



miR-31 在亚洲玉米螟中的表达及其与 Cry1Ab 蛋白敏感性关系研究

徐丽娜^{1,2} 周子燕¹ 胡飞¹ 何康来^{2*} 胡本进^{1*}

1 安徽省农业科学院 植物保护与农产品质量安全研究所, 合肥 230031; 2 中国农业科学院 植物保护研究所, 北京 100193

*通讯作者, kanglai.he@263.net; hubenjin@126.com

摘要 昆虫体内苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)受体蛋白表达量的改变是影响靶标昆虫对 Bt 产生抗性的关键因素之一, 但是其表达调控机制并不清楚。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类非编码 RNA, 可与靶标 mRNA 互补配对, 在转录后水平调控基因表达, 进而参与昆虫生长、发育和逆境应答等多种生物学功能的调控。为了探讨 microRNA-31 (miR-31) 在亚洲玉米螟 (Asian corn borer, ACB) (*Ostrinia furnacalis*) 对杀虫晶体蛋白 (pesticidal crystal protein, Cry1Ab) 产生抗性过程中的作用, 本研究分析了 miR-31 在亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性品系 (ACB-AbR) 和 Bt 敏感品系 (ACB-BtS) 不同组织的表达, 结果显示, miR-31 在 ACB-AbR 表皮组织中的表达量显著高于 ACB-BtS 表皮组织, 而在 ACB-BtS 和 ACB-AbR 中肠的表达量却显著下降, 而且 miR-31 在 ACB-AbR 中肠的表达量也低于其在 ACB-BtS 中的表达量。进而以 Sf9 细胞为研究对象, 分析 miR-31 表达量改变后, 细胞对 Cry1Ab 杀虫蛋白敏感性的变化。研究发现 miR-31 表达量升高导致 Sf9 对 Cry1Ab 杀虫蛋白敏感性增加; 反之, miR-31 表达量降低导致 Sf9 对 Cry1Ab 杀虫蛋白敏感性减弱。上述结果提示, 亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性品系幼虫中肠 miR-31 表达量下降, 可能是导致该虫对 Cry1Ab 杀虫蛋白产生抗性的原因之一。本研究为进一步解析亚洲玉米螟 Bt 抗性产生的机理提供了参考依据。

关键词 miR-31, 亚洲玉米螟 (ACB), 杀虫晶体蛋白 (Cry1Ab) 抗性

中图分类号 S435.132 **文献标识码** A

Expression of miR-31 in Asian Corn Borer (*Ostrinia furnacalis*) and Its Relationship with Cry1Ab Protein Sensitivity

XU Li-Na^{1,2} ZHOU Zi-Yan¹ HU Fei¹ HE Kang-Lai^{2*} HU Ben-Jin^{1*}

1 Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; 2 Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

*Corresponding author, kanglai.he@263.net; hubenjin@126.com

Abstract The change of *Bacillus thuringiensis* (Bt) receptor protein expression is one of the key factors affecting the resistance of target insects to Bt, but the mechanism of its expression regulation is not clear. MicroRNAs (miRNAs), as a class of non-coding RNAs, could be paired with target mRNA to regulate gene expression at post-transcriptional level, and thus participate in the regulation of insect growth, development and stress response. To investigate the role of microRNA-31 (miR-31) in the production of resistance of Asian corn borer (ACB, *Ostrinia furnacalis*) to pesticidal crystal protein (Cry1Ab), the expression of miR-31 in different tissues of Cry1Ab resistant strain of ACB (ACB-AbR) and Bt sensitive strain (ACB-BtS) was analyzed. It was found that the expression of miR-31 in the epidermis of ACB-AbR was significantly higher

基金项目: 植物病虫害生物学国家重点实验室开放基金 (No. SKLOF201704)

收稿日期: 2018-04-03 接受日期: 2018-05-03

than that in the epidermis of ACB-BtS, but decreased significantly in the midgut of ACB-BtS and ACB-AbR, and the expression of miR-31 in the midgut of ACB-AbR was lower than that in the midgut of ACB-AbR. Then, the sensitivity of Sf9 cells to Cry1Ab was analyzed after the expression of miR-31 was changed. It was found that the increased expression of miR-31 resulted in an increase of the sensitivity of Sf9 to Cry1Ab, whereas the decrease in the expression of miR-31 resulted in a decrease of the sensitivity of Sf9 to Cry1Ab. These results suggested that the decrease of miR-31 expression in midgut of ACB-AbR may be one of the reasons leading to its resistance to Cry1Ab. This study provides basic data for further analysis of the mechanism of Bt resistance in ACB.

Keywords miR-31, Asian corn borer (ACB), Pesticidal crystal protein (Cry1Ab) resistance

亚洲玉米螟(Asian corn borer, ACB)(*Ostrinia furnacalis*)是影响我国玉米(*Zea mays*)生产的最主要害虫(王振营等, 2000)。转苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)相关基因的抗虫玉米可以有效控制亚洲玉米螟的危害(何康来等, 2004; 王培等, 2012; 王月琴等, 2014; 常雪等, 2013)。然而在实验室内进行抗性筛选的实验发现, 亚洲玉米螟可以对多种Bt蛋白产生抗性, 而且在不同Bt蛋白间存在交互抗性(韩海亮等, 2009; Xu et al., 2010; 贺明霞等, 2013)。深入探索亚洲玉米螟对Bt蛋白产生抗性的机理, 对于早期检测田间Bt抗性的产生、制定合理的抗性治理措施、延缓抗性的发展意义重大。

现有研究认为, 靶标昆虫对Bt产生抗性是多基因、多因素综合作用的效果, 包括基因突变、相关蛋白质糖基修饰、蛋白质表达量的调节等(Heckel, 2007)。其中Bt蛋白在昆虫中肠刷状缘膜囊泡 (brush border membrane vesicles, BBMV) 上特异性受体的改变, 是引起抗性产生的主要原因之一。Bt蛋白受体主要有4种, 包括氨肽酶N (aminopeptidase N, APN)、类钙粘蛋白 (cadherin-like protein, CAD)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 和糖脂 (glycolipid) (Pigott & Ellar, 2007)。Bt蛋白受体基因的表达水平影响了靶标昆虫对Bt蛋白的敏感程度 (Han et al., 2014; Wei et al., 2016), 但Bt蛋白受体基因的表达调控机理尚不明确。

微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类长20~25 nt的单链非编码RNA分子, 广泛存在于从植物、昆虫到哺乳动物的细胞中。miRNA与靶标mRNA互补配对, 在转录后水平对基因表达进行调控, 参与细胞增殖凋亡、细胞分化、发育和逆境应答等所有已验证的生物学过程。近年来, 关于农业昆虫miRNAs的研究逐步发展。CSU-New-miR15是一种新发现的二化螟(*Chilo suppressalis*) miRNA候选

分子, 用表达该分子的转基因水稻连续饲喂二化螟幼虫, 导致其化蛹时间延迟4 d (Jiang et al., 2017)。几丁质酶基因是miR-24在棉铃虫中的作用靶标, 棉铃虫幼虫取食表达miR-24的转基因烟草 (*Nicotiana tabacum*) 后, 蜕皮受到抑制, 最终引发死亡 (Agrawal et al., 2015)。在甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼虫生长阶段, 饲喂Sex-miR-4924类似物, 可以抑制幼虫生长, 并引起死亡; 而过表达Sex-miR-4924使得几丁质酶1表达水平显著降低 (Zhang et al., 2015)。

miR-31是一类在脊椎动物和果蝇 (*Drosophila*) 中广泛、保守存在的miRNA种子家族成员, 因拥有独特的8个核苷酸序列而发挥miRNA的特异性靶向调控作用 (Grimson et al., 2007)。miR-31在多能祖细胞和干细胞中呈差异表达, 并在细胞分化中发挥调控作用 (Rouas et al., 2009; Sun et al., 2009; Suárez et al., 2010)。本课题组前期研究发现, miRNA-31在亚洲玉米螟杀虫晶体蛋白 (pesticidal crystal protein, Cry1Ab) 抗性和敏感品系幼虫中差异表达, 并且靶基因预测发现, miRNA-31可以靶向作用多个功能基因 (Xu et al., 2015)。为了进一步明确miR-31对亚洲玉米螟Cry1Ab抗性形成的影响, 本研究首先分析了miR-31在亚洲玉米螟敏感品系和Cry1Ab抗性品系不同组织的表达差异, 然后转染miR-31模拟物 (mimics) 或抑制剂 (inhibitor) 而改变Sf9细胞中miR-31表达量, 确定该细胞对Cry1Ab蛋白敏感性的变化。本研究为进一步解析亚洲玉米螟Bt抗性产生的机理提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 昆虫解剖及组织制备

亚洲玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*) Bt敏感品系

(ACB-BtS),是以人工饲料长期饲养的、未接触任何 Bt 材料的实验室种群; Cry1Ab 抗性品系(ACB-AbR)则以 ACB-BtS 为基础,用含 Cry1Ab 蛋白的人工饲料汰选的实验室种群。冰浴解剖亚洲玉米螟 5 龄幼虫,分别取其中肠和表皮组织 2 mg,迅速放入液氮备用。

1.2 细胞培养及转染

昆虫细胞系 Sf9 购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心,用 Hyclone SH30809.01B 改良型 RPMI-1640 培养基(Hyclone, 美国)在环境温度为 28 °C 细胞培养箱培养。实验分别设置转染 miR-31 类似物(mimics)、miR-31 抑制剂(inhibitor)、无意义链(control)等 3 个处理,以未转染 miRNA 的正常细胞(normal)作为对照。miR-31 Mimics (5'-AGGCAAGATGTTGGCATAGCTGTTT-3')、Inhibitor (5'-TTTGTCGATACGGTTGTAGAAC-GGA - 3') 和 Control (5' - ACGUGACACGUUCG-GAGAAUU-3')均由上海吉玛制药技术有限公司合成。细胞以 2×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔培养板,每孔 1 mL,于 28 °C 恒温培养箱培养 24 h。待生长至 70% 融合时进行细胞转染,转染试剂为 Lipofectamine® RNAi MAX Reagent (Thermo Fisher, 美国),操作步骤参照说明书。

1.3 总 RNA 提取及荧光定量 PCR

对于各组织,取 0.2~0.3 g 并加入液氮充分研磨,然后转入 1.5 mL 离心管,按照 Trizol (Invitrogen, 美国)说明书提取总 RNA。对于各组细胞,培养 48 h 后弃去培养液,加入 1 mL PBS 清洗 1 min; 弃去 PBS,加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化 1 min; 收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min; 收集沉淀,向沉淀细胞中加入 Trizol 并提取总 RNA。

将上述总 RNA 以 GoScrip Reverse Transcriptase (Promega, 美国)反转录为 cDNA,以此为模板

进行荧光定量 PCR 分析。PCR 反应体系: $2 \times$ qPCR Mix (Promega, 美国) 7.5 μ L, 10 μ mol/L 正、反向引物各 1.0 μ L, 反转录产物 2.0 μ L, ddH₂O 3.5 μ L。PCR 程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 循环 40 次。以 U6 作为内参基因,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析 miRNA 相对表达量。荧光定量 PCR 所用引物序列见表 1。

1.4 Cry1Ab 敏感性测定

将杀虫蛋白 Cry1Ab (Envirologix, 美国)配置为 2 mg/mL 溶液备用。取冻存的 Sf9 细胞,于 37 °C 快速解冻,以 1 200 r/min 离心 3 min。弃去上清,加入 6 mL 培养基,28 °C 恒温培养箱培养。待细胞长满后调整浓度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔培养板,28 °C 恒温培养箱培养 24 h。将 Cry1Ab 稀释为 6 个浓度(100, 200, 300, 400, 500, 800 μ g/mL),每孔给药 100 μ L,每个处理重复 3 次。药后 4 h 每孔加入 10 μ L 噻唑蓝(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT),28 °C 恒温培养箱培养 4 h; 吸净孔内液体,加入 150 μ L 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO),于室温振荡 10 min; 以酶标仪测定吸光值 OD_{492} 。利用 Excel 中 STDEV 函数计算各处理组的 OD_{492} 均值及标准差,按照下述公式计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率(%) = $\frac{(\text{空白对照组 } OD_{492} - \text{处理组 } OD_{492})}{\text{空白对照组 } OD_{492}} \times 100$

1.5 统计分析

利用 SAS 8.0 进行统计分析,并采用邓肯新复极差法(Duncan's multiple range test, DMRT)和 *t* 检验对各处理数据进行差异显著性分析。利用 CurveExpert 1.4 软件进行毒力回归分析,得到拟合曲线及对应回归方程;根据回归方程计算细胞增殖抑制率为 50% 时对应的 Cry1Ab 浓度,即抑制中浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

表 1 用于荧光定量 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time PCR amplification

引物名称 Primer name	序列(5'~3') Sequence	用途 Application
miR-31F	CTCAACTGGTGTCTGTTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAAACAGCT	miR-31 扩增
miR-31R	ACACTCCAGCTGGGAGGCAAGATGTTGGCATAG	miR-31 amplification
U6F	CTCGCTTCGGCAGCACA	内参基因
U6R	AACGCTTACGAATTTGCGT	Reference gene

2 结果与分析

2.1 miR-31在亚洲玉米螟不同组织的表达差异

为了解miR-31在亚洲玉米螟不同组织的表达差异,对于ACB-BtS和ACB-AbR的5龄幼虫表皮和中肠组织,利用荧光定量PCR方法进行表达量分析。结果显示,亚洲玉米螟Bt敏感品系(ACB-BtS)和Cry1Ab抗性品系(ACB-AbR)的表皮组织和中肠组织中,miR-31的表达量均存在显著差异。

miR-31在亚洲玉米螟Cry1Ab抗性品系(ACB-AbR)的表皮组织中表达量最高,在ACB-AbR的中肠组织表达量最低。与亚洲玉米螟Bt敏感品系(ACB-BtS)的相同组织比较,miR-31在Cry1Ab抗性品系表皮中的表达量显著上升,中肠中的表达量显著下降(图1)。

2.2 microRNA转染效果验证

将miR-31 Mimics、Inhibitor、Control和Normal分别转染Sf9细胞,Control和Normal的miR-31表达量没有明显变化;在miR-31 Mimics转染组,miR-31表达量相比对照组显著增加;在miR-31 Inhibitor转染组,miR-31表达量相比对照组显著降低;同时,48 h后miR-31被促进或抑制的效果较24 h更为显著(图2)。

2.3 miR-31对Sf9的Cry1Ab敏感性的影响

为了研究miR-31表达量对昆虫Cry1Ab敏感性的影响,以Sf9细胞为实验对象,转染miR-31

Mimics或Inhibitor以改变细胞中miR-31表达量,然后测定Sf9细胞对杀虫蛋白Cry1Ab的敏感性。结果显示,转染miR-31 Mimics后,Sf9细胞的 IC_{50} 为98.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$,显著低于正常对照(Normal)及Control处理(表2);转染miR-31 Inhibitor后,Sf9细胞的 IC_{50} 为182.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$,显著高于Normal及Control处理(表3)。实验结果提示,miR-31表达量升高导致Sf9对Cry1Ab敏感性增加。

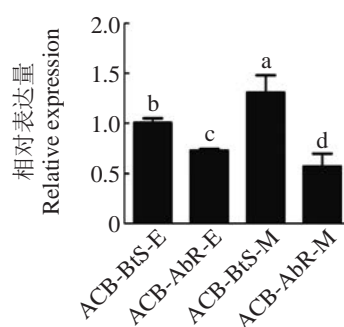


图1 miR-31在亚洲玉米螟不同品系中的组织表达分析

Figure 1 The tissue expression of miR-31 in different strains of Asian corn borer

不同字母表示 $P<0.05$; ACB-BtS-E: 亚洲玉米螟Bt敏感品系表皮组织; ACB-BtS-M: 亚洲玉米螟Bt敏感品系中肠组织; ACB-AbR-E: 亚洲玉米螟Cry1Ab抗性品系表皮组织; ACB-AbR-M: 亚洲玉米螟Cry1Ab抗性品系中肠组织

Different letters indicate $P<0.05$; ACB-BtS-E: The epidermis of Bt susceptible strain of Asian corn borer (ACB); ACB-BtS-M: The midgut of Bt susceptible strain of ACB; ACB-AbR-E: The epidermis of Cry1Ab resistant strain of ACB; ACB-AbR-M: The midgut of Cry1Ab resistant strain of ACB

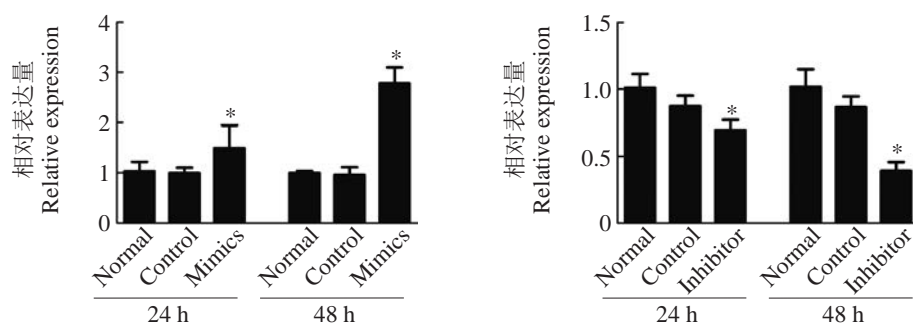


图2 miR-31在不同处理Sf9细胞中的表达变化

Figure 2 The expression of miR-31 in Sf9 with different treatments

*: 与Normal比较具有显著性差异($P<0.05$); Normal: 未转染寡核苷酸序列; Control: 转染无意义序列; Mimics: 转染miR-31模拟物序列; Inhibitor: 转染miR-31抑制物序列; 下同

*: Significant difference compared with the Normal ($P<0.05$); Normal: No transfection with oligonucleotide sequenc; Control: Transfected with meaningless sequence; Mimics: Transfected with miR-31 mimics sequence; Inhibitor: Transfected with miR-31 inhibitor sequence; The same below

3 讨论

自从1996年美国开始商业化种植转基因作物,全球转基因作物种植面积持续上升。到2015年,即转基因作物商业化种植的第20年,全球转基因作物种植面积达1.797亿hm²,其中转Bt基因作物0.84亿hm²(James, 2015)。转Bt基因作物有效控制了靶标害虫危害,降低了化学农药使用量,缓解了杀虫剂滥用造成的不良影响(Tabashnik, 2010)。

亚洲玉米螟是危害我国玉米产量和质量的最主要害虫(王振营等, 2000),实验发现表达Cry1Ab、Cry1fa和Cry1ie等基因的Bt玉米可以有效控制亚洲玉米螟危害(何康来等, 2004; 王培等, 2012; 王月琴等, 2014; 常雪等, 2013)。然而,持续使用含Bt杀虫蛋白的人工饲料筛选,可以导致亚洲玉米螟Bt产生抗性(韩海亮等, 2009; Xu et al., 2010; 贺明霞等, 2013),提示该虫具有产生田间Bt抗性的风险。

昆虫对Bt产生抗性,主要与其肠道环境、围食膜、受体蛋白等因素有关,其中受体蛋白的改变是主要因素。现有研究发现,亚洲玉米螟对Bt杀虫蛋白产生抗性,与APN和CAD等受体蛋白的碱基突变和表达量改变相关,然而确切的作用机制以及受体蛋白基因的表达调控机理尚不明确。

目前关于miR-31的研究主要集中于医学领域。在miRBase数据库中,miR-31被注释为肿瘤抑制性miRNA,该定义主要基于转移性乳腺癌中miR-31具有多重抗转移效应的研究事实(Valastyan et al., 2009)。在肺癌中,miR-31通过与大型肿瘤抑制剂基因(large tumor inhibitors, LATS)和蛋白磷酸酶2A-B55 α 亚基基因(protein phosphatase 2A-B55 alpha subunit gene, PPP2R2A)等抑癌基因相互作用而影响细胞增殖。在肠癌中,miR-31可激活小分子量G蛋白家族成员之一的Ras信号通路,进而抑制RASA1转运,导致肿瘤生长和恶性分化(Ivanov

表2 miR-31模拟物对Sf9细胞生物指标的影响分析

Table 2 Effects of miR-31 mimics on biological indexes of Sf9 cells

组别	Cry1Ab浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\bar{X}(OD_{420})\pm SD$	细胞增殖抑制率/%	抑制中浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Group	Concentration of Cry1Ab		Inhibition rate of cell proliferation	IC_{50}
Normal	0	0.94 \pm 0.01		124.42
	100	0.51 \pm 0.01	45.12	
	200	0.38 \pm 0.00	59.43	
	300	0.34 \pm 0.00	63.49	
	400	0.32 \pm 0.01	65.62	
	500	0.32 \pm 0.00	66.16	
	800	0.30 \pm 0.01	67.69	
Control	0	0.88 \pm 0.01		116.27
	100	0.48 \pm 0.01	45.18	
	200	0.32 \pm 0.01	63.28	
	300	0.31 \pm 0.01	64.53	
	400	0.31 \pm 0.01	65.17	
	500	0.28 \pm 0.01	67.74	
	800	0.25 \pm 0.01	71.36	
Mimics	0	0.84 \pm 0.01		98.39*
	100	0.40 \pm 0.01	51.98	
	200	0.31 \pm 0.01	63.28	
	300	0.29 \pm 0.00	65.62	
	400	0.27 \pm 0.01	68.24	
	500	0.23 \pm 0.01	73.16	
	800	0.21 \pm 0.01	75.61	

*: 与正常细胞比较具有显著性差异($P<0.05$);下同

*: Significant difference compared with the Normal ($P<0.05$); The same below

et al., 2010; Sun et al., 2013)。在胶质瘤组织和细胞中, miR-31 都呈现低表达状态, 表达水平随着胶质瘤级别的升高而降低; miR-31 表达调控实验证明, 其在胶质瘤中充当抑癌因子(侯文仲等, 2017)。本研究通过荧光定量 PCR 发现, 与 ACB-BtS 表皮组织相比, miR-31 在 ACB-AbR 表皮中的表达量显著上升, 而在 ACB-BtS 和 ACB-AbR 中肠内的表达量却显著下降, 而且 miR-31 在 ACB-AbR 中肠的表达量显著低于其在 ACB-BtS 中肠的表达量。进而利用 Sf9 细胞进行杀虫蛋白 Cry1Ab 敏感性测定发现, 转染 miR-31 Mimics 可提高 Sf9 细胞 miR-31 表达量, 并且 Sf9 细胞的 IC_{50} 为 $98.39 \mu\text{g}/\text{mL}$, 显著低于正常对照(Normal)和无意义序列转染处理(Control); 转染 miR-31 Inhibitor 而抑制 miR-31 表达量后, Sf9 细胞的 IC_{50} 为 $182.58 \mu\text{g}/\text{mL}$, 显著高于 Normal 和 Control 处理。实验结果提示, miR-31 表达量升高导致 Sf9 对 Cry1Ab 敏感性增加, 这一结果与 miR-31 在 ACB-AbR 中肠的表达量低于 ACB-BtS 相一致。

目前关于农业昆虫 miRNA 的功能研究尚处于

起步阶段, 仅在少数昆虫中发现 miRNA 可以影响靶标昆虫的药剂敏感性。人工饲喂 miRNA 类似物或抑制剂, 改变棉蚜(*Aphis gossypii*)体内 miR-276 和 miR-3016 的表达量后, 蚜虫体内乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的表达量以及对螺虫乙酯的耐受性均发生改变(Wei et al., 2016)。miR-7a 和 miR-8519 可以调控小菜蛾(*Plutella xylostella*)体内二酰胺类杀虫剂的靶标—鱼尼丁受体(ryanodine receptor, PxRyR)的表达(Li et al., 2015)。拟除虫菊酯抗性尖音库蚊(*Culex pipiens*)品系中, miR-278-3p 表达量与细胞色素 P450 家族成员 *CYP6AG11* 的表达量具有相关性, 通过微量注射促进 miR-278-3p 过表达后, 尖音库蚊存活率显著下降, 而 *CYP6AG11* 表达量同时下降(Lei et al., 2015)。

本研究发现, miR-31 在亚洲玉米螟的表达具有组织特异性。由于前期研究发现, 亚洲玉米螟中肠 Bt 受体蛋白表达量的改变可以影响其对 Bt 的敏感水平, 因此推测, 亚洲玉米螟 Cry1Ab 抗性品系幼虫中肠 miR-31 表达量下降, 可能导致试虫对

表 3 miR-31 抑制物对 Sf9 细胞生物指标的影响分析

Table 3 Effects of miR-31 inhibitor on biological indexes of Sf9 cells

组别 Group	Cry1Ab 浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Concentration of Cry1Ab	$\bar{X}(OD_{420}) \pm SD$	细胞增殖抑制率/% Inhibition rate of cell proliferation	抑制中浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ IC_{50}
Normal	0	1.05±0.02		146.44
	100	0.54±0.02	48.59	
	200	0.46±0.01	56.26	
	300	0.38±0.00	63.52	
	400	0.30±0.00	71.32	
	500	0.26±0.00	75.72	
	800	0.24±0.01	77.21	
Control	0	0.99±0.01		134.41
	100	0.52±0.03	47.58	
	200	0.44±0.01	55.42	
	300	0.35±0.01	64.51	
	400	0.27±0.01	72.26	
	500	0.24±0.01	75.76	
	800	0.22±0.007	77.85	
Mimics	0	1.02±0.01		182.58*
	100	0.54±0.01	47.15	
	200	0.44±0.02	56.41	
	300	0.43±0.02	57.79	
	400	0.40±0.01	61.06	
	500	0.39±0.01	62.04	
	800	0.36±0.02	64.20	

Cry1Ab 蛋白产生一定抗性。然而 miR-31 表达量变化引发的生物学效应仍需进一步研究予以验证。同时, Cry1Ab 抗性亚洲玉米螟表皮组织中 miR-31 表达量上升, 是否对 Cry1Ab 抗性品系中肠组织中 miR-31 表达量下降表现出补偿作用, 以及 miR-31 的作用机制尚需深入探讨。

4 结论

本研究证实亚洲玉米螟体内存在 miR-31, 其表达具有组织特异性, 在中肠组织的表达量降低与昆虫对杀虫蛋白 Cry1Ab 产生抗性具有潜在的相关性。上述结果为进一步探明亚洲玉米螟对 Cry1Ab 产生抗性的机理提供了新的线索, 但是相关作用机制仍需进一步研究。

参考文献

常雪, 王伟, 沈志成, 等. 2013. 转 cry1Ab/cry2Aj 玉米对亚洲玉米螟的抗性评价[J]. 植物保护学报, 40(4): 339-344. (Chang X, Wang W, Shen Z C, et al. 2013. Evaluation of transgenic cry1Ab/cry2Aj maize for its resistance to *Ostrinia furnacalis*[J]. Acta Phytopylacica Sinica, 40(4): 339-344.)

韩海亮, 李光涛, 王振营, 等. 2009. Cry1Ac 抗性亚洲玉米螟对四种 Bt 蛋白的交互抗性[J]. 植物保护学报, 36(4): 329-334. (Han H L, Li G T, Wang Z Y, et al. 2009. Cross-resistance of Cry1Ac selected Asian corn borer to other Bt toxins[J]. Acta Phytopylacica Sinica, 36(4): 329-334.)

何康来, 王振营, 文丽萍, 等. 2004. 转 Bt 基因玉米对亚洲玉米螟的抗性评价[J]. 中国农学通报, 20(6): 240-242. (He K L, Wang Z Y, Wen L P, et al. 2004. Transgenic maize evaluated for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 20(6): 240-242.)

贺明霞, 何康来, 王振营, 等. 2013. Cry1Ie 毒素胁迫下亚洲玉米螟的抗性发展及汰选种群对其他 Bt 毒素的交互抗性[J]. 昆虫学报, 56(10), 1135-1142. (He M X, He K L, Wang Z Y, et al. 2013. Selection of Cry1Ie resistance and cross-resistance of the selected strain of other Cry toxins in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) [J]. Acta Entomologica Sinica, 56(10): 1135-1142.)

侯文仲, 毛振敏, 曾敏敏, 等. 2017. MicroRNA-31 在胶质瘤中的表达及功能研究[J]. 转化医学电子杂志, 4(6): 26-28. (Hou W Z, Mao Z M, Zeng M M, et al. 2017. Study

on the expression and function of microRNA-31 in glioma[J]. E-journal of Translational Medicine, 4(6): 26-28.)

王培, 何康来, 王振营, 等. 2012. 转 cry1Ac 玉米对亚洲玉米螟的抗性评价[J]. 植物保护学报, 39(5): 395-400. (Wang P, He K L, Wang Z Y, et al. 2012. Evaluating transgenic cry1Ac maize for resistance to *Ostrinia furnacalis* (Guenée) [J]. Acta Phytopylacica Sinica, 39(5): 395-400.)

王月琴, 何康来, 江帆, 等. 2014. BT799 玉米对亚洲玉米螟抗性研究[J]. 应用昆虫学报, 51(3): 636-642. (Wang Y Q, He K L, Jiang F, et al. 2014. Resistance of transgenic Bt corn variety BT799 to the Asian corn borer[J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 51(3): 636-642.)

王振营, 鲁新, 何康来, 等. 2000. 我国研究亚洲玉米螟历史、现状与展望[J]. 沈阳农业大学学报, 31(5): 402-412. (Wang Z Y, Lu X, He K L, et al. 2000. Review of history, present situation and prospect of the Asian maize borer research in China[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 31(5): 402-412.)

Agrawal A, Rajamani V, Reddy V S, et al. 2015. Transgenic plants over-expressing insect specific microRNA acquire insecticidal activity against *Helicoverpa armigera*: An alternative to Bt-toxin technology[J]. Transgenic Research, 24(5): 791.

Grimson A, Farh K K, Johnston W K, et al. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing[J]. Molecular Cell, 27(1): 91-105.

Han L, Han C, Liu Z, et al. 2014. Binding site concentration explains the differential susceptibility of chilo suppressalis and *Sesamia inferens* to Cry1A-producing rice[J]. Applied and Environmental Microbiology, 80(16): 5134-5140.

Heckel D G, Gahan L J, Baxter S W, et al. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of *Lepidoptera*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 95(3):192-197.

Ivanov S V, Goparaju C M, Lopez P, et al. 2010. Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma[J]. The Journal of Biological Chemistry, 285(30): 22809-22817.

James C. 2015. 20th anniversary of the global commercialization of biotech crops (1996 to 2015) and biotech crop highlights in 2015[R]. ISAAA Brief No. 51. International service for the acquisition of agri-biotech applications: Ithaca, NY, pp 5-12

Jiang S, Wu H, Liu H, et al. 2017. The overexpression of insect endogenous small RNAs in transgenic rice inhibits growth and delays pupation of striped stem borer (*Chilo suppressalis*) [J]. Pest management science, 73(7), 1453-

- 1461.
- Lei Z, Lv Y, Wang W, et al. 2015. MiR-278-3p regulates pyrethroid resistance in *Culex pipiens pallens*[J]. Parasitology Research, 114(2): 699-706.
- Li X, Guo L, Zhou X, et al. 2015. miRNAs regulated overexpression of ryanodine receptor is involved in chlorantraniprole resistance in *Plutella xylostella*[J]. Scientific Reports, 5: 14095.
- Pigott, C R, & Ellar, D J. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(2): 255-281.
- Rouas R, Fayyad-Kazan H, El Zein N, et al. 2009. Human natural Treg microRNA signature: Role of microRNA-31 and microRNA-21 in *FOXP3* expression[J]. European Journal of Immunology, 39(6): 1608-1618.
- Suárez Y, Wang C, Manes T D, et al. 2010. Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of Eselectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: Feedback control of inflammation[J]. The Journal of Immunology, 184(1): 21-25.
- Sun D, Yu F, Ma Y, et al. MicroRNA-31 activates the RAS pathway and functions as an oncogenic MicroRNA in human colorectal cancer by repressing RAS p21 GTPase activating protein 1 (RAS A1)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 288(13): 9508-9518.
- Sun F, Wang J, Pan Q, et al. 2009. Characterization of function and regulation of miR-24-1 and miR-31[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 380(3): 660-665.
- Tabashnik B E. 2010. Communal benefits of transgenic corn [J]. Science, 330(6001): 189-190.
- Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, et al. 2009. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis[J]. Cell, 137(6): 1032-1046.
- Wei X, Zheng C, Peng T, et al. 2016. miR-276 and miR-3016 modulated expression of acetyl-CoA carboxylase accounts for spirotetramat resistance in *Aphis gossypii* Glover[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 79: 57-65.
- Wei J, Zhang M, Liang G, et al. 2016. APN1 is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea*[J]. Scientific Reports, 6: 19179.
- Xu L N, Ling Y H., Wang Z Y, et al. 2015. Identification of differentially expressed microRNAs between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab-resistant and susceptible strains of *Ostrinia furnacalis*[J]. Scientific Reports, 5: 15461.
- Xu L N, Wang Z Y, Zhang J, et al. 2010. Cross-resistance of Cry1Ab-selected Asian corn borer to other Cry toxins [J]. Journal of Applied Entomology, 134(5): 429-438.
- Zhang Y L, Huang Q X, Yin G H, et al. 2015. Identification of microRNAs by small RNA deep sequencing for synthetic microRNA mimics to control *Spodoptera exigua*[J]. Gene, 557(2): 215-221.

(责任编辑 杨 芬)