



LncRNA13164 通过 ace-miR-4968-y 调节中华蜜蜂幼虫对蜜蜂球囊菌侵染的免疫应答

付中民^{1,2#}, 顾小雨^{1#}, 胡颖¹, 赵浩东¹, 祝智威¹, 张浩宇¹, 吉挺³, 牛庆生⁴, 陈大福^{1,2}, 郭睿^{1,2*}

1 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

2 福建省蜂疗研究所, 福建 福州 350002

3 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225000

4 吉林省养蜂科学研究所, 吉林 吉林 132000

付中民, 顾小雨, 胡颖, 赵浩东, 祝智威, 张浩宇, 吉挺, 牛庆生, 陈大福, 郭睿. LncRNA13164 通过 ace-miR-4968-y 调节中华蜜蜂幼虫对蜜蜂球囊菌侵染的免疫应答[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1047-1059.

FU Zhongmin, GU Xiaoyu, HU Ying, ZHAO Haodong, ZHU Zhiwei, ZHANG Haoyu, JI Ting, NIU Qingsheng, CHEN Dafu, GUO Rui. LncRNA13164 regulates immune response of *Apis cerana cerana* larvae to *Ascosphaera apis* infection via ace-miR-4968-y[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(3): 1047-1059.

摘要: 【目的】长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 可通过竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 等多种方式发挥重要的调控作用, 但蜜蜂 lncRNA 的功能研究至今依然缺失, lncRNA 在蜜蜂免疫应答中的作用尚不清楚。本研究旨在揭示中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)幼虫响应蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)侵染的免疫应答中 lncRNA 的调控功能及作用机制。笔者团队前期通过深度测序和生物信息学分析发现, lncRNA13164 与 ace-miR-4968 存在靶向关系且潜在参与在中蜂幼虫对蜜蜂球囊菌侵染的应答。【方法】利用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测蜜蜂球

资助项目: 国家自然科学基金(31702190); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(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); 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)科研扶持项目(付中民); 福建省大学生创新创业训练计划项目(S202110389073, S202110389070)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31702190), the Special fund for the construction of national modern agricultural industrial technology system (CARS-44-KXJ7), the General Project of Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J01131334), the Master Supervisor Team Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (GUO Rui), the Scientific Research Project of College of Animal Sciences (College of Bee Science) of Fujian Agriculture and Forestry University (FU Zhongmin), and the Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (S202110389073, S202110389070).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: ruiguo@fafu.edu.cn

Received: 2022-07-11; Accepted: 2022-10-13; Published online: 2022-10-31

囊菌接种后中蜂幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达谱。采用 ILoc-LncRNA 软件预测 lncRNA13164 的亚细胞定位。联用 RNAhybrid、Miranda 和 TargetScan 软件预测 lncRNA13164 靶向的 miRNA 及 miRNA 靶向的 mRNA。通过 PCR 和 RT-qPCR 验证 lncRNA13164 和 ace-miR-4968 的真实表达及二者间的结合关系。通过饲喂 dsRNA 对蜜蜂球囊菌侵染的中蜂幼虫肠道内 lncRNA13164 进行 RNAi, 进而检测 lncRNA13164 的沉默效果及 ace-miR-4968 和 3 个免疫基因(*stk*、*e3ul* 和 *orl*)的相对表达量。【结果】相较于未接种组, lncRNA13164 的表达量在蜜蜂球囊菌接种组 4 日龄幼虫肠道内上调, 在 5 和 6 日龄幼虫肠道内显著上调。lncRNA13164 可靶向 ace-miR-4968 等 15 个 miRNA 并形成 1 个调控网络。ace-miR-4968 共靶向 79 个基因, 可注释到 17 个基因本体论(gene ontology, GO)条目和 85 条京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路。lncRNA13164 与 ace-miR-4968 在中蜂幼虫肠道内均真实表达。相较于未接种组, 接种组 5 日龄幼虫肠道内 ace-miR-4968-y 极显著下调表达, 与 lncRNA13164 的表达趋势相反。相较于 dsRNA-*egfp* 饲喂组, dsRNA-lncRNA13164 饲喂组 5 和 6 日龄幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达量均极显著下调($P<0.01$), 沉默效率分别为 66.05%和 56.45%。沉默 lncRNA13164 后, ace-miR-4968 的表达量在 5 日龄幼虫肠道内极显著上调, *stk*、*e3ul* 和 *orl* 的表达量均显著下调($P<0.05$)。【结论】饲喂 dsRNA 可有效沉默中蜂幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达, lncRNA13164 通过 ace-miR-4968 调控丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-protein kinase Doa isoform X4)基因 *stk*、E3 泛素蛋白连接酶(E3 ubiquitin-protein ligase, MYLIP)基因 *e3ul* 和抗氧化蛋白 1 亚型 X6 (oxidation resistance protein 1 isoform X6)基因 *orl* 表达, 进而介导宿主对蜜蜂球囊菌侵染的免疫应答。

关键词: 中华蜜蜂; 蜜蜂球囊菌; lncRNA13164; ace-miR-4968; 竞争性内源 RNA; 免疫应答

LncRNA13164 regulates immune response of *Apis cerana cerana* larvae to *Ascosphaera apis* infection via ace-miR-4968-y

FU Zhongmin^{1,2#}, GU Xiaoyu^{1#}, HU Ying¹, ZHAO Haodong¹, ZHU Zhiwei¹, ZHANG Haoyu¹, JI Ting³, NIU Qingsheng⁴, CHEN Dafu^{1,2}, GUO Rui^{1,2*}

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

2 Fujian Province Institute of Apitherapy, Fuzhou 350002, Fujian, China

3 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225000, Jiangsu, China

4 Jilin Province Institute of Apicultural Science, Jilin 132000, Jilin, China

Abstract: [Objective] Long non-coding RNA (lncRNA) usually functions as competing endogenous RNA (ceRNA) to play crucial regulatory roles. As no study of the function of bee lncRNA is available, the role of lncRNA in the immune response of bee is unclear. This study aims to reveal the regulatory function and mechanism of lncRNA in immune response of *Apis cerana cerana* larvae to *Ascosphaera apis* infection. Through deep sequencing and bioinformatics analysis, we have found that lncRNA targets ace-miR-4968 and involves in the

response of *A. c. cerana* larvae to *A. apis* infection. **[Methods]** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to quantify the expression of lncRNA13164 in larval guts of *A. c. cerana* after *A. apis* inoculation. ILoc-LncRNA was employed to predict subcellular localization of lncRNA13164. RNAhybrid, Miranda, and TargetScan were applied to predict target miRNAs of lncRNA13164 and miRNA-targeted mRNAs. PCR and RT-qPCR were performed to validate expression of lncRNA13164 and ace-miR-4968 as well as their potential binding relationship. The larvae which had been infected with *A. apis* were fed with dsRNA for RNAi of lncRNA13164 in larval guts, followed by determination of the silencing effect on lncRNA13164 and relative expression of ace-miR-4968 and three immune genes (*stk*, *e3ul*, and *orl*). **[Results]** The expression of lncRNA13164 was up-regulated in guts of 4-day-old larvae and significantly up-regulated in guts of 5- and 6-day-old larvae in the inoculation group as compared with that in the non-inoculation group. lncRNA13164 targeted 15 miRNAs including ace-miR-4968, which formed a regulatory network. ace-miR-4968 putatively targeted 79 genes which were involved in 17 gene ontology (GO) terms and 85 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathways. Both lncRNA13164 and ace-miR-4968 were expressed in *A. c. cerana* larval gut. The expression of lncRNA13164 in guts of both 5- and 6-day-old larvae was significantly down-regulated as compared with that in the dsRNA-*egfp*-fed group, and silencing efficiencies were 66.05% and 56.45%, respectively. After the silencing of lncRNA13164, the expression of ace-miR-4968 was up-regulated ($P<0.01$) in guts of 5-day-old larvae, while expression of *stk*, *e3ul*, and *orl* was down-regulated ($P<0.05$). **[Conclusion]** lncRNA13164 in *A. c. cerana* larval guts can be silenced through the feeding of specific dsRNA. lncRNA13164 regulates the expression of serine/threonine-protein kinase Doa isoform X4 gene *stk*, E3 ubiquitin-protein ligase (MYLIP) gene *e3ul*, and oxidation resistance protein 1 isoform X6 gene *orl* via ace-miR-4968 and further mediates the immune response of host to *A. apis* invasion.

Keywords: *Apis cerana cerana*; *Ascosphaera apis*; lncRNA13164; ace-miR-4968; competing endogenous RNA (ceRNA); immune response

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 nt 且含有 2 个及以上外显子的非编码 RNA (ncRNA), 起初被认为是转录过程产生的副产物^[1]。但随着研究的逐渐深入, lncRNA 被证实参与调控发育、生殖和免疫防御等诸多生物学过程^[2-3]。lncRNA 具有灵活多样的调控方式, 包括通过顺式作用调控上下游基因表达^[2-4], 通过反式作用调节共表达基因^[5], 编码具有生物学活性的蛋白或小肽^[6]。

借助高通量测序技术和生物信息学, 人类 (*Homo sapiens*)^[7]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[8] 和裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)^[9] 等动植物和微生物的 lncRNA 被陆续鉴定出来。在昆虫中, 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)^[10]、家蚕 (*Bombyx mori*)^[11] 和小菜蛾 (*Plutella xylostella*)^[12] 等的 lncRNA 研究也已见诸报道。目前, lncRNA 的功能和作用机制研究主要集中在人类等少数模式生物^[7,13], 对于绝大多数昆虫,

相关研究仍处于起步阶段。前人对蜜蜂的 lncRNA 进行了一些研究,但主要集中在生物信息学方面,例如 Humann 等^[14]的研究发现, lncRNA lnccov1 在西方蜜蜂(*Apis mellifera*)工蜂和蜂王胚胎发育过程中差异表达, lnccov1 在工蜂胚胎形成期影响卵巢管细胞的自噬与凋亡; Jayakodi 等^[15]在东方蜜蜂(*Apis cerana*)和西方蜜蜂中分别预测出 2 470 和 1 514 条 lincRNA,其中 11 条 lincRNA 特异性调控中华蜜蜂对 SBV 病毒感染的应答。到目前为止,蜜蜂 lncRNA 的功能和机制研究仍然缺失。

中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 简称中蜂)是东方蜜蜂的指名亚种,也是我国特有的优良蜂种,已高度适应我国自然地理环境,在生态平衡维持和农作物授粉等方面发挥重要作用^[16]。蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)是一种专性感染蜜蜂幼虫的真菌病原,导致的白垩病在养蜂生产中常年反复发生,给养蜂业造成较大损失^[17]。笔者团队前期证实蜜蜂球囊菌对中蜂工蜂和雄蜂幼虫具有侵染性^[18],并对蜜蜂球囊菌和中蜂的 lncRNA 进行了系统鉴定^[19-21]。然而, lncRNA 是否及如何参与调节中蜂幼虫对蜜蜂球囊菌胁迫的应答尚不清楚。研究表明含有 miRNA 反应元件(miRNA response element, MRE)的 lncRNA 能通过吸附 miRNA 调节下游靶基因表达,进而调节具体的生物学过程,被称为竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)机制,已在人^[7]、小鼠(*Mus musculus*)^[22]和番茄(*Solanum lycopersicum*)^[23]等物种中被证实。但在蜜蜂中 ceRNA 机制相关研究仍然缺失。

笔者团队前期已结合基于链特异性 cDNA 建库的 RNA-Seq 与 small RNA-Seq 技术对蜜蜂球囊菌接种及未接种的中蜂 4、5 和 6 日龄幼虫肠道组织进行测序,获得了高质量的转录组数

据^[20-22],并发现接种后 4、5 和 6 日龄幼虫肠道内 ace-miR-4968 的表达量均极显著下调($P < 0.0001$),且 ace-miR-4968 与 lncRNA13164 与之间存在潜在结合关系(未发表数据)。为探究 lncRNA13164 能否作为 ceRNA 靶向 ace-miR-4968 进而调节中蜂幼虫对蜜蜂球囊菌感染的免疫应答,本研究检测在蜜蜂球囊菌感染过程中宿主 lncRNA13164 的表达谱,对 lncRNA13164 靶向的 miRNA 以及 miRNA 靶向的 mRNA 进行预测,进而通过饲喂 dsRNA 对幼虫肠道内 lncRNA13164 进行 RNAi,并测定沉默 lncRNA13164 对 ace-miR-4968-y 及 3 个免疫基因表达的影响,以期揭示 lncRNA13164 通过 ace-miR-4968-y 调控宿主免疫应答的功能及作用机制,并为中蜂幼虫与蜜蜂球囊菌的相互作用提供新见解。

1 材料与方法

1.1 材料

中蜂幼虫和蜜蜂球囊菌菌株由福建农林大学动物科学学院(蜂学学院)蜜蜂保护课题组提供^[20]。

1.2 蜜蜂球囊菌感染过程中宿主 lncRNA13164 的 RT-qPCR 检测

按照笔者团队已建立的技术流程^[19,24]进行蜜蜂球囊菌活化与孢子纯化,然后利用血球计数板进行孢子计数,制备好的纯净孢子立即用于接种中蜂幼虫。

选择群势较强且外观健康(无白垩病症状且 PCR 鉴定为阴性)^[25]的 3 群中蜂群作为实验蜂群。按照文献^[25]移取 2 日龄幼虫至预置 1 000 μ L 饲料的 6 孔细胞培养板,放入恒温恒湿箱进行饲养,条件为: $(35.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 相对湿度(relative humidity, RH) 90%。24 h 后将 3 日龄幼虫转移至 48 孔细胞培养板。处理组 3 日龄幼虫饲喂含蜜

蜂球囊菌孢子(终浓度为 1×10^7 个/mL)的饲料, 对照组 3 日龄幼虫饲喂不含孢子的饲料。此后每日清理食物残留, 更换新鲜饲料。分别剖取处理组和对照组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道, 每 3 只肠道放入 1 个 RNA-Free 离心管, 液氮速冻后转移至 -80°C 超低温冰箱保存。上述实验进行 3 次生物学重复。将对照组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道样品分别命名为 AcCK1、AcCK2 和 AcCK3, 处理组 4、5 和 6 日龄幼虫肠道样品分别命名为 AcT1、AcT2 和 AcT3。

利用 RNA 抽提试剂盒(Promega 公司)分别提取上述 6 组肠道样品的总 RNA, 作为模板进行反转录得到 cDNA 模板。反应在 ABI QuantStudio 3 荧光定量 PCR 系统(ABI 公司)上进行。反应体系(20 μL)包括: SYBR Green Dye 10 μL , 上下游引物各 1 μL (2.5 pmol/ μL), cDNA 模板 1 μL , DEPC 水补至 20 μL 。反应条件为: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 15 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 20 s, 共 40 个循环, 熔解曲线程序默认系统设置。选择肌动蛋白基因 *actin* (GenBank 登录号: 107999330)作为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[26]计算 lncRNA13164 的相对表达量。每个反应均进行 3 次平行重复和 3 次技术重复。利用 Graphpad Prism 8 软件进行数据处理及绘图, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示并进行 Student's *t* 检验。

1.3 lncRNA13164 的亚细胞定位预测及靶向分析

利用在线工具 iLoc-LncRNA (<http://lin-group.cn/server/iLoc-LncRNA/>)预测 lncRNA13164 的亚细胞定位。笔者团队前期利用 small RNA-Seq 技术对蜜蜂球囊菌接种及未接种的中蜂 4、5 和 6 日龄幼虫肠道样品进行测序, 获得了高质量的 miRNA 组学数据^[27]。通过联用 RNAhybrid^[28]、Miranda^[29] 和 TargetScan^[30] 软件预测 lncRNA13164 靶向的 miRNA 及 miRNA 靶向的

mRNA。通过 Cytoscape 软件^[31] (<https://cytoscape.org/>)对 lncRNA13164 进行调控网络可视化, 阈值设置为: 结合自由能小于 -22 kcal/mol 。

1.4 ace-miR-4968-y 的靶基因预测及数据库注释

采用 BLAST 工具将 ace-miR-4968-y 的靶 mRNA 比对到 Nr 数据库(<https://www.biostars.org/p/235632/>)以获得相应的蛋白功能注释, 同时将上述靶 mRNA 比对到 GO (<http://geneontology.org/>)和 KEGG (<https://www.kegg.jp/>)数据库以获得相应的功能和通路注释。

1.5 lncRNA13164 和 ace-miR-4968-y 的分子验证

根据 1.3 节的靶向预测结果, 利用 Office PowerPoint 软件(Microsoft 公司)绘制 lncRNA13164 与 ace-miR-4968-y 之间的潜在靶向结合关系。根据 ace-miR-4968-y 的核酸序列, 设计特异性 stem-loop 引物和上游引物(F)及通用下游引物(R)。将 1.2 节获得的 5 日龄幼虫肠道总 RNA 作为模板分为 2 份, 其中 1 份利用随机引物(random primer)和多聚胸腺嘧啶引物 oligo(dT)₁₈ 反转录得到 cDNA 作为 lncRNA13164 的 PCR 和内参 U6 (F: 5'-GTTAGGCTTTGACGATTTCG-3', R: 5'-GGCATTCTCCACCAGGTA-3')的 qPCR 模板, 另 1 份利用 stem-loop 引物进行反转录得到 cDNA 作为 ace-miR-4968-y 的 PCR 和 qPCR 模板。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[25]对 ace-miR-4968-y 进行相对定量。反应体系和数据处理同 1.2 节, 反应条件为: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 15 s, 55°C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环, 熔解曲线程序默认系统设置。

1.6 dsRNA 合成与饲喂及 RNAi 效果检测

根据预测出的 lncRNA13164 序列, 利用

Primer Premier 6 软件设计特异性上下游引物, 以 1.2 节获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。参照杜宇等^[24]的方法回收目的片段(约 300 bp)并进行 TA 克隆, 送菌液至生工生物(上海)股份有限公司进行 Sanger 测序。取少量菌液加入新鲜 LB 液体培养基(含氨苄抗生素浓度为 0.1 mg/mL), 摇床振荡培养 16 h。利用 FastPure Plasmid Mini Kit 试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)提取质粒。根据 lncRNA13164 序列设计合成扩增干扰片段的上下游引物, 并在引物的 5' 端添加 T7 启动子序列(TAATACGACTCACTATA)。反应体系和程序同 1.2 节。PCR 产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段作为模板, 使用 T7 RNAi Transcription Kit 试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)合成 lncRNA13164 的 dsRNA (dsRNA-lncRNA13164)。按照上述方法合成阴性对照 *egfp* 基因的 dsRNA (dsRNA-*egfp*)。

移取 2 日龄幼虫至 48 孔培养板, 在温度 (35±0.5) °C, 相对湿度(RH) 95% 的条件下饲养 24 h, 处理组 3 日龄幼虫单头饲喂 1 µg dsRNA-lncRNA13164, 对照组 3 日龄幼虫单头饲喂 1 µg dsRNA-*egfp*, 待 dsRNA 被幼虫全部摄入后在孔内添加新鲜饲料, 每隔 24 h 更换 1 次饲料, 连续饲养至 6 日龄。分别剖取 5 和 6 日龄肠道后充分研磨提取总 RNA, 反转录得到相应的 cDNA 模板。通过 qPCR 检测饲喂 dsRNA 后幼虫肠道内 lncRNA13164 的相对表达量。

1.7 沉默 lncRNA13164 后 ace-miR-4968-y 的 RT-qPCR 检测

将 1.6 节获得的沉默 lncRNA13164 后的幼虫肠道 RNA 分为 2 份, 其中 1 份利用 stem-loop 引物反转录得到 cDNA 作为 ace-miR-4968-y 的 qPCR 模板, 另 1 份利用 random primers 和 oligo(dT)₁₈ 反转录得到 cDNA 作为 ace-miR-4968-y

的内参 *U6* (GenBank 登录号: XM_017048274.2) 的 qPCR 模板。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[25] 计算 ace-miR-4968-y 的相对表达量。

1.8 沉默 lncRNA13164 后 ace-miR-4968-y 靶向的免疫基因的 RT-qPCR 检测

根据 1.3 节的靶向预测结果并查阅国内外相关文献, 选取 ace-miR-4968-y 靶向的 3 个免疫基因进行 RT-qPCR 检测, 包括丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine-protein kinase Doa isoform X4) 基因 *stk* (GenBank 登录号: XM_017064314.1), E3 泛素蛋白连接酶(E3 ubiquitin-protein ligase, MYLIP) 基因 *e3ul* (GenBank ID: XM_017061503.1) 和抗氧化蛋白 1 亚型 X6 (oxidation resistance protein 1 isoform X6) 基因 *orl* (GenBank ID: XM_017056306.1)。利用 Primer Premier 6 软件分别设计相应的特异性引物。参照 1.2 节中的方法进行中蜂工蜂幼虫肠道的 RNA 提取和反转录得到 cDNA 模板。以 actin 基因(F: 5'-CAAAGCC TGTGATGTGGA-3', R: 5'-GCCAAGTTTCTGA TTTCCC-3') 作为内参。每个反应均进行 3 次技术重复和 3 次平行重复。反应体系及数据处理同 1.2 节, 反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 40 个循环, 熔解曲线程序默认系统设置。

2 结果与分析

2.1 蜜蜂球囊菌侵染过程中中蜂幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达谱

RT-qPCR 结果显示相较于未接种组, 蜜蜂球囊菌接种组 4 日龄幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达量上调, 但组间差异不显著 ($P>0.05$), 5 和 6 日龄幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达量显著上调 ($P<0.05$) (图 1), 说明蜜蜂球囊菌侵染激活了 lncRNA13164 表达, 宿主通过上调表达 lncRNA13164 潜在参与调节侵染应答。

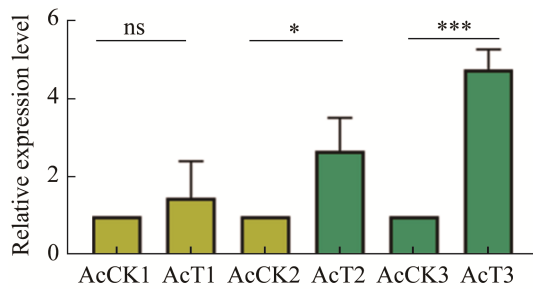


图 1 蜜蜂球囊菌侵染的中蜂幼虫肠道内 lncRNA13164 表达谱检测

Figure 1 Detection of expression profile of lncRNA13164 in *Apis cerana cerana* larval guts infected by *A. apis*. Relative expression levels of host lncRNA13164 during *A. apis* infection, data were presented as mean \pm SD and subjected to Student's *t* test, ns: $P>0.05$, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, and ****: $P<0.0001$.

2.2 LncRNA13164 的亚细胞定位预测及靶向分析

LncRNA13164 同时定位于细胞核和细胞质, 但主要定位于细胞质, 说明 lncRNA13164 可能作为 ceRNA 发挥作用。LncRNA13164 及其靶向的 15 个 miRNA 可形成 1 个调控网络(图 2);

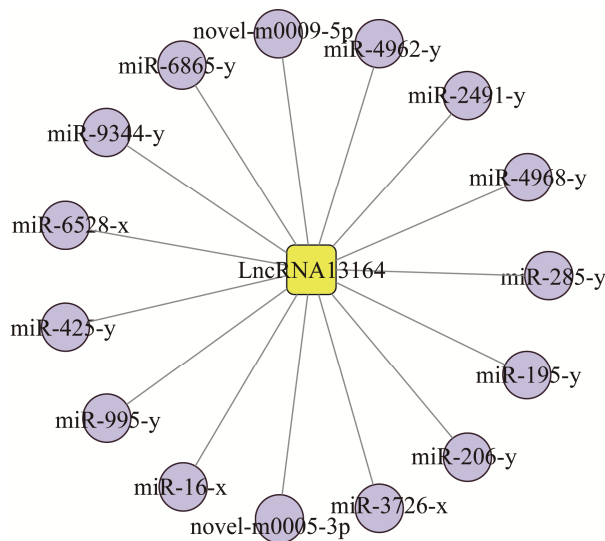


图 2 LncRNA13164 与靶 miRNA 之间的调控网络
Figure 2 Regulatory network between lncRNA13164 and target miRNAs.

lncRNA13164 与 ace-miR-4968 之间的结合自由能最小($\Delta G=-48.4$ kcal/mol), 且 ace-miR-4968 在 5 和 6 日龄比较组的表达量均显著下调(\log_2 FC=-9.63, \log_2 FC=-9.86, $P<0.0001$), 而 lncRNA13164 在 5 和 6 日龄比较组的表达均上调表达(\log_2 FC=0.38, \log_2 FC=0.41, $P>0.05$)。以上结果进一步说明 lncRNA13164 可能通过 ace-miR-4968 发挥 ceRNA 调控作用。

进一步分析发现, ace-miR-4968 共靶向 79 个基因, 可注释 17 个 GO 条目, 包括细胞进程和代谢进程等 6 条生物学进程相关的条目, 结合和催化活性等 5 条分子功能相关的条目, 以及细胞和细胞组件等 6 条细胞组分相关的条目(图 3A); 上述靶基因还可注释到 Wnt 信号通路、代谢进程及 RNA 转运体等 85 条 KEGG 通路(图 3B)。

2.3 LncRNA13164 和 ace-miR-4968 的表达验证

如图 4A 所示, lncRNA13164 和 ace-miR-4968 之间具有潜在靶向结合关系。琼脂糖凝胶电泳结果显示, lncRNA13164 和 ace-miR-4968 的扩增片段单一且符合预期大小(约 367 bp 和 64 bp), 说明二者在中蜂幼虫肠道中真实表达(图 4B、4C)。RT-qPCR 结果显示相较于未接种组, 接种组 5 日龄幼虫肠道内 ace-miR-4968-y 的表达量极显著下调(图 4D), 与 lncRNA13164 的表达趋势相反(图 1), 说明 lncRNA13164 可能通过结合 ace-miR-4968-y 发挥调控作用。

2.4 沉默 lncRNA13164 影响 ace-miR-4968 表达

蜜蜂球囊菌接种后, 相较于 dsRNA-*egfp* 饲喂组, dsRNA-lncRNA13164 饲喂组 5 和 6 日龄幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达量均极显著下调($P<0.01$), 沉默效率分别为 66.05%和 56.45%(图 5)。

进一步的 RT-qPCR 检测结果显示沉默

lncRNA13164 后, 相较于 dsRNA-*egfp* 饲喂组, dsRNA-lncRNA13164 饲喂组 5 日龄幼虫肠道内 ace-miR-4968 的表达量显著上调($P<0.01$) (图 6),

与 lncRNA13164 的表达趋势相反, 进一步说明 lncRNA13164 通过结合 ace-miR-4968-y 发挥 ceRNA 调控作用。

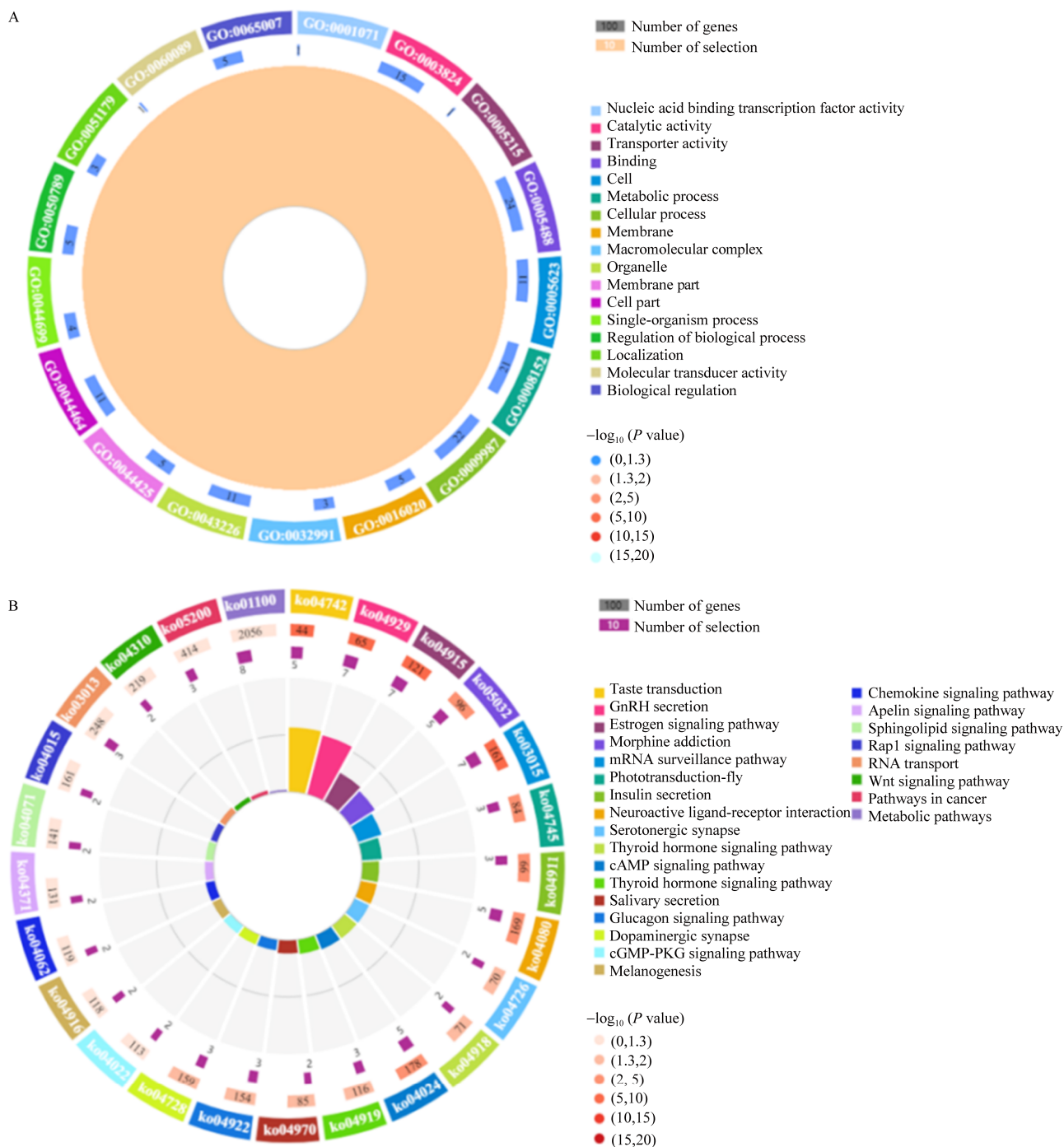


图 3 ace-miR-4968 的靶基因的 GO (A)和 KEGG (B)数据库注释

Figure 3 GO (A) and KEGG (B) database annotation of ace-miR-4968-targeted genes.

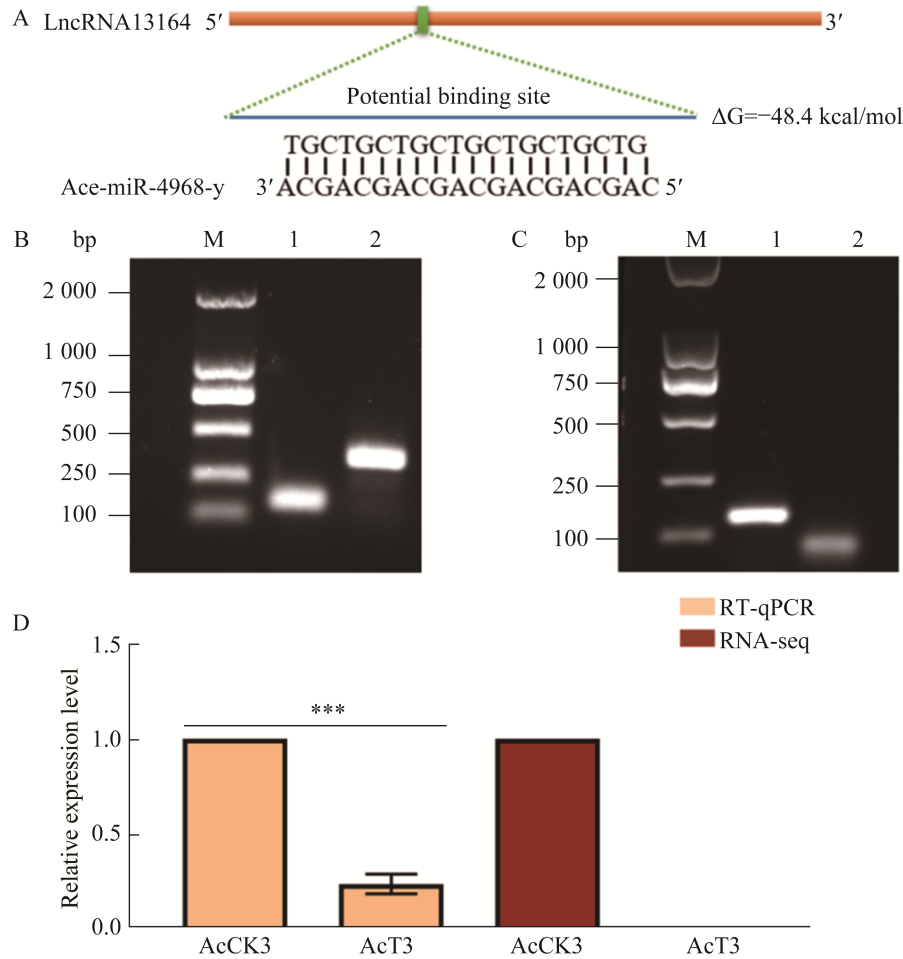


图 4 lncRNA13164 和 ace-miR-4968-y 的表达和趋势验证

Figure 4 Validation of expression and trends of lncRNA13164 and ace-miR-4968-y. A: Schematic diagram of binding relationship between lncRNA13164 and ace-miR-4968-y. B: Agarose gel electrophoresis for PCR amplification products from *actin* and lncRNA13164. Lane M: DNA marker; Lane 1: *actin*; Lane 2: lncRNA13164. C: Agarose gel electrophoresis for PCR products from *U6* and ace-miR-4968-y. Lane M: DNA marker; Lane 1: *U6*; Lane 2: ace-miR-4968-y. D: RT-qPCR validation of ace-miR-4968-y. ***: $P < 0.001$.

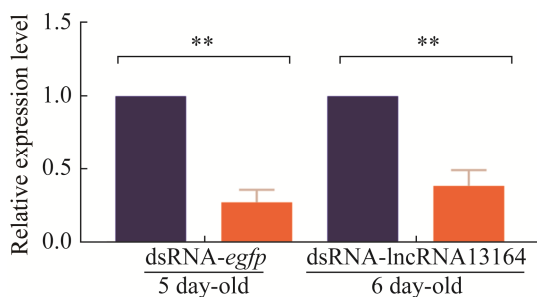


图 5 饲喂 dsRNA 后中蜂幼虫肠道内 lncRNA13164 的沉默效果测定

Figure 5 Determination of silence effect of lncRNA13164 in larval guts of *Apis cerana cerana* after feeding with dsRNA. **: $P < 0.01$.

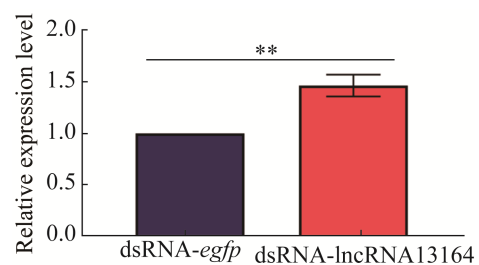


图 6 沉默 lncRNA13164 后中蜂幼虫肠道内 ace-miR-4968-y 的相对表达量

Figure 6 Relative expression level of ace-miR-4968 in *A. c. cerana* larval guts after silencing lncRNA13164. **: $P < 0.01$.

2.5 沉默 lncRNA13164 影响 3 个免疫基因表达

ace-miR-4968 与 3 个免疫基因(*stk*、*e3ul* 和 *orl*)的潜在靶向结合关系如图 7 所示。RT-qPCR 结果显示沉默 lncRNA13164 后, 相较于

dsRNA-*egfp* 饲喂组, dsRNA-lncRNA13164 饲喂组 5 日龄幼虫肠道内 *stk*、*e3ul* 和 *orl* 的表达量皆显著下调(图 7),说明 lncRNA13164 与 *stk*、*e3ul* 和 *orl* 之间存在相同的表达趋势。

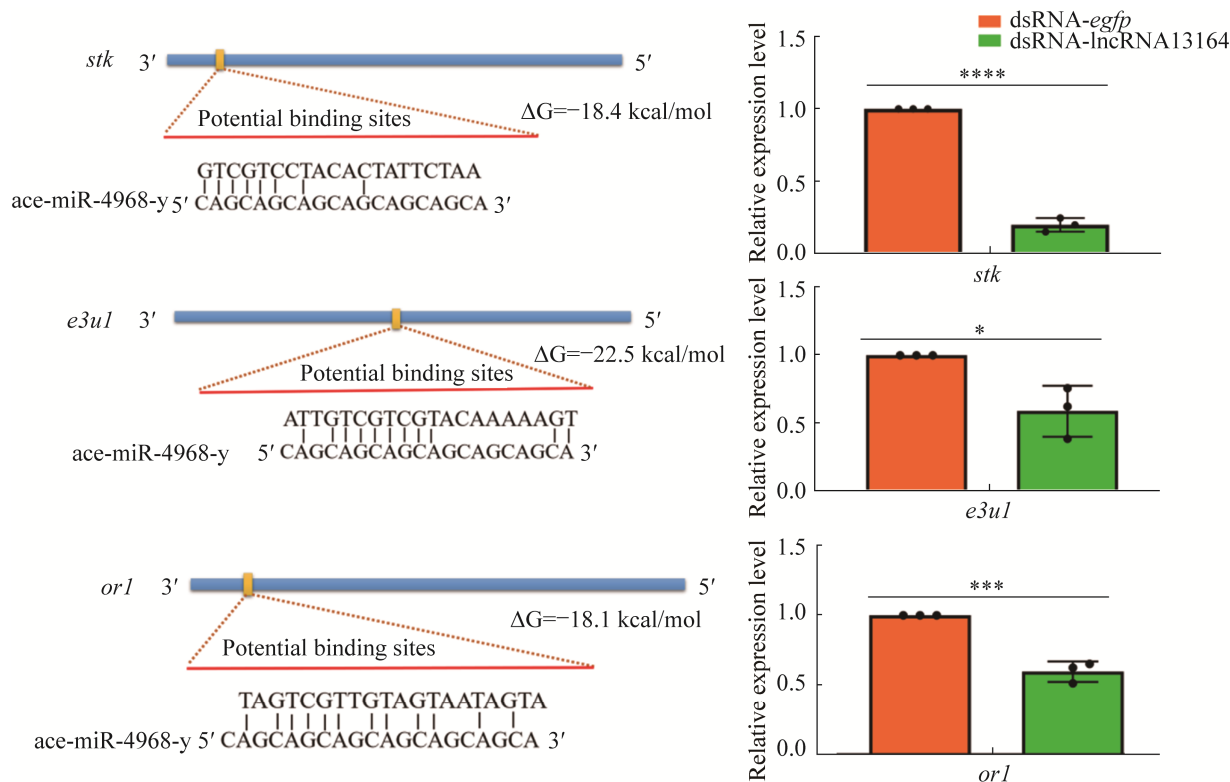


图 7 沉默 lncRNA13164 后中蜂幼虫肠道内 3 个免疫基因的相对表达量

Figure 7 Relative expression levels of three immune genes in *Apis cerana cerana* larval guts after silencing lncRNA13164. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$

3 讨论与结论

研究表明 lncRNA 在果蝇^[10]、家蚕^[11]和朱砂叶螨(*Tetranychus cinnabarinus*)^[31]等昆虫中发挥 ceRNA 调控作用。Feng 等^[32]的研究发现, 朱砂叶螨的 lncRNA_Tc13743.2 可竞争性结合 miR-133-5p, 部分解除 miR-133-5p 对解毒酶基因 *TcGSTm02* 的抑制作用, 进而增强朱砂叶螨对丁氟螨酯的抗药性。此前, 蜜蜂 lncRNA 的

ceRNA 调控作用相关研究未见报道。本研究发现蜜蜂球囊菌接种后, lncRNA13164 在中蜂 4 日龄幼虫肠道内上调表达, 在 5 和 6 日龄幼虫肠道内均显著上调表达(图 1), 暗示 lncRNA13164 参与调节宿主对蜜蜂球囊菌侵染的应答。细胞核内转录形成的 lncRNA 需要转运至细胞质进而发挥 ceRNA 作用^[3]。本研究中, 软件预测结果显示 lncRNA13164 主要定位于细胞质, 表明 lncRNA13164 可能通过 ceRNA 作用

参与调节宿主的侵染应答。另外, lncRNA13164 与 ace-miR-4968 之间存在潜在靶向关系(图 4A), 且二者在 4–6 日龄比较组的表达趋势相反。还发现 lncRNA13164 和 ace-miR-4968 在 5 日龄幼虫肠道内真实表达(图 4B、4C)。以上结果共同表明在蜜蜂球囊菌侵染过程中 lncRNA13164 可能通过靶向调控 ace-miR-4968 对宿主应答进行调节。

此前, 通过注射或饲喂 dsRNA 对果蝇^[10]和家蚕^[11]等昆虫的 lncRNA 进行沉默已见诸报道, 例如, Zhou 等^[10]的研究发现过表达果蝇的 lncRNA *CR46018* 显著上调 Toll 信号通路上的靶基因 *Dif* 和 *Dorsal* 表达, 表明宿主通过上调 *CR46018* 表达激活 Toll 信号通路进而参与对侵染的应答; Lin 等^[11]发现家蚕核多角体病毒(BmNPV)感染后家蚕脂肪体中 lnc_209997 的表达量显著下调, 而与存在靶向关系的 lnc_209997 表达量上调, 表明 BmNPV 可以通过抑制宿主细胞内 lnc_209997 的表达来提高 miR-275-5p 的表达水平, 进而表达病毒增殖。本研究发现相较于 dsRNA-*egfp* 饲喂组, dsRNA-lncRNA13164 饲喂组 5 和 6 日龄幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达量分别极显著下调 66.05% 和 56.45% (图 5), 说明通过饲喂特异性 siRNA 能有效沉默中蜂幼虫肠道内的 lncRNA13164。这是利用 dsRNA 干扰蜜蜂 lncRNA 的首例报道, 为中蜂幼虫和其他蜂种的 lncRNA 功能研究提供了实验依据。此外, RT-qPCR 结果显示沉默 lncRNA13164 后 5 日龄幼虫肠道内 ace-miR-4968 显著上调表达, 表现出与 lncRNA13164 相反的表达趋势(图 6), 进一步表明 lncRNA13164 通过结合 ace-miR-496 在宿主的侵染应答中发挥 ceRNA 调控作用。

E3 泛素连接酶在识别靶标底物过程中发挥特异性作用, 通过募集具有丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点的底物蛋白催化其泛素化并经蛋白酶体降解, 进而参与调节信号转导、细胞凋亡、细胞

周期和免疫调控等生物学进程^[33]。Yang 等^[34]发现 E3 泛素蛋白连接酶 2 靶向调节干扰素 TIR 结构域衔接蛋白的泛素化和降解过程, 进而负调控 Toll 样受体 3 介导的天然免疫和炎症应答。本研究中, 沉默 lncRNA13164 后下游靶基因 *e3ul* 的表达量显著下调, 表明 lncRNA13164 可能通过 ace-miR-4968 调控 *e3ul* 表达影响泛素介导的蛋白水解过程, 进而参与中蜂幼虫对蜜蜂球囊菌侵染的免疫应答, 但具体的作用机制仍需进一步探究。昆虫进化出多种抵御病原体侵染的机制, 包括物理和化学屏障及天然免疫系统。蜜蜂等昆虫可通过产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)来抵御病原体入侵进而维持自身内环境的稳定, 但过量的 ROS 会对机体造成氧化损伤, 因此宿主需通过抗氧化蛋白平衡体内的 ROS 调控细胞的氧化还原状态、提高细胞的应激能力^[35]。本研究发现沉默 lncRNA13164 后, 下游靶基因 *or1* 显著下调表达, 说明 lncRNA13164 可能通过 ace-miR-4968 调节 *or1* 表达以维持 ROS 动态平衡, 进而参与宿主免疫应答。下一步的工作重点是一方面对 ace-miR-4968 进行过表达和敲减研究, 另一方面对 *e3ul* 和(或) *or1* 进行 RNAi 研究, 以深入揭示 lncRNA13164-ace-miR-4968-*e3ul* (*or1*) 轴调节宿主免疫应答的作用机制。

综上所述, 饲喂 dsRNA 能有效沉默中蜂幼虫肠道内 lncRNA13164 的表达, lncRNA13164 通过 ace-miR-4968 调控 *stk*、*e3ul* 和 *or1* 表达进而调节宿主对蜜蜂球囊菌侵染的免疫应答。

参考文献

- [1] KOPP F, MENDELL JT. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2018, 172(3): 393-407.
- [2] PONTING CP, OLIVER PL, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs[J]. Cell, 2009, 136(4): 629-641.

- [3] KIM TK, SHIEKHATTAR R. Diverse regulatory interactions of long noncoding RNAs[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2016, 36: 73-82.
- [4] HUNG T, CHANG HY. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms[J]. *RNA Biology*, 2010, 7(5): 582-585.
- [5] FATICA A, BOZZONI I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(1): 7-21.
- [6] HUANG JZ, CHEN M, CHEN D, GAO XC, ZHU S, HUANG HY, HU M, ZHU HF, YAN GR. A peptide encoded by a putative lncRNA HOXB-AS3 suppresses colon cancer growth[J]. *Molecular Cell*, 2017, 68(1): 171-184.e6.
- [7] LIU XH, SUN M, NIE FQ, GE YB, ZHANG EB, YIN DD, KONG R, XIA R, LU KH, LI JH, DE W, WANG KM, WANG ZX. Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2014, 13: 92.
- [8] ZHAO XY, LI JR, LIAN B, GU HQ, LI Y, QI YJ. Global identification of *Arabidopsis* lncRNAs reveals the regulation of MAF4 by a natural antisense RNA[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5056.
- [9] SENMATSU S, ASADA R, ODA A, HOFFMAN CS, OHTA K, HIROTA K. lncRNA transcription induces meiotic recombination through chromatin remodelling in fission yeast[J]. *Communications Biology*, 2021, 4: 295.
- [10] ZHOU HJ, NI JJ, WU SS, MA F, JIN P, LI SJ. lncRNA-CR46018 positively regulates the *Drosophila* Toll immune response by interacting with Dif/Dorsal[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 124: 104183.
- [11] LIN S, ZHANG SL, YIN HT, ZHAO ZM, CHEN ZK, SHEN MM, ZHANG ZD, GUO XJ, WU P. Cellular Lnc_209997 suppresses *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus replication by targeting miR-275-5p in *B. mori*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2022, 31(3): 308-316.
- [12] ETEBARI K, FURLONG MJ, ASGARI S. Genome wide discovery of long intergenic non-coding RNAs in diamondback moth (*Plutella xylostella*) and their expression in insecticide resistant strains[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 14642.
- [13] CESANA M, CACCHIARELLI D, LEGNINI I, SANTINI T, STHANDIER O, CHINAPPI M, TRAMONTANO A, BOZZONI I. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. *Cell*, 2011, 147(2): 358-369.
- [14] HUMANN FC, HARTFELDER K. Representational difference analysis (RDA) reveals differential expression of conserved as well as novel genes during caste-specific development of the honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(8): 602-612.
- [15] JAYAKODI M, JUNG JW, PARK D, AHN YJ, LEE SC, SHIN SY, SHIN C, YANG TJ, KWON HW. Genome-wide characterization of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) provides new insight into viral diseases in honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera*[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 680.
- [16] 曾志将. 养蜂学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
ZENG ZJ. Apiculture[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003 (in Chinese).
- [17] 梁勤, 陈大福. 蜜蜂保护学[M]. 2版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
LIANG Q, CHEN DF. Bee Protection[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2009 (in Chinese).
- [18] MAXFIELD-TAYLOR SA, MUJIC AB, RAO S. First detection of the larval chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* (Ascomycota: Eurotiomycetes: Ascosphaerales) in adult bumble bees[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124868.
- [19] 陈华枝, 付中民, 王杰, 祝智威, 范小雪, 蒋海宾, 范元婵, 周丁丁, 李汶东, 熊翠玲, 郑燕珍, 徐国钧, 陈大福, 郭睿. 中华蜜蜂 6 日龄幼虫响应蜜蜂球囊菌胁迫的环状 RNA 应答[J]. *微生物学报*, 2020, 60(10): 2292-2310.
CHEN HZ, FU ZM, WANG J, ZHU ZW, FAN XX, JIANG HB, FAN YC, ZHOU DD, LI WD, XIONG CL, ZHENG YZ, XU GJ, CHEN DF, GUO R. Circular RNA response of *Apis cerana cerana* 6-day-old larvae to *Ascosphaera apis* stress[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(10): 2292-2310 (in Chinese).
- [20] GUO R, CHEN DF, XIONG CL, HOU CS, ZHENG YZ, FU ZM, DIAO QY, ZHANG L, WANG HQ, HOU ZX, LI WD, KUMAR D, LIANG Q. Identification of long non-coding RNAs in the chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2018, 156: 1-5.
- [21] 杜宇, 冯睿蓉, 王杰, 祝智威, 张文德, 余岢骏, 隆琦, 蔡宗兵, 解彦玲, 熊翠玲, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿. 中华蜜蜂 6 日龄幼虫响应蜜蜂球囊菌感染的长链非编码

- RNA 应答研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1338-1358.
- DU Y, FENG RR, WANG J, ZHU ZW, ZHANG WD, YU KJ, LONG Q, CAI ZB, XIE YL, XIONG CL, ZHENG YZ, CHEN DF, GUO R. Long non-coding RNA response of 6-day-old *Apis cerana cerana* larvae to *Ascosphaera apis* infection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1338-1358 (in Chinese).
- [22] ZHANG R, WANG JL, LIU BS, WANG WJ, FAN XH, ZHENG BY, YUAN QH, XUE MY, XU F, GUO P, CHEN YG. Differentially expressed lncRNAs, miRNAs and mRNAs with associated ceRNA networks in a mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(3): 2487-2495.
- [23] JIANG N, CUI J, SHI YS, YANG GL, ZHOU XX, HOU XX, MENG J, LUAN YS. Tomato lncRNA23468 functions as a competing endogenous RNA to modulate *NBS-LRR* genes by decoying miR482b in the tomato-*Phytophthora infestans* interaction[J]. Horticulture Research, 2019, 6: 28.
- [24] 杜宇, 童新宇, 周丁丁, 陈大福, 熊翠玲, 郑燕珍, 徐国钧, 王海朋, 陈华枝, 郭意龙, 隆琦, 郭睿. 中华蜜蜂幼虫肠道响应球囊菌胁迫的 microRNA 应答分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(9): 1747-1764.
- DU Y, TONG XY, ZHOU DD, CHEN DF, XIONG CL, ZHENG YZ, XU GJ, WANG HP, CHEN HZ, GUO YL, LONG Q, GUO R. MicroRNA responses in the larval gut of *Apis cerana cerana* to *Ascosphaera apis* stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(9): 1747-1764 (in Chinese).
- [25] 熊翠玲, 杜宇, 冯睿蓉, 蒋海宾, 史小玉, 王海朋, 范小雪, 王杰, 祝智威, 范元婵, 陈华枝, 周丁丁, 郑燕珍, 陈大福, 郭睿. 感染中华蜜蜂 6 日龄幼虫的蜜蜂球囊菌的微小 RNA 差异表达谱及调控网络[J]. 微生物学报, 2020, 60(5): 992-1009.
- XIONG CL, DU Y, FENG RR, JIANG HB, SHI XY, WANG HP, FAN XX, WANG J, ZHU ZW, FAN YC, CHEN HZ, ZHOU DD, ZHENG YZ, CHEN DF, GUO R. Differential expression pattern and regulation network of microRNAs in *Ascosphaera apis* invading *Apis cerana cerana* 6-day-old larvae[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(5): 992-1009 (in Chinese).
- [26] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods: San Diego, Calif, 2001, 25(4): 402-408.
- [27] 冯睿蓉. 微小 RNA 介导中华蜜蜂工蜂幼虫响应蜜蜂球囊菌感染的分子机制[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2021.
- FENG RR. The molecular mechanism underlying microRNA-mediated response of *Apis cerana cerana* workers' larvae to *Ascosphaera apis* infection[D]. Fuzhou: Master's Thesis Fujian Agriculture and Forestry University, 2021. (in Chinese).
- [28] KRÜGER J, REHMSMEIER M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(suppl_2): W451-W454.
- [29] RITCHIE W. MicroRNA target prediction[J]. Methods in Molecular Biology: Clifton, N J, 2017, 1513: 193-200.
- [30] ALLEN E, XIE ZX, GUSTAFSON AM, CARRINGTON JC. MicroRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants[J]. Cell, 2005, 121(2): 207-221.
- [31] SMOOT ME, ONO K, RUSCHEINSKI J, WANG PL, IDEKER T. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization[J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 431-432.
- [32] FENG KY, LIU J, WEI P, OU SY, WEN X, SHEN GM, XU ZF, XU Q, HE L. LincRNA_Tc13743.2-miR-133-5p-TcGSTm02 regulation pathway mediates cyflumetofen resistance in *Tetranychus cinnabarinus*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 123: 103413.
- [33] 郭豪. E3 泛素连接酶-Itch 调控胰岛素信号通路关键蛋白的表达及其分子机制研究[D]. 张家口: 河北北方学院硕士学位论文, 2021.
- GUO H. E3 ubiquitin ligase-itch regulates the expression of key proteins in insulin signaling pathway and molecular mechanism research[D]. Zhangjiakou: Master's Thesis of Hebei North University, 2021 (in Chinese).
- [34] YANG Y, LIAO B, WANG SY, YAN BR, JIN Y, SHU HB, WANG YY. E3 ligase WWP₂ negatively regulates TLR3-mediated innate immune response by targeting TRIF for ubiquitination and degradation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(13): 5115-5120.
- [35] BONNAY F, COHEN-BERROS E, HOFFMANN M, KIM SY, BOULIANNE GL, HOFFMANN JA, MATT N, REICHHART JM. *big bang* gene modulates gut immune tolerance in *Drosophila*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(8): 2957-2962.