

DOI: 10.12264/JFSC2023-0145

翘嘴鲌 MyomiRs 时空表达特征及靶向 Pax7 的预测分析

曾维^{1,2}, 朱鑫², 程聪益², 孟杨杨², 张宇², 宾琴², 李灿¹, 褚武英², 陈韬¹

1. 湖南农业大学动物医学学院, 湖南 长沙 410128;

2. 长沙学院生物与化学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: MyomiRs 为一类肌肉特异性 microRNAs (miRNAs), 对于肌细胞的增殖和分化具有重要作用。本研究旨在探究翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*) 4 种 MyomiRs 基因(*miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499*)的时空表达及其在短期饥饿胁迫下的表达特征, 并预测分析 4 种 MyomiRs 对 *Pax7* 的调控作用。应用实时荧光定量 PCR 检测 4 种 MyomiRs 在翘嘴鲌不同组织、胚后不同发育阶段的白肌以及饥饿 5 d 白肌中的表达情况, 并利用 RNAhybrid 对 4 种 MyomiRs 与 *Pax7* mRNA 3'UTR 的靶向位点进行预测。结果显示, *miR-1a*、*miR-133a-3p* 和 *miR-206* 在 D60 (出膜后 60 d)高表达, *miR-499* 在 D100 高表达。*miR-1a* 和 *miR-133a-3p* 在红肌、白肌和心肌中高表达, 在其他组织中表达量低。*miR-206* 在红肌和白肌中高表达, 在其他组织中表达量较低。*miR-499* 在心肌中表达量较高, 在红肌和白肌中的表达量次之, 其他组织中表达量低。饥饿 5 d 后 4 种 MyomiRs 的表达均显著上升, 表明鲌骨骼肌可能对饥饿胁迫做出应激反应, 通过上调 4 种 MyomiRs 的表达来调节代谢等生理过程。靶基因预测发现 *miR-1a*、*miR-133a-3p* 和 *miR-206* 与 *Pax7* 的 3'UTR 存在结合位点, 进一步通过荧光定量 PCR 验证, *miR-206* 和 *Pax7* 在翘嘴鲌胚后不同发育阶段以及昼夜节律性的表达趋势相反。本研究结果表明, *miR-1a* 和 *miR-133a-3p* 具有肌肉特异性, *miR-206* 和 *miR-499* 为肌源性组织中富集型表达。此外, *miR-206* 可能直接调控 *Pax7* 的表达, 进而调控翘嘴鲌幼鱼时期肌细胞的增殖和分化从而影响肌肉的生长发育。

关键词: 翘嘴鲌; MyomiRs; 骨骼肌; 表达特征; 昼夜节律

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)08-0933-09

MicroRNA (miRNA)是一类短的、内源性非编码的 RNA, 结合在靶基因的 3'UTR (untranslated regions, UTR), 抑制 mRNA 翻译或降解 mRNA 以调控基因表达^[1], 其序列在各种动物中都具有很强的保守性^[2]。根据 miRNA 在组织的表达和分布情况, 将 miRNA 分为组织特异性或组织富集表达类型。与其他组织的平均值相比, “组织特异性” miRNA 指在特定组织中的表达水平是其他组织平均值的 20 倍或更高, 而“组织富集型” miRNA 其表达水平与其他组织的平均值相比低于 20 倍^[3]。在骨骼肌中唯一或优先表达的 miRNA 被称为 MyomiRs^[4], 目前已发现 8 种 MyomiRs: *miR-1*、

miR-133a、*miR-133b*、*miR-206*、*miR-208a*、*miR-208b*、*miR-486* 和 *miR-499*。MyomiRs 参与骨骼肌生长和发育的各个过程, 在肌肉生长发育过程中起到重要的调控作用^[5]。Sui 等^[6]研究发现 *miR-1a* 通过抑制山羊(*Capra hircus*) *HDAC4* 的转录后表达促进肌肉发育。*miR-1* 和 *miR-133* 对调控斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎肌肉的基因表达有重要的影响, 干扰 *miR-1* 和 *miR-133* 会导致快速骨骼肌中肌动蛋白的肌体组织被破坏^[7]。但 MyomiRs 在翘嘴鲌中是否具有肌肉特异性以及发育过程中的表达模式尚不明确。

Pax7 是卫星细胞中表达的标志性基因, 主要

收稿日期: 2023-06-15; 修订日期: 2023-07-10.

基金项目: 国家自然科学基金项目(U21A20263, 31820103016, 32002370); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40629).

作者简介: 曾维(1999–), 男, 硕士, 研究方向为鱼类品质调控. E-mail: 2330610838@qq.com

通信作者: 陈韬, 教授, 研究方向为分子生物学. E-mail: chentao_114@163.com

存在于肌卫星细胞增殖阶段,促进肌卫星细胞的增殖,并抑制肌卫星细胞的分化,对调节卫星细胞的增殖和分化至关重要^[8-9]。利用 Cre 重组酶腺病毒感染原代成肌细胞致使 *Pax7* 缺失后,肌卫星细胞和成肌细胞表现出细胞周期停滞和肌源性调节因子失调^[10]。已有研究表明, *miR-1a* 和 *miR-206* 在卫星细胞分化过程中急剧上调,限制肌卫星细胞增殖并且抑制 *Pax7* 的表达,从而促进肌卫星细胞分化^[11-12]。在小鼠中 *miR-133b*、*miR-206* 和 *Pax7* 存在调控关系。利用 *miR-133b* 或 *miR-206* 模拟物转染小鼠(*Mus musculus*)成肌细胞,导致 *Pax7* mRNA 和蛋白水平下降, *miR-133b* 模拟物和 *miR-206* 模拟物抑制了 *Pax7* mRNA 的表达^[13]。在翘嘴鲌中 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 是否能够直接调控 *Pax7* 的表达进而调控肌肉生长、发育和分化也尚未知。

翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)是一种肉食性鱼类,主要捕食小型鱼类及虾类。其具有高蛋白、富含氨基酸且易吸收等特点,具有很高的营养价值^[14]。但在自然环境下其生长发育容易受到食物匮乏等自然因素影响,可能导致鱼类肠道功能和肌肉支链氨基酸的显著改变^[15-16]。在饥饿期间 miRNA 对肌肉生长可能有重要的调节作用^[17]。根据本实验室已有翘嘴鲌 miRNA 序列数据库^[18],已鉴定出 *miR-1*、*miR-133a-3p*、*miR-133b-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 的序列。*miR-133a-3p* 和 *miR-133b-3p* 是 *miR-133* 家族的两个成员,并在不同发育阶段 *miR-133a* 和 *miR-133b* 具有相似的表达模式^[19],故本研究对翘嘴鲌胚后 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 在不同发育阶段的白肌和各组织中的表达模式及其在短期饥饿胁迫下的表达特征进行了分析。并通过靶基因在线预测网站 RNAhybrid,初步预测 4 种 MyomiRs 与 *Pax7* 之间的调控关系,为后续研究 MyomiRs 对翘嘴鲌胚后肌肉发育、饥饿胁迫对 MyomiRs 的影响以及 MyomiRs 可能调控的靶基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用翘嘴鲌来自湖南省水产科学研究所

鳊鱼原种场。

1.2 实验方法

1.2.1 翘嘴鲌胚后不同阶段白肌样品采集 翘嘴鲌胚后不同发育时间点记为 *D_n* (出膜后第 *n* 天),翘嘴鲌出膜 1 周后,分别转入水泥池中培育,培育水温为(24±1) °C,溶解氧为(8.0±0.2) mg/L, pH 7.4~7.7。自开口摄食起,投喂相同的足量适口活饵料鱼。分别在 *D20*、*D30*、*D45*、*D60*、*D100* 和 *D150* 随机选取 5 尾规格大小一致的翘嘴鲌,使用 100 mg/L MS-222 对翘嘴鲌进行麻醉并于冰上解剖,快速取背鳍起点下背侧的白肌保存于装有 1 mL Trizol 的离心管中,并用液氮快速冷冻,保存在-80 °C超低温冰箱内。

1.2.2 翘嘴鲌短期饥饿实验及组织样品收集 挑选健康且体重相近的翘嘴鲌(145±12) g 15 尾,随机挑选 5 尾鱼,使用 100 mg/L MS-222 对翘嘴鲌进行麻醉,在冰上分别取其心、肝、脾、肠、肾、红肌、白肌,并保存于-80 °C超低温冰箱备用。剩余的 10 尾鱼均分为两组,对照组分早晚两次给予充足的饵料,实验组不进行饲喂,饥饿胁迫 5 d 后,使用相同方法麻醉后于冰上取其白肌,并保存于-80 °C超低温冰箱备用。

1.2.3 翘嘴鲌昼夜节律实验及组织样品收集 挑选健康无病且体重相近的翘嘴鲌 45 尾,体重(145±12) g。采用 12 L:12D 的光周期进行 30 d 的驯养实验。在驯养期间给予充足的饵料。采样时间在一昼夜的 9 个时间点,每隔 3 h 采样 1 次,具体的取样时间和对应区时与朱鑫等^[20]实验设计一致。每个时间点随机挑选 5 尾鱼,分别取适量背鳍起点下背侧白肌组织,用液氮快速冷冻,并保存于-80 °C超低温冰箱内备用。

1.2.4 RNA 提取及 cDNA 合成 所有组织样品的总 RNA 使用 Trizol 法提取(RNAiso Plus, 宝日医生物, 中国),通过超微量分光光度计(NanoPhotometer-NP80, implen, 德国)和 2%的琼脂糖凝胶电泳检测提取 RNA 的浓度和质量。取 1 µg 的总 RNA 采用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒合成 cDNA 第 1 链。合成的单链 cDNA 收集保存至-80 °C。用于 miRNA 定量的 cDNA 采用 TaKaRa 公司的

Mir-X™ miRNA First-Strand Synthesis 方法。反应条件为 37 ℃, 60 min [Poly (A)加尾和反转录反应], 85 ℃, 5 min (酶失活)。模板均稀释 50 倍用于 qRT-PCR 反应。

1.2.5 引物设计与合成 根据本实验室已有翘嘴鳊 miRNA 序列数据库^[18]设计 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 荧光定量 PCR 的上游引物, *Pax7* 的 cDNA 序列(XM_044171555)在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查询获得。引物利用 Primer 5.0 软件进行设计, 引物序列见表 1, 设计的引物由擎科生物有限公司合成。miRNA 定量的下游引物和内参基因引物为试剂盒提供。

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') primer sequence (5'-3')
<i>miR-1a</i> -F	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT
<i>miR-133a-3p</i> -F	TTTGGTCCCTTCAACCAGCTG
<i>miR-206</i> -F	TGGAATGTAAAGGAAGTGTGTG
<i>miR-499</i> -F	TTAAGACTTGCAGTGATGTTTA
<i>Pax7</i> -F	GGATGCCAACTTTACCCACA
<i>Pax7</i> -R	CTGTGGCGATTGGATGAGAG

1.2.6 荧光定量 荧光定量反应总体系为 25 μL, 包括 SYBR Premix Ex Taq™ II 12.5 μL, 反转录合成的 cDNA 模板 1 μL, 无酶水 9.5 μL, 上游引物和下游引物各 1 μL。反应按 94 ℃预变性 3 min, 94 ℃变性 5 s, 60 ℃退火, 20 s 延伸, 反应 39 个循环。

1.2.7 数据处理 使用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析, miRNA 和基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[21]。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)差异性统计检验, 所有数据进行 Shapiro-Wilk 分析以检验数据正态分布性, Levene 分析以检验方差齐性, 多重比较选择 Tukey 法, miRNA 和基因的相对表达量表示为平均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$), 当显著性 $P < 0.05$ 认为两组数据之间差异显著。翘嘴鳊白肌中 *miR-206* 和 *Pax7* 的一昼夜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余弦函数方程式为 $f(t)=M+A\cos(t/\pi/12-\varphi)$ 的拟合。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 为余弦曲线中基因或 miRNA 表达量最高点所对应的弧度, 通过公式 $\varphi \times 12/\pi$ 换算成基因或 miRNA 表达量最高点所对应的时间点。当每个时间点数值差异显著($P < 0.05$), MATLAB 输出 $P < 0.3$ 时, 则表示该基因具有昼夜节律性。

2 结果与分析

2.1 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 在翘嘴鳊不同组织中的表达分析

miR-1a、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 在翘嘴鳊不同组织中的表达如图 1 所示, *miR-1a* 和 *miR-133a-3p* 在心肌、红肌和白肌的表达为其他组织的 20 倍以上, 在其他组织中的表达极低且之间无显著性差异($P > 0.05$), 表明 *miR-1a* 和 *miR-133a-3p* 表达具有肌肉特异性。*miR-206* 在红肌中的表达最高, 在白肌中的表达次之, 并且显著高于其他组织($P < 0.05$)。 *miR-499* 在心肌中表达较高, 红肌和白肌中的表达次之, 在其他组织中表达较低且之间无显著性差异($P > 0.05$), 表明 *miR-206* 和 *miR-499* 在肌源性组织中富集性表达。

2.2 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 在翘嘴鳊胚后不同发育阶段的表达

据图 2 所示, *miR-1a*、*miR-133a-3p* 和 *miR-206* 在翘嘴鳊胚后不同发育阶段均有表达, 在翘嘴鳊幼鱼发育早期表达水平相对较低, 表达丰度随着幼鱼的发育逐渐增加, 在 D60 的表达量相对较高。 *miR-499* 在幼鱼发育前期的表达较低, 在 D100 和 D150 中表达较高。

2.3 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 在正常投喂和饥饿 5 d 后翘嘴鳊白肌中的表达分析

翘嘴鳊白肌组织的 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 在正常饲喂和饥饿 5 d 表达见图 3。经饥饿 5 d 处理, 实验组 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 的表达均显著上升($P < 0.05$)。

2.4 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 与 *Pax7* 靶向位点预测

通过靶基因在线预测网站 RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)分析,

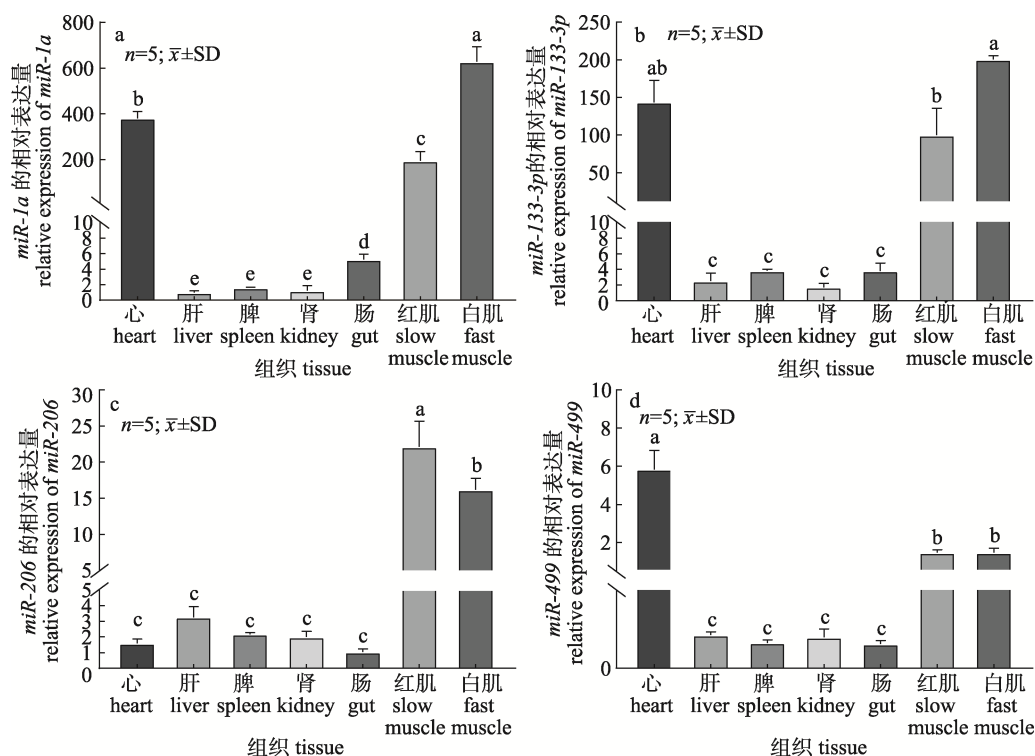


图 1 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 在翘嘴鲌不同组织中的相对表达丰度

不同字母表示不同组织之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Relative expression of *miR-1a*, *miR-133a-3p*, *miR-206* and *miR-499* in different tissues of *Siniperca chuatsi*. Different letters indicate significant differences among different tissues ($P < 0.05$).

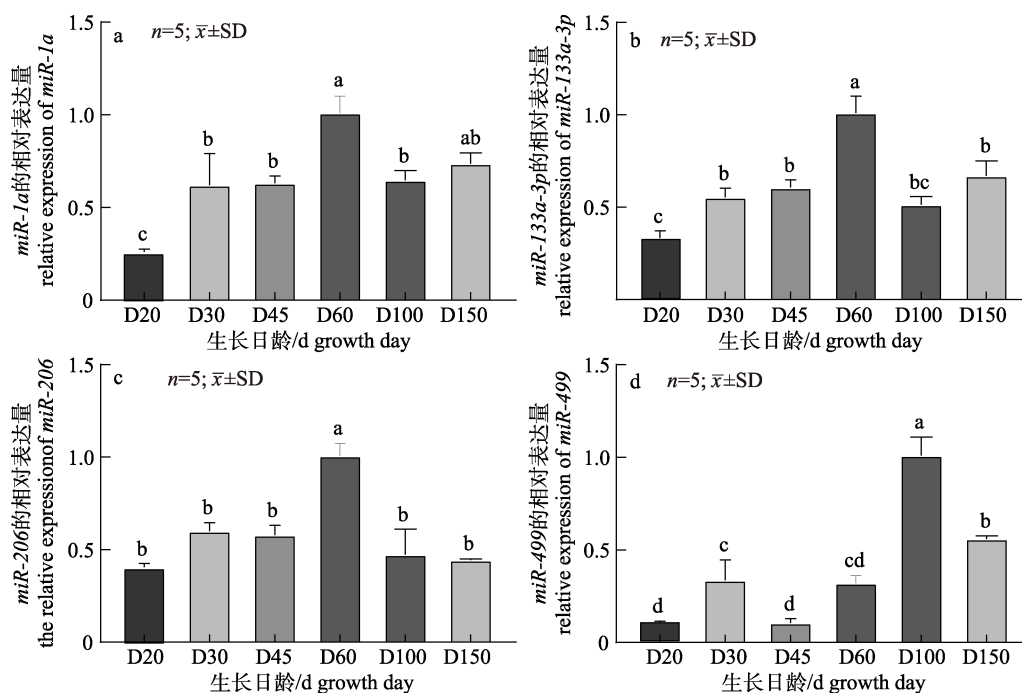


图 2 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 在翘嘴鲌白肌不同发育阶段的相对表达丰度

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. 2 Relative expression of *miR-1a*, *miR-133a-3p*, *miR-206* and *miR-499* in different developmental stages of *Siniperca chuatsi* white muscle. Different letters indicate significant differences among different developmental stages ($P < 0.05$).

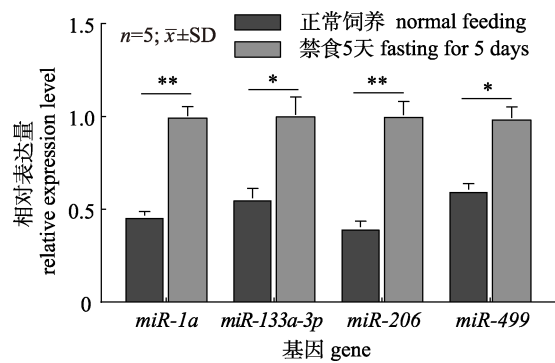


图 3 正常投喂和饥饿 5 d 后翘嘴鲌白肌中 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499* 的表达

*表示正常组与饥饿胁迫组表达的显著差异($P<0.05$).

Fig. 3 Expression of *miR-1a*, *miR-133a-3p*, *miR-206* and *miR-499* in *Siniperca chuatsi* white muscle with normal feeding and fasting for 5 d

* indicates the significant difference in expression between the normal group and the starvation group ($P<0.05$).

经翘嘴鲌基因组获取 *Pax7* 的 3'UTR 序列, 根据 miRNA 种子序列的靶向互补原则进行配对比较。结果显示, 翘嘴鲌 *Pax7* mRNA 的 3'UTR 序列与 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 存在结合靶位点(图 4)。最小折叠自由能(MFE)分别为-19.8 kcal/mol、-21.3 kcal/mol、-23.5 kcal/mol, 结合稳定性高。

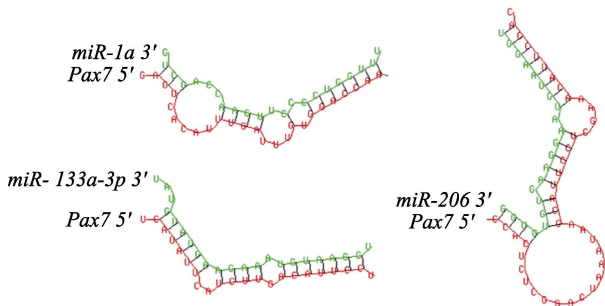


图 4 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 靶向 *Pax7* mRNA 3'UTR 位点预测

Fig. 4 Prediction of 3'UTR site of *Pax7* mRNA targeted by *miR-1a*, *miR-133a-3p* and *miR-206*

进一步利用荧光定量 PCR 检测 *Pax7* 在 D20、D30、D45、D60、D100 和 D150 的表达, 结果表明 *Pax7* 在 D20 的表达量较高, 在其他时期表达量较低且无明显差异(图 5)。同时检测 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 以及 *Pax7* 在翘嘴鲌白肌的昼夜节律性。结果发现 *Pax7* 在 D20 的表达量较高, 在其他时期表达量较低且无明显差异(图 5)。

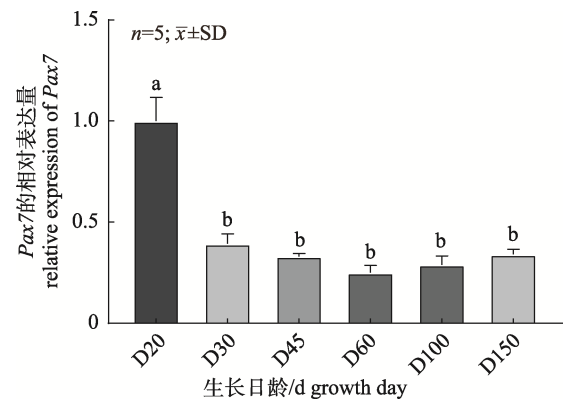


图 5 *Pax7* 在翘嘴鲌胚后不同发育阶段中的相对表达丰度

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. 5 Relative expression of *Pax7* in different developmental stages of *Siniperca chuatsi*

Different letters indicate significant differences between different development stages ($P<0.05$).

miR-1a、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *Pax7* 的表达均具有昼夜节律性($P<0.05$, $p<0.3$), 其中 *miR-206* 表达模式呈现光周期降低, 暗周期升高, 峰值相位位于 ZT 0.42 h (zeitgeber time, ZT)。 *Pax7* 的表达模式为光周期升高, 暗周期降低。峰值相位位于 ZT 11.73 h。 *miR-206* 的昼夜节律与 *Pax7* 的昼夜节律趋势相反。 *miR-1a* 和 *miR-133a-3p* 呈现昼高夜低的表达模式, 峰值相位位于 ZT 3~5 h 之间(表 2, 图 6)。

表 2 翘嘴鲌 <i>miR-1a</i> 、 <i>miR-13aa-3p</i> 、 <i>miR-206</i> 和 <i>Pax7</i> 表达的节律性参数				
Tab. 2 Rhythmic parameters of <i>miR-1a</i> , <i>miR-13aa-3p</i> , <i>miR-206</i> <i>miR-206</i> and <i>Pax7</i> expression in <i>Siniperca chuatsi</i>				
类别 category	振幅 amplitude	中值 mesor	峰值相位 acrophase	<i>P</i>
<i>miR-1a</i>	0.27	0.56	4.21	0.04
<i>miR-133a-3p</i>	0.24	0.51	3.34	0.06
<i>miR-206</i>	0.22	0.57	0.42	0.04
<i>Pax7</i>	0.26	0.60	11.73	0.14

根据皮尔曼等级相关系数, 将 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *Pax7* 进行两两相关性分析。 *miR-206* 和 *Pax7* 在翘嘴鲌昼夜节律($r=-0.749<-0.5$)以及胚后不同发育阶段($r=-0.534<-0.5$)均呈中度负相关(表 3)。推测在翘嘴鲌 *miR-206* 可能通过靶向调控 *Pax7* 基因的表达, 从而影响翘嘴鲌肌肉的生长发育。

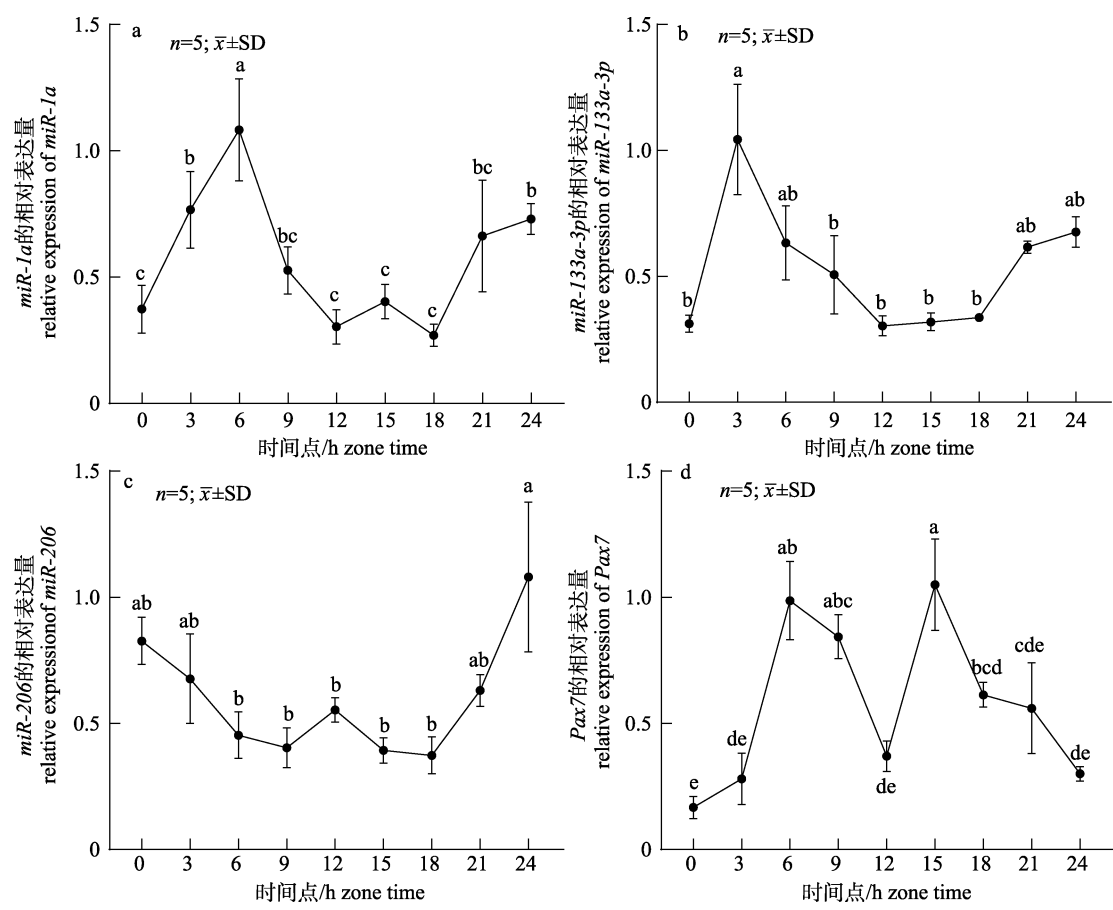


图 6 *miR-1a* (a)、*miR-133a-3p* (b)、*miR-206* (c)和 *Pax7* (d)在翘嘴鲈白肌中的表达
不同字母表示两组数据之间存在显著差异性($P<0.05$), X 轴中 0~12 为光照阶段, 12~24 为黑暗阶段。
Fig. 6 Expression of *miR-1a* (a), *miR-133a-3p* (b), *miR-206* (c) and *Pax7* (d) in *Siniperca chuatsi* white muscle
Different letters indicate significant differences between each time point ($P<0.05$). In the X axis, 0~12 is the illumination stage, and 12~24 is the dark stage.

表 3 翘嘴鲈白肌中 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *Pax7* 的相关性分析

类别 category	<i>Pax7</i>		
	<i>miR-1a</i>	<i>miR-133a</i>	<i>miR-206</i>
昼夜节律	0.207	-0.202	-0.749
胚后不同发育阶段表达	-0.859	-0.693	-0.534

注: $-0.79<r<-0.5$ 为中度负相关; $r\leq-0.8$ 为重度负相关; $-0.5<r<0.5$ 无相关性。
Note: $-0.79<r<-0.5$ indicates moderate negative correlation; $r\leq-0.8$ indicates severe negative correlation; $-0.5<r<0.5$ indicates no correlation.

3 讨论

MyomiRs 是一类在肌源性组织中特异性高表达的 miRNA。研究表明, 成熟的 *miR-1* 仅在人类

心肌中表达, 而在脑、肾、肝、肺等其他组织中不表达。Sempere 等^[22]通过 Northern 印迹分析了在小鼠和人类成年器官中特异性表达的 119 种 miRNA。研究发现, 30 种 miRNA 在特定的器官中特异性表达或大量富集。其中 *miR-1*、*miR-133a* 和 *miR-206* 属于骨骼肌富集型。*miR-499* 在斑马鱼心肌和骨骼肌中特异性表达^[23]。在本研究中, 翘嘴鲈 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 在肌源性组织中的表达显著高于其他组织, 其表达特征与其他物种的表达模式类似。但 MyomiRs 并非只在肌源性组织中表达。研究表明 *miR-1*、*miR-133a* 和 *miR-206* 在棕色预脂肪细胞和成熟脂肪细胞中高表达^[24]。*miR-499* 在猪 (*Sus scrofa domestica*) 睾丸组织中高表达, 并通过靶向 PTEN 基因的 PI3K/AKT 途径促进未成熟支持细胞的增

殖^[25]。*miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 在翘嘴鲌其他组织中存在一定量的表达, 其在翘嘴鲌其他组织中是否发挥调控作用有待进一步研究。骨骼肌是鱼类身体的重要组成部分, 骨骼肌约占鱼类体重的 40%~60%^[26], 骨骼肌的发育情况对鱼类的生长发育起到关键作用。而骨骼肌的发育受到内源性的 MyomiRs 以及饥饿等环境因素的影响。研究表明, miRNA 对骨骼肌的生长发育以及组织再生等都发挥重要作用, 肌肉特异性和组织富集表达的 miRNA 参与骨骼肌发育的各个阶段^[27-28]。Sui 等^[6]研究发现从新生山羊到 7 个月的山羊, *miR-1* 的表达呈现出增加的趋势, 并在进一步成熟时降低。*miR-1* 对新生山羊骨骼肌的生长和发育具有重要的调节作用。Zhou 等^[29]发现在产后第 120 天的猪背腰最长肌中, *miR-1a* 和 *miR-133a* 的表达水平达到最高。在胚后肌纤维生长中发挥重要作用。饥饿是影响器官发育、机体代谢以及后代发育重要的环境因素之一。研究表明, 雌性斑马鱼经饥饿胁迫后, 出现卵巢发育迟缓、产卵减少以及卵子增大等异常现象。此外, 母体饥饿会导致胚胎孵化延迟、发育抑制和幼鱼的运动障碍^[30]。饥饿可通过介导代谢从而影响人体的 miRNA 水平, 在禁食 10 d 后, 7 种代谢相关 miRNA 的表达水平显著变化^[31]。本研究检测 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 在翘嘴鲌胚后不同发育阶段以及饥饿 5 d 后的表达。结果表明, *miR-1a*、*miR-133a-3p* 和 *miR-206* 在不同发育阶段翘嘴鲌的白肌中, 在 D20 表达相对较低, 随着翘嘴鲌的生长在 D60 表达含量相对最高, 翘嘴鲌白肌中呈现出先上升后下降再上升的表达趋势, 与 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 在猪和山羊等动物中的表达趋势相同, 可能在翘嘴鲌中发挥类似的调控作用。MyomiRs 可能在翘嘴鲌发育 D60 发挥重要作用。但其具体的调控作用有待进一步研究。鲌在短期饥饿复投喂 1 h 后 *miR-133a-3p* 和 *miR-206* 的表达量都上升, 可能参与鱼类骨骼肌的快速反应信号系统, 以调控鱼类骨骼肌的生长^[32]。而在短期饥饿胁迫后, *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 的表达均显著上升。与短期饥饿复投喂后 *miR-133a-3p* 和

miR-206 的变化趋势相同。表明骨骼肌可能对饥饿胁迫做出应激反应, 通过上调 4 种 MyomiRs 的表达来调节代谢等生理过程。

研究表明, 静息态肌卫星细胞在多种刺激因素作用下, 开始进入激活态, 激活后的肌卫星细胞分化产生单核成肌细胞^[33]。*Pax7* 是已明确的静息期肌卫星细胞标记物, 能够抑制肌卫星细胞的表达, 而在肌卫星细胞激活期其表达量明显下调, 小鼠肌卫星细胞中的 *miR-206* 通过抑制 *Pax7* 的表达, 促进肌卫星细胞的分化^[10-11]。*miR-206* 的敲除会导致 *Pax3* 和 *Pax7* 蛋白水平的上调, 肌卫星细胞的增殖能力增强, 肌源性分化受损。*miR-206* 对肌卫星细胞从增殖到分化过程中具有重要的调控作用^[5]。本研究通过 RNAhybrid 预测 *miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 作用靶基因, 发现 *Pax7* 的 3'UTR 与 *miR-206* 具有结合位点。进一步检测 *Pax7* 在翘嘴鲌胚后不同发育阶段的表达以及昼夜节律性, 发现 *Pax7* 与 *miR-206* 表达趋势相反, *miR-206* 可能直接调控 *Pax7* 的表达, 并通过抑制 *Pax7* 的表达促进肌肉细胞的分化。

本研究探究翘嘴鲌 4 种 MyomiRs (*miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206*、*miR-499*) 的时空表达及其在短期饥饿胁迫下的表达特征, 研究表明 4 种 MyomiRs 在翘嘴鲌肌源性组织中高表达, 可能在翘嘴鲌发育 D60 发挥重要作用。*miR-1a*、*miR-133a-3p*、*miR-206* 和 *miR-499* 可能对饥饿胁迫下翘嘴鲌的应激反应具有重要的调控作用。通过对胚后表达特征以及昼夜节律性分析, 推测 *miR-206* 可能调控 *Pax7* 的表达来调节翘嘴鲌肌卫星细胞的分化。本研究揭示了 MyomiRs 在翘嘴鲌中的表达特征及其在短期饥饿胁迫下的影响, 并进一步预测了 *miR-206* 与 *Pax7* 之间的调控关系, 这有助于深入了解 MyomiRs 在肌肉发育中的作用机制。

参考文献:

- [1] Anna C A, Lidia C, Jamileh M, et al. Procyanidins modulate microRNA expression in pancreatic islets[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2013, 61(2): 355-363.
- [2] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs[J].

- Nature Genetics, 2005, 37(7): 766-770.
- [3] Lee E J, Baek M, Gusev Y, et al. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors[J]. RNA, 2008, 14(1): 35-42.
- [4] Tauli R, Bersani F, Foglizzo V, et al. The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2009, 119(8): 2366-2378.
- [5] Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development[J]. Developmental Biology, 2016, 410(1): 1-13.
- [6] Sui M, Zheng Q, Wu H, et al. The expression and regulation of miR-1 in goat skeletal muscle and satellite cell during muscle growth and development[J]. Animal Biotechnology, 2020, 31(5): 455-462.
- [7] Mishima Y, Abreu-Goodger C, Staton A A, et al. Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization[J]. Genes Development, 2009, 23(5): 619-632.
- [8] Zammit P S, Relaix F, Nagata Y, et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells[J]. Journal of Cell Science, 2006, 119(9): 1824-1832.
- [9] Zammit P S, Golding J P, Nagata Y, et al. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?[J]. Journal of Cell Biology, 2004, 166(3): 347-357.
- [10] Von M J, Jones A E, Parks R J, et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(41): 16474-16479.
- [11] Chen J F, Tao Y, Li J, et al. MicroRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7[J]. Journal of Cell Biology, 2010, 190(5): 867-879.
- [12] Dey B K, Gagan J, Dutta A. MiR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7[J]. Molecular and Cellular Biology, 2011, 31(1): 203-214.
- [13] Cui S, Li L, Mubarak S N, et al. Wnt/beta-catenin signaling induces the myomiRs miR-133b and miR-206 to suppress Pax7 and induce the myogenic differentiation program[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(8): 12740-12751.
- [14] Zhang J G, Shen Y J, Zhang C F. Advances in Research on Muscle Nutritional Value of *Siniperca chuatsi*[J]. Food Research And Development, 2019, 40(22): 209-214. [张家国, 沈益娟, 张长峰. 翘嘴鲌肌肉营养价值研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(22): 209-214.]
- [15] Day R D, Tibbetts I R, Secor S M. Physiological responses to short-term fasting among herbivorous, omnivorous, and carnivorous fishes[J]. Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systems and Environmental Physiology, 2014, 184(4): 497-512.
- [16] Li L, Chu W Y, Pan Y X, et al. Effects of short-term starvation on KLF15-BCAA signaling pathway in the muscle of *Procypris merus*[J]. Genomics and Applied Biology, 2021, 40(5-6): 1928-1933. [李莉, 褚武英, 潘亚雄, 等. 短期饥饿对禾花鲤肌肉 KLF15-BCAA 信号通路影响研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(5-6): 1928-1933.]
- [17] Lou Z, Zhao Y, Zhang Y, et al. MiR-2014-5p and miR-1231-5p regulate muscle growth of *Larimichthys crocea* by targeting MSTN gene[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2021, 252: 110535.
- [18] 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.
- [19] Koutsoulidou A, Mastroyiannopoulos N P, Furling D, et al. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle[J]. BMC Developmental Biology, 2011, 11(1): 1-9.
- [20] Zhu X, Ye S H, Li Y, et al. Temporal and spatial expression characteristics of miR-21 and regulation of adaptive rhythm expression under short-term starvation stress in *Siniperca chuatsi*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2022, 29(5): 665-672. [朱鑫, 叶苏杭, 李源, 等. 鳊 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[J]. 中国水产科学, 2022, 29(5): 665-672.]
- [21] 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.
- [22] Sempere L F, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation[J]. Genome Biology, 2004, 5(3): R13.
- [23] Kloosterman W P, Steiner F A, Berezikov E, et al. Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(9): 2558-2569.
- [24] Walden T B, Timmons J A, Keller P, et al. Distinct expression of muscle-specific microRNAs (Myomirs) in brown adipocytes[J]. Journal Of Cellular Physiol, 2009, 218(2): 444-449.
- [25] Gao H, Chen B, Luo H, et al. miR-499 promotes immature porcine Sertoli cell growth through the PI3K/AKT pathway by targeting the PTEN gene[J]. Reproduction, 2020, 159(2): 145-157.
- [26] Weatherley A H, Gill H, Casselman J M. Biology of Fish Growth[M]. London: Academic Press, 1987: 139-146.

- [27] 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, 6(40): 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, 6(40): 976-992.]
- [28] Du T N, Liu J M, Shi X E. Effects of competing endogenous RNA on proliferation and differentiation of skeletal muscle cells[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 37(9): 1131-1137. [杜天宁, 刘捷明, 史新娥. 竞争性内源 RNA 在骨骼肌细胞增殖分化中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(9): 1131-1137.]
- [29] Zhou B, Liu H L, Shi F X, et al. MicroRNA expression profiles of porcine skeletal muscle[J]. Animal Genetics, 2010, 41(5): 499-508.
- [30] Fan X, Hou T, Sun T, et al. Starvation stress affects the maternal development and larval fitness in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Science of the Total Environment, 2019, 695: 133897.
- [31] Ravanidis S, Grundler F, de Toledo F W, et al. Fasting-mediated metabolic and toxicity reprogramming impacts circulating microRNA levels in humans[J]. Food and Chemical Toxicology, 2021, 152: 112187.
- [32] Zhu X, Chen D, Hu Y, et al. The microRNA signature in response to nutrient restriction and refeeding in skeletal muscle of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. Marine Biotechnology, 2015, 17(2): 180-189.
- [33] Morgan J E, Partridge T A. Muscle satellite cells[J]. International Journal of Biochemistry, 2003, 35(8): 1151-1156.

Spatio-temporal expression characteristics of MyomiRs and prediction analysis of MyomiRs targeting to *Pax7* in *Siniperca chuatsi*

ZENG Wei^{1,2}, ZHU Xin², CHENG Congyi², MENG Yangyang², ZHANG Yu², BIN Qin², LI Can¹, CHU Wuying², CHEN Tao¹

1. College of Animal Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

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

Abstract: MyomiRs, a class of muscle-specific microRNAs (miRNAs), play an important role in the proliferation and differentiation of myoblasts. This study investigated the spatio-temporal expression characteristics of four myomiRs (*miR-1a*, *miR-133a-3p*, *miR-206*, and *miR-499*) in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*), as well as their expression features under short-term starvation stress, and predicted their regulation of *Pax7*. The expressions of the four myomiRs in various tissues of Chinese perch, including white muscle at different stages of post embryonic development and white muscle after 5 days of starvation, were examined by real-time fluorescence quantitative PCR. Then, the targeting sites of the four myomiRs on the 3'-untranslated region (UTR) of *Pax7* mRNA were predicted using RNAhybrid. The results showed that *miR-1a*, *miR-133a-3p*, and *miR-206* were highly expressed at D60 (60 days post hatching), while *miR-499* was highly expressed at D100. Furthermore, *miR-1a* and *miR-133a-3p* were highly expressed in red muscle, white muscle, and the heart, yet low expressed in other tissues. *miR-206* was highly expressed in red muscle and white muscle, while *miR-499* was highly expressed in heart, followed by red muscle and white muscle, and was low expressed in other tissues without a significant difference observed. The expressions of all four myomiRs increased significantly after 5 days of starvation, suggesting that skeletal muscle may respond to starvation stress by upregulating the expression of the four myomiRs to regulate physiological processes such as metabolism. Target gene prediction analysis showed that *miR-1a*, *miR-133a-3p*, and *miR-206* had binding sites on the 3'-UTR of *Pax7*. Further verification by real-time fluorescence quantitative PCR showed that the expression of *miR-206* and *Pax7* at various post embryonic developmental stages and the circadian rhythms of the Chinese perch were in opposite trends. These results suggest that *miR-1a* and *miR-133a-3p* are muscle-specific, while *miR-206* and *miR-499* are enriched in muscle-derived tissues. In addition, *miR-206* may directly regulate the expression of *Pax7*, thus affecting the differentiation and development of muscle tissue in juvenile Chinese perch.

Key words: *Siniperca chuatsi*; MyomiRs; skeletal muscle; expression features; circadian rhythms

Corresponding author: CHEN Tao. E-mail: chentao_114@163.com