

miR-192在尼罗罗非鱼应答碱度胁迫中的表达及靶基因

周昊天, 张成硕, 王艳玲, 赵金良, 赵岩

Expression of miR-192 in Nile tilapia in response to alkalinity stress and verification of target genes

ZHOU Haotian, ZHANG Chengshuo, WANG Yanling, ZHAO Jinliang, ZHAO Yan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200302946>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[Aja-miR-22和Aja-miR-27及其靶基因在刺参盐度胁迫后的表达模式](#)

Expression profiles of Aja-miR-22 and Aja-miR-27, and their target genes, in sea cucumber under salinity stress

中国水产科学. 2020, 27(4): 375 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2020.19166>

[尼罗罗非鱼TIRAP基因克隆、组织表达及其在无乳链球菌、脂多糖和聚肌胞苷酸刺激下的免疫应答](#)

Cloning and expression of *TIRAP* gene and immune response in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*, lipopolysaccharides and polyinosinic polycytidylic acid stress

大连海洋大学学报. 2020, 35(6): 857 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-318>

[尼罗罗非鱼Ikaros基因的克隆及表达分析](#)

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *IKAROS* GENE FROM NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

水生生物学报. 2018, 42(1): 77 <https://doi.org/10.7541/2018.010>

[高碳酸盐碱胁迫对尼罗罗非鱼氨代谢基因表达变化的影响](#)

Change in ammonia metabolism gene expression of *Oreochromis niloticus* under the stress of high carbonate alkalinity

中国水产科学. 2016, 23(6): 1290 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2016.16047>

[盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响](#)

Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*

水产学报. 2014, (10): 1696 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2014.49311>

[盐度胁迫对尼罗罗非鱼肝脂肪酸组成与脂代谢相关基因表达的影响](#)

Effects of salinity on the fatty acid composition and the expression of lipid-metabolism-related genes in the liver of Nile tilapia

中国水产科学. 2020, 27(8): 859 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1118.2020.19314>

文章编号: 1674-5566(2021)03-0407-09

DOI:10.12024/jsou.20200302946

miR-192 在尼罗罗非鱼应答碱度胁迫中的表达及靶基因

周昊天^{1,2}, 张成硕^{1,2}, 王艳玲^{1,2}, 赵金良^{1,2}, 赵 岩^{1,2}

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘 要: 采用实时荧光定量、生物信息学、双荧光素酶报告和体内 miRNA 抑制的方法, 探究 miR-192 在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 应答碳酸盐碱度胁迫中的作用。结果如下: (1) 实时荧光定量 PCR 实验表明, 在急性碱度胁迫 (6 g/L NaHCO₃) 尼罗罗非鱼 6 h 后, 鳃组织中 miR-192 的表达显著下调, 溶质转运蛋白基因 (solute carriers16A7, *SLC16A7*) 表达显著上调 ($P < 0.05$); (2) 借助生物信息分析预测到 *SLC16A7* 可能是 miR-192 的靶基因; (3) 利用双荧光素酶报告实验发现 miR-192 会与 *SLC16A7* 的 3' UTR 结合; (4) 体内对 miR-192 抑制后, *SLC16A7* 的表达显著上调 ($P < 0.05$)。证实了 miR-192 参与了尼罗罗非鱼应答碱度胁迫中的调控过程, *SLC16A7* 是 miR-192 的直接靶基因, 为探明 miRNAs 调控尼罗罗非鱼应答碱度胁迫的分子机制提供了一定的依据。

关键词: 碱度胁迫; microRNA; 尼罗罗非鱼; miR-192; *SLC16A7*

中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

中国拥有大量的盐碱水资源, 面积约为 $6.03 \times 10^{12} \text{ m}^2$ ^[1], 但开发利用难度大, 需要适宜的水产养殖品种^[2]。盐碱水具有盐度高、pH 高、碱度高、离子成分复杂等特点^[3], 其中碱度是指水中能与酸发生中和反应的物质总量, 包括 HCO₃⁻、CO₃²⁻ 等弱酸根, OH⁻ 等强碱以及 NH₃ 等弱碱性物质, 而天然水体中主要以碳酸盐碱度为主^[4]。通常, 适当的碱度有利于水生生物生存, 但过高的碳酸盐碱度对水生生物具有较强的毒害作用^[5-6]。碱度毒性会影响血液中 pH 缓冲体系, 会损伤鳃、黏膜等离子交换组织^[7]。尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 是一种广盐性鱼类。本实验室在开展耐盐碱罗非鱼新品种选育的过程中也试图研究其适应盐碱环境的机制^[8]。在高碳酸盐碱度胁迫下, 血氨浓度上升, 罗非鱼会启动尿素与谷氨酰胺代谢途径共同参与调节血氨浓度^[9]。碱度胁迫会影响尼罗罗非鱼鳃离子细胞数量和形态^[10]。碳酸酐酶 (carbonic anhydrase, CA) 家族中的 CA II、CA IV、溶质载体

家族蛋白 (solute carrier family, SLC) 中的 *SLC4A4*、*SLC26A6* 参与碱度胁迫下离子转运、渗透压平衡调节^[11]。

microRNA (miRNAs) 是一类内源性、短链非编码小 RNA^[12]。miRNAs 主要通过靶基因的 3' 非翻译区 (3' UTR) 的碱基不完全配对, 抑制或降解靶基因的表达^[13]。研究表明 miRNA 广泛参与动物^[14-15]和植物^[16]适应环境的过程。在植物中的研究表明 miRNA 在适应盐度^[17]、碱度^[18]、温度^[19]和湿度^[20]的变化中发挥重要作用。在尼罗罗非鱼的研究中发现: miR-204 通过靶向血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 响应低氧胁迫^[21]; miR-30c 和 miR-206 分别通过靶向热休克蛋白 (heat shock proteins 70, HSP70) 和胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 来应对渗透压变化^[22-23]; miR-21 通过靶向血管内皮生长因子 *VEGFB* 和 *VEGFC* 来参与适应碱度胁迫^[24]。本实验室已通过高通量测序技术发现碳酸盐碱度胁迫后罗非鱼鳃组织

收稿日期: 2020-03-03 修回日期: 2020-05-30

基金项目: 国家自然科学基金(31602128); 现代农业产业技术体系专项 (CARS-46); 上海市自然科学基金 (16ZR1415300)

作者简介: 周昊天 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为罗非鱼遗传育种。E-mail: 619044862@qq.com

通信作者: 赵 岩, E-mail: y_zhao@shou.edu.cn

中67个差异表达显著 miRNAs,并结合实时荧光定量 PCR 对7个 miRNA(miR-122、miR-192、miR-194a、miR-24a、miR-30d、miR-143 和 miR-155)进行了初步研究,但尚未对其作用和靶基因进行深入研究。

选取 miR-192 深入研究其在尼罗罗非鱼应答碱度胁迫中的作用,首先采用实时荧光定量 PCR 检测在急性碱度胁迫尼罗罗非鱼后,96 h 内鳃组织中 miR-192 的表达变化。利用生物信息软件预测 miR-192 的靶基因,并对靶基因进行 KEGG 通路分析。在众多可能的靶基因中筛选出溶质转运蛋白(solute carriers16A7, *SLC16A7*)基因进行实时荧光定量 PCR、双荧光素酶报告实验以及活体内注射 miR-192 抑制剂实验进一步验证靶向关系。本研究为探明 miRNAs 调控尼罗罗非鱼应答碱度胁迫的分子调控机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用尼罗罗非鱼取样于上海海洋大学罗非鱼种质资源试验站,体质量为(110 ± 10) g,暂养于室内控温循环水族箱内,每天定时投喂2次,投喂量约为鱼体质量的3%。待完全适应新环境后,挑选规格均匀、体质健康的个体开展碱度胁迫实验。本研究经上海海洋大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 碳酸盐碱度胁迫实验设计

实验容器为60 cm × 45 cm × 40 cm 的玻璃水槽,实验用碱水提前配制,在曝气完全的淡水中加入所需 NaHCO₃(分析纯),稳定48 h后使用。实验前1 d 停止喂食,实验开始时将鱼从过渡淡水中直接移至碱度组中进行急性胁迫,每组投放10尾鱼,设置3个重复。于胁迫后0、6、12、24、48、72 和 96 h 采样,胁迫过程中没有死亡现象,每个重复组取1尾鱼。

根据预实验结果,设置淡水组 FW 和碱度组 AW6(6 g/L NaHCO₃),实验期间应适当换水保持碱度。配置完成后,用滴定法对水体碱度进行测量,FW 组碱度为2.01 mmol/L, AW6 组碱度为68.60 mmol/L。

取胁迫后0、6、12、24、48 和 96 h 的鳃组织进行实时荧光定量,检测 miR-192 和 *SLC16A7* 的表达量。取0 h 其他组织用于 miR-192 的组织表达谱分析。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

利用 Trizol 法提取尼罗罗非鱼的鳃组织总 RNA,提取步骤严格按照 TRNzol-A⁺ Reagent (TIANGEN)说明书操作,以1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,并测定质量浓度及纯度,稀释至1 ng/μL 保存于-80 °C 冰箱备用。提取0 h 尼罗罗非鱼的鳃、脑、心、肌肉、肝、肾、肠组织的总 RNA,用于组织表达谱检测。

所提取的总 RNA 经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 无降解条带和污染条带,核酸浓度检测仪测定的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为1.8 ~ 2.0,可用于后续实验。

使用 Prime Script[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒合成 *SLC16A7* 的 cDNA 第一链,反应体系第一步,去除 RNA 中残存的 DNA (10 μL):5 × gDNA Eraser Buffer 2.0 μL, gDNA Eraser 1.0 μL, RNA 1.0 μL, RNase Free dH₂O 6.0 μL。第二步,合成 cDNA 第一链(20 μL):经第一步处理的 RNA 10.0 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL, RT 引物 1.0 μL, 5 × PrimeScript Buffer 4.0 μL, RNase Free dH₂O 4.0 μL。

合成 miR-192 的 cDNA 第一链,第2步中用 miR-192 RT 引物替代 RT 引物,其余同 *SLC16A7* cDNA 第一链的合成。

制备的 cDNA 保存在4 °C 冰箱,用于后续实验。

1.4 引物设计与筛选

根据测序所得尼罗罗非鱼 miR-192 序列,采用生工生物工程股份有限公司提供的茎环序列,使用 Primer 5 设计茎环引物,选取 U6 snRNA 作为内参基因。

选取 β -actin 作为内参基因,对 *SLC16A7* 设计引物。引物通过软件 Primer 5 设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成。选择3'UTR 区域用于双荧光素实验中的引物设计,通过普通 PCR 反应筛选验证,引物信息详见表1。

表 1 引物序列信息

Tab.1 Primer sequence information

引物 Primer	正向引物	反向引物	序列 Sequence
miR-192	正向引物		GCGCGATGACCTATGAATTG
	反向引物		AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
	RT 引物		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCGACTG GATACGACGGCTGT
SLC16A7-UTR	正向引物		CGCG <u>TTTAAA</u> CGTGT GGTGAACCCAATGTGC
	反向引物		GC <u>TCTAGA</u> CAGCTT CTCCGTGTCTGGTT
U6 snRNA	正向引物		CTCGCTTCGGCAGCACA
	反向引物		AACGCTTCACGAATTTGCGT
β -actin	正向引物		CAGCAGATCTGGATCAGCAAGC
	反向引物		TGAAGTTGTTGGCGCTTTGG

注:下划线表示 *Dra* I 和 *Xba* I 的酶切位点,加粗为保护碱基(引物的扩增长度为 508 bp,位于 *SLC16A7* 基因 3'UTR 第 1 004 ~ 1 511 bp 处)。

Notes: Restriction sites of *Dra* I and *Xba* I are underlined, sequences marked in bold are protective bases (Amplification length of the primers is 508 bp, located at the 1 004 - 1 511 bp of the 3'UTR of the *SLC16A7* gene).

1.5 实时荧光定量 PCR

使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒进行荧光定量 PCR,反应体系如下(20 μ L):TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10.0 μ L,PCR 正向引物(10 μ mol/L) 0.5 μ L,PCR 反向引物(10 μ mol/L) 0.5 μ L,cDNA 2.0 μ L,无 RNase 酶水 7.0 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 2 min 预变性;95 $^{\circ}$ C 15 s 变性;58.5 $^{\circ}$ C 1 min 退火延伸,反应进行 35 个循环。

数据分析采用 CFX Manager 软件进行。基线值、阈值和阈循环值由软件自动设定,每个反应设置 3 个平行组。每批反应均设阴性对照,确保反应体系未受污染,采取相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [25] 法计算表达量。

1.6 双荧光素酶报告载体构建与鉴定

构建 pmirGLO-SLC16A7-3'-UTR 双荧光素酶报告载体:根据 Ensembl 上的基因序列 (ENSONIG00000016934) 通过 RT-PCR 方法扩增 *SLC16A7* 基因 3'UTR 片段。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 反应产物,并对产物进行纯化。用 *Dra* I 和 *Xba* I 对纯化的 PCR 产物和载体进行双酶切,然后 T4 酶连接(连接时 PCR 产物与荧光素酶报告载体的摩尔数之比为 10:1,连接体系为 10 μ L)。将连接产物导入 DH5 α 感受态细胞进行阳性克隆验证,双酶切及电泳检测正确后,送公司测序鉴定。鉴定正确的重组载体命名为 pmirGLO-SLC16A7-3'-UTR。

瞬时转染 HEK-293T 细胞:采用 24 孔板进行培养,接种密度为 5×10^4 。使用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基置于 CO₂ 培养箱中培

养,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 24 h 至细胞密度达 70% ~ 85% 时开始转染。转染分为 3 组:重组载体 pmirGLO-SLC16A7-3'-UTR(对照组)、重组载体 pmirGLO-SLC16A7-3'-UTR + miR-192 mimic(处理组)和重组载体 pmirGLO-SLC16A7-3'-UTR + miR-192 mimic NC(处理 NC 组)。转染时每组细胞设 6 个平行,先吸去原培养基,取 25 μ L OPTI-MEM 培养基稀释 1 μ L Lipofectamine™ 2 000 并充分混匀(转染稀释液),取 25 μ L OPTI-MEM 培养基稀释 1 μ g miR-192 mimics 或者 mimic NC 并充分混匀(处理稀释液),将上述处理稀释液缓慢滴入转染稀释液中,轻轻混匀后于室温孵育 5 min。加入转染脂质体复合物至细胞中,转染 6 h 后更换新鲜 OPTI-MEM 培养基。在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下孵育细胞 2 d 后分析转染细胞的荧光值。

1.7 双荧光素酶报告基因系统检测

使用 Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) 试剂盒,在 Promega GLOMAX 上检测荧光信号。将 5 \times PLB 稀释成 1 \times PLB 备用,预混好 LAR II 和 Stop&Glo Reagent 反应液。弃去旧培养基,用 PBS 清洗 2 遍,每孔加入 100 μ L 1 \times PLB 裂解细胞,置于摇床上 15 min。将 50 μ L LAR II 加入 1.5 mL EP 管中,取 10 μ L 细胞裂解液加入 EP 管,置于仪器检测信号;加入 50 μ L Stop&Glo Reagent,再次置入仪器,检测信号。根据测得的萤火虫荧光素酶活性值 F (firefly luciferase) 及海肾荧光素酶活性值 R (renilla luciferase),计算出相对荧光素酶活性 $\Delta CT = F/R$ 。

1.8 罗非鱼体内注射 miRNA 抑制剂实验

罗非鱼分别注射生理盐水(对照组)和 miR-192 抑制剂(处理组)。提前使用 RNase-free 无菌水稀释 miR-192 抑制剂,每尾每次注射剂量为 500 μ L 的 miR-192 抑制剂稀释液(200 μ mol/L),对照组使用 500 μ L 0.65% 的生理盐水。采用胸腔注射,每天 2 次,注射 3 d,注射时间固定。距离第 1 次注射 96 h 后,取肌肉、鳃、肾和肝组织进行测量。

1.9 统计学处理

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。分析结果采用平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示,当 $P < 0.05$ 时表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-192 的生物信息学分析和靶基因预测

使用 miRanda 和 RNAhybrid 对 miR-192 的靶基因进行预测,并对预测的结果进行 KEGG 通路富集分析($P < 0.05$),见图 1。结果显示,预测的靶基因在损伤修复相关通路 (biosynthesis of antibiotics、protein processing in endoplasmic reticulum) 和碳代谢通路 (carbon metabolism) 上显著富集,也与 p53、Wnt、FoxO 等信号通路相关联。在靶基因预测结果中, *SLC16A7* 的靶向结合位点被两个软件同时预测位于 3'UTR 的区域(图 2),推测其被 miR-192 直接靶向调节的可能性较大,因此选择 *SLC16A7* 作为后续验证靶基因。

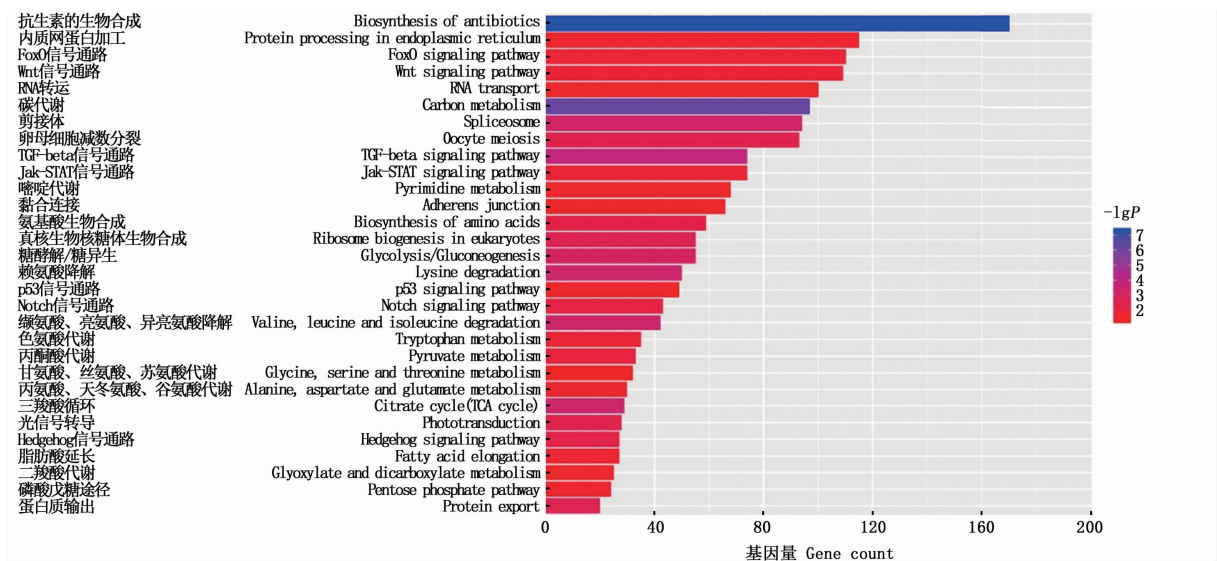


图 1 预测靶基因的 KEGG 通路富集分析图

Fig. 1 Enrichment analysis map of KEGG pathway for predicting target genes

2.2 miR-192 组织表达谱

取 0 h 各个组织的 cDNA 进行 PCR 扩增,对扩增产物进行凝胶电泳检测,检测其组织表达谱。由图 3 可知,miR-192 在肾、肌肉、心、肝、肠、脑和鳃中都表达,其中在肾、肝和肠中表达水平较高。使用 Image J 对凝胶电泳条带的亮度进

行定量,见图 3。

2.3 miR-192 和 *SLC16A7* 在碱度胁迫下 96 h 内鳃组织中表达规律

miR-192 和 *SLC16A7* 在碱度胁迫下鳃组织中的表达如图 4 所示。在 AW 中,miR-192 表达显著下降,*SLC16A7* 的表达显著上升。

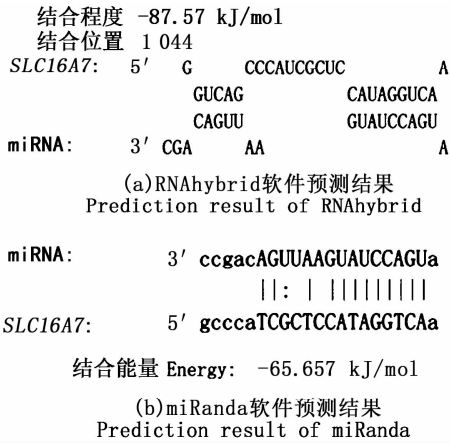


图2 对靶基因 SLC16A7 的预测结果
Fig.2 Prediction of the target gene SLC16A7

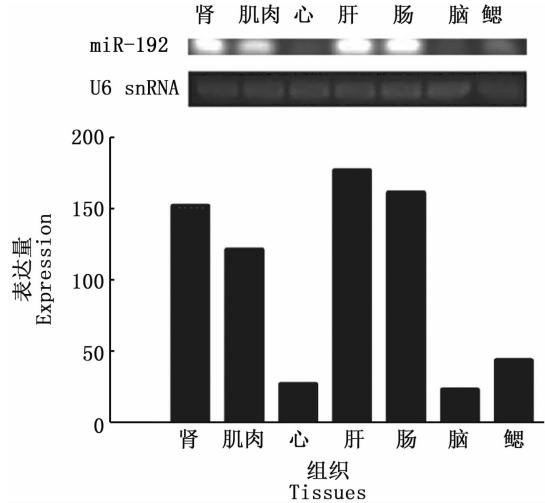
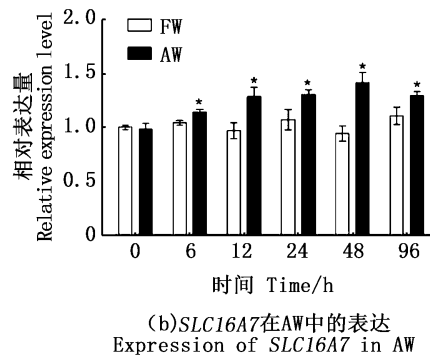
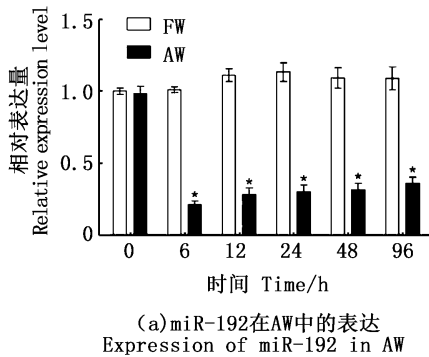


图3 miR-192 的组织表达谱
Fig.3 Tissue expression of miR-192



柱状图上方“*”代表差异显著(P<0.05)。
“*”above the histogram shows significant difference (P<0.05).

图4 miR-192 和 SLC16A7 在鳃组织 96 h 内的表达
Fig.4 Expression of miR-192 and SLC16A7 in gill within 96 h

2.4 双荧光素酶报告载体的构建与鉴定

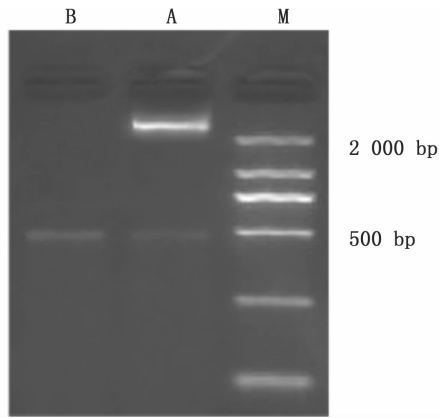
根据 miR-192 在 SLC16A7-3'UTR 的靶向位点设计引物,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳显示为一条长度约 500 bp 的条带,与实际长度(508 bp)相符,测序结果证实该片段基因序列完全正确。pmirGLO 载体经过酶切线性化,插入目的基因片段,制备 pmirGLO-SLC16A7-3'-UTR 双荧光素酶重组载体。构建好的载体经过双酶切鉴定,结果显示酶切后得到的片段与预期片段大小相符。见图 5。

2.5 荧光素酶活性检测

处理组、对照组和处理 NC 组均检测出荧光信号,但处理组的荧光素酶活性显著低于对照组和处理 NC 组。miR-192 mimics 显著降低了 pmir GLO-SLC16A7-3'-UTR 双荧光素酶报告载体的荧光素酶表达。见图 6。

2.6 罗非鱼体内注射 miRNA 抑制剂实验

与注射生理盐水(对照组)相比 miR-192 抑制剂(处理组)中肝、鳃、肾、肌肉中 miR-192 表达均受到抑制,表达水平下降 (P<0.05),见图 7。SLC16A7 的表达均显著上升(P<0.05),见图 8。

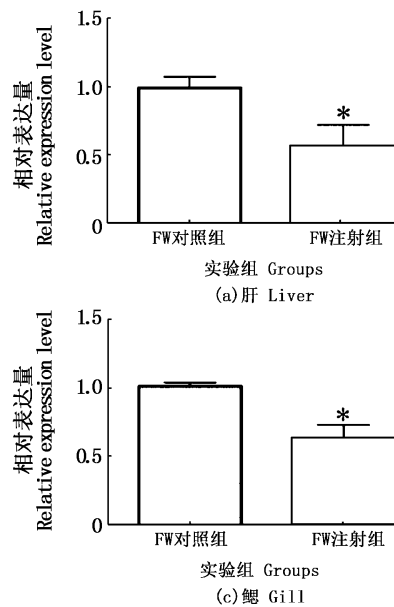


A. pmirGLO-*SLC16A7*-3'-UTR 双荧光素酶报告载体; B. PCR 产物; M. Marker。

A. Dual luciferase reporter of pmirGLO-*SLC16A7*-3'-UTR; B. Production of PCR; M. Marker.

图5 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 5 Result of agarose gel electrophoresis



柱状图上方“*”代表差异显著($P < 0.05$)。

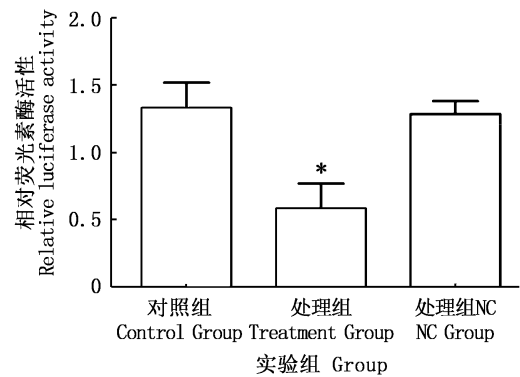
“*” above the histogram shows significant difference ($P < 0.05$).

图7 体内注射 miRNA 抑制剂实验中 miR-192 的表达

Fig. 7 Expression of miR-192 *in vivo* injection of miRNA antagonist

3 讨论

研究表明, miR-192 是一种高度保守的 miRNA, 在生物生长和疾病发生的过程中发挥重要作用。例如: 在人肝癌细胞中, miR-192 的表达显著下降, 其靶向的 *SLC39A6* 参与癌细胞转移过程^[26]; 在人结肠直肠癌细胞中, miR-192 通过靶向

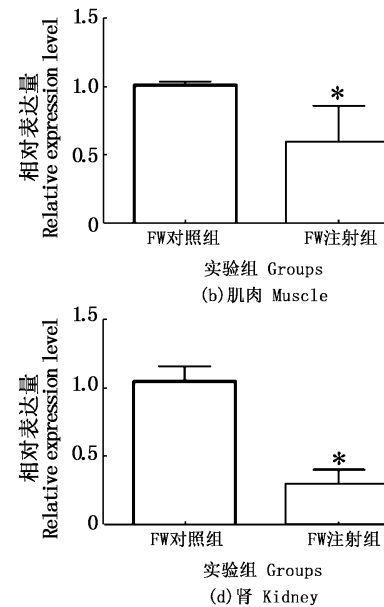


柱状图上方“*”代表差异显著($P < 0.05$)。

“*” above the histogram shows significant difference ($P < 0.05$).

图6 双荧光素酶活性检测

Fig. 6 Detection of dual luciferase activity



柱状图上方“*”代表差异显著($P < 0.05$)。

“*” above the histogram shows significant difference ($P < 0.05$).

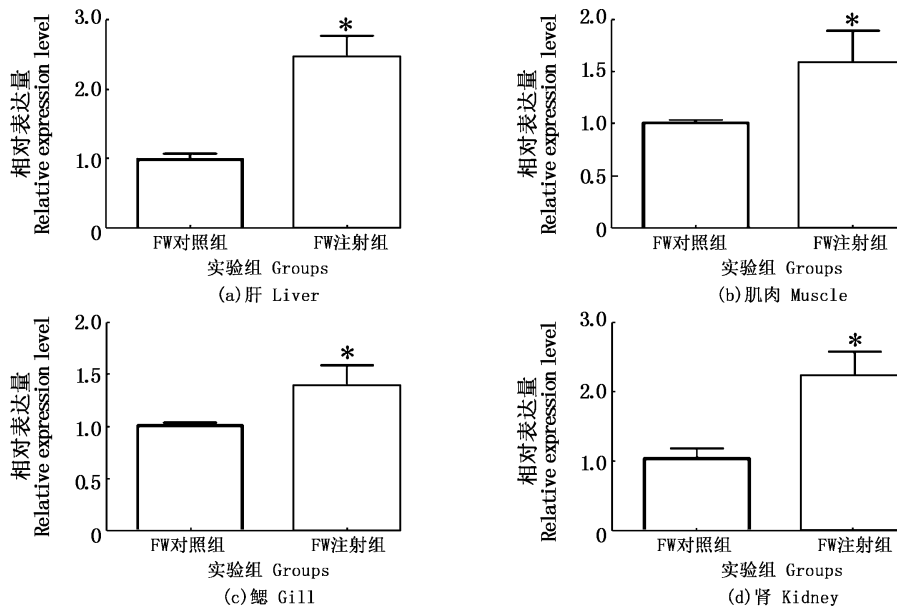
图7 体内注射 miRNA 抑制剂实验中 miR-192 的表达

Fig. 7 Expression of miR-192 *in vivo* injection of miRNA antagonist

C-X-C 基序趋化因子配体 2 基因 (C-X-C chemokines 2, *CXCL2*) 抑制癌细胞迁移^[27]; 在水稻中, miR-192 负调控 ATP 结合蛋白 (ATP-binding cassette transporter, *ABC*) 基因参与对金属胁迫的应答过程^[28]。miR-192 在尼罗罗非鱼的肾、肝、胃肠、肌肉和鳃组织中均有表达, 而碱度胁迫下在鳃组织中的表达随时间显著下调。

对 miR-192 预测靶基因的 KEGG 通路富集分析发现,miR-192 的靶基因与多个重要的信号传导 (foxO signaling pathway、wnt signaling pathway 等)、氨基酸代谢 (lysine degradation 等)、抗生素的生物合成 (biosynthesis of antibiotics)、内质网中的蛋白质加工 (protein processing in endoplasmic

reticulum) 等通路相关联。上述通路都在罗非鱼适宜碱度胁迫过程中起到重要作用^[8],如参与逆境响应、生物损伤修复等。综上说明 miR-192 参与了罗非鱼应答及适应碱度胁迫的过程,也暗示了其可能的作用。



柱状图上方“*”代表差异显著($P < 0.05$)。

“*” above the histogram shows significant difference ($P < 0.05$).

图8 体内注射 miRNA 抑制剂实验中 *SLC16A7* 的表达

Fig. 8 Expression of *SLC16A7* in vivo injection of miRNA antagonist

本研究筛选了靶基因 *SLC16A7* 并进行深入研究。通过实时荧光定量技术发现在碱度胁迫下 miR-192 显著下调,同时 *SLC16A7* 的表达显著上调。双荧光素酶报告实验发现,miR-192 会与 *SLC16A7* 的 3' UTR 区域结合,降低相应荧光表达。体内注射 miR-192 抑制剂后,罗非鱼多个组织中 miR-192 的表达显著下调,同时 *SLC16A7* 显著上调。结果说明,*SLC16A7* 是 miR-192 直接调控的靶基因,即 miR-192 通过与 *SLC16A7* 的 mRNA 3' UTR 区域结合,对其进行转录后水平调控。

溶质转运蛋白 16 家族 (solute carriers family 16, *SLC16*) 是细胞膜 (含胞内膜) 上最重要的膜转运蛋白家族之一,它参与了细胞间的物质运输和能量传递等重要生理活动^[29],其中 *SLC16A1*、*SLC16A3*、*SLC16A7* 和 *SLC16A8* 在人体内的主要作用是转运乳酸盐、丙酮酸和酮体^[30]。例如,当

氧气供应不足、糖酵解受到刺激时,细胞内产生大量乳酸,*SLC16A1* 和 *SLC16A3* 会参与酸碱调控并将乳酸代谢出细胞^[31]。在高盐碱度环境下,生物体内 pH 会发生变动,耗氧率升高^[32],细胞内可能会聚集乳酸代谢产物^[33]。推测 *SLC16A7* 可能通过调节乳酸代谢和细胞内 pH 而参与罗非鱼适应碱度胁迫的过程。

参考文献:

- [1] 刘永新,方辉,来琦芳,等. 我国盐碱水渔业现状与发展对策[J]. 中国工程科学, 2016, 18(3): 74-78.
LIU Y X, FANG H, LAI Q F, et al. The current state and development strategy for China's saline-alkaline fisheries [J]. Engineering Science, 2016, 18(3): 74-78.
- [2] 雷衍之,董双林,沈成钢. 碳酸盐碱度对鱼类毒性作用的研究[J]. 水产学报, 1985, 9(2): 171-183.
LEI Y Z, DONG S L, SHEN C G. Study on the toxicity of carbonate-alkaline to fishes [J]. Journal of Fisheries of

- China, 1985, 9(2): 171-183.
- [3] 章征忠, 张兆琪, 董双林, 等. pH、盐度、碱度对淡水养殖种类影响的研究进展[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 95-98.
ZHANG Z Z, ZHANG Z Q, DONG S L, et al. Advance in research on the effects of pH, salinity and alkalinity on freshwater cultured species[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1999, 6(4): 95-98.
- [4] 王萍, 刘济源, 么宗利, 等. 水生动物盐碱适应生理学研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2015, 12(15): 44-47.
WANG P, LIU J Y, YAO Z L, et al. Research advances in saline-alkali adaptation physiology of aquatic animals[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2015, 12(15): 44-47.
- [5] 么宗利, 应成琦, 周凯, 等. 碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾基因的差异表达[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 1-12.
YAO Z L, YING C Q, ZHOU K, et al. Gene expression profiles of *Litopenaeus vannamei* in response to carbonate alkalinity stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 1-12.
- [6] YAO Z L, LAI Q F, ZHOU K, et al. Developmental biology of medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to alkalinity stress[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2010, 26(3): 397-402.
- [7] 孙龙仪, 王云祥, 李秀梅. 碱度毒性和防治措施的探讨[J]. 天津水产, 1997(1): 34-35.
SUN L Y, WANG Y X, LI X M. Discussion on alkalinity toxicity and control measures[J]. Tianjin Fisheries, 1997(1): 34-35.
- [8] ZHAO Y, ZHANG C S, ZHOU H T, et al. Transcriptome changes for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to alkalinity stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2020, 33: 100651.
- [9] 涂翰卿. 碳酸盐碱度胁迫下尼罗罗非鱼氨代谢途径与Rh蛋白氨转运作用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
TU H Q. Ammonia metabolism pathway and ammonia transport of Rh proteins of *Oreochromis niloticus* under the stress of carbonate alkalinity[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [10] 王燕, 赵金良, 吴俊伟, 等. 碱度胁迫对尼罗罗非鱼鳃离子细胞形态以及鳃、肾和肠中 HCO_3^- 转运因子的影响[J]. 动物学杂志, 2016, 51(6): 1027-1037.
WANG Y, ZHAO J L, WU J W, et al. Effects of alkalinity on morphology of Gill Ionocytes and HCO_3^- transporters in gill, kidney and intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Chinese Journal of Zoology, 2016, 51(6): 1027-1037.
- [11] 王燕, 赵金良, 赵岩, 等. 碱度对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶活性的影响[J]. 生态科学, 2017, 36(4): 12-20.
WANG Y, ZHAO J L, ZHAO Y, et al. Influence of alkalinity on serum osmolality, ion concentration and ion transport enzymes activity of *Oreochromis niloticus* [J]. Ecological Science, 2017, 36(4): 12-20.
- [12] LAU N C, LIM L P, WEINSTEIN E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 2001, 294(5543): 858-862.
- [13] REINHART B J, WEINSTEIN E G, RHOADES M W, et al. MicroRNAs in plants[J]. Genes & Development, 2002, 16(13): 1616-1626.
- [14] HER G M, HSU C C, HONG J R, et al. Overexpression of gankyrin induces liver steatosis in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2011, 1811(9): 536-548.
- [15] MENNIGEN J A, PANSERAT S, LARQUIER M, et al. Postprandial regulation of hepatic microRNAs predicted to target the insulin pathway in rainbow trout[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38604.
- [16] 王维, 张玉娟, 陈洁, 等. 植物逆境胁迫相关 miRNA 研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(1): 1-10.
WANG W, ZHANG Y J, CHEN J, et al. Research progress of MicroRNAs in plant stress responses[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(1): 1-10.
- [17] ZHAO B T, GE L F, LIANG R Q, et al. Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor[J]. BMC Molecular Biology, 2009, 10(1): 29.
- [18] LI H Y, DONG Y Y, YIN H L, et al. Characterization of the stress associated microRNAs in Glycine max by deep sequencing[J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 170.
- [19] ZHOU X F, WANG G D, SUTOH K, et al. Identification of cold-inducible microRNAs in plants by transcriptome analysis [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 2008, 1779(11): 780-788.
- [20] ZHAO B T, LIANG R Q, GE L F, et al. Identification of drought-induced microRNAs in rice [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 354(2): 585-590.
- [21] ZHAO Y, ZHU C D, YAN B, et al. miRNA-directed regulation of VEGF in tilapia under hypoxia condition [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 454(1): 183-188.
- [22] YAN B, GUO J T, ZHAO L H, et al. MiR-30c: a novel regulator of salt tolerance in tilapia [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 425(2): 315-320.
- [23] YAN B, ZHU C D, GUO J T, et al. MiR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*) through the modulation of IGF-1 gene expression [J]. Journal of Experimental Biology, 2013, 216(7): 1265-1269.

- [24] ZHAO Y, WU J W, WANG Y, et al. Role of miR-21 in alkalinity stress tolerance in tilapia [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 471(1): 26-33.
- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] LIAN J W, JING Y, DONG Q Z, et al. miR-192, a prognostic indicator, targets the SLC39A6/SNAIL pathway to reduce tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2672-2683.
- [27] 郑敏. miR-192 靶向 CXCL2 基因对结肠癌细胞侵袭迁移能力的抑制作用[D]. 唐山: 华北理工大学, 2017.
- ZHENG M. miR-192 targets C-X-C motif chemokine ligand 2 and inhibits invasion and migration in human colorectal cancer [D]. Tangshan: North China University of Science and Technology, 2017.
- [28] 刘海丽. miR192、miR166 及其靶基因 HD-Zip 对水稻镉胁迫应答的功能研究[D]. 杭州: 中国计量学院, 2013.
- LIU H L. Functional analysis on cadmium response of miR192、miR166 and it's target HD-Zip in rice (*Oryza sativa*) [D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2013.
- [29] MITCHELL P. Translocations through natural membranes [M]//NORD F F. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. New York; John Wiley & Sons, Inc., 1967: 33-87.
- [30] 王月, 徐冰红, 刘虎, 等. 溶质转运蛋白超家族的功能及结构研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(24): 4775-4783, 4793.
- WANG Y, XU B H, LIU H, et al. Research progress on the function and structure of solute carrier superfamily transporters [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2017, 17(24): 4775-4783, 4793.
- [31] HALESTRAP A P. The SLC16 gene family - Structure, role and regulation in health and disease[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 34(2/3): 337-349.
- [32] ZHANG P D, ZHANG X M, LI J, et al. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) [J]. *Aquaculture*, 2006, 256(1/4): 579-587.
- [33] 张桂芝. 单羧酸转运蛋白 *MCT1* 基因反义表达重组载体转染人肺腺癌细胞及其生物学效应的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2001.
- ZHANG G Z. Study on Monocarboxylate transporter-1 gene anti-sense reconstructed vector transfection into lung adenocarcinoma A549 cells and its biological affects [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2001.

Expression of miR-192 in Nile tilapia in response to alkalinity stress and verification of target genes

ZHOU Haotian^{1,2}, ZHANG Chengshuo^{1,2}, WANG Yanling^{1,2}, ZHAO Jinliang^{1,2}, ZHAO Yan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to explore the role of miR-192 in response to carbonate alkalinity stress in Nile tilapia, real-time PCR, bioinformatics, dual-luciferase reporter assay and miRNA inhibition *in vivo* were used. The results were as follows: (1) The real-time PCR experiments showed that the expression of miR-192 was significantly down-regulated, while solute carriers *SLC16A7* was significantly up-regulated in gills of Nile tilapia after 6 hours acute alkalinity stress (6 g/L NaHCO₃) ($P < 0.05$); (2) Bioinformatics analysis revealed that *SLC16A7* might be the target gene of miR-192; (3) Dual-luciferase reporter assay showed that miR-192 directly regulated *SLC16A7* by targeting its 3' UTR; (4) Inhibition of miR-192 significantly increased the mRNA level of *SLC16A7* *in vivo* ($P < 0.05$). In conclusion, miR-192 was involved in the adaptation of Nile tilapia to alkalinity stress, and *SLC16A7* was the direct target gene of miR-192. This study provides a basis for exploring the mechanism of miRNAs in the response to alkalinity stress in Nile tilapia.

Key words: alkalinity stress; microRNA; Nile tilapia; miR-192; *SLC16A7*