

过表达 ace-miR-14-y 对中华蜜蜂工蜂幼虫靶基因表达及个体和肠道重量的影响*

徐国钧^{1**} 刘小玉^{1**} 刘治滩¹ 任亚萍¹ 康 婧¹ 宓诗雨¹
胡艳雯¹ 刘彩珍² 陈大福^{1,3,4} 郭 睿^{1,3,4***}

(1. 福建农林大学蜂学与生物医药学院, 福州 350002; 2. 福建农业职业技术学院, 福州 350002;

3. 天然生物毒素国家地方联合工程实验室, 福州 350002; 4. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002)

摘 要 【目的】探究过表达 ace-miR-14-y 对中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂幼虫靶基因表达及个体和肠道重量的影响, 进而揭示 ace-miR-14-y 的潜在调控作用。【方法】使用茎环 RT-PCR 和 Sanger 测序验证 ace-miR-14-y 的表达和序列。采用相关软件预测和分析 ace-miR-14-y 的靶基因。通过饲喂模拟物 (Mimic) 进行幼虫肠道中 ace-miR-14-y 的过表达。利用 RT-qPCR 检测 ace-miR-14-y 的过表达效果及过表达 ace-miR-14-y 后靶基因的相对表达量。使用电子天平对幼虫个体和肠道进行称重。【结果】ace-miR-14-y 在工蜂幼虫肠道中存在和表达; ace-miR-14-y 共靶向 265 个基因, 涉及 33 个 GO 条目与 180 条 KEGG 通路; mimic-miR-14 组 ace-miR-14-y 的表达量显著高于 mimic-NC 组 ($P<0.05$); 过表达 ace-miR-14-y 后, 靶基因 *Wg* 和 *AP-1* 的表达量均显著下调 ($P<0.05$), 幼虫个体和肠道的重量均极显著上升 ($P<0.01$)。【结论】过表达 ace-miR-14-y 显著影响中华蜜蜂工蜂幼虫肠道中靶基因 *Wg* 和 *AP-1* 的表达及幼虫个体和肠道的重量, ace-miR-14-y 通过调节 *Wg* 和 *AP-1* 表达发挥潜在的调控作用。

关键词 中华蜜蜂; 幼虫; ace-miR-14-y; 过表达; 靶基因

Overexpression of ace-miR-14-y affects target gene and gut weight of *Apis cerana cerana* larvae

XU Guo-Jun^{1**} LIU Xiao-Yu^{1**} LIU Zhi-Tan¹ REN Ya-Ping¹ KANG Jing¹ MI Shi-Yu¹
HU Yan-Wen¹ LIU Cai-Zhen² CHEN Da-Fu^{1,3,4} GUO Rui^{1,3,4***}

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

2. Fujian Vocational College of Agriculture, Fuzhou 350002, China;

3. National & Local United Engineering Laboratory of Natural Biotxin, Fuzhou 350002, China;

4. Apitherapy Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract 【Aim】The objective of this study is to investigate the effect of ace-miR-14-y overexpression on expression of target genes in the *Apis cerana cerana* worker larvae as well as weights of individual and gut. 【Methods】Stem-loop RT-PCR and Sanger sequencing were utilized to confirm the expression and sequence of ace-miR-14-y. Relative software were used to predict and analyze the target genes of ace-miR-14-y. Overexpression of ace-miR-14-y in the larval gut was performed by feeding mimic, followed by examination of the effect of overexpression and the relative expression level of target genes after overexpression. Electronic balance was employed to weigh the larval individual and gut. 【Results】The results demonstrated that ace-miR-14-y authentically existed and expressed in the *A. cerana cerana* worker larval gut. ace-miR-14-y targeted a total

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金面上项目 (32372943, 32172792); 国家现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-44-KXJ7); 福建省自然科学基金面上项目 (2022J01133); 宁夏回族自治区重点研发项目 (2022BBF02037); 福建农林大学科技创新专项基金项目 (KFb22060XA)

**共同第一作者 Co-first authors, E-mail: xuguojun@fafu.edu.cn; liuxiaoyu2000@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-11-08; 接受日期 Accepted: 2024-03-13

of 265 genes, involving 33 GO terms and 180 KEGG pathways. The expression level of ace-miR-14-y in the mimic-miR-14 group was significantly higher than that in the mimic-NC group ($P < 0.05$). After overexpression of ace-miR-14-y, the expression level of target genes *Wg* and *AP-1* were both significantly downregulated ($P < 0.05$) and the weights of larval individual and gut were increased with extreme significance ($P < 0.01$). **[Conclusion]** The overexpression of ace-miR-14-y significantly affects the target genes *Wg* and *AP-1*'s expression in *Apis cerana cerana* worker larval gut as well as the weights of larval individual and gut, ace-miR-14-y plays a potential regulatory part through the regulation of expression of *Wg* and *AP-1*.

Key words *Apis cerana cerana*; larva; ace-miR-14-y; overexpression; target gene

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约 22 nt 的小非编码 RNA (Non-coding RNA, ncRNA), 可在转录后水平调控基因表达, 进而影响动物、植物和原生动物的生长和发育等诸多生物学过程 (Fabian *et al.*, 2010)。首个 miRNA 在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 中被发现, 并被证实对于维持幼虫的正常发育不可或缺 (Lee *et al.*, 1993)。随着高通量测序和生物信息学的进步, 大量的 miRNA 陆续在多种动植物和微生物中被鉴定到, 包括小鼠 *Mus musculus*、烟草 *Nicotiana tabacum* L、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* (Wu *et al.*, 2017; Ban *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2023)。较多的研究表明 miRNA 参与调节昆虫的生长、发育、代谢、免疫及细胞生命活动 (Kim *et al.*, 2009; Huntzinger and Izaurralde, 2011)。相关研究表明, miRNA 在西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的记忆形成、级型分化和蜂王繁殖等方面具有重要的调控作用, 例如 Michely 等 (2017) 通过使用 miRNA 抑制剂证实了 miR-12 和 miR-124 在西方蜜蜂工蜂长期和瞬时记忆早期阶段的形成中共同发挥作用; Freitas 等 (2017) 发现 miR-34-5p 在西方蜜蜂的早期发育过程中靶向体节分化及结构基因, 从而影响其体节分化。

miR-14 已被证实参与调节蜜蜂和家蚕等昆虫的激素合成及变态发育过程。在蜜蜂的卵巢发育和级型分化等过程中, miR-14 起到关键调节作用 (Ashby *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018)。在果蝇 *Drosophila* 中, miR-14 可以靶向调节基因 *EcR* 的表达 (Varghese and Cohen, 2007)。Chen 和 Fu (2021) 通过过表达和敲低 miR-14 发现其靶向调控 *EcR* 表达进而影响蜂王的产卵量。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (简称中蜂) 是

我国特有的东方蜜蜂 *A. cerana* 亚种, 广泛应用于养蜂生产, 不仅能提供丰富的优质蜂产品, 还可为众多农作物和野生植物授粉, 因而具有重要的经济、生态和研究价值 (曾志将, 2017)。本团队前期通过 Small RNA-seq (sRNA-seq) 在中蜂工蜂幼虫肠道中鉴定到 ace-miR-14-y 等 435 个 miRNA (冯睿蓉等, 2022)。对于包括蜜蜂在内的昆虫, 肠道是消化食物、吸收营养和抵御病原的重要器官。目前, miR-14 是否参与以及如何调控蜜蜂肠道发育仍不清楚。本研究对 ace-miR-14-y 进行分子验证, 预测和分析 ace-miR-14-y 的靶基因, 并通过饲喂模拟物 (Mimic) 过表达中蜂工蜂幼虫肠道中的 ace-miR-14-y, 进而检测关键靶基因的相对表达量、幼虫个体及肠道的重量, 旨在揭示揭示 ace-miR-14-y 在工蜂幼虫肠道中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

中蜂工蜂幼虫取自福建农林大学蜂学与生物医药学院蜜蜂保护实验室的饲养蜂群。

1.2 Stem-loop RT-PCR 与 Sanger 测序

根据 ace-miR-14-y 的核苷酸序列 (5'-UCAGUCUUUUUCUCUCUCCUAU-3'), 设计并合成茎环引物和上下游引物 (表 1)。参照张凯遥等 (2022) 的方法, 提取中蜂工蜂 5 日龄幼虫肠道样品的总 RNA, 经反转录得到 cDNA 模板, 再进行 PCR 扩增 (翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司, 中国), 产物经的琼脂糖凝胶 (1.8%) 电泳检测。按照郭意龙等 (2022) 的方法进行片段回收与分子克隆, 送菌液至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 Sanger 测序。

表 1 模拟物及引物序列
Table 1 Sequences of mimics and primers

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
mimic-NC-sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	合成 mimic-NC
mimic-NC-antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT	Synthesis of mimic-NC
mimic-miR-14-y-sense	UCAGUCUUUUUCUCUCCUAU	合成 mimic
mimic-miR-14-y-antisense	AGGAGAGAGAAAAAGACUGAUU	Synthesis of mimic
ace-miR-14-y-LOOP	CTCAACTGGTGTCTGTCGTCGCAATTCAGTTGAGATAGGAGA	合成茎环 Synthetic stem-loop
ace-miR-14-y-F	ACACTCCAGCTGGGTCAGTCTTTTCTC	RT-qPCR
UniR	CTCAACTGGTGTCTGGA	RT-qPCR
AcU6-F	CCAGGAGATGAAGTGGATACTC	RT-qPCR
AcU6-R	CTTGCTTGAAGTCTGCTT	
actin-F	TTCCGCTATTTACTCCG	RT-qPCR
actin-R	ATACTTTGGCTACGCTTG	
CK II -F	GTGAATCCCAACCTAT	RT-qPCR
CK II -R	AATCCTGTTCCAAAAT	
AP-1-F	TTCACCTCCGATGTCT	RT-qPCR
AP-1-R	TTTATCTTCCAGCCTG	
APC-F	AAAATGCCATCCCAGA	RT-qPCR
APC-R	GGAGCAGAAGACCAGG	
Wg-F	TTTTTGCCAATGTCTCCA	RT-qPCR
Wg-R	CTGCGTTGCTTTCTCCTC	

1.3 中蜂工蜂幼虫肠道样品制备

根据 ace-miR-14-y 的核苷酸序列,设计并合成 ace-miR-14-y 的 Mimic (mimic-miR-14) 及无义 Mimic(mimic-NC)(表 1)。按照吴鹰等(2023)报道的配方,分别配制含 mimic-miR-14 (mimic-NC) 的饲料,终浓度均为 20 pmol/g。参照蔡宗兵等(2022)的方法,将中蜂蜂群巢脾上的 2 日龄幼虫移至无菌的 48 孔培养板孔内,在 (35.0±0.5) °C 和相对湿度 90% 的恒温恒湿箱(上海精科实业有限公司,中国)中饲养 24 h。处理组 3 日龄幼虫饲喂 50 μL 含 mimic-miR-14 的饲料(终浓度为 50 μg/头),对照组 3 日龄幼虫饲喂 50 μL 含 mimic-NC 的饲料(终浓度为 50 μg/头)。每 24 h 更换一次新鲜饲料,连续饲喂幼虫至 5 日龄。取样时,每个无菌的 RNA-Free 离心管中放入 3 头幼虫的肠道,并设置 3 次生物学重复。

1.4 ace-miR-14-y 的过表达效果检测

参照张凯遥等(2022)的方法,分别提取

mimic-miR-14 组和 mimic-NC 组 5 日龄幼虫肠道样品中的总 RNA,并将其均分为 2 份,其中, ace-miR-14-y 的 qPCR 模板 cDNA 利用 Stem-loop 引物对 RNA 进行反转录; ace-miR-14-y 的靶基因、靶基因内参 *actin* 基因(GeneBank 登录号: LOC107999330)及 ace-miR-14-y 内参 *U6* 基因(GeneBank 登录号: LOC107994478)的 qPCR 模板 cDNA 利用 Oligo DT 引物和随机引物进行反转录。在全自动 PCR 分析系统(西安天隆科技有限公司,中国)上进行 ace-miR-14-y 的 qPCR 反应,反应程序和体系参照蔡宗兵等(2022)。ace-miR-14-y 相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的计算方法。数据分析和绘图以及显著性分析(ns: $P>0.05$, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$)分别利用 GraphPad Prism 8 软件以及 Student's *t* 检验进行。各个反应均设置 3 次技术重复。

1.5 ace-miR-14-y 的靶向预测与分析

基于前期获得的中蜂工蜂幼虫肠道转录组数据(冯睿蓉等,2022),并参照吴鹰等(2023)

的方法预测得到 ace-miR-14-y 的高可信度靶基因集合及其相应的功能和通路注释。

1.6 靶基因的 RT-qPCR 检测

根据 KEGG, GO 和 Nr 数据库的注释结果, 并参考国内外相关报道(Gonsalves and DasGupta, 2008; Yoon *et al.*, 2013), 筛选出与幼虫生长发育相关的 2 个关键靶基因进行 RT-qPCR 检测, 包括转录因子 AP-1 (Transcription factor AP-1, AP-1) 基因 AP-1 和无翼蛋白 (Protein wingless, Wg) 基因 Wg。使用 Primer primer 6 软件设计上述靶基因及内参基因 *actin* 的 qPCR 引物(表 1)。以 1.4 节获得的 mimic-miR-14 组和 mimic-NC 组 5 日龄幼虫肠道 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 检测。反应条件和体系及数据统计方法同 1.4 节。

1.7 过表达 ace-miR-14-y 后中蜂工蜂幼虫个体和肠道重量检测

参照 Borsuk 等 (2017) 的方法, 分别取 mimic-miR-14-组和 mimic-NC 组的 5 日龄幼虫, 使用 PBS 缓冲液反复漂洗幼虫表面, 并使用干净滤纸小心吸干体表残留液体。随后对幼虫进行称重, 计算各组幼虫的平均体重。在超净台中分别剖取 mimic-miR-14 组和 mimic-NC 组的 5 日龄幼虫肠道, 去除肠道上粘附的脂肪体后, 使用 FA2004 超精细电子天平进行称重。试验均设置 3 次生物学重复, 每个重复含 1 头幼虫。利用 SPSS 26.0 软件, 通过 Student's *t* 检验对幼虫个体和肠道重量数据进行组间差异显著性分析 (ns: $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$), 并采用 Graphpad Prism 8 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 ace-miR-14-y 的分子验证

通过 PCR 成功扩增出了单一且符合预期大小 (60 bp) 的目的片段 (图 1: A), 说明 ace-miR-14-y 在中蜂工蜂幼虫肠道中表达。与基于转录组数据预测的 ace-miR-14-y 核苷酸序列相比, 本研究进行了 3 次 Sanger 测序, 结果均显示在同一位置 (第 15 至 20 个碱基) 发生相同突变 (图 1: B), 说明 ace-miR-14-y 的真实序列为: 5'-UCAGUCUUUUCUCAACUGAAU-3'。

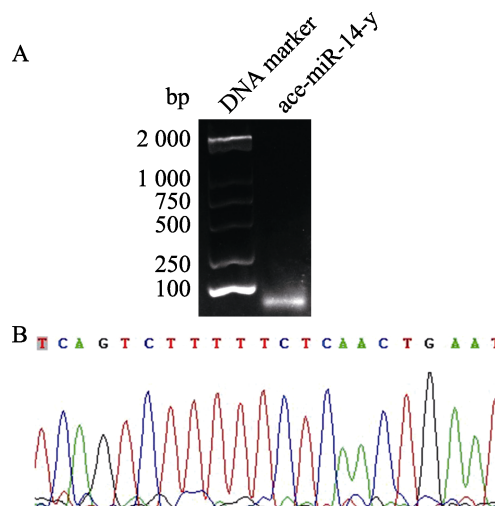


图 1 中华蜜蜂工蜂幼虫肠道中 ace-miR-14-y 的分子验证

Fig. 1 Molecular validation of ace-miR-14-y in the gut of *Apis cerana cerana* worker larva

A. PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳;

B. 目的片段的 Sanger 测序峰图。

A. Agarose gel electrophoresis for the amplified product from PCR; B. Peak diagram of Sanger sequencing of the target segment.

2.2 中蜂工蜂幼虫肠道中 ace-miR-14-y 的过表达效果

RT-qPCR 结果显示, mimic-miR-14 组 5 日龄幼虫肠道中 ace-miR-14-y 的表达水平, 相较于 mimic-NC 组极显著上调 ($P < 0.01$) (图 2)。

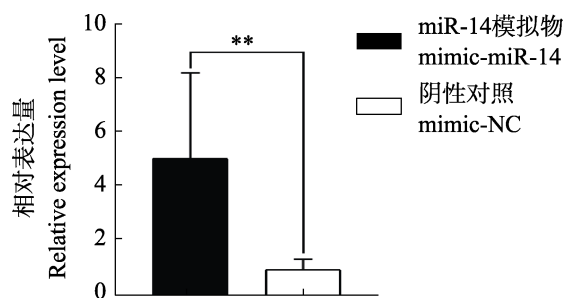


图 2 饲喂模拟物后中华蜜蜂工蜂 5 日龄幼虫肠道中 ace-miR-14-y 的相对表达量

Fig. 2 The relative expression level of ace-miR-14-y in the gut of *Apis cerana cerana* worker 5-day-old larvae after mimic-feeding

星号代表 Student's *t* 检验差异显著 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。图 4 和图 5 同。

Asterisk indicates significant difference by Student's *t*-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

The same for Fig. 4 and Fig. 5.

个靶基因。如图 3 (A) 所示, 这些靶基因可注释到 7 个分子功能、16 个生物学进程和 10 个细

ace-miR-14-y 共靶向 559 条 mRNA, 对应 265

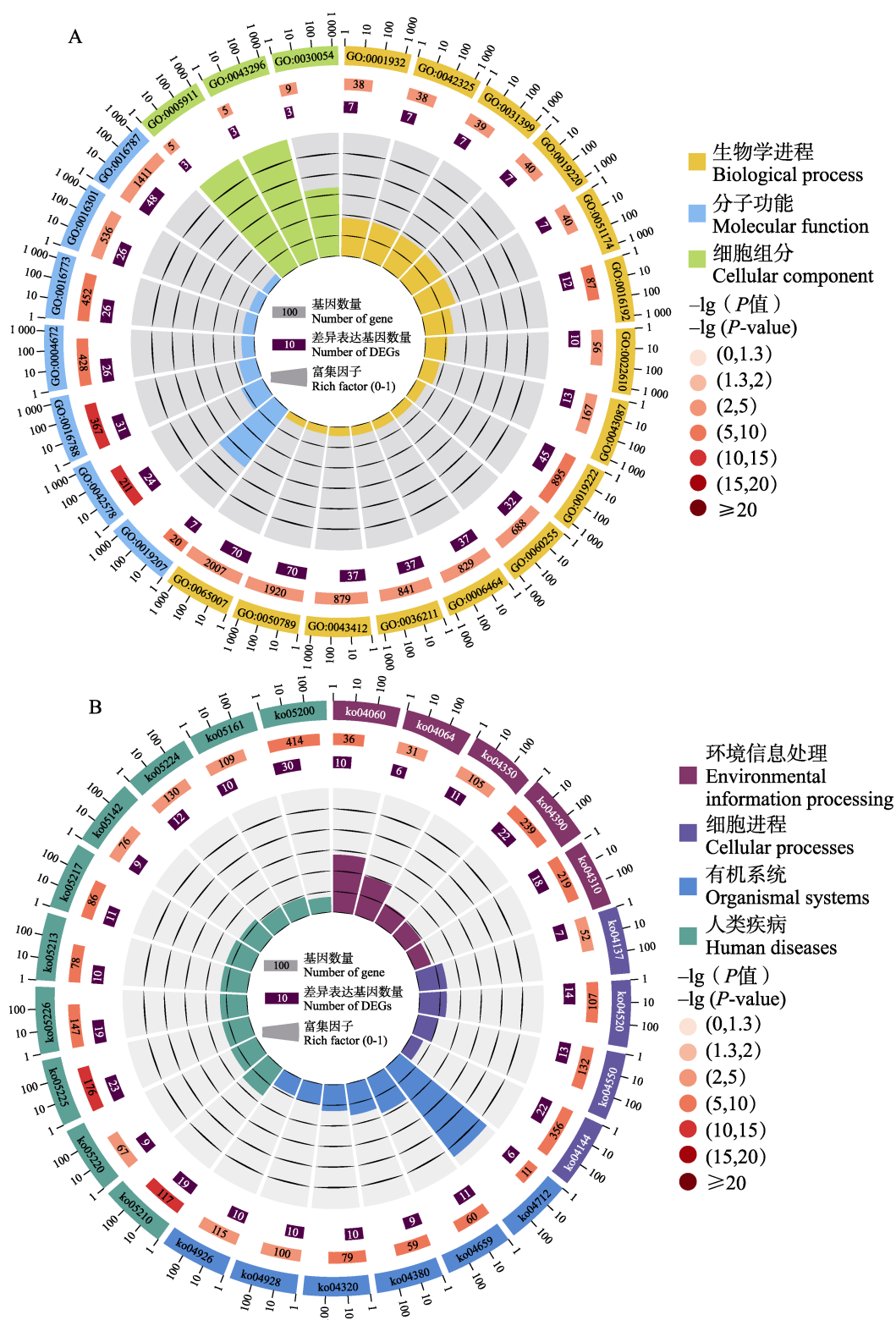


图3 ace-miR-14-y 的靶基因注释的 GO 条目 (A) 和 KEGG 通路 (B) 圈图

Fig. 3 Circle diagram of the GO terms (A) and KEGG pathways (B) annotated for the target genes of ace-miR-14-y

胞组相关的 33 个条目, 包括催化活性、生物学调节和细胞组件等。此外, 上述靶基因还可注释到新陈代谢和环境信息处理等相关的 180 条 KEGG 通路, 包括代谢途径、Hippo 信号通路、胞吞作用及 Th17 细胞分化等 (图 3: B)。

2.4 过表达 ace-miR-14-y 显著影响 5 日龄幼虫肠道靶基因 *Wg* 和 *AP-1* 表达水平

RT-qPCR 检测结果显示与 mimic-NC 组相比, mimic-miR-14 组 5 日龄幼虫肠道中 *Wg* 和 *AP-1* 的表达水平均显著下调 ($P<0.05$) (图 4: A-D)。

2.5 过表达 ace-miR-14-y 显著影响 5 日龄幼虫个体及肠道的重量

mimic-miR-14 组 5 日龄幼虫个体的平均重量为 $(0.074\ 0\pm0.019\ 7)\text{g}$, 极显著高于 ($P<0.001$) mimic-NC 组 5 日龄幼虫个体的平均重量 $[(0.020\ 3\pm0.002\ 1)\text{g}]$ (图 5: A)。如图 5 (B) 所示, mimic-miR-14 组 5 日龄幼虫肠道的平均重量为 $(0.023\ 7\pm0.003\ 2)\text{g}$, 极显著高于 ($P<0.001$) mimic-NC 组 5 日龄幼虫肠道的平均重量 $[(0.005\ 3\pm0.001\ 0)\text{g}]$ 。

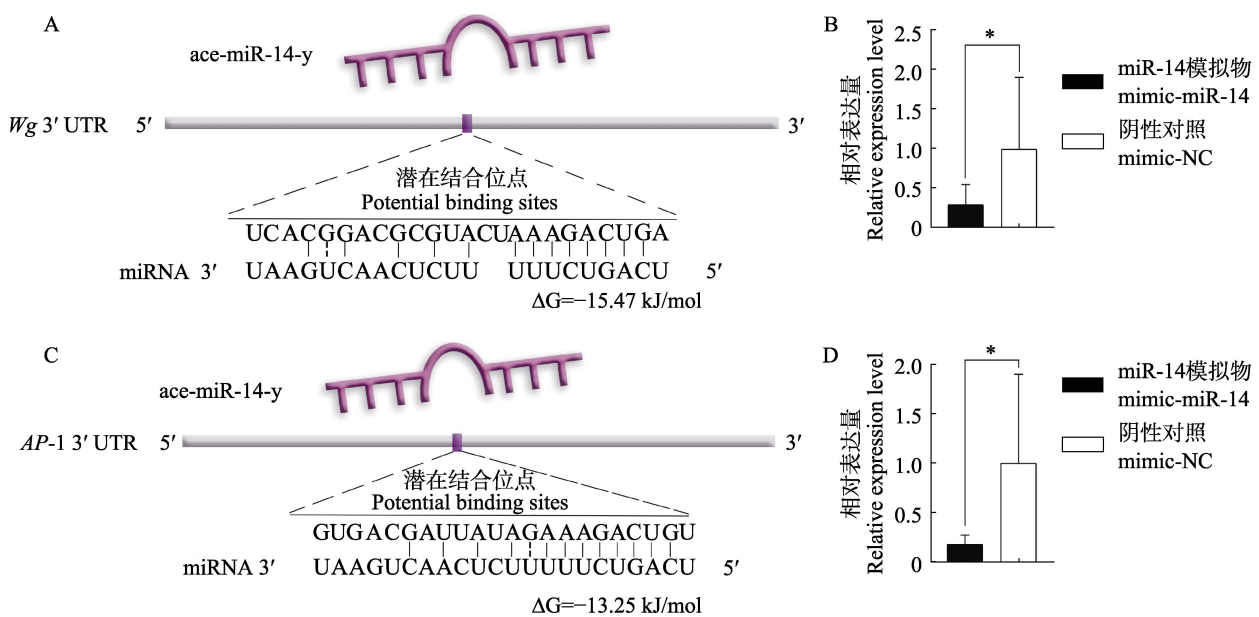


图 4 *Wg* (A) 和 *AP-1* (C) 基因与 ace-miR-14-y 间的靶向结合关系及过表达 ace-miR-14-y 后中华蜜蜂工蜂 5 日龄幼虫肠道中 *Wg* (B) 和 *AP-1* (D) 的相对表达量

Fig. 4 Target binding relationship between *Wg* (A) and *AP-1* (C) genes and ace-miR-14-y and relative expression levels of *Wg* (B) and *AP-1* (D) in the *Apis cerana cerana* worker 5-day-old larval guts after ace-miR-14-y overexpression

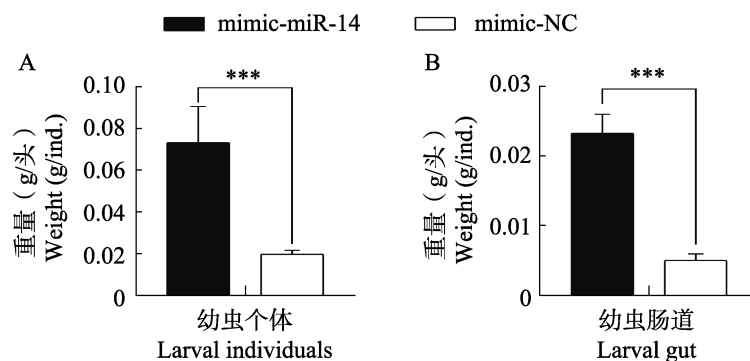


图 5 过表达 ace-miR-14-y 后中华蜜蜂工蜂 5 日龄幼虫个体 (A) 和肠道 (B) 的重量

Fig. 5 Weights of individual (A) and gut (B) of the *Apis cerana cerana* worker 5-day-old larvae after ace-miR-14-y overexpression

3 讨论

本团队在前期研究中已通过饲喂 Mimic 实现了蜜蜂幼虫肠道内多个 miRNA 的过表达 (蔡宗兵等, 2022; 张凯遥等, 2022)。本研究中, 对中蜂工蜂 5 日龄幼虫饲喂 Mimic-miR-14-y 后发现, ace-miR-14-y 的表达水平在肠道样品中极显著上升。上述结果表明, 在蜜蜂幼虫个体水平, 可通过饲喂法实现 miRNA 的高效过表达。这为后续深入研究 miRNA 在调控幼虫肠道发育中的功能及机制提供了必要的技术平台。

在真核生物中, 单个 miRNA 能同时靶向调控多个基因的表达, 反之亦然 (Bartel, 2009)。本研究发现, ace-miR-14-y 可同时靶向 265 个基因, 这些基因可注释到 33 个 GO 条目和 180 条 KEGG 通路 (图 3), 说明 ace-miR-14-y 通过调控相关基因表达潜在参与调节相关功能和通路, 体现出 miRNA 调控作用的广泛性, 与其他动植物和微生物中的报道类似 (Rhoades *et al.*, 2002; Ban *et al.*, 2020; 张文德等, 2022)。

miRNA 通常通过在转录后水平负调控靶基因的表达对相关生物学功能进行调节 (张卫星, 2022)。此前, 本团队研究发现 ace-miR-3720 通过调控 *CK I* 等 3 个靶基因表达, 潜在影响中蜂工蜂幼虫的肠道重量 (蔡宗兵等, 2022)。作为哺乳动物 Wnt 肿瘤蛋白的同源物 (Bejsovec, 2018), *Wg* 作为节段极性基因, 用于沿果蝇发育过程中的胚胎的前后轴, 对每个单独的节段进行模式化, 在果蝇的正常发育和模式化过程中起到关键作用 (Gonsalves and DasGupta, 2008)。Chaudhary 和 Boutros (2019) 研究发现分泌蛋白 *Wg* 可以激活果蝇翅膀上皮的信号传导。Zhang 等 (2015) 提出, 经典的 *Wg* 信号传导介导了 Bsk 诱导的非依赖性细胞死亡。本研究发现, ace-miR-14-y 与 *Wg* 之间存在潜在的靶向关系, 过表达 ace-miR-14-y 引起 5 日龄幼虫肠道中 *Wg* 的表达量显著下降。*AP-1* 是由 Jun, Fos 和 ATF 家族的 DNA 结合蛋白组成的二聚体复合物, 可介导真核细胞对生长因子、细胞因子和神经递质等细胞间信号分子的应答 (Turpaev, 2006), 并

参与增殖、凋亡、分化、存活、迁移和转化等细胞生命活动 (Shaulian and Karin, 2001)。在非洲爪蟾 *Xenopus* 的早期发育神经发生过程中, *AP-1* 参与调控 *xFoxD5b* 的表达 (Yoon *et al.*, 2013)。此外, *AP-1* 已被证实与小鼠的血管生成和发育密切相关 (Yoshitomi *et al.*, 2021)。本研究中, ace-miR-14-y 和 *AP-1* 间也存在潜在的靶向关系, 过表达 ace-miR-14-y 导致 5 日龄幼虫肠道中 *AP-1* 的表达水平显著降低。综上, ace-miR-14-y 的表达量与靶基因 *Wg* 和 *AP-1* 的表达量均存在负相关关系。推测 ace-miR-14-y 通过负调控 *Wg* 与 *AP-1* 的表达参与调节中蜂工蜂幼虫肠道的发育。然而, 这一推测仍需进一步的实验验证。

miRNA 参与调节牛 *Bos taurus* (韩露露等, 2023)、飞蝗 *Locusta migratoria* (Song *et al.*, 2019) 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Zhu *et al.*, 2017) 等昆虫的发育过程。例如, 飞蝗的 miR-2/13/71 簇通过抑制靶基因 *Notch* 的表达降低卵黄原蛋白基因的 mRNA 水平, 进而影响卵巢的发育 (Song *et al.*, 2019); 来源于植物花粉的 miR-162a 可靶向黑腹果蝇的 *dm TOR* 基因并下调其表达水平, 进而延缓黑腹果蝇的生长发育 (Zhu *et al.*, 2017)。本研究中, 过表达 ace-miR-14-y 后 5 日龄幼虫个体及肠道的重量极显著升高, 说明 ace-miR-14-y 发挥潜在的调控作用。但 ace-miR-14-y 是否通过负调控 *Wg* 与 *AP-1* 的表达影响幼虫个体及肠道重量仍不确定。未来的工作重点是利用本团队已建立的基因功能研究方法 (郭意龙等, 2022) 探究 ace-miR-14-y 靶向 *Wg* 和 *AP-1* 调控幼虫个体和肠道重量及其发育过程的作用机制。

参考文献 (References)

- Ashby R, Forêt S, Searle I, Maleszka R, 2016. MicroRNAs in honey bee caste determination. *Scientific Reports*, 6: 18794.
- Ban E, Jeong S, Park M, Kwon H, Park J, Song EJ, Kim A, 2020. Accelerated wound healing in diabetic mice by miRNA-497 and its anti-inflammatory activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121: 109613.
- Bartel DP, 2009. MicroRNAs: Target recognition and regulatory

- functions. *Cell*, 136(2): 215–233.
- Bejsovec A, 2018. Wingless signaling: A genetic journey from morphogenesis to metastasis. *Genetics*, 208(4): 1311–1336.
- 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.
- Cai ZB, Wang SY, Wang ZX, Zhao X, Zhang KY, Guo YL, Yao YT, Qian JJ, Hu Y, Fu ZM, Chen DF, Guo R, 2022. Overexpression and knockdown of ace-miR-3720 impact the target gene expression and weight of the larval gut of *Apis cerana cerana* workers. *Acta Entomologica Sinica*, 65(10): 1247–1255. [蔡宗兵, 王思懿, 王紫馨, 赵萧, 张凯遥, 郭意龙, 姚雨彤, 钱加珺, 胡颖, 付中民, 陈大福, 郭睿, 2022. 过表达和敲减 ace-miR-3720 对中华蜜蜂工蜂幼虫肠道的靶基因表达和重量的影响. 昆虫学报, 65(10): 1247–1255.]
- Chaudhary V, Boutros M, 2019. Exocyst-mediated apical Wg secretion activates signaling in the *Drosophila* wing epithelium. *PLoS Genetics*, 15(9): e1008351
- Chen X, Ma C, Chen C, Lu Q, Shi W, Liu ZG, Wang HH, Guo HK, 2017. Integration of lncRNA-miRNA-mRNA reveals novel insights into oviposition regulation in honey bees. *PeerJ*, 5: e3881.
- Chen X, Fu JL, 2021. The microRNA miR-14 regulates egg-laying by targeting EcR in honeybees (*Apis mellifera*). *Insects*, 12(4): 351.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W, 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 79: 351–379.
- Feng RR, Fu ZM, Du Y, Zhang WD, Fan XX, Wang HP, Wan JQ, Zhou ZY, Kang YX, Chen DF, Guo R, Shi PY, 2022. Identification and analysis of MicroRNAs in the larval gut of *Apis cerana cerana*. *Scientia Agricultura Sinica*, 55(1): 208–218. [冯睿蓉, 付中民, 杜宇, 张文德, 范小雪, 王海朋, 万洁琦, 周紫彧, 康育欣, 陈大福, 郭睿, 史培颖, 2022. 中华蜜蜂幼虫肠道中微小 RNA 的鉴定及分析. 中国农业科学, 55(1): 208–218.]
- Freitas FCP, Pires CV, Claudianos C, Cristino AS, Simões ZLP, 2017. MicroRNA-34 directly targets pair-rule genes and cytoskeleton component in the honey bee. *Scientific Reports*, 7: 40884.
- Gonsalves FC, DasGupta R, 2008. Function of the wingless signaling pathway in *Drosophila*. *Methods in Molecular Biology*, 469: 115–125.
- Guo YL, Yu KJ, Zhao X, Qian JJ, Zhao HD, Zhang J, Zhang Y, Zhao HX, Xu XJ, Luo Q, Chen DF, Guo R, 2022. Bioinformatic analysis and functional study of *nkd* gene in larvae of *Apis mellifera ligustica* workers. *Acta Microbiologica Sinica*, 62(12): 5005–5017. [郭意龙, 余岢骏, 赵萧, 钱加珺, 赵浩东, 张婕, 张扬, 赵红霞, 徐细建, 骆群, 陈大福, 郭睿, 2022. 意大利蜜蜂工蜂幼虫 *nkd* 基因的生物信息学分析及功能研究. 微生物学报, 62(12): 5005–5017.]
- Han LL, Han DP, Zhao QN, Diao QY, Cui K, 2023. Research progress of intestinal injury in young farm animals under stress mediated by miRNA. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 54(3): 877–888. [韩露露, 韩德平, 赵启南, 刁其玉, 崔凯, 2023. miRNA 介导应激幼畜肠道损伤的研究进展. 畜牧兽医学报, 54(3): 877–888.]
- Huntzinger E, Izaurralde E, 2011. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2): 99–110.
- Kim VN, Han JJ, Siomi MC, 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(2): 126–139.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *Lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *Lin-14*. *Cell*, 75(5): 843–854.
- Liu ZL, Ling L, Xu J, Zeng BS, Huang YP, Shang P, Tan AJ, 2018. MicroRNA-14 regulates larval development time in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 93: 57–65.
- Michely J, Kraft S, Müller U, 2017. miR-12 and miR-124 contribute to defined early phases of long-lasting and transient memory. *Scientific Reports*, 7(1): 7910.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP, 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110(4): 513–520.
- Shao SS, Yan WY, Huang Q, 2021. Identification of novel miRNAs from the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 93: 104930.
- Shaulian E, Karin M, 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20(19): 2390–2400.
- Song JS, Li WW, Zhao HH, Zhou ST, 2019. Clustered miR-2, miR-13a, miR-13b and miR-71 coordinately target Notch gene to regulate oogenesis of the migratory locust *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 106: 39–46.
- Turpaev KT, 2006. Role of transcription factor AP-1 in integration of cellular signalling systems. *Molekuliarnaia Biologiya*, 40(6): 945–961.
- Varghese J, Cohen SM, 2007. MicroRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. *Genes & Development*, 21(18): 2277–2282.

- Wu W, Xiong W, Li C, Zhai M, Li Y, Ma F, Li B, 2017. MicroRNA-dependent regulation of metamorphosis and identification of microRNAs in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Genomics*, 109(5/6): 362–373.
- Wu Y, Ye YP, Qian JJ, Zhang JX, Gu XY, Niu QS, Chen DF, Guo R, 2023. Impact of ace-miR-3759-y overexpression and knockdown on target gene expression and body weight of *Apis cerana cerana* larvae. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 60(1): 87–95. [吴鹰, 叶亚萍, 钱加珺, 张佳欣, 顾小雨, 牛庆生, 陈大福, 郭睿, 2023. 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. *应用昆虫学报*, 60(1): 87–95.]
- Yang K, Huang Y, Li Z, Zeng Q, Dai X, Lv J, Zong X, Deng K, Zhang J, 2023. Overexpression of Nta-miR6155 confers resistance to *Phytophthora nicotianae* and regulates growth in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14: 1281373.
- Yoon J, Kim JH, Lee OJ, Lee SY, Lee SH, Park JB, Lee JY, Kim SC, Kim J, 2013. AP-1^(c-Jun/FosB) mediates xFoxD5b expression in *Xenopus* early developmental neurogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(11/12): 865–872.
- Yoshitomi Y, Ikeda T, Saito-Takatsuji H, Yonekura H, 2021. Emerging role of AP-1 transcription factor JunB in angiogenesis and vascular development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6): 2804.
- Zeng ZJ, 2017. Apiculture. Beijing: China Agriculture Press. 10–12. [曾志将, 2017. 养蜂学. 北京: 中国农业出版社. 10–12.]
- Zhang KY, Liu JM, Zhang WD, Hu Y, Kang YX, Wang ZX, Wang SY, Qian JJ, Zhao X, Zhang JX, Chen DF, Guo R, Fu ZM, 2022. ame-miR-79 negatively regulates the expression of target genes *CYP450* and *FG* in the larval guts of *Apis mellifera ligustica* workers. *Acta Entomologica Sinica*, 65 (10): 1256–1265. [张凯遥, 刘佳美, 张文德, 胡颖, 康育欣, 王紫馨, 王思懿, 钱加珺, 赵萧, 张佳欣, 陈大福, 郭睿, 付中民, 2022. ame-miR-79 负调控意大利蜜蜂工蜂幼虫肠道中靶基因 *CYP450* 和 *FG* 的表达. *昆虫学报*, 65 (10): 1256–1265.]
- Zhang S, Chen C, Wu C, Yang Y, Li W, Xue L, 2015. The canonical Wg signaling modulates Bsk-mediated cell death in *Drosophila*. *Cell Death Disease*, 6(4): e1713.
- Zhang WD, Zhao HD, Sun MH, Yu KJ, Guo YL, Zhu LR, Hu Y, Zhao X, Ye YP, Chen DF, Guo R, 2022. Identification and analysis of microRNAs in *Nosema ceranae* spores. *Acta Entomologica Sinica*, 65(6): 708–717. [张文德, 赵浩东, 孙明会, 余岢骏, 郭意龙, 朱乐冉, 胡颖, 赵萧, 叶亚萍, 陈大福, 郭睿, 2022. 东方蜜蜂微孢子虫孢子中微小 RNA 的鉴定与分析. *昆虫学报*, 65(6): 708–717.]
- Zhang WX, 2020. The molecular mechanisms of ame-miR-184 regulating on hypopharyngeal gland activity of *Apis mellifera ligustica*. Doctor dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [张卫星, 2020. ame-miR-184 调控意大利蜜蜂咽下腺活性的分子机制研究. 博士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Zhu KG, Liu MH, Fu Z, Zhou Z, Kong Y, Liang HW, Lin ZG, Luo J, Zheng HQ, Wan P, Zhang JF, Zen K, Chen J, Hu FL, Zhang CY, Ren J, Chen X, 2017. Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genetics*, 13(8): e1006946.