送能量，维持组织的 NAD^+/NADH 比例等不同功能，当果蝇完全丧失 GPDH 活性，其生存能力显著降低（鲁延军等，2010）。在酵母的抗逆性研究中也表明 GPDH 对于酵母在高渗环境中的生存有重要作用（Yan *et al*., 2008）。实验中，*N. ceranae* 感染意大利蜂后，GPDH 的 mRNA 和蛋白质的表达水平均发生了上调，进而引起细胞基础代谢发生变化。α 淀粉酶是消化和吸收食物中淀粉和某些碳水化合物的一种酶，它活性增强时有利于淀粉等物质的降解和葡萄糖的吸收（段思宇等，2021），实验中意大利蜜蜂实验组 α 淀粉酶表达量增加对增强能量供应十分必要。戊糖磷酸途径(PPP 途径)是生物体内糖代谢途径之一，该途径产生大量的 NADPH 和各种结构的糖分子，NADPH 对氨基酸、核酸、脂类等合成代谢有重要作用，很多糖分子也是细胞内主要生物分子的组成部分。6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6PGDH）是 PPP 途径非氧化阶段其中的一个关键酶，可以调节细胞内的 NADPH 和 6-磷酸葡萄糖的去路，进而维持细胞正常的的生长和代谢，它在真核生物体内均为二聚体结构，同时在不同物种中保守性很高（彭祥然等，2018）。已有研究发现植物在受某些胁迫的情况下，体内 6PGDH 表达量会显著提升，比如：高温胁迫下的黄瓜（魏跃等，2010）、Pb 胁迫下的豌豆幼苗（Devi *et al*., 2013）。天冬氨酸转氨酶是一种氨基转移酶，以磷酸吡哆醛作为辅因子，联系氨基酸和三羧酸循环。6PGDH 和天冬氨酸转氨酶都上调表达，可能都是为了调动体内物质转化，使更多的物质进行分解代谢，短时间就能提高意大利蜜蜂体内能量代谢。

在多细胞生物中，组成 hemichannel 的蛋白被称为连接蛋白（相邻细胞膜上的 hemichannel 连接形成缝隙连接），无脊椎动物的是 innexin（Inx），脊椎动物中是 connexin（Cx）和 pannexin（Px）（Beyer and Berthoud, 2018）。研究发现，革兰氏阴性菌细胞壁的脂多糖对哺乳动物白细胞中的 connexin-hemichannel 活性有很大影响，而这种成分则会降低昆虫细胞中 innexin-hemichannel 的活性；Samuels 等（2010）研究发现蚂蟥神经系统中通过 innexin-hemichannel 通道使免疫细胞向神经受损处迁移，可以推测

innexin-hemichannel 通道与昆虫免疫信号转导有关。另外，innexin 与 pannexin 是同源物，Px1-hemichanne 能介导细胞凋亡，且已研究发现草地滩夜蛾 Sf9 细胞中过量表达 inx2 和 inx3 时其细胞中出现凋亡小体（李明等，2013），这可以推测 innexin-hemichannel 通道和细胞凋亡有关。本实验 2 种 innexin 表达量有所增加，推测微孢子虫入侵时，这些基因表达量增加有利于意大利蜜蜂增强自身的免疫系统和调控被入侵细胞的凋亡。

蜂王浆主蛋白（MRJPs）是蜂王浆中的水溶性蛋白，占蜂王浆总蛋白的 46%-89%。在目前已经发现的 32 个 MRJPs 家族成员中，关于 $MRJP_1$- $MRJP_9$ 的研究比较丰富，通过比较 MRJPs 家族成员的序列，发现同源性高达 70% 左右，这说明各成员在某些功能上可能有相似的功能。生物学功能方面，MRJPs 家族在蜜蜂的生长发育和繁殖、社会行为、生理机能起着重要的作用，作为家族成员之一，$MRJP_2$ 具有前述功能，除此之外，$MRJP_2$ 还表现出促进细胞增殖、抗菌活性，如 $MRJP_2$ 可以刺激小鼠的巨噬细胞释放 TNF-α 促进肝细胞增殖。这些作用可能与蜜蜂微孢子入侵中华蜜蜂后 $MRJP_2$ 表达量上调有关。另外，MRJP2 也存在种间差异性，如中华蜜蜂 MRJP2 的 C-端序列存在明显的串联重复序列长度多态性,而这种情况在意大利蜜蜂 $MRJP_2$ 的 C-端序列中并不出现（胡熠凡，2013），也许正是两者的差异性导致了中华蜜蜂、意大利蜜蜂被感染后，$MRJP_2$ 在两种蜜蜂表达量变化不同的原因。

泛素是一种真核生物中普遍存在的小蛋白，参与泛素化修饰过程，即泛素经 E1 泛素激活酶、E2 泛素耦合酶、E3 泛素连接酶将反应物连接到底物蛋白上，泛素化修饰过程在免疫、感染、炎症等生理过程中发挥着重要作用（张勇等，2021）。中华蜜蜂受微孢子虫感染后泛素表达量增加，这可能会增强其免疫功能抵抗微孢子虫。V 型质子 ATP 酶能以水解 ATP 产生的能量实现细胞器内 pH 的调节（范明，2020），目前关于 V 型质子 ATP 酶亚基 c 的研究较少，它在被微孢子入侵后的中华蜜蜂的中肠组织中表达量升高，可能预示着 V 型质子 ATP 酶表达量升高，进而调节被入侵细胞内的 PH。

硫氧还蛋白还原酶是一种 NADPH 依赖型并包含 FAD 结构域的二聚体硒酶，并与硫氧还蛋白及 NADPH 共同构成了硫氧还蛋白系统，在机体氧化还原调节、抗氧化防御、细胞增殖及信号转导中起到重要作用。例如在氧胁迫情况下，淋巴细胞和一些正常细胞中的 TrX、TrxR 能够快速的调节、减缓氧胁迫的压力（张笑天和熊咏民，2005）。Trx 系统是调节活性氧（Reactive oxygen species，ROS）水平的主要酶系统，对于细胞的氧化还原的功能调节尤为重要（Rundlo and Arner, 2004）。Dussaubat 等（2012）等研究表明 *N. ceranae* 感染意大利蜂中肠后，其参与氧化应激反应的相关基因（如抗氧化酶）的表达量发生了上调。在我们的研究中，*N. ceranae* 感染中华蜜蜂，TrxR 的表达量发生了明显的上调表达，试验组是对照组表达量的 1.72 倍，这可能是 *N. ceranae* 感染中华蜜蜂中肠组织后，中华蜜蜂自身的氧化应激反应增强，以此来抵抗 *N. ceranae* 的入侵。

果糖二磷酸醛缩酶、磷酸甘油酸变位酶（PGAM）是糖酵解和糖异生途径中一种重要的酶，与生物体内物质代谢、能量代谢有密切关系。Kondoh 等（2005）发现增加小鼠成纤维细胞中 PGAM 的活性有利于延长细胞的寿命，Okomo-Adhiambo 等（2006）证实在弓形虫感染猪肾上皮细胞时，弓形虫体内 PGAM2 含量升高；ATP 合成酶是寡聚酶，由各亚基组成，ATP 合成酶催化氧化磷酸化的末端的反应，在有质子动力时，极易使 ATP 合酶驱动 ADP 和 Pi 合成 ATP，电化学势力不足时水解 ATP；谷胱甘肽硫转移酶是一组存在各种生物体内的同工酶，以膜结合和胞液两种形式存在，与生物体内解毒系统密切相关。它能减少谷胱甘肽的酸解离常数，催化其与有害物质的亲电基团结合，使有害物质易于穿过细胞膜，达到解毒的目的（冯雪等，2012）。Yin 等（2021）研究表明谷胱甘肽 *S*-转移酶(PxGST2L)可能参与小菜蛾 *Plutella xylostella*(L.)中氯虫苯

甲酰胺的解毒代谢。从这些方面来看果糖二磷酸醛缩酶、磷酸甘油酸变位酶、ATP 合成酶亚基、谷胱甘肽硫转移酶与中华蜜蜂体内的能量代谢，解毒系统等有关，当微孢子虫入侵后，中华蜜蜂体内能量代谢、有毒物质转运应该是上升趋势，但在本实验中相关基因均是下调表达，原因还需进一步探究。

综上所述，推测在 *N. ceranae* 感染蜜蜂初期，蜜蜂为了应对东方蜜蜂微孢子虫的入侵，通过调节其中肠组织中某些蛋白的表达量，从而调节细胞内的基本代谢、能量代谢、免疫应答反应及氧化应激反应，最终维持蜜蜂自身中肠组织的代谢平衡。本研究为深入探讨蜜蜂中肠对东方蜜蜂微孢子虫的免疫与代谢应答方式提供丰富的数据基础，对于解析蜜蜂抵御微孢子虫侵染的分子机制具有重要的意义，也为深入了解 *N. ceranae* 感染对蜜蜂中肠组织蛋白质的影响提供参考。

参考文献 (References)

Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Vigues B, Belzunces LP, Delbac F, Blot N, 2012. Parasite-insecticide interactions: A case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honey bee. *Scitific Reports*, 2(1): 1–7.

Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N, 2014. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS ONE*, 9(3): e91686

Beyer EC, Berthoud VM, 2018. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860(1): 5–8.

Candas M, Loseva O, Oppert B, Kosaraju P, Bulla LA, 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: Alt erat ion in the indianmeal moth larval gut proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2(1): 19–28.

Chen YP, Huang ZY, 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifer*a in the USA and Asia. *Apidologie*, 41(3): 364–374.

Devi R, Munjral N, Gupta AK, Kaur N, 2013. Effect of exogenous lead on growth and carbon metabolism of pea (*Pisum sativum* L) seedlings. *Physiology and Molecular Biology of Plants*: *An International Journal of Functional Plant Biology*, 19(1): 81–89.

Ding GL, Shi W, 2008. Honeybee microsporidia. *Apiculture of China*, 59(9): 47–48. [丁桂玲, 石巍, 2008. 蜜蜂微孢子虫. 中国蜂业 (国外养蜂科技), 59(9): 47–48.]

Du X, Zeng ZJ, Wu J, 2021. Apiculture status, development trend and suggestions in 2020. *Chinese Journal of Animal Science*, 57(3): 252–257. [杜夏, 曾志将, 吴杰, 2021. 2020 年蜂产业现状、发展趋势与建议. 中国畜牧杂志, 57(3): 252–257.]

Duan SY, Chen G, Gao QQ, Guo YH, Duan KZ, Zhang H, Yang SC, Zhao Y, 2021. Stability and α-amylase inhibition of *Hemsleya chinensis* polyphenols. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 49(9): 167–171. [段思宇, 陈庚, 高青青, 郭兆宽, 段柯兆, 张辉, 杨生超, 赵艳, 2021. 雪胆多酚的稳定性及对 α-淀粉酶的抑制作用. 江苏农业科学, 49(9): 167–171.]

Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(5): e37017.

Fan M, 2020. Gene analysis and function preliminary study of V-ATPase H subunit of Penicillium digitatum. Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [范明, 2020. 指状青霉 V 型 ATP 酶 H 亚基的基因分析及其功能初探. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]

Fantham HB, Porter A,1914. The morphology, biology and economic importance of *Nosema bombi*, N. sp., parasitic in various humble bees (*Bombus* spp.). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 8(3): 623–638.

Feng X, Wang B, Sun YX, 2012. Research progress of glutathione sulfur transferases. *Biology Teaching*, 37(6): 5–6. [冯雪, 王彬, 孙艳香, 2012. 谷胱甘肽硫转移酶的研究进展. 生物学教学, 37(6): 5–6.]

Fries I, Feng F, Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ, 1996. *Nosema ceranae* n. sp.(Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32(3): 356–365.

Games PD, Alves SN, Katz BB, Tomich JM, Serrão JE , 2016. Differential protein expression in the midgut of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes induced by the insecticide temephos. *Medical and Veterinary Entomology*, 30(3): 253–263.

Gao K, Deng XY, Qiu ZY, Qin GX, Guo XJ, 2013. Differential protein analysis of *Bombyx mori* Linnaeus midgut tissue after infection with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). *Agricultural Sciences in China*, 46(13): 2796–2807. [高坤, 邓祥元, 裘智勇, 覃光星, 郭锡杰, 2013. 家蚕感染质型多角体病毒 (BmCPV) 后中肠组织差异蛋白质分析. 中国农业科学, 46(13): 2796–2807.]

Geng SH, 2020. Molecular mechanism of *Nosema ceranae* infecting *Apis mellifera*. Master dissertation. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [耿四海, 2020. 东方蜜蜂微孢子虫侵染意大利蜜蜂的分子机制初探. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.]

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, 2015. Bee declines

driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957.

Graystock P, Ng WH, Parks K, Tripodi AD, Muñiz PA, Fersch AA, Myers CR, McFrederick QS, McArt SH, 2020. Dominant bee species and floral abundance drive parasite temporal dynamics in plant-pollinator communities. *Nature Ecology & Evolution*, 4(10): 1358–1367.

Guo R, Dao C, Xiong CL, Zhen YZ, Fu ZM, Chen DH, 2018. Analysis of the highly expressed genes in the midgut of *Apis mellifera ligustica* worker under the stress of *Nocema ceranae*. *Journal of Environmental Entomology*, 40(5): 1106–1112. [郭睿, 刀晨, 熊翠玲, 郑燕珍, 付中民, 耿四海, 陈大福, 2018. 意大利蜜蜂工蜂中肠响应 *Nosema ceranae* 胁迫的高表达基因分析. 环境昆虫学报, 40(5): 1106–1112.]

Han X, Tan LQ, Wang ZL, Yan WY, Zeng ZJ, Wu XB, 2014. Effects of vitamin C on larval development and worker viability of *Apis cerana cerana* Fabricius. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 26(5): 1265–1271. [韩旭, 田柳青,王子龙, 颜伟玉, 曾志将, 吴小波, 2014. 维生素C对中华蜜蜂幼虫发育及工蜂生存能力的影响. 动物营养学报, 26(5): 1265–1271.]

He C, 2014. Identification of molecular genetic diversity and 30 kD-size protein by LC-MS/MS in *Nosema ceranae* from Chongqing area. Master dissertation. Chongqing: Chongqing Normal University . [何超, 2014. 重庆地区东方蜜蜂微孢子虫的遗传多样性鉴定及30 kD蛋白质的LC-MS/MS分析. 硕士学位论文. 重庆: 重庆师范大学.]

He YL, 2012. Study on histopathology of pebrine and preliminary construction of digital silkworm. Master dissertation. Chognqing: Southwest University. [贺元莉, 2012. 家蚕微粒子病组织病理学研究及数字化家蚕构建初探. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学.]

Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A, 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3): 211–217.

Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botías C, Meana A, 2009. First detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in African honey bees (*Apis mellifera* intermissa). *Apicult. Res*, 48: 217–219.

Higes M, Martin-Hernandez R, Meana A, 2010. *Nosema ceranae* in Europe, an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41 (3): 375–392.

Houdelet C, Sinpoo C, Chantaphanwattana T, 2020. Proteomics of anatomical sections of the gut of Nosema-infected western honeybee (*Apis mellifera*) reveals different early responses to *Nosema* spp. isolates. *Journal of Proteome Research*, 20(1): 804–817.

Hu YF, 2013. Structural study of the royal jelly proteins MRJP1 and MRJP2. Master dissertation. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [胡熠凡, 2013. 蜂王浆蛋白 MRJP1 和 MRJP2 的结构研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院.]

Kondoh H, Lleonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Carnero A, Beach D, 2005. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Research*, 65(1): 177–185.

Laino A, Lopez-Zavala AA, Garcia-Orozco KD, Carrasco-Miranda JS, Santana M, Stojanoff V, Garcia CF, 2017. Biochemical and structural characterization of a novel arginine kinase from the spider *Polybetes pythagoricus*. *PeerJ*, 5(2): e3787.

Li JH, Liu Z, Cheng DH, Liang Q, 2012. Transcriptome expression of MRJ9 in honeybee. *Acta Entomologica Sinica*, 49(5): 1147–1154. [李江红, 刘振, 陈大福, 梁勤, 2012. 蜜蜂体内王浆主蛋白基因 mrj9 的转录组表达研究. 昆虫学报, 49(5): 1147–1154.]

Li M, Zhang Y, Pang KJ, 2013. The research progress in the functions of innexin. *Journal of Environmental Entomology*, 35(2): 226–231. [李明, 杨洋, 张艳, 庞尊玉, 罗开珺, 2013. Innexin 通道蛋白功能研究进展. 环境昆虫学报, 35(2): 226–231.]

Liu C, Ding J, Ruan CJ, Du W, Zhang WC, Han P, 2020. Gene Expression and bioinformatics analysis of *HrGPD1* in sea buchthorn (*Hippophae* L.). *Molecular Plant Breeding*, 18(2): 409–415. [刘景, 丁健, 阮成江, 杜维, 张莞晨, 韩平, 2020. 沙棘 3-磷酸甘油脱氢酶基因生物信息学及表达分析. 分子植物育种, 18(2): 409–415.]

Liu JF, Liu TT, Wang H, Wang ZL, Yan WY, Zeng ZJ, Wu XB, 2012. Cloning, sequence analysis and expression characteristics of Cu, Zn-Superoxide dismutase from *Apis cerana cerana*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 24(8): 1512–1519. [刘俊峰, 刘亭亭, 王欢, 王子龙, 颜伟玉, 曾志将, 吴小波, 2012. 中华蜜蜂铜锌超氧化物歧化酶克隆、序列分析及表达特性. 动物营养学报, 24(8): 1512–1519.]

Lu YJ, Ji MM, Niu YS, Zhang SX, SiMa YH, Xu SQ, 2010. Structure characteristics and expression profiles of *BmGpd*, a glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 53(3):269–278. [鲁延军, 季明明, 牛艳山, 张升祥, 司马杨虎, 徐世清, 2010. 家蚕 3-磷酸甘油脱氢酶基因 *BmGpd* 的结构特征与表达谱分析. 昆虫学报, 53(3): 269–278.]

Martín-Hernández R, Meana A, García-Palencia P, Marín P, Botías C, Garrido-Bailón E, Higes M, 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8): 2554–2557.

Miranda MR, Canepa GE, Bouvier LA, Pereira CA, 2006. Trypanosoma cruzi: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp. Parasitol*, 114(4): 341–344.

Okomo-Adhiambo M, Beattie C, Rink A, 2006. cDNA microarray analysis of host-pathogen interactions in a porcine in vitro model for *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity*, 74(7): 4254–4265.

OuYang HY, Liu YM, Liu CZ, 2002. Advances in studies on nosemosis of bees. *Apicultural Science and Technology*, 2002(6): 17–19. [欧阳红燕, 刘玉梅, 刘彩珍, 2002. 蜜蜂微孢子虫病研究进展. 养蜂科技, 2002 (6): 17–19.]

Peng XR, Qi JR, Shang SR, Zhang ZL, Chen HL, Zhang YL, Shen ZY, 2018. Cloning and expression characteristic analysis of *Nb6PGDH* gene of *Nosema bombycis*. *Science of Sericulture*, 44(5): 698–704.[彭祥然, 齐静茹, 尚瑞沙, 张志林, 陈红丽, 张轶岭, 沈中元, 2018. 家蚕微孢子虫 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 Nb6PGDH 的克隆及表达特征分析. 蚕业科学, 44(5): 698–704.]

Qing HR, Shao Y, Wu J, Li JL, 2012. Detection and identification of *Nosema ceranae* by dual fluorescent staining with calcofluor white M2R and Sytox green. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1392–1396. [秦浩然, 绍禹, 吴杰, 李继莲, 2012. Calcofluor White M2R 与 Sytox green 双重染色法鉴别蜜蜂微孢子虫. 应用昆虫学报, 49(5): 1392–1396.]

Rundlo FAK, Arner ES, 2004. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxid Redox Signal*, 6(1): 41–52.

Samuels, SE, Lipitz JB, Dahl G, Muller KJ, 2010. Neuroglial ATP release through innexin channels controls microglial cell movement to a nerve injury. *Journal of General Physiology*, 136(4): 425–442.

Vidau C, Panek J, Texier CG, Biron DP, Belzunces L, Gall ML, Broussard C, Delbac F, Alaoui HE, 2014. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae* -infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 121: 89–96.

Wei Y, Chen XY, Li ZL, Wang YP, Shi JP, Wu ZM, Chen JF, 2010. Cloning of 6-phosphogluconate dehydrogenase gene cDNA fragmen from cucumber and expression analysis. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 33(1): 37–42. [魏跃, 陈啸寅, 李振陆, 王永平, 史建磊, 吴志明, 陈劲枫, 2010. 黄瓜 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 cDNA 片段的克隆及表达分析. 南京农业大学学报, 33(1): 37–42.]

Wei YH, Yuan WL, Zhang XR, 2019. A review of arginine kinases(AK) in insects. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2019(5): 69–74. [魏玉红, 袁伟宁, 张新瑞, 2019. 昆虫精氨酸激酶研究综述. 甘肃农业科技, 2019(5): 69–74.]

Wu ZH, Zeng ZJ, Huang Q, 2021. Epidemiological analysis of *Nosema ceranae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 61(9): 2628–2642. [吴志豪, 曾志将, 黄强, 2021, 东方蜜蜂微孢子虫传染病学分析. 微生物学报, 61(9): 2628–2642.]

Xiong CL, Geng SH, Zhou DD, Shi CY, Guo YL, Chen DF, Zheng YZ, Xu GJ, Zhang X, Guo R, 2019. Analysis of highly expressed genes in *Nosema ceranae* infecting themidguts of *Apis mellifera ligustica* worker and purified fungal spores.*Journal of Shanghai Jiaotong University* (*Agricultural Science Edition*), 37(2): 6–13. [熊翠玲, 耿四海, 周丁丁, 石彩云, 郭意龙, 陈大福, 郑燕珍, 徐国钧, 张曦, 郭睿, 2019. 感染意大利蜜蜂工蜂的东方蜜蜂微孢子虫及其纯化孢子的高表达基因分析. 上海交通大学学报(农业科学版), 37(2): 6–13.]

Yan H, Jia LH, Lin YP, Jiang N, 2008. Glycerol accumulation in the dimorphic yeast *Saccharomycopsis fibuligera*: Cloning of two glycerol 3-phosphate dehydrogenase genes, one of which is markedly induced by osmotic stress. *Yeast*, 25(9): 609–621.

Yao CL, Wang ZY, Xiang JH, 2008. Structure and function of arginine kinase in crustaceans. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 24(3): 203–208. [姚翠鸾, 王志勇, 相建海, 2018. 甲壳动物精氨酸激酶的结构与功能. 中国生物化学与分子生物学报, 24(3): 203–208.]

Yin F, Lin QS, Wang XX, Li ZY, Feng X, Shabbir MZ , 2021. The glutathione S-transferase (PxGST2L) may contribute to the detoxification metabolism of chlorantraniliprole in *Plutella xylostella*(L). *Ecotoxicology* (*London*, *England*), 30(6): 1007–1016.

Yue JY, Tang XD, Xu L, Yan W, Li QL, Xiao SY, Fu XL, Wang W, Li N, Shen ZY, 2015. Early responses of silkworm midgut to microsporidium infection-A digital gene expression analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 6–14.

Zander E, 1909. Tierische parasiten als krankenheitserreger bei der biene. *Münchener Bienenzeitung*, 31: 196–204.

Zhang SZ, Xu JS, Ma ZG, Zhou ZY, 2015. Establishment and application of a method for extracting total protein from the mid-gut of *Apis mellifera*. *Journal of Chongqing Normal University*, 32(7): 50–52. [张素贞, 许金山, 马振刚, 周泽扬, 2105. 一种适于意大利蜜蜂中肠总蛋白提取方法的建立和应用. 重庆师范大学学报(动物科学), 32(7): 50–52.]

Zhang XT, Xiong YM, 2005. The progress in studies of thioredoxin reductase. *Foreign Medical Sciences* (*Section of Medgeography*), 26(4): 148–151. [张笑天, 熊咏民, 2005. 硫氧还蛋白还原酶研究进展. 国外医学医学地理分册, 26(4): 148–151.]

Zhang Y, Zhang LQ, Liu CH, 2021. Research progress of regulatory roles of linear ubiquitination in immune system. *Cellular & Molecular Immunology*, 37(7): 769–779. [张勇, 张令强, 刘翠华, 2021. 线性泛素化修饰对免疫系统的调控作用研究进展. 中国免疫学杂志, 37(7): 769–779.]