

辛连喜, 瓦热斯·吐尔松, 艾力西热·买买提, 等. 捻转血矛线虫伊维菌素抗药性相关 miRNA 鉴定及其功能分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (9): 93-103.

XIN L X, TUERSONG W, MAIMAITI A, et al. Identification and functional analysis of miRNAs related to IVM resistance in *Haemonchus contortus* [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (9): 93-103.

捻转血矛线虫伊维菌素抗药性相关 miRNA 鉴定及其功能分析

辛连喜¹, 瓦热斯·吐尔松^{1*}, 艾力西热·买买提², 热依兰木·吐尔洪¹, 胡敏³,
卡力比夏提·艾木拉江⁴, 巴音查汗·盖力克¹, 赛福丁·阿不拉^{1*}, 张伟¹, 郭庆勇¹

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830013;

3. 华中农业大学动物医学院农业微生物发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070;

4. 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 旨在探究捻转血矛线虫伊维菌素 (IVM) 抗药相关的 miRNA 及其功能。本研究以 IVM 敏感虫株与抗药虫株为试验材料, 采用 Illumina novaseq 6000 平台进行测序, 构建 cDNA 文库, 质控分析后采用生信软件筛选 2 个虫株之间的差异 miRNA。结果: IVM 敏感株和抗药株雌雄虫共鉴定到 441 个 miRNA, 其中已知 160 个, 新鉴定到的 281 个。与敏感株相比, 抗药株雄虫中 30 个 miRNA 显著上调, 21 个显著下调; 抗药株雌虫中, 4 个 miRNA 显著上调, 5 个显著下调。后续差异 miRNA 分析预测 miR-1、miR-2、miR-133 和 miR-5912b 可能与 IVM 抗药性有关。基因本体论 (GO) 分析显示, 雌雄虫差异 miRNA 靶基因主要富集到细胞修饰氨基酸生物合成过程、磷代谢过程、细胞蛋白质代谢过程、嘌呤核苷酸结合等。此外, 京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 显示雌雄虫差异基因富集趋势具有一定的相似性, 主要富集到 mTOR 信号通路、促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、环核苷酸 (cAMP) 信号通路、赖氨酸降解、嘌呤代谢及三羧酸循环 (TCA cycle) 等。最终选取 6 个差异 miRNA 进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证, 发现结果与测序结果一致。综上, 捻转血矛线虫对 IVM 抗药性的产生与其代谢过程 (尤其是氨基酸代谢) 有一定的联系, 本研究为揭示 IVM 抗药机制奠定了理论基础。

关键词: 捻转血矛线虫; 伊维菌素; 抗药性; miRNA

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)09-0093-11

Identification and functional analysis of miRNAs related to IVM resistance in *Haemonchus contortus*

XIN Lianxi¹, TUERSONG Waresi^{1*}, MAIMAITI Ailixire², TUERHONG Reyilanmu¹, HU Min³,
AIMULAJIANG Kalibixiati⁴, GAILIKE Bayinchahan¹, ABULA Saifuding^{1*}, ZHANG Wei¹, GUO Qingyong¹

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Veterinary Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Husbandry, Urumqi 830013, China;

3. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology Discovery and Utilization, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

4. State Key Laboratory on Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Clinical Medicine Institute, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: To explore the miRNA related to ivermectin (IVM) resistance of *Haemonchus contortus* and its function, an IVM-sensitive strain and a drug-resistant strain were used, and the cDNA library was constructed by Illumina novaseq 6000 platform. After quality control analysis, bioinformatics software was used to screen the differential miRNAs between IVM-sensitive and drug-resistant strains in this study. The

收稿日期: 2024-11-25; 修回日期: 2025-07-22

基金项目: 2023 年自治区自然科学基金青年科学基金项目 (2023D01B32)

第一作者: 辛连喜, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 瓦热斯·吐尔松, 维吾尔族, 博士, 讲师, 主要研究方向为寄生线虫抗药机制研究及抗药性检测方法的建立、蠕虫遗传多样性, E-mail: 1749457375@qq.com; 赛福丁·阿不拉, 维吾尔族, 博士, 教授, 主要研究方向为中药活性成分提取及抗病毒和免疫活性研究, E-mail: 1348793799@qq.com.

results were that a total of 441 miRNAs were identified in male and female adult worms of the resistant strain, compared with those of the susceptible strain, of which 160 were known genes, and 281 were newly identified. For the resistant males, 30 miRNA were significantly up-regulated, 21 were significantly down regulated. For the resistant females, 4 miRNA were significantly up-regulated, 5 miRNA were significantly down regulated. The differential miRNA analysis showed that miR-1, miR-2, miR-133 and miR-5912b might be related to IVM resistance. The GO analysis showed that the differential miRNA target gene of the male and female worms were significantly enriched in cellular modified amino acid biosynthetic process, phosphorus metabolic process, cellular protein metabolic process, and purine nucleotide binding. In addition, the KEGG results showed that the enrichment trend of DEGs between the male and female worms was similar to some extent, and they were significantly enriched in the mTOR signal pathway, the MAPK signal pathway, the cAMP signal pathway, in lysine degradation, purine metabolism and TCA cycle. Finally, to validate the results, six miRNA were selected for RT-qPCR analysis, and the results of qPCR were consistent with the previous sequencing results. To conclude, this study confirmed that the resistance of *H. contortus* to IVM might be related to its metabolic process (especially amino acid metabolism), and that this laid a foundation for a better understanding of the mechanism of IVM resistance.

Keywords: *Haemonchus contortus*; ivermectin; resistance; miRNA

捻转血矛线虫病是由吸血的捻转血矛线虫寄生于反刍动物的真胃所引发的寄生虫病,对反刍动物健康产生重要影响,给全球畜牧业造成了巨大的经济损失^[1]。由于缺乏有效的疫苗和生物防治措施,目前该病的控制主要依赖于定期使用3大类驱虫药^[2]。1981年伊维菌素(ivermectin, IVM)的问世,为人类和动物线虫感染提供了新的治疗方案^[3]。然而,IVM的长期滥用而导致的抗药性在大多数线虫中变得很普遍,从而在全世界范围内对畜牧生产造成重大影响,也对线虫的防控形成挑战^[4-5]。

在许多寄生线虫中 IVM 抗药性的出现引起了研究者对其机制的兴趣,其中对捻转血矛线虫 IVM 抗药性机制研究较多^[6]。迄今为止,IVM 抗药机制的研究主要集中在候选基因的筛选^[7]。虽然这些研究有助于了解与抗药相关的机制,但鉴于捻转血矛线虫的高度遗传多样性^[8],使得大多数田间株的 IVM 抗药机制变得十分复杂。因此,迫切需要研究 IVM 抗药分子基础来从根本上解决由抗药性引起的危机。

近年来,高通量测序(HTS)技术的开发和应用取得了重大进展^[9]。随着捻转血矛线虫基因组序列的完成,转录组研究也应用于捻转血矛线虫 IVM 抗药机制研究中。Rezansoff 等^[10]通过转录组学对捻转血矛线虫 IVM 抗药株和敏感株雌虫进行测序,发现了相关的基因转录水平的变化。刘阳^[5]对给药(IVM)前后的捻转血矛线虫抗药株和敏感株3期幼虫进行转录组学研究,发现了相关代谢酶基因的显著变化。瓦热斯等^[11]通过转录组学对捻转血矛线虫 IVM 抗药株和敏感株雌雄虫进行测序,挖掘了抗药相关的基因和代谢通路的变化。虽然,已有上述相关的研究,但基于微小RNA(miRNA)测序比较抗药株和敏感株雌雄成虫的研究相对缺乏。因此,本试验以捻转血矛线虫 IVM 敏感株和抗药株为试验材料,利用转录组测序对 IVM 敏感株和抗药株的转录组变

化进行分析,旨在分析在 IVM 长期诱导下的田间抗药株的相关基因转录水平的变化,为探究 IVM 抗药机理提供重要的数据资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将捻转血矛线虫 Haecon-5-S 株(国际公认的敏感株)和 IVM 抗药株(分离于昭苏县,通过体内外试验已验证抗药性^[11])雌雄成虫,分别为敏感株雌虫(SF-1、SF-2、SF-3),耐药株雌虫(RF-1、RF-2、RF-3),敏感株雄虫(SM-1、SM-2、SM-3),耐药株雄虫(RM-1、RM-2、RM-3)4组,每组3个生物学重复(15条/样)。

1.2 主要仪器及试剂

荧光定量 PCR 仪 ViiA7 购自美国 Bio-Rad Laboratories 公司;PCR 半裙边 96 孔板购自无锡国盛生物过程有限公司;-80 °C 超低温冰箱,液氮罐,台式冷冻离心机购自中国 Scilogex 公司;NanoDrop2000 分光光度计购自美国 Thermo Scientific 公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;miRNA 反转录试剂盒和 RT-PCR 试剂盒购自中国诺唯赞公司。

1.3 RNA 提取及文库构建

分别取 IVM 敏感虫株与抗药虫株的雌雄虫,提取虫体总 RNA,选取质量浓度高于 150 ng/μL 的样品,同时检测 RNA 的完整性(RIN 值 ≥ 8 作为标准),使用检测合格的 RNA 为模板开始构建小 RNA 文库。将合格样品委托上海美吉生物医药有限公司进行 miRNA 转录组测序。

1.4 测序数据质控及比对分析

为保证后续分析的准确性,首先对原始测序数据进行过滤,除去包含测序接头序列或低质量读段,从而得到高质量的测序数据以保证后续分析的顺利进行。然后使用 Bowtie 软件将净读数与参考基因组序

列进行比对,统计比对上的读数和百分比。捻转血矛线虫参考基因组:(https://parasite.wormbase.org/Haemonchus_contortus_prjeb506/Info/Index/)。

1.5 miRNA 分类注释

将比对到参考基因组上的读数先与 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 中的 miRNA 前体及成熟体序列进行比对,获得已知 miRNA,并预测其前体的二级结构。对于未对上已知 miRNA 的 reads,使用 Rfam 数据库 (<http://rfam.xfam.org/>) 进行注释,过滤核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA)、核内小 RNA (snRNA)、核仁小 RNA (snoRNA) 等,重复序列也一并过滤,用于新 miRNA 的预测和鉴定。

1.6 表达量分析

首先对各组样本中 miRNA 进行表达量统计,然后比较组间差异表达的 miRNA,筛选上下调的 miRNA。本研究采用显著性 P 值和差异倍数 (fold change, FC) 作为筛选样本间差异表达的判断标准:当 P 值 ≤ 0.05 并且 $\log_2 FC \geq 1$,判断为上调;当

P 值 ≤ 0.05 并且 $\log_2 FC \leq -1$,判断为下调。FC 值差异倍数越大,说明在两个样本中的表达差异越大; P 值越小,数据的可靠性越高。

1.7 差异 miRNA 靶基因富集分析

利用 miRanda 预测软件对所鉴定的已知和新预测的 miRNA 进行靶基因预测。随后,采用软件 Goatools 对差异 miRNA 靶基因进行基因本体论 (GO) 分析。同时使用 KOBAS2.1 软件对筛选到的 mRNA 测序差异基因及差异 miRNA 靶基因进行京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 分析。

1.8 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证

为进一步验证测序数据可靠性,随机选取了 5 个差异表达的 miRNA,采用茎环引物法,以 Tubulin 为内参进行 RT-qPCR,引物见表 1。生物学重复和技术重复各 3 个,结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著,以 $P < 0.001$,表示差异极显著。

表 1 miRNA RT-qPCR 的引物序列

名称	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
Tubulin-F	TGTTCCATCACCCAAGGTATCC	22
Tubulin-R	GTCCTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGATAC	50
miR-5932-F	GCGATTTTGGTCCGCTGGTTA	20
miR-5932-loop	GTCCTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGACTC	50
miR-5912b-F	GCGATATTCGAGTCCCCTGC	19
miR-5912b-loop	GTCCTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCTGGG	50
miR-46-F	TGCCCGAGTGTGTAAACC	18
miR-46-loop	GTCCTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGAAGA	50
miR-133-F	CGATTGGTCCCCTCCAACCTAA	22
miR-133-loop	GTCCTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTAGCT	50
miR-5896-F	CGATGGGCAATGTGTCTCG	19
miR-5896-loop	GTCCTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCTGAA	50
miR-R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	20

2 结果与分析

2.1 miRNA 测序数据质控分析

基于 Illumina novaseq 6000 测序平台,将对 IVM 抗药株和敏感株 12 个样本的总 RNA 进行 miRNA 测

序。如表 2 所示,各样本均获取了高质量的原始读数和净读数,每个样本数据量均在 10.06×10^6 个以上,共获得 140.14×10^6 个,其中 Q20 和 Q30 值分别达到 98.37%、95.13%及以上,错误率均低于 0.03%,表明 miRNA 测序数据质量较高。

表 2 miRNA 测序数据统计情况

样本	原始读数/个	净读数/个	Q20 值/%	Q30 值/%	错误率/%	GC 含量/%
RM-1	11 586 774	9 992 287	98.37	95.59	0.023 8	50.38
RM-2	10 152 625	8 807 957	99.04	96.87	0.022 4	49.75
RM-3	10 590 583	7 782 794	99.13	97.00	0.022 3	49.96
RF-1	11 562 213	11 198 430	98.50	95.43	0.023 8	46.53
RF-2	10 822 667	10 575 203	98.65	95.65	0.023 5	45.78
RF-3	15 446 931	14 895 846	98.84	96.28	0.023 0	46.33
SM-1	10 139 662	9 812 317	98.53	95.45	0.023 7	48.07
SM-2	10 061 140	9 659 183	98.68	95.69	0.023 5	47.53
SM-3	10 175 670	9 936 949	98.60	95.26	0.023 8	47.69
SF-1	10 185 812	9 960 540	98.41	95.13	0.024 0	46.91
SF-2	12 435 230	12 165 752	98.68	95.62	0.023 5	47.43
SF-3	12 473 233	12 098 637	98.61	95.65	0.023 5	47.61

2.2 miRNA 鉴定

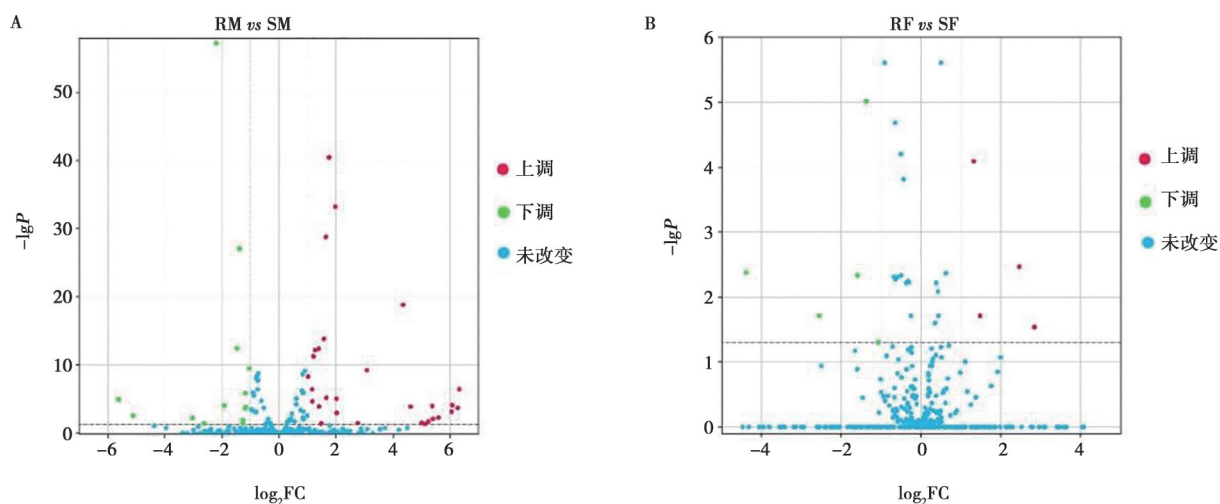
由表 3 可知，在抗药株和敏感株雌雄文库中共鉴定出 441 个 miRNA，其中已知 160 个，新鉴定出 281 个。同时利用靶基因预测软件 miRanda 进行预测，发现其中 409 个 miRNA 与 1 752 个靶基因紧密结合，可以为后续功能分析提供依据。

表 3 miRNA 鉴定结果

类型	miRNA	有靶基因的 miRNA	靶基因
已知 miRNA	160	155	872
新鉴定 miRNA	281	254	880
总计	441	409	1 752

2.3 差异 miRNA 筛选

根据 miRNA 表达水平，以 $|\log_2FC| \geq 1$ 及校正的 P 值为条件筛选出抗药株和敏感株之间的差异 miRNA。如图 1 所示，雌雄虫中共鉴定出 60 个差异表达 miRNAs，其中雄虫 51 个（上调 30 个，下调 21 个）miRNA，雌虫 9 个（上调 4 个，下调 5 个）miRNA，抗药株雌雄虫共有 1 个差异表达 miRNA (miR-5912b)。为了更好地观察差异 miRNA 表达模式，同时进行聚类分析。如图 2 所示，在抗药株和敏感株组内的表达模式保持一致，组间存在显著的表达模式差异，表明测序数据的准确性和重复性良好。



A. 雄虫差异 miRNA; B. 雌虫差异 miRNA。

图 1 抗药株和敏感株差异 miRNA 的火山图

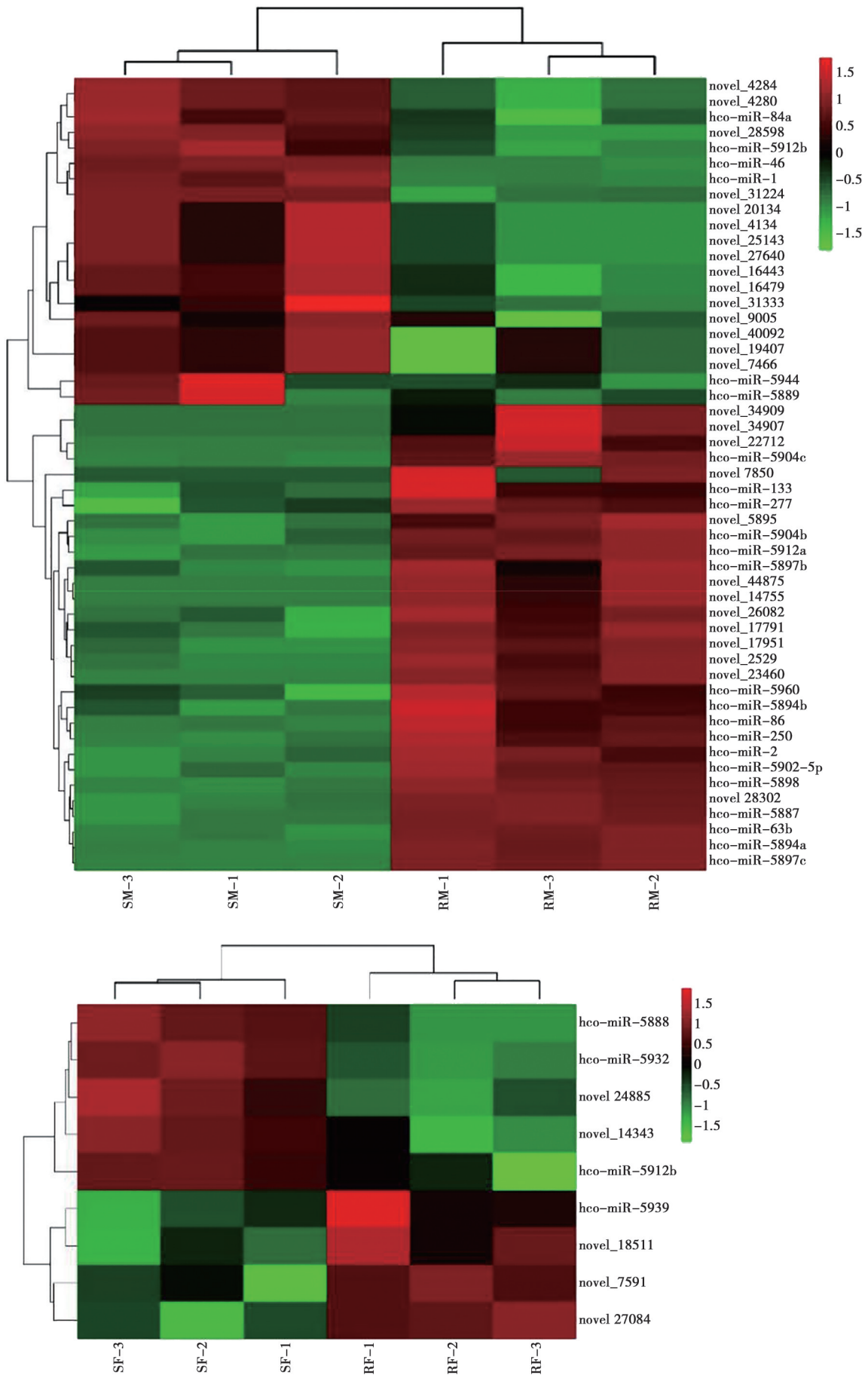


图2 抗药株和敏感株雄虫 (A) 和雌虫 (B) 差异 miRNAs 热图

2.4 GO 富集分析

由图 3 的 GO 富集分析, 雄虫结果显示, 在生物学过程 (BP) 上富集到磷代谢过程 (phosphorus metabolic process)、含磷化合物代谢过程 (phosphate-containing compound metabolic process)、细胞蛋白质代谢过程 (cellular protein metabolic process)、蛋白质修饰过程 (protein modification process) 等项; 在细胞成分 (CC) 上主要富集到细胞部分 (cell part)、细胞内的部分 (intracellular part)、胞质部分 (cytoplasmic part)、神经元部分 (neuron part) 等项。在分子功能 (MF) 上富集到离子结合 (ion binding)、蛋白结合 (protein binding)、蛋白激酶活性 (protein kinase activity)、嘌呤依赖 NTP 的解旋酶活性

(purine NTP-dependent helicase activity)、ATP 依赖解旋酶活性 (ATP-dependent helicase activity)。

雌虫结果显示, 在 BP 上富集到细胞蛋白质代谢过程 (cellular protein metabolic process)、小分子代谢过程 (small molecule metabolic process)、含磷化合物代谢过程 (phosphate-containing compound metabolic process) 等项; 在 MF 上主要富集到阴离子结合 (anion binding)、ATP 结合 (ATP binding)、腺苷酸结合 (adenyl nucleotide binding)、嘌呤核苷酸结合 (purine nucleotide binding)、碳水化合物衍生物结合 (carbohydrate derivative binding) 等项; 在 CC 上富集到核质 (nucleoplasm part) 部分。

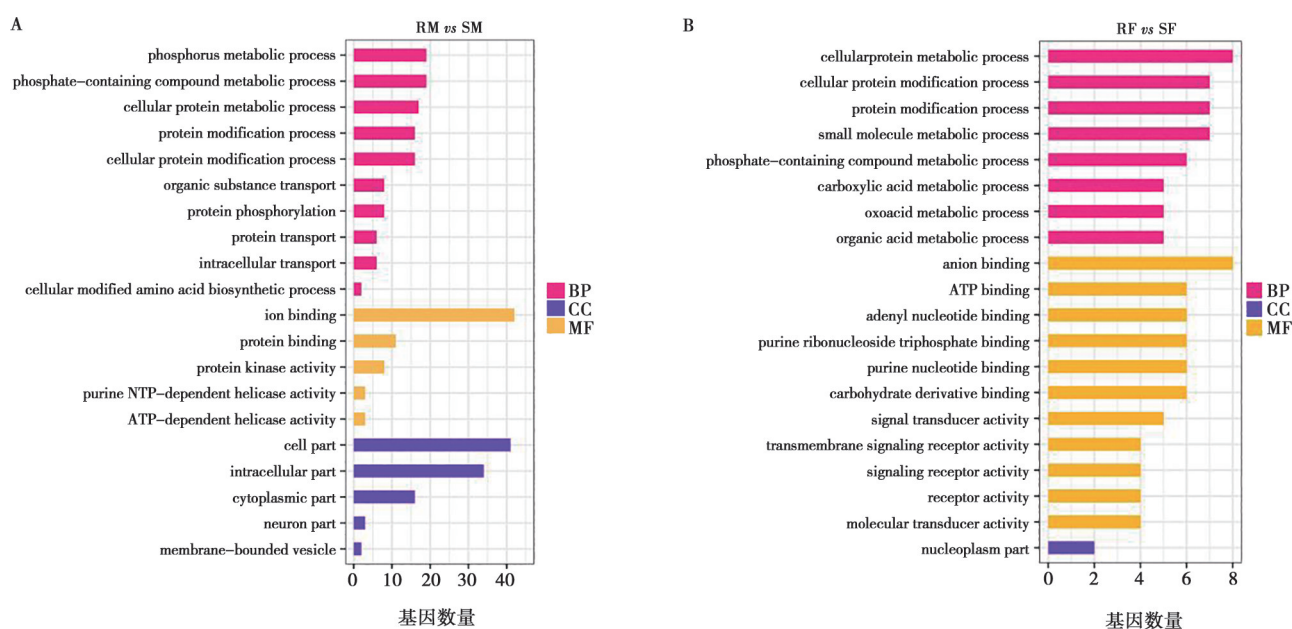


图 3 抗药株和敏感株雄虫 (A) 和雌虫 (B) miRNA 靶基因 GO 富集分析

2.5 KEGG 富集分析

图 4 的 KEGG 分析结果显示, 雌雄虫差异 miRNA 靶基因分别注释到了 102 和 149 个通路, 且雌雄虫注释到的通路具有一定的相似性, 其中雄虫的 KEGG 通路主要为赖氨酸降解 (lysine degradation)、内质网中的蛋白质加工 (protein processing in endoplasmic reticulum)、mTOR 信号通路 (mTOR signalling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signalling pathway)、cAMP 信号通路 (cAMP signalling pathway)、丙酮酸代谢 (pyruvate metabolism)、嘌呤代谢 (purine metabolism) 及 TCA 循环 (TCA cycle) 等。

雌虫的 KEGG 通路除了与雄虫相似的以外, 主要富集到肌动蛋白细胞骨架的调节 (regulation of actin cytoskeleton)、背腹轴形成 (dorso-ventral axis

formation)、嘌呤代谢 (purine metabolism)、氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)、细胞凋亡 (apoptosis)、FoxO 信号通路 (foxO signalling pathway) 等。

2.6 miRNA 靶基因功能分类

为了进一步分析差异基因的功能, 根据 GO 和 KEGG 的生物过程分别对不同组的差异 miRNA 靶基因进行功能分类。结果显示, 抗药株雄虫和雌虫差异 miRNA 的靶基因参与的功能分类分别为 21 和 12 类, 且雌雄虫分类趋势基本相似, 主要包括代谢过程 (metabolic process)、细胞过程 (cellular process)、单生物过程 (single-organism process)、生物调节 (biological regulation)、生物过程的调节 (regulation of biological process)、定位 (localization)、信号 (signaling)、应激反应 (response to stimulus)、多细胞生物过程 (multicellular organismal process)、发育过程

(developmental process) 等 (图 5)。上述结果表明, 差异 miRNA 也调控参与代谢过程的靶基因, 因此进

一步推测 IVM 抗药株和敏感株之间的代谢水平上的差异与 IVM 抗药性相关。

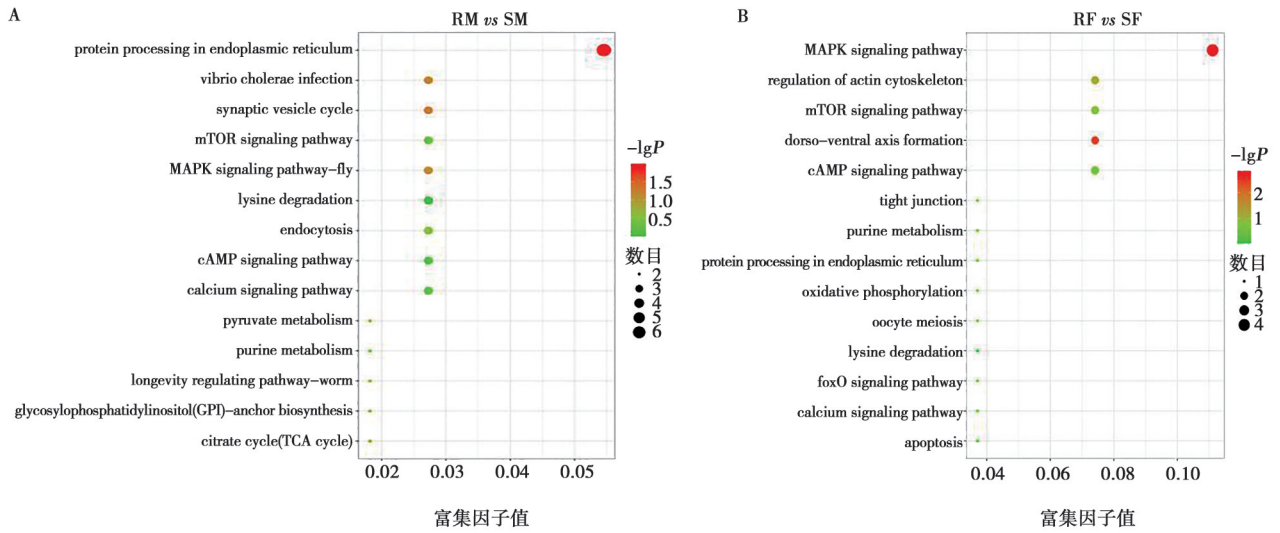


图 4 抗药株和敏感株雄虫 (A) 和雌虫 (B) miRNA 靶基因 KEGG 富集分析

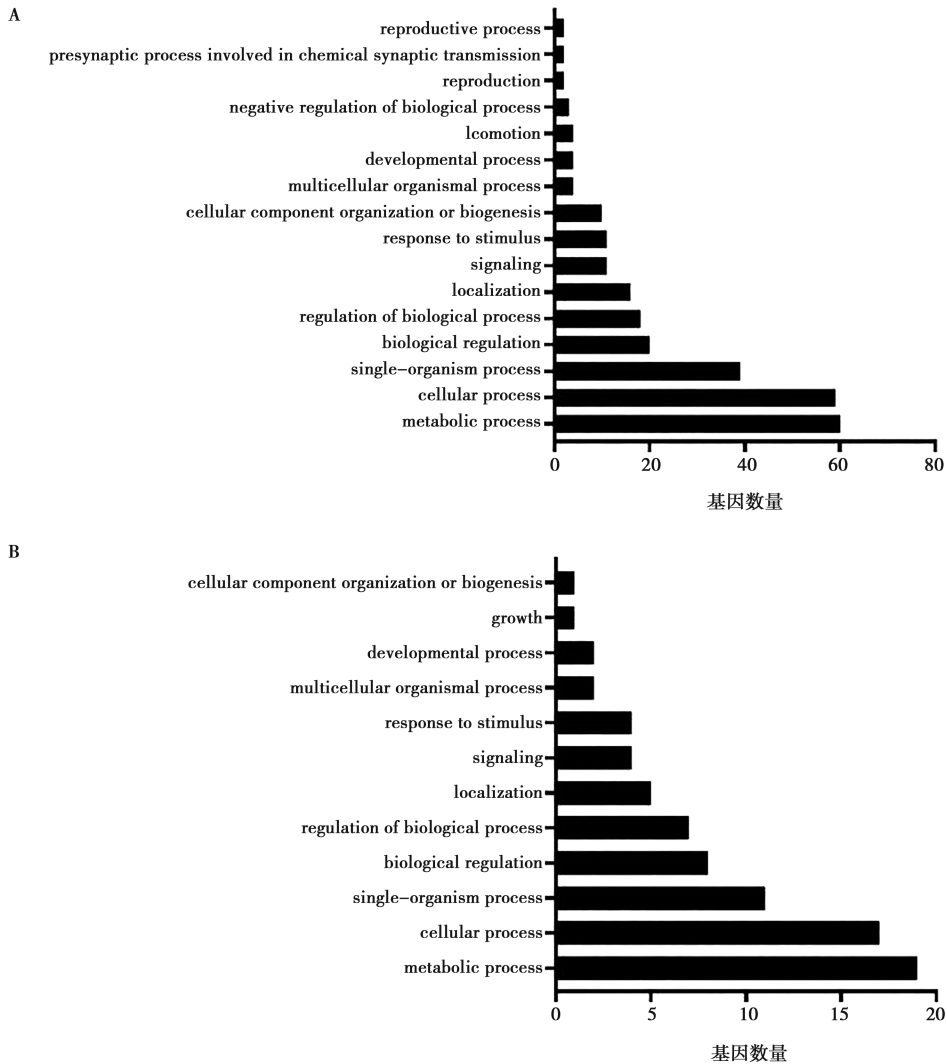


图 5 抗药株和敏感株雄虫 (A) 和雌虫 (B) 差异 miRNA 的靶基因功能分类

2.7 代谢过程的分类

进一步对参与代谢过程的靶基因进行分析结果显示，雄虫和雌虫差异的代谢过程分别分为 9 和 5 类，在雌雄虫分类趋势较为相似，主要包括氨基酸代谢 (amino acid metabdism)、碳水化合物代谢 (carbohy-

drate metabolism)、核苷酸代谢 (nucleotide metabolism)、能量代谢 (energy metabolism) 等 (图 6)。此外，在雌雄虫分类中共有氨基酸代谢为主，上述结果进一步表明，IVM 抗药株和敏感株之间的氨基酸代谢水平上的差异可能与抗药性的产生相关

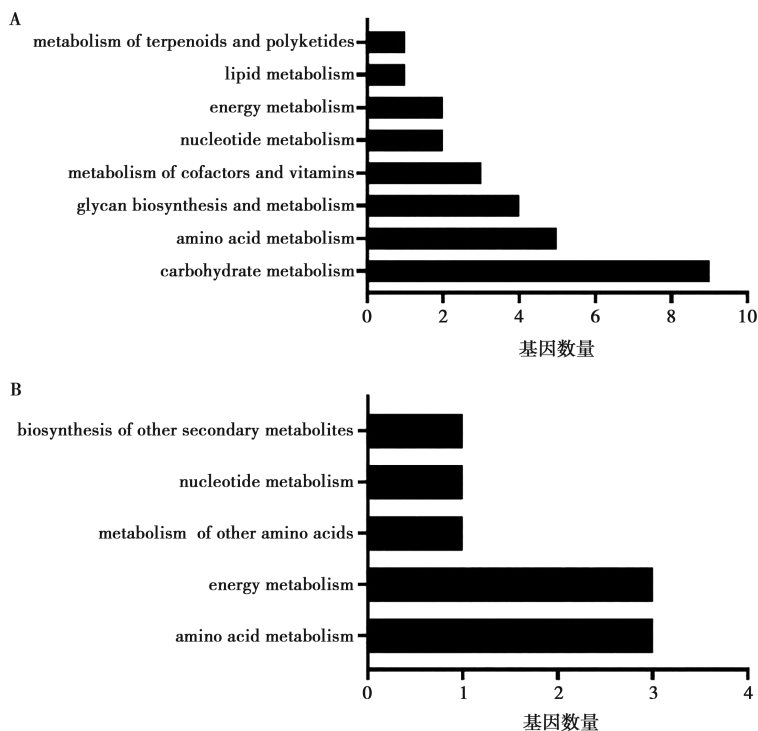
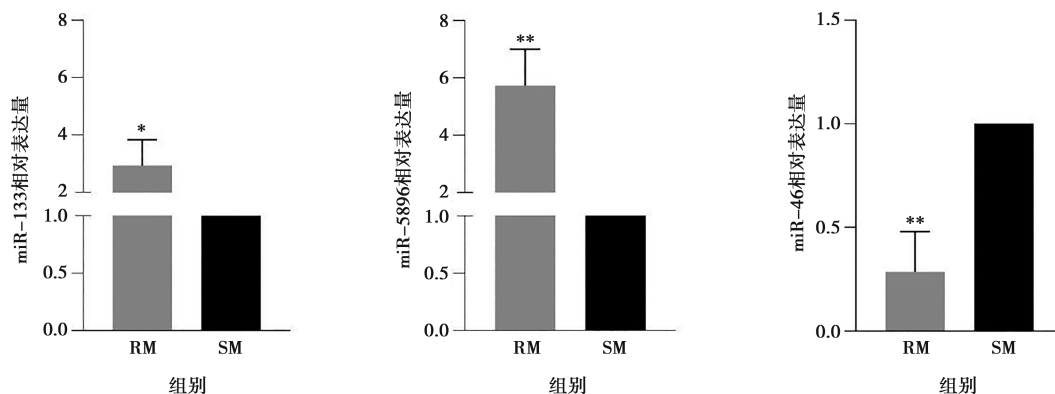


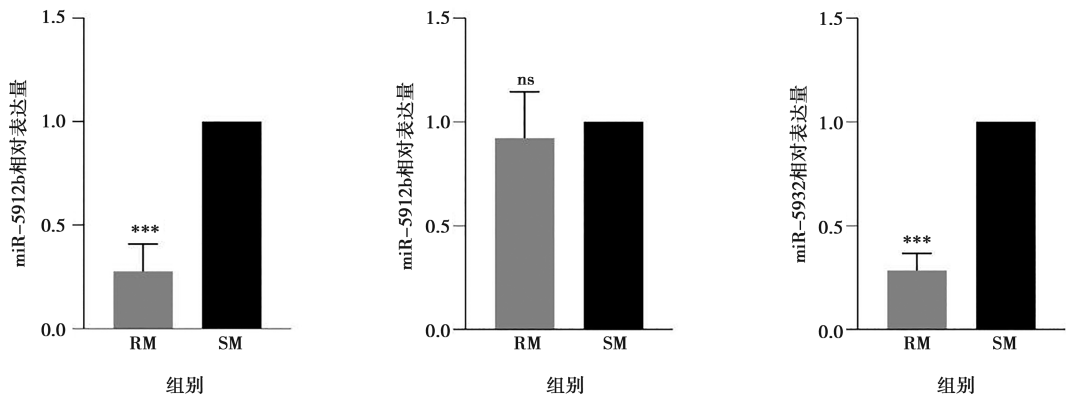
图 6 抗药株和敏感株雄虫 (A) 和雌虫 (B) 代谢过程的分类

2.8 RT-qPCR 对测序结果的验证

为了验证测序数据，将抗药株和敏感株雌雄虫组中选择 6 个差异表达基因，以 Tubulin 作为内参进行

RT-qPCR 验证。结果显示，差异 miRNA 的上下调趋势与 RNA-seq 结果一致 (图 7)，说明测序数据可信。





与 SM 组相比, ns 表示无显著差异, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。

图7 miRNA RT-qPCR 验证结果

3 讨论

目前,通过 miRNA 测序研究细菌或寄生线虫抗药机制已成为一个重要的手段。本研究构建了捻转血矛线虫 IVM 抗药株和敏感株 miRNA 的转录谱,并鉴定出 60 个差异转录 miRNAs,其中雄虫 51 个 miRNA,雌虫 9 个 miRNA。表明 miRNA 通过调控的方式在该线虫 IVM 抗药性的产生过程中发挥作用。然而,本研究发现敏感株和抗药株雌雄虫差异 miRNA 数量存在较大的差异,这有可能与雌虫体内包含大量虫卵有关,从而影响测序结果。此外,本研究所应用的抗药株是否对阿苯达唑类驱虫药产生抗药性尚不清楚,但该驱虫药在长期使用过程中会影响相关 miRNA 的转录,有可能影响本结果。

3.1 miRNA 在抗药性中的作用

研究表明 miR-1 在生物肌肉组织中特异表达并参与多种疾病的发展和耐药性的产生^[12]。如在 *Caenorhabditis elegans* 中 miR-1 通过调控靶向亚基 (UNC-29 和 UNC-63) 产生左旋咪唑抗性表型^[13]。此外,miR-1 的过表达可以在体内外抑制癌细胞增殖及逆转耐药性^[14],这进一步表明 miR-1 的低表达与产生耐药性密切相关。本研究发现,miR-1 在 IVM 抗药株中显著下调,这提示 miR-1 可能与捻转血矛线虫 IVM 抗药性相关,至于是否与多种驱虫药抗药性相关,还需进一步研究。

研究表明,miR-133 在骨骼肌细胞中高表达,通过调节参与肌细胞分化和增殖的基因来保证肌肉的正常发育^[15]。本研究发现,miR-133 在 IVM 抗药株当中显著上调,而且主要调控的其靶基因 (HCON_00175580) 参与细胞分化和转录调控,在肠道和神经元中高表达。这提示 miR-133 可能在 IVM 药物作

用所引起的咽部和运动肌肉的抑制中发挥作用,即通过调节肌肉细胞的分化和增殖,促进虫体肌肉细胞的正常发育,保证虫体摄食和运动从而在 IVM 抗药性产生过程中发挥间接性的作用。

研究表明,miR-2 在不同物种间高度保守,且具有相似的靶向特性^[16]。据报道,miR-2 在果蝇和秀丽隐杆线虫头部和神经元中高表达,并调控神经系统发育、神经元分化、感觉器官发育、细胞存活、若虫蜕皮发育成虫相关的基因^[17-18]。此外,如 Chen 等^[19]研究发现,在对镉耐受的水蚤中 miR-2 表达显著上调,miR-2 通过调节 GTP 酶和角质层抑制细胞生长和增殖,将细胞能量分配到解毒过程,从而增加水蚤对镉的耐受性。本研究发现,miR-2 在 IVM 抗药株和敏感株雄虫中都高表达,而且在抗药株中显著上调。因此,对 miR-2 靶基因进行预测发现 miR-2 靶向 14 个基因,主要为参与角质层形成、蜕皮、GTP 酶活性、轴突发育和 ephrin 受体信号通路的基因,这预示着 miR-2 可能通过调节虫体角质层的形成来参与 IVM 抗药性产生。

3.2 差异表达 miRNAs 靶基因功能分析

据报道,mTOR 通路对于果蝇、线虫和哺乳动物细胞的生长和发育至关重要,也是 PI3K-Akt-mTOR 信号通路的主调节剂,通过抗凋亡作用来主导耐药性的产生^[20]。如在乳腺癌中,PI3K 和 PI3K/AKT 信号通路的激活可以促进癌细胞对曲妥珠单抗和抗雌激素药物产生耐药性^[20-21]。此外,PI3K/AKT 也是胃肠道间质瘤对伊马替尼产生耐药的关键信号通路^[22]。本研究功能分析发现 mTOR 信号通路也富集到 KEGG 通路分析中,这预示着 mTOR 信号通路可能通过介导 PI3K-Akt 信号通路来参与 IVM 抗药性的产生。

研究发现,MAPK 通路分为有丝分裂原 (ERK) 和应激激活 (JNK 和 p38) 的 MAPK 通路,在癌症耐

药性的产生中发挥重要作用,如 ERK 通路的再激活是在转移性恶性黑色素瘤对维莫拉非尼和曲美替尼产生耐药性过程中发挥重要作用^[23]。同样, JNK 维持肺癌中促进生存蛋白的表达,从而增加对顺铂治疗的耐药性^[24]。p38 通路的再激活也同样促进乳腺癌对主要药物他莫昔芬耐药的产生,对 p38 活性抑制有效降低了他莫昔芬耐药性^[25]。此外,研究发现 PI3K/AKT 信号通路与 ERK 通路相通,因此抑制这两种途径中的一种可以增加另一种途径的活性,从而导致获得性耐药性,这表明 mTOR 和 MAPK 信号通路发挥协同作用,从而促进耐药性产生^[26]。本研究中 MAPK 信号通路也富集到 KEGG 通路分析中,并且对参与该通路的基因进行分析发现,有 3 个 (HCON_00111880、HCON_00185500、HCON_00111880) 参与该通路,这预示着 MAPK 信号通路可能通过调节细胞生长和抗凋亡等多种途径参与 IVM 抗药性的产生。

3.3 氨基酸代谢在 IVM 抗药性中的潜在作用

解决捻转血矛线虫 IVM 抗药性问题是防控该病的一个重大挑战,需要创新的策略来揭示复杂的抗药机制。最近的癌细胞耐药性研究表明,癌细胞代谢状态与药物疗效有着密切的关系,即抗癌药物的长期选择压力会改变细胞的代谢状态,有助于特定代谢性状的出现,从而促进抗药性的产生。其中,氨基酸代谢为抗药癌细胞提供了特定的适应性特征,从而抵消抗癌药物的作用^[27-28]。此外,细菌通过改变自身的氨基酸代谢状态来抵抗抗生素的药物作用^[29]。如 Peng 等^[30]发现在迟钝爱德华菌卡那霉素抗药株中丙氨酸含量与敏感株相比显著降低,通过添加外源性丙氨酸能够逆转对卡那霉素的抗药性。本研究对 miRNA 靶基因进行功能分类分析发现,在雌雄虫 miRNA 靶基因主要富集到代谢过程,进一步对代谢过程进行分析发现以氨基酸代谢为主,这提示着氨基酸代谢有可能在 IVM 抗药性产生中发挥潜在作用。上述结果表明 IVM 作为一种抗生素类(大环内酯类)驱虫药,可能改变捻转血矛线虫的代谢水平,同样捻转血矛线虫有可能通过改变自身的代谢状态来抵抗 IVM 的药物作用,从而促进抗药性的产生。

本研究通过高通量测序对捻转血矛线虫 IVM 抗药性关键 miRNA 与其相关通路进行了探索,为后续的抗药机制研究提供了科学依据。未来研究可针对关键 miRNA (如 miR-1、miR-133) 的靶基因功能,结合 RNA 干扰技术等,进一步揭示捻转血矛线虫的抗药性分子机制,为新型抗药性治理策略的开发提供理论支持。

参考文献:

- [1] GODOY P, LIAN J, BEECH R N, et al. *Haemonchus contortus* P-glycoprotein - 2: *in situ* localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport [J]. *Int J Parasitol*, 2015, 45 (1): 85-93.
- [2] ZHANG Z, GASSER R B, YANG X, et al. Two benzimidazole resistance-associated SNPs in the isotype-1 β -tubulin gene predominate in *Haemonchus contortus* populations from eight regions in China [J]. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 2016, 6 (3): 199-206.
- [3] ÖMURA S. Ivermectin: 25 years and still going strong [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 31 (2): 91-98.
- [4] CAZAJOUS T, PREVOT F, KERBIRIOU A, et al. Multiple-resistance to ivermectin and benzimidazole of a *Haemonchus contortus* population in a sheep flock from mainland France, first report [J]. *Vet Parasitol Reg Stud Rep*, 2018, 14: 103-105.
- [5] 刘阳. 捻转血矛线虫转录组和蛋白组学分析及耐 IVM 候选基因功能研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [6] LAING R, GILLAN V, DEVANEY E. Ivermectin-old drug, new tricks [J]. *Trends Parasitol*, 2017, 33 (6): 463-472.
- [7] MARTIN R J, ROBERTSON A P, CHOUDHARY S. Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more [J]. *Trends Parasitol*, 2021, 37 (1): 48-64.
- [8] LAING R, KIKUCHI T, MARTINELLI A, et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery [J]. *Genome Biol*, 2013, 14 (8): R88.
- [9] PAREEK C S, SMOZYNSKI R, TRETYN A. Sequencing technologies and genome sequencing [J]. *J Appl Genet*, 2011, 52 (4): 413-435.
- [10] REZANSOFF A M, LAING R, MARTINELLI A, et al. The confounding effects of high genetic diversity on the determination and interpretation of differential gene expression analysis in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* [J]. *Int J Parasitol*, 2019, 49 (11): 847-858.
- [11] TUERSONG W, ZHOU C, WU S, et al. Comparative analysis on transcriptomics of ivermectin resistant and susceptible strains of *Haemonchus contortus* [J]. *Parasites Vectors*, 2022, 15 (1): 159.
- [12] YAMAMOTO H, MORI M. MicroRNAs as therapeutic targets and colorectal cancer therapeutics [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 937: 239-247.
- [13] SIMON D J, MADISON J M, CONERY A L, et al. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions [J]. *Cell*, 2008, 133 (5): 903-915.
- [14] HAN C, SHEN J K, HORNICEK F J, et al. Regulation of microRNA-1 (miR-1) expression in human cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2017, 1860 (2): 227-232.
- [15] CHEN J F, MANDEL E M, THOMSON J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. *Nat Genet*, 2006, 38 (2): 228-233.
- [16] MARCO A, HOOKS K, GRIFFITHS-JONES S. Evolution and function of the extended miR-2 microRNA family [J]. *RNA Biol*, 2012, 9 (3): 242-248.
- [17] LEAMAN D, CHEN P Y, FAK J, et al. Antisense-mediated deple-

- tion reveals essential and specific functions of microRNAs in *Drosophila* development [J]. *Cell*, 2005, 121 (7): 1097–1108.
- [18] LOZANO J, MONTAÑEZ R, BELLES X. MiR-2 family regulates insect metamorphosis by controlling the juvenile hormone signaling pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112 (12): 3740–3745.
- [19] CHEN S, NICHOLS K M, POYNTON H C, et al. MicroRNAs are involved in cadmium tolerance in *Daphnia pulex* [J]. *Aquat Toxicol*, 2016, 175: 241–248.
- [20] JIANG B H, LIU L Z. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment [J]. *Drug Resist Updat*, 2008, 11 (3): 63–76.
- [21] BERNS K, HORLINGS H M, HENNESSY B T, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12 (4): 395–402.
- [22] BAUER S, DUENSING A, DEMETRI G D, et al. KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor; PI₃-kinase/AKT is a crucial survival pathway [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (54): 7560–7568.
- [23] LEE S, RAUCH J, KOLCH W. Targeting MAPK signaling in cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (3): E1102.
- [24] XU L, FU Y, LI Y, et al. Cisplatin induces expression of drug resistance-related genes through c-Jun N-terminal kinase pathway in human lung cancer cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 80 (2): 235–242.
- [25] WAGNER E F, NEBREDA A R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (8): 537–549.
- [26] MURUGAN A K. mTOR: role in cancer, metastasis and drug resistance [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 92–111.
- [27] PRANZINI E, PARDELLA E, PAOLI P, et al. Metabolic reprogramming in anticancer drug resistance: a focus on amino acids [J]. *Trends Cancer*, 2021, 7 (8): 682–699.
- [28] BANSAL A, SIMON M C. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217 (7): 2291–2298.
- [29] LIU S R, PENG X X, LI H. Metabolic mechanism of ceftazidime resistance in *Vibrio alginolyticus* [J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12: 417–429.
- [30] PENG B, SU Y B, LI H, et al. Exogenous alanine and/or glucose plus kanamycin kills antibiotic-resistant bacteria [J]. *Cell Metab*, 2015, 21 (2): 249–262.