

DOI: 10.12264/JFSC2021-0520

鱥 *miR-21* 的时空表达特征及短期饥饿胁迫下的适应性节律表达调控

朱鑫, 叶苏杭, 李源, 甘泉, 刘帅朋, 潘亚雄, 包凌晨, 陈圆华, 褚武英

长沙学院生物与环境工程学院水产动物营养与品质调控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410022

摘要: miRNAs 作为一类具有重要调控作用的非编码单链小分子 RNA, 对生物节律的调控发挥着重要的作用。为探究鱥(*Siniperca chuatsi*) *miR-21* 的时空表达特征以及短期饥饿对其昼夜节律表达的影响, 本研究利用实时荧光定量 PCR 分析了鱥胚胎不同发育阶段、幼鱼不同组织以及饥饿 5 d 后鱥白肌中 *miR-21* 的表达特征。结果显示, 在胚胎发育的早期可以检测到较高水平的 *miR-21*, 随着胚胎的发育其表达逐渐降低, 至原肠胚早期仅能检测到少量 *miR-21*; *miR-21* 在原肠胚后的表达有所提高, 但除尾芽期和心搏期外其余各阶段表达量无显著性差异; *miR-21* 在所检测的组织中均有表达, 其中在心、肠和红肌中具有较高水平的表达; 正常投喂时, 鱥白肌中 *miR-21* 的表达具有昼夜节律性, 为昼低夜高的节律性振荡; 饥饿 5 d 后, *miR-21* 的表达虽仍具有昼夜节律性, 但其中值、振荡幅度、峰值相位等都受到了明显影响; 靶基因预测分析显示 *Arntl2* mRNA 的 3'UTR 序列有 *miR-21* 结合的靶位点, 且荧光定量 PCR 的结果显示 *Arntl2* 的表达趋势在饥饿 5 d 后与 *miR-21* 的表达趋势相反。结果表明, *miR-21* 呈母源性表达, 在神经胚后表达开始上升说明 *miR-21* 可能参与调控神经胚后的器官形成; *miR-21* 在不同组织中的表达无明显组织特异性, 但在心、肠和红肌组织中可能有重要功能; 饥饿胁迫能够影响 *miR-21* 在鱥白肌的节律性表达, 并且 *miR-21* 可能通过调控昼夜节律基因 *Arntl2* 参与鱥的节律性调控从而影响鱥肌肉的生长和逆境胁迫下的生理功能。

关键词: 鱥; *miR-21*; 表达特征; 昼夜节律; 饥饿

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)05-0665-08

小 RNA(microRNA, miRNA)是真核生物中小分子非编码 RNA, 长度为 21~25 nt, 主要存在于基因组的非编码区。miRNA 能够通过碱基互补配对与靶 mRNA 的 3'UTR 特异性结合, 使靶 mRNA 进行降解或抑制靶 mRNA 的翻译, 从而调控靶基因的表达, 进而影响生物的生理功能^[1-2]。在鱼类的研究中, miRNAs 对生长发育和繁殖、糖脂的代谢、组织再生、免疫等都有着重要的作用^[3-4]。在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的变态阶段, 一些 miRNAs 呈高度表达, 表明它们可能是该阶段所必须的 miRNAs^[5]。Hang 等^[6]在尼罗罗非鱼

(*Oreochromis niloticus*)的研究中发现, *miR-1*、*miR-206*、*miR-133a* 可能介导骨骼肌的增殖和分化。*miR-21* 位于染色体 17q23.2 区域与编码液泡膜蛋白(Transmembrane Protein 19, TMEM19)的基因重叠, 在脊椎动物中高度保守^[7]。*miR-21* 在生长发育等多种生物学功能中起到至关重要的作用^[8], 目前关于其功能的研究主要聚焦于其对肿瘤细胞的增殖作用。Chu 等^[9]在鱥(*Siniperca chuatsi*)肌肉鉴定了 33 个表达高丰度的 miRNA, *miR-21* 就属于其中之一, 但 *miR-21* 在鱥的表达特征及其对肌肉的调控功能尚不明确。

收稿日期: 2021-10-29; 修订日期: 2021-12-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32002370); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40629); 湖南省教育厅创新平台开放基金项目(20K014).

作者简介: 朱鑫(1989—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为鱼类肌肉品质调控. E-mail: xinzh1219@163.com;
并列第一作者: 叶苏杭.

通信作者: 褚武英, 教授, 研究方向为水产动物营养及品质调控. E-mail: chuwuying18@163.com

生物按照昼夜周期性进行活动现象称为生物节律或生物钟，生物钟是自然进化过程中自然选择的作用下，机体为了适应环境而获得的，它使机体生理、行为呈现 24 h 的节律，且受到光照、温度、饮食等外界因子影响。人类和一切生物几乎都受到生物节律的控制与影响。在哺乳动物中，在动物的肝脏存在一个昼夜代谢组，它受昼夜节律时钟本身的转录机制控制^[10]。自昼夜节律的分子调控机制发现以来，严格的转录调控和转录后调控被认为是校正昼夜节律的重要组成部分。miRNAs 作为一类具有重要调控作用的非编码单链小分子 RNA，其作用类似于分子控制开关，参与基因转录后的调控，对生物节律的调控也发挥着重要的作用。Yang 等^[11]在果蝇(*Drosophila*)的研究表明，对于某些蛋白水平的日常变化受到 miRNAs 介导的转录后调节。miRNAs 是昼夜节律计时过程的关键调节因子，其中 *miR-219* 和 *miR-132* 还能影响细胞的兴奋性，从而调节时钟周期性^[12]。Nagel 等^[13]发现 *miR-192* 和 *miR-194* 能够有效调节节律基因 *Period*，其外源性过度表达导致昼夜节律周期变化。Kojima 等^[14]在小鼠 (*Mus musculus*) 的研究中发现，*miR-122* 能够调节 *Nocturnin* 的表达来参与小鼠肝脏近日节律的调节。Wu 等^[15]的研究发现，在金鱼(*Carassius auratus*) 肌肉中检测出 *miR-16*、*miR-23a*、*miR-29* 等 15 种 miRNA 的表达表现出昼夜节律性。目前关于 miRNAs 在鳜及其他鱼类的节律性调控的研究还较少，因此，miRNAs 在鱼类节律性方面的具体功能还尚未明确。*miR-21* 在鳜中是否存在昼夜节律性表达以及是否参与的节律性调控也尚未知。

鳜又名桂花鱼，是我国东南部地区的主要淡水鱼之一。鳜肉质丰腴细腻，味道鲜美可口，营养丰富，无小刺，深受人们的喜爱，是市场中紧俏的水产品之一^[16]。对于鱼类 miRNA 的研究表明，miRNA 对鱼类的发育、生理功能以及疾病防御等方面都发挥着重要的作用。本研究对 *miR-21* 在鳜胚胎发育不同阶段和不同组织的表达谱进行了分析，并对 *miR-21* 的节律性表达及饥饿对其表达的影响进行初步探究，为后续研究其生物学功能以及利用调控生物节律提高养殖鱼类生长奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

繁殖用鳜亲鱼来自湖南省水产科学研究所鳜原种场，基因组织表达谱及节律性表达研究实验用鱼来自实验室长期合作的鳜养殖基地。

1.2 实验方法

1.2.1 鳜不同发育阶段胚胎的收集 鳜的人工繁殖与胚胎孵化技术参照刘希良等^[17]的方法。待胚胎发育至 2 细胞、32 细胞、囊胚早期、囊胚晚期、原肠胚早期、原肠胚晚期、神经胚期、视泡期、尾芽期、肌肉效应期、心搏期、出膜期，分别取 30~40 枚胚胎保存于装有 1 mL Trizol 的离心管中，然后用液氮快速冷冻，最后保存于 -80 °C 超低温冰箱内。

1.2.2 鳜短期饥饿处理及组织样品的收集 挑选健康无病、体重相近的鳜 114 尾，体重(145±12) g。所有鳜采用 12 h 光照，12 h 黑暗的 LD 光制进行 30 d 的驯养实验。随机挑选 6 尾鳜，在冰上分别取其心、肝、脾、肠、肾、红肌、白肌，后保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。将剩余的 108 尾鱼随机分为正常投喂组和饥饿组，每组 54 尾鱼。正常投喂组的采样时间在一昼夜的 9 个时间点，每隔 3 h 采集一次，具有的取样时间和对应区时与刘晶洁等^[18]实验设计一致。每个时间点随机挑选 6 尾鱼，分别取适量背部白肌组织，用液氮快速冷冻，随后保存于 -80 °C 超低温冰箱内备用。短期饥饿组鳜经饥饿 5 d 处理，处理方式参照刘晶洁等^[18]实验方法，采样时间点安排及方法与正常投喂组一致。

1.2.3 RNA 提取及 cDNA 合成 胚胎样品和组织样品的总 RNA 使用 Trizol 法提取(RNAiso Plus, 宝日生物, 中国)，再用超微量分光光度计(Nano-Photometer-NP80, implen, 德国)结合琼脂糖凝胶电泳测定提取 RNA 的浓度和纯度。cDNA 合成使用 One Step PrimeScript® miRNA cDNA Synthesis Kit (Perfect Real Time)试剂盒。反应总体积为 20 μL。Poly(A)加尾反应与 cDNA 合成反应同步进行，1 h 内即可完成 miRNA 1 st Strand cDNA 合成。反应条件：37 °C, 60 min (Poly(A)加尾和反转录反应); 85 °C, 5 s (酶的失活反应)。

1.2.4 引物设计与合成 根据本实验室已有鱣 miRNA 数据库^[9]序列设计 miR-21 荧光定量 PCR 的引物, 以 *RPL13* 基因作为荧光定量的内参基因^[9,19]。引物利用 Primer 5.0 软件进行设计(表 1), 设计好的引物序列由铂尚生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.5 荧光定量 PCR 在荧光定量 PCR 仪上进行反应, 反应总体系为 12.5 μL, 包括 SYBR Premix Ex Taq™ II 6 μL, 反转录合成的 cDNA 模板 1 μL, 无酶水 4.5 μL, 上游引物和下游引物各 0.5 μL。反应按 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火, 20 s 延伸, 反应 39 个循环。每组反应 3 个技术重复。

1.2.6 数据处理 荧光定量 PCR 结果利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因在不同样本之间的相对表达量^[20]。相对表达量数值经 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析与显著性检验, 基因相对表达量表示为平均值±标准误(mean ± SE), 当显著性 $P<0.05$ 认为两组数据之间差异显著^[21]。

miR-21 在鱣肌肉的一昼夜的表达数值在进行显著性分析后, 采用 MATLAB 软件对定量数据进行拟合方程式为 $f(t)=M+A \cos(t/p_i/12-\varphi)$ 的余弦函数。方程字母分别代表: 给定时间内基因表达水平 $f(t)$; 平均值 M ; 时间 t ; 振荡振幅 A ; 峰值相位 φ , φ 是最高振幅所在的时间点所换算出的角度。当每个时间点数值显著性差异 $P<0.05$, MATLAB 输出 $P<0.3$ 时, 则表示该基因具有昼夜节律性^[18,22]。

表 1 荧光定量引物

Tab. 1 The Primers for RT-qPCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	退火温度/°C annealing temperature	扩增效率/% amplification efficiency
<i>miR-21</i> -F	CGTAGCTTATCAG ACTGGTGTG	58	98.2
<i>RPL13</i> -RT-F1	CACAAGAAGGAG AAGGCTCGGGT	58	96.7
<i>RPL13</i> -RT-R1	TTGGCTCTCTTG GCACGGAT		

2 结果与分析

2.1 *miR-21* 在鱣胚胎不同发育阶段的表达分析

miR-21 在鱣胚胎不同发育阶段的表达见图 1。

miR-21 的表达在胚胎发育早期处于较高水平, 随着胚胎不断发育, 在 2 细胞期至原肠胚期的表达逐渐降低, 在原肠胚早期仅能检测到少量的 *miR-21* 表达。*miR-21* 的表达在原肠胚期后开始上升, 并在神经胚期达到较高水平, 但除尾芽期和心搏期外, 神经胚后其余各阶段表达量无显著性差异。

2.2 *miR-21* 在鱣不同组织中的表达分析

miR-21 在鱣不同组织中的表达见图 2。*miR-21*

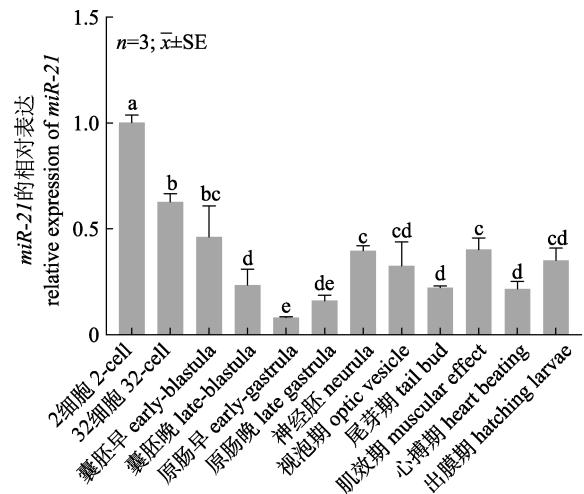


图 1 鲢胚胎不同发育阶段 *miR-21* 相对表达丰度
不同字母表示不同发育阶段之间存在显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 1 Relative expression of *miR-21* in different embryonic stages of *Siniperca chuatsi*

Values with the same letters indicated there was no significant difference at different developmental stages ($P<0.05$).

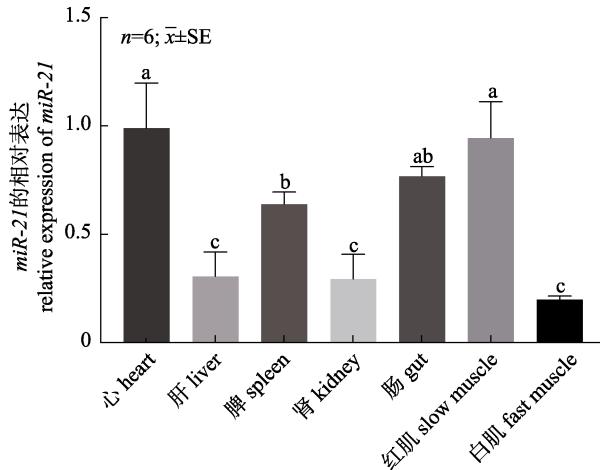


图 2 *miR-21* 在鱣不同组织中的相对表达丰度
不同字母表示不同组织之间存在显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 2 Relative expression of *miR-21* in different tissues of *Siniperca chuatsi*

Values with the same letters indicated there was no significant difference in different tissues ($P<0.05$).

在检测的所有组织中都有表达, 表明 *miR-21* 在鱥中无组织特异性表达。在鱥的心脏、肠、红肌组织中具有较高水平的表达, 在肝脏、肾脏、白肌中的表达水平相对较低且无显著性差异。

2.3 正常投喂和饥饿 5 d 后鱥肌肉中 *miR-21* 的昼夜节律性表达分析

miR-21 在鱥白肌组织一昼夜的表达见图 3。在正常投喂下, *miR-21* 的表达具有昼夜节律性 ($P=0.12$, 表 2), 其表达趋势为光周期降低, 暗周期升高, 呈现出昼低夜高的节律性振荡, 其中 *miR-21* 的表达到达峰值相位的时间为 ZT 1.55 (图 3A)。

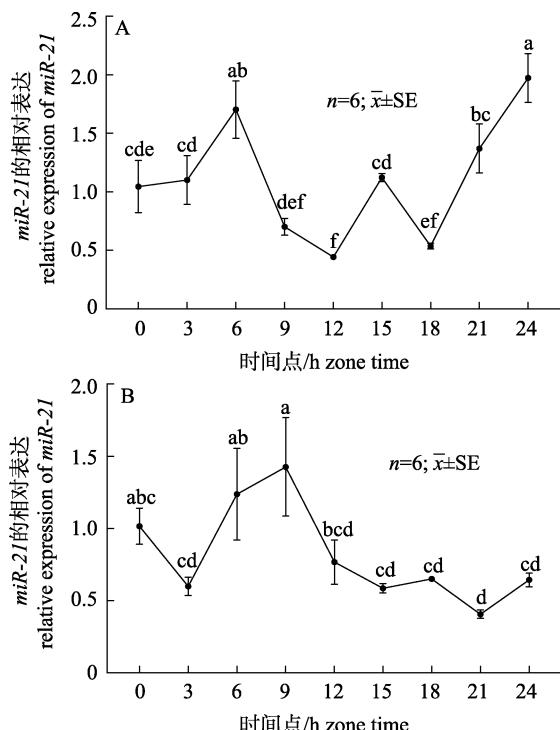


图 3 正常投喂(A)和饥饿 5 d 后(B)鱥白肌中 *miR-21* 的表达
不同字母表示两组数据之间存在显著差异性; X 轴中 0~12 为
光照阶段, 12~24 为黑暗阶段。

Fig. 3 Expression of *miR-21* in *Siniperca chuatsi* muscle with normal feeding (A) and fasting for 5 d (B). Different letters indicate significant differences between each time point ($P<0.05$); in the X axis, 0–12 is the illumination stage, and 12–24 is the dark stage.

饥饿 5 d 后, *miR-21* 的表达仍具有节律性 ($P=0.04$), 但其表达趋势为光周期升高, 暗周期降低。峰值相位时间为 ZT 7.43, 相比于正常情况下右移(延缓) 5.88 h, 且振幅和中值均减小(图 3B)。

这一结果说明在饥饿胁迫下 *miR-21* 在鱥白肌组织中的表达呈现适应性节律表达。

表 2 鳥 *miR-21* 表达的节律性参数
Tab. 2 Rhythmic parameters of *miR-21* expression in *Siniperca chuatsi*

类别 category	振幅 amplitude	中值 mesor	峰值相位 acrophase	P
正常投喂 normal feeding	0.43	1.07	0.41	0.12
饥饿 5 d fasting for 5 days	0.35	0.83	1.95	0.04

2.4 *miR-21* 调控节律性基因的靶位点预测

通过鱥的基因组和转录组数据库获得核心生物钟基因 Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like 2 (*Arntl2*)、*Arntl1*、Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput a (*Clocka*)、*Clockb*、Cryptochrome Circadian Regulator 1Ab (*Cry1Ab*)、*Cry2*、Neuronal PAS Domain Protein 2 (*Npas2*)、Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 (*Nrl1d1*)、*Nrl1d2b*、Period Circadian Regulator 2 (*Per2*)、*Per3*、RAR Related Orphan Receptor A (*Rora*)、Timeless Circadian Regulator (*Timeless*)和 cryptochrome DASH (*Cry-dash*) mRNA 的 3'UTR 序列, 然后根据 miRNA 种子序列的靶向互补原则进行配对比较。结果发现在鱥 *Arntl2* mRNA 的 3'UTR 序列有 *miR-21* 结合的靶位点(图 4)。进一步利用荧光定量 PCR 检测 *Arntl2* 在正常投喂以及饥饿 5 d 鳥白肌的表达, 结果发现 *Arntl2* 表达模式呈现光周期降低, 暗周期升高, 其表达在正常投喂时的表达不具有昼夜节律性(表 3, 图 5A)。而饥饿 5 d 后 *Arntl2* 的表达具有昼夜节律性, 趋势与饥饿 5 d 后 *miR-21* 的表达相反(表 3, 图 5B)。因此, 推测在鱥中 *miR-21* 可能通过靶向调控 *Arntl2* 基因的表达, 从而影响鱥饥饿状态下白肌生长或生理功能的节律性。

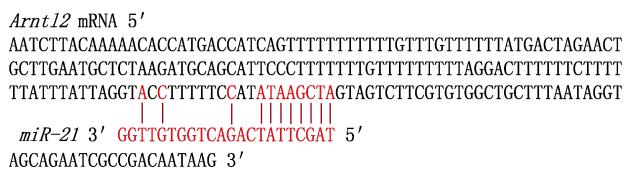


图 4 *miR-21* 靶向 *Arntl2* mRNA 3'UTR 位点预测

Fig. 4 Prediction of 3'UTR site of *Arntl2* mRNA targeted by *miR-21*

表3 鲢 *Arntl2* 表达的节律性参数Tab. 3 Rhythmic parameters of *Arntl2* expression in *Siniperca chuatsi*

类别 category	振幅 amplitude	中值 mesor	峰值相位 acrophase	P
正常投喂 normal feeding	0.08	0.66	1.02	0.75
饥饿 5 d fasting for 5 d	0.36	1.15	4.45	0.27

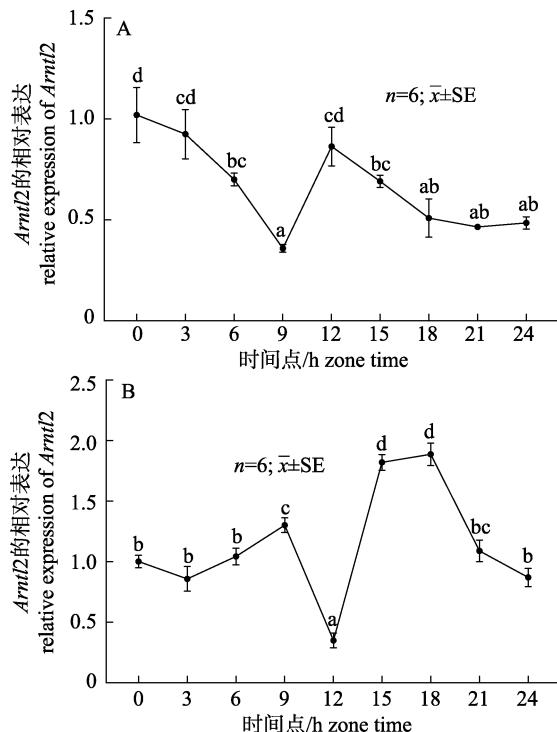


图5 正常投喂(A)和饥饿 5 d 后(B)鱥白肌中 *Arntl2* 的表达
不同字母表示两组数据之间存在显著差异性; X轴中 0~12 为
光照阶段, 12~24 为黑暗阶段。

Fig. 5 Expression of *Arntl2* in *Siniperca chuatsi* muscle with normal feeding (A) and fasting for 5 days (B)
Different letters indicate significant differences between each time point ($P<0.05$); in the X axis, 0–12 is the illumination stage, and 12–24 is the dark stage.

3 讨论

miRNAs 在哺乳动物生殖细胞、胚胎发育及早期胚胎发育均起到一定的调节作用^[23]。多项研究表明, miRNAs 对动物胚胎发育过程中有着不可忽视的作用。在小鼠(*Mus musculus*)胚胎发育过程中, miRNAs 的转录与降解处于动态平衡, 并且调控胚胎发育阶段的 miRNAs 的表达大量增加, 而不参与调控胚胎发育阶段的 miRNAs 表达则减少^[24,25]。有研究发现, *miR-430* 在斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、鳕(*Eleginops gracilis*)

胚胎发育的囊胚期呈高表达水平, 能够促进母源 mRNA 脱腺苷化和母源 mRNA 的清除^[26–29]。Liu 等^[29]在斑马鱼中发现, *miR-206* 在其母源基因与合子基因均有表达, 并在原肠胚形成过程中对控制细胞运动起至关重要的作用。本研究检测分析 *miR-21* 在鱥胚胎的 2 细胞期、32 细胞期、囊胚早期、囊胚晚期、原肠胚早期、原肠胚晚期、神经胚期、视泡期、尾芽期、肌肉效应期、血液循环期、出膜期等 12 个发育阶段的表达情况。结果表明, *miR-21* 的表达在胚胎不同发育阶段具有显著差异性, 在 2 细胞时期的表达水平在胚胎发育过程中最高, 说明 *miR-21* 具有母源性, 并在胚胎早期发挥抑制靶基因的功能。随着胚胎的发育进程, 母源性产物逐渐消耗, *miR-21* 在原肠胚期降至最低水平, 而神经胚期后 *miR-21* 的表达水平有一个显著上升的过程, 表明 *miR-21* 可能对鱥神经胚期的器官形成等过程有一定的调节功能。

有研究表明, *miR-21* 普遍表达于哺乳动物的心、脾、小肠、结肠等组织器官中^[30]。本研究检测分析了鱥心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肠、红肌、白肌等组织器官中 *miR-21* 的表达水平。结果显示, *miR-21* 在鱥不同组织中均有表达, 其中在心脏组织呈高水平表达。Tu 等^[31]和 Cheng 等^[32]研究表明, *miR-21* 表达上调能够介导靶基因 PTEN 和 PDCD4 从而对心肌细胞发挥保护作用。本研究中, 鳥心脏内 *miR-21* 表达水平较高, 所以我们推测 *miR-21* 对鱥的心肌细胞的生长发育也有着类似的作用。此外 *miR-21* 在肠和红肌组织中也有较高水平表达, 表明 *miR-21* 在该类组织中也存在着重要调控作用, 但其具体参与的调控功能需要进一步研究。

刘佩^[33]在鱥(*Siniperca chuatsi*)红肌和白肌组织中发现 *miR-21* 具有高水平表达, 但其在鱥中具体的功能暂不明确。本研究采用荧光定量 PCR 检测正常投喂组 24 h 内鱥白肌中 *miR-21* 的表达, 发现 *miR-21* 在鱥白肌的表达具有昼夜节律性, 表达趋势为光周期降低、暗周期升高, 可能参与鱥的生物节律。为进一步了解 *miR-21* 在鱥中的生理功能, 我们对 *miR-21* 的靶基因进行预测分析, 结果发现在鱥 *Arntl2* mRNA 的 3'UTR 序列有 *miR-21*

结合的靶位点。*Anrtl2* 是一种转录因子，能够参与生物体的昼夜节律。*Anrtl2* 蛋白包括 bHLH、PAS1、PAS2 和 PAC 四个保守结构域^[34]。bHLH 家族蛋白在神经系统和肌肉的发育过程中起到重要的作用^[35]。以此预测 *miR-21* 可能通过调控昼夜节律基因 *Anrtl2* 的表达，从而调控鱥肌肉的发育过程，进而影响鱥的生长和发育。饥饿是鱼类在自然水域生态系统中经常面临的一种生理胁迫现象，是影响鱼类生长发育和生存的重要环境因素^[36]。鱼受饥饿胁迫时，会引发一系列的生理反应用于应对饥饿，体内基因的表达也必然受到影响。饥饿还可以影响鱼的代谢、行为、组织结构、繁殖、酶活性等生理行为活动^[37]。本研究通过检测饥饿 5 d 后的鱥体内 *miR-21* 的表达量，发现饥饿后，鱥白肌中 *miR-21* 仍具有节律性，但其表达量下降，表达周期后移，说明在饥饿后，鱥体内原有的节律性已经受到影响而发生变化。汪建华等^[38]在锦鲫(*Carassius auratus*)的研究也发现饥饿能够影响基因表达的节律性。结合 *miR-21* 的靶基因预测以及荧光定量 PCR 结果，表明 *miR-21* 可能通过介导 *Anrtl2* 的表达来应对饥饿胁迫下的生理节律，进而对肌肉的生理功能或生长发育起到调控作用。

本研究对鱥不同发育阶段的胚胎、不同的组织器官中 *miR-21* 的表达以及正常投喂与饥饿 5 d 的鱥白肌中的 *miR-21* 的节律性表达进行了初步研究，结果表明，*miR-21* 可能对神经胚期之后的器官形成以及心脏、红肌和肠等组织器官有重要调节功能。鱥 *miR-21* 在白肌中的表达具有明显的昼夜节律性，且参与饥饿胁迫下的动态调节过程。通过靶基因的预测以及荧光定量 PCR 结果，我们推测 *miR-21* 可能通过调控 *Anrtl2* 的表达来调节鱥白肌的生长发育或生理功能。本研究对 *miR-21* 在鱼类中的时空表达及短期饥饿胁迫下的节律性表达特征进行分析，为后续研究其在鱼类中的生物学功能奠定基础。

参考文献：

- [1] Makeyev E V, Maniatis T. Multilevel regulation of gene expression by microRNAs[J]. *Science*, 2008, 319(5871): 1789-1790.
- [2] van Rooij E, Liu N, Olson E N. microRNAs flex their muscles[J]. *Trends in Genetics*, 2008, 24(4): 159-166.
- [3] Li F J, Li M S, Fu C P, et al. Research progress of miRNA in aquatic animals[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(6): 976-992. [李法君, 李明爽, 付春鹏, 等. microRNA 在水产动物中的研究进展[J]. 水产学报, 2016, 40(6): 976-992.]
- [4] Lu R H, Wang J L, Sun J J, et al. Current research progress in fish miRNAs[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(2): 231-236. [卢荣华, 王俊丽, 孙君君, 等. 鱼类 miRNAs 研究新进展[J]. 水产科学, 2017, 36(2): 231-236.]
- [5] Fu Y S, Shi Z Y, Wu M L, et al. Identification and differential expression of microRNAs during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(7): e22957.
- [6] Huang C W, Li Y H, Hu S Y, et al. Differential expression patterns of growth-related microRNAs in the skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Animal Science*, 2012, 90(12): 4266-4279.
- [7] Fujita S, Ito T, Mizutani T, et al. miR-21 gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 378(3): 492-504.
- [8] Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease[J]. *RNA Biology*, 2011, 8(5): 706-713.
- [9] Chu W Y, Liu L S, Li Y L, et al. Systematic identification and differential expression profiling of microRNAs from white and red muscles of *Siniperca chuatsi*[J]. *Current Molecular Medicine*, 2013, 13(8): 1397-1407.
- [10] Eckel-Mahan K L, Patel V R, Mohney R P, et al. Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(14): 5541-5546.
- [11] Yang M C, Lee J E, Padgett R W, et al. Circadian regulation of a limited set of conserved microRNAs in *Drosophila*[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 83.
- [12] Cheng H Y M, Papp J W, Varlamova O, et al. microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment[J]. *Neuron*, 2007, 54(5): 813-829.
- [13] Nagel R, Clijsters L, Agami R. The miRNA-192/194 cluster regulates the Period gene family and the circadian clock[J]. *The FEBS Journal*, 2009, 276(19): 5447-5455.
- [14] Kojima S, Gatfield D, Esau C C, et al. microRNA-122 modulates the rhythmic expression profile of the circadian deadenylase Nocturnin in mouse liver[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(6): e11264.
- [15] Wu P, Shi J, Yang C Y, et al. Effects of short-term starvation on the rhythmic expression of microRNAs in skeletal muscle

- of goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Aquaculture Research, 2018, 49(2): 726-737.
- [16] Yan A S, Xiong C X, Qian J W, et al. A study on the rate of flesh content of mandarinfish and nutritonal quality of the flesh[J]. Journal Huazhong (Central China) Agricultural University, 1995, 14(1): 80-84. [严安生, 熊传喜, 钱健旺, 等. 鲤鱼含肉率及鱼肉营养价值的研究[J]. 华中农业大学学报, 1995, 14(1): 80-84.]
- [17] Liu X L, Bin S Y, Wang K Z, et al. Artificial propagation and embryonic development observation of mandarin fish[J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2013, 31(2): 100-106. [刘希良, 宾石玉, 王开卓, 等. 翘嘴鮊的人工繁殖与胚胎发育观察[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2013, 31(2): 100-106.]
- [18] Liu J J, Chu W Y, Zhu X, et al. Embryonic development characteristics and rhythmic expression analysis of ROR α gene under starvation in *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition), 2021, 39(5): 190-197. [刘晶洁, 褚武英, 朱鑫, 等. 鲤 ROR α 基因的胚胎发育特征及饥饿对其节律性表达影响分析[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2021, 39(5): 190-197.]
- [19] Li D, Wu P, He M F, et al. Screening of reference genes in *Siniperca chuatsi* for qRT-PCR analysis[J]. Life Science Research, 2016, 20(3): 214-217. [李迪, 吴萍, 何美凤, 等. qRT-PCR 分析鲤鱼内参基因的筛选[J]. 生命科学研究, 2016, 20(3): 214-217.]
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Nong X X, Zhao F L, Bin S Y, et al. cDNA cloning and vertical expression analysis of the myosin light chain 3(*MLC3*) gene in *Siniperca scherzeri*[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2011, 34(2): 79-83. [农小献, 赵发兰, 宾石玉, 等. 斑鱲轻链 3 基因(*MLC3*) cDNA 的克隆及纵向表达分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2011, 34(2): 79-83.]
- [22] Chen Y H, Li H H, Wang L X, et al. Effects of GSK4112 on circadian rhythmicity expression of Nr1d1 and Ulk1b in liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(2): 584-590. [陈圆华, 李虹辉, 王利香, 等. GSK4112 对尼罗罗非鱼肝脏 Nr1d1 和 Ulk1b 基因昼夜节律性表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(2): 584-590.]
- [23] Hua M M, Ru Y F, Shi H J. Regulatory role of microRNAs in mammalian gametogenesis and early embryonic development[J]. Chinese Journal of Reproduction and Contraception, 2017, 37(5): 412-417. [华敏敏, 茹彦飞, 施惠娟. miRNA 参与配子发生和早期胚胎发育调控的研究进展[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37(5): 412-417.]
- [24] Yang Y H, Bai W T, Zhang L, et al. Determination of microRNAs in mouse preimplantation embryos by microarray[J]. Developmental Dynamics: an Official Publication of the American Association of Anatomists, 2008, 237(9): 2315-2327.
- [25] McCallie B, Schoolcraft W B, Katz-Jaffe M G. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility[J]. Fertility and Sterility, 2010, 93(7): 2374-2382.
- [26] Giraldez A J, Mishima Y, Rihel J, et al. Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs[J]. Science, 2006, 312(5770): 75-79.
- [27] Tani S R, Kusakabe R, Naruse K, et al. Genomic organization and embryonic expression of miR-430 in medaka (*Oryzias latipes*): Insights into the post-transcriptional gene regulation in early development[J]. Gene, 2010, 449(1-2): 41-49.
- [28] Johansen S D, Karlsen B O, Furmanek T, et al. RNA deep sequencing of the Atlantic cod transcriptome[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2011, 6(1): 18-22.
- [29] Liu X L, Ning G Z, Meng A M, et al. microRNA-206 regulates cell movements during zebrafish gastrulation by targeting prickle1a and regulating c-Jun N-terminal kinase 2 phosphorylation[J]. Molecular and Cellular Biology, 2012, 32(14): 2934-2942.
- [30] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. Current Biology, 2002, 12(9): 735-739.
- [31] Tu Y F, Wan L, Fan Y H, et al. Ischemic postconditioning-mediated miRNA-21 protects against cardiac ischemia/reperfusion injury via PTEN/Akt pathway[J]. PLoS ONE, 2013, 8(10): e75872.
- [32] Cheng Y H, Zhu P, Yang J, et al. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4[J]. Cardiovascular Research, 2010, 87(3): 431-439.
- [33] Liu P. Rhythmic expression analysis of miRNA in *Siniperca chuatsi* muscle and liver[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2016. [刘佩. 翘嘴鮊肌肉及肝脏 miRNA 的节律性表达分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.]
- [34] Lebailly B, Langa F, Boitard C, et al. The circadian gene Arntl2 on distal mouse chromosome 6 controls thymocyte apoptosis[J]. Mammalian Genome, 2017, 28(1-2): 1-12.
- [35] Jones S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins[J]. Genome Biology, 2004, 5(6): 226.
- [36] Liu B, He Q G, Tang Y K, et al. Effects of starvation on growth, physiological and biochemical parameter of GIFT strain of Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(2): 230-237. [刘波, 何

- 庆国, 唐永凯, 等. 饥饿胁迫对吉富罗非鱼生长及生理生化指标的影响[J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 230-237.]
- [37] Xie X J, Deng L, Zhang B. Advances and studies on ecophysiological effects of starvation on fish [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1998, 22(2): 181-188. [谢小军, 邓利, 张波. 饥饿对鱼类生理生态学影响的研究进展[J]. 水生生物学报, 1998, 22(2): 181-188.]
- [38] Wang J H. Effects of short-term fasting on the rhythmic expression of clock-related genes in skeletal muscle and liver of *Carassius auratus*[D]. Guilin: Guangxi Normal University, 2016. [汪建华. 短期饥饿对锦鲤肌肉和肝脏中生物钟相关基因表达的影响[D]. 桂林: 广西师范大学, 2016.]

Temporal and spatial expression characteristics of *miR-21* and regulation of adaptive rhythm expression under short-term starvation stress in *Siniperca chuatsi*

ZHU Xin, YE Suhang, LI Yuan, GAN Quan, LIU Shuaipeng, PAN Yaxiong, BAO Lingsheng, CHEN Yuanhua, CHU Wuying

Hunan Provincial Key Laboratory of Nutrition and Quality Control of Aquatic Animals, Department of Biological and Environmental Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China

Abstract: miRNAs, a class of non-coding single-stranded small RNAs with regulatory roles, play an important part in the regulation of biological rhythms. In order to explore the spatio-temporal expression characteristics of *miR-21*, as well as the effects of fasting on its expression, real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression of *miR-21* in the embryos of different developmental stages and tissues of the Chinese perch *Siniperca chuatsi*, as well as the rhythmic expression after 5 d of fasting. The results showed that a high level of *miR-21* can be detected in the early stage of embryonic development, expression of *miR-21* decreases as the embryo develops, and only a small amount of *miR-21* could be detected in the early gastrula stage. The expression of *miR-21* increased after the gastrula stage, but there was no significant difference in the expression of *miR-21* after the neurula stage, except in the tail-bud and heart-beating stages. *miR-21* was expressed in all tested tissues, with high levels of expression in heart, intestine, and red muscle. Under normal feeding, *miR-21* expression in Chinese perch muscle showed a circadian rhythm: low in the day and high in the night. After 5 d of fasting, expression of *miR-21* was still in a circadian rhythm, but its median value, oscillation amplitude, and peak phase were significantly affected. Target gene prediction analysis showed that the 3'UTR sequence of *Arntl2* mRNA had *miR-21* binding sites. Taken together, results indicated that the expression of *miR-21* in the embryo was maternal and began to rise after the neurula stage, suggesting that *miR-21* plays an important role in embryonic organogenesis after this stage. The expression of *miR-21* was not tissue-specific, but it may play an important role in the growth and development of heart, intestine, and red muscle. Fasting stress could affect the circadian rhythm of *miR-21* in Chinese perch muscle, and *miR-21* might be involved in the regulation of the rhythm of the Chinese perch by regulating the circadian gene *Arntl2*, thus affecting muscle growth and physiological functions.

Key words: *Siniperca chuatsi*; *miR-21*; expression pattern; circadian rhythms; fasting

Corresponding author: CHU Wuying. E-mail: chuwuying18@163.com