

# 中华蜜蜂工蜂中肠中 piRNA 的鉴定与分析\*

臧 贺<sup>1,2,3\*\*</sup> 张艺琼<sup>1\*\*</sup> 杨 雪<sup>1</sup> 康 婧<sup>1</sup> 董舒楠<sup>1</sup> 郑一荻<sup>1</sup> 徐文华<sup>1</sup>  
陈大福<sup>1,2,3</sup> 邱剑丰<sup>1,2,3\*\*\*</sup> 郭 睿<sup>1,2,3\*\*\*</sup>

(1. 福建农林大学蜂学学院, 福州 350002; 2. 天然生物毒素国家地方联合工程实验室, 福州 350002;

3. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002)

**摘 要** 【目的】本研究旨在通过鉴定和分析中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 工蜂中肠的 piRNA, 为深入开展中华蜜蜂 piRNA 的调控功能与作用机制研究提供资源和基础。【方法】基于已获得的 small RNA-seq 数据鉴定中华蜜蜂 7 (Ac7) 和 10 (Ac10) 日龄工蜂中肠中的 piRNA, 再进行数量统计和结构特征分析。采用每百万标签序列 (Tags per million, TPM) 法计算 piRNA 的表达量并进行归一化。根据  $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$  且  $P \leq 0.05$  的标准筛选差异表达 piRNA (Differentially expressed piRNA, DEpiRNA)。使用相关软件预测 DEpiRNA 的靶 mRNA 并进行 GO 和 KEGG 数据库注释。采用 stem-loop RT-PCR 验证 piRNA 的表达。通过 RT-qPCR 验证测序数据的可靠性。【结果】在 Ac7 和 Ac10 组中分别鉴定到 534 和 495 个 piRNA, 包括 602 个非冗余 piRNA。上述两组中 piRNA 的长度分布均介于 24-34 nt, 分布在 27 nt 的 piRNA 数量最多, 且首位碱基均表现出碱基 C 倾向。在 Ac7 vs Ac10 比较组中筛选到 2 个 DEpiRNA, 共靶向 472 个 mRNA, 可注释到生物调节、催化活性和细胞器等 26 个 GO 功能条目及内吞作用、Wnt 信号通路和 JAK-STAT 信号通路等 167 条 KEGG 通路。有 27 和 11 条靶 mRNA 分别涉及到 7 条发育相关信号通路 (Wnt, Notch, mTOR, AMPK, Hippo, TGF-beta 和 Hedgehog) 和 8 条免疫通路 (内吞作用、溶酶体、吞噬体、MAPK、PI3K-Akt、JAK-STAT、TGF-beta 和 FoxO)。Stem-loop RT-PCR 结果显示随机选择的 7 个 piRNA 在工蜂中肠中均真实表达。RT-qPCR 结果显示 2 个 DEpiRNA 的表达模式与前期测序结果一致, 说明测序数据可靠。【结论】中华蜜蜂工蜂中肠中表达的 602 个 piRNA 具有类似于其他动物 piRNA 的结构特征, 通过靶向调控相关基因, 具有参与调控工蜂中肠发育和免疫的潜力。

**关键词** 中华蜜蜂; 中肠; piRNA; 鉴定; 靶基因; 调控

## Identification and investigation of piRNAs in the midguts of *Apis cerana cerana* workers

ZANG He<sup>1,2,3\*\*</sup> ZHANG Yi-Qiong<sup>1\*\*</sup> YANG Xue<sup>1</sup> KANG Jing<sup>1</sup> DONG Shu-Nan<sup>1</sup>  
ZHENG Yi-Di<sup>1</sup> XU Wen-Hua<sup>1</sup> CHEN Da-Fu<sup>1,2,3</sup> QIU Jian-Feng<sup>1,2,3\*\*\*</sup> GUO Rui<sup>1,2,3\*\*\*</sup>

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

2. National & Local United Engineering Laboratory of Natural Biotoxin, Fuzhou 350002, China;

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

**Abstract** [Aim] To identify and analyze piRNAs in the midgut of *Apis cerana cerana* workers, thereby providing a foundation for the in-depth study of the regulatory function and mechanism of piRNAs in this species. [Methods] piRNAs in the midgut of 7- and 10-day-old *A. c. cerana* workers (Ac7 and Ac10) were identified based on the available small RNA-seq data, and their quantitative statistics and structural characteristics analyzed. The expression levels of piRNAs were calculated

\*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 (2022J01131334); 福建农林大学硕士生导师团队项目 (郭睿); 福建农林大学科技创新专项基金 (Kfb22060XA); 福建省大学生创新创业训练计划项目 (202310389027, S202310389076)

\*\*共同第一作者 Co-first authors, E-mail: zanghe321@163.com; zhangyiqiong1121@163.com

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

收稿日期 Received: 2025-05-29; 接受日期 Accepted: 2026-05-08

and normalized using the tag per million (TPM) method. Differentially expressed piRNAs (DEpiRNAs) were screened following the criteria of  $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$  and  $P \leq 0.05$ . Relevant software was employed to predict target mRNAs of DEpiRNAs followed by GO and KEGG database annotation. The expression of piRNAs was validated using stem-loop RT-PCR. The expression trends of DEpiRNA were confirmed by RT-qPCR. **[Results]** A total of 534 and 495 piRNAs were discovered in the Ac7 and Ac10 groups, respectively, including 602 non-redundant ones. The length distribution of piRNAs in the above-mentioned two groups ranged between 24-34 nt, with most being 27 nt in length. The first base is biased toward C. Two DEpiRNAs were screened in the Ac7 vs Ac10 comparison group, targeting a total of 472 mRNAs, which could be annotated to 26 GO terms, including biological regulation, catalytic activity and organelle, and 167 KEGG pathways such as endocytosis, Wnt signaling pathway and JAK-STAT signaling pathway. There were 27 and 11 target mRNAs, respectively, involved in seven developmental signaling pathways (Wnt, Notch, mTOR, AMPK, Hippo, TGF-beta and Hedgehog), and eight immune pathways (endocytosis, lysosome, phagosome, MAPK, PI3K-Akt, JAK-STAT, TGF-beta and FoxO). The stem-loop RT-PCR results demonstrate that seven randomly selected piRNAs were actually expressed in the midgut of *A. c. cerana* workers. The results of RT-qPCR indicate that expression of the two DEpiRNAs is consistent with that observed in the sequencing data, confirming the latter's reliability. **[Conclusion]** The 602 piRNAs expressed in the midgut of the *A. c. cerana* workers have structural features analogous to those of other animals. These piRNAs are potentially engaged in the development and immunity of the midgut through regulating the expression of related genes.

**Key words** *Apis cerana cerana*; midgut; piRNA; identify; target gene; regulation

PIWI 蛋白互作 RNA (PIWI-interacting RNA, piRNA) 是一类大小在 24-34 nt 之间的小非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA), 在抑制转座子、基因组稳定性维持等方面发挥关键作用, 以及参与调控基因表达和免疫防御等生物学过程 (Kolliopoulou *et al.*, 2019)。piRNA 最经典的生物学功能是与 PIWI 蛋白组装成 piRNA 诱导沉默复合体 (piRISC), 通过在转录及转录后水平双重抑制转座子的转座活性, 从而保障生殖细胞基因组的完整性 (Yamashiro and Siomi, 2018)。在果蝇中, piRNA 经由“乒乓循环” (Ping-Pong cycle) 机制实现级联扩增, 在特异性识别并切割转座子转录本的同时产生次级 piRNA, 进而构建起高效的转座子沉默体系 (Huang *et al.*, 2021)。近年来的研究进一步证实, piRNA 在生殖腺以外的体细胞中亦发挥着关键的转座子调控作用 (Wu *et al.*, 2020)。不同于微小 RNA (microRNA, miRNA) 等其他小 ncRNA, piRNA 的生物发生机制较为独特 (Sun *et al.*, 2022)。

早期研究表明 piRNA 主要在动物生殖细胞中表达和发挥作用 (Aravin *et al.*, 2006; Kawaoka *et al.*, 2008a)。Kawaoka 等 (2008b) 检测了家蚕 *Bombyx mori* 的 Piwi 亚家族 2 个成员 (SIWI 和 BmAGO3) 编码基因的表达模式, 发现二者

在幼虫期睾丸比在蛹期睾丸中的表达量更高, 表明它们可能参与家蚕精子发生。随着相关理论的完善和研究手段的进步, piRNA 被证实同样能在除性腺外的其他组织或器官中表达并行使特殊功能 (Jones *et al.*, 2016; Sato and Siomi, 2020; Kiuchi *et al.*, 2023)。例如, Jones 等 (2016) 曾证实果蝇 *Drosophila* spp. 的非性腺体细胞中存在完整的 piRNA 途径, 并发现 piRNA 影响果蝇的正常代谢和机体健康; Feng 等 (2021) 研究发现家蚕的脂肪体和中肠中表达丰富的 piRNA, 其在抗病毒免疫中起到潜在的调控作用。相比于果蝇和家蚕等少数模式昆虫, 蜜蜂的 piRNA 研究起步较晚, 且有限的研究多集中在西方蜜蜂 *Apis mellifera*。Liao 等 (2010) 曾在西方蜜蜂中鉴定到 piRNA 生物合成通路上的 2 个关键基因 *Am-aub* 和 *Am-ago3*。Watson 等 (2022) 研究发现 piRNA 参与西方蜜蜂配子发生和胚胎发育调控。除了调控转座子, piRNA 还能通过与 mRNA 的 3'UTR 或编码区互补结合, 在转录后水平调控蛋白质编码基因的表达 (Pyrkova *et al.*, 2026)。在小鼠精子发生过程中, piRNA 能够介导大量 mRNA 的降解, 确保精子发育的正常进行 (Sun *et al.*, 2021)。在果蝇中, piRNA 可以通过抑制翻译来调控胚胎发育相关基因的表达 (Takase

*et al.*, 2022)。这些研究表明, piRNA 对 mRNA 的调控是其发挥生物学功能的重要方式之一 (Hanusek *et al.*, 2022)。

昆虫肠道不仅是食物消化和营养吸收的主要场所,同时也是抵御病原入侵、发挥免疫防御作用的关键组织 (Zeng *et al.*, 2022)。前期研究中,笔者团队基于 small RNA-seq (sRNA-seq) 技术在意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 工蜂中肠中鉴定到 596 个 piRNA (范小雪等, 2022), 并解析了工蜂响应东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae* 侵染过程中 piRNA 的表达模式,以及潜在的调控作用 (许雅静等, 2022); 此外,在意大利蜜蜂工蜂幼虫肠道中成功鉴定到 843 个 piRNA (Xu *et al.*, 2022), 进而揭示了差异表达 piRNA (Differentially expressed piRNA, DEpiRNA) 在幼虫应答蜜蜂球囊菌 *Ascospaera apis* 侵染中的调控作用 (Sun *et al.*, 2023)。目前,中华蜜蜂 piRNA 的研究匮乏,迄今仅有一例报道 (Long *et al.*, 2022)。

蜜蜂中肠在食物消化、营养吸收和免疫防御等方面发挥重要作用 (黄少康, 2010)。但中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 中肠中 piRNA 的数量、结构特征和调控作用尚不清楚。本课题组前期通过 sRNA-seq 对中华蜜蜂 7 日龄和 10 日龄工蜂的中肠组织进行了 sRNA 测序,获得了高质量的可靠数据。基于前期测序结果,本研究对中华蜜蜂工蜂中肠中的 piRNA 进行了系统鉴定与结构特征分析,预测 piRNA 的靶 mRNA 并进行功能和通路注释,进而对 piRNA 和 DEpiRNA 进行分子验证,以期丰富中华蜜蜂 piRNA 的基本信息,并揭示 piRNA 在工蜂中肠发育和免疫中的潜在功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

中华蜜蜂工蜂取自福建农林大学蜂学与生物医药学院蜜蜂-病原互作机制研究团队饲养的实验蜂群。

### 1.2 sRNA-seq 数据来源

前期研究中,本课题组已利用 sRNA-seq 技

术对中华蜜蜂 7 日龄 (Ac7) 和 10 日龄 (Ac10) 工蜂中肠进行测序 ( $n=3$ ), 获得了高质量的 sRNA 组学数据, 共测得 127 523 419 条原始读段 (Raw reads), 清洁读段 (Clean reads) 达 122 104 443 条, 占 95.75% (Chen *et al.*, 2019)。原始数据已上传 NCBI SRA 数据库 (BioProject 号: PRJNA487111)。

### 1.3 piRNA 的鉴定与表达量计算

piRNA 的生物信息学鉴定参照本团队前期建立的方法并进行优化 (范小雪等, 2022): 首先使用 Bowtie2 软件将质控后的 clean reads 比对至东方蜜蜂参考基因组 (版本号 GCF\_001442555.1\_ACSNU-2.0), 筛选得到唯一比对到基因组的序列; 随后通过 BLASTN 分别比对 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 Rfam (<https://rfam.org/>) 数据库, 去除 rRNA、tRNA、snoRNA、snRNA 及 scRNA 等其他类型的非编码 RNA; 再将剩余序列比对至 miRBase 数据库 (<https://www.mirbase.org/>) (Griffiths-Jones *et al.*, 2008), 并使用 miRDeep2 软件预测并过滤掉已知和新的 miRNA; 最后保留长度在 24-34 nt 范围内的序列, 作为最终的候选 piRNA。采用每百万标签数 (Transcripts per million, TPM) 法对 piRNA 的表达量进行归一化处理, 计算公式为:  $TPM = (\text{某一 piRNA 的 clean reads 数} / \text{所有 sRNA 的总 clean reads 数}) \times 10^6$  (Liu *et al.*, 2016)。

### 1.4 piRNA 的结构特征分析

根据 1.3 节 piRNA 的鉴定结果对分布于不同长度的 piRNA 进行数量统计。同时对不同长度的 piRNA 读段序列的首位碱基偏向性进行分析 (Yu *et al.*, 2019)。通过 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行绘图。

### 1.5 piRNA 的 stem-loop PCR 验证

随机选取 7 个 piRNA (piR-ace-1216942、piR-ace-752152、piR-ace-858637、piR-ace-252931、piR-ace-202265、piR-ace-932156 和 piR-ace-

1128833) 进行验证。基于鉴定得到的 piRNA 序列, 使用 DNAMAN 6.0 软件设计特异性 stem-loop 反转录引物、上游引物及通用下游引物(引物序列见表 1), 所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用艾科瑞公司(长沙)总 RNA 提取试剂盒分别提取 7 日龄和 10 日龄中华蜜蜂工蜂中肠组织的总 RNA, 经 Nanodrop

2000 检测 RNA 浓度和纯度后,使用翌圣生物(上海)的 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 以 stem-loop 引物进行反转录合成 cDNA。PCR 反应体系和程序参照本团队前期发表的方法进行(范小雪等, 2022)。扩增产物经 1.8%琼脂糖凝胶电泳分离后,使用上海培清 JS-680B 凝胶成像系统进行观察和拍照。

表 1 引物序列  
Table 1 Sequences of primers

| 引物 Primer            | 序列 (5'-3') Sequence (5'-3')                   |
|----------------------|-----------------------------------------------|
| piR-ace-1216942-Loop | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACATCTT |
| piR-ace-1216942-F    | TCGGCAGGCACTGATCGAGTCGTC                      |
| piR-ace-752152-Loop  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCAACTCC  |
| piR-ace-752152-F     | TCGGCAGGAGGACACTGCCAGGCG                      |
| piR-ace-858637-Loop  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCCTGTCCTC |
| piR-ace-858637-F     | TCGGCAGGCTAAGGCCAGCTCAGC                      |
| piR-ace-867282-Loop  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCATTTGCCG |
| piR-ace-867282-F     | TCGGCAGGTGTAGGTAAGGGAAGT                      |
| piR-ace-252931-loop  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGTACCGCC |
| piR-ace-252931-F     | TCGGCAGGCAGGCGGGGAGTTTGA                      |
| piR-ace-202265-Loop  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTTGCCGAC |
| piR-ace-202265-F     | TCGGCAGGAATGTAGGTAAGGGAA                      |
| piR-ace-932156-Loop  | CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTACCGCCC |
| piR-ace-932156-F     | TCGGCAGGGCGGGGAGTTTGACTG                      |
| piRNA-R              | CTCAACTGGTGTCGTGGA                            |
| U6-F                 | CCAGGAGATGAAGTGGAATCTC                        |
| U6-R                 | CTTGCTTGAAGTGCTGCTT                           |

1.6 piRNA 的靶向预测及分析

利用 TargetFinder 软件对 piRNA 进行靶向预测,采用软件默认参数。利用 Blast 工具将靶 mRNA 分别比对到 GO (<https://www.geneontology.org>) 和 KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) 数据库, 以获得相应的功能和通路注释。根据 piRNA 及其靶 mRNA 之间的靶向结合关系构建调控网络, 再通过 Cytoscape3.8.2 软件(Shannon *et al.*, 2003) 对调控网络进行可视化。

1.7 DEpiRNA 的筛选和 RT-qPCR 验证

使用 edgeR 软件 (Robinson *et al.*, 2010),

按照 $|\log_2 \text{ fold change}| \geq 1$  ( $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$ ) 且  $P \leq 0.05$  的标准, 筛选 Ac7 vs Ac10 比较组的 DEpiRNA。分别提取 7 和 10 日龄工蜂中肠的总 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 piR-ace-1216942 和 piR-ace-752152 的 RT-qPCR; 另一份 RNA 利用等摩尔比混合的 Oligo dT 和 Random 6 mer 引物进行反转录, 得到的 cDNA 作为内参 U6 (GeneBank 登录号: LOC107992425) 的模板进行 RT-qPCR。反应体系与条件参照范小雪等(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 piRNA 相对表达量。采用 GraphPad Prism 8 软件进行 qPCR 数据的 Student's *t* 检验及绘图。采用 GraphPad Prism 8 软件进行 qPCR 数据的 Student's *t* 检验及绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 中华蜜蜂工蜂中肠 piRNA 的数量和表达量

在 Ac7 和 Ac10 组中分别鉴定到 534 和 495 个 piRNA, 包括 602 个非冗余 piRNA; 两组的共有 piRNA 数目为 427 个, 特有 piRNA 的数目分别为 107 和 68 个。进一步分析发现 Ac7 组中表达量最高的是 piR-ace-992993, 其次为 piR-ace-338826 和 piR-ace-361874; Ac10 组表达量最高的前 3 位分别是 piR-ace-410371、piR-ace-267432 和 piR-ace-992993 (表 2)。

### 2.2 中华蜜蜂工蜂中肠 piRNA 的长度分布和首位碱基偏向性

Ac7 和 Ac10 组中 piRNA 的长度分布均介于 24-34 nt; 其中, 分布在 27 nt 的 piRNA 数量最多 (104 和 95 个), 分布在 28 nt 的 piRNA 数量次之 (90 和 82 个) (图 1: A)。此外, 上述两组中 piRNA 的首位碱基均表现出碱基 C 倾向 (图 1: B, C)。

### 2.3 中华蜜蜂工蜂中肠中 piRNA 的表达验证

Stem-loop RT-PCR 扩增结果显示, 随机选取的 7 个 piRNA 均能扩增出单一、清晰的特异性条带, 大小约为 100 bp (图 2), 与预期的扩增产物长度相符, 表明这些 piRNA 在中华蜜蜂工蜂中肠中确实存在表达。进一步的 RT-qPCR 验证结果显示, 2 个 DEpiRNA 的表达变化趋势与 sRNA-seq 测序结果完全一致, 证明本研究获得的转录组数据真实可靠。

### 2.4 DEpiRNA 的靶 mRNA 分析

在 Ac7 vs Ac10 比较组中筛选到 2 个 DEpiRNA, 共靶向 472 个 mRNA。GO 功能注释结果表明, 144 个靶 mRNA 共富集到 26 个功能条目, 其中生物学进程类 10 个, 主要包括细胞过程、生物调节、代谢过程和生物合成等; 分子功能类 9 个, 主要涉及结合活性、催化活性、信号转导活性和分子转导活性等; 细胞组分类 7 个, 主要包括细胞、细胞器、细胞膜和突触等 (图 3: A)。KEGG 通路富集分析显示, 107 个靶 mRNA 共注释到 167 条信号通路, 主要包括赖氨酸降解、磷酸肌醇代谢、丙酮酸代谢以及多种信号转导通路 (图 3: B)。

表 2 中华蜜蜂 7 日龄和 10 日龄工蜂中肠中 piRNA 的表达量 (前 10 位)

Table 2 The expression levels of piRNAs in the midgut of *Apis cerana cerana* 7-and 10-day-old worker (Top 10)

| 7 日龄 7-day-old    |                                                   |  | 10 日龄 10-day-old     |                                                   |
|-------------------|---------------------------------------------------|--|----------------------|---------------------------------------------------|
| piRNA 编号 piRNA ID | 每百万转录本数<br>Transcripts per million (TPM)<br>value |  | piRNA 编号<br>piRNA ID | 每百万转录本数<br>Transcripts per million (TPM)<br>value |
| piR-ace-992993    | 1 907.33                                          |  | piR-ace-410371       | 1 412.67                                          |
| piR-ace-338826    | 1 791.00                                          |  | piR-ace-267432       | 1 371.00                                          |
| piR-ace-361874    | 1 790.67                                          |  | piR-ace-992993       | 1 300.67                                          |
| piR-ace-912809    | 1 764.33                                          |  | piR-ace-1125230      | 1 269.67                                          |
| piR-ace-326296    | 1 762.00                                          |  | piR-ace-805822       | 1 269.67                                          |
| piR-ace-361873    | 1 728.67                                          |  | piR-ace-930874       | 1 235.00                                          |
| piR-ace-397987    | 1 677.33                                          |  | piR-ace-361874       | 1 231.67                                          |
| piR-ace-969859    | 1 673.33                                          |  | piR-ace-338826       | 1 227.33                                          |
| piR-ace-326295    | 1 645.33                                          |  | piR-ace-912809       | 1 213.33                                          |
| piR-ace-251649    | 1 645.33                                          |  | piR-ace-361873       | 1 199.67                                          |

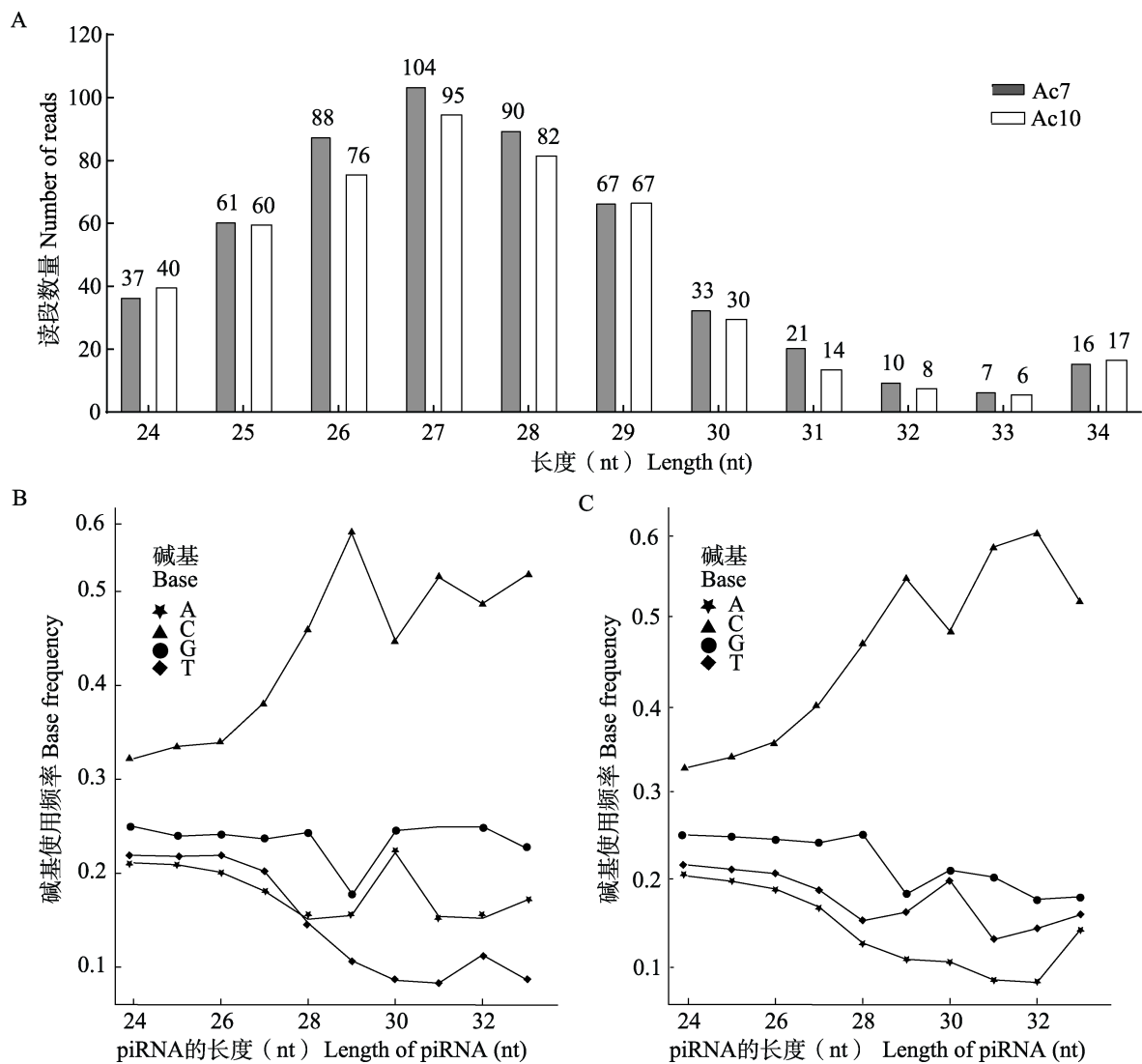


图 1 Ac7 和 Ac10 组中 piRNA 的长度分布 (A) 和首位碱基偏向性 (B, C)  
Fig. 1 Length distribution (A) and first base bias (B, C) of piRNAs in Ac7 and Ac10 groups  
Ac7 和 Ac10 分别表示 7 和 10 日龄工蜂中肠。下图同。  
Ac7 and Ac10 represent midguts of 7- and 10-day-old workers, respectively. The same below.

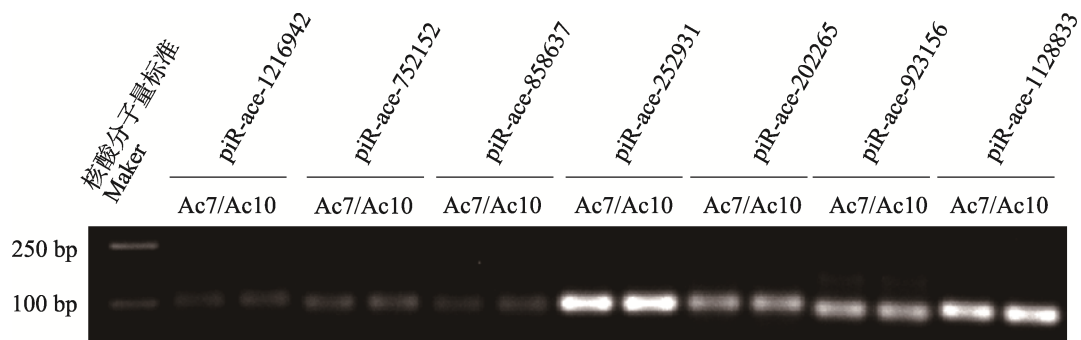


图 2 中华蜜蜂工蜂中肠中 7 个 piRNA 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis for the amplified products from 7 piRNAs  
in the midguts of *Apis cerana cerana* workers

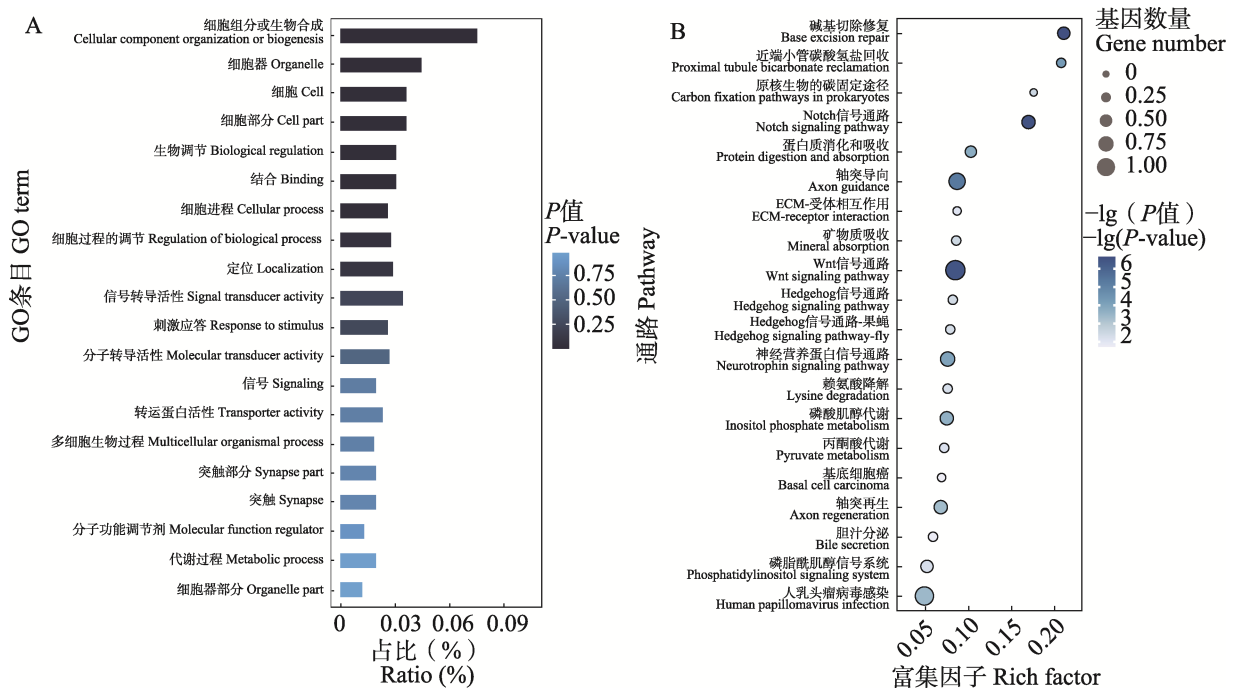


图 3 中华蜜蜂 Ac7 vs Ac10 比较组的工蜂中肠中 DEpiRNAs 的靶 mRNA 功能和通路注释  
Fig. 3 Function and pathway annotation of mRNAs targeted by DEpiRNAs in the midguts of Ac7 vs Ac10 comparison group of *Apis cerana cerana* workers

A. DEpiRNAs 的靶 mRNA 的 GO 数据库注释; B. DEpiRNAs 的靶 mRNA 的 KEGG 数据库注释。  
A. GO database annotation of target mRNAs of DEpiRNAs; B. KEGG database annotation of target mRNAs of DEpiRNAs.

## 2.5 中华蜜蜂工蜂中肠中 DEpiRNA-靶 mRNA 的调控网络

调控网络分析结果显示, DEpiRNA 的 27 条靶 mRNA 涉及 Wnt、Notch、mTOR、AMPK、Hippo、TGF-beta 和 Hedgehog 7 条发育相关信号通路,其中 XM\_017056336.1、XM\_017056337.1、XM\_017056338.1 和 XM\_017056339.1 等 9 个靶 mRNA 可同时注释到 Wnt 和 Notch 信号通路; XM\_017052745.1 可同时注释到 Wnt 和 Hippo 信号通路(图 4)。

此外, DEpiRNA 的 11 条靶 mRNA 涉及内吞作用、溶酶体、JAK-STAT 和 FoxO 信号通路等 8 条免疫应答相关途径,其中 XM\_017050636.1、XM\_017054127.1、XM\_017054128.1、XM\_017056318.1、XM\_017049981.1 和 XM\_017060159.1 可以注释到吞噬体、溶酶体等 3 条细胞免疫相关通路; XM\_017050440.1、XM\_017058556.1、XM\_017059772.1、XM\_017062705.1 和 XM\_017062706.1 可以注释

到 PI3K-Akt、JAK-STAT 和 FoxO 信号通路等 5 条体液免疫相关通路。XM\_017058556.1 可以同时注释到 MAPK、PI3K-Akt、JAK-STAT 和 FoxO 信号通路(图 5)。

## 2.6 DEpiRNA 的 RT-qPCR 验证

在 Ac7 vs Ac10 比较组中筛选出 2 个 DEpiRNA, 分别为 piR-ace-1216942 ( $\log_2FC = 14.29$ ,  $P = 4.44 \times 10^{-4}$ ) 和 piR-ace-752152 ( $\log_2FC = -1.70$ ,  $P = 3.46 \times 10^{-2}$ )。RT-qPCR 检测结果显示上述 2 个 DEpiRNA 的表达趋势与测序数据中的表达趋势一致(图 6), 证实了本研究所用转录组数据的可靠性。

## 3 讨论

本研究在中华蜜蜂 7 和 10 日龄工蜂成虫中肠中分别鉴定到 534 和 495 个 piRNA, 去冗余后共鉴定到 602 个 piRNA, 这为持续开展 piRNA 调控工蜂中肠发育及应答病原侵染的功能和机

制研究提供了必要资源。前期研究中,本团队在中华蜜蜂工蜂幼虫肠道中鉴定到 621 个 piRNA (Long *et al.*, 2022)。通过比较发现有 448 个 piRNA 同时在工蜂成虫中肠和工蜂幼虫肠道中表达,而分别有 154 和 230 个 piRNA 在工蜂成虫中肠和工蜂幼虫肠道中特异性表达。以上结果表明少数 piRNA 在中华蜜蜂工蜂成虫中肠和工蜂幼虫肠道中发挥时间特异性调控作用。进一步分析发现,有 70.93% 的 piRNA 为 7 和 10 日龄工蜂中肠所共有,特有 piRNA 占比分别为 17.77% 和 11.30%,推测上述特异性表达的 piRNA 在工蜂中肠发育的不同时间点也发挥特殊作用。

结构特征分析结果显示,上述鉴定到的 piRNA 的长度主要介于 24-34 nt,与家蚕(Kawaoka *et al.*, 2008a)、斑马鱼 *Danio rerio* (Houwing *et al.*, 2007) 和白纹伊蚊 *Aedes albopictus* (Liu *et al.*, 2016) 等动物的 piRNA 长度分布相似。此外,中华蜜蜂 piRNA 的首位碱基偏向于 C,这与生殖细胞中 piRNA 首位碱基偏向 U 的经典特征不同,但与 Vourekas 等(2015)报道的小鼠体细胞 piRNA 的碱基偏向性一致。这一结果提示中华蜜蜂中肠 piRNA 可能通过非经典的生物发生途径产生,其具体的生成机制有待进一步研究。本研究中,通过 stem-loop RT-PCR 扩增出随机选

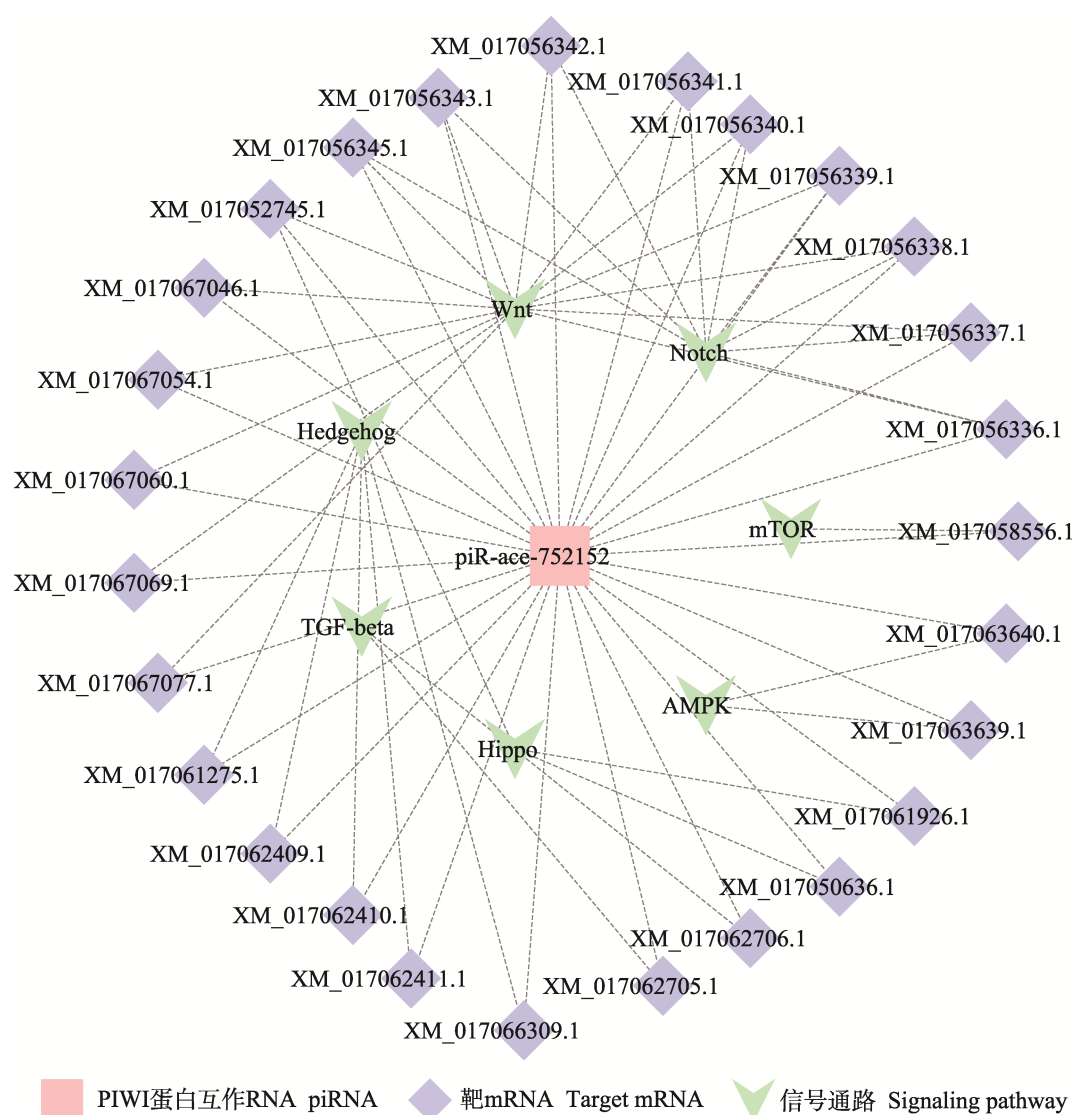


图 4 中华蜜蜂 Ac7 vs Ac10 比较组的工蜂中肠中发育相关信号通路的差异表达 piRNA 与靶 mRNA 的调控网络  
Fig. 4 Regulatory network between differentially expressed piRNA and target mRNAs involved in development-relevant signaling pathways in the midguts of the Ac7 vs Ac10 comparison group of *Apis cerana cerana* workers



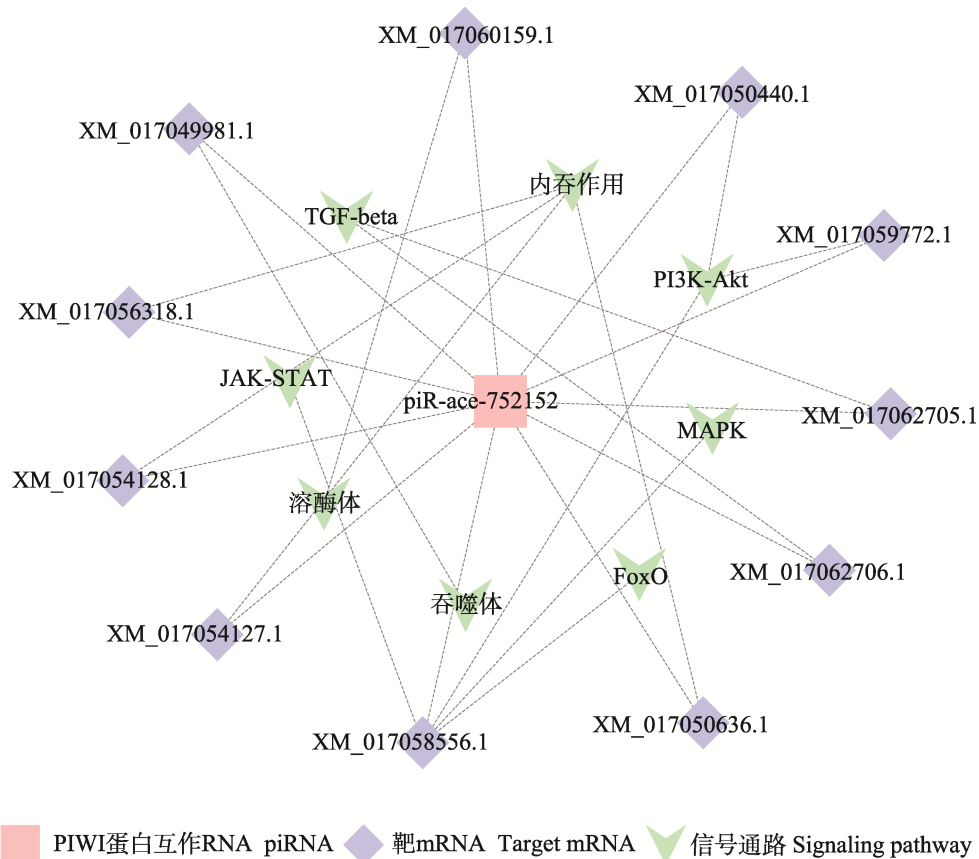


图 5 中华蜜蜂 Ac7 vs Ac10 比较组的工蜂中肠中免疫相关信号通路的差异表达 piRNA 与靶 mRNA 的调控网络  
Fig. 5 Regulatory network between differentially expressed piRNA and target mRNAs involved in immune-relevant signaling pathways in the midguts of the Ac7 vs Ac10 comparison group of *Apis cerana cerana* workers

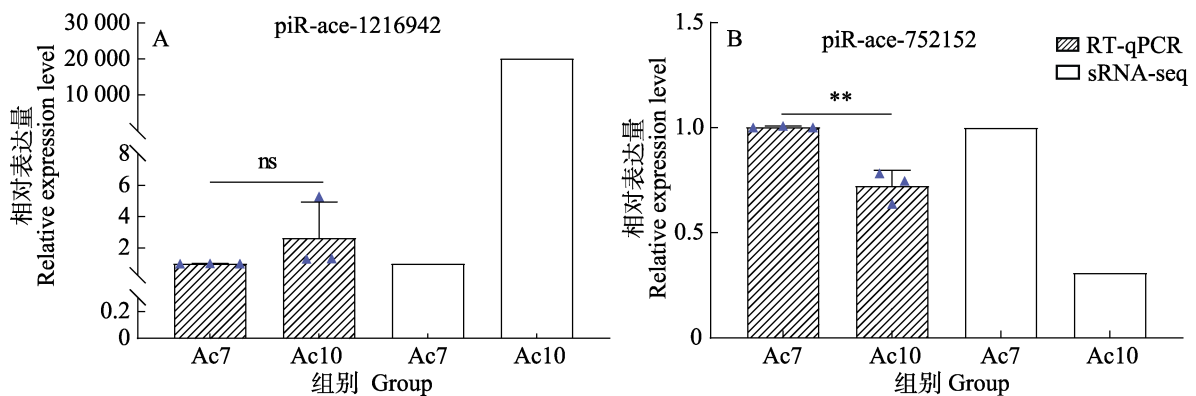


图 6 piR-ace-1216942 (A) 和 piR-ace-752152 (B) 的 RT-qPCR 验证  
Fig. 6 RT-qPCR verification of piR-ace-1216942 (A) and piR-ace-752152 (B)

图中数据为平均值±标准差；ns 表示差异不显著 ( $P > 0.05$ , 独立样本  $t$  检验)；

\*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ , 独立样本  $t$  检验)。

Data are presented as mean±SD; ns represents non-significant difference ( $P > 0.05$ , independent sample  $t$ -test),

\*\* represents extremely significant difference ( $P < 0.01$ , independent sample  $t$ -test).

择的 7 个 piRNA 的目的片段,说明它们在工蜂中肠中真实表达(图 2)。该结果一定程度证明了本研究中鉴定到的 piRNA 的可靠性。后续研

究将通过更高深度的小 RNA 测序和长读长测序技术,结合生物信息学分析,系统鉴定中华蜜蜂基因组中的 piRNA cluster,明确 piRNA 基因在

基因组中的分布特征, 进一步验证 piRNA 鉴定的准确性。

在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Kotov *et al.*, 2019)、家蚕 (Sakai *et al.*, 2016) 和秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (Zhang *et al.*, 2018) 等物种中, piRNA 已被证实能通过靶向 mRNA 调控基因表达, 进而调节重要生物学过程。本研究中, Ac7 vs Ac10 比较组中的 DEpiRNA (piR-ace-752152) 可靶向 472 条靶 mRNA, 涉及 26 个 GO 条目, 包括细胞进程、代谢过程、转运活性和催化活性等。另外, 这些靶 mRNA 还涉及 167 条 KEGG 通路, 包括氮代谢、氨基酸的生物合成和鞘脂代谢和等 22 条物质代谢通路, 柠檬酸循环、丙酮酸代谢和糖酵解/糖异生等 10 条能量代谢通路。这表明 piR-ace-752152 可通过上述功能条目和通路潜在调节中华蜜蜂工蜂中肠的物质和能量代谢。本研究仅使用 TargetFinder 软件进行 piRNA 靶基因预测, 可能存在一定的假阳性。后续研究将结合 RNA 免疫共沉淀测序 (RIP-seq) 等实验技术, 进一步验证 piRNA 与靶 mRNA 的真实结合关系, 明确其调控机制。

Wnt 信号通路是调控细胞增殖、分化、自我更新以及胚胎发育的核心通路, 在肠道上皮的发育和稳态维持中发挥着不可替代的作用 (Steinhart and Angers, 2018)。Hippo 与 Notch 信号通路之间存在紧密的交互调控, 共同参与肠道干细胞的增殖与分化过程, 维持肠道上皮的完整性和功能平衡 (Hong *et al.*, 2020)。此外, 本研究还发现 piR-ace-752152 的靶基因 XM\_017058556.1 同时参与 JAK-STAT 和 MAPK 两条关键免疫信号通路。综合以上结果推测, piR-ace-752152 可能通过靶向调控这些信号通路中的关键基因, 参与中华蜜蜂工蜂中肠的细胞免疫和体液免疫反应。

昆虫缺少获得性免疫, 主要通过天然免疫抵御病原微生物入侵, 昆虫天然免疫又分为细胞免疫和体液免疫 (Khan *et al.*, 2023)。研究表明 piRNA 参与埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Blair, 2019)、家蚕 (Feng *et al.*, 2021) 和西方蜜蜂 (Sun *et al.*, 2023) 的免疫应答过程。溶酶体在处理 and 呈递抗原到 T 淋巴细胞中起关键作用 (Watts, 2022)。

细胞内吞作用广泛参与机体的免疫防御和细胞介导运动 (Cossart and Helenius, 2014)。本研究中, 分别有 1 和 4 个靶 mRNA 注释到溶酶体和内吞作用。JAK/STAT 信号通路参与肿瘤、表皮创伤、机械应激和寄生蜂感染的全身免疫反应, 同时可以促进损伤肠道上皮的修复作用 (Yu *et al.*, 2022)。Geng 等 (2016) 研究发现 JAK/STAT 信号通路参与家蚕对球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 的免疫应答过程。MAPK 信号通路可以调节昆虫宿主中氨基肽酶和其他中肠基因的差异表达, 从而减少苏云金芽孢杆菌毒素对小菜蛾 *Plutella xylostella* 的毒力效应 (Guo *et al.*, 2020)。本研究发现, 靶 mRNA (XM\_017058556.1) 涉及 JAK-STAT 和 MAPK 信号通路。上述结果表明 piR-ace-752152 通过调控靶基因表达潜在参与工蜂中肠的细胞和体液免疫。

piRNA 最经典的功能是调控转座子活性。本研究鉴定的中华蜜蜂中肠 piRNA 可能同样具有抑制转座子转座、维持体细胞基因组稳定性的作用。后续研究将系统注释中华蜜蜂基因组中的转座子, 分析中肠 piRNA 对转座子的靶向调控关系, 明确 piRNA 在维持中肠基因组稳定性中的作用。在蜜蜂病害防控方面, piRNA 可以作为新型分子靶标, 通过过表达或敲降特定 piRNA 增强蜜蜂对病原的抵抗力; 也可以开发基于 piRNA 的 RNAi 技术, 用于蜜蜂病毒和寄生虫的防治。在蜜蜂遗传改良方面, piRNA 参与调控蜜蜂的生长发育和繁殖性能, 通过对 piRNA 的调控可以改良蜜蜂的经济性状, 培育优良品种。本研究鉴定的参与发育和免疫调控的 piRNA, 为这些应用提供了重要的候选分子。近期, 本团队成功建立蜜蜂个体水平的 piRNA 过表达和敲降技术体系 (Sun *et al.*, 2023)。下一步的工作重点是针对本研究初步验证的 7 个 piRNA 进行过表达和敲降研究, 以探究它们在中华蜜蜂工蜂中肠发育及免疫应答过程中的调控功能和作用机制。

## 参考文献 (References)

- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S,

- Nakano T, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T, 2006. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442(7099): 203–207.
- Blair CD, 2019. Deducing the role of virus genome-derived PIWI-associated RNAs in the mosquito-arbovirus arms race. *Frontiers in Genetics*, 10: 1114.
- Chen D, Du Y, Chen H, Fan Y, Fan X, Zhu Z, Wang J, Xiong C, Zheng Y, Hou C, Diao Q, Guo R, 2019. Comparative identification of microRNAs in *Apis cerana cerana* workers' midguts in response to *Nosema ceranae* invasion. *Insects*, 10(9): 258.
- Cossart P, Helenius A, 2014. Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(8): a016972.
- Fan XX, Long Q, Sun MH, Guo YL, Zhao HD, Song YM, Kang YX, Gu XY, Chen DF, Guo R, 2022. Identification and analysis of piRNAs in the midgut of *Apis mellifera ligustica* workers. *Acta Entomologica Sinica*, 65(6): 684–694. [范小雪, 隆琦, 孙明会, 郭意龙, 赵浩东, 宋岳梅, 康育欣, 顾小雨, 陈大福, 郭睿, 2022. 意大利蜜蜂工蜂中肠 piRNA 的鉴定与分析. 昆虫学报, 65(6): 684–694.]
- Feng M, Kolliopoulou A, Zhou YH, Fei SG, Xia JM, Swevers L, Sun JC, 2021. The piRNA response to BmNPV infection in the silkworm fat body and midgut. *Insect Science*, 28(3): 662–679.
- Geng T, Lv DD, Huang YX, Hou CX, Qin GX, Guo XJ, 2016. JAK/STAT signaling pathway-mediated immune response in silkworm (*Bombyx mori*) challenged by *Beauveria bassiana*. *Gene*, 595(1): 69–76.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ, 2008. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue): D154–D158.
- Guo Z, Kang S, Sun D, Gong L, Zhou J, Qin J, Guo L, Zhu L, Bai Y, Ye F, Wu Q, Wang S, Crickmore N, Zhou X, Zhang Y, 2020. MAPK-dependent hormonal signaling plasticity contributes to overcoming *Bacillus thuringiensis* toxin action in an insect host. *Nature Communications*, 11(1): 3003.
- Hanusek K, Poletajew S, Kryst P, Piekietko-Witkowska A, Bogusławska J, 2022. piRNAs and PIWI proteins as diagnostic and prognostic markers of genitourinary cancers. *Biomolecules*, 12(2): 186.
- Hong AW, Meng Z, Guan KL, 2016. The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 13(6): 324–337.
- Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov DV, Blaser H, Raz E, Moens CB, Plasterk RH, Hannon GJ, Draper BW, Ketting RF, 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*, 129(1): 69–82.
- Huang SK, 2010. Honey Bee Physiology. China Agriculture Press, Beijing. 24–25. [黄少康, 2010. 蜜蜂生理学. 北京: 中国农业出版社. 24–25.]
- Huang X, Hu H, Webster A, Zou F, Du J, Patel D, Sachidanandam R, Toth K, Aravin A, Li S, 2021. Binding of guide piRNA triggers methylation of the unstructured N-terminal region of Aub leading to assembly of the piRNA amplification complex. *Nature Communications*, 12(1): 4061.
- Jones BC, Wood JG, Chang C, Tam AD, Franklin MJ, Siegel ER, Helfand SL, 2016. A somatic piRNA pathway in the *Drosophila* fat body ensures metabolic homeostasis and normal lifespan. *Nature Communications*, 7: 13856.
- Kawaoka S, Hayashi N, Katsuma S, Kishino H, Kohara Y, Mita K, Shimada T, 2008a. *Bombyx* small RNAs: Genomic defense system against transposons in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12): 1058–1065.
- Kawaoka S, Minami K, Katsuma S, Mita K, Shimada T, 2008b. Developmentally synchronized expression of two *Bombyx mori* Piwi subfamily genes, SIWI and BmAGO3 in germ-line cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(4): 755–760.
- Khan SA, Kojour MAM, Han YS, 2023. Recent trends in insect gut immunity. *Frontiers in Immunology*, 14: 1272143.
- Kiuchi T, Shoji K, Izumi N, Tomari Y, Katsuma S, 2023. Non-gonadal somatic piRNA pathways ensure sexual differentiation, larval growth, and wing development in silkworms. *PLoS Genetics*, 19(9): e1010912.
- Kolliopoulou A, Santos D, Taning CNT, Wynant N, Vanden Broeck J, Smagghe G, Swevers L, 2019. PIWI pathway against viruses in insects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(6): e1555.
- Kotov AA, Adashev VE, Godneeva BK, Ninova M, Shatskikh AS, Bazylev SS, Aravin AA, Olenina LV, 2019. piRNA silencing contributes to interspecies hybrid sterility and reproductive isolation in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 47(8): 4255–4271.
- Liao Z, Jia Q, Li F, Han Z, 2010. Identification of two piwi genes and their expression profile in honeybee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 74(2): 91–102.
- Liu P, Dong Y, Gu J, Puthiyakunnon S, Wu Y, Chen XG, 2016. Developmental piRNA profiles of the invasive vector mosquito *Aedes albopictus*. *Parasites & Vectors*, 9(1): 524.
- Long Q, Sun MH, Fan XX, Cai ZB, Zhang KY, Wang SY, Zhang JX, Gu XY, Song YX, Chen DF, Fu ZM, Guo R, Niu QS, 2022. First identification and investigation of piRNAs in the larval gut

- of the Asian honeybee, *Apis cerana*. *Insects*, 14(1): 16.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK, 2010. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1): 139–140.
- Sakai H, Sumitani M, Chikami Y, Yahata K, Uchino K, Kiuchi T, Katsuma S, Aoki F, Sezutsu H, Suzuki MG, 2016. Transgenic expression of the piRNA-resistant masculinizer gene induces female-specific lethality and partial female-to-male sex reversal in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Genetics*, 12(8): e1006203.
- Sato K, Siomi MC, 2020. The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells. *Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences*, 96(1): 32–42.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T, 2003. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11): 2498–2504.
- Steinhart Z, Angers S, 2018. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development*, 145(11): dev146589.
- Sun M, Fan X, Long Q, Zang H, Zhang Y, Liu X, Feng P, Song Y, Li K, Wu Y, Jiang H, Chen D, Guo R, 2023. First characterization and regulatory function of piRNAs in the *Apis mellifera* larval response to *Ascosphaera apis* invasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22): 16358.
- Sun YH, Lee B, Li XZ, 2022. The birth of piRNAs: How mammalian piRNAs are produced, originated, and evolved. *Mammalian Genome*, 33(2): 293–311.
- Sun Y, Wang R, Du K, Zhu J, Zheng J, Xie L, Pereira A, Zhang C, Ricci E, Li X, 2021. Coupled protein synthesis and ribosome-guided piRNA processing on mRNAs. *Nature Communications*, 12(1): 5970.
- Takase N, Otsu M, Hirakata S, Ishizu H, Siomi M, Kawai G, 2022. T-hairpin structure found in the RNA element involved in piRNA biogenesis. *RNA*, 28(4): 541–550.
- Vourekas A, Zheng K, Fu Q, Maragkakis M, Alexiou P, Ma J, Pillai RS, Mourelatos Z, Wang PJ, 2015. The RNA helicase MOV10L1 binds piRNA precursors to initiate piRNA processing. *Genes & Development*, 29(6): 617–629.
- Watson OT, Buchmann G, Young P, Lo K, Remnant EJ, Yagound B, Shambrook M, Hill AF, Oldroyd BP, Ashe A, 2022. Abundant small RNAs in the reproductive tissues and eggs of the honey bee, *Apis mellifera*. *BMC Genomics*, 23(1): 257.
- Watts C, 2022. Lysosomes and lysosome-related organelles in immune responses. *FEBS Open Bio*, 12(4): 678–693.
- Wu X, Pan Y, Fang Y, Zhang J, Xie M, Yang F, Yu T, Ma P, Li W, Shu Y, 2020. The biogenesis and functions of piRNAs in human diseases. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 21: 108–120.
- Pyrkova A, Akhmetova K, Zhanuzakov M, Tauassarova M, Rakhmetulina A, Niyazova R, Orazova S, Zielenkiewicz P, Ivashchenko A, 2026. Regulatory potential of piRNAs targeting Klotho and other genes. *Genes*, 17(2): 241.
- Xu YJ, Long Q, Fan XX, Ye YP, Zhang KY, Zhang JX, Zhao HD, Yao YT, Fu ZM, Chen DF, Guo R, Ji T, Lin ZG, 2022. Transcriptome-wide characterization of piRNAs during the developmental process of European honey-bee larval guts. *Genes*, 13(10): 1879.
- Xu YJ, Sun MH, Liu JM, Guo YL, Hu Y, Zhang JX, Zhao X, Zhang KY, Xiong CL, Chen DF, Guo R, 2022. Differential expression profiles and potential function of piRNAs in *Apis mellifera ligustica* workers under *Nosema ceranae* stress. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 59(3): 178–186. [许雅静, 孙明会, 刘佳美, 郭意龙, 胡颖, 张佳欣, 赵萧, 张凯遥, 熊翠玲, 陈大福, 郭睿, 2022. 东方蜜蜂微孢子虫胁迫下意大利蜜蜂工蜂的 piRNA 差异表达谱及潜在功能. 四川大学学报(自然科学版), 59(3): 178–186.]
- Yamashiro H, Siomi M, 2018. PIWI-Interacting RNA in *Drosophila*: Biogenesis, transposon regulation, and beyond. *Chemical Reviews*, 118(8): 4404–4421.
- Yu S, Luo F, Xu Y, Zhang Y, Jin LH, 2022. *Drosophila* innate immunity involves multiple signaling pathways and coordinated communication between different tissues. *Frontiers in Immunology*, 13: 905370.
- Yu T, Koppetsch BS, Pagliarani S, Johnston S, Silverstein NJ, Luban J, Chappell K, Weng Z, Theurkauf WE, 2019. The piRNA response to retroviral invasion of the koala genome. *Cell*, 179(3): 632–643.
- Zeng T, Jaffar S, Xu Y, Qi Y, 2022. The intestinal immune defense system in insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23): 15132.
- Zhang D, Tu S, Stubna M, Wu WS, Huang WC, Weng Z, Lee HC, 2018. The piRNA targeting rules and the resistance to piRNA silencing in endogenous genes. *Science*, 359(6375): 587–592.