

DOI: 10.12264/JFSC2021-0387

鲑降钙素对虹鳟鳞组织 lncRNA 表达的影响

王刘永¹, 周启苓¹, 马骞^{1,2}, 毛非凡¹, 杨二军¹, 陈刚^{1,2}

1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江), 广东 湛江 524025

摘要: 为探明鲑降钙素(salmon calcitonin, sCT)对鱼类骨组织钙代谢过程的调节机制, 对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)幼鱼进行 sCT 腹腔注射, 并在注射后 24 h 采集鳞组织进行转录组测序, 分析其中长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)表达水平的变化。结果显示, 注射 sCT 后的虹鳟鳞组织中共鉴定出 847 个差异表达的 lncRNA, 其中 247 个表达上调, 600 个表达下调。GO 注释结果显示, 差异表达 lncRNA 靶基因主要被注释到转录调控、运输、信号转导、膜、细胞质、金属离子结合和核苷酸结合等功能中。KEGG 通路富集结果显示, 差异表达 lncRNA 靶基因在硫胺素代谢通路、炎症介质对 TRP 通道调节、血小板活化、谷氨酸能突触、神经营养因子通路、ARVC 通路和 NF-kappa B 信号通路等通路中显著富集。利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)对随机选取的 6 个差异表达 lncRNA 的表达量进行验证, 结果显示, qRT-PCR 与 RNA-Seq 结果一致。基于上述结果, 本研究筛选到 MSTRG.68909.2、MSTRG.39805.1、MSTRG.121429.1、MSTRG.9137.1 和 MSTRG.43721.1 共 5 个可能参与虹鳟钙代谢的关键 lncRNA, 这些关键基因的筛选鉴别可为探明硬骨鱼类骨代谢的调控机理提供新的切入点, 为虹鳟养殖生产实践提供参考。

关键词: 虹鳟; 钙代谢; 长链非编码 RNA; 转录组; 鳞

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)07-1091-10

硬骨鱼类骨骼是鱼体的钙库, 储存了体内约 99% 的钙^[1]。骨组织中的骨形成与骨吸收过程通常处于动态平衡状态, 其主要表现为钙的生物矿化以及再活化过程。当鱼体对钙需求发生变化时, 可能会引发骨吸收过程从而实现钙的再活化^[2]。因此, 钙代谢可作为骨骼新陈代谢的重要表征。鳞是鱼类外骨骼的重要组成部分, 其在细胞组成方面与其他高等脊椎动物骨骼相似^[3]。据报道, 硬骨鱼类中鳞组织的钙含量可高达机体总钙的 20%^[4]。当水环境及食物中的钙源不足时, 鱼体首先通过调用鳞组织中的钙来进行补给, 其次为鳍条和内骨骼^[5-7]。例如, 饲料中缺乏钙/磷会抑制金鱼(*Carassius auratus*)鳞组织的矿化作用^[8]; 水环境中可利用钙的不足会导致尼罗罗非鱼(*Oreochr-*

omis niloticus)鳞组织中钙含量的显著降低^[9]。由此可知, 相较于内骨骼而言, 鳞组织中的钙更易被活化以满足鱼体对于钙的需求^[10]。此外, 鳞作为外骨骼直接暴露于水环境且更易于采集, 因此可作为鱼类钙代谢研究的优良载体。

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)属鲑形目(Salmoniformes)、鲑科(Salmonidae)、太平洋鲑属[大马哈鱼属(*Oncorhynchus*)]^[11], 是我国养殖产量最高的鲑鳟鱼类^[11]。已有研究表明, 钙缺乏会延迟虹鳟幼鱼骨化过程, 影响其骨骼发育, 造成骨骼畸形^[12-13]。反之, 提高虹鳟幼鱼饲料中钙磷的含量能够降低发育过程中骨骼畸形出现的概率^[14]。由此可见, 钙在虹鳟骨骼发育过程中发挥着重要作用。

收稿日期: 2021-08-24; 修订日期: 2022-01-15.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772828); 广东海洋大学科研启动经费资助项目(R19022).

作者简介: 王刘永(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类种子工程与健康养殖. E-mail: 1245285126@qq.com

通信作者: 马骞, 副教授, 研究方向为海水鱼类发育学及生理学与遗传育种. E-mail: maq@gdou.edu.cn

降钙素(calcitonin, CT)是一种多肽激素,与破骨细胞的降钙素受体相结合,抑制破骨细胞的活性,从而减少骨吸收^[15-16]。对昂齿非鲫(*Sarotherodon mossambicus*)注射 CT 后,其鳞组织中的成骨细胞数量明显增加,细胞体积明显增大^[17],表明 CT 具有促进鳞生长的作用。鲑降钙素(salmon calcitonin, sCT)是由鲑鳟鱼类体内甲状腺滤泡旁细胞分泌的一种降钙素。在目前发现的 8 种降钙素中,sCT 的生物活性最高,约为人降钙素的 45~50 倍^[18]。因此,sCT 因其对动物体内降钙素受体具有更强的亲和力或更强的抗代谢降解作用,被广泛应用于各类研究中^[19]。据报道,sCT 能够显著降低翠鳢(*Channa punctatus*)血浆钙含量并抑制抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP)活性,表明 sCT 在抑制破骨细胞活性方面发挥了作用^[20]。此外,sCT 还可以提高欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)骨骼中成骨细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,促进骨组织形成^[21]。因此,研究 sCT 对虹鳟鳞组织中钙代谢水平的影响,可为探明其骨代谢的调控机制提供新思路。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)是指长度超过 200 nt 的一类非编码 RNA,主要从蛋白质编码基因的反义链以及间隔区转录出来^[22]。据报道,米非司酮(RU486)处理的尼罗罗非鱼在性别分化早期表现出性别二型性,其性腺中的 lncRNA 表达水平发生显著变化,表明这些差异表达 lncRNA 可能与性别分化和性逆转具有密切关系^[23]。研究表明,lncRNA 能竞争性结合 miRNA,调节靶基因蛋白丰度并以此来参与免疫应答^[24-25]。例如,不同品系虹鳟感染嗜冷黄杆菌(*Flavobacteria cryophilus*)后,筛选到的差异表达 lncRNA 基因组定位与多种免疫相关蛋白编码基因(包括补体成分、细胞因子、趋化因子和参与免疫的多种信号分子)重叠,表明这些 lncRNA 可能参与其免疫调节过程^[26]。此外,感染鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)或内毒素的硬骨鱼类脾脏中 IRAK4-related lncRNA (IRL)的表达上调,IRL 与 miR-27c-3p 相互作用,能够减轻 miR-27c-3p 对炎症反应相关基因 *IRAK4* 的抑制作用,从而促进免

疫应答^[27]。抗病毒相关 lncRNA (AANCR)作为 miR-210 的竞争性内源 RNA (ceRNA),可促进抗鳜鱼弹状病毒(*Siniperca chuatsi* rhabdovirus, SCRV)关键基因 *MITA* 的表达,从而抑制 SCRV 复制并加强抗病毒反应^[28]。在鱼类骨代谢方面,在研究团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肌间骨的生长机制中,发现 lncRNA 在骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向成骨细胞分化过程中起到重要作用,同时筛选到的差异 lncRNA 富集到在骨形成中具有关键作用的 MAPK 信号通路^[29]。由此可见,lncRNA 在鱼类胚胎发育、生殖调控、性别决定、免疫调节等过程中均发挥着重要作用。

据此,本研究选取 lncRNA 作为鱼类骨代谢调节机制的研究对象,通过对虹鳟幼鱼进行 sCT 腹腔注射,随后采集鳞组织进行转录组测序。通过对测序结果中的 lncRNA 进行注释,分析统计其表达量,筛选差异表达 lncRNA,并基于 GO 注释和 KEGG 通路富集对 lncRNA 进行分类注释及相关靶基因的功能富集;最后,采用实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)技术对筛选到的部分差异 lncRNA 进行表达水平检测,验证转录组数据的可靠性。相关结果可为探明硬骨鱼类骨代谢的分子调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品制备

虹鳟幼鱼[体长(16.33±1.30) cm, 体重(52.21±7.24) g]采集于山东省潍坊市临朐县淡水虹鳟养殖基地。实验开始前将虹鳟置于有效体积为 1000 L(直径 1.6 m, 高 0.6 m)的 PE 桶中,水深约为 PE 桶高度的 1/2,流水暂养 3 d(盐度 27, 水温 14~16 °C),光周期条件为 12 h : 12 h,每天早上 8:00 和下午 4:00 投喂配合饲料(总投喂量约为鱼体重的 3%)。

本研究设置实验组(SI)与对照组(CG),每组 3 个重复,实验组腹腔注射 sCT (上海源叶生物科技有限公司,纯度≥97%;注射量按 2 μg/kg 鱼体重),对照组腹腔注射同体积生理盐水。注射 24 h 后,每组各随机采集 3 尾鱼。幼鱼经 300 mg/L MS-222 (3-氨基苯甲酸乙酯)麻醉后,刮取鱼体左侧鳞,立即置于液氮中保存,后转移至-80 °C 保存直至组织提取。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

按照 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)法提取鱗组织总 RNA。通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳和核酸测定仪分别检测总 RNA 的完整性及浓度, 根据 PrimeScript Rtase 试剂盒(TaKaRa)说明书, 将 1 μ g 总 RNA 反转录合成第一链 cDNA, 并保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱待用(qRT-PCR 验证)。

1.3 文库构建和测序

将质检合格的 RNA 样品送至杭州联川生物技术股份有限公司完成转录组测序(RNA sequencing, RNA-Seq)和文库制备。去除合格样品中的核糖体 RNA (rRNA depletion), 打成片段连接测序接头, 以 cDNA 文库的平均插入尺寸为 2×150 bp (PE 150)的规则进行文库构建。使用 Illumina HiSeq 4000 进行配对测序。

1.4 数据处理及分析

将 Illumina HiSeq 4000 平台上得到的原始图像数据经过 Base Calling 转化为原始测序序列数据。CutAdapt 用于去除含有接头污染、低质量碱基和未确定碱基的阅读片段。然后使用 FASTQC_0.10.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 在线工具进行质量控制分析。通过 hisat_2.0.4 进行基因组比对。

1.5 差异 lncRNA 筛选

利用 StringTie_1.3.0, 通过计算 FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) 来确定 lncRNA 的表达水平, 计算公式: FPKM=cDNA fragments/[mapped fragments (millions)× transcript lengths (kb)]。通过将每个样品中的 Clean 读数映射到组装的转录组以获得每个基因的读数, 来检测基因表达水平。去除已知的

mRNA 和小于 200 bp 的转录本后, 使用 CNCI_2.0 (Coding Potential Calculator) 和 CPC_0.9-r2 (Coding Non-Coding Index) 软件对剩下的转录本进行 lncRNA 预测, 判定无编码潜能的转录组序列为候选 lncRNA。在筛选过程中, 以 $\log_2|fold change|\geq 1$ 作为不同组间差异表达 lncRNA 的筛选阈值, $P<0.05$ 具有统计学意义, 使用 edgeR 进行 lncRNA 差异表达分析, 获得两个样品间的差异 lncRNA, 来估算各转录本的表达水平。

1.6 GO 注释和 KEGG 富集分析

基于基因本体论数据库(<http://geneontology.org>)进行 GO 注释分析, 研究 lncRNA 的功能, 并对 lncRNA 进行 GO 功能分类统计, 分别对参与的生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC) 和基因的分子功能(molecular function, MF)进行描述。利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库(<http://www.kegg.jp/kegg>)进行信号通路富集分析, 确定可能的功能通路, 当校正后的 P 值(Q value) <0.05 时, 表示该功能存在显著富集。

1.7 qRT-PCR 验证差异表达的 lncRNA

基于 RNA-Seq 结果, 随机选取 6 个差异 lncRNA, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 利用 analytikjena-qTOWER2.2 型荧光定量 PCR 仪进行验证实验。引物由北京擎科生物科技有限公司广州分公司合成, 引物信息见表 1。内参基因选择 18S rRNA。qRT-PCR 根据 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (TliRNase H Plus) 试剂盒(TaKaRa)说明进行操作, 各样品设置 3 个重复。所有引物均经过扩增效率检测($E>90\%$; $R^2>0.990$), PCR 产物经测序验证。

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primer used in this study

引物名称 primer name	上游引物(5'-3') forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') reverse primer (5'-3')
MSTRG.39805.1	GGAACCCCTTTAGTCTAAG	CTATGATACAGTAGGAGATC
MSTRG.48032.2	TGCCATCAGAACAGCCTAA	GGAAGCATTGGAGTGAACAT
MSTRG.100239.1	CGGACCATTATGTTCAGAG	TGATTACCATTGTCGTGTG
MSTRG.121429.1	CCTGCTTCCTACAATCACA	GCCCATAATGACACCCAGAA
MSTRG.9137.1	CAGCGATTAGGGAGGTCTA	GCATGTTGGATCTCTGTGTT
MSTRG.92554.2	CTCTAAGGTTGTAGCAGTTGT	GGCAAGACTCCATGAAGAT
18S rRNA	CTTAGAGGGACAAGTGGCGTTAGC	CACGAGTGGGTTCATCGGGTT

根据 qRT-PCR 测得的 C_t 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各样品的基因相对表达量。所得数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$, $n=3$)表示, 使用 SPSS 19.0 中的单因素方差分析(One-Way ANOVA)法及 Duncan's 多重比较, 分析各基因表达量在两种不同处理方式下的差异水平, 若 $P<0.05$, 表示有显著差异; 若 $P<0.01$, 则差异极显著。

2 结果与分析

2.1 测序数据及其对比分析

实验组(SI-1、SI-2 和 SI-3)和对照组(CG-1、CG 和 CG-3)的虹鳟幼鱼鳞组织转录组测序共获得 75.48 Gb Clean Data。测序样品的数据质量及比对结果详情见表 2, 各样品的 Clean Data 均达到 11.38 Gb, Q30 碱基百分比均在 97.99% 以上。将各样品的 Clean read 与虹鳟基因组进行序列比对, 比对效率均在 85.97% 以上。各项数据显示测序数据的质量较好, 可以进行后续分析。

2.2 lncRNA 差异表达分析

实验组与对照组间的差异表达 lncRNA 的层次聚类分析结果如图 1。结果显示, 同一 lncRNA 在同一组内的表达量基本一致, 组内的样本间差异较小。与对照组相比, 实验组 lncRNA 的表达水平变化显著, 且下调表达的 lncRNA 多于上调表达的 lncRNA。

在 $\log_2|\text{fold change}| \geq 1$, 且 $P<0.05$ 的条件下, 以 $-\lg(P \text{ 值})$ 为纵坐标, 以 \log_2 (倍数变化, fold change, FC) 为横坐标绘制的差异表达 lncRNA 火山图显示, 本研究筛选出差异表达的 lncRNA 共

847 条, 其中 247 条 lncRNA 上调, 600 条 lncRNA 下调(图 2)。其中, 筛选到的差异 lncRNA 中有 5 个与钙代谢密切相关: MSTRG.68909.2 靶基因 *rac1* 富集到 MAPK 信号通路(04010)和 Wnt 信号通路(04310); MSTRG.121429.1 靶基因 *LOC110524573* 富集到 MAPK 信号通路(04010); MSTRG.9137.1 靶基因 *LOC110533847* 富集到 Wnt 信号通路(04310); MSTRG.39805.1 靶基因 *LOC110490697* 编码丛状蛋白 B2 (plexin-B2); MSTRG.43721.1 靶基因 *LOC110492264* 注释到钙离子结合(GO: 0005509)功能, 并且富集到钙信号通路(04020)。

2.3 差异表达 lncRNA 靶基因的 GO 注释和 KEGG 富集分析

对差异表达 lncRNA 靶基因进行 GO 功能分析并注释到生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF) 3 大条目。通过 BLASTx 比对, 在已知基因组中共注释了 8309 个基因, 涉及到 25 个生物学过程、15 个细胞成分和 10 个分子功能。其中, 生物学过程包括转录调控、运输、信号转导、磷酸化和细胞黏附等; 细胞组分包括膜、膜的组成部分、细胞质和质膜等; 分子功能包括金属离子结合、分子功能、核苷酸结合和锌离子结合等(图 3)。

利用 KEGG 数据库将差异表达 lncRNA 靶基因富集到相关通路中, 以 $P<0.05$ 为阈值, 选取前 20 条显著富集的信号通路(图 4)。结果表明, 差异 lncRNA 靶基因主要富集在硫胺素代谢通路、炎症介质对 TRP 通道调节、血小板活化、谷氨酸能突触、神经营养因子通路、ARVC 通路和 NF- κ B 信号通路等。其中, 富集到血小板活化通路的 lncRNA

表 2 各样本转录组测序数据信息
Tab. 2 Information of transcriptomic reads of each sample

组别 group	数目 total read	总碱基数/ G clean base	碱基质量 ≥ 30 所占 的百分比/% Q30	比对到参考基因组上的 reads 数(比对效率) mapped reads (comparision efficiency)
SI-1	75841578	11.38	98.11	66484165 (87.66%)
SI-2	90352240	13.55	98.38	77672604 (85.97%)
SI-3	87054418	13.06	98.38	76792719 (88.21%)
CG-1	84319514	12.65	98.59	72864251 (86.41%)
CG-2	83602640	12.54	98.10	71937217 (86.05%)
CG-3	82017856	12.30	97.99	71369583 (87.02%)

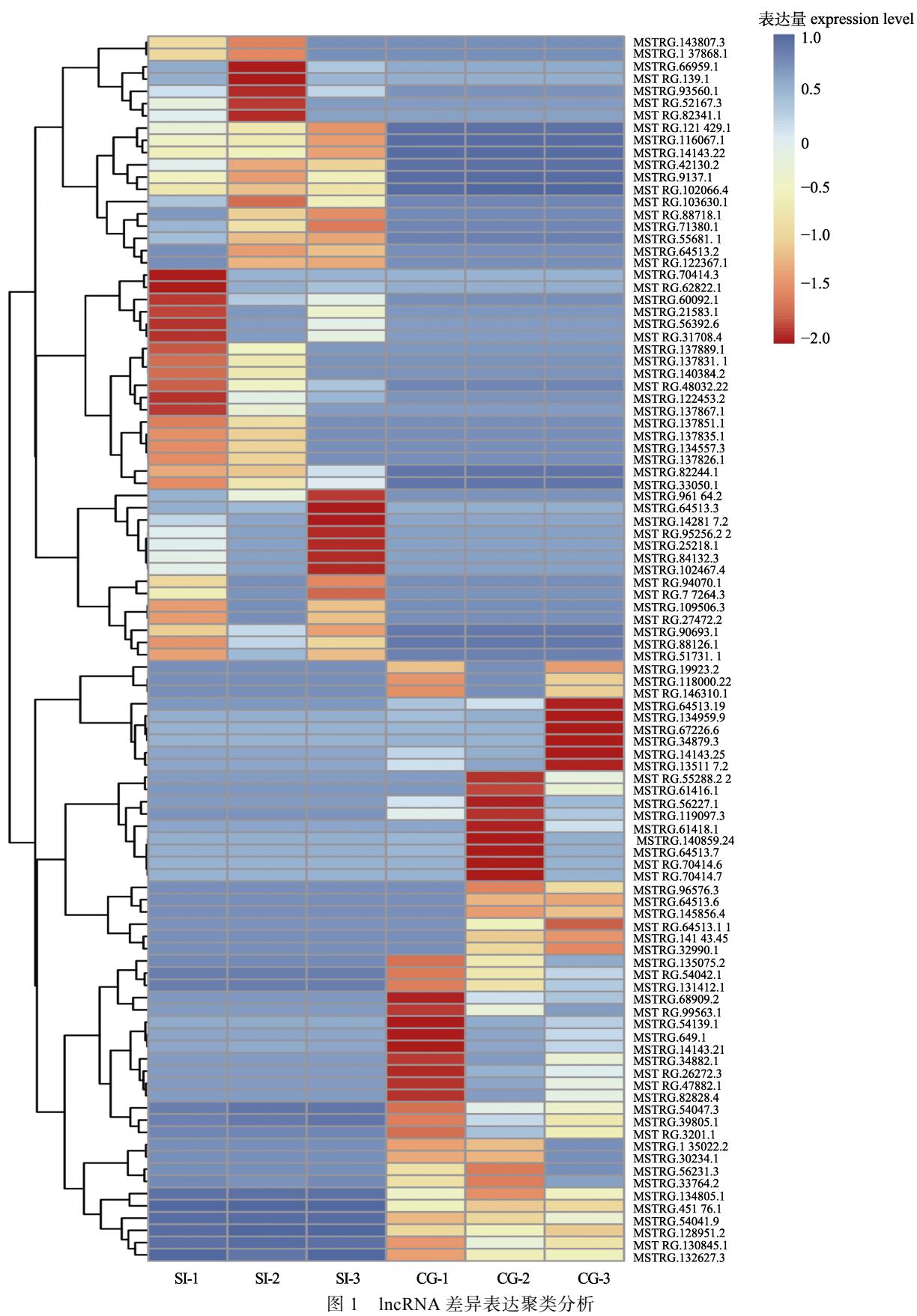


图 1 lncRNA 差异表达聚类分析
Fig. 1 Cluster analysis of lncRNA differential expression

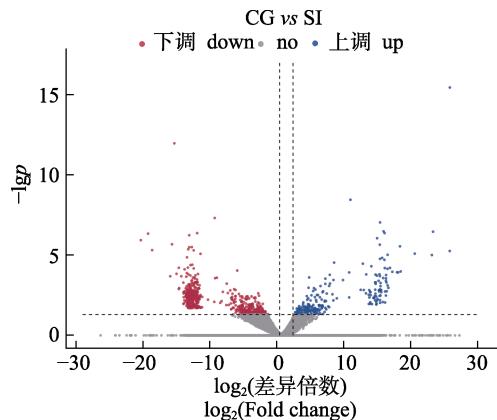
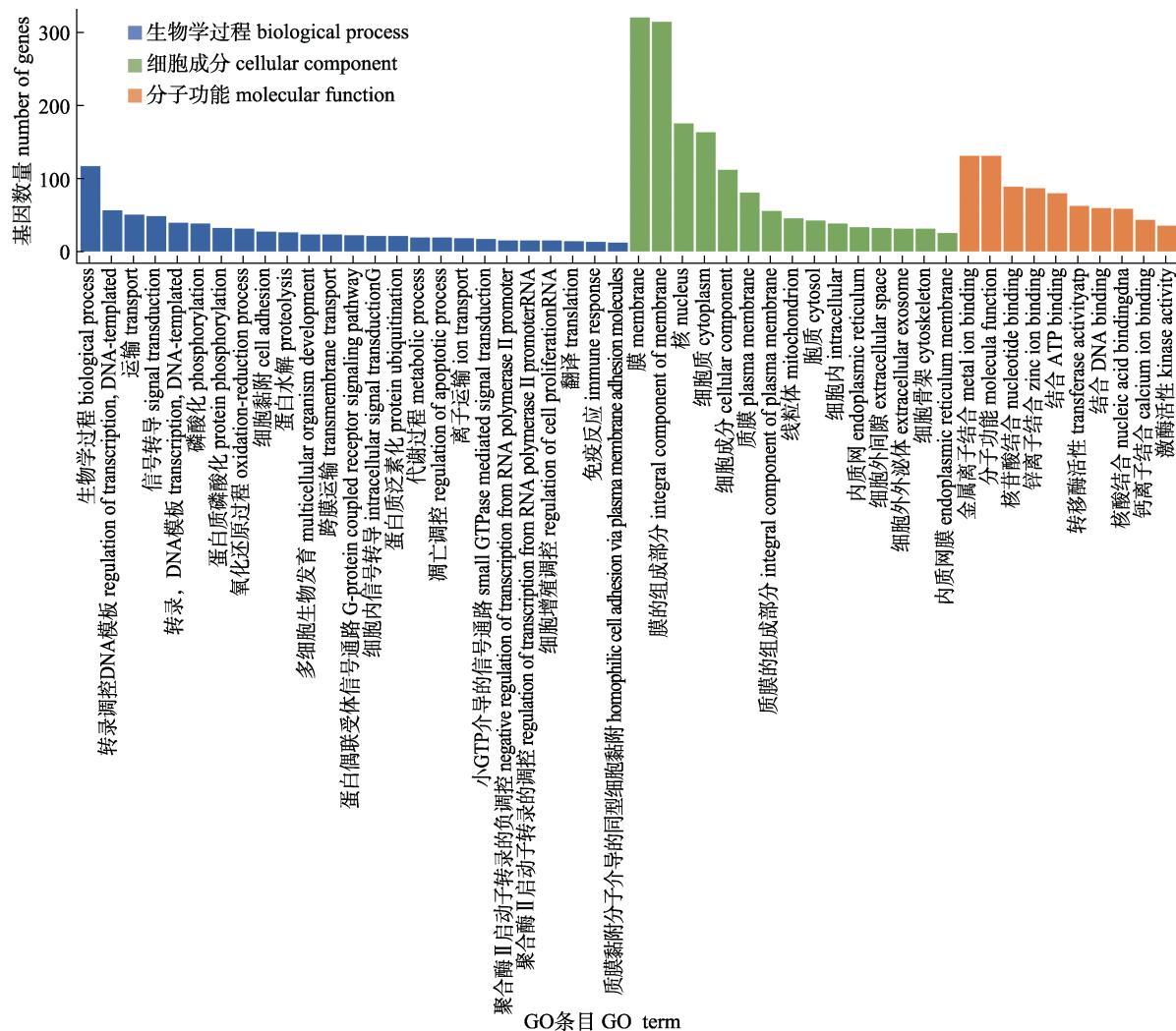


图 2 差异表达 lncRNA 火山图

Fig. 2 Volcanic map of differentially expressed lncRNAs

数目最多, 涉及 16 条差异 lncRNA; 富集到硫胺素代谢的 lncRNA 差异最显著, 涉及 2 条差异 lncRNA。

图 3 差异表达 lncRNA 靶基因的 GO 注释
Fig. 3 GO annotation of target genes of differentially expressed lncRNAs

2.4 qRT-PCR 验证差异表达的 lncRNA

本研究通过 qRT-PCR 实验对随机挑选的 6 个 lncRNA 进行验证, 其中包括 1 个上调表达基因和 5 个下调表达基因(图 5)。各 lncRNA 经 qRT-PCR 验证后的表达趋势与测序结果一致。

3 讨论

本研究共筛选到 4 个可能与虹鳟钙代谢相关的差异表达 lncRNA(表达上调、下调各 2 个)。表达水平下调的 2 个 lncRNA 中, MSTRG.121429.1 靶向对应基因 *LOC110524573*, 该基因编码盘状蛋白结构域受体 2 (discoidin domain-containing receptor 2, *Ddr2*)。据报道, *DDR2* 具有抑制软骨细

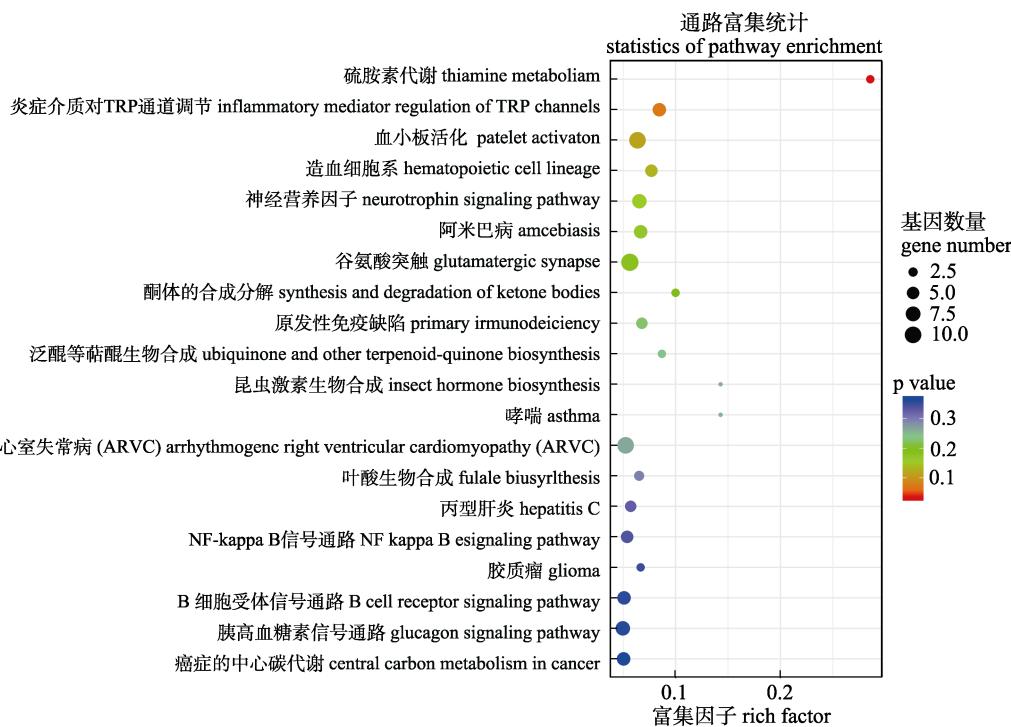


图4 差异表达 lncRNA 的靶基因 KEGG 信号通路分析

Fig. 4 KEGG signaling pathway analysis of target genes of differentially expressed lncRNAs

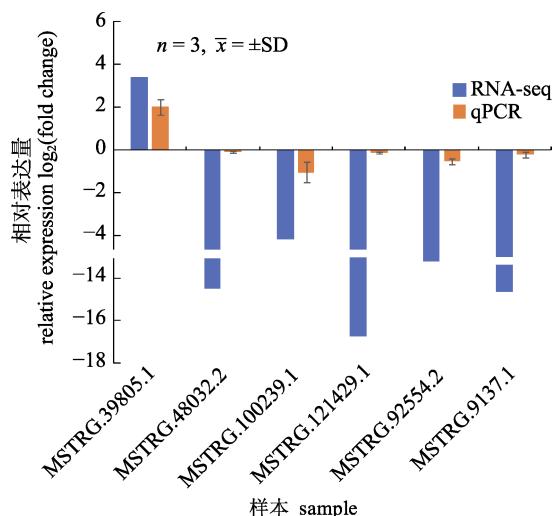


图5 差异表达 lncRNA 的 qRT-PCR 验证

Fig. 5 qRT-PCR verification of differentially expressed lncRNAs

胞增殖、促进成骨细胞凋亡的作用^[30]。另一表达下调的MSTRG9137.1靶向对应基因LOC110533847，该基因编码Wnt-11。Wnt-11作为一种富含半胱氨酸的分泌型脂糖蛋白，对细胞的增殖与分化具有重要调控作用^[31]。Wnt-11表达水平降低会引起小鼠椎骨中成骨细胞数量增加及破骨细胞数量减少，从而增加椎骨的骨密度(bone mineral density，

BMD)^[32]。Wnt-11还具有促进骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein 9, Bmp9)表达的作用，从而诱导间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向成骨细胞分化^[33]。此外，KEGG富集分析显示2个下调lncRNA靶基因同时富集到Wnt/β-catenin信号通路，该通路通过参与调节骨髓间充质干细胞早期分化来调控成骨分化过程^[34-35]。综上，上述2个lncRNA可能在sCT调控虹鳟钙代谢的过程中发挥重要作用。

本研究筛选到的上调lncRNA中，MSTRG.68909.2靶向对应基因rac1，该基因的过表达能够加强钙粘蛋白(N-cadherin)的合成从而促进软骨形成^[36]，而rac1基因缺失则会造成软骨中骨小梁的缺失并延迟软骨骨化过程^[37]。另一个关键上调lncRNA MSTRG.39805.1靶向对应基因LOC110490697(丛状蛋白B2编码基因，plexin-B2)，该基因与破骨细胞分泌的血管生成素(angiogenin, ANG)编码基因组成ANG/plexin-B2轴，plexin-B2表达上调会抑制骨血管内皮细胞衰老^[38]。据此，上述2个上调lncRNA及其靶基因可能为虹鳟钙代谢过程的关键调节因子，可作为后续研究的目标基因。

GO 注释分析结果显示, 本研究筛选到的差异 lncRNA 中有 230 条富集于金属离子结合功能, 表明虹鳟组织中与钙代谢相关的基因, 尤其是与钙离子结合、钙离子运输等功能相关基因的表达受到 sCT 的影响。KEGG 富集结果也显示, 差异 lncRNA 靶基因主要富集于与钙代谢密切相关的核转录因子 κB (NF-κB)信号通路、硫胺素代谢信号通路、炎症介质对 TRP 通道调节信号通路和血小板活化等。这些信号通路中的关键基因, 如骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/NF-κB 受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, RANKL)等会参与调节血管钙化过程; 而 RANKL 作为破骨细胞分化调节因子, 在诱导破骨细胞分化过程中会引起 lncRNA 表达水平的显著变化^[39]。TRP 作为钙离子进入细胞的通道在调节胞内钙离子平衡方面也具有重要作用^[40]。此外, 血小板活化过程中, *rac1* 活性会伴随着钙离子通过质膜的内流过程不断增加, 表明该信号通路中的部分基因可能参与钙代谢调节^[41]。本研究中, 靶基因富集于上述信号通路的差异 lncRNA 受到 sCT 的影响, 可能在虹鳟钙代谢过程中具有潜在调控作用。本研究筛选的差异表达 lncRNA 可作为后续研究的目标基因, 为阐明虹鳟钙代谢的调节机制提供重要参考。后续研究将侧重在 ceRNA 调控网络分析, 特别是 lncRNA 与 miRNA 互作关系研究等内容, 为揭示鱼类骨代谢的分子调控网络奠定基础。

参考文献:

- [1] Flik G, Fenwick J C, Kolar Z, et al. Effects of low ambient calcium levels on wholebody Ca²⁺ flux rates and internal calcium pools in the freshwater cichlid teleost, *Oreochromis mossambicus*[J]. Journal of Experimental Biology, 1986, 120(1): 249-264.
- [2] Guerreiro P M, Fuentes J, Canario A V M, et al. Calcium balance in sea bream (*Sparus aurata*): The effect of oestradiol-17beta[J]. The Journal of Endocrinology, 2002, 173(2): 377-385.
- [3] Bushinsky D A, Monk R D. Calcium[J]. The Lancet, 1998, 352(9124): 306-311.
- [4] Persson P, Johannsson S H, Takagi Y, et al. Estradiol-17β and nutritional status affect calcium balance, scale and bone resorption, and bone formation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Journal of Comparative Physiology B, 1997, 167(7): 468-473.
- [5] Mugiya Y, Watabe N. Studies on fish scale formation and resorption—II. Effect of estradiol on calcium homeostasis and skeletal tissue resorption in the goldfish, *Carassius auratus*, and the killifish, *Fundulus heteroclitus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1977, 57(2): 197-202.
- [6] Persson P, Takagi Y, Björnsson B T. Tartrate resistant acid phosphatase as a marker for scale resorption in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Effects of estradiol-17β treatment and refeeding[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1995, 14(4): 329-339.
- [7] Shinozaki F, Mugiya Y. Effects of salmon calcitonin on calcium deposition on and release from calcified tissues in fed and starved goldfish *Carassius auratus*[J]. Fisheries Science, 2000, 66(4): 695-700.
- [8] Ogawa N, Ura K, Takagi Y. Scale calcification in the goldfish *in vitro*: Histological and quantitative analysis[J]. Fisheries Science, 2010, 76(2): 189-198.
- [9] Yasuaki T, Tetsuya H, Juro Y. Scale regeneration of tilapia (*Oreochromis niloticus*) under various ambient and dietary calcium concentrations[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1989, 92(4): 605-608.
- [10] Bereiter-Hahn J, Zylberberg L. Regeneration of teleost fish scale[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1993, 105(4): 625-641.
- [11] Fan Z T, Jiang Z F, Han Y. Cold-Water Fish Farming[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2008. [范兆廷, 姜作发, 韩英. 冷水性鱼类养殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.]
- [12] Fontagné S, Silva N, Bazin D, et al. Effects of dietary phosphorus and calcium level on growth and skeletal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry[J]. Aquaculture, 2009, 297(1-4): 141-150.
- [13] Fjelldal P G, Hansen T, Breck O, et al. Supplementation of dietary minerals during the early seawater phase increase vertebral strength and reduce the prevalence of vertebral deformities in fast-growing under-yearling Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt[J]. Aquaculture Nutrition, 2009, 15(4): 366-378.
- [14] Nordin B E C, Morris H A. The calcium deficiency model for osteoporosis[J]. Nutrition Reviews, 1989, 47(3): 65-72.
- [15] Fjelldal P G, Hansen T, Breck O, et al. Supplementation of dietary minerals during the early seawater phase increase vertebral strength and reduce the prevalence of vertebral deformities in fast-growing under-yearling Atlantic salmon

- (*Salmo salar* L.) smolt[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2009, 15(4): 366-378.
- [16] Si X N, Huang W H, Gan R B. Calcitonin[J]. *Chemistry of Life (Communication of the Chinese Biochemistry Society)*, 1997, 17(1): 28-30. [斯小宁, 黄文华, 甘人宝. 降钙素[J]. 生命的化学(中国生物化学会通讯), 1997, 17(1): 28-30.]
- [17] Wendelaar Bonga S E, Lammers P I. Effects of calcitonin on ultrastructure and mineral content of bone and scales of the cichlid teleost *Sarotherodon mossambicus*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1982, 48(1): 60-70.
- [18] Gao Y, Huang W Q, Wang J D, et al. Effect of salmon calcitonin on expression of OPG/RANKL in rat arterial calcification[J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 2009, 55(3): 359-364. [高岩, 黄维清, 王敬东, 等. 鲑鱼降钙素对大鼠钙化血管中OPG/RANKL表达的影响[J]. 武汉大学学报(理学版), 2009, 55(3): 359-364.]
- [19] Li Y Y, Yin L H, Liu F N, et al. Calcitonin in the treatment of chronic kidney disease-research progress of mineral and bone abnormalities[J]. *Journal of Clinical Nephrology*, 2018, 18(9): 579-581. [李映燕, 尹良红, 刘璠娜, 等. 降钙素治疗慢性肾脏病-矿物质和骨异常的研究进展[J]. 临床肾脏病杂志, 2018, 18(9): 579-581.]
- [20] Mukherjee D, Sen U, Bhattacharyya S P, et al. The effects of calcitonin on plasma calcium levels and bone metabolism in the fresh water teleost *Channa punctatus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2004, 138(4): 417-426.
- [21] Shyu J F, Shih C, Tseng C Y, et al. Calcitonin induces podosome disassembly and detachment of osteoclasts by modulating Pyk2 and Src activities[J]. *Bone*, 2007, 40(5): 1329-1342.
- [22] Wilusz J E, Sunwoo H, Spector D L. Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world[J]. *Genes & Development*, 2009, 23(13): 1494-1504.
- [23] Cai J, Li L, Song L Y, et al. Effects of long term anti-progestin mifepristone (RU486) exposure on sexually dimorphic lncRNA expression and gonadal masculinization in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 215: 105289.
- [24] Chu Q, Xu T J, Zheng W W, et al. Long noncoding RNA MARL regulates antiviral responses through suppression miR-122-dependent MAVS downregulation in lower vertebrates[J]. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(7): e1008670.
- [25] Zheng W W, Chu Q, Xu T J. The long noncoding RNA NARL regulates immune responses via microRNA-mediated NOD1 downregulation in teleost fish[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100414.
- [26] Paneru B, Al-Tobasei R, Palti Y, et al. Differential expression of long non-coding RNAs in three genetic lines of rainbow trout in response to infection with *Flavobacterium psychrophilum*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 36032.
- [27] Zheng W W, Chu Q, Xu T J. Long noncoding RNA IRL regulates NF-κB-mediated immune responses through suppression of miR-27c-3p-dependent IRAK4 downregulation in teleost fish[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100304.
- [28] Chu Q, Xu T J, Zheng W W, et al. Long noncoding RNA AACNR modulates innate antiviral responses by blocking miR-210-dependent MITA downregulation in teleost fish, *Miichthys miiuy*[J]. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(7): 1131-1148.
- [29] Chen Y L, Wan S M, Li Q, et al. Genome-wide integrated analysis revealed functions of lncRNA-miRNA-mRNA interaction in growth of intermuscular bones in *Megabrama amblycephala*[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 8: 603815.
- [30] Zhang Y, Su J, Yu J T, et al. An essential role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in osteoblast differentiation and chondrocyte maturation via modulation of Runx2 activation[J]. *Journal of Bone and Mineral Research: the Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2011, 26(3): 604-617.
- [31] Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors[J]. *Cellular Signalling*, 2007, 19(4): 659-671.
- [32] Bose D, Kugan R, Stubbs D, et al. Management of infected nonunion of the long bones by a multidisciplinary team[J]. *The Bone & Joint Journal*, 2015, 97-B(6): 814-817.
- [33] Zhu J H, Liao Y P, Li F S, et al. Wnt11 promotes BMP9-induced osteogenic differentiation through BMPs/Smads and p38 MAPK in mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(11): 9462-9473.
- [34] Wu M, Zhang Y. Related factors regulating osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2021, 25(1): 116-122. [吴铭, 张岩. 调控骨髓间充质干细胞成骨分化的Wnt/β-catenin信号通路及相关因素[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(1): 116-122.]
- [35] Xia W Z, Zhuang L, Deng X, et al. Long noncoding RNA-p21 modulates cellular senescence via the Wnt/β-catenin signaling pathway in mesenchymal stem cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(5): 7039-7047.
- [36] Woods A, Wang G Y, Dupuis H, et al. Rac1 signaling stim-

- ulates N-cadherin expression, mesenchymal condensation, and chondrogenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(32): 23500-23508.
- [37] Wang G Y, Beier F. Trabecular bone phenotype in cartilage-specific inactivation of the Rac1 gene in mice[J]. Bone, 2010, 47: S422-S423.
- [38] Liu X N, Chai Y, Liu G Q, et al. Osteoclasts protect bone blood vessels against senescence through the angiogenin/plexin-B2 axis[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1832.
- [39] Chen R S, Zhang X B, Zhu X T, et al. LncRNA Bmncr alleviates the progression of osteoporosis by inhibiting RANML-induced osteoclast differentiation[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(21): 9199-9206.
- [40] Zheng Y H, Liu W. Identification and characterization of a new calmodulin binding site at the C-terminus of *Drosophila* TRP channel[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 32(7): 790-797. 郑云华, 刘伟. 果蝇TRP离子通道C端一个新钙调蛋白结合位点的鉴定和分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(7): 790-797.]
- [41] Bergmeier W, Stefanini L. Novel molecules in calcium signaling in platelets[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH, 2009, 7(Suppl 1): 187-190.

Effects of salmon calcitonin on the expression of lncRNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) scales

WANG Liuyong¹, ZHOU Qiling¹, MA Qian^{1,2}, MAO Feifan¹, YANG Erjun¹, CHEN Gang^{1,2}

1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang 524025, China

Abstract: Fish growth and development, reproduction regulation, immune regulation, and many other life activities are regulated by long non-coding RNA (lncRNA). As a polypeptide hormone, calcitonin plays an important role in regulating calcium metabolism in vertebrates. Notably, salmon calcitonin (sCT) has the highest biological activity. To explore the effect of sCT on the expression level of lncRNAs in the skeletal tissue of teleosts, intraperitoneal injection of sCT was administered to young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and their scales were collected 24 h after the injection. The lncRNA expression profile was analyzed using high-throughput sequencing technology and bioinformatics methods. A total of 847 differentially expressed lncRNAs, including 247 upregulated and 600 downregulated lncRNAs, were identified in the scales of rainbow trout administered with sCT. Six lncRNAs were randomly selected for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis; the results of which indicated that the expression pattern of these lncRNAs aligned with the RNA-Seq results. GO annotation revealed that the target genes of the aforementioned differentially expressed lncRNAs were mainly annotated in the functions of transcription regulation, transportation, signal transduction, membrane, cytoplasm, metal ion binding, and nucleotide binding. KEGG pathway enrichment analysis showed that target genes of the differentially expressed lncRNAs were significantly enriched in thiamine metabolism, inflammatory mediator regulation of TRP channels, platelet activation, glutamatergic synapse, neurotrophin signaling pathway, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), and NF-kappa B signaling pathway. Accordingly, five lncRNAs (MSTRG.68909.2, MSTRG.39805.1, MSTRG.121429.1, MSTRG.9137.1, and MSTRG.43721.1) and their target genes might participate in the molecular regulation of *O. mykiss* calcium metabolism, and identification of these genes could provide a valuable dataset to elucidate the molecular regulation of bone metabolism in fish.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; calcium metabolism; lncRNA; transcriptome; scales

Corresponding author: MA Qian. E-mail: maq@gdou.edu.cn