

高表达 lncRNA 调控意大利蜜蜂工蜂中肠发育的作用解析

王 杰¹, 孙明会¹, 隆 琦¹, 范元婵¹, 吴 鹰¹,
郭意龙¹, 张凯遥¹, 石彩云¹, 陈大福^{1,2}, 郭 睿^{1,2}

(1. 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福州 350002; 2. 福建农林大学蜂疗研究所, 福州 350002)

摘 要: 为了探究高表达 lncRNA (highly-expressed lncRNA, HlncRNA) 调控意大利蜜蜂 (*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂) 工蜂中肠发育的潜在作用, 本研究利用前期获得的组学数据筛选出意蜂 7 和 10 日龄工蜂中肠的 HlncRNA, 通过 RT-PCR 验证上述 HlncRNA 的真实表达, 通过 RT-qPCR 分析 HlncRNA 在 1~21 日龄工蜂中肠发育过程的表达谱, 进而对 HlncRNA 的调控作用进行生物信息学分析. 结果表明 7 和 10 日龄工蜂中肠中表达量最高的 9 条 lncRNA 相同; 这些 HlncRNA 在 1~21 日龄工蜂中肠发育过程中真实表达且表达规律不同; HlncRNA 通过顺式和反式作用分别调控 32 个上下游基因和 18 条共表达 mRNA, 此外可靶向 55 个 miRNA 进而结合 131 条 mRNA. 研究结果揭示上述 9 条 HlncRNA 可通过顺式作用、反式作用和 ceRNA 网络潜在调节应激反应与糖类消化和吸收等功能条目和通路, 进而调控意蜂工蜂的中肠的发育.

关键词: 蜜蜂; 意大利蜜蜂; 中肠; 发育; 长链非编码 RNA

中图分类号: S891 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.016005

Analysis of highly-expressed lncRNAs function in regulating midgut development of *Apis mellifera ligustica* worker

WANG Jie¹, SUN Ming-Hui¹, LONG Qi¹, FAN Yuan-Chan¹, WU-Ying¹,
GUO Yi-Long¹, ZHANG Kai-Yao¹, SHI Cai-Yun¹, CHEN Da-Fu^{1,2}, GUO Rui^{1,2}

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

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

Abstract: In order to explore the potential role of highly-expressed lncRNAs (HlncRNAs) in regulating the midgut development of *Apis mellifera ligustica* worker, the omics data obtained in the previous at 7- and 10-day-old *A. m. ligustica* workers' midguts were used to screen out the HlncRNAs. RT-PCR was performed to confirm the real expression of aforementioned HlncRNAs and analysis the expression pattern of them during the developmental process of 1~21 days old workers' midguts, and bioinformatic analyses of the regulatory function of HlncRNAs were further performed. The results suggested that the 9 HlncRNAs in the 7 and 10-day-old worker's midgut were the same. These HlncRNAs were expressed in 1- to 21-day-old workers' midguts but their expression patterns were different. HlncRNAs regulated

收稿日期: 2021-05-05
基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-44-KXJ7); 福建农林大学硕士生导师团队项目(郭睿); 福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室开放课题(郭睿); 江西省蜜蜂生物学与饲养重点实验室开放基金(JXKLHBB-2020-04)
作者简介: 王杰(1998-), 男, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂分子生物学. E-mail: wanglegejie@163.com
通讯作者: 郭睿. E-mail: ruiguog@fafu.edu.cn

32 upstream and downstream genes and 18 co-expressed mRNAs via *cis*-acting and *trans*-acting manner, respectively. Additionally, these HlncRNAs can target 55 miRNAs and further bind to 131 mRNAs. These results reveal the 9 HlncRNAs potentially regulated functional terms and pathways such as the stress response, sugar digestion and absorption through *cis*-acting, *trans*-acting and ceRNA network to regulate the development of *A. m. ligustica* worker's midgut.

Keywords: Honeybee; *Apis mellifera ligustica*; Midgut; Development; Long non-coding RNA (lncRNA)

1 引言

长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是 ncRNA 世界的重要成员之一,一般长度大于 200 nt 且包含 2 个以上外显子,由 RNA 聚合酶 II 转录形成^[1]. 类似于 mRNA, lncRNA 具有 5' 端帽子和 3' polyA 尾巴,但多数 lncRNA 的表达量较低且长度更短^[2]. 在发现之初, lncRNA 被认为是基因转录过程的副产物,但随着研究的不断增多与深入, lncRNA 已被证实在基因组印记、染色体修饰、转录调控等诸多生物学过程中发挥重要作用^[3,4]. LncRNA 的作用方式灵活多样,不仅能通过顺式(*cis*)作用对其相邻蛋白编码基因的的表达进行调控,还可以通过反式作用(*trans*)调控距离较远基因的表达^[1];此外, lncRNA 还能作为竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)与其他含相同 miRNA 反应元件(miRNA response element, MRE)的 RNA 分子竞争性结合 miRNA,从而间接调节下游基因的表达水平^[5]. CeRNA 机制已在人类、其他哺乳动物和植物中被广泛证实. Xue 等^[6]发现肝癌细胞中上调表达的 Loc339803 可通过竞争结合 miR-30a-5p 进而调控靶基因 SNAIL1,最终促进了肝癌细胞的侵袭和迁移;Wang 等^[7]研究表明 IMF lnc1 可以通过竞争结合 miR-199a-5p 并影响 caveolin-1 的表达进而影响猪中肌肉脂肪含量. Yuan 等^[8]建立了植物中 ceRNA 调控网络数据库 PceRBase (<http://bis.zju.edu.cn/pcernadb/index.jsp>),收录了拟南芥在内 26 种植物中潜在的 ceRNA 调控网络. 但目前 lncRNA 在意蜂工蜂中肠发育中的调控作用尚不清楚. 通过解析高表达 lncRNA 在意蜂工蜂中肠发育过程的表达谱及潜在调控作用,可为明确 HlncRNA 的分子功能提供理论依据,并为阐明中肠发育机理打下基础.

近年来,随着高通量测序技术的快速发展,人们在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、家蚕

(*Bombyx mori*)、小菜蛾(*Plutella xylostella*)^[9-11]等昆虫中鉴定到大量 lncRNA. 研究表明 lncRNA 可参与昆虫的生殖、发育、行为和免疫等过程. 但蜜蜂 lncRNA 的研究较为滞后,迄今仅有少量的研究报道. 例如,郭昱等^[12]通过比较意蜂蜂王与工蜂 4、5 和 6 日龄幼虫中 lncRNA 的表达谱,发现在幼虫的发育进程中差异 lncRNA 的数量逐渐增多,功能注释显示差异 lncRNA 在组织发育、神经系统发育、转录调控等方面发挥潜在的调控作用. Chen 等^[13]通过对意大利蜜蜂的处女王、产卵蜂王、抑制产卵的蜂王以及产卵恢复的蜂王进行转录组测序,鉴定出位于控制卵巢大小数量性状位点(QTL)的 14 条 lncRNA,并进一步筛选出卵巢发育和产卵相关的 2 条 lncRNA XLOC_073978 和 XLOC_081294.

意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*, 简称意蜂)是西方蜜蜂(*Apis mellifera*)的亚种之一,因具有性情温顺、采集能力优越及分泌蜂王浆能力和造脾能力较强的显著优势而在世界各养蜂国家中广泛饲养. 中肠是昆虫的重要组织,除了直接发挥食物消化和营养吸收的功能外,还能分泌抗菌肽和活性氧进而参与昆虫的免疫及解毒过程^[14]. 前人对于蜜蜂肠道的研究主要涉及肠道微生物方面^[15],而肠道发育机理的相关研究很少. 此前,笔者团队全基因组鉴定、分析和验证了意蜂工蜂中肠的 lncRNA 和环状 RNA(circular RNA, circRNA)^[16,17],并对中肠发育过程的 lncRNA 差异表达谱、circRNA 差异表达谱及调控网络进行了系统解析^[18,19].

笔者团队前期已利用链特异性 cDNA 建库的 RNA-seq 技术意蜂工蜂中肠进行深度测序,本研究拟基于已获得的高质量转录组数据筛选意蜂工蜂中肠的高表达 lncRNA (highly expressed lncRNA, HlncRNA),通过分子生物学手段验证 HlncRNA 的真实表达并检测其在工蜂中肠发育过程的表达谱,进而利用生物信息学方法分析和探

讨 HlncRNA 的顺式作用、反式作用和 ceRNA 调控网络,以期深入揭示 HlncRNA 在意蜂工蜂中肠发育过程的潜在作用,并为探明背后的分子机理提供理论依据和基础。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 转录组数据来源 之前笔者所在团队已利用链特异性 cDNA 建库的 RNA-seq 技术对意蜂 7 日龄(Am7)和 10 日龄(Am10)工蜂中肠进行测序,得到的平均 raw reads 数分别为 134 802 058 和 147 051 470 条,经严格过滤得到的平均 clean reads 数分别为 134 166 157 和 146 293 288 条,平均 Q20 和 Q30 分别达到 97.34%和 93.86%^[18],质控结果表明转录组数据质量良好,可满足本研究的需要。

2.1.2 意蜂工蜂 取自本院教学蜂场。

2.2 方法

2.2.1 HlncRNA 筛选 参照 Chen 等^[2]的报道,利用 FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)法对每一条 lncRNA 的表达量进行归一化。将 Am7 组和 Am10 组包含的所有 lncRNA 按照 FPKM 值从高往低排序,表达量最高的前 9 条 lncRNA 相同,均为 XR_001706220.1、XR_001702285.1、XR_001703498.1、XR_411315.2、TCONS_00004791、TCONS_00004790、TCONS_00034036、TCONS_00007249 和 TCONS_00006094。因此,本研究选择上述 9 条 HlncRNA 进行验证、检测和分析。

2.2.2 意蜂工蜂的人工饲养及中肠样品的制备 按照笔者所在实验室前期已建立的技术流程^[16]进行意蜂工蜂的人工饲养及中肠样品制备:从群势较强的蜂群中提出封盖子脾,置于 34 ± 0.5 °C 的培养箱中待工蜂出房,将刚出房的工蜂记为 1 日龄,然后在 34 ± 0.5 °C 的条件下连续饲养至 21 日龄,每日检查工蜂的存活状态,并及时清理死亡蜜蜂。本实验进行 3 次生物学重复。每日随机选取 3 只工蜂拉取中肠,放入 RNA-free 的离心管,经液氮速冻后置于 -80 °C 超低温冰箱保存。

2.2.3 意蜂工蜂中肠中 HlncRNA 的 RT-PCR 验证 根据上述 9 条 HlncRNA 的核酸序列,采用 DNAMAN 软件(Lynnon Biosoft 公司,美国)设计相应的特异性引物,委托上海生工生物有限公司合成。利用 AxyPrep™ Multisource Total RNA Miniprep Kit(TaKaRa 公司,日本)分别提取上述 21 个日龄中工蜂中肠样品的总 RNA,作为模板经

反转录得到相应的 cDNA,再作为模板进行 PCR。PCR 反应体系包含:cDNA 模板 1 μ L,上游及下游引物各 1 μ L,PCR mix 10 μ L,无菌水 7 μ L。PCR 反应程序设置为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 34 个循环;72 °C 再延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后用凝胶成像仪(上海培清,中国)观察和拍照。

2.2.4 意蜂工蜂中肠发育过程中 HlncRNA 表达谱的 qPCR 检测 利用 1.3 中制备的 cDNA 作为模板进行 qPCR。qPCR 反应按照 SYBR Green Dye 试剂盒(Vazyme 公司,中国)的操作说明书进行。RT-qPCR 反应在 QuantStudio 3 (ABI 公司,美国)上进行。反应体系(20 μ L)包括:SYBR Green Dye 10 μ L,浓度为 1 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L,cDNA 模板 1 μ L,无菌水 7 μ L。反应程序为:95 °C 预变性 1 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。每个反应进行 3 次平行重复和 3 次技术重复。以 *actin* 基因作为内参。以意蜂 1 日龄工蜂中肠作为对照组,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[20]计算上述 9 条 HlncRNA 在 2~21 日龄工蜂中肠中的相对表达量。

2.2.5 HlncRNA 的顺式作用和反式作用分析 参照熊翠玲等的方法^[16],将 HlncRNA 上下游 10 kb 内的蛋白编码基因预测为 HlncRNA 顺式调控的靶基因。通过计算 lncRNA 与 mRNA 的共表达关系,选择其中 Pearson 相关系数大于 0.95 的 mRNA 作为 HlncRNA 反式调控的靶 mRNA。然后利用 Omicshare 平台(<http://www.omicshare.com/tools/index.php/>)对高表达 lncRNA 的上下游基因以及反式作用的靶 mRNA 进行 GO(Gene Ontology)分类和 KEGG 通路富集分析。

2.2.6 HlncRNA 的靶向预测及调控网络构建与分析 参照郭睿等^[19]的方法,联用 Miranda、RNAhybrid 和 TargetScan 三个软件预测 lncRNA 的靶 miRNA 以及 miRNA 的靶 mRNA。依据靶向关系构建 HlncRNA-miRNA-mRNA 调控网络。通过 Cytoscape 软件对调控网络进行可视化。再利用基迪奥云平台的相关软件对调控网络中的靶 mRNA 进行 GO 数据库(<http://geneontology.org/>)和 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/>)注释,均采用默认参数。

3 结果与分析

3.1 HlncRNA 的筛选及表达验证

Am7 组和 Am10 组中表达量最高的前 9 条

lncRNA 相同, 均为 XR_001706220. 1、XR_001702285. 1、XR_001703498. 1、XR_411315. 2、TCONS_00004791、TCONS_00004790、TCONS_00034036、TCONS_00007249、TCONS_00006094 利用 RT-PCR 对上述 9 条 HlncRNA 进行验证, 电泳结果显示它们在意蜂 1~21 日龄工蜂中肠中均真实表达; 其中 XR_001706220. 1 的验证结果如图 1 所示.

表 1 9 条高表达 lncRNA 在 Am7 组和 Am10 组中的 FPKM 值

Tab.1 FPKM values of nine HlncRNAs in Am7 group and Am10 group

LncRNA 编号 LncRNA id	Am7 组中的 FPKM 值 FPKM in Am7	Am10 组中的 FPKM 值 FPKM in Am10
XR_001702285.1	7353.5	2904.95
XR_001706220.1	3035.01	2526.5
TCONS_00004791	261.44	312.44
TCONS_00034036	201.92	179.62
TCONS_00004790	199.61	264.45
TCONS_00006094	118.3	186.28
TCONS_00007249	105.42	90.63
XR_001703498.1	102.45	113.86
XR_411315.2	75.62	93.47

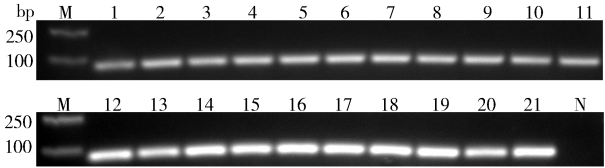


图 1 意蜂 1~21 日龄工蜂中肠中 XR_001706220.1 表达的 RT-PCR 验证

Fig.1 RT-PCR validation of expression of XR_001706220.1 in *A. m. ligustica* 1~21 day-old workers' midguts

3.2 HlncRNA 在意蜂工蜂发育过程中的表达谱检测

RT-qPCR 检测结果显示, 上述 9 条 HlncRNA 在意蜂工蜂中肠发育 1~21 日龄总体上均表现出不同的表达规律; XR_411315.2 的表达量在 5 日龄时最高, TCONS_00006094 的表达量在 9 日龄时最高, 其余 7 条 HlncRNA 的表达水平均在 6 日龄时达到峰值; XR_001706220.1 的表达量在 2~4 日龄持续上调, 其余 8 条 HlncRNA 在 2~4 日龄均表现为先下调再上调; XR_001703498.1、TCONS_00004791、TCONS_00004790 和 TCONS_00007249 的表达量在 15 日龄前不断变化, 但在 17~21 日龄表达量趋于稳定.

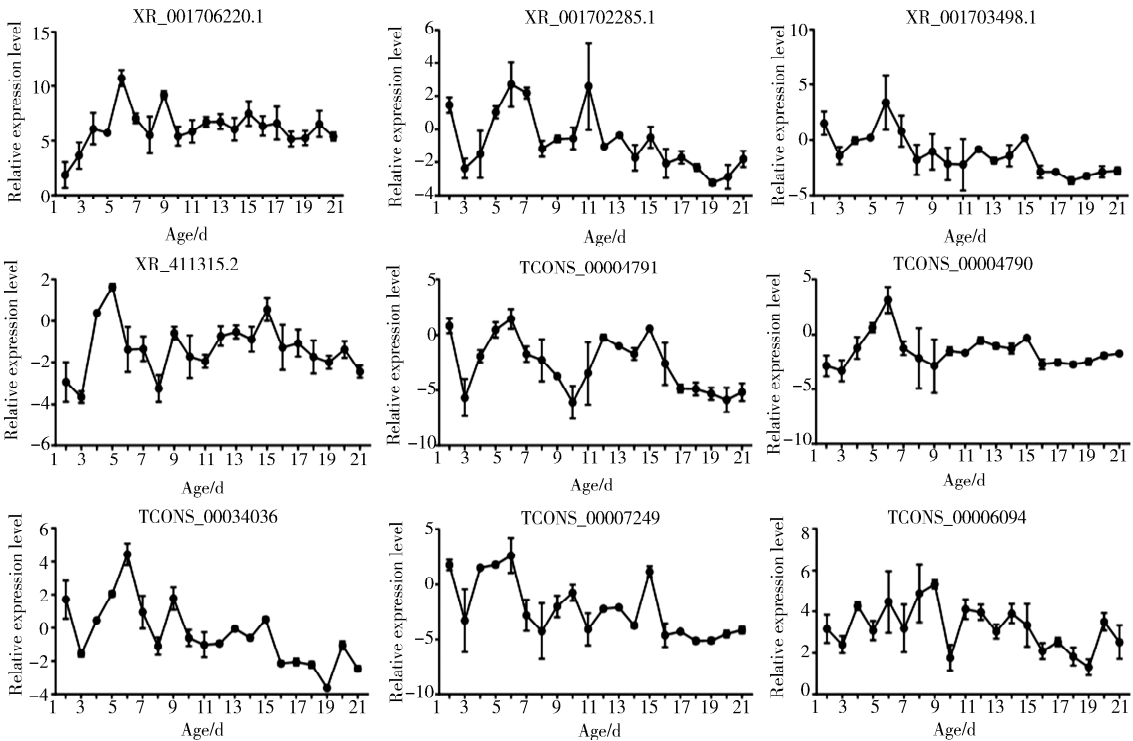


图 2 9 条高表达 lncRNA 在意蜂工蜂中肠发育过程的表达谱

Fig.2 Expression profile of nine HlncRNAs during the developmental process of the *A. m. ligustica* worker's midgut

3.3 意蜂工蜂中肠 HlncRNA 的顺式作用和反式作用分析

顺式作用分析结果显示, 9 条 HlncRNA 潜在调控 32 个上下游基因。反式作用分析结果显示, 9 条 HlncRNA 与共表达的 18 条 mRNA 具有正(或负)相关关系。对 HlncRNA 顺式和反式调控的上下游基因和 mRNA 进行 GO 分类, 结果显示这些

靶标涉及单一组织进程、细胞进程和定位等 9 个生物学进程相关条目, 细胞膜、细胞膜组分和细胞等 7 个细胞组分相关条目及结合和催化活性等 4 个分子功能相关条目(图 3a)。KEGG 通路富集分析结果显示, 上述靶标可富集在 ABC 转运体、胆汁分泌及糖类消化与吸收等 18 条通路(图 3b)。

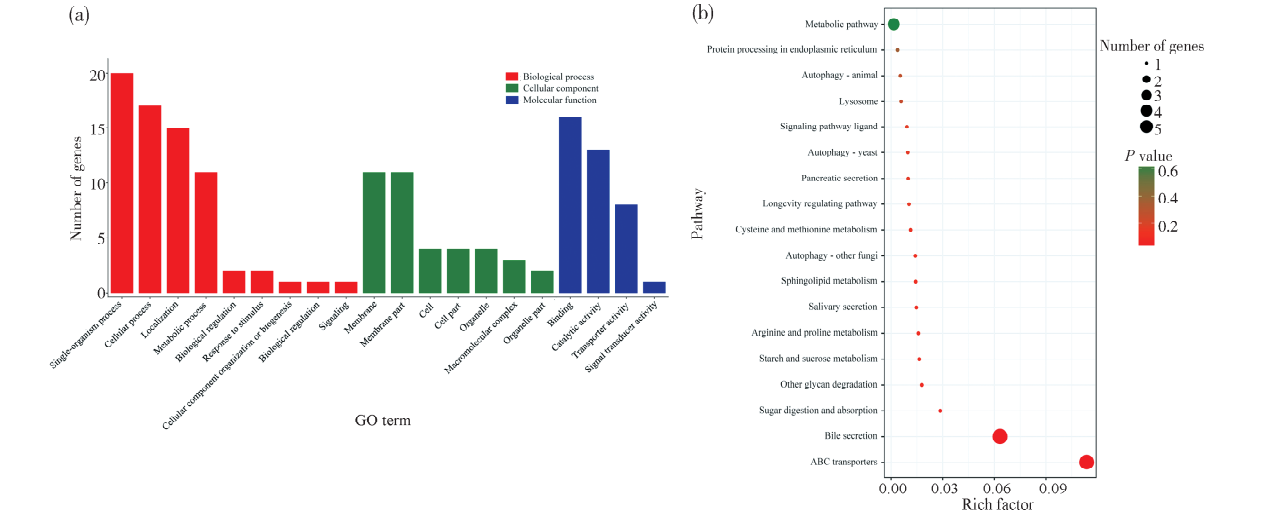


图 3 9 条高表达 lncRNA 顺式和反式调控靶标的 GO 分类(a)和 KEGG 通路富集分析(b)
Fig. 3 GO classification (a) and KEGG pathway enrichment analysis (b) of *cis*- and *trans*-regulating targets of nine HlncRNAs

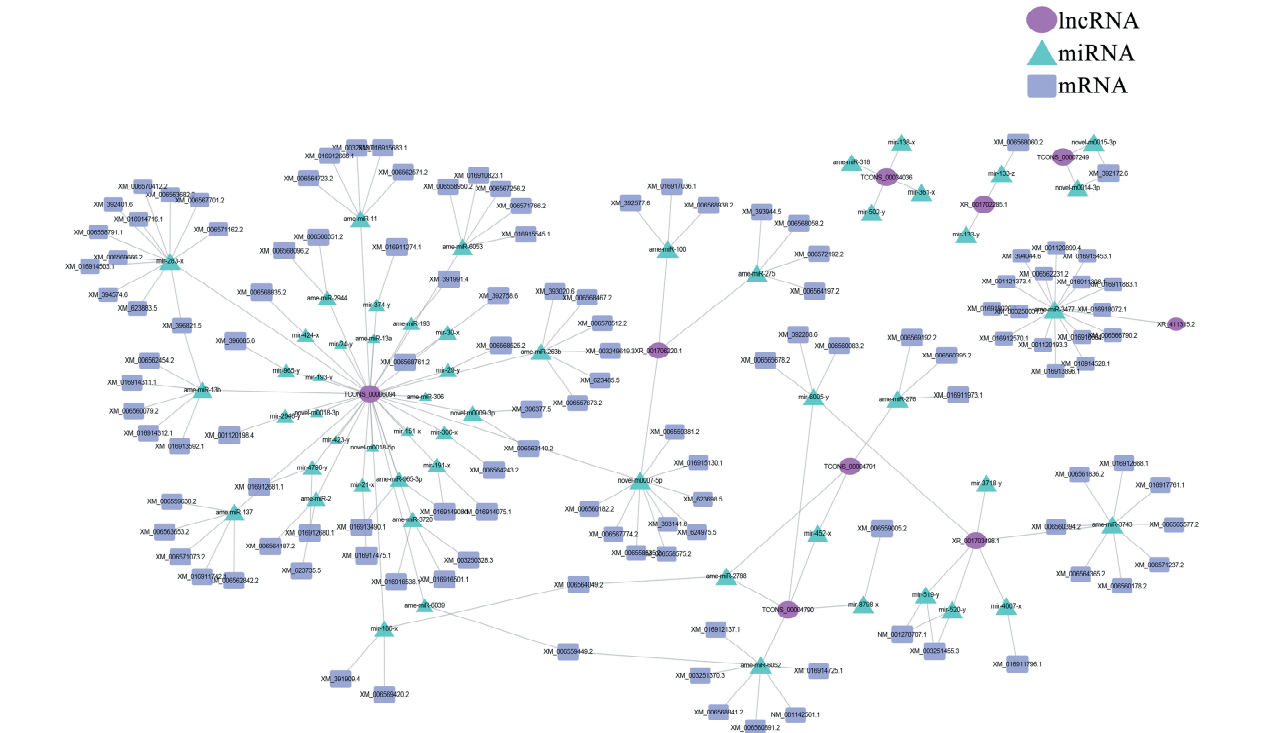


图 4 意蜂工蜂中肠的 9 条高表达 lncRNA 的 ceRNA 调控网络
Fig. 4 CeRNA network of nine HlncRNAs in the midgut of *A. m. ligustica* worker

3.4 意蜂工蜂中肠 HlncRNA 的靶向预测及调控网络分析

靶向预测结果显示,9 条 HlncRNA 共靶向 55 个 miRNA,进而结合 131 条 mRNA. 靶向 miRNA 数量最多的 HlncRNA 是 TCONS_00006094 和 XR_001703498.1,分别靶向 33 和 6 个 miRNA. 结合 mRNA 数量最多的 miRNA 是 ame-miR-3477 和 mir-283-x,分别结合 16 和 11 条 mRNA (图 4). 进一步的数据库注释结果显示,ceRNA 调控网络中的靶 mRNA 可注释到细胞进程、代谢进程、结合、催化活性和应激反应等 30 个功能条目,以及内吞作用、细胞周期、Wnt 信号通路、Hippo 信号通路、和 Notch 信号通路等 70 条通路.

4 讨论

昆虫中肠不仅是消化吸收的主要场所,也是重要的免疫器官^[14]. LncRNA 能在转录水平和转录后水平发挥灵活多样的调控功能^[1,3]. 有研究表明表达量较高的 lncRNA 在癌症发生、免疫应答等方面具有重要的调控功能. 例如,Zhang 等^[21]研究发现 lncRNA CCND2-AS1 在恶性胶质瘤组织和细胞中的表达量较高,可通过增强脑胶质瘤中的 Wnt/ β -catenin 信号通路促进胶质瘤细胞增殖;Valanne 等^[22]研究发现当果蝇感染革兰氏阳性细菌 *M. luteus* 后,*lincRNA-IBIN* 维持高表达且可通过影响 Toll 通路进而参与宿主免疫应答. 基于笔者团队已获得的高质量 lncRNA 组学数据,我们发现 9 条 HlncRNA 在意蜂 7 和 10 日龄工蜂中肠中均为高表达(FPKM 值分别介于 75.62~7353.5 和 93.47~2904.95),暗示这些 HlncRNA 在中肠发育过程的潜在重要性. 本研究中,RT-PCR 结果显示上述 9 条 HlncRNA 在意蜂 1~21 日龄工蜂中肠中均真实表达;此外,RT-qPCR 检测结果显示它们在 1~21 日龄工蜂中肠中呈现出不同的表达规律,XR_411315.2 的表达量在 5 日龄时最高,TCONS_00006094 的表达量在 9 日龄时最高,其余 7 条 HlncRNA 的表达水平均在 6 日龄时达到峰值;XR_001706220.1 的表达量在 2~4 日龄持续上调,其余 8 条 HlncRNA 在 2~4 日龄均表现为先下调再上调;XR_001703498.1、TCONS_00004791、TCONS_00004790 和 TCONS_00007249 的表达量在 15 日龄前不断变化,但在 17~21 日龄表达量趋于稳定. 意蜂工蜂中肠发育是一个复杂的过程,期间伴随着不同分子事件的次

第发生,HlncRNA 的表达谱检测结果可为进一步的功能研究提供理论和实验依据.

LncRNA 的功能与其邻近的蛋白编码基因密切相关,可通过影响基因的启动子或者其他顺式作用元件发挥调控作用;此外,lncRNA 也可以结合距离较远的基因上的增强子或启动子,进而调控基因表达^[1]. 笔者团队前期研究发现无论在意蜂工蜂中肠发育过程还是在意蜂工蜂中肠响应东方蜜蜂微孢子虫侵染的过程中,差异表达 lncRNA 均可以通过顺式和反式作用发挥潜在的调控功能^[2,18]. 本研究发现,9 条 HlncRNA 的上下游基因和共表达 mRNA 共有 50 个,可注释到胆汁分泌、胰液分泌、唾液分泌和糖类消化与吸收等消化吸收相关条目,以及内质网蛋白加工、半胱氨酸和蛋氨酸代谢及淀粉和蔗糖代谢等物质代谢相关通路. 以上结果表明相应的 HlncRNA 在意蜂工蜂中肠发育过程潜在调节消化吸收与物质代谢. 自噬在真核生物中广泛存在,当生物体遭遇营养缺乏、病原入侵和细胞程序性死亡时都可以激活自噬进而起到平衡体内环境的功能^[23]. 本研究中,HlncRNA 顺式和反式调控的靶标可注释到细胞自噬-动物、细胞自噬-其它真菌及细胞自噬-酵母,说明相应的 HlncRNA 可能通过调节自噬机制进而参与意蜂工蜂中肠的发育过程.

CeRNA 机制认为含相同或类似 miRNA 反应元件(miRNA response elements, MREs)的不同类型 RNA 皆能通过竞争性结合 miRNA 调控基因表达^[5]. Feng 等^[24]通过对抗丁氟螨酯与丁氟螨酯敏感品系的朱砂叶螨转录组测序和比较分析,筛选出与丁氟螨酯抗性相关的 *lincRNA_Tc13743.2*,过表达实验结果表明 *lincRNA_Tc13743.2* 可通过与谷胱甘肽 S-转移酶基因 *Tc GSTm02* 竞争结合 miR-133-5p 介导朱砂叶螨对丁氟螨酯的抗性. 本研究中,9 条 HlncRNA 可靶向 59 个 miRNA 进而结合 131 条 mRNA. 进一步分析发现,TCONS_00006094、XR_001703498.1、TCONS_00004790、XR_001706220.1 和 TCONS_00004791 靶向的 miRNA 较多,分别为 33、6、5、3 和 3 个,这些靶 miRNA 又能分别靶向 75、14、12、16 和 4 条 mRNA;上述 5 条 HlncRNA 形成的调控网络较为复杂;而 TCONS_00034036 仅靶向 4 个 miRNA,XR_001702285.1 可靶向 2 个 miRNA,进而结合 1 条 mRNA;类似地,TCONS_00007249 可靶向 2 个 miRNA,进而结合 1 条 mRNA;XR_411315.2 仅

能靶向 1 个 miRNA, 但能进一步结合 16 条 mRNA. 根据 ceRNA 机制的原理, 处于调控网络中心且连接靶标的数量越多(即联通性越强)的 RNA 分子的重要性越大, 推测 TCONS_00034036、XR_001702285.1、TCONS_00007249 和 XR_411315.2 在意蜂工蜂中肠发育的过程中作用相对其他 5 条 HlncRNA 较弱. 通过功能注释发现调控网络中的靶 mRNA 可注释到消化相关通路如初级胆汁酸生物合成, 这表明 HlncRNA 不仅可通过顺式和反式作用还可以通过 ceRNA 机制对中肠的消化吸收进行调控; 此外, 还发现 HlncRNA 间接调控的靶 mRNA 可注释到 Hippo 和 Wnt 信号通路. Hippo 信号通路由一系列保守激酶组成, 通过调控细胞增殖与凋亡从而控制器官大小^[25]. Wnt 信号通路已被证实昆虫生长、发育和代谢等方面扮演重要角色^[26]. 目前, 利用 RNAi 技术对昆虫的 lncRNA 进行敲减和功能研究已见诸报道^[24,27]. 下一步我们将针对 9 条 HlncRNA 分别设计合成特异性 siRNA, 然后通过饲喂 siRNA 的方法对意蜂工蜂中肠的单条 HlncRNA 进行敲减或多条 HlncRNA 同时进行敲减, 进一步探究 HlncRNA 的功能.

综上所述, 本研究证实了 9 条 HlncRNA 的真实表达并检测了它们在意蜂工蜂中肠中的表达谱, 揭示了 HlncRNA 可通过其顺式作用、反式作用和 ceRNA 调控网络调节消化吸收和物质代谢, 进而参与中肠的发育过程.

参考文献:

- [1] Kopp F, Mendell J T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs [J]. Cell, 2018, 172: 393.
- [2] Chen D F, Chen H Z, Du Y, *et al.* Genome-wide identification of long non-coding RNAs and their regulatory networks involved in *Apis mellifera ligustica* response to *Nosema ceranae* infection [J]. Insects, 2019, 10: 245.
- [3] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15: 7.
- [4] Mchugh C A, Chen C K, Chow A, *et al.* The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3 [J]. Nature, 2015, 521: 232.
- [5] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, *et al.* A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language [J]. Cell, 2011, 146: 353.
- [6] Xue C, Zhang X, Gao P, *et al.* LncRNA loc339803 acts as CeRNA of miR-30a-5p to promote the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells [J]. J Cancer, 2021, 12: 1061.
- [7] Wang J, Chen M Y, Chen J F, *et al.* LncRNA IM-Flnc1 promotes porcine intramuscular adipocyte adipogenesis by sponging miR-199a-5p to up-regulate CAV-1 [J]. BMC Mol Cell Biol, 2020, 21: 77.
- [8] Yuan C, Meng X, Li X, *et al.* PceRBase: a database of plant competing endogenous RNA [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45: D1009.
- [9] Young R S, Marques A C, Tibbit C, *et al.* Identification and properties of 1,119 candidate lincRNA loci in the *Drosophila melanogaster* genome [J]. Genome Biol Evo, 2012, 4: 427.
- [10] Wu Y, Cheng T, Liu C, *et al.* Systematic identification and characterization of long non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. PLoS One, 2016, 15: 11.
- [11] Wang Y, Xu T, He W, *et al.* Genome-wide identification and characterization of putative lncRNAs in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J]. Genomics, 2018, 110: 35.
- [12] 郭昱, 苏松坤, 陈盛禄, 等. LncRNA 在蜜蜂级型分化中的功能研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42: 750.
- [13] Chen X, Ma C, Chen C, *et al.* Integration of lncRNA-miRNA-mRNA reveals novel insights into oviposition regulation in honey bees [J]. Peer J, 2017, 5: e3881.
- [14] Abou A E, Cools D, Vanden B J. Role of peptide hormones in insect gut physiology [J]. Curr Opin Insect Sci, 2020, 41: 71.
- [15] Ellegaard K M, Tamarit D, Javelind E, *et al.* Extensive intra-phylogroup diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honey bee gut [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 284.
- [16] 熊翠玲, 耿四海, 王心蕊, 等. 意大利蜜蜂工蜂中肠的长链非编码 RNA 的预测、分析及鉴定 [J]. 应用昆虫学报, 2018, 55: 1034.
- [17] 熊翠玲, 陈华枝, 陈大福, 等. 意大利蜜蜂工蜂中肠的环状 RNA 及其调控网络分析 [J]. 昆虫学报, 2018, 61: 1363.
- [18] 郭睿, 耿四海, 熊翠玲, 等. 意大利蜜蜂工蜂中肠发育过程中长链非编码 RNA 的差异表达分析 [J]. 中国农业科学, 2018, 51: 3600.
- [19] 郭睿, 陈华枝, 熊翠玲, 等. 意大利蜜蜂工蜂中肠

发育过程中的差异表达环状 RNA 及其调控网络分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51: 4575.

[20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. Methods, 2001, 25: 402.

[21] Zhang H, Wei D L, Wan L, *et al.* Highly expressed lncRNA CCND2-AS1 promotes glioma cell proliferation through Wnt/ β -catenin signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482: 1219.

[22] Valanne S, Salminen T S, Järvelä-Stölting M, *et al.* Immune-inducible non-coding RNA molecule lincRNA-IBIN connects immunity and metabolism in *Drosophila melanogaster* [J]. PLoS Pathog, 2019, 15: e1007504.

[23] Glick D, Barth S, Macleod K F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. J Pathol, 2020, 221: 3.

[24] Feng K, Liu J, Wei P, *et al.* LincRNA_Tc13743. 2-miR-133-5p-TcGSTm02 regulation pathway mediates cyflumetofen resistance in *Tetranychus cinnabarinus* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2020, 123: 103413.

[25] Meng Z, Moroishi T, Guan K L. Mechanisms of Hippo pathway regulation [J]. Genes Dev, 2016, 30: 1.

[26] Steinhart Z, Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis [J]. Development, 2018, 145: dev146589.

[27] Zhang L, Xu W, Gao X, *et al.* LncRNA sensing of a viral suppressor of RNAi activates non-canonical innate immune signaling in *Drosophila* [J]. Cell Host Microbe, 2020, 27: 115.

引用本文格式:

中 文: 王杰, 孙明会, 隆琦, 等. 高表达 lncRNA 调控意大利蜜蜂工蜂中肠发育的作用解析[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 016005.

英 文: Wang J, Sun M H, Long Q, *et al.* Analysis of highly-expressed lncRNAs function in regulating midgut development of *Apis mellifera ligustica* worker [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 016005.