

低氧胁迫下斑马鱼鳃 microRNAs 差异分析

林 枫¹, 贾若南¹, 王法祥¹, 许强华^{1,2}

1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306

2. 上海海洋大学/大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室/国家远洋渔业工程技术研究中心/
远洋渔业协同创新中心, 上海 201306

摘要: 为研究microRNAs (miRNAs) 应对低氧胁迫的生物学功能, 对低氧胁迫和常氧条件下斑马鱼 (*Danio rerio*) 鳃组织进行高通量miRNAs测序, 分析了低氧胁迫与常氧条件下斑马鱼鳃中miRNAs的表达差异。结果表明, 低氧胁迫和常氧条件下, 斑马鱼鳃中共有15个miRNAs呈显著差异表达, 其中13个miRNAs在低氧胁迫斑马鱼鳃中的表达量显著上调, 2个miRNAs表达量显著下调。对miRNAs测序和斑马鱼鳃转录组进行关联分析, 针对前期筛选获得的低氧胁迫与常氧条件下显著差异表达的28个热休克蛋白基因进行靶基因预测, 结果显示, 低氧胁迫下显著低表达的miR-455-3p同时靶向提高热休克蛋白基因*hspa14*和*dnajb6b*的表达, 以增强对低氧的适应能力。另外, 低氧胁迫下显著高表达的miR-194a和miR-155可以分别靶向5个热休克蛋白基因 (*hspa12a*, *dnajc5aa*, *hspb7*, *hsp70.3*, *dnajb2*) 和4个热休克蛋白基因 (*hspa12a*, *hspg2*, *hspa13*, *dnajb2*) 来调控斑马鱼对低氧环境的适应。

关键词: 斑马鱼; miRNAs; 高通量测序; 热休克蛋白基因; 靶基因预测

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Differential analysis of microRNAs in zebrafish gills under hypoxic stress

LIN Feng¹, JIA Ruonan¹, WANG Faxiang¹, XU Qianghua^{1,2}

1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. Shanghai Ocean University/Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education/National Distant Water Fisheries Engineering Research Center/Collaborative Innovation Center for Distant Water Fisheries, Shanghai 201306, China

Abstract: In order to study the biological function of microRNAs (miRNAs) in response to hypoxic stress, we performed high-throughput miRNAs sequencing in the gill tissues of zebrafish (*Danio rerio*) under hypoxic stress and normoxic condition, and analyzed the differences in miRNAs expression in the gill tissues of zebrafish. The results show that a total of 15 miRNAs are significantly differentially expressed in the gills of zebrafish under hypoxic stress and normoxic condition, among which 13 miRNAs were up-regulated significantly and 2 miRNAs were down-regulated significantly. Moreover, we performed a correlation analysis on miRNAs sequencing and zebrafish gill transcriptome, and predicted the target genes for 28 heat shock protein genes that were significantly differentially expressed under hypoxic stress and normoxic condition screened in the previous stage. The result shows that miR-455-3p, which was expressed significantly low under hypoxic stress, targeted to increase the expression of *hspa14* and *dnajb6b* and enhance the adaptability to hypoxic stress. In addition, miR-194a and miR-155, which were highly expressed under hypoxic stress, targeted five heat shock protein genes (*hspa12a*, *dnajc5aa*, *hspb7*, *hsp70.3*, *dnajb2*) and

收稿日期: 2021-04-22; 修回日期: 2021-06-21

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0900601); 国家自然科学基金面上项目 (31772826); 上海市教委重点科技创新项目 (2017-01-07-00-10-E00060)

作者简介: 林 枫 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类分子生物学。E-mail: 1156630936@qq.com

通信作者: 许强华 (1974—), 女, 教授, 博士, 从事鱼类生物学、功能基因组学研究。E-mail: qhxu@shou.edu.cn

four heat shock protein genes (*hspa12a*, *hspg2*, *hspa13*, *dnajb2*) to regulate zebrafish's adaptation to hypoxic condition.

Keywords: *Danio rerio*; miRNAs; High-throughput sequencing; Heat shock protein gene; Target gene prediction

鱼类在水体中的生命活动会受到不同环境的影响,水中的溶解氧浓度变化对鱼类有至关重要的影响。水中溶解氧质量浓度在 $4.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,鱼类可以正常生长发育;低于 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,大部分鱼类会出现浮头现象^[1]。水中溶解氧浓度降低,不仅使鱼类呼吸和摄氧能力下降^[2],还会影响鱼类细胞的存活和信号传递^[3],并直接影响其产卵、交配、生长、发育等一系列生命活动^[4],严重时还会出现死亡,破坏种群内部的动态平衡。

斑马鱼 (*Danio rerio*) 具有易繁殖、发育快等优点^[5],一直作为模式生物用于生物医学研究^[6-7]。作为模式生物,斑马鱼的应激调节功能、心血管系统功能等与人类高度相似^[8-9]。鳃是鱼类重要的黏膜免疫器官和呼吸器官,在鱼类低氧适应研究中常作为主要的研究对象,如低氧胁迫下鳃组织中热休克蛋白的研究^[10],草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 在低氧胁迫下鳃的差异蛋白质组学及热休克诱导^[11],低氧胁迫对卵形鲳鲀 (*Trachinotus ovatus*) 鱼体鳃器官的影响^[12]等。

miRNAs 可以通过调控其靶基因的表达水平从而参与细胞的各类进程,并参与许多关键的生理进程与病理过程^[13]。已有多项研究表明,miRNAs 是植物和动物面临环境胁迫作出响应的关键调节剂,一些 miRNAs 可以通过调控基因表达,恢复或重建新的表达程序,从而增强细胞对胁迫的耐受性^[14]。低氧是生物常常面临的一种胁迫,目前已有的一些应对低氧胁迫 miRNAs 的报道。如缺氧性神经胶质瘤来源的外泌体通过信号转导和转录活化因子 3 (STAT3) 和核因子 κB (NF- κB) 途径靶向端粒重复结合因子 2 (*terf2ip*),传递 microRNA-1246 诱导 M2 巨噬细胞极化^[15]。miR-204 可以作用于血管内皮生长因子 (*vegf*) 的 3'-UTR 区,是一个内源性的 *vegf* 表达调控因子。miR-204 通过基因网络调控应答低氧胁迫^[16]。miR-126-5p 可以作为一种新型的 miRNA,在缺氧条件下靶向白细胞介素 17 (IL-17A) 来调节大鼠心肌细胞 (H9c2) 的活力和凋亡^[17]。

热休克蛋白 (Heat shock proteins, HSPs) 是生物在面对环境中的物理、化学、生物等刺激发生应激反应后大量产生的,常被称为应激蛋白^[18]。热休克蛋白是生物体内最古老的分子之一。生物体为抵

御环境变化所带来的刺激,会减少其他正常蛋白的合成,同时增加 HSP 的合成以应对环境的变化,帮助生物体恢复正常^[10]。因此本文在对常氧和低氧胁迫下的斑马鱼鳃组织进行小 RNA 组测序的基础上,进一步筛选可能与低氧胁迫相关的 miRNAs,并用其对热休克蛋白基因进行了靶基因预测,以期进一步挖掘斑马鱼的低氧适应机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂

small RNA 分离试剂盒, DEPC 水 (生物生工有限公司), 氯仿 (24 : 1), Trizol 试剂, 异丙醇, 无水乙醇 (吉泰生物公司)。

1.1.2 实验器材

研磨棒、EP 管、超净工作台、冰块、移液器、各类枪头、剪刀、镊子、锡纸均购买于上海生物生工有限公司,低氧驯化箱 (长沙华晓电子科技有限公司定制),离心机,旋涡仪 (德国 Eppendorf 有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样本低氧处理

将本实验室培养的多代斑马鱼分别置于 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低氧驯化箱中,保持该浓度进行低氧胁迫,同时保留 $6.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶解氧质量浓度作为常氧对照组。在使用 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶解氧质量浓度进行低氧胁迫时,发现 2 周后斑马鱼不再出现浮头的现象,推测经 2 周低氧胁迫后其逐渐适应了低氧环境。故采用低氧驯化 2 周后的斑马鱼与常氧下的斑马鱼进行比对。低氧胁迫 2 周后,取出常氧/低氧条件下的斑马鱼,每个溶解氧质量浓度下取样本 15 尾 (体长 3~4 cm),解剖取出两组样本的鳃组织,备用。

1.2.2 高通量测序和生信分析

提取 RNA 样本,按照 NucleoZOL 试剂盒进行。将所提取的 RNA 进行电泳检测。检测后将 EP 管放入 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱进行保存。将上述常氧和低氧下斑马鱼鳃组织提取后检测合格的 RNA^[19],按照 small RNA 分离试剂盒的方法,分别进行 small RNA 的分离。将提取的 small RNA 进行纯化,运

用荧光光度计进行定量, 上机检测测序得到原始测序结果。为保证数据的质量, 对原始数据进行处理。去除低质量的 reads (N 比例大于 10% 的 reads、有 5'接头污染的 reads、无 3'接头序列和插入片段的 reads、3'接头序列以及 polyA/T/G/C 的 reads) 后得到的 clean small RNA reads 数。其中大多数小 RNA 的长度为 21~23 nt。对于该物种的 ncRNA 注释, 若有该物种小 RNA 的注释信息, 就用该物种 ncRNA 注释所测的 small RNA。若没有该物种的信息, 则选择 Rfam 数据库中 rRNA、tRNA、snRNA 和 snoRNA 来注释测序所得的 small RNA。

1.2.3 靶基因预测

本实验室前期通过对低氧、常氧条件下鳃组织的转录组比较分析发现, 常氧低氧条件下斑马鱼鳃中一共筛选获得 28 个显著差异表达的热休克蛋白基因, 包括表达量显著下调基因 12 个, 显著上调基因 16 个^[12]。对 miRNAs 测序和斑马鱼鳃转录组进行关联分析。针对低氧胁迫和常氧条件下斑马鱼

鳃中显著差异表达的 miRNAs, 对实验室前期筛选获得的 28 个差异热休克蛋白基因进行靶基因的预测分析。miRNAs 的靶基因预测使用 TargetScan-Fish (http://www.targetscan.org/fish_62/)、miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) 2 个网站同时进行。

2 结果

2.1 低氧与常氧下斑马鱼鳃的小 RNA 测序

常氧和低氧斑马鱼鳃样本的小 RNA 组测序分别产生 6 995 009 和 6 662 504 bp 的原始数据。去除低质量的数据后分别得到 6 585 748 和 5 941 304 bp 的 clean data。

常氧与低氧小 RNA 序列比对后获得了相应结果, 获得饼状图 (图 1)。根据饼图比例分析, 可以看出, 其中常氧的 miRNA 约占整个 small RNA 总数的 40%。而低氧的约占 20%。提示与常氧相比, 低氧胁迫下的 miRNA 有降低的趋势 (图 1)。

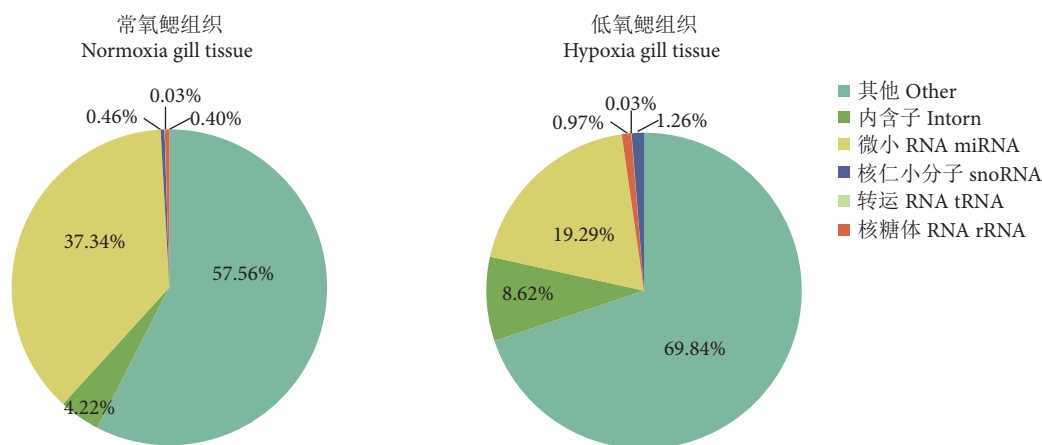


图1 常氧与低氧中鳃组织miRNA占小RNA的比例

Fig. 1 Proportion of miRNA in whole small RNAs sequence in normoxic and hypoxic gill tissues

2.2 低氧/常氧下鳃组织的差异 miRNAs 分析

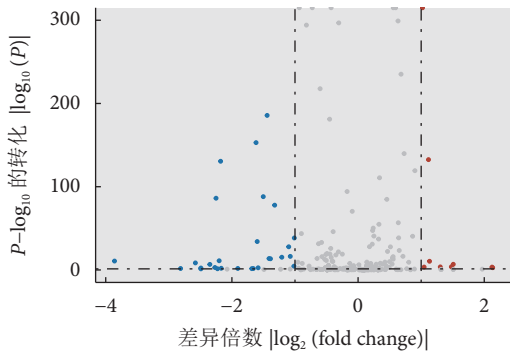
根据测序结果, 首先排除 tRNA、rRNA 等小分子的 RNA。利用归一化法对比低氧胁迫斑马鱼与常氧斑马鱼中同一个 miRNA 的表达差异量。利用火山图呈现差异 miRNAs 的整体分布情况。结果显示, 低氧/常氧条件下的斑马鱼鳃间一共筛选出差异表达的 miRNAs 共 32 个 (图 2)。使用校正后的显著水平 (P) 和差异倍数 (Fold change) 2 个水平进行评估, 设置显著差异表达 miRNAs 的筛选条件为 $P < 0.01$ 和 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 。

针对 32 个差异 miRNAs, 同时使用 $|\log_2\text{FC}| \geq 1$, $P < 0.05$, 且表达量 ≥ 50 作为临界值, 从低氧和

常氧的比较中, 一共鉴定获得低氧与常氧条件下显著差异表达的 15 个 miRNAs。其中, 13 个 miRNAs 在低氧胁迫斑马鱼鳃中的表达量显著上调、2 个 miRNAs (miR-455-3p、miR-125b-5p) 的表达量显著下调。图 3 为显著差异表达 miRNAs 的聚类。

2.3 差异 miRNAs 靶向热休克蛋白基因的预测结果

针对前期筛选获得的低氧胁迫与常氧条件下显著差异表达的 28 个热休克蛋白基因 (包括 12 个表达量显著下调的 *hsp* 基因、16 个显著上调的 *hsp* 基因)^[11] 进行靶基因预测, 结果显示, 7 个显著差异表达的 miRNAs 可以靶向 9 个热休克蛋白基因。



横坐标代表 miRNAs 不同样品中表达倍数变化, 纵坐标代表 miRNAs 表达量变化的统计学显著程度, 图中的散点代表各个 miRNAs, 灰色圆点表示无显著性差异的 miRNAs, 蓝色圆点表示显著上调的差异 miRNAs, 红色圆点表示显著下调的差异 miRNAs。

The horizontal axis represents the variation of miRNAs expression multiple in different samples; the vertical axis represents the statistically significant degree of miRNAs expression change; the scattered dots represent each miRNAs; the gray dots represent the miRNAs without significant difference; the blue dots represent the significantly upregulated differential miRNAs; and the red dots represent the significantly down-regulated differential miRNAs.

图2 常氧和低氧鳃组织差异miRNAs火山图

Fig. 2 miRNAs volcano map of difference between normoxic and hypoxic gill tissues

图 4 显示出单个 miRNA 靶向热休克蛋白基因的数量。

表达量显著下调的 miR-455-3p 可以靶向 2 个显著上调的热休克蛋白基因 (表 1)。表达量显著上

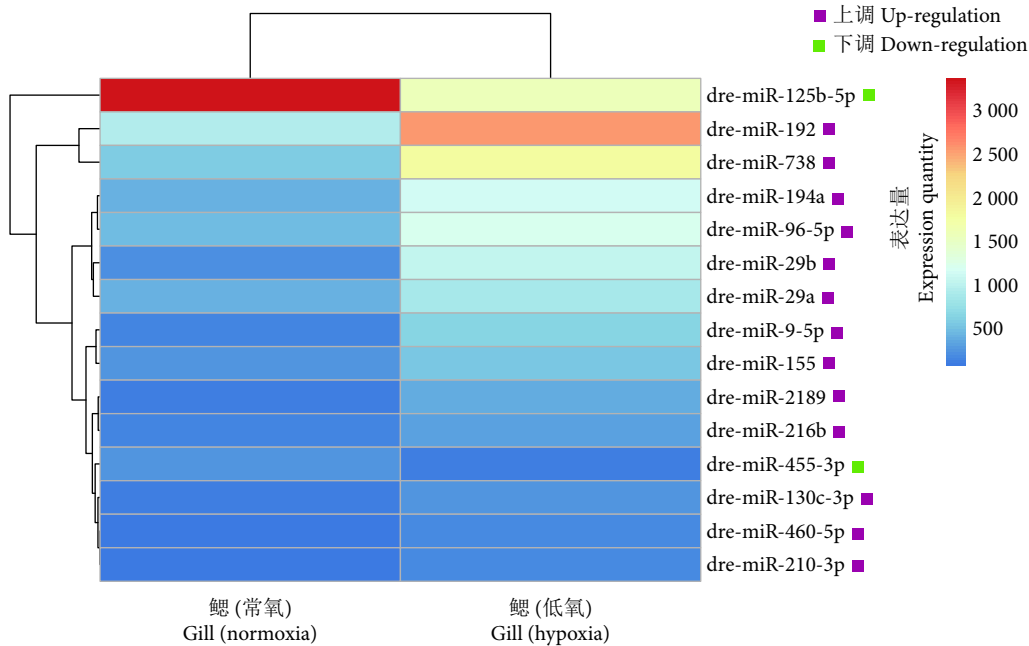
调的 miRNAs (dre-miR-194a、dre-miR-155、dre-miR-130c、dre-miR-9、dre-miR-29a、dre-miR-96-5p) 可以靶向 7 个显著下调的热休克蛋白基因 (表 2)。

2.4 差异 miRNAs 靶向的热休克蛋白基因富集分析

针对差异 miRNAs 靶向的热休克蛋白基因进行富集分析发现, 富集到的生物过程功能前 6 条通路主要与发育相关, 包括 *dnajb6b* 和 *hspg2* 两个靶基因 (图 5)。低氧胁迫的斑马鱼鳃中表达量显著上调的 miR-455-3p 靶向 *dnajb6b*, 而 *hspg2* 同时受到 2 个上调的 miRNAs (miR-155 和 miR-29a) 调控。差异 miRNAs 靶向的热休克蛋白基因富集的前 20 条通路主要涉及的基因除了上面提及的 2 个 miRNAs 外, 还包括 miR-194a 和 miR-130c 同时靶向的 *hspb7*。

3 讨论

本研究发现了在缺氧反应中差异表达的 15 个 miRNAs, 13 个 miRNAs 在低氧胁迫的斑马鱼鳃中表达量上调, 2 个 miRNAs 的表达显著下调。也有研究表明, 在下调的 miRNAs 中, miR-125b-5p 的靶基因 *rps3a* 通过在翻译机制中发挥调节作用以抑制细胞凋亡^[20]; 而在上调的 miRNAs 中, mir-



图中的颜色代表了不同基因在低氧胁迫后的表达量, 颜色由蓝到黄到红表示表达量依次增加。
The colors in the figure represent the expression levels of different genes under hypoxic stress; the colors from blue to yellow to red indicates that the expression levels increased successively.

图3 常氧和低氧鳃组织差异miRNAs聚类图

Fig. 3 miRNAs clustering map of difference between normoxic and hypoxic gill tissues

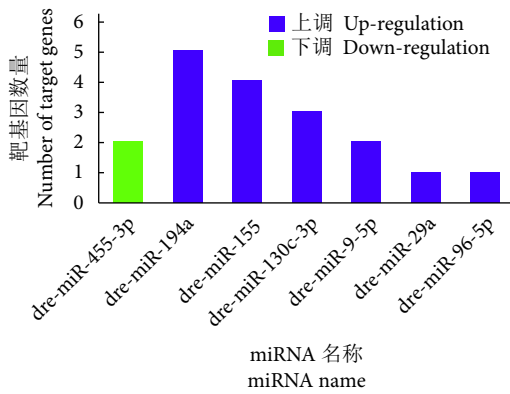


图4 差异miRNAs靶基因数量统计分析

Fig. 4 Statistical analysis of number of differential miRNAs target genes

192 可以通过靶向 E 盒结合锌指蛋白基因 (*Zeb2*) 来保护肝脏免受氧化应激诱导的损伤, 增强肝脏的低氧耐受性^[21-22]。在人类细胞中, miR-29b 的上调可以靶向 TNF 受体相关因子 5 (*TRAF5*) 保护心肌细胞免受缺氧诱导的细胞凋亡^[23]。miR-29b 在调节细胞凋亡中显示出重要作用^[24]。另外, 小鼠中 miR-216b 可以作用于自噬相关蛋白 13 基因 (*Atg13*), 且使缺氧条件下细胞的自噬减少, 并减少细胞的凋亡^[25]。

高海拔人群中的 miR-210-3p 水平与红细胞计数以及血红蛋白和血细胞比容显示出强正相关性, 被认为是人类适应高海拔地区生活的重要 miRNA^[26]。miR-194 过表达可以保护缺氧诱导的人肾皮质近曲小管上皮细胞 (HK-2) 损伤^[27]。miR-155 被发现在低氧条件下促进内皮细胞的血管生成^[28]。人参皂甙 (GS-Rb1) 可以增加 mir-29a 的表达量, 保护缺氧的心肌细胞^[29]。大鼠中 *Hif-1 α* 诱导的 miR-9 上调在缺氧期间有助于肺动脉平滑肌细胞的表型调节^[30], miR-96-5p 已知有抑制细胞凋亡的功能^[31]。miR-1 可能在转录后水平直接或间接调控 HSP90a1 和 HSP90b1。过表达 miR-1 后缺氧复氧的 HSP90

蛋白及其亚型 90aa1 和 90b1 表达水平更低, 结合之前的结果提示 miR-1 可能在心肌缺氧复氧中调控 HSP90^[32]。在高血压心肌肥厚的早期代偿阶段, 心肌 miR-378 表达的下降使其对内源性 HSF1 转录后抑制作用减弱, 进而对 HSF1 的代偿性升高发挥了重要的调控作用^[33]。可见, miRNAs 在低氧条件下在其他器官起着抑制细胞凋亡, 增强器官的低氧耐受性, 保护细胞免受缺氧带来的损伤等一系列功能。因此, 本研究筛选出的低氧和常氧之间差异表达的 miRNAs 很可能在低氧适应机制中起重要作用。已知生物体在面对环境变化时会通过改变蛋白或者调节 mRNAs 的翻译以适应环境, 本实验室已经发表过低氧胁迫下鳃组织相关热休克差异蛋白基因, 验证了一些热休克蛋白基因应对低氧胁迫的作用^[11]。因此, 本研究利用筛选到的斑马鱼低氧与常氧状态下差异表达的 15 条 miRNAs 对 28 个热休克蛋白基因^[11]进行靶基因预测, 再结合 miRNAs 与预测的 mRNAs 的表达呈负相关这一特性, 对预测的靶基因进行分析。

热休克蛋白被认为与正常和异常的胚胎发育密切相关。低氧胁迫下, 低表达的 miR-455-3p 通过同时靶向提高 *hspa14* 和 *dnajb6b* 的表达, 有可能增强了生物体的发育和机体保护, 进而增强对低氧的适应。本研究发现, miR-194a 同时靶向 5 个热休克蛋白基因 (*hspa12a*、*dnajc5aa*、*hspb7*、*hsp70.3*、*dnajb2*); 而 miR-155 可以同时靶向 4 个热休克蛋白基因 (*hspa12a*、*hspg2*、*hspa13*、*dnajb2*)。本研究还发现, 热休克蛋白基因 *dnajb2* 同时受到 5 个 miRNAs 调控。基因 *dnajb2* 是 HSP70 的伴侣调节剂, 主要在神经系统中表达^[34]。等距遗传性运动神经病 (dHMN) 是一组罕见的遗传性神经肌肉疾病, 其特征是在没有感觉症状的情况下会影响腓骨

表1 斑马鱼低氧与常氧鳃中下调的miRNAs靶基因预测

Table 1 Prediction of down-regulated miRNAs target genes in hypoxic and normoxic gills of *D. rerio*

miRNA名称 miRNA name	靶基因 Gene binding	结合位点 Site	目标区域的预测配对 Predicted pairing of target region
dre-miR-455-3p	<i>hspa14</i>	935—941	5'...UCCUCACAGUGCGGGGACAAUU... 3' GCUACAUCAGGUUCCCGUGUAU
	<i>dnajb6b</i>	1157—1163	5'...AUAACAUAUAAAAGA GGCACAAUU... 3' GCUACAUCAGGUUCCCGUGUAU
		1829—1835	5'...GGGAAAACACAAAA GGCACAAUU... 3' GCUACAUCAGGUUCCCGUGUAU

表2 斑马鱼低氧与常氧鳃中上调miRNAs靶基因预测
Table 2 Prediction of up-regulated miRNAs target genes in hypoxic and normoxic gills of *D. rerio*

miRNA名称 miRNA name	靶基因 Gene binding	结合位点 Site	目标区域的预测配对 Predicted pairing of target region
dre-miR-194a	<i>hspa12a</i>	2 262—2 268	5' ...UGUUUGUCACA CUAGUGUUACAG... 3' AGGUGUACCUC GCCGACAAUGU
	<i>dnajc5aa</i>	4 114—4 120	5' ...UUGUUUCAAUUGGUUUGUUACA... 3' GGUGUACCUCAACGACAAUGU
	<i>hspb7</i>	1 644—1 650	5' ...ACAAACAAAACAAAUUGUUACA... 3' GGUGUACCUCAACGACAAUGU
	<i>hsp70.3</i>	245—251	5' ...CAUUCUUGUUGUUGUUGUACA... 3' GGUGUACCUCAACGACAAUGU
	<i>dnajb2</i>	3 834—3 840	5' ...UUCCACAUUUUUUAUGUUACAG... 3' GGUGUACCUCAACGACAAUGU
dre-miR-155	<i>hspa12a</i>	2 771—2 777	5' ...UUUUAGCAUUGUUUUAGCAUUAG... 3' GGGGAUAGUGCUAAUCGUAUUU
	<i>hspg2</i>	3 611—3 617	5' ...UUUAAAACAAAAGGAGCAUUAC... 3' GGGGAUAGUGCUAAUCGUAUUU
	<i>hspa13</i>	308—314	5' ...UUUUGAAUUGUGCAAGCAUUAU... 3' GGGGAUAGUGCUAAUCGUAUUU
	<i>dnajb2</i>	903—910	5' ...CCUCUAAAUCUGGAAGCAUUAA... 3' GGGGAUAGUGCUAAUCGUAUUU
	<i>dnajb2</i>	1 484—1 490	5' ...UGCUAACAUCAGCUGCAUUAAA... 3' GGGGAUAGUGCUAAUCGUAUUU
dre-miR-130c	<i>hspa12a</i>	3 219—3 225	5' ...AAACUAGUCAUUUUGCAUUAAU... 3' GUGGUUAGUCAGCUUCGUAUUG
	<i>hspa12a</i>	4 709—4 715	5' ...GUGACUGUAAUUUCAUUGCACUG... 3' UACGGGAAAAUUUAACGUGAC
	<i>dnajb2</i>	920—926	5' ...AUGUUGCUAUCGAAUUGCACUAA... 3' UACGGGAAAAUUUAACGUGAC
dre-miR-9	<i>dnajc5aa</i>	2 348—2 354	5' ...GUGAUGAAUGUAUAGUUGCACUU... 3' UACGGGAAAAUUUAACGUGAC
	<i>dnajb2</i>	5 033—5 039	5' ...UAAUAAAUAUAAAAUCCAAAGAA... 3' AGUAUGUCGAUCUUAUGGUUUUCU
dre-miR-29a	<i>hspg2</i>	2 832—2 839	5' ...AUCAAAAAUGAAACAUGGUGCUA... 3' UGUGACUAAAGUUUACCACGAU
dre-miR-96-5p	<i>dnajb2</i>	2 290—2 296	5' ...AAUAUUUCAAAAUGCUGCCAAAA... 3' UCGUUUUUACACGAUCACGGUUU
	<i>dnajb2</i>	5 045—5 051	5' ...UUCCCAAAGACAGGUGUGCCAAG... 3' UCGUUUUUACACGAUCACGGUUU
	<i>dnajb2</i>	5 094—5 100	5' ...UGAGGCUAUAUAAUGCUGCCAAAG... 3' UCGUUUUUACACGAUCACGGUUU

肌肉的萎缩, *dnajb2* 是 23 个与 dHMN 有关的基因之一, 主要从 *dnajb2* 起始^[35]。可以推测, 5 个

miRNAs 靶向抑制 *dnajb2* 基因的表达, 有可能减轻了对低氧环境下生物体神经系统的伤害。

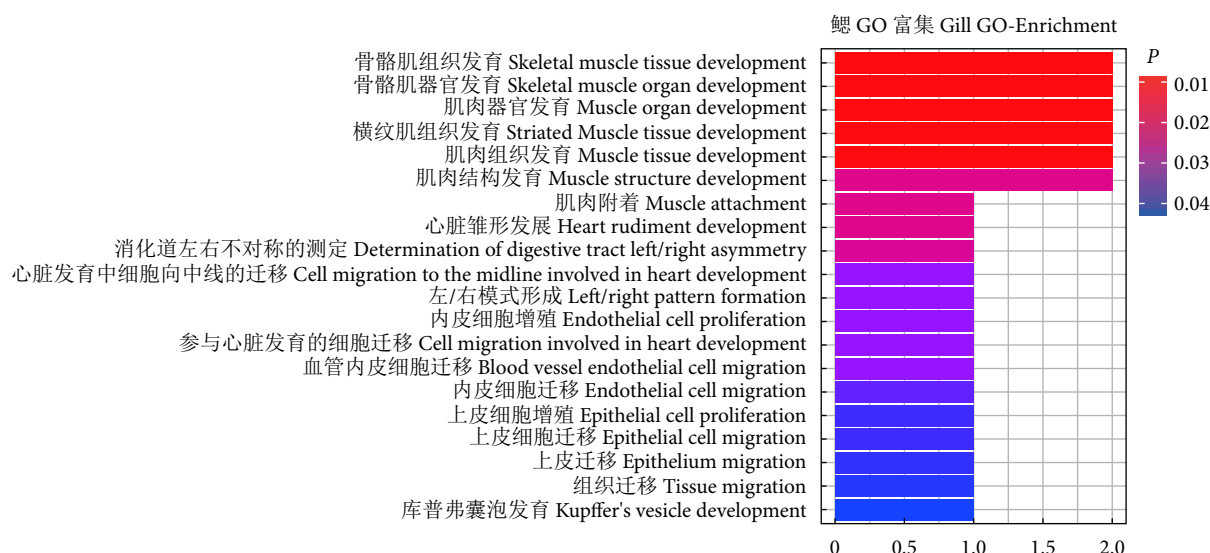


图5 差异miRNAs靶向的热休克蛋白基因GO富集

Fig. 5 GO enrichment of differential miRNAs-targeted heat shock protein genes

Hspa14 可能是肢体发育的相关基因^[36], 在成年斑马鱼中进行无偏见的诱变筛选, 确定了 *dnajb6b* 是心肌病的新型遗传修饰剂^[37]。缺乏热休克蛋白基因 *hspg2* 可减轻在低氧中引起的动脉高压^[38]。另外, 在靶向的热休克蛋白基因 GO 功能富集前 20 条通路中, 均有 *hspg2* 的参与。miR-155 和 miR-29a 同时靶向 *hspg2*, 很可能通过抑制 *hspg2* 的表达来降低低氧胁迫下引起的动脉高压, 增强对低氧环境的适应。

综上, 本研究结合常氧与低氧下差异表达的 miRNAs 和热休克蛋白基因的关联分析, 为探究鱼类低氧适应机制提供了新的研究思路。

参考文献:

- [1] RICHARDS J G. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia[J]. J Exp Biol, 2011, 214(2): 191-199.
- [2] 赵文文, 曹振东, 付世建. 溶氧水平对鳊鱼、中华倒刺鲃幼鱼游泳能力的影响 [J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 314-320.
- [3] 钟雪萍, 王丹, 张义兵, 等. 鲫鱼低氧相关基因差减 cDNA 文库的构建与分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(1): 113-118.
- [4] BEST C, IKERT H, KOSTYNIUK D J, et al. Epigenetics in teleost fish: from molecular mechanisms to physiological phenotypes[J]. Comp Biochem Physiol B, 2018, 224: 210-244.
- [5] 刘昌盛, 穆宇, 杜久林. 斑马鱼在生命科学研究中的应用 [J]. 生命科学, 2007(4): 33-37.
- [6] SARASAMMA S, VARIKKODAN M M, LIANG S T, et al. Zebrafish: a premier vertebrate model for biomedical research in Indian scenario[J]. Zebrafish, 2017, 14(6): 589-605.
- [7] 刘春晓, 吕为群, 杨志刚, 等. TGF- β /Smad 信号通路响应光周期变化参与调控斑马鱼卵巢发育 [J]. 南方水产科学, 2019, 15(3): 69-75.
- [8] SANTHAKUMAR K, JUDSON E C, ELKS P M, et al. A zebrafish model to study and therapeutically manipulate hypoxia signaling in tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2012, 72(16): 4017-4027.
- [9] 张凡, 黄秋花, 陈赛娟, 等. 用斑马鱼模型研究低氧应激在造血和血液疾病中的作用 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2016, 36(8): 1237-1241.
- [10] 狄治朝, 周涛, 许强华. 低氧胁迫与常氧条件下斑马鱼鳃中热休克蛋白基因家族的表达差异比较 [J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(6): 11-16.
- [11] 徐湛宁. 草鱼在低氧胁迫下鳃的差异蛋白质组学及热休克诱导草鱼四倍体育种研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018: 11-12.
- [12] 陈世喜, 王鹏飞, 区又君, 等. 急性和慢性低氧胁迫对卵形鲳鲹鳃器官的影响 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(1): 124-130.
- [13] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
- [14] 曾幼玲, 杨瑞瑞. 植物 miRNA 的生物学特性及在环境胁迫中的作用 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(19): 3671-3682.
- [15] QIAN M, WANG S, GUO X, et al. Hypoxic glioma-derived exosomes deliver microRNA-1246 to induce M2 macrophage polarization by targeting TERF2IP via the STAT3 and NF- κ B pathways[J]. Oncogene, 2020, 39(2): 428-442.
- [16] ZHAO Y, ZHU C D, YAN B, et al. miRNA-directed regulation of VEGF in tilapia under hypoxia condition[J]. Biochem Bioph Res Commun, 2014, 454: 183-188.
- [17] SUN X H, WANG X, ZHANG Y, et al. Exosomes of bone-marrow stromal cells inhibit cardiomyocyte apoptosis under ischemic and hypoxic conditions via miR-486-5p targeting the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Thromb Res, 2019, 177: 23-32.
- [18] 曲凌云, 孙修勤, 相建海, 等. 热休克蛋白研究进展 [J]. 海洋科

- 学进展, 2004, 22(3): 385-391.
- [19] 黄勇, 龚望宝, 陈海刚, 等. 基于 RNA-Seq 高通量测序技术的大口黑鲈转录组分析 [J]. 南方水产科学, 2019, 15(1): 106-112.
- [20] NAORA H. Involvement of ribosomal proteins in regulating cell growth and apoptosis: translational modulation or recruitment for extraribosomal activity[J]. Immunol Cell Biol, 1999, 77(3): 197-205.
- [21] ZHI F, SHAO N, XUE L, et al. Characteristic MicroRNA expression induced by δ -Opioid receptor activation in the rat liver under prolonged hypoxia[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(6): 2296-309.
- [22] CHEN P J, WENG J Y, HSU P H, et al. NPGPx modulates CPEB2-controlled HIF-1 α RNA translation in response to oxidative stress[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(19): 9393-9404.
- [23] CAI Y H, LI Y P. Upregulation of miR-29b-3p protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis by targeting TRAF5[J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24(1): 27.
- [24] ZHANG H, LI H, GE A, et al. Long non-coding RNA TUG1 inhibits apoptosis and inflammatory response in LPS-treated H9c2 cells by down-regulation of miR-29b[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 101: 663-669.
- [25] DING S, MIERADILIJIAN A, ZHOU Z, et al. Histamine deficiency aggravates cardiac injury through miR-206/216b-Atg13 axis-mediated autophagic-dependant apoptosis[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 694.
- [26] YAN Y, CHENG W, ZHOU W, et al. Elevation of circulating miR-210-3p in high-altitude hypoxic environment[J/OL]. Front Physiol, 2016, 7: 84. DOI: [10.3389/fphys.2016.00084](https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00084).
- [27] SHEN Y, ZHAO Y, WANG L, et al. MicroRNA-194 overexpression protects against hypoxia/reperfusion-induced HK-2 cell injury through direct targeting Rheb[J]. J Cell Biochem, 2018, 120(5): 8311-8318.
- [28] MATSUURA Y, WADA H, EGUCHI H, et al. Exosomal miR-155 derived from hepatocellular carcinoma cells under hypoxia promotes angiogenesis in endothelial cells[J]. 2019, 64(3): 792-802.
- [29] YAN J R, XUE H J, WU S Q, et al. Ginsenoside-Rb1 protects hypoxic- and ischemic-damaged cardiomyocytes by regulating expression of miRNAs[J]. EVID-Based Compl Alt, 2015, 171306. DOI: [10.1155/2015/171306](https://doi.org/10.1155/2015/171306).
- [30] SHAN F, LI J, HUANG Q Y. HIF-1 alpha-induced up-regulation of miR-9 contributes to phenotypic modulation in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(10): 1511-1520.
- [31] TIAN L, CAI D, ZHUANG D, et al. miR-96-5p regulates proliferation, migration, and apoptosis of vascular smooth muscle cell induced by angiotensin II via targeting NFAT5[J]. J Vasc Res, 2020, 57(2): 1-11.
- [32] 郭伟, 许万福, 赵俊红, 等. microRNA-1 和热休克蛋白 90 在心肌缺氧复氧中的关系 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2019, 108(5): 57-61.
- [33] 苑洁, 邹云增. 压力超负荷致小鼠心肌肥厚中 miR-378 对热休克转录因子-1 的调节作用 [J]. 中国临床医学, 2019, 26(40): 543-648.
- [34] CLAEYS K G, SOZANSKA M, MARTIN J J, et al. DNAJB2 expression in normal and diseased human and mouse skeletal muscle[J]. Am J Pathol, 2010, 176(6): 2901-2910.
- [35] VINCENZO L, CARMEN A, ERWIN K, et al. Chaperonopathies: spotlight on hereditary motor neuropathies[J]. Front Mol Biosci, 2016, 3: 81. DOI: [10.3389/fmolb.2016.00081](https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00081).
- [36] ZHU Y, ZHOU H, ZHU Y, et al. Gene expression of *Hsp70*, *Hsp90*, and *Hsp110* families in normal and abnormal embryonic development of mouse forelimbs[J]. Drug Chem Toxicol, 2012, 35(4): 432-444.
- [37] DING Y, LIU W, GORE B, et al. Abstract 41: Dnajb6b is a novel genetic modifier for cardiomyopathy that regulates ER stress response[J]. Circul Res, 2014, 115(Suppl 1): A41.
- [38] TRANLUNDMARK K, CHANG Y T, TANNENBERG P, et al. Lack of perlecan heparan sulfate impairs pulmonary vascular development and is protective in hypoxia induced pulmonary hypertension[J]. Cardiovasc Res, 2015, 107(1): 20-31.