



胡亚, 罗嫚, 吴建伟. 家蝇微生物感染对 RNA 干扰 *GNBP3* 基因的作用 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (1): 162–169.

家蝇微生物感染对 RNA 干扰 *GNBP3* 基因的作用

胡亚^{1*}, 罗嫚², 吴建伟³

(1. 毕节市第一人民医院, 贵州毕节 551700; 2. 毕节市中医院, 贵州毕节 551700; 3. 贵州医科大学, 贵阳 550004)

摘要: 为了研究家蝇 *Musca domestica* 微生物感染对 RNA 干扰 *GNBP3* 基因的作用, 评价微生物感染后对下游抗菌肽水平的影响, 本研究用 RNA 干扰技术沉默家蝇 *GNBP3* 基因探索最佳沉默时间及效果, 检测 RNA 干扰后家蝇幼虫存活及化蛹情况, 通过微生物喂食途径感染, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测抗菌肽基因 (*cecropins*、*defensin*、*diptericin*) 的表达情况。结果显示注射 ds*GNBP3* 后家蝇 *GNBP3* 基因在 24 h 达到有效沉默, 沉默 *GNBP3* 基因后家蝇幼虫的化蛹率及存活率降低。RNA 干扰 *GNBP3* 基因后, 在未感染组中, *cecropins* 的表达量显著性降低; 白色念珠菌感染后, *cecropins* 的表达与未感染组呈相似的趋势 ($P < 0.0001$); 而大肠杆菌和金黄色葡萄球菌感染后, *cecropins* 的表达量显著提高 ($P < 0.05$)。对家蝇 *diptericin* 基因的表达量进行分析, 在未感染组中, *diptericin* 的表达量显著性降低 ($P < 0.0001$); 而大肠杆菌和白色念珠菌感染后, *diptericin* 的表达量显著提高 ($P < 0.05$); 但金黄色葡萄球菌感染后其表达在两组间无统计学意义 ($P > 0.05$)。对家蝇 *defensin* 基因的表达量进行分析, 在未感染组中, *defensin* 的表达量显著性降低 ($P < 0.05$); 而白色念珠菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌感染后其表达在两组间均无统计学意义 ($P > 0.05$)。家蝇 *GNBP3* 基因在 24 h 时得到有效沉默并使抗菌肽基因的表达降低, 细菌感染能够增高抗菌肽基因 (*cecropins*、*diptericin*) 的表达, 而真菌感染时抗菌肽基因的表达各不相同。推测各抗菌肽基因间呈协同调节抗真菌的作用, 且家蝇 *GNBP3* 基因在抗真菌免疫中起到一定作用, 但可能同时存在其它抗真菌途径以共同完成家蝇先天性免疫系统对真菌的免疫应答。

关键词: RNA 干扰; 革兰氏阴性菌结合蛋白 3 (*GNBP3*); 感染; 抗菌肽; 家蝇

中图分类号: Q965; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 01-0162-08

Effect of microorganism infection of *Musca domestica* on RNA interference of *GNBP3* gene

HU Ya^{1*}, LUO Man², WU Jian-Wei³ (1. Bijie First Municipal People's Hospital, Bijie 551700, Guizhou Province, China; 2. Bijie Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bijie 551700, Guizhou Province, China; 3. Medical University of Guizhou, Guiyang 550004, China)

Abstract: To study the functional roles of housefly larvae *GNBP3* in response to microorganism infection and evaluate the effects on downstream AMP levels, we used RNA interference to inhibit the production of *GNBP3* and measured the interference effect with quantitative real-time PCR. Then we evaluated the challenge with exogenous microbes. Through *GNBP3* dsRNA microinjection, *GNBP3* was knocked down in the first 24 h after the injection, the survival rate and pupation rate of *GNBP3*-depleted housefly larvae was severely suppressed compared with *GFP* dsRNA and blank control group ($P < 0.05$). The expression of AMP genes (*cecropins*, *defensin*, *diptericin*) was lower than those of control group after *GNBP3* RNA

基金项目: 贵州省科技厅省校合作项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7076 号); 国家自然科学基金 (81360254); 贵州省卫生计生委科学技术项目 (gzwjkj2014-2-100)

* 通讯作者 Author for correspondence: 胡亚, 硕士, 检验主管技师, 研究方向为医学昆虫免疫及应用, E-mail: hooyaa@126.com

收稿日期 Received: 2020-09-25; 接受日期 Accepted: 2021-02-18

interference ($P < 0.05$)。But its expression varied after exogenous microbes infection, its low expression with *cecropins* gene and high expression with *dipterocin* gene after fungal infections compared with those of control, high expression (*cecropins*, *dipterocin*) with gram positive and negative bacteria infections ($P < 0.05$)。 *GNBP3* gene of housefly larvae was effectively silenced at 24 h after RNAi, that could cause a low expression of antibacterial peptide genes in the blank control. The highly expression (*cecropins*, *dipterocin*) with bacteria infections and difference expression with fungal infection. It was speculated that among various antibacterial peptide gene was synergy to adjust the action of antifungal, and housefly *GNBP3* gene played a significance role in the antifungal immunity, but there also were other antifungal ways at the same time for adjustments of housefly innate immune system to identification of fungi and immune response.

Key words: RNA interference; gram negative binding protein 3 (*GNBP3*); infection; antimicrobial peptide; *Musca domestica*

随着免疫抑制剂及广谱抗生素的大量使用, 真菌感染尤其是白色念珠菌引起的机会性感染逐年增加, 已严重威胁着人类生命健康 (Marchetti *et al.*, 2004; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013)。宿主的免疫反应抵御白色念珠菌的入侵, 而对于宿主-病原菌相互作用的免疫应答反应还缺乏适合的动物模型。因此, 利用合适的动物模型深入研究真菌感染后宿主的免疫应答变化及其调控机制是非常必要的。先天免疫系统是宿主抵御病原入侵的第一防线, 昆虫的先天性免疫系统具有高效抵御微生物病原侵害的效能, 应用昆虫作为实验模型的实验结果不受获得性免疫应答的干扰, 因此, 大蜡蛾蜡螟 *Galleria mellonella*、家蚕 *Bombyx mori*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、象鼻虫 *Boll weevil* 等昆虫已成为研究病原微生物与宿主之间先天免疫的重要模型 (Pollard *et al.*, 2012; 徐颖, 2012; Afonso-Barroso *et al.*, 2013; Huet *et al.*, 2013; Rader and Guillemain, 2013; Rivas-Santiago *et al.*, 2013)。

昆虫体液免疫在其先天性免疫中起关键作用 (Kounatidis and Ligoxygakis, 2012)。昆虫机体受微生物入侵后, 体液中的分泌型模式识别受体 (PRR, Pattern Recognition Receptor) 对病原微生物的病原相关分子模式 (PAMPs, Pathogen associated molecular patterns) 进行识别, 通过信号通路进行转导和调控, 最终促使脂肪体细胞合成抗菌肽, 抗菌肽分泌到血淋巴中杀死入侵的病原体 (Kurata, 2014; 胡亚等, 2016)。研究发现, 抗菌肽的表达主要由 Toll 信号通路和 IMD 信号通路控制 (Lemaitre and Hoffmann, 2007; 修江帆等, 2014), 其中真菌与大多数革兰氏阳性菌激活 Toll 信号途径, 革兰氏阴性菌激活 IMD 信号通路

(Sony and Yonggyun, 2010; Cho *et al.*, 2012; Kleino and Silverman, 2014), 抵御并消除病原微生物对机体的损伤, 这一复杂的过程是基于昆虫体液免疫模式识别微生物的病原相关分子。

在 Toll 受体介导的信号通路中, 真菌感染靶生物时, 机体启动免疫防御主要依赖于体液免疫系统对外源微生物的非特异性识别。真菌细胞壁中的 β -1, 3 葡聚糖作为基本功能单位, 可直接与靶生物体液中的革兰氏阴性菌结合蛋白-3 (*GNBP3*, Gramnegative bacteriabinding protein 3) 的功能结构域相互作用, 从而完成免疫系统对侵入体液中真菌的识别 (Mishima *et al.*, 2009), 如在果蝇 (Matskevich *et al.*, 2010; Fullaondo *et al.*, 2011)、黄粉虫 (Lee *et al.*, 2009) 中, *GNBP3* 结合 β -1, 3 葡聚糖, 然后迅速活化 Toll 信号通路上游的一系列信号级联传递, 最终启动抗菌肽的转录, 参与抗真菌防御 (胡亚等, 2016)。

家蝇 *Musca domestica* 是世界性昆虫, 隶属于昆虫纲双翅目环裂亚目蝇科家蝇属, 孳生环境复杂, 是重要的媒介昆虫之一 (魏川川等, 2015), 其体表可携带多种病原体而自身很少受害, 说明家蝇比其它昆虫可能具有更强大的先天免疫系统 (修江帆等, 2014; 王宇等, 2015; 彭传林等, 2015)。目前国内学者研究已表明, 家蝇能够产生 attacin、cecropin、defensin、dipterocin 等多种常见抗菌肽多肽 (Wang *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2013)。家蝇基因组和 Jeffrey 等 (2014) 的研究结果表明 *GNBP3* 是信号通路上游的模式识别受体, 参与昆虫先天性免疫应答反应对真菌的识别, 其能够识别真菌细胞壁中的 β -1, 3 葡聚糖, 完成免疫系统对侵入体液中真菌的识别, 从而宿主对真菌产生免疫抵

抗,且根据本课题组前期家蝇转录组分析表明,GNBP3 是家蝇迄今为止唯一的一个 *GNBP* 基因编码的真菌模式识别受体(胡亚等,2016),而有关 GNBP3 在家蝇感染后的表达情况及抗菌肽的表达情况,国内外尚未见相关研究报道,GNBP3 在家蝇先天性免疫系统中发挥什么作用还不清楚。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)可调节大多数动植物基因表达和用于研究抗病毒防御的发生(Fire *et al.*, 1998),已成为功能基因组学、生物医学和农业应用的重要工具(Price and Gatehouse, 2008; Kurreck, 2009)。一旦宿主细胞对 dsRNA 产生反应,其胞质中的核酸内切酶 Dicer 将 dsRNA 切割成多个具有特定长度和结构的小片段 RNA (siRNA), siRNA 再与体内一些酶(包括内切酶、外切酶、解旋酶等)结合形成 RNA 诱导的沉默复合物(RISC), RISC 与基因表达的 mRNA 的同源区进行特异性结合,从而诱发宿主细胞降解 mRNA (Siomi *et al.*, 2011)。因此,本研究采用 RNA 干扰技术沉默家蝇 *GNBP3* 基因,以微生物感染家蝇幼虫,研究家蝇幼虫 GNBP3 对真菌感染的功能作用,并评价真菌感染后对下游抗菌肽水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与实验昆虫

家蝇是由贵州医科大学病原生物学教研室长期饲养。饲养温度为 25~28℃,相对湿度为 70%~80%,光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗循环。家蝇幼虫 RNA 干扰模型的饲养温度是 20~25℃,饲以麦麸、热灭活酵母、水等。大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、白色念珠菌 *Candida Albicans* 由贵州医科大学病原生物学教研室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器

SYBR Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 试剂盒、rTaq 酶、分子量标准 DNA marker DL2000、质粒快速提取试剂盒、总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent、DNA 凝胶回收试剂盒质粒、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit 试剂盒、DEPC 水(焦碳酸二乙酯)均购自 Takara 公司; MEGAscriptR RNAi Kit 合成试剂盒(美国);所用引物由上海生工生物工程公司合成。ABI PRISM

7300 Fast real time PCR System (美国);核酸定量分析仪(GeneQuant 公司);PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司);显微解剖镜(尼康);显微超微量注射仪(美国);超净工作台(苏州净化设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

根据 NCBI 公布的家蝇基因组 *GNBP3* 基因预测序列、内参基因 *RPS18* 和抗菌肽基因 *defensin*、*cecropins*、*diptericin* 的基因序列,运用 Primer 5.0 软件设计内参 *RPS18* 基因、*GNBP3* 基因和抗菌肽基因的 q-PCR 引物及 *GNBP3* 基因和 *GFP* 基因的 dsRNA 合成引物。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其序列如下(表 1)。

1.2.2 双链 RNA 的制备

1.2.2.1 基因 PCR 扩增及线性 DNA 片段合成

以课题组保存的家蝇质粒为模板进行 PCR 扩增,扩增条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定及回收纯化。以纯化 PCR 产物为模板,引物为含有 T7 启动子的 *GNBP3* 引物,PCR 扩增条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min (罗嫚, 2017)。2% 琼脂糖凝胶电泳检测。然后用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物,并进行浓度测定。

1.2.2.2 dsRNA 的初步合成

以上述纯化 PCR 产物为模板,定量为 1 μg 进行 dsRNA 的合成,将无 RNase 的 PCR 小管(200 μL)置于冰盒上,Linear template DNA 1~2 μg, CTP Solution 2.0 μL, UTP Solution 2.0 μL, ATP Solution 2.0 μL, GTP Solution 2.0 μL, 10 × T7 Reaction Buffer 2.0 μL, T7 Enzyme Mix 2.0 μL, Nuclease-free Water 至 20.0 μL。轻轻混匀后瞬时离心,37℃ 孵育 6 h(最佳孵育时间根据基因长度而定)。

1.2.2.3 去除 DNA 和 ssRNA 及纯化 dsRNA

加入反应体系 dsRNA (1.2.2.2) 20 μL, Nuclease-free Water 21 μL, 10 × Digestion Buffer 5.0 μL, DNase I 2.0 μL, RNase I 2.0 μL, 总体积为 50 μL。轻轻混匀后瞬时离心,37℃ 孵育 1 h (不得超过 2 h)。加入 dsRNA 50 μL, 10 × Binding Buffer 50 μL, Nuclease-free Water 150 μL, 100% Ethanol 250 μL, 总体积至 500 μL 进行纯化并测定浓度, -20℃ 冰箱保存备用。

表 1 本文中所使用的引物
Table 1 The primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence
GNBP3-QF	5'-CAGACGAGAAATGATGGAGGAC-3'
GNBP3-QR	5'-TATTGCGATAAGTTGTGTGC-3'
RPS18-F	5'-CGCGGATCCATGTCGCTCGTTAT-3'
RPS18-R	5'-CCCAAGCTTTTACTTCTTCTTGAT-3'
cecropins-F	5'-GGACAAAGTGAAGCTGGATGGTT-3'
cecropins-R	5'-GCTGGGCCACACCAATAGTTTGA-3'
defensin-F	5'-AAATTTCTGCTCCATGGAGCTGACGC-3'
defensin-R	5'-ACCGCTCAACAAATCGCAAGTAG-3'
diptericin-F	5'-AGTGCAACATTTGTGGTTGCCGAC-3'
diptericin-R	5'-GCCATAACCTGCTGTGGCATCA-3'
dsGNBP3-T7F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGGCTGGAGCCCATTGATCCC-3'
dsGNBP3-T7R	5'-TAATACGACTCACTATAGGGCCACCCGCAAATAGAACTCC-3'
dsGFP-T7F	5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'
dsGFP-T7R	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
GFP-F	5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'
GFP-R	5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'

1.2.3 dsRNA 注射家蝇幼虫

根据预实验结果,选择家蝇 2 龄幼虫,幼虫体表依次用 75% 酒精及灭菌水进行擦拭,然后用干净纸巾吸干幼虫体表的水分(罗嫚,2017)。对家蝇 2 龄幼虫利用显微超微量注射仪注射 dsRNA(定量为 2 μg),设立 *GNBP3* RNA 干扰实验组,同时注射 ds*GFP* 作为对照组,并设立空白对照组,每组 100 头幼虫,将其饲养于 20℃ 恒温培养箱中。参照钟鸣研究结果(钟鸣,2014),设立干扰时间点分别为 24 h、48 h 和 72 h,收集样本以确定最佳干扰时间点,记录 RNA 干扰后家蝇幼虫的死亡和化蛹等生理学特性,进行 3 次重复实验。

1.2.4 微生物感染

以白色念珠菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌作为感染源,通过喂食途径感染 RNA 干扰 24 h 后并饥饿 6 h 的家蝇幼虫(ds*GFP* 组和 ds*GNBP3* 组),细菌感染浓度为 1 × 10⁸ CFU/mL,设置为感染组,感染过程参照王宇对家蝇幼虫经口途径饲喂白色念珠菌感染模型的建立(王宇,2016;罗嫚,2017)。同时设置未感染对照组,感染后 6 h 进行各标本的收集,−80℃ 保存备用。每组进行

3 个重复实验。

1.2.5 样本总 RNA 的提取及 cDNA 合成

对所有收集标本,按照 Takara 公司 TRIzol 说明书提取总 RNA。取总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,同时测定 A_{260/280} 比值及浓度。以 1 μg 总 RNA 为模板进行 cDNA 的合成,合成的 cDNA 保存于 −80℃ 冰箱中备用。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测

取家蝇 2 龄幼虫 RNA 干扰不同时间点(24 h、48 h 和 72 h)(ds*GFP* 对照组、ds*GNBP3* 实验组和空白对照组) cDNA(1:10 稀释)为模板,以 *GNBP3* 为目的基因,*RPS18* 为内参基因,使用 ABI PRISM 7300(ABI,USA)进行荧光 PCR,确定最佳干扰时间,每个样品重复 3 次,每组 3 个重复。同样取家蝇微生物(大肠杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌)感染样本(PBS 对照组及感染组(ds*GFP* 组和 ds*GNBP3* 组)) cDNA(1:10 稀释)为模板,以 *defensin*、*cecropins*、*diptericin* 为目的基因,*RPS18* 为内参基因,按照 q-PCR 试剂盒说明进行 RT-PCR 反应,以检测抗菌肽基因表达情况,进行 3 × 3 重复实验。反应体系为:2 × SYBR

premixEX Taq II 10 μ L、上游引物 + 下游引物 1.6 μ L、ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μ L、cDNA 1.0 μ L, 加无 RNA 酶的水 (RNase Free dH₂O) 补足至 20 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。反应结束后, 确认 real-time PCR 的溶解曲线和扩增曲线。

1.2.7 数据处理及分析

采用 *RPS18* 作为内参照, 用 *RPS18* 的拷贝数作为校正基数, 按目的基因表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各细菌感染样本中目的基因 mRNA 的相对表达含量 (胡亚等, 2016)。采用 Graphpad prism 6 统计软件进行统计分析, 应用组间 *t* 检验进行分析, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *GNBP3* 基因 RNA 干扰效率检测

采用 q-PCR 方法检测 RNA 干扰后 *GNBP3* mRNA 相对表达量。通过对家蝇 2 龄幼虫注射 *GNBP3* dsRNA (2 μ g) 并收集注射后 24 h、48 h 和 72 h 样本, 以检测 *GNBP3* mRNA 的表达情况。结果表明, RNA 干扰 *GNBP3* 24 h 后, 较 *GFP* RNAi 对照组和空白对照组, *GNBP3* 基因表达量下降了大约 90%, 最佳的干扰效果在 48 h 时 (图 1)。此实验表明在干扰后 24 h 时 *GNBP3* 基因取得了较好的抑制作用, 为进一步实验提供了依据。

2.2 RNA 干扰后检测家蝇生理学指标

通过对家蝇幼虫注射 ds*GNBP3* 已达到沉默 *GNBP3* 基因的目的, 检测 *GNBP3* 基因在 RNA 干扰后是否会影响家蝇幼虫的化蛹及存活等生理学指标, 以探究其在家蝇中所起的重要作用。结果显示, 与对照组相比, 家蝇幼虫在 RNA 干扰后的存活率随着时间的变化逐渐降低, 最终存活率低于 50% (图 2)。除此之外, 家蝇幼虫的化蛹率也显著降低 (图 3)。

2.3 RNAi 家蝇 *GNBP3* 基因后抗菌肽基因的表达情况

以白色念珠菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为感染源, 通过喂食感染家蝇 RNA 干扰模型 (ds*GFP* 组和 ds*GNBP3* 组), 通过 q-PCR 方法检测抗菌肽基因的表达情况。结果显示, 在 *GFP* RNAi 组和 *GNBP3* RNAi 组之间, 对于不同微生物感染其抗菌肽基因 (*cecropins*、*defensin*、*diptericin*) 表

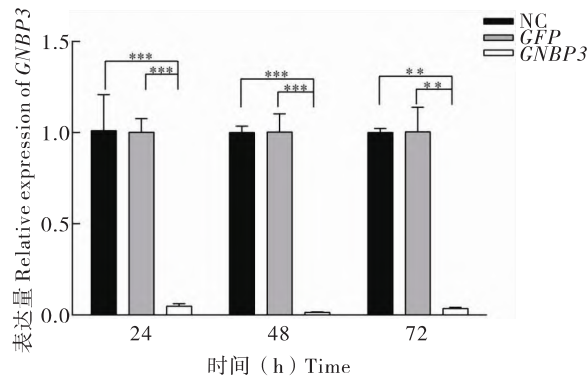


图 1 注射 dsRNA 后 *GNBP3* 基因的相对表达量

Fig. 1 Relative gene expression of *GNBP3* over time by dsRNA treatment

注: NC, 空白对照组; *GFP*, ds*GFP* 对照组; *GNBP3*, ds*GNBP3* 实验组; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。Note: NC, Normal control; *GFP*, ds*GFP* control group; *GNBP3*, ds*GNBP3* experience group.

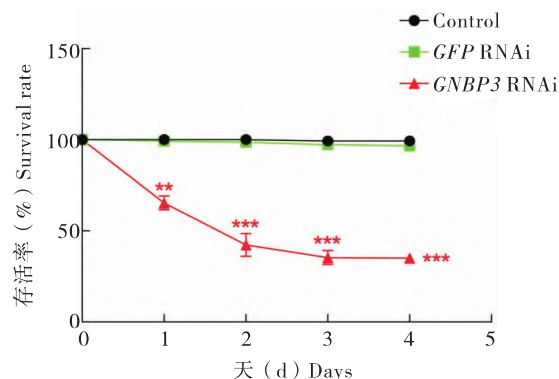


图 2 RNA 干扰后家蝇幼虫存活率

Fig. 2 Survival rate of housefly larvae after RNA interference

注: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$ 。下图同。Note: The same below.

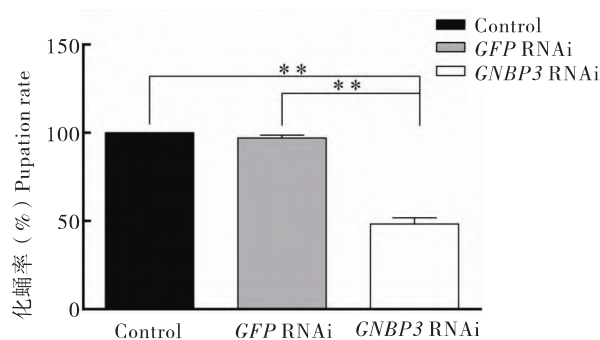


图 3 RNA 干扰后家蝇幼虫化蛹率

Fig. 3 Pupation rate of housefly larvae after RNA interference

达情况各有差异。

对家蝇 *cecropins* 基因的表达量进行分析后发现, 在未感染组中, RNA 干扰 *GNBP3* 后 *cecropins* 的表达量显著性降低; 而白色念珠菌感染后, *cecropins* 的表达与未感染组呈相似的趋势 (图 4-A, $P < 0.0001$); 但是, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌感染后, 在 *GNBP3* RNAi 后 *cecropins* 的表达量显著提高 (图 4-A, $P < 0.05$)。

对家蝇 *diphtericin* 基因的表达量进行分析后发现, 在未感染组中, RNA 干扰 *GNBP3* 后 *diphtericin* 的表达量显著性降低 (图 4-B, $P < 0.0001$); 而大肠杆菌和白色念珠菌感染后, 在 *GNBP3* RNAi 后

diphtericin 的表达量显著提高 (图 4-B, $P < 0.05$); 但金黄色葡萄球菌感染后其表达在两组间无统计学意义 (图 4-B, $P > 0.05$)。

对家蝇 *defensin* 基因的表达量进行分析后发现, 在未感染组中, RNA 干扰 *GNBP3* 后 *defensin* 的表达量显著性降低 (图 4-C, $P < 0.05$); 而白色念珠菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌感染后其表达在两组间均无统计学意义 (图 4-C, $P > 0.05$)。这说明 *GNBP3* 基因在家蝇先天性免疫应答中起着重要作用, 推测与其它免疫途径协同调节家蝇免疫应答。

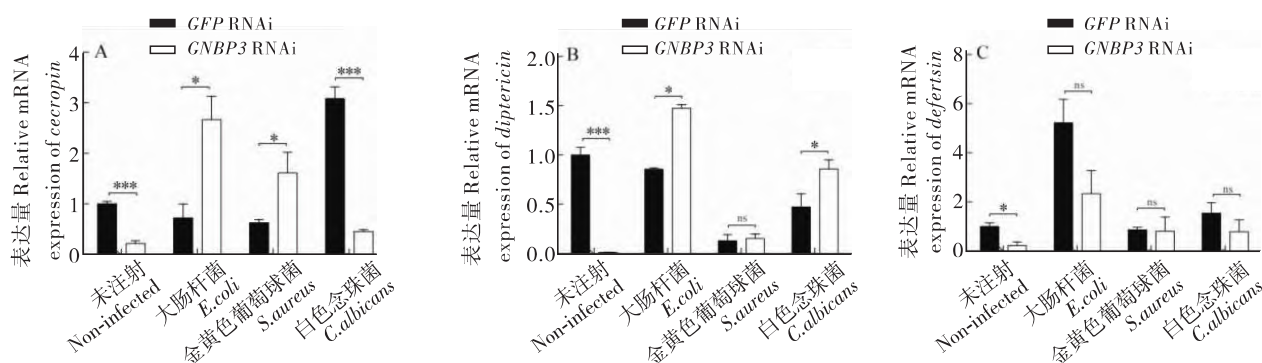


图 4 RNAi *GNBP3* 后家蝇抗菌肽基因的表达情况

Fig. 4 Housefly AMP genes expression after RNAi of *GNBP3*

注: A, 天蚕抗菌肽; B, 双翅肽; C, 防御素。Note: A, Cecropins; B, Diphtericin; C, Defensin.

3 结论与讨论

革兰氏阴性菌结合蛋白-3 (*GNBP3*) 作为昆虫先天性免疫病原识别因子, 参与昆虫先天性免疫应答, 其能够识别真菌细胞壁中的 β -1, 3 葡聚糖完成免疫系统对侵入体液中真菌的识别 (Mishima *et al.*, 2009; Matskevich *et al.*, 2010; Fullaondo *et al.*, 2011)。家蝇 *Musca domestica* 孳生于杂乱菌丛的环境中传播疾病, 是重要的媒介昆虫, 其有效的免疫防御系统得到很多研究者的关注, 而对于家蝇 *GNBP3* 基因及其感染后表达水平的研究未见报道 (胡亚等, 2016)。近年来, 基因敲除技术逐渐成为研究基因功能必不可少的工具, 但传统的基因敲除很难获得功能缺失的实验个体, RNAi 技术是一种利用特异双链 RNA 引起目的基因沉默的方法, 在基因功能分析的研究领域应用得尤为广泛。

本研究通过 RNA 干扰技术沉默家蝇 *GNBP3* 基

因, 检测 *GNBP3* 基因的干扰效率及家蝇幼虫在干扰后的生理学指标 (化蛹率及存活率), 对已确定家蝇 *GNBP3* 基因干扰模型进行微生物感染 (以白色念珠菌、大肠杆菌及金黄色葡萄球菌作为感染源), 通过 q-PCR 方法检测抗菌肽基因 (*cecropins*、*defensin* 及 *diphtericin*) 的表达情况。经过前期预实验, 对各龄期家蝇幼虫进行 dsRNA 注射, 以确定 dsRNA 注射的最佳龄期及浓度, 注射家蝇 1 龄幼虫后, 由于此期家蝇幼虫个体小, 体壁薄, 及针刺刺激, 其死亡率达到 100%, 注射家蝇 3 龄幼虫后, 由于家蝇幼虫受到外界刺激, 使得其化蛹时间提前, 无法完成后续实验, 对各龄期幼虫注射浓度为 1 μg 时, 并未达到干扰效果。对家蝇 2 龄幼虫注射 ds*GNBP3* (定量为 2 μg), 结果显示, 在干扰后 24 h 时家蝇 *GNBP3* 基因已达到有效沉默, 其干扰效率达到 90% 左右, 在 48 h 时沉默效果达到最佳, 但 72 h 时沉默效率有复苏的情况, 均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 其次, RNA 干扰家蝇 *GNBP3* 基因后, 家蝇幼虫的存活率逐渐降低达

50% 以上,同时化蛹率降低,均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这说明家蝇 *GNBP3* 基因能够影响家蝇幼虫的生长发育,推测干扰家蝇 *GNBP3* 基因后,扰乱了家蝇幼虫体内的菌群平衡状态,造成其死亡率增高及化蛹推迟现象。RNA 干扰家蝇 *GNBP3* 基因 24 h 后并饥饿 6 h 幼虫,再进行微生物感染 6 h,抗菌肽基因的表达各有差异。对于未感染组,*GNBP3* RNAi 组抗菌肽基因 (*defensin*、*cecropins* 及 *diptericin*) 的表达较 *GFP* RNAi 组呈显著性降低 ($P < 0.05$)。*GFP* 是一种理想的报告基因,对宿主的生理并无影响,同时它可以显示生物体一个或多个基因的表达状况,所以 *GFP* RNAi 后对家蝇幼虫没有影响却可以显示 *GNBP3* 基因和抗菌肽基因的表达情况,在未感染时 *GFP* RNAi 后 *GNBP3* 基因正常表达,抗菌肽基因也正常表达,当 *GNBP3* RNAi 后使抗菌肽基因呈现低表达状态,就此 *GNBP3* 基因的表达得到有效抑制,从而调节了抗菌肽基因的表达,这说明 *GNBP3* 基因参与了家蝇先天性免疫应答,在先天性免疫中有着至关重要的作用,可诱导抗菌肽基因的表达。白色念珠菌感染时,家蝇 *cecropins* 基因在 *GNBP3* RNAi 后的表达量显著性降低 ($P < 0.05$),*diptericin* 基因在 *GNBP3* RNAi 后的表达量显著性提高 ($P < 0.05$),而家蝇 *defensin* 基因的表达在两组间 (*GFP* RNAi 和 *GNBP3* RNAi) 差异不显著 ($P > 0.05$)。大肠杆菌感染时,家蝇 *cecropins* 基因及家蝇 *diptericin* 基因在 *GNBP3* RNAi 后的表达量显著性提高 ($P < 0.05$),而家蝇 *defensin* 基因的表达在两组间 (*GFP* RNAi 和 *GNBP3* RNAi) 差异不显著 ($P > 0.05$);金黄色葡萄球菌感染时,家蝇 *cecropins* 基因在 *GNBP3* RNAi 后的表达量显著性提高 ($P < 0.05$),而家蝇 *defensin* 基因及家蝇 *diptericin* 基因的表达在两组间 (*GFP* RNAi 和 *GNBP3* RNAi) 差异不显著 ($P > 0.05$)。*GNBP3* 基因能够激活 Toll 信号通路上游信号级联传递,启动下游抗菌肽基因的转录表达,使抗菌肽对微生物发挥查杀作用。通过对家蝇幼虫 *GNBP3* RNA 干扰模型在微生物感染下,各抗菌肽基因表达情况的研究,发现白色念珠菌感染家蝇时 *cecropins* 基因低表达,说明沉默的 *GNBP3* 导致由 β -1,3 葡聚糖激活的 Toll 通路基因不能被激活,酚氧化物酶活性降低,不能启动下游抗菌肽的应答反应,这说明家蝇 *GNBP3* 基因能够识别真菌以启动下游抗菌肽对真菌的查杀,在抗真菌免疫中起到一定作

用。然而每种抗菌肽都有不同的活性谱,*defensin* 一般情况下只对革兰氏阳性菌起作用;*diptericin* 对革兰氏阴性菌有较强杀伤作用;*cecropins* 对革兰氏阳性和阴性菌都有广谱的抗菌活性 (Li *et al.*, 2012; 罗嫚, 2017),造成不同微生物感染状态下各抗菌肽基因表达的差异性,白色念珠菌感染家蝇时 *diptericin* 基因高表达,大肠杆菌感染家蝇时 *cecropins* 及 *diptericin* 基因呈高表达,金黄色葡萄球菌感染家蝇时 *cecropins* 基因高表达,说明干扰 *GNBP3* 基因后并不能影响所有抗菌肽基因的表达反应,可能同时存在其它抗菌途径能够诱导抗菌肽的产生,呈现协同调节的作用,共同完成家蝇先天性免疫系统对真菌的识别及免疫应答,而对于家蝇先天性免疫系统对真菌的免疫应答机制需进一步研究。此次研究将为今后家蝇先天性免疫系统对真菌的免疫应答研究提供依据和参照,为进一步探讨家蝇先天性免疫系统提供新的思路。

参考文献 (References)

- Alastruey IA, Mellado E, Pelaez T, *et al.* Population based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (Filpop study) [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57 (7): 3380–3387.
- Afonso BA, Clark SO, Williams A, *et al.* Lipoarabinomannan mannose caps do not affect mycobacterial virulence or the induction of protective immunity in experimental animal models of infection and have minimal impact on *in vitro* inflammatory responses [J]. *Cellular Microbiology*, 2013, 15 (4): 660–674.
- Cho IH, Jeon JW, Paek SH, *et al.* Toll-like receptor-based immunoanalysis of pathogenic microorganisms [J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84 (22): 9713–9720.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 39 (1): 806–811.
- Fullaondo A, García SS, Sanz PA, *et al.* Spn1 regulates the *gnbp3*-dependent toll signaling pathway in *Drosophila melanogaster* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2011, 31 (14): 2960–2972.
- Huet O, Ramsey D, Miljavec S, *et al.* Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock [J]. *Shock*, 2013, 39 (6): 488–494.
- Hu Y, Luo M, Wang Y, *et al.* Cloning and expression pattern of *GNBP3* gene under the fungal infection in *Musca domestica* [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 39 (6): 596–604.
- [胡亚, 罗嫚, 王宇, 等. 家蝇 *GNBP3* 基因克隆及感染白色念珠菌后的表达 [J]. 环境昆虫学报, 2016, 39 (6): 596–604]
- Jin XB, Mei HF, Pu QH, *et al.* Effects of *Musca domestica* cecropin on the adhesion and migration of human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells [J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 36 (6): 938–943.

- Jeffrey GS, Wesley CW, Leo WB, *et al.* Genome of the house fly, *Musca domestica* L., a global vector of diseases with adaptations to a septic environment [J]. *Genome Biology*, 2014, 15 (10): 466.
- Kurreck J. RNA interference: From basic research to therapeutic applications [J]. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009, 48 (8): 1378–1398.
- Kounatidis I, Ligoxygakis P. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection [J]. *Open Biology*, 2012, 2 (5): 120075.
- Kurata S. Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 42 (1): 36–41.
- Kleino A, Silverman N. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 42 (1): 25–35.
- Liang YL, Wang JX, Zhao XF, *et al.* Molecular cloning and characterization of cecropin from the housefly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30 (3): 249–257.
- Lemaitre B, Hoffmann. The host defense of *Drosophila melanogaster* [J]. *Annual Review of Immunology*, 2007, 25: 697–743.
- Lee H, Kwon HM, Park JW, *et al.* N-terminal gnbp homology domain of gram-negative binding protein 3 functions as a beta-1,3-glucan binding motif in *Tenebrio molitor* [J]. *BMB Reports*, 2009, 42 (8): 506–510.
- Liu FS, Sun LL, Tang T, *et al.* Cloning, sequence analysis and induced expression of attacin2 gene in housefly (*Musca domestica*) [J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2011, 54 (1): 27–33.
- Li KM, Ren LY, Zhang YJ, *et al.* Knockdown of *Microplitis mediator* odorant receptor involved in the sensitive detection of two chemicals [J]. *J. Chem. Ecol.*, 2012, 38 (3): 287–294.
- Luo M. Molecular Cloning and Characterization of Peritrophic Matrix Protein (MdPM-17) in *Musca domestica* larvae [D]. Guiyang: Medical University of Guizhou, 2017. [罗嫚. 家蝇幼虫围食膜蛋白 (MdPM-17) 的基因克隆鉴定及其特性研究 [D]. 贵州: 贵州医科大学, 2017]
- Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, *et al.* Epidemiology of candidemia in swiss tertiary care hospitals: Secular trends, 1991–2000 [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, 38 (3): 311–320.
- Mishima Y, Quintin J, Aïmeida V, *et al.* The n-terminal domain of *Drosophila* gram negative binding protein 3 (GNBP3) defines a novel family of fungal pattern recognition receptors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (42): 28687–28697.
- Matskevich AA, Quintin J, Ferrandon D. The *Drosophila* PRR GNBP3 assembles effector complexes involved in antifungal defenses independently of its toll pathway activation function [J]. *European Journal of Immunology*, 2010, 40 (5): 1244–1254.
- Price DR, Gatehouse JA. RNAi mediated crop protection against insects [J]. *Trends Biotechnol.*, 2008, 26 (6): 393–400.
- Pollard AJ, Savulescu J, Oxford J, *et al.* Human microbial challenge: The ultimate animal model [J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2012, 12 (12): 903–905.
- Peng CL, Wang Y, Wu JW, *et al.* Cloning expression and sequence analysis of heat shock protein20 of *Musca domestica* [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2015, 31 (3): 330–333. [彭传林, 王宇, 吴建伟, 等. 家蝇热休克蛋白 HSP20 基因克隆、表达和序列分析 [J]. 中国公共卫生, 2015, 31 (3): 330–333]
- Rader BA, Guillemin K. Insights into the human microbiome from animal models [J]. *The Human Microbiota*, 2013: 273–288.
- Rivas SB, Castaneda DJE, Rivas SCE, *et al.* Ability of innate defence regulator peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to protect against *Mycobacterium tuberculosis* infections in animal models [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8 (3): e59119.
- Sony S, Yonggyun K. Activation of immune associated phospholipase A2 is functionally linked to toll/imd signal pathways in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34 (5): 530–537.
- Siomis MC, Sato K, Pezic D, *et al.* PIWI interacting small RNAs: The vanguard of genome defence [J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011, 12 (2): 246–258.
- Wang LC, Wang JX, Wang LY, *et al.* Cloning and sequence analysis of the full length cDNA encoding defensin, an antimicrobial peptide from the housefly (*Musca domestica*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, 49 (3): 408–413.
- Wang Y, Wu GJ, Luo M, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of *Musca domestica* thymosin gene [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31 (2): 143–147. [王宇, 吴高吉, 罗曼, 等. 家蝇 Thymosin (THY) 基因的克隆及原核表达 [J]. 生物技术通报, 2015, 31 (2): 143–147]
- Wang Y. Studies Midguttran Scriptome Peritrophic Matrix Proteome Housefly Larvae *Candida Albicans* [D]. Guiyang: Medical University of Guizhou, 2016. [王宇. 白假丝酵母菌感染家蝇幼虫中肠转录组及围食膜蛋白质组学研究 [D]. 贵州: 贵州医科大学, 2016]
- Xu Y. Research progress on innate immunity of Silkworm [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 26: 12891–12892. [徐颖. 家蚕先天性免疫的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 26: 12891–12892]
- Xiu JF, Wei CC, Chen MM, *et al.* Expression analysis of immune genes at different induction conditions of third instar larvae of *Musca domestica* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 6: 120–127. [修江帆, 魏川川, 陈明明, 吴建伟. 不同诱导条件下家蝇 (*Musca domestica*) 三龄幼虫免疫相关基因的表达研究 [J]. 生物技术通报, 2014, 6: 120–127]
- Yu X, Wan Z, Zhang Z, *et al.* Phenotypic and molecular identification of sporothrix isolates of clinical origin in northeast China [J]. *Mycopathologia*, 2013, 176 (1–2): 67–74.
- Zhong M. Cloning, Identification and Function of Aquaporins from *Musca domestica* [D]. Hunan: Central South University, 2014. [钟鸣. 家蝇水通道蛋白克隆、鉴定及其功能的研究 [D]. 湖南: 中南大学, 2014]