

DOI: 10.12264/JFSC2023-0256

miR-462-731 对草鱼线粒体功能的影响

宋安康, 孙甜甜, 林钧璽, 刘红, 王焕岭

华中农业大学水产学院, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070

摘要: 硬骨鱼特有的 miR-462 与 miR-731 位于同一基因簇(简称为 miR-462-731), 在低氧环境中表达量会显著上调。为了进一步研究 miR-462-731 簇的作用, 本研究以草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肝脏细胞为对象, 分析 miR-462 与 miR-731 过表达对细胞线粒体生物学功能的影响。结果显示 miR-462 与 miR-731 过表达后三羧酸循环中关键基因 *mdh*、*ogdh*、*cs* 的 mRNA 表达水平以及 ATP 含量均显著降低, 线粒体膜电位下降; 细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的含量显著增加, 同时总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性显著下降, 而丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量升高; 电子显微镜观察发现 miR-462 与 miR-731 过表达后细胞线粒体结构损伤。由此推测, miR-462-731 簇可通过影响细胞线粒体膜电位、代谢及氧化应激等参与线粒体活动, 研究结果可为草鱼及其他硬骨鱼类低氧调节机制提供基础资料。

关键词: 草鱼; miR-462-731; 能量代谢; 线粒体膜电位; 氧化应激; 细胞超微结构

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)01-0051-08

氧气对于鱼类的生存是至关重要的。与陆地环境不同, 水体环境很容易由于自然原因或人为活动而处于低氧状态, 而溶氧不足会对鱼类生存造成严重威胁^[1]。草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)作为中国传统四大淡水养殖鱼类之一, 养殖广泛且经济价值较高, 但在养殖过程中同样受到低氧的影响。低氧环境能够导致鱼类氧化应激造成细胞损伤^[2], 降低采食量, 而长期采食量不足会影响鱼类生长、繁殖和生理代谢等^[3-4]。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs)是一类进化上高度保守的非编码小分子 RNA, 也是细胞中最丰富的基因调控分子, 在脊椎动物中大约 30%的 mRNA 都受到 miRNAs 的调控^[5]。这些 miRNA 可结合多个靶基因参与基因调控^[6], 在鱼类生殖、生长、免疫、代谢、渗透压调节及低氧应答等过程中发挥重要作用^[7-9]。miR-462 和 miR-731 为硬骨鱼所特有, 成簇存在于基因间(简称为 miR-462-731),

由人和软骨鱼类的 miR-191 和 miR-425 进化而来^[10], 并且在多种硬骨鱼类中高度保守^[11]。该基因簇在鱼类造血系统及心脏、肝脏等组织发育中发挥重要作用^[11-13], 而且还参与抗细菌、病毒感染和干扰素的应答过程^[14-15]。在斑马鱼(*Danio rerio*)中 miR-462-731 能够通过低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1 alpha, Hif-1 α)参与低氧应答, 影响糖酵解及氧化磷酸化等通路^[12]。氧气进入机体后在线粒体中参与有氧呼吸, 线粒体是细胞能量代谢中心, 是氧化磷酸化发生的场所。因此, 在低氧环境显著上调的 miR-462-731 很可能与线粒体功能相关。

鉴于该基因簇的保守性, 本研究以草鱼为研究对象, 通过分析 miR-462-731 过表达后三羧酸循环过程中关键基因表达、线粒体膜电位、ATP 含量、抗氧化酶活性以及细胞超微结构等变化, 从而探讨 miR-462-731 对线粒体生物学功能的影

收稿日期: 2023-11-14; 修订日期: 2023-12-10.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872542); 中央高校专项基金(2662022SCYJ005).

作者简介: 宋安康(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: 1121354154@qq.com

通信作者: 王焕岭, 教授, 研究方向为分子遗传与鱼类育种. E-mail: huanlingok@mail.hzau.edu.cn

响,为应对草鱼养殖过程中低氧问题提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞转染

草鱼肝脏细胞系(L8824,取自华中农业大学水产学院)在 28 ℃、5% CO₂的恒温培养箱(美国 Thermo 公司)中培养,培养基为包含 10%胎牛血清(美国 Hyclone 公司)、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 M199 培养基(GIBCO 公司),每 1~2 d 更换 1 次培养基。将细胞接种到 12 孔或 24 孔细胞培养板(SORFA 公司),当细胞铺满培养瓶 70%时,利用 Lipo2000 (Invitrogen 公司)分别将 miR-462 模拟物(miR-462 mimics)、miR-731 模拟物(miR-731 mimics)、阴性对照(nc)(浓度均为 80 nmol/L,上海吉玛公司)转染到细胞中,24 h 后收集细胞用于后续实验,每个实验设置 3 个重复。

用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,所用引物(由擎科生物科技有限公司合成)序列见表 1。

1.2 实时荧光定量 PCR

利用 Trizol 法提取所收集细胞的总 RNA,并通过 HiScript II Reverse Transcriptase 反转录试剂盒(南京诺唯赞生物)反转录成 cDNA,利用 qRT-PCR 检测基因的表达变化。qRT-PCR 的反应体系: cDNA 模板 1 μL, SYBR Green I Master Mix(2×) 10 μL, 正反向引物各 0.8 μL (10 mmol/L), 无核酸酶水 7.4 μL。反应条件: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 59 ℃ 30 s, 72 ℃ 20 s, 35 个循环; 72 ℃ 5 min。其中 miRNA 的表达分析用 18S rRNA 作为内参基因,而 mRNA 的分析用 ACTB 作为内参基因。数据采用 2^{-ΔΔC_t}法计算目的基因的相对表达量。

1.3 线粒体膜电位检测

利用线粒体膜电位检测试剂盒(碧云天生物)检测 miR-462 和 miR-731 过表达后细胞线粒体膜

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 The primer sequences used in this study

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage	序列来源 sequence source
miR-462 模拟物 miR-462 mimics	Sense: UAACGGAACCCAUAAUGCAGCU Antisense: CUGCAUUAUGGGUUCCGUUAUU	miRNA mimics	[16]
miR-731 模拟物 miR-731 mimics	Sense: AAUGACACGUUUUCUCCCGGAUCG Antisense: GUGGCCUACAGAACUGACAGGUU		[17]
阴性对照 negative control	Sense: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT Antisense: ACGUGACACGUUCGGAGAATT		
RT-miR-462	CTCAACTGGTGTCTGTCGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGCTGCAT	miRNA	[12]
RT-miR-731	CTCAACTGGTGTCTGTCGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCGATCCGG	反转录	
miR-462-F	CGGGCGTAACGGAACCCATAAT	qRT-PCR	
miR-731-F	GGCGGGCAATGACACGTTTTCTC		
qRT-Reverse	TCAACTGGTGTCTGTCGAGTCGGC		
miR-18s-R	GGACACGGAAGGATTGACAG		[16]
miR-18s-F	CGGAGTCTCGTTCGTTATCGG		
cs-F	GCGGCCAAGATCTACCGTAA		XM_051879024
cs-R	TGAAGTGTGGCTCGCTGTAG		
mdh-F	AGGAGATGTGTTTCGGCAAGG		XM_051910623
mdh-R	TTGGCATAGAGCCCACCAAG		
ogdh-F	TGCACCGCTTAAGGACTTGT		XM_051903446
ogdh-R	CGTGTAGCACCTGAATGGCT		
ACTB-F	CCTTCTTGGGTATGGAATCTTG		[17]
ACTB-R	AGAGTATTACGCTCAGGTGGG		

电位的变化。在 12 孔板每孔加入 1 mL JC-1 染色剂(1×), 37 °C 孵育 20 min, 加入 JC-1 染色缓冲液(1×)洗涤 2 次, 每孔加入 1 mL M199 培养基, 利用倒置荧光显微镜在 490 nm 激发波长、530 nm 发射波长观察绿色荧光, 525 nm 激发波长、590 nm 发射波长观察红色荧光。

1.4 ROS 含量检测

利用 ROS 检测试剂盒(南京建成生物)检测细胞 ROS 含量。去除细胞培养基, 加入 10 μmol/L 的 DCFH-DA 后 28 °C 孵育 20 min, 用无血清 M199 培养基洗涤细胞 2 次, 去除残余的 DCFH-DA, 然后利用倒置荧光显微镜在 487 nm 激发波长、524 nm 发射波长下观察荧光强度。

1.5 ATP 含量检测

利用 ATP 检测试剂盒(碧云天生物)检测细胞 ATP 含量。去除细胞培养基, 用 PBS 清洗后加入裂解液裂解细胞, 4 °C、12000 r/min 离心 6 min 取上清, 在 96 孔板每孔加入 100 μL ATP 检测液以及 10 μL 上清液混匀后室温静置 5 min, 然后利用酶标仪在 480 nm 激发波长、525 nm 发射波长下检测 ATP 含量。

1.6 抗氧化能力检测

收集细胞超声破碎后, 4 °C、12000 r/min 离心 5 min 取上清, 利用抗氧化能力检测试剂盒(碧云天生物)检测细胞中的 SOD 活性以及 T-AOC 和

MDA 含量, 具体步骤按照说明书进行操作。

1.7 细胞超微结构观察

将细胞收集到离心管中, 1000 r/min 离心 8 min, 用 1 mL 2%戊二醛重悬细胞, 并在 4 °C 固定 4 h, 然后 4000 r/min 离心 10 min, 细胞沉淀通过乙醇脱水、石蜡包埋、切片、复水、染色等处理, 利用 100 kV 透射电子显微镜(日本 Hitachi)观察细胞的结构。

1.8 数据处理

利用 SPSS Statistics 24.0 对数据进行分析, 采用 Duncan's 进行多重比较, 数值均采用平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示, $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为差异极显著。结果使用 GraphPad Prism 8 软件作图, Image J 软件分析荧光强度。

2 结果与分析

2.1 miR-462-731 过表达导致三羧酸循环关键酶基因表达及 ATP 含量变化

miRNA mimics 转染 L8824 细胞后, 通过 qRT-PCR 检测 miR-462 和 miR-731 的表达量。结果显示, miR-462 和 miR-731 表达量显著上调($P < 0.01$, 图 1a)。另外, 与对照组相比, 转染 miR-462 mimics、miR-731 mimics 后三羧酸循环过程中关键基因苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, *mdh*)、 α -酮戊二酸脱氢酶(oxoglutarate dehydrogenase, *ogdh*)、*cs* 含量, 具体步骤按照说明书进行操作。

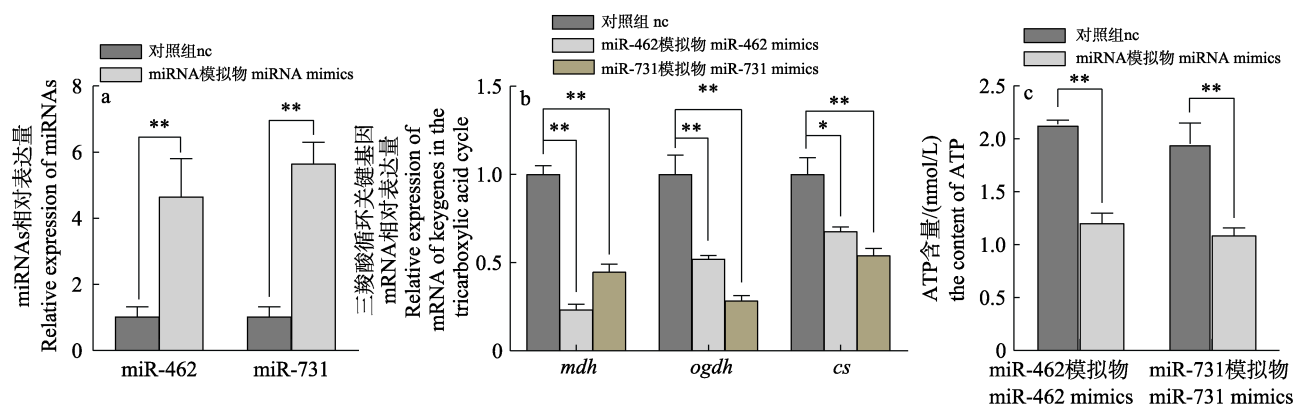


图 1 miR-462-731 过表达后三羧酸循环关键基因 mRNA 表达及 ATP 含量的变化

a. miR-462 和 miR-731 表达水平; b. 三羧酸循环中关键基因的表达量; c. ATP 含量。

nc 为对照组, *表示差异显著($P < 0.05$), **表示差异极显著($P < 0.01$)。

Fig. 1 Changes of the mRNA expression of key genes in the tricarboxylic acid cycle and ATP contents after miR-462-731 overexpression

a. Expression level of miR-462 and miR-731; b. mRNA expression of key genes in the tricarboxylic acid cycle; c. ATP contents. nc: control, * means significant difference ($P < 0.05$), ** means extremely significant difference ($P < 0.01$).

ogdh)、柠檬酸合酶(citrate synthetase, cs)的 mRNA 水平均显著下降($P<0.05$, 图 1b), 同时细胞中 ATP 含量也显著降低($P<0.01$, 图 1c), 说明 miR-462 和 miR-731 过表达可以抑制细胞三羧酸循环过程, 进而减少 ATP 生成, 降低细胞能量代谢。

2.2 miR-462-731 过表达影响线粒体膜电位

正常细胞中 JC-1 染料以聚合物形式聚集在线

粒体中而发出红色荧光, 膜电位下降后 JC-1 变成单体存在于胞质中而发出绿色荧光。基于 JC-1 检测结果显示, 与对照组相比, 转染 miR-462 模拟物和 miR-731 模拟物后细胞中红色荧光信号减弱而绿色荧光信号显著增强($P<0.01$, 图 2), 说明 miR-462 和 miR-731 过表达会降低细胞线粒体膜电位。

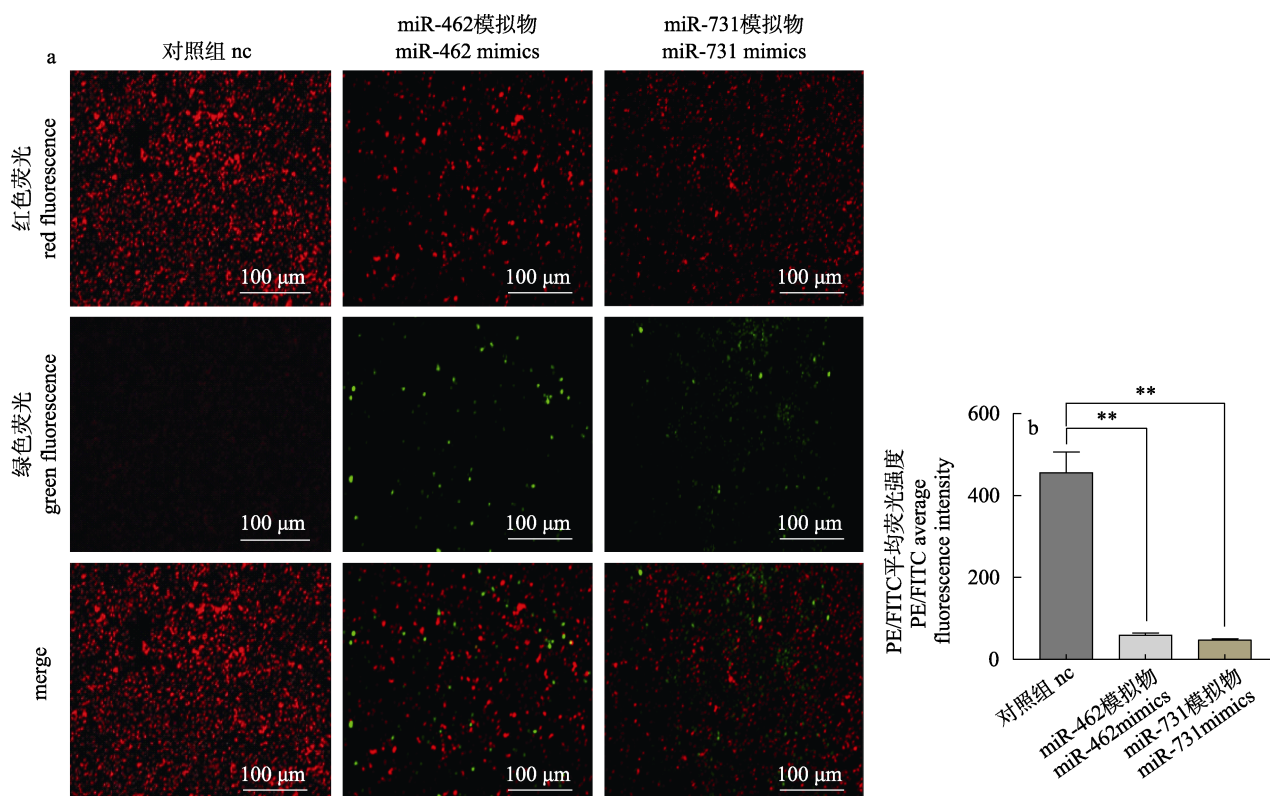


图 2 miR-462-731 过表达导致草鱼细胞线粒体膜电位降低

a. miR-462-731 过表达后线粒体膜电位的检测, 红色荧光表示正常细胞 JC-1 以聚合物形式存在, 绿色荧光表示细胞膜电位下降 JC-1 以单体形式存在; b. 红绿荧光强度比值. **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 2 miR-462-731 overexpression leading to decrease in the mitochondrial membrane potential of *Ctenopharyngodon idella* cells. a. The mitochondrial membrane potential detection after miR-462-731 overexpression, red fluorescence indicated that JC-1 existing in polymer form in normal cells, and green fluorescence indicated that JC-1 existing in monomer form after the cell membrane potential decreased; b. Red-green fluorescence intensity ratio. nc for control, ** means extremely significant difference ($P<0.01$).

2.3 miR-462-731 过表达导致 ROS 含量升高

DCFH-DA 荧光分子探针本身没有荧光, 当其进入细胞内会被水解为 DCFH, 而 ROS 可以氧化 DCFH 发出强绿色荧光。基于 DCFH-DA 检测发现, 与对照组相比, miR-462 mimics 和 miR-731 mimics 转染后绿色荧光的强度明显增强($P<0.01$, 图 3), 说明 miR-462-731 过表达会引起细胞中 ROS 含量上升。

2.4 miR-462-731 过表达影响细胞抗氧化能力

为了解 miR-462-731 对细胞抗氧化能力的影响, 本研究分析了 miR-462-731 过表达后 SOD 活性及 T-AOC 和 MDA 含量的变化。结果如图 4 所示, miR-462 mimics 和 miR-731 mimics 转染后都会导致 T-AOC 及 SOD 活性显著下降($P<0.05$), 而 MDA 含量显著升高($P<0.01$), 这说明 miR-462 和 miR-731 过表达会降低细胞抗氧化能力。

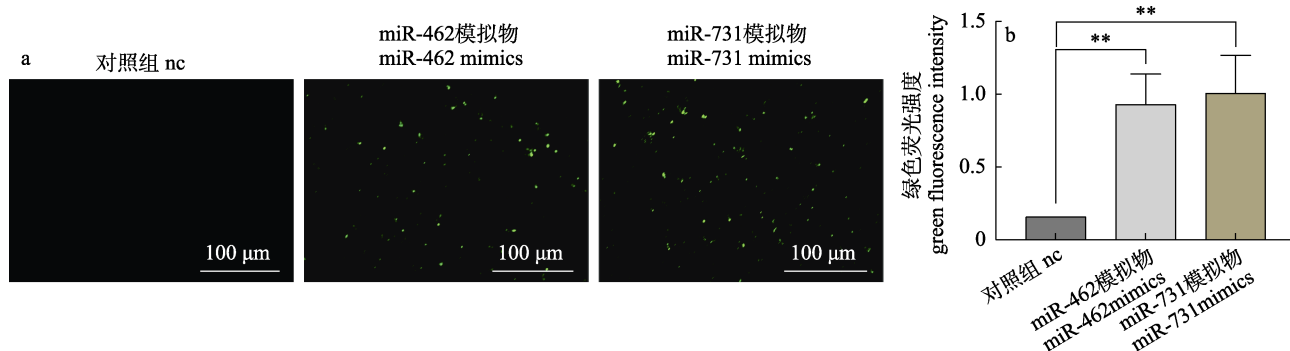


图 3 miR-462-731 过表达导致 ROS 含量升高

a. miR-462-731 过表达后 ROS 含量检测, DCFH 被 ROS 氧化可发出绿色荧光; b. 绿色荧光强度. **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 3 Overexpression of miR-462-731 resulting in elevated ROS content

a. The ROS detection after miR-462-731 overexpression, DCFH was oxidized by ROS and emitted green fluorescence;

b. Green fluorescence intensity. ** means extremely significant difference ($P<0.01$).

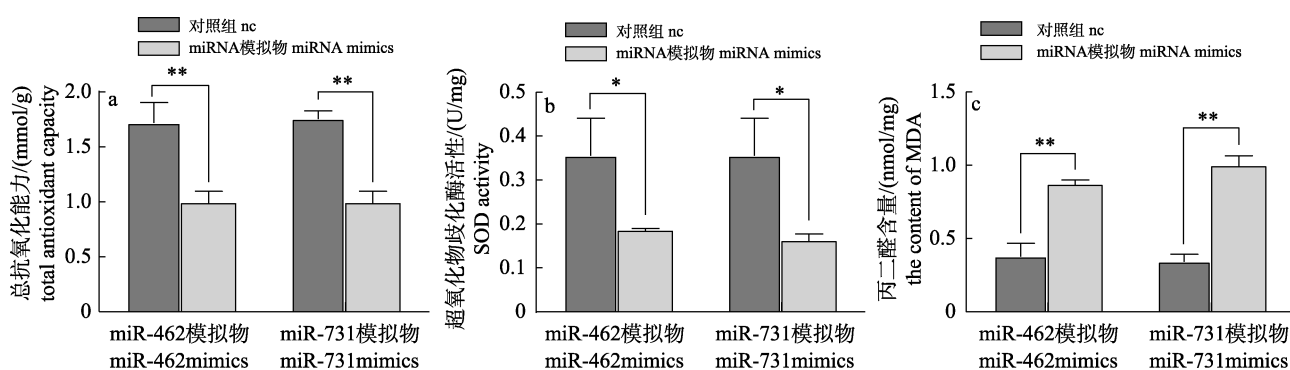


图 4 miR-462-731 过表达降低细胞抗氧化能力

a. T-AOC; b. SOD 活性; c. MDA 含量. *表示差异显著($P<0.05$). **表示差异极显著($P<0.01$).

Fig. 4 Overexpression of miR-462-731 reduced cellular antioxidant capacity

a. T-AOC; b. SOD activity; c. MDA content. nc for control, * means significant difference ($P<0.05$),

** means extremely significant difference ($P<0.01$).

2.5 细胞超微结构观察

透射电子显微镜结果显示, 对照组细胞线粒体数量较多而且线粒体结构完整, 没有损伤, 而 miR-462 mimics 和 miR-731 mimics 处理后会损伤线粒体嵴结构, 出现空泡化(图 5), 说明 miR-462 和 miR-731 过表达都会导致线粒体结构受损。

3 讨论

水中溶解氧是影响鱼类生长的重要因素, 低氧能够降低线粒体有氧呼吸及供能, 进而影响鱼类的正常生理活动。本研究在草鱼肝脏细胞过表达在低氧应答中显著上调的 miR-462-731 簇, 分析 miR-462-731 在草鱼线粒体中的作用。

三羧酸循环是生物体内产生能量的主要途径^[18],

关键酶发生异常, 细胞的能量代谢将会受到严重的影响^[19], 进而影响组织器官正常生理活动^[20-21]。本研究中, 过表达 miR-462-731 后发现三羧酸循环关键酶基因 *mdh*、*ogdh*、*cs* 表达量显著降低, 且 ATP 含量显著下降。基于转录组分析也发现 miR-462-731 敲降后与氧化磷酸化及糖酵解相关的通路显著富集^[12], 说明 miR-462-731 参与细胞能量代谢。线粒体膜电位形成于内膜两侧质子及其他离子浓度的不对称分布, 线粒体膜电位的降低会抑制 ATP 生成, 进而影响细胞能量代谢, 造成细胞凋亡^[22]。线粒体嵴是重要的线粒体超微结构, 线粒体嵴基粒中含有 ATP 合成酶, 能利用呼吸链产生的能量合成 ATP, 而嵴的缺失会导致线粒体能量代谢异常^[23]。斑马鱼中 miR-462-731 过表达可以促进细胞凋亡^[12], 而本研究也发现该基

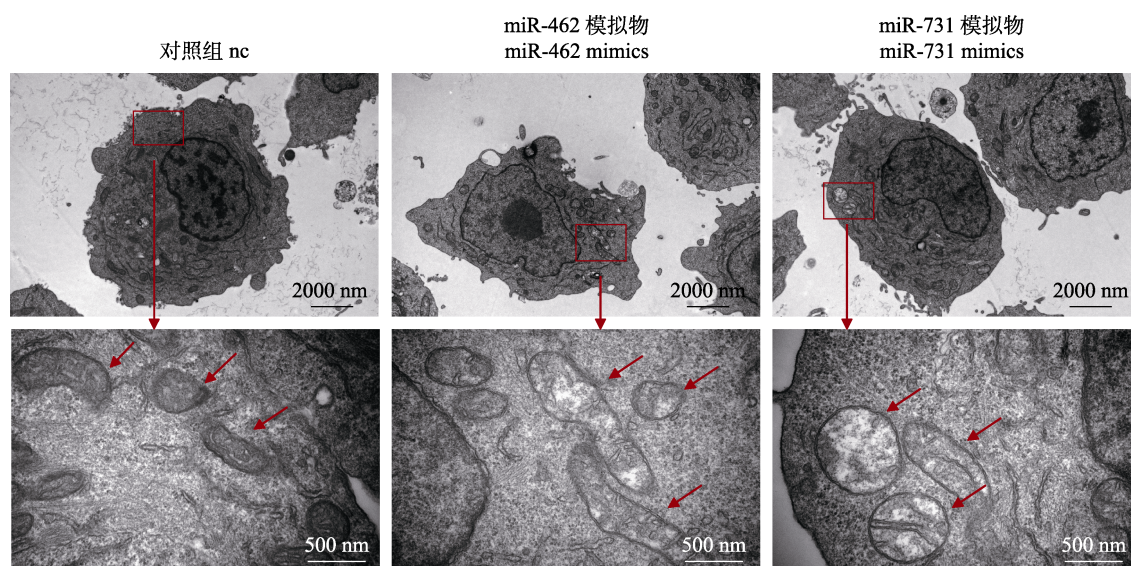


图 5 miR-462-731 过表达后细胞超微结构变化
箭头表示线粒体。

Fig. 5 Ultrastructural changes in cells after overexpression of miR-462-731
Arrows indicated mitochondria.

因簇过表达会降低线粒体膜电位, 导致线粒体结构异常, 说明该基因簇可通过影响线粒体功能参与细胞过程。有研究表明 miR-462-731 靶向作用于 *aldh9a1*、*pdhb* 和 *dlat* 基因^[12]。*aldh9a1* 参与糖代谢等过程^[24]; *pdhb* 是连接糖酵解和三羧酸循环的关键基因, 在氧化磷酸化中有重要作用, *pdhb* 的过表达能够促使丙酮酸代谢进入三羧酸循环过程, 进而抑制细胞增殖与生殖^[25-26]; *dlat* 基因能够通过柠檬酸循环-氧化磷酸化途径参与物质能量代谢过程^[27]。因此, 本研究推测 miR-462-731 可能通过 *aldh9a1*、*pdhb* 和 *dlat* 基因参与线粒体能量代谢, 进而影响草鱼生长, 然而这种调控关系有待进一步研究。

本研究还发现过表达 miR-462-731 后细胞 ROS 含量显著升高, 同时 T-AOC 以及 SOD 活性降低, 而 MDA 含量增加。线粒体是机体产生 ROS 的关键场所^[28], ROS 的过量产生会对线粒体代谢产生不良影响。ROS 还具有促进脂质过氧化生成的作用, 其中 MDA 是重要标志物之一^[29], MDA 在细胞发生氧化应激时会大量生成, 造成细胞损伤。ROS 的升高还能造成 SOD 活性下降^[30], SOD 是生物体内非常重要的抗氧化酶, T-AOC 包含生物体内多种抗氧化大分子与抗氧化小分子, SOD

与 T-AOC 降低会导致细胞抗氧化能力减弱^[31-32]。研究发现 miR-462-731 靶向作用于 *foxO1* 与 *foxO3*^[12], 而这两个基因参与机体氧化应激等途径^[33-34]。因此, 本研究推测 miR-462-731 可能通过 *foxO1* 与 *foxO3* 基因参与机体氧化应激过程进而参与草鱼低氧调节。

综上, 本研究发现 miR-462-731 过表达能够损伤草鱼线粒体, 降低线粒体有氧呼吸, 对草鱼健康养殖产生不利影响。同时进一步完善了 miR-462-731 的功能研究, 为草鱼及其他硬骨鱼类低氧调节机制及耐低氧品系的选育提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] Erichsen Jones J R. The reactions of fish to water of low oxygen concentration[J]. Journal of Experimental Biology, 1952, 29(3): 403-415.
- [2] Hermes-Lima M, Moreira D C, Rivera-Ingraham G A, et al. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2015, 89: 1122-1143.
- [3] Aksakal E, Ekinci D. Effects of hypoxia and hyperoxia on growth parameters and transcription levels of growth, immune system and stress related genes in rainbow trout[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular

- & Integrative Physiology, 2021, 262: 111060.
- [4] Landry C A, Steele S L, Manning S, et al. Long term hypoxia suppresses reproductive capacity in the estuarine fish, *Fundulus grandis*[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2007, 148(2): 317-323.
- [5] Lim L P, Lau N C, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. Nature, 2005, 433(7027): 769-773.
- [6] Wang R Z, Zeng C X, Zhuang S M. MicroRNA regulatory network and cancer[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2010, 22(7): 634-640. [王锐智, 曾春贤, 庄诗美. microRNA 调控网络与肿瘤[J]. 生命科学, 2010, 22(7): 634-640.]
- [7] Li W S, Wang D F. A review of microRNA research in fish[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(4): 628-639. [李文笙, 王东方. 鱼类 microRNA 研究进展[J]. 水产学报, 2017, 41(4): 628-639.]
- [8] Greco S, Martelli F. MicroRNAs in hypoxia response[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2014, 21(8): 1164-1166.
- [9] Seok J K, Lee S H, Kim M J, et al. MicroRNA-382 induced by HIF-1 α is an angiogenic miR targeting the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(12): 8062-8072.
- [10] Lai E C, Tomancak P, Williams R W, et al. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes[J]. Genome Biology, 2003, 4(7): R42.
- [11] Huang C H, Chen N, Huang C X, et al. Involvement of the miR-462/731 cluster in hypoxia response in *Megalobrama amblycephala*[J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2017, 43(3): 863-873.
- [12] Huang C X, Chen N, Wu X J, et al. The zebrafish miR-462/miR-731 cluster is induced under hypoxic stress via hypoxia-inducible factor 1 α and functions in cellular adaptations[J]. FASEB Journal, 2015, 29(12): 4901-4913.
- [13] Huang Y, Huang C X, Wang W F, et al. Zebrafish miR-462-731 is required for digestive organ development[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 2020, 34: 100679.
- [14] Schyth B D, Bela-Ong D B, Jalali S A H, et al. Two virus-induced microRNAs known only from teleost fishes are orthologues of microRNAs involved in cell cycle control in humans[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0132434.
- [15] Zhang B C, Zhou Z J, Sun L. Pol-miR-731, a teleost miRNA upregulated by megalocytivirus, negatively regulates virus-induced type I interferon response, apoptosis and cell cycle arrest[J]. Scientific Reports, 2016, 6(7): Article No.28354.
- [16] Wang A Q. Verification of the target genes of grass carp miR-462 and functional analysis of target gene family[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [王安琪. 草鱼 miR-462 靶基因验证及靶基因家族功能分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [17] Fang Y. Study on the function of *Gadd45* family genes and related miRNAs in grass carp[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University. [方圆. 草鱼 *Gadd45* 家族基因及相关 miRNA 功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [18] Newsholme P, Curi R, Gordon S, et al. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages[J]. Biochemical Journal, 1986, 239(1): 121-125.
- [19] Williams N C, O'Neill L A J. A role for the Krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: Article No.141.
- [20] VanItallie T B. Parkinson disease: Primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction[J]. Metabolism, 2008, 57(Suppl 2): S50-S55.
- [21] Bender A, Krishnan K J, Morris C M, et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease[J]. Nature Genetics, 2006, 38(5): 515-517.
- [22] Farshori N N. Verbesina encelioides-induced cytotoxicity and mitochondria-mediated apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation[J]. Biologia, 2021, 76(9): 2711-2720.
- [23] Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism[J]. Nature, 1961, 191(4784): 144-148.
- [24] Marchitti S A, Bocker C, Stagos D, et al. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: The aldehyde dehydrogenase superfamily[J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2008, 4(6): 697-720.
- [25] Zhu Y Z, Wu G, Yan W F, et al. MiR-146b-5p regulates cell growth, invasion, and metabolism by targeting PDHB in colorectal cancer[J]. American Journal of Cancer Research, 2017, 7(5): 1136-1150.
- [26] Tang H B, Luo X G, Li J, et al. Pyruvate dehydrogenase B promoted the growth and migration of the nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Tumour Biology, 2016, 37(8): 10563-10569.
- [27] Patel M S, Nemeria N S, Furey W, et al. The pyruvate dehydrogenase complexes: Structure-based function and regulation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(24): 16615-16623.
- [28] Mela L. Direct and indirect effects of endotoxin on mitochondrial

- function[J]. Progress in Clinical and Biological Research, 1981, 62: 15-21.
- [29] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges[J]. Analytical Biochemistry, 2017, 524: 13-30.
- [30] Guo M D, Zhu C H, Fu R Z, et al. Ginsenoside Rk3 regulates nonalcoholic steatohepatitis by modulation of intestinal flora and the PI3K/AKT signaling pathway in C57BL/6 mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(24): 9370-9380.
- [31] Li A X, Zheng N N, Ding X D. Mitochondrial abnormalities: A hub in metabolic syndrome-related cardiac dysfunction caused by oxidative stress[J]. Heart Failure Reviews, 2022, 27(4): 1387-1394.
- [32] Farshori N N. Verbesina encelioides-induced cytotoxicity and mitochondria-mediated apoptosis in human colon cancer cells through ROS generation[J]. Biologia, 2021, 76(9): 2711-2720.
- [33] Xu X H, Zheng N, Chen Z N, et al. Puerarin, isolated from *Pueraria lobata* (Willd.), protects against diabetic nephropathy by attenuating oxidative stress[J]. Gene, 2016, 591(2): 411-416.
- [34] Ni Y J, Deng J, Liu X, et al. Echinacoside reverses myocardial remodeling and improves heart function via regulating SIRT1/FOXO3a/MnSOD axis in HF rats induced by isoproterenol[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2021, 25(1): 203-216.

Effects of miR-462-731 on the mitochondrial function of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*

SONG Ankang, SUN Tiantian, LIN Junzhao, LIU Hong, WANG Huanling

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University; Key Laboratory of Freshwater Biological Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China

Abstract: Oxygen is necessary for fish survival, and low oxygen levels affect the growth, reproduction, and survival of fish. miR-462 and miR-731 are located in the same gene cluster (miR-462-731), which is unique to teleost fish; the expression of this gene cluster is significantly upregulated in hypoxic environments. Mitochondria are the centers of energy metabolism and use oxygen for aerobic respiration to power the body. The function of miR-462-731 is speculated to be related to the mitochondria. To investigate whether the miR-462-731 cluster could regulate mitochondrial function in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), we analyzed the effects of miR-462 and miR-731 overexpression on the biological function of mitochondria in grass carp liver cells. The mRNA expression levels of key enzyme genes in the tricarboxylic acid cycle were detected by qRT-PCR after the overexpression of miR-462 and miR-731, and the expression of *mdh*, *ogdh* and *cs* significantly decreased. Simultaneously, the ATP content was significantly reduced. The JC-1 probe was used to detect the mitochondrial membrane potential of cells after transfection. The content of reactive oxygen species (ROS) in the cells increased significantly, whereas the total antioxidant capacity (T-AOC) and superoxide dismutase (SOD) activity decreased significantly; however, the content of malondialdehyde (MDA) increased. Electron microscopy revealed that the overexpression of miR-462 and miR-731 led to mitochondrial structural damage. In conclusion, this study found that overexpression of miR-462-731 could reduce cellular energy metabolism and the antioxidant capacity of grass carp liver, destroy mitochondrial structure, and affect mitochondrial function. This study further improved the functional study of miR-462-731 and provided a theoretical basis for the hypoxic regulation mechanism and hypoxic tolerance of grass carp and other bony fishes.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; miR-462-731; energy metabolism; mitochondrial membrane potential; oxidative stress; cellular ultrastructure

Corresponding author: WANG Huanling. E-mail: huanlingok@mail.hzau.edu.cn