



蚊 circRNA-407 的分子进化及功能分析

周婉葵^{1,2}, 王衍海³, 高永辉^{2*}, 顾金保^{2*}

(1. 广东省佛山市南海经济开发区人民医院(检验科), 广东佛山 528000; 2. 广东省新发传染病重点实验室, 南方医科大学公共卫生学院, 广州 510515; 3. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 102206)

摘要: 媒介蚊虫可传播多种重要人类病原体是世界公共卫生的巨大威胁。雌蚊吸血后卵巢发育, 且可多次吸血、产卵, 这些生物学特征是蚊虫传播疾病的前提也是其种群不断全球扩张的重要原因。深入了解蚊虫血餐后卵巢发育的分子调控机制, 将有助于寻求蚊虫种群控制的新策略。环状 RNA (Circular RNA, circRNA) 是一种环状闭合的单链 RNA 分子, 其在生物体内可以通过多种方式参与基因调控从而发挥多种重要生物学功能, 且分子结构与功能在物种间具有一定保守性。本研究前期发现了白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 雌蚊卵巢高表达的 circRNA-407, 其可以通过特异结合 miR-9a 来影响其下游靶基因叉头框蛋白 L (*Fork head box L*, *FoxL*), 从而实现调控雌蚊血餐后卵巢发育的作用。但 circRNA-407 在蚊虫是否普遍存在, 功能是否保守未知。本研究基于 circRNA-407 源基因 (Host gene) 进行了基因结构与分子进化分析, 通过 RT-PCR 对其他蚊种的同源 circRNA-407 进行了验证, 通过生物信息学分析对 circRNA-407/miR-9a/*FoxL* 分子调控通路的保守性进行了探讨。RT-PCR 与测序结果首次证实了 circRNA-407 在蚊科中保守存在。分子进化与基因结构分析显示 circRNA-407 成环于其源基因的 4 个保守外显子, 此结构出现于双翅的共同祖先。生物信息学分析证实主要蚊种 circRNA-407 与 *FoxL* 均具有保守 miR-9a 潜在的结合位点, 暗示 circRNA-407/miR-9a/*FoxL* 分子通路参与雌蚊卵巢发育的调控是保守存在的。该研究为揭示了蚊虫重要生殖调控 circRNA 分子的进化起源与保守特征, 为利用该类分子为潜在靶标分子进行种群控制提供了理论基础。

关键词: 环状 RNA; 卵巢发育; 蚊科; 蚊媒防制

中图分类号: Q963

文献标识码: A

Molecular evolution and function analysis of circRNA-407 in mosquitoes

ZHOU Wan-Kui^{1,2}, WANG Yan-Hai³, GAO Yong-Hui^{2*}, GU Jin-Bao^{2*} (Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Nanhai Economic Development Zone in Foshan City, Foshan 528000, Guangdong Province, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Disease Research, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. China National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: Mosquitoes (Diptera: Culicidae) are undoubtedly the most important insect vectors for the transmitting parasitic and viral infections to humans and animals, posing persistent public health risks globally. Following blood ingestion, female mosquitoes initiate ovarian development and undergo repeated blood feeding and oviposition cycles throughout their lifespan. These biological traits serve as the foundation for the transmission of mosquito-borne diseases and significantly contribute to the global expansion of mosquito populations. A comprehensive understanding of the molecular regulatory mechanism in ovarian development post-blood meal is

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82372285); 广东省自然科学基金面上项目 (2022A1515010721)

作者简介: 周婉葵, 女, 广东佛山人, 硕士研究生, 研究方向为蚊媒防治, E-mail: 373072739@qq.com

*共同通讯作者 Author for correspondence: 顾金保, 男, 博士, 教授, 主要研究方向为蚊媒防制, E-mail: gujinbao@smu.edu.cn; 高永辉, 男, 博士, 医师, 主要研究方向为蚊媒防制, E-mail: 787052744@qq.com

收稿日期 Received: 2024-12-18; 修回日期 Revision received: 2025-02-21; 接受日期 Accepted: 2025-02-24

essential for development of novel strategies for mosquito population control. Circular RNA (circRNA) represents a single-stranded RNA molecule characterized by their covalently closed circular structure. They play the critical biological roles through diverse gene regulatory mechanisms and exhibit strong cross-species conservation. In our previous study, we identified a highly expressed circRNA-407 in the ovaries of *Aedes albopictus* females. This circRNA was found to regulate ovarian development by specifically binding to miR-9a, thereby influencing the expression of its downstream target gene *Forkhead Box L* (*FoxL*). However, the prevalence of circRNA-407 across mosquito species and the evolutionary conservation of its functional role remain to be further elucidated. In this study, we conducted gene structure and molecular evolutionary analyses of circRNA-407 and its host gene. Homologous sequences of circRNA-407 were detected in multiple mosquito species using RT-PCR, while RNA-hybrid tools were employed to predict potential miRNA binding sites. Our RT-PCR and Sanger sequencing results first confirmed the conservation of circRNA-407 within the Culicidae family. Molecular evolution and gene structure analyses revealed that circRNA-407 comprises four conserved exons derived from its host gene, with evolutionary origins tracing back to a common ancestor of Diptera. Bioinformatics analysis further demonstrated that both circRNA-407 and *FoxL* in major vector mosquitoes harbor conserved miR-9a binding sites, suggesting that the circRNA-407/miR-9a/*FoxL* regulatory axis governing ovarian development is evolutionarily conserved. These findings establish a foundation for using the conserved essential gene involved in mosquito reproduction as potential targets for population management.

Key words: circRNA; ovarian development; Culicidae; mosquito control

蚊属昆虫纲 Insecta 双翅目 Diptera 长角亚目 Nematocera 蚊科 Culicidae。蚊科含两亚科：按蚊亚科 Anophelinae 与库蚊亚科 Culicinae，共计 113 个属约 3 726 种（Sukupayo *et al.*, 2024），我国已知约 20 属 63 个亚属 419 种。其中按蚊属 *Anopheles*、伊蚊属 *Aedes* 与按蚊属 *Culex* 是最为重要的传病蚊属。按蚊属已知按蚊 465 种超过 70 种可传播人类疟原虫（Dalilah *et al.*, 2024），2022 年造成 2.49 亿人感染超过 60 万死亡（Miura *et al.*, 2024），还可以传播班氏丝虫与阿尼昂-尼昂病毒等（Brault *et al.*, 2004; Manguin *et al.*, 2010）。伊蚊属可传播寨卡病毒、登革病毒、基孔肯雅病毒与黄热病毒等。截止到 2024 年 10 月，仅登革热全球已报导 1 300 多万病例（https://worldhealthorg.shinyapps.io/dengue_global/）。库蚊属是乙型脑炎的主要传播媒介主要传播乙型脑炎病毒、西部与东部马脑炎、西尼罗病毒、圣路易斯脑炎病毒与乌苏图病毒等（Madhav *et al.*, 2024）。近年，蚊媒传染病流行形势异常严峻，除了加全球变暖、城市化加剧，人口流动性增加等因素外，蚊虫一生中可多次吸血、产卵，这种强大的生殖能力也是其种群增加与全球扩张的重要前提，也是蚊虫传播疾病的基础。深入了解蚊虫吸血后卵巢发育的分子调控机制将有助于寻找用于蚊虫种群控制的新的分子靶标。

环状 RNA（Circular RNA, circRNA）是通过一种非典型的反向剪接方式（Back splicing）使 RNA 前体链的 5'端和 3'端通过共价键结合形成的一种单链环形 RNA。circRNA 无游离的 5'和 3'端，耐受核酸外切酶的降解，因此比线性 RNA 更稳定半衰期更长（Patop *et al.*, 2019）。circRNA 可通过结合 miRNA, RBP 等蛋白质或直接翻译多肽或蛋等作用方式参与机体的基因表达调控、细胞分化、肿瘤发生等多种生物学过程（Li, 2023）。与哺乳动物相比 circRNA 在蚊虫中的研究仍处于初步阶段，本研究前期证实了白纹伊蚊的一个 circRNA 分子 aal-circRNA-407 可作为 miRNA 海绵(miRNA sponge),能够特异性结合 miR-9a, 从而影响其对下游靶基因叉头框蛋白 L 基因（*Forkhead Box L*, *FoxL*）的调控作用，最终调控雌蚊血餐后

卵巢发育（Gao *et al.*, 2023）。一般认为 circRNA 具有一定的物种间保守性（Patop *et al.*, 2019），但目前 circRNA-407 是否在蚊虫普遍存在及其功能是否保守未得到证实。本研究基于根据白纹伊蚊 circRNA-407 及其源基因（Host genes）进行了基因结构与分子进化分析，通过 RT-PCR 对其他昆虫的同源 circRNA-407 进行了验证，通过生物信息学分析对 circRNA-407/miR-9a/*FoxL* 分子调控通路的保守性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 蚊株与饲养

白纹伊蚊佛山株 *Aedes albopictus* Foshan Strain，于 1981 年采集自广东省佛山市；埃及伊蚊海口株 *Ae. aegypti* Haikou Strain 于 2016 年采集自海南省海口市；致倦库蚊广州株 *Culex quinquefasciatus* Guangzhou Strain 于 1993 年采集自广东省广州市，以上蚊株均为本室饲养。斯氏按蚊中国株 *Anopheles stephensi* Hor strain 由中山大学张东京教授馈赠；中华按蚊 *An. sinensis* China strain 由重庆师范大学陈斌教授馈赠。成蚊饲养条件为光照时间：黑暗时间=12 h：12 h，温度 28℃，湿度 70%~80%；幼虫用去氯水饲养在不锈钢盆中，每日喂食龟粮；成蚊在羽化后转移至 30 cm³ 的蚊笼中，供给 10%葡萄糖水喂养，雌蚊在产卵前 3 d 喂食脱纤维绵羊血。

1.2 菌株与试剂盒

大肠杆菌感受态细胞 *Trans5a* 购自北京全式金公司，平末端载体 pLB vector 购自北京天根公司。总 RNA 提取试剂 TRIzolTM Reagent、基因组去除试剂盒 TURBO DNA-freeTM Kit 购自美国 Invitrogen 公司；逆转录试剂盒 GoScript Reverse Transcription System 购自美国 Promega 公司；热启动 DNA 聚合酶 DreamTaq Green PCR Master Mix、DNA 片段纯化试剂盒 GeneJET PCR Purification Kit 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 RT-PCR

使用 TRIzol 试剂提取样品总 RNA，TURBO DNA-freeTM 试剂盒去除基因组 DNA 残留。因 circRNA 缺乏多聚腺苷酸尾（Poly A tail），本研究中的线性及 circRNA 分子均使用随机引物（Random Primer）使用 GoScript Reverse Transcription System 试剂盒进行逆转录。以上操作均按照试剂盒说明进行。circRNA RT-PCR 使用背靠背的反向引物（Divergent primer）扩增目标，使用对向引物（Convergent primer）扩增其对应的线性分子，分别使用 cDNA 和基因组 DNA（gDNA）为模板。PCR 扩增的产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 引物与测序

用于 circRNA PCR 分析的引物与用途如表 1。

表 1 用于 circrna 鉴定单的引物信息及其使用参数

Table 1 Primers used for circRNA identification and cycling parameters

物种	引物名称	引物序列（5'-3'）	引物用途	循环参数
Species	Primer ID	Primer sequence(5'-3')	Primer usage	Cycling parameters
埃及伊蚊	aae-circ407 F	TCACTCCGAAAAGTGCCCTC	反向引物 Divergent primer	94℃ 3 min, 35 个循环 (95℃ 30 s, 55℃ 30
<i>Ae. aegypti</i>	aae-circ407 R	AGTTTTTGC GCGACCTAGA		
致倦库蚊	cqu-circ407 F	TGCCACCCTCCTCCAAACTC		

<i>Cx. quinquefasciatus</i>	cqu-circ407 R	AGTTTTTGC	CGCCCCGAGC	s, 72°C 30 s), 72°C
斯氏按蚊	ast-circ407 F	CTGGAGGAC	GGTAACACAGC	延伸 5 min。
<i>An. stephensi</i>	ast-circ407 R	GGCCAACTC	CTTCGTCATCT	
中华按蚊	asi-circ407 F	TCCAACAAAC	CGTCCCTTCC	
<i>An. sinensis</i>	asi-circ407 R	TCCTTCACGT	ACGCCTGGAT	
埃及伊蚊	aae-circ407 LF	GGAGATAGCG	CTGCTTGGAC	
<i>Ae. aegypti</i>	aae-circ407 LR	TTCCGTGGCC	ACCATTTTGA	
致倦库蚊	cqu-circ407 LF	CGGAACGGT	TGTGCTTTCTG	94°C 3 min, 35 个循
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	cqu-circ407 LR	AATCCCCGTC	CAGCCTTGATG	对向引物 环(95°C 30 s, 54°C 30
斯氏按蚊	ast-circ407 LF	GTCGGTGCCA	ATGGAGAAGA	Convergent primer s, 72°C 30 s), 72°C
<i>An. stephensi</i>	ast-circ407 LR	ATTGTGCCGA	ATTGTGGTGC	延伸 5 min。
中华按蚊	asi-circ407 LF	CGACTGACG	ACACTCTGCTT	
<i>An. sinensis</i>	asi-circ407 LR	CCTCCAGGAT	GAACGCTACC	

使用 GeneJET PCR Purification Kit 试剂盒对 DNA 片段进行回收, 使用 Lethal Based Fast Cloning Kit 对回收的 DNA 片段进行连接, 连接产物转化感受态细胞 *Trans5a*: PCR 扩增引物的合成及 Sanger 测序由上海生工 Sango Biotech 公司完成。

1.5 结构域预测与分子进化分析

利用 NCBI 在线工具 Conserved Domain Database (CDD) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 以默认参数对白纹伊蚊 aal-circRNA-407 的源基因 (GenBank: *LOC109412837*) 蛋白序列结构域进行分析。以白纹伊蚊源基因蛋白序列 (GenBank: XP_062703436.1) 通过 tblastn 方法在 NCBI 数据库比对同源基因信息和序列。用于分子进化与基因结构分析的昆虫物种 (GenBank 基因号与蛋白号) 如下: 科鲁兹按蚊 *An. coluzzii* (*LOC120953771*, XP_040229956.1)、冈比亚按蚊 *An. gambiae* (*AGAP003084*, XP_312769.5)、拇鲁斯按蚊 *An. merus* (*LOC121591062*, XP_041767348.1)、斯氏按蚊 (*LOC118505424*, XP_035897074.1)、中华按蚊 (*ASIC014696*, *ASIC014696-PA*)、致倦库蚊 (*LOC6033921*, XP_038105627.1) 白纹伊蚊 (*LOC109412837*, XP_029707757.1)、埃及伊蚊 (*LOC5576154*, XP_001662501.2)、黑水虻 *Hermetia illucens* (*LOC119653267*, XP_037913815.1)、尖眼蕈蚊 *Sciara coprophila* (同物异名 *Bradysia coprophila*, *LOC119085529*, XP_037051843.1)、家蚕 *Bombyx mori* (*LOC101744503*, XP_037871273.1)、大蜡螟 *Galleria mellonella* (*LOC113512141*, XM026895946.2)、西方蜜蜂 *Apis mellifera* (*LOC410867*, XP_003251195.1)、丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* (*LOC100123495*, XP_003425305.1)、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (*LOC658498*, XP_969974.2)、牛头嗡蜣螂 *Onthophagus taurus* (*LOC111424101*, XP_022913298.)。内华达动白蚁 *Zootermopsis nevadensis* (*LOC110829223*, XP_021918426.1)、第 2 堆砂白蚁 *Cryptotermes secundus* (*LOC111874158*, XP_023725175.1)、褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (*LOC111063429*, XP_039294500.1)、烟粉虱 *Bemisia tabaci* (*LOC109031724*, XP_018898965.1)。蛛形纲的微小扇头蜱 *Rhipicephalus microplus* (*LOC119177604*, XP_037284800.1) 与雕纹似刺尾蝎 *Centruroides sculpturatus* (*LOC111633488*, XP_023233837.1) 为外群。使用 ClustalX 软件 1.83 版本, 默认参数, 进行同源基因氨基酸序列的多序列比对, 比对结果使用 Mega 6.05 软件以邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 以 1 000 进行 bootstrap 校验。

2 结果与分析

2.1 circRNA-407 在蚊虫中保守存在

NCBI CDD 预测结果显示 *LOC109412837* 基因蛋白序列中共含有 3 个结构域(图 1),分别为位于 10~399 位氨基酸的冷休克蛋白结构域 (Cold Shock protein Domain A, CsdA) 属硒半胱氨酸裂解酶/半胱氨酸脱硫酶 (Selenocysteine lyase/Cysteine desulfurase) 主要功能为参与氨基酸转运和代谢, 1187~1264 位氨基酸的腺苷酸 α 水解酶超家族 (Adenine nucleotide α -hydrolase, AANH) 结构域与位于 1097~1300 位氨基酸 *prk10696* 超家族结构域 (图 1-A)。tblastn 结果显示 *LOC109412837* 不仅在蚊科的主要病媒三属伊蚊属、库蚊属与按蚊属, 在其他蚊属包括: 煞蚊属 *Sabethes*、阿蚊属 *Armigeres*、蓝带蚊属 *Uranotaenia*、局限蚊属 *Topomyia*、钩蚊属 *Malaya*、瓶草蚊属 *Wyeomyia* 和巨蚊属 *Toxorhynchites* 均存在同源基因。以白纹伊蚊、埃及伊蚊、致倦库蚊、斯氏按蚊与中华按蚊为代表, 进一步对其基因结构进行了分析, 结果显示这 4 个蚊种 *LOC109412837* 同源基因均有多个外显子组成, 且呈现相似的外显子-内含子组成的基因结构, 其中白纹伊蚊成环外显子为 5-8 外显子, 而这四个外显子在其它蚊种相对保守 (图 1-B)。因此, 本研究利用 circRNA PCR 法探究在埃及伊蚊、致倦库蚊、斯氏按蚊和中华按蚊这 4 个保守的外显子是否也可成环。首先通过设计背靠背的跨越反向拼接位点 (Backspliced Junction, BSJ) 的反向引物和针对线性分子的对向引物进行 RT-PCR 验证。因 gDNA 上不含有相应的 BSJ 序列, 因此反向引物仅能在 cDNA 模板中扩增出产物, 而对向引物则在 cDNA 和 gDNA 模板中均能够扩增出产物。PCR 结果显示 4 种蚊种 cDNA 样品中反向与正向引物均扩增获得预期条带, 而 gDNA 样品仅仅正向引物获得预期条带 (图 1-B), PCR 产物经测序证明为跨 BSJ 序列的预期序列 (图 2-A), 因此证实其他 3 个蚊种均含有白纹伊蚊 circ-407 的同源 circRNA 分子。以 Clustal X 通过以上 4 种蚊加科鲁兹按蚊、冈比亚按蚊与拇鲁斯按蚊 3 种按蚊的成环外显子第一外显子的与第四外显子的外显子-内含子剪接位点及其 BSJ 两侧序列进行多比对, 结果显示两侧剪接位点附近核苷酸序列与 BSJ 两侧序列保守性较高, 结果暗示外显子来源的 circRNA (Exonic circRNAs, ecircRNAs) 所有的同源基因并且形成 aal-circRNA-407 的 4 个外显子及侧翼内含子的核酸序列高度保守 (图 2-B)。

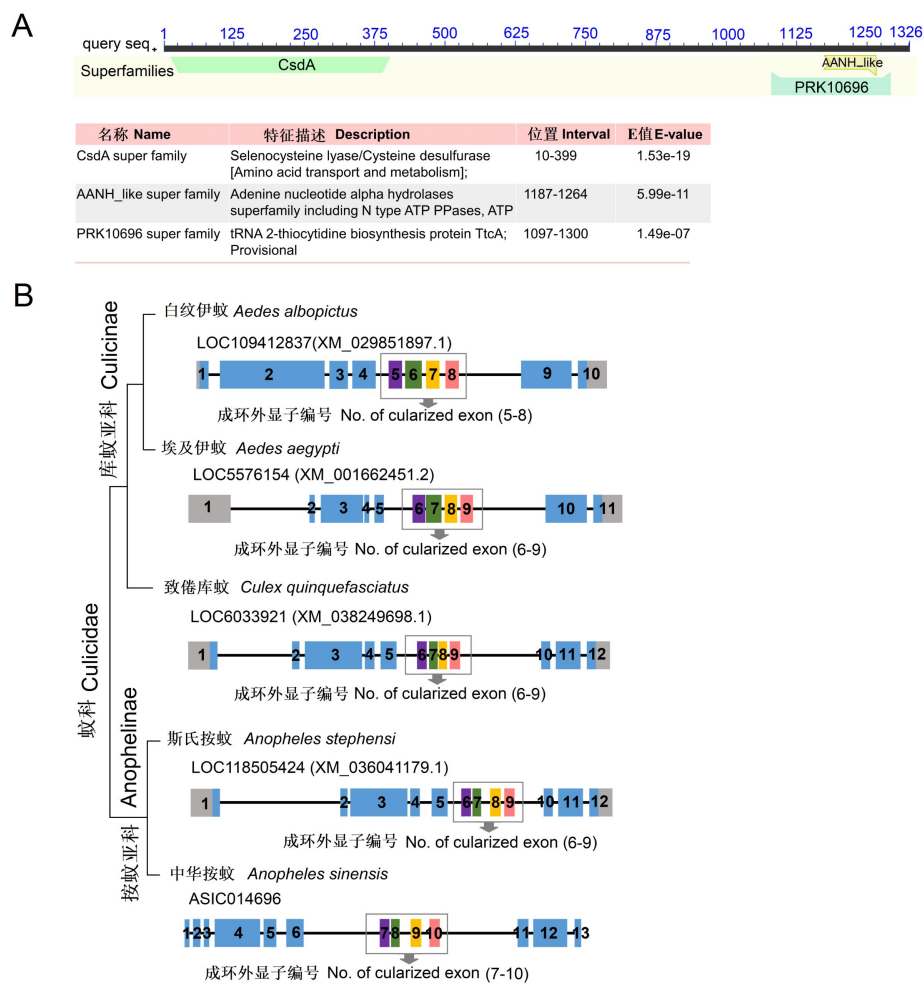


图1 CircRNA-407 源基因的蛋白结构域与基因结构分析(A)NCBI CDD 预测的白纹伊蚊 circRNA-407 源基因 *LOC109412837* 蛋白序列保守功能域 (B) 代表蚊种的 *LOC109412837* 同源基因的基因结构示意图

Fig. 1 Analysis of protein motifs and gene structure of circRNA-407 host genes (A) Conserved domains of *LOC109412837* predicted by NCBI CDD (B) Schematic showing the gene structure of *LOC109412837* homologs of representing mosquito species in Culicinae

注: 紫、绿、黄和粉色为4个可能环化的保守外显子。Note: The purple, green, yellow and pink marked exons indicated the four putative circularized conserved exons.

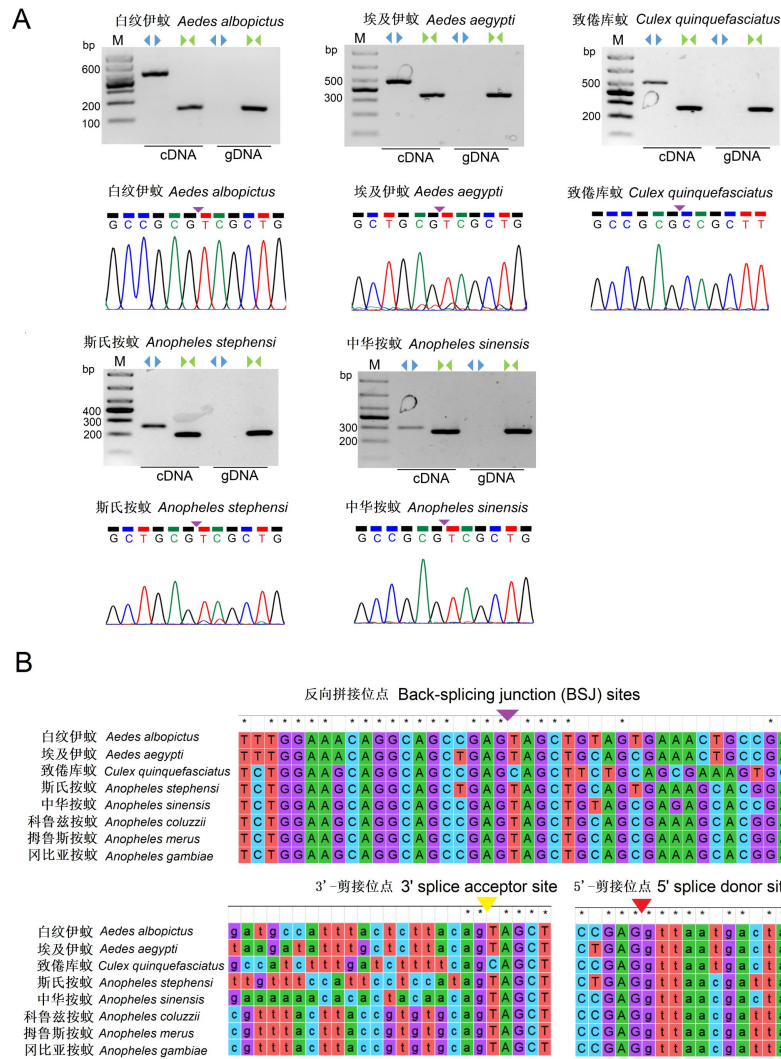


图2 实验验证蚊科 circRNA-407 与其成环相关序列特征分析 (A) RT-PCR 和 Sanger 测序证实了外显子的环化 (B) 8 个蚊种中 aal-circRNA-407 的同源序列可能的环化位点、3'端剪接受体及 5'端剪接供体的多序列比对

Fig. 2 Experimental validation of the circRNA-407 in Culicinae and Characteristic analysis of circRNA biogenesis related sequences. (A) Validation of the putative circularized exons by RT-PCR and Sanger sequencing (B) Multiple sequence alignment of the putative back spliced junction, splice donor and acceptor sites of aal-circRNA-407 homologs among eight mosquito species.

注: 黄色与红色箭头所示为内含子 3'及 5'端剪接位点体, 紫色箭头所示 BSJ 位点。Note: The yellow and red arrows indicated the 3' and 5' splice sites, respectively. The purple arrow showed the BSJ.

2.2 circRNA-407 宿主基因的分子进化分析

tblastn 结果显示在节肢动物中 *LOC109412837* 同源基因广泛存在, 证明其起源于昆虫出现之前。在昆虫纲同源基因主要存在于长角亚目 Nematocera, 除了集中在蚊科成员。其他长角亚目还包括蠓科 Ceratopogonidae 的短跗库蠓 *Culicoides brevitaris*, 眼蕈蚊科 Sciaridae 的尖眼蕈蚊, 毛蠓科 Psychodidae 的巴浦白蛉 *Phlebotomus papatasi*、银足白蛉 *Phlebotomus argentipes* 与长须罗蛉 *Lutzomyia longipalpis*。但在短角亚目 Brachycera 仅黑水虻中存在。EcircRNA 主要依赖于其源基因反向剪接的外显子生成, 其中源基因 mRNA 前体 (pre-mRNA) 的 3'剪接供体与 5'剪接受体反向共价连接。通过源基因的分子进化特征可间接获知 circRNA 的进化轨迹, 因此本研究通过使用昆虫纲双翅目、鳞翅目 Lepidoptera、膜翅目 Hymenoptera、鞘翅目 Coleoptera、半翅目 Hemiptera 与蜚蠊目 Blattodea 六目 20 种昆虫的同源基因, 蛛形纲 Arachnida 的蜱目 Ixodida 与蝎目 Scorpiones 两个成员作为外群绘制了 circRNA-407 源基因的系统发育树。邻接法系统

发育树显示，所有蚊科成员聚为一个分支，包括按蚊亚科与库蚊亚科两个小支；而蚊科之外的双翅目昆虫黑水虻与迟眼蕈蚊聚为一个分支。在进化关系上双翅目与鳞翅目亲缘关系最近（图 3-A）。为了深入探寻 circRNA-407 的起源，本研究进一步对昆虫同源基因进行了基因结构分析，由系统发育树以及各同源基因的外显子-内含子基因组成结构可以观察到，尽管在昆虫中主要目均存在 *LOC109412837* 同源基因，然而，除了双翅目长角亚目的蚊科、眼蕈蚊科与毛蠓科以外，结果仅在短角亚目的黑水虻中可以观察到与 aal-circRNA-407 同源的外显子结构（图 3-B），证明 circRNA-407 主要形成于双翅目出现后。

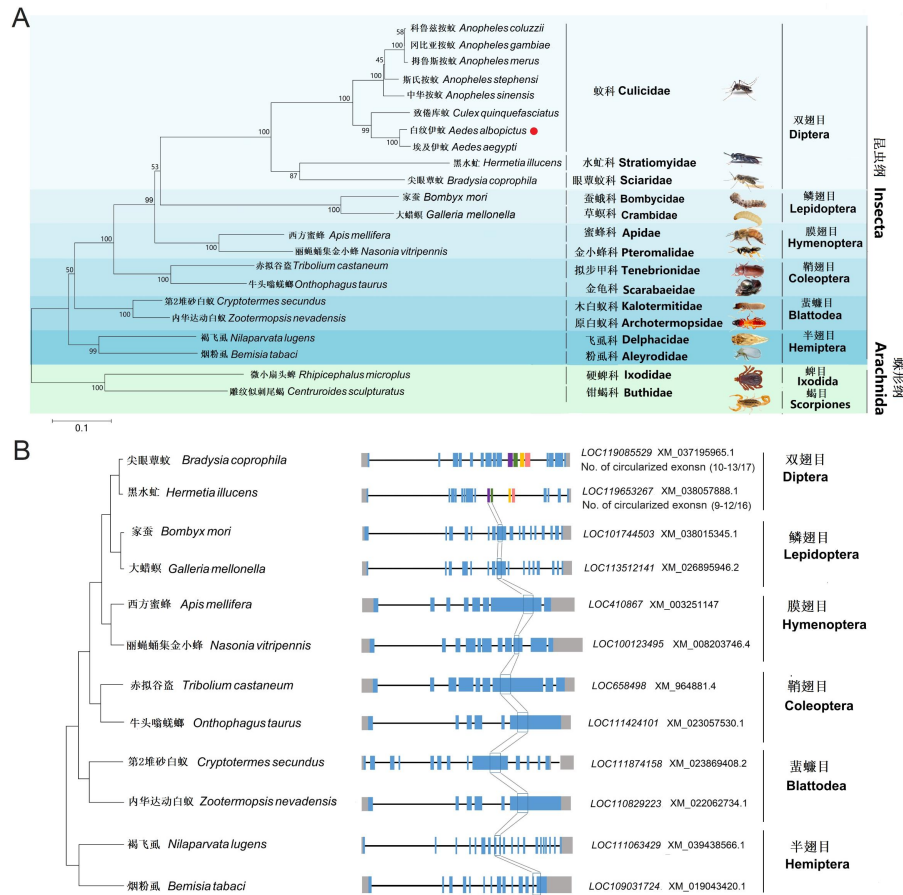


图 3 昆虫中 *LOC109412837* 同源基因的进化分析(A)昆虫中 *LOC109412837* 同源基因的系统发育(B)昆虫中 *LOC109412837* 同源基因的基因结构比较

Fig. 3 Evolution analysis of the *LOC109412837* homologs in insects. (A) Phylogeny of the *LOC109412837* homologs in insects (B) Comparison of the molecular organization of the *LOC109412837* homologs in insects.

2.3 circRNA-407/miR-9a/FoxL 通路在蚊虫中的保守性分析

本研究在蚊科 *LOC109412837* 同源基因的基因结构中均观察到保守的 circRNA-407 成环外显子存在，且通过 PCR 与测序证实了埃及伊蚊、致倦库蚊、斯氏按蚊和中华按蚊中 circRNA-407 同源 circRNA 分子的存在，由于这些传病蚊种的雌蚊都具有需要吸血后进行卵巢发育的共同特性，因此，为深入探究已白纹伊蚊 aal-circRNA-407/aal-miR-9a/*FoxL* 分子作用通路在蚊虫中是否也保守存在，本研究首先获取了埃及伊蚊、致倦库蚊和斯氏按蚊 miRNA 数据中的 miR-9a 序列（缺少中华按蚊的 miRNA 数据因此未做分析），使用 miRNA 靶基因预测数据库 RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.rnabybrid/>) 分析各蚊种的 circRNA-407 是否也具有保守 miR-9a 潜在的结合位点，*FoxL* 同源基因 3'非编码区域（3'-untranslated region, 3'UTR）是否也存在 miR-9a 潜在的结合位点。结果如图 4-A 显示，每种蚊虫的 circRNA-407 的序列上均含有保守 miR-9a 的结合位点，最小自由能（Minimum Free Energy, MFE）均<-24 kcal/mol，且这些 miR-9a 与各蚊

种中的 FoxL 同源基因的 3'UTR 序列上也具有保守的结合位点 MFE) 均 ≤ 22 kcal/mol (图 4-B)。以上结果暗示 circRNA-407/ miR-9a/FoxL 作用通路在主要传病蚊属保守存在。

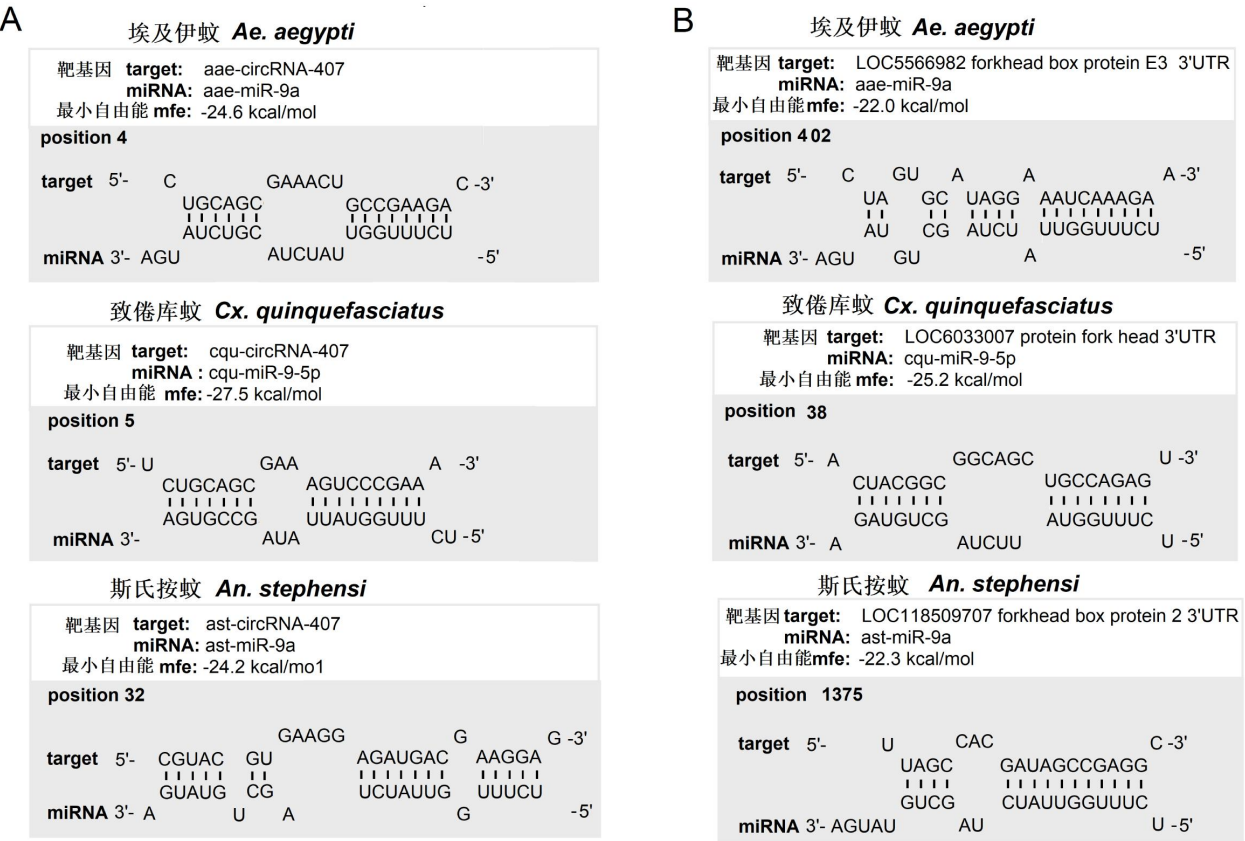


图 4 蚊 circRNA-407/miR-9a/Fox 通路的保守性分析 (A) RNAhybrid 工具预测 3 种蚊虫 circRNA-407 中 miR-9a 的结合位点 (B) RNAhybrid 工具预测三种蚊虫 FoxL 基因中 miR-9a 的结合位点

Fig. 4 Conservation analysis of circRNA-407/miR-9a/Fox pathway in mosquitoes. (A) Putative binding site of miR-9a on circRNA-407 predicted by RNAhybrid (B) Putative binding site of miR-9a on FoxL.

3 结论与讨论

吸血蚊虫中只有雌性需要通过叮咬吸血以获取卵巢发育必需的营养, 该过程中也是蚊虫传播病原体的基础, 因此雌蚊是研究和防控的重点对象。更重要的是, 蚊的生殖繁衍能力强, 这也是其能够在全世界迅速扩散的主要原因之一。雌性一生可多次吸血、多次产卵, 每次产卵数量与蚊种有关, 但可多达数十到数百颗 (Rezende *et al.*, 2008)。因此, 了解并阐明雌蚊卵巢成熟和胚胎发育过程中的分子调控机制, 对于开发有效的媒介蚊虫种群控制新方法具有重要的参考意义。

FOX 家族蛋白是一类具有“翼状螺旋 (Winged helix)”结构的 DNA 结合功能域的转录激活因子。此类蛋白在真核生物中保守存在, 在包括发育、代谢、免疫调节、肿瘤的发生发展和衰老等生物学过程中发挥重要作用 (Carlsson *et al.*, 2002; Coffey *et al.*, 2004; Jonsson *et al.*, 2005)。在果蝇中, 各型 FOX 转录因子在胚胎发育中参与到不同的调控过程中, 如 FOXC 负责头部组织的发育 (Hacker *et al.*, 1995), FOXG 参与早期胚胎的细胞分裂 (Grossniklaus *et al.*, 1992), FOXN 的缺失可以引起机体活力和生育能力的下降等 (Strödicke *et al.*, 2000)。在对埃及伊蚊卵黄蛋白原 (Vitellogenin, Vg) 基因的转录调控研究中分析发现, 埃及伊蚊 Vg 基因的启动子近端区域存在 FOX 蛋白的结合位点, 并且通过

体外细胞实验证实了其可以被果蝇 FOXA 转录因子结合并诱导表达，初次提示了 FOX 转录因子可能参与到蚊虫的生殖调控中（Kokoza *et al.*, 2001）。随后，对埃及伊蚊的 FOX 家族基因进行了鉴定分类，并且证实了干扰埃及伊蚊 FoxN1、FoxN2、FoxL 及 FoxO 基因可以影响 *Vg* 基因的表达，最终影响雌蚊的产卵数量（Hansen *et al.*, 2007）。

CircRNA 广泛存在于真核生物中，来源于基因的外显子或者内含子区域，在动物细胞中大量存在，具有多种分子生物学功能，部分 circRNA 还表现出在较高的物种间保守性，一些表达量高、保守且具有调节功能的 circRNA 还能够在不同的物种中发挥类似的功能（Rybak-Wolf *et al.*, 2015）。如高度保守的 circRasGEF1B 在低等脊椎动物中可以通过 miR-21-3p/MITA 通路增强机体抗病毒的免疫能力（Chu *et al.*, 2021）；在哺乳动物大脑中，circSLC45A4 是维持神经细胞处于祖细胞状态所必需的（Suenkel *et al.*, 2020）。本研究前期结果发现了白纹伊蚊高丰度卵巢组织高表达的 aal-circRNA-407，并证实了其可以 miRNA 海绵功能特异 aal-miR-9a 并最终通过 aal-circRNA-407/miR-9a/FoxL 分子通路影响血餐后的卵巢发育。本研究通过序列比对和 RT-PCR 证实了 circRNA-407 保守的存在于主要蚊科成员中，且由 pre-mRNA 保守的 4 个外显子的 3'剪接供体与 5'剪接受体的反向剪接产生的。通过分子进化与基因结构分析证实，尽管 circRNA-407 的源基因的同源基因广泛存在于昆虫中，但是 circRNA-407 保守的成环外显子仅仅在双翅目出现后才出现，而且在短角亚目仅仅在黑水虻中出现，这个结果暗示 circRNA-407 更有可能出现在双翅目出现后，但是仅仅在长角亚目得以保存，大多数短角亚目则进化过程中丢失该结构。成他蚊虫中也存在同源分子。通过 RNAhybrid 工具进一步发现主要蚊种的 circRNA-407 与 FoxL 基因 3' UTR 均具有保守 miR-9a 潜在的结合位点。这些暗示 circRNA-407 作为内源竞争 RNA (Competing endogenous RNAs, ceRNA) 通过 miR-9a 调控 FoxL 从而参与雌蚊卵巢发育的调控机制是保守存在的。

本研究首次证实了蚊虫保守存在的 circRNA，深入讨论其分子进化特征，说明了其参与蚊虫血餐后卵巢发育分子调控通路的保守性。后续研究将根据 circRNA-407 的保守 BJS 区设计对应的通用 siRNA，验证是其对主要传病蚊种的卵巢发育的抑制效果，并通过基因编辑方法构建可靶向抑制 circRNA-407 的转基因蚊虫品系，为最终利用 circRNA 分子作为靶标分子进行蚊虫种群控制提供了新策略。

参考文献 (References)

- Brault AC, Foy BD, Myles KM, *et al.* Infection patterns of o'nyong nyong virus in the malaria-transmitting mosquito, anopheles gambiae [J]. *Insect Molecular Biology*, 2004, 13 (6): 625-635.
- Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism [J]. *Developmental Biology*, 2002, 250 (1): 1-23.
- Chu Q, Zheng W, Su H, *et al.* A highly conserved circular RNA, circRasGEF1B, enhances antiviral immunity by regulating the miR-21-3p/MITA pathway in lower vertebrates [J]. *Journal of Virology*, 2021, 95 (7): 10-1128.
- Coffier PJ, Burgering BM. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4 (11): 889-899.
- Dalilah D, Syafruddin D, Saleh I, *et al.* A systematic review: Is Anopheles vagus a species complex? [J] *Malaria Journal*, 2024, 23 (1): 88.
- Fu WB, Chen B. Taxonomy and fauna of culicidae: history and current knowledge [J]. *Acta Entomol Sin*, 2018, 61 (1): 122-138. [付文博, 陈斌. 蚊科昆虫分类及区系研究历史和现状概述 [J]. 昆虫学报, 2018, 61 (1): 122-138]
- Gao Y, Yang L, Chen Y, *et al.* Aal-circRNA-407 regulates ovarian development of aedes albopictus, a major arbovirus vector, via the miR-9a-5p/Foxl axis [J]. *Public Library of Science Pathogens*, 2023, 19 (5): 1011374.
- Grossniklaus U, Pearson RK, Gehring WJ. The drosophila sloppy paired locus encodes two proteins involved in segmentation that show homology to mammalian transcription factors [J]. *Genes & Development*, 1992, 6 (6): 1030-1051.
- Hacker U, Kaufmann E, Hartmann C, *et al.* The drosophila fork head domain protein crocodile is required for the establishment of head structures [J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1995, 14 (21): 5306-5317.
- Hansen IA, Sieglaff DH, Munro JB, *et al.* Forkhead transcription factors regulate mosquito reproduction [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 37 (9): 985-997.

- Jonsson H, Peng SL. Forkhead transcription factors in immunology [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62 (4): 397-409.
- Kokoza VA, Martin D, Mienaltowski MJ, *et al.* Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade [J]. *Gene*, 2001, 274 (1-2): 47-65.
- Li H. circRNA: A promising all-around star in the future [J]. *Epigenomics*, 2023, 15 (12): 677-685.
- Madhav M, Blasdell KR, Trewin B, *et al.* Culex-transmitted diseases: Mechanisms, impact, and future control strategies using wolbachia [J]. *Viruses*, 2024, 16 (7): 1134.
- Manguin S, Bangs MJ, Pothikasikorn J, *et al.* Review on global co-transmission of human plasmodium species and wuchereria bancrofti by anopheles mosquitoes [J]. *Infection Genetics and Evolution*, 2010, 10 (2): 159-177.
- Miura K, Flores-Garcia Y, Long CA, *et al.* Vaccines and monoclonal antibodies: new tools for malaria control [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2024, 37 (2): 0007123.
- Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circRNAs [J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 2019, 38 (16): 100836.
- Rezende GL, Martins AJ, Gentile C, *et al.* Embryonic desiccation resistance in aedes aegypti: presumptive role of the chitinized serosal cuticle [J]. *BMC Developmental Biology*, 2008, 8: 1-14.
- Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glazar P, *et al.* Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed [J]. *Molecular Cell*, 2015, 58 (5): 870-885.
- Strödicke M, Karberg S, Korge G. Domina (Dom), a new drosophila member of the FKH/WH gene family, affects morphogenesis and is a suppressor of position-effect variegation [J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 96 (1): 67-78.
- Suenkel C, Cavalli D, Massalini S, *et al.* A highly conserved circular RNA is required to keep neural cells in a progenitor state in the mammalian brain [J]. *Cell Reports*, 2020, 30 (7): 2170-2179.
- Sukupayo PR, Poudel RC, Ghimire TR. Entomological surveillance of container-breeding mosquitoes focusing on aedes (stegomyia) (diptera: culicidae) vectors along altitudinal range in Nepal [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2024, 62 (1): 207-219.