



草鱼 miR-23a 在嗜水气单胞菌感染过程中的调控机制

包天杰¹, 鲍生成¹, 樊坤¹, 沈玉帮^{1,2,3}, 徐晓雁^{1,2,3*}, 李家乐^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产养殖工程研究中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为探索嗜水气单胞菌感染后草鱼肾脏细胞 (*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK) 中 miR-23a 的调控机制, 实验通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 测定了嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞后 miR-23a 的表达量变化, 使用 RNAhybrid 软件预测 miR-23a 的靶基因并用双荧光素酶报告基因检测系统进行鉴定, 最后分析 miR-23a 对靶基因及下游基因的调控作用。研究发现, 在嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞不同时间点, miR-23a 表达量产生显著变化; 双荧光素酶报告基因实验和 miRNA-23a 模拟物/抑制剂转染实验对靶基因反向调控, 鉴定出 *tbk1* 和 *glut1* 是 miR-23a 靶基因; 过表达 miR-23a 抑制了下游基因 *ldha*、*ldhba*、*pdha1a* 和 *pdha1b* 的表达水平。实验结果揭示, miR-23a 参与调控嗜水气单胞菌感染后 CIK 细胞中的免疫应答。*tbk1* 和 *glut1* 是 miR-23a 靶基因, miR-23a 能够靶向 *glut1* 影响下游基因的表达。以上结果为 miR-23a 在硬骨鱼类中免疫反应调控研究方面提供了重要思路, 同时为进一步了解 miRNA 介导多个靶基因调节鱼类先天性免疫提供了更多理论依据。

关键词: miR-23a; 草鱼肾脏细胞; 嗜水气单胞菌; 免疫反应

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是世界上养殖产量最高的水产养殖对象^[1]。随着草鱼养殖业的开展, 病害时有发生, 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染引起的草鱼疾病导致严重的经济损失^[2]。嗜水气单胞菌是一类革兰氏阴性水生细菌, 广泛分布于各种水环境和水生动物中^[3-5]。课题组已有研究发现, 草鱼感染嗜水气单胞菌后, 易感和抗病草鱼脾脏中有 21 个 miRNAs 产生差异表达, 指示在嗜水气单胞菌感染草鱼的过程中 miRNA 也许参与并发挥重要作用^[6]。

microRNA (miRNA) 是一种长度为 19~25 个核苷酸的内源性非编码小分子单链 RNA, 能够与靶

基因 3'非翻译区 (3'-untranslated regions, 3'-UTR) 结合从而抑制靶基因的翻译或降解靶基因^[7-10]。作为一种新型的基因表达调控分子, miRNA 参与调控细胞分化、凋亡、免疫防御等多种生物学过程^[11]。炎症是由组织损伤、化学刺激物、微生物感染、免疫细胞浸润和脂多糖 (LPS) 等不同刺激引起的复杂生物过程^[12-13]。研究表明, 一些 miRNAs 与被病毒和细菌感染后的硬骨鱼的免疫反应调节密切相关^[14]。例如, 在鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 期间, miR-155 可促进促炎功能并增强单核细胞/巨噬细胞的凋亡^[15]。此外, 一些研究发现 miRNAs 如 miR-148^[16]、miR-

收稿日期: 2021-03-07 修回日期: 2021-05-24

资助项目: 国家自然科学基金青年基金 (31802285); 现代农业产业技术体系 (CARS-45-03); 上海市工程中心提升项目 (19DZ2284300)

第一作者: 包天杰 (照片), 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: 1073133449@qq.com

通信作者: 徐晓雁, 从事鱼类种质资源与种苗工程研究, E-mail: xyxu@shou.edu.cn



214^[17] 和 miR-19a^[18] 也可以抑制 MyD88 的表达, MyD88 可以负性调节细菌引起的炎症反应。尽管已有多种类型的 miRNAs 被研究, 但特异性 miRNAs 在炎症中的作用和分子机制仍有待进一步研究。

此实验揭示了嗜水气单胞菌感染草鱼 CIK 细胞后 miR-23a 表达量的变化, 利用双荧光素酶报告基因系统测定 miR-23a 的靶基因, 并揭示 miR-23a 对下游基因的调控作用, 为深入研究 miRNAs 对靶基因的调控机制和在炎症中的作用提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

Medium 199 培养基、Opti-MEM 转染培养基、胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、氨苄青霉素-链霉素 (双抗) 溶液和 0.25% 胰蛋白酶 Trypsin-EDTA (1×) 购自 Gibco 公司; Lipofectamine 3000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; miR-23a agomir (模拟物)、antagomir (抑制剂) 和阴性对照 (NC) 购自上海吉玛制药技术有限公司; 无缝克隆试剂盒购自碧云天生物技术; RNAiso Plus 试剂、Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ II 荧光定量 PCR 试剂盒、Quick Cut™ Sac I 限制酶、DNA 凝胶回收试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; miRNA 反转录试剂盒 miScript II RT Kit 和荧光定量 PCR 试剂盒 miScript SYBR® Green PCR Kit 购自德国 Qiagen 公司; 快速质粒小提试剂盒和 DH5α 感受态细胞购自天根生化科技 (北京) 有限公司; pGEM®-TEasy 载体、pmirGLO 双荧光素酶 miRNA 靶基因表达载体和双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司; CO₂ 细胞恒温培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司; Centrifuge 5424 R 冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; Nanodrop 2000c 分光光度计购自 Thermo Scientific; CFX96 Real-Time System 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养和细菌感染

草鱼肾脏细胞系 (*Ctenopharyngodon idella* kideny, CIK) 为贴壁生长细胞, 购自中国典型培养物保藏中心。使用补充有 10% 热灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 M199 培

养基, 将细胞置于 5%CO₂、28 °C 恒温细胞培养箱中孵育。细胞处于对数生长期进行实验, 每 3~4 d 进行 1 次传代。

细菌感染实验所用嗜水气单胞菌为 AH10 菌株, 保存于武汉大学菌种保藏中心 (保藏号: AB2014155), 由张国亮等^[19] 从草鱼体内分离。实验前, 将 50 mL 培养皿中的 CIK 细胞 (2×10⁶ 个/mL) 接种到 24 孔板中, 待细胞生长密度达到 70%~80% 时, 用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 润洗细胞 1~2 次, 加入不含抗生素的 M199 培养基 (含 10% 热灭活胎牛血清), 随后用 100 μL 嗜水气单胞菌 (10³ CFU/mL) 刺激细胞^[29]。暴露 0.5 h 后换入加抗含血清的 M199 培养基。将感染的 CIK 细胞孵育相应的时间 (0、6、12、24 和 36 h) 后收集细胞, 用于分析 miR-23a 和 *tbk1*、*glut1* 的时间依赖性表达。每组实验进行 3 个生物学重复。

1.3 靶位点预测和质粒构建

利用 RNAhybrid 软件预测 miR-23a 的潜在靶基因。通过 PCR 扩增含有所预测 miR-23a 结合位点的靶基因 3'UTR 片段。然后将扩增子插入 pmirGLO 荧光素酶报告基因载体的 Sac I 位点, 利用无缝克隆试剂盒 (碧云天生物技术) 合成重组质粒。所有重组质粒均通过测序验证。

1.4 双荧光素酶报告基因实验

将 pmirGLO-*tbk1*、pmirGLO-*glut1* 荧光素酶报告载体与 miR-23a agomir 或 NC 共转染到 CIK 细胞。转染 36 h 后, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒裂解 CIK 细胞进行荧光素酶活性分析, 该实验每组重复 3 次。通过将萤火虫荧光素酶活性 (FL) 相对于海肾荧光素酶活性 (RL) 标准化来获得相对荧光素酶活性 (FL/RL), 验证靶基因 3'UTR 与 miR-23a 的结合能力。

1.5 转染实验

将对数生长期 CIK 细胞接种至 24 孔细胞板内, 待细胞融合度达到 70%~80% 时, 换入新鲜细胞培养基, 并根据 Lipofectamine 3000 试剂使用说明将合成的 miR-23a agomir、antagomir 和 NC 转染至 CIK 细胞。每组实验进行 3 个生物学重复, 转染 36 h 后收集细胞样品。

1.6 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (qPCR)

按照 TRIzol 试剂说明书提取每个样品的总 RNA。使用 NanoDrop 2000c 分光光度计和琼脂糖

凝胶电泳测量样品总 RNA 的浓度和质量。使用 RNA 反转录试剂盒和 miRNA 反转录试剂盒分别对 RNA 进行反转录获得 cDNA。总 RNA 的 qPCR 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。miRNA 的 qPCR 反应条件: 95 °C 15 min; 94 °C 15 s, 55 °C 30 s, 70 °C 30 s, 40 个循环。在每次测定之后进行溶解曲线分析, 以验证产物扩增的特异性。miRNA 和 mRNA 的相对表达水平分别使用 miR-101a 和 18S *rRNA* 作为内参, 每个样品 3 个平行。用于 qPCR 分析的引物见表 1。

表 1 qPCR 所用的引物序列

Tab. 1 Sequences of primer used for qPCR

引物名称 primers name	正向序列(5'→3') forward sequences (5'→3')	反向序列(5'→3') reverse sequences (5'→3')
miR-23a	ATCACATTGCCAGGG ATTTCCA	
miR-101a	TACAGTACTGTGATAA CTGAAG	
<i>tbk1</i>	TTGGCACAGTTTGTCT TATCG	CCTGTCTGGGTTTACT GTGA
<i>glut1</i>	GCATCGTTATTGGCAT CCTC	GCAAGGCAAGAGCAA TGGTC
<i>ldha</i>	ACAAGATAGTGGCGG ATAA	GTAACGGAAACGAGC AGA
<i>ldhba</i>	ATCGGCACAGATAAA GACG	CACAGGGCAGACTCA GGTA
<i>pdha1a</i>	GGTGGTATCTGCCAGG AC	GATCTCACGAACAGT GCC
<i>pdha1b</i>	GGGACATCAGTGGAA CGA	CTAATCATGCGTCTC TC
18S <i>rRNA</i>	GGACACGGAAAGGAT TGACAG	CGGAGTCTCGTTTCGT ATCGG

1.7 统计学分析

所有实验均设 3 个重复。所有相关基因表达数据均通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法获得, 通过单因素方差分析和邓肯氏多重比较法测试组间差异性。所有计量数据均为平均值±标准差 (mean ± SD)。* $P < 0.05$ 为差异显著, ** $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌感染对 CIK 细胞 miR-23a 的影响

利用 qPCR 检测嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞后 miR-23a 的表达情况。结果显示, miR-23a 的表达量呈现出先上调后下降的趋势 ($P < 0.01$, 图 1)。感染后 6 和 12 h, miR-23a 的表达量极显著高于对照组 ($P < 0.01$); 感染后的 24 和 36 h 的表达量极显

著低于对照组 ($P < 0.01$)。结果表明, 在嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞的过程中, miR-23a 的表达受到了极显著影响。

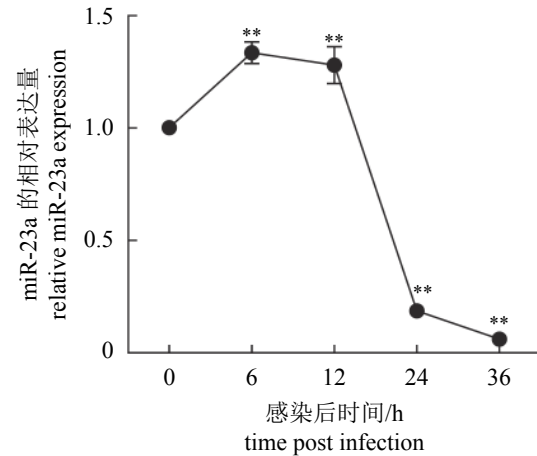


图 1 嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞后 miR-23a 的表达水平

图中数据表示为平均值±标准差 ($n = 3$), “***”代表极显著差异, $P < 0.01$

Fig. 1 Expression profiling of miR-23a in CIK cells upon *A. hydrophila* infection

Error bars indicate the mean and standard deviation ($n = 3$); “***” represents very significant difference, $P < 0.01$

2.2 miR-23a 靶基因的鉴定

根据课题组已有的 miRNA-mRNA 负表达关系数据和生物信息学软件 RNAhybrid, 预测 *tbk1* 和 *glut1* 为 miR-23a 的靶基因。miR-23a 在 *tbk1* 和 *glut1* 的 3'UTR 的结合位点见图 2。

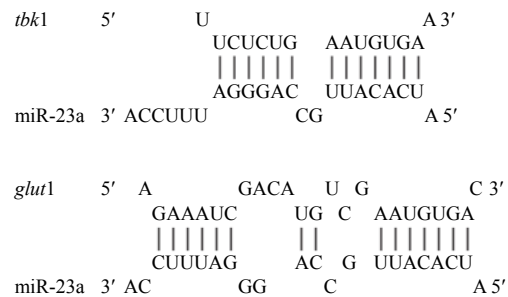


图 2 miR-23a 靶基因预测

miR-23a 与 *tbk1*、*glut1* 3'-UTR 结合位点示意图

Fig. 2 Prediction of miR-23a target genes

Schematic diagram of the binding site of miR-23a to 3'-UTR of *tbk1* and *glut1*

qPCR 检测数据表明, CIK 细胞在受到嗜水气单胞菌刺激过程中, *tbk1* 和 *glut1* 的表达量先下调后上调, 与 miR-23a 的表达情况负相关 (图 3)。

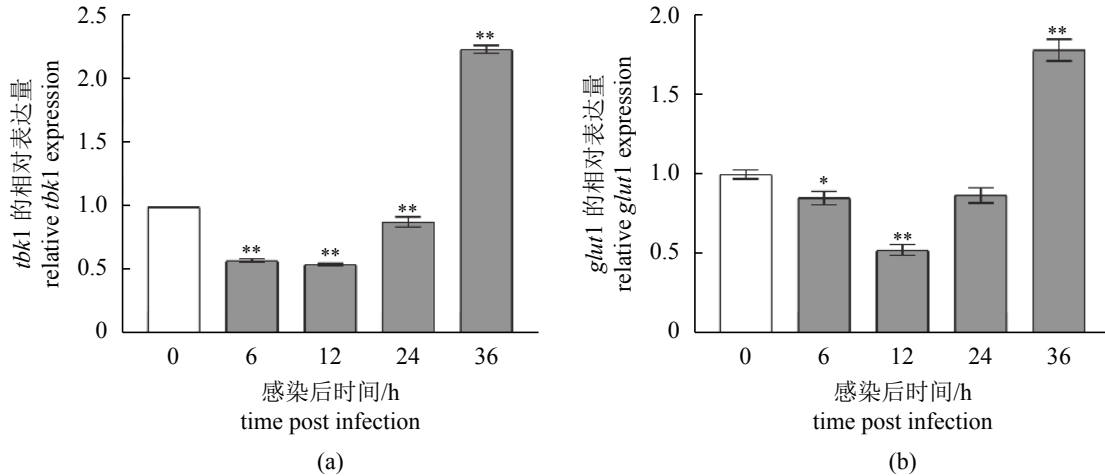


图 3 *tbk1* and *glut1* 在嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞中的表达

嗜水气单胞菌感染后 CIK 细胞中 *tbk1* (a) 和 *glut1* (b) 的表达情况; 图中数据表示为平均值±标准差 (n = 3), “*”代表显著差异, P < 0.05; “***”代表极显著差异, P < 0.01

Fig. 3 Expression profiling of *tbk1* and *glut1* in CIK cells upon *A. hydrophila* infection

Expression profiles of *tbk1* (a) and *glut1* (b) in CIK cells following *A. hydrophila* infection; error bars indicate the mean and standard deviation (n = 3); “*” represents significant difference, P < 0.05, “***” represents very significant difference, P < 0.01

将含有 miR-23a 结合位点的 *tbk1* 和 *glut1* 3'UTR 克隆到荧光素酶报告基因载体的下游, 得到实验所需 pmirGLO 报告质粒: pmirGLO-*tbk1* 和 pmirGLO-*glut1*。共转染 miR-23a agomir 实验组的荧光素酶活性显著下调。与对照组比较, pmirGLO-*tbk1* 和 pmirGLO-*glut1* 的荧光素酶活性分别下调约 63.5% 和 54.4% (P < 0.01, 图 4)。以上数据表明 miR-23a 可以靶向作用于 *tbk1* 和 *glut1* 3'UTR 互补位点, 从而抑制其表达。

与对照组 (1.00 ± 0.06) 相比, 过表达 miR-23a 后, miR-23a 相对表达量 (119.68 ± 16.92) 显著升高 (P < 0.01, 图 5-a), 表明模拟物试剂转染有效, 能够特异性上调 CIK 细胞中 miR-23a 的表达量。利用 18S *rRNA* 作为内参基因, 测定靶基因 *tbk1* 和 *glut1* 的相对表达量 (图 5-b), 相比于对照组, miR-23a agomir 转染组靶基因 *tbk1* 和 *glut1* 的表达量被抑制, 分别为 (0.46 ± 0.03) 和 (0.32 ± 0.02)。抑制 miR-23a 后, miR-23a 相对表达量为 (0.03 ± 0.00), 显著低于抑制对照组 (1.00 ± 0.06) (P < 0.01, 图 5-c), 表明抑制试剂转染有效, 能够特异性下调 CIK 细胞中 miR-23a 的表达量。以 18S *rRNA* 为内参基因, 测定靶基因 *tbk1* 和 *glut1* 的相对表达量 (图 5-d), 相比于对照组, miR-23a antagomir 转染组靶基因 *tbk1* 和 *glut1* 的表达量上调, 分别为 (1.78 ± 0.21) 和 (1.74 ± 0.15)。

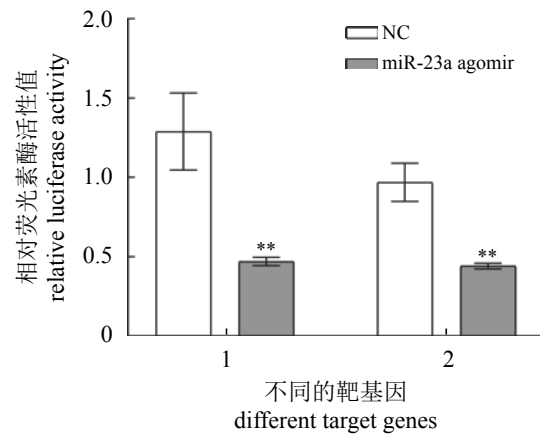


图 4 双荧光素酶报告系统验证 miR-23a 对 *tbk1* 和 *glut1* 的靶向作用

1. *tbk1*, 2. *glut1*; miR-23a agomir 和重组质粒 pmirGLO-*tbk1*、pmirGLO-*glut1* 转染 CIK 细胞后的双荧光素酶活性鉴定; 图中数据表示为平均值±标准差 (n = 3); “*”代表显著差异, P < 0.05, “***”代表极显著差异, P < 0.01

Fig. 4 Dual luciferase reporter system validates the targeting of miR-23a on *tbk1* and *glut1*

1. *tbk1*, 2. *glut1*; dual luciferase activity assay after miR-23a agomir and recombinant plasmid (pmirGLO-*tbk1*, pmirGLO-*glut1*) were transfected to CIK cells; error bars indicate the mean and standard deviation (n = 3); “*” represents significant difference, P < 0.05, “***” represents very significant difference, P < 0.01

2.3 miR-23a 调控下游基因

ldha、*ldhba*、*pdha1a* 和 *pdha1b* 是 *glut1* 在胰高糖素信号通路中的下游基因。qPCR 检测数据表

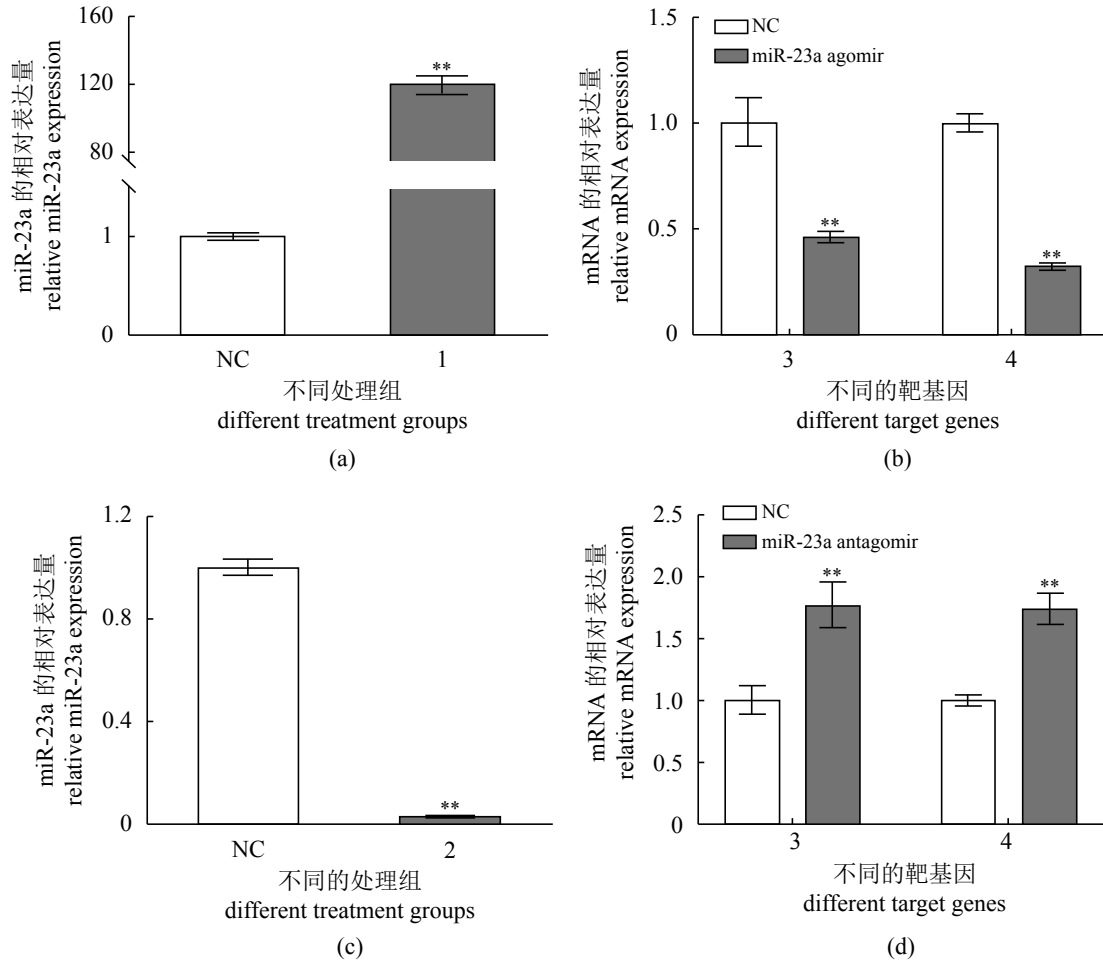


图 5 miR-23a 靶向 *tbk1* 和 *glut1*

miR-23a agomir 转染 CIK 细胞后, qPCR 检测 miR-23a (a) 和靶基因 *tbk1*、*glut1* (b) 的表达; miR-23a antagonist 转染 CIK 细胞后, qPCR 检测 miR-23a (c) 和靶基因 *tbk1* 和 *glut1* (d) 的表达; 1. miR-23a agomir, 2. miR-23a antagonist, 3. *tbk1*, 4. *glut1*; 图中数据表示为平均值 \pm 标准差 ($n=3$); “*”代表显著差异, $P<0.05$; “***”代表极显著差异, $P<0.01$

Fig. 5 miR-23a targets *tbk1* and *glut1*

Expression of miR-23a (a) and target genes *tbk1* and *glut1* (b) by qPCR after miR-23a agomir was transfected to CIK cells; expression of miR-23a (c) and target genes *tbk1* and *glut1* (d) by qPCR after miR-23a antagonist was transfected to CIK cells; 1. miR-23a agomir, 2. miR-23a antagonist, 3. *tbk1*, 4. *glut1*; error bars indicate the mean and standard deviation ($n=3$); “*” represents significant difference, $P<0.05$, “***” represents very significant difference, $P<0.01$

明, 过表达 miR-23a 能够显著降低下游基因 *ldha*、*ldhba*、*pdha1a* 和 *pdha1b* 的表达量 ($P<0.01$, 图 6)。

3 讨论

嗜水气单胞菌是十分经典的人-兽-鱼共患病病原菌, 能够诱发鱼类细菌性败血症, 引起养殖过程中严重的经济损失, 不利于全球淡水鱼养殖产业的健康发展^[20]。因此, 针对可以加强鱼类对细菌感染耐受能力基因的研究对鱼类养殖业的可持续进步有着重要意义。在高等动物的一些研究中表明, 诱发细菌性败血症并致死的重要因素是

正常炎症反应紊乱^[7]和负调控炎症反应没有及时发生^[8]。相关的临床实验表明, 通过抑制炎症反应和降低炎症因子的活化水平^[9], 能够降低感染对机体的负面作用^[10], 并提高机体对细菌性败血症的耐受力。因此, 为抑制细菌性败血症过程中炎症紊乱, 研究如何防止炎症相关信号通路的过度激活和相关炎症因子的表达失调是解决此类问题的关键。不断有新的研究揭示 miRNA 参与机体炎症反应调控过程。在拟南芥 (*Arabidopsis*) 的相关研究中, 第一次发现存在 miRNA 参与宿主抵抗细菌感染的现象, miR-393 能够抑制生长素信号通路, 从而作用于丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syr-*

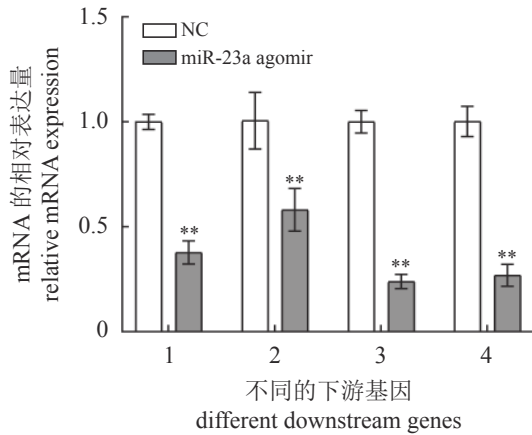


图 6 miR-23a 对下游基因的调控作用

miR-23a agomir 转染 CIK 细胞后, qPCR 检测下游基因 1. *ldha*、2. *ldhba*、3. *pdha1a* 和 4. *pdha1b* 的表达; 图中数据表示为平均值±标准差 ($n = 3$); “*”代表显著差异, $P < 0.05$; “**”代表极显著差异, $P < 0.01$

Fig. 6 Regulatory effect of miR-23a on downstream genes

Expression of downstream genes *ldha*, *ldhba*, *pdha1a* and *pdha1b* by qPCR after miR-23a agomir was transfected to CIK cells; 1. *ldha*, 2. *ldhba*, 3. *pdha1a*, 4. *pdha1b*; error bars indicate the mean and standard deviation ($n = 3$); “*” represents significant difference, $P < 0.05$, “**” represents very significant difference, $P < 0.01$

ingae) 感染拟南芥的致病过程^[21]。虽然 miRNA 调控细菌侵袭和胞内病原感染过程的作用机制仍未被深入探究。但研究发现 miRNA 通过靶向 mRNA 调控机体免疫反应, 它既能够增加炎症反应以应对病原体入侵^[22], 也能衰减炎症反应以保护机体^[23]。

虽然 NF- κ B 亚基 P65 与 miR-23a 启动子区结合可以抑制其表达有被报道^[24], 但是关于 miR-23a 如何调节先天免疫的报道并不多见。miR-23a 在人体原代巨噬细胞中存在很高的表达量, 研究表明, 在 LPS、CpG 或 poly(I: C) 刺激后, miR-23a 表达水平出现时间依赖性下调, 说明 miR-23a 参与 TLR 介导的先天免疫反应过程, 揭示了 miR-23a 在免疫细胞中的功能^[25]。在巨噬细胞中, miR-23a 是由 TLR 触发的先天免疫反应的正向调节因子。当巨噬细胞受到 TLR 配体如 LPS、CpG 或 poly(I: C) 刺激时 miR-23a 的表达量下调。由于 miR-23a 的表达量降低, 从而引起 NF- κ B 信号通路的负调控因子 A20 的表达量增加, NF- κ B 活性下降导致促炎基因表达量受到抑制。因此, miR-23a 可能是控制炎症反应的一个新的治疗靶点。根据课题组目前研究发现, miR-462^[26] 通过调控 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1*, miR-21^[27] 通过调控 *jnk*

和 *ccr7*, miR-731^[28] 通过调控 *Gadd45aa*、miR-23a-3p^[29], miR-23a-5p^[29] 通过调控 *CiGadd45ab*, 以调节嗜水气单胞菌感染后草鱼的炎症反应和细胞凋亡。在本研究中, 嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞后, miR-23a 的表达量出现显著变化, 表明其参与免疫反应调控。在细菌感染 CIK 细胞过程中, miR-23a 的表达水平在 6、12 h 显著上调, 感染 36 h 后 miR-23a 的表达水平显著下调。由此我们推测 miR-23a 可能参与草鱼细菌感染的早期调控反应。在其他鱼类中也有相似发现, 由于细菌感染, miRNA 表达模式产生显著变化^[30]。但是, miR-23a 对草鱼感染嗜水气单胞菌过程中的免疫应答反应机制尚未深入探究。

根据生物信息学软件 RNAhybrid 预测显示, *tbk1* 和 *glut1* 可能是 miR-23a 的潜在靶基因。TBK1 是来自于 I κ B 激酶家族的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 参与细胞增殖^[31]、凋亡^[32]、自噬^[33]等一系列先天性免疫应答。GLUT1 是第一个被克隆的葡萄糖转运蛋白, 被激活的 T 细胞和效应 T 细胞通过 GLUT1 可选择性靶向 T 细胞葡萄糖代谢, 以抑制炎症反应, 促进耐受性和免疫抑制^[34]。在本研究中, *tbk1* 和 *glut1* 的表达模式与 miR-23a 的变化负相关。通过双荧光素酶报告基因系统分析, 确认 *tbk1* 和 *glut1* 是 miR-23a 的靶基因。miR-23a 模拟物和抑制剂转染实验结果显示, 由于过表达和抑制 miR-23a 的表达水平, *tbk1* 和 *glut1* 的表达量也对应发生下调和上调, 充分说明两者之间的负调控关系, 进一步证明 *tbk1* 和 *glut1* 是 miR-23a 的靶基因。另外, 转染 miR-23a 模拟物后, *glut1* 的下游基因 *ldha*、*ldhba*、*pdha1a* 和 *pdha1b* 的表达量也被抑制, 表明 miR-23a 能够靶向 *glut1* 影响下游基因的表达。LDHA、LDHBA 属于乳酸脱氢酶, 抑制 LDHA 具有抗炎作用, LDHA 可以通过其在巨噬细胞中的抗炎作用成为自身免疫性疾病的潜在治疗靶点^[35]。PDHA1A、PDHA1B 属于丙酮酸脱氢酶, 能够调节糖代谢和心脏 AMPK 信号通路, 缺乏可加重心肌细胞肥大、炎症和纤维化^[36]。因此, miR-23a 通过调控下游基因 *ldha*、*ldhba*、*pdha1a* 和 *pdha1b* 的表达水平, 从而进一步影响炎症反应的进程。

综上, 本研究表明, miR-23a 的表达模式在嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞后发生显著变化, 揭示其参与了免疫应答; 鉴定了 *tbk1* 和 *glut1* 是 miR-23a 的靶基因; 另外, miR-23a 能够靶向 *glut1* 影

响下游基因的表达。实验结果为 miR-23a 在硬骨鱼类中免疫反应调控方面研究提供了重要思路,同时为进一步了解 miRNA 介导多个靶基因调节鱼类先天性免疫提供了更多理论依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] FAO. Fishery and Aquaculture statistics[M]. Roma: FAO, 2016.
- [2] Song X H, Zhao J, Bo Y X, *et al.* *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): an experimental model[J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 171-178.
- [3] Bo Y X, Song X H, Wu K, *et al.* Characterization of interleukin-1 β as a proinflammatory cytokine in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 584-595.
- [4] Syakuri H, Jung-Schroers V, Adamek M, *et al.* Beta-glucan feeding differentiated the regulation of mRNA expression of claudin genes and prevented an intestinal inflammatory response post *Aeromonas hydrophila* intubation in common carp, *Cyprinus carpio* L[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2014, 37(2): 149-156.
- [5] Zhang Y L, Ong C T, Leung K Y. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish[J]. *Microbiology*, 2000, 146: 999-1009.
- [6] Xu X Y, Shen Y B, Fu J J, *et al.* Next-generation sequencing identified microRNAs that associate with motile aeromonad septicemia in grass carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(1): 94-103.
- [7] Qu K, Wang Z, Lin X L, *et al.* MicroRNAs: key regulators of endothelial progenitor cell functions[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 448: 65-73.
- [8] He Y D, Ju C Y, Zhang X B. Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans[J]. *Molecular Immunology*, 2015, 68(2): 399-403.
- [9] Wheeler B M, Heimberg A M, Moy V N, *et al.* The deep evolution of metazoan microRNAs[J]. *Evolution & Development*, 2009, 11(1): 50-68.
- [10] Takacs C M, Giraldez A J. MicroRNAs as genetic sculptors: fishing for clues[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(7): 760-767.
- [11] Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10): 1712.
- [12] Kowalski E J A, Li L W. Toll-interacting protein in resolving and non-resolving inflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 511.
- [13] Yi Y S. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses[J]. *Immunology*, 2017, 152(2): 207-217.
- [14] Andreassen R, Høyheim B. miRNAs associated with immune response in teleost fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 75: 77-85.
- [15] Nie L, Cai S Y, Sun J, *et al.* MicroRNA-155 promotes pro-inflammatory functions and augments apoptosis of monocytes/macrophages during *Vibrio anguillarum* infection in ayu, *Plecoglossus altivelis*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 70-81.
- [16] Chu Q, Gao Y H, Bi D K, *et al.* MicroRNA-148 as a negative regulator of the common TLR adaptor mediates inflammatory response in teleost fish[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4124.
- [17] Chu Q, Sun Y N, Cui J X, *et al.* Inducible microRNA-214 contributes to the suppression of NF- κ B-mediated inflammatory response via targeting *myd88* gene in fish[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(13): 5282-5290.
- [18] Zhao X Y, Chu Q, Cui J X, *et al.* microRNA-19a as a negative regulator in TLR signaling pathway by direct targeting myeloid differentiation factor 88 in miui croaker[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 87: 171-175.
- [19] 张国亮, 王浩, 张也, 等. 嗜水气单胞菌AH10(CCTCC AB2014155)的全基因组测序及比较分析[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 995-1005.
- Zhang G L, Wang H, Zhang Y, *et al.* Whole-genome sequencing and comparative analysis of *Aeromonas hydrophila* AH10 (CCTCC AB2014155)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 995-1005 (in Chinese).
- [20] Ordas A, Kanwal Z, Lindenberg V, *et al.* MicroRNA-146 function in the innate immune transcriptome response of zebrafish embryos to *Salmonella typhi*

- imurium* infection[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 696.
- [21] Navarro L, Dunoyer P, Jay F, *et al.* A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling[J]. *Science*, 2006, 312(5772): 436-9.
- [22] 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.
- [23] 刘杰. 黄鳝和斑马鱼性别相关 miRNA 的鉴定及表达分析 [D]. 武汉: 武汉大学, 2014.
Liu J. Identification and expression analysis of sex-related miRNAs in swamp eel and zebrafish[D]. Wuhan: Wuhan University, 2014 (in Chinese).
- [24] Rathore M G, Saumet A, Rossi J F, *et al.* The NF- κ B member p65 controls glutamine metabolism through miR-23a[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(9): 1448-1456.
- [25] Peng P, Li Z Y, Liu X Y. Reduced expression of miR-23a suppresses A20 in TLR-stimulated macrophages[J]. *Inflammation*, 2015, 38(5): 1787-1793.
- [26] 王安琪, 陶丽竹, 周丰林, 等. 草鱼 miR-462 通过靶向 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 调控嗜水气单胞菌感染诱导的免疫应答[J]. 水产学报, 2020, 44(9): 1467-1476.
Wang A Q, Tao L Z, Zhou F L, *et al.* miR-462 modulates cellular immune response by targeting *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1* in CIK cells infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(9): 1467-1476 (in Chinese).
- [27] Tao L Z, Xu X Y, Fang Y, *et al.* miR-21 targets *jnk* and *ccr7* to modulate the inflammatory response of grass carp following bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 258-263.
- [28] Fang Y, Xu X Y, Tao L Z, *et al.* Effects of microRNA-731 on inflammation and apoptosis by targeting *CiGadd45aa* in grass carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 97: 493-499.
- [29] Fang Y, Xu X Y, Shen Y B, *et al.* miR-23a-3p and miR-23a-5p target *CiGadd45ab* to modulate inflammatory response and apoptosis in grass carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 98: 34-44.
- [30] Guan X L, Zhang B C, Sun L. Japanese flounder pol-miR-3p-2 suppresses *Edwardsiella tarda* infection by regulation of autophagy via p53[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 103: 103531.
- [31] Sarraf S A, Sideris D P, Giagtzoglou N, *et al.* PINK1/Parkin influences cell cycle by sequestering TBK1 at damaged mitochondria, inhibiting mitosis[J]. *Cell Reports*, 2019, 29(1): 225-235.e5.
- [32] Yu H Y, Cleveland D W. Tuning apoptosis and neuroinflammation: TBK1 restrains RIPK1[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1339-1341.
- [33] Kumar S, Gu Y X, Abudu Y P, *et al.* Phosphorylation of *Syntaxin 17* by *TBK1* controls autophagy initiation[J]. *Developmental Cell*, 2019, 49(1): 130-144.e6.
- [34] Macintyre A N, Gerriets V A, Nichols A G, *et al.* The glucose transporter *Glut1* is selectively essential for CD4T cell activation and effector function[J]. *Cell Metabolism*, 2014, 20(1): 61-72.
- [35] Song Y J, Kim A, Kim G T, *et al.* Inhibition of lactate dehydrogenase a suppresses inflammatory response in RAW 264.7 macrophages[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19(1): 629-637.
- [36] Sun W Q, Quan N H, Wang L, *et al.* Cardiac-specific deletion of the *Pdha1* gene sensitizes heart to toxicological actions of ischemic stress[J]. *Toxicological Sciences*, 2016, 153(2): 411.

Regulation mechanism of miR-23a in *Ctenopharyngodon idella* during *Aeromonas hydrophila* infection

BAO Tianjie¹, BAO Shengcheng¹, FAN Kun¹, SHEN Yubang^{1,2,3}, XU Xiaoyan^{1,2,3*}, LI Jiale^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is the most productive aquaculture fish in the world. With the development of *C. idella* culture, diseases have occurred from time to time, and the disease caused by *Aeromonas hydrophila* infection lead to serious economic losses. miRNA is a kind of endogenous non-coding small molecule RNA with a length of about 22 nt, which can bind to 3'-UTR (3'-untranslated regions) of target mRNA to inhibit the translation of target mRNA or degrade target mRNA. As a new type of gene expression regulation molecule, miRNA can participate in the regulation of different types of biological processes such as cancer occurrence, immunity, development, cell differentiation, apoptosis and immune defense. The degree of complementarity corresponds to different forms of action. When miRNA and target mRNA 3'-UTR have incomplete complementary binding, protein production is inhibited at the translation level. When miRNA completely complements the target mRNA 3'-UTR, degradation generally occurs after transcription. At present, more than 30 000 miRNA molecules have been found in more than 200 species. In all kinds of aquatic animals, miRNAs perform a variety of biological functions in their bodies. For example, some miRNAs are closely related to the regulation of immune response in bony fish after virus or bacterial infection. During *Vibrio anguillarum* infection in ayu, miR-155 promotes pro-inflammatory functions and augments apoptosis of monocytes/macrophages. In addition, some studies have found that miRNAs such as miR-148, miR-214 and miR-19a can also inhibit the expression of MyD88, which can negatively regulate the inflammatory response caused by bacteria. In this study, the target genes of miR-23a were screened and determined to study its mechanism after *A. hydrophila* infection. In order to explore the regulatory mechanism of miR-23a in *C. idella* kidney (CIK) cells infected with *A. hydrophila*, the expression of miR-23a in CIK cells infected with *A. hydrophila* was determined by real-time quantitative PCR (qPCR). The target genes of miR-23a were predicted by RNAhybrid software and identified by dual-luciferase reporter assay system. Finally, the regulation of miR-23a on downstream genes was analyzed. The study found that the expression of miR-23a changed significantly at different time points of infection. In the dual-luciferase reporter assay and experiments of miR-23a agomir/antagomir transfection, the target genes were reversely regulated, and *tbk1*, *glut1* were identified as the target genes of miR-23a. The expression of *ldha*, *ldhba*, *pdha1a* and *pdha1b* were suppressed after overexpression of miR-23a. These results showed that miR-23a was involved in the regulation of immune response in CIK cells after *A. hydrophila* infection. *tbk1* and *glut1* are the target genes of miR-23a. miR-23a can affect the expression of downstream genes by targeting *GLUT1*. The above results provide important ideas for the role of miR-23a in the regulation of immune response in bony fishes, and provide more theoretical basis for further understanding of miRNA-mediated multiple target genes to regulate the innate immunity of fish.

Key words: miR-23a; *Ctenopharyngodon idella* kidney (CIK); *Aeromonas hydrophila*; immune response

Corresponding author: XU Xiaoyan. E-mail: xyxu@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China Youth Project (31802285); China Agriculture Research System (CARS-45-03); Shanghai Engineering and Technology Center for Promoting Ability (19DZ2284300)