



· 综述 ·

硬骨鱼免疫相关 microRNA 研究进展

汪小冬, 金生振, 赵鑫, 熊舒婷, 肖调义*

(湖南省特色水产资源利用工程技术中心, 湖南农业大学, 湖南长沙 410128)

摘要: MicroRNA (miRNA) 是一类长度为 18~25 nt 的非编码 RNA, 在硬骨鱼免疫应答中起重要作用。近年来, 借助高通量测序与荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术, 筛选到大量免疫相关的差异表达 miRNA (DE miRNA)。通过比较多种硬骨鱼在不同病毒/细菌感染条件的 miRNA 表达谱, 筛选出相同 DE miRNA, 并认为筛选出的 DE miRNA 是潜在参与调节宿主免疫应答的进化上保守的候选 DE miRNA。据此, 我们在病毒感染表达谱中筛选到 10 个进化保守的 DE miRNA, 细菌感染表达谱中筛选到 8 个保守的 DE miRNA。此外, miRNA 的功能研究也取得较大进展, 宿主 miRNA 不仅可直接抑制病毒的复制, 同时参与调控干扰素反应、炎症、细胞凋亡等过程。本文简述了硬骨鱼免疫相关 miRNA 的研究进展, 以期为硬骨鱼疾病预防与治疗提供新思路。

关键词: 硬骨鱼; 免疫应答; 差异表达 miRNA; 保守 miRNA

中图分类号: Q 785; S 942

文献标志码: A

MicroRNA (miRNA) 作为一类内源性的、进化上高度保守的非编码小 RNA 单链分子, 通过与靶基因的 3' 端非翻译区 (UTR) 结合而抑制靶基因的翻译或降解靶基因^[1], 进而调控生命活动。1993 年第一个 miRNA (lin-4) 在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中被发现, 并证明可以调控秀丽隐杆线虫发育过程后^[2], 大量的 miRNA 陆续被发现并对其功能和靶基因进行了研究。目前斑马鱼 (*Danio rerio*) 已报道了 373 个成熟的 miRNA^[3]; 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 有 695 个成熟的 miRNA^[4]; 大西洋鲑 (*Salmo salar*) 被报道具有 497 个成熟 miRNA^[5]。且已证实 miRNA 在鱼类免疫应答中发挥重要调控作用, 但国内外尚缺乏全面的总结报道, 鉴于此, 本文对硬骨鱼免疫相关 miRNA 的研究进行了综述, 以期为后续更好研

究 miRNA 在鱼类疾病调控中的作用提供参考。

1 miRNA 分子的转录及作用机制

与基因表达类似, 基因组上的 miRNA 同样需要转录为成熟 miRNA 才能发挥具体的生物学功能。成熟 miRNA 的形成通常包含下面几个关键步骤, 首先 miRNA 在细胞核内被 RNA 聚合酶 II/III 转录成具有帽子结构和多聚腺苷酸尾巴的初级转录物 (pri-miRNA), pri-miRNA 通过 2 次剪切产生成熟的 miRNA。pri-miRNA 第 1 次剪切位于细胞核内, 产生大小约为 70 bp 并能形成茎环结构的 miRNA 前体 (pre-miRNA), 第 2 次剪切位于细胞质中, miRNA 前体被加工成约 22 bp 双链 RNA (miR-miR*)。最后, 双链 miRNA 中一条参

收稿日期: 2020-03-21 修回日期: 2020-04-26

资助项目: 国家自然科学基金 (31972787); 湖南农业大学双一流建设专项 (SYL201802020)

第一作者: 汪小冬 (照片), 从事水产遗传育种研究, E-mail: wangxd1225@126.com

通信作者: 肖调义, E-mail: tyxiao1128@163.com



与形成 RNA 介导的沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), 介导 RISC 靶向目的 mRNA, 而另一条链 (miR*) 则被降解。

RISC 复合物与靶基因 mRNA 的 3' 端 UTR 的碱基结合, 对靶基因进行降解或翻译抑制。当 miRNA 5' 端 2~8 个核心序列 (seed sequence) 与靶 mRNA 完全互补配对时, RISC 复合体会发挥作用使 mRNA 链断裂发生降解; 若二者序列不完全互补配对, 可能将抑制靶 mRNA 的翻译, 从而达到沉默该基因的作用。

2 硬骨鱼免疫相关 miRNA 的发现与表达谱比较分析

miRNA 作为硬骨鱼类免疫应答的调节因子, 在疾病研究中起着重要作用, miRNA 的差异表达与疾病发生 (如癌症、心血管疾病等) 密切相关^[6]。硬骨鱼中免疫相关 miRNA 的发现主要基于 3 种方法: 分子克隆、基因芯片和高通量测序。到目前为止, 大多数免疫相关 miRNA 的研究都是通过对不同硬骨鱼进行机体或者细胞水平 (病毒、细菌、免疫刺激物等) 的感染实验, 比较分析宿主感染病原体前后 miRNA 差异表达谱进而获得免疫相关差异表达的 miRNA (differentially expressed miRNA, DE miRNA), 并对其靶基因进行预测和验证。

2.1 病毒感染下的 miRNA 表达谱分析

当硬骨鱼受到病毒侵染或者 poly(I:C) 刺激

时, 某些宿主特定 miRNA 会发生明显的差异性表达。Schyth 等^[7]用基因芯片方法分析了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝脏感染病毒性出血败血症病毒 (VHSV) 前后的差异表达谱, 并筛选得到 120 个显著差异表达 miRNA。Zhang 等^[8]利用高通量测序技术, 在感染细胞肿大病毒 (Megalocytivirus) 的牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 脾脏中鉴定出 381 个 miRNA, 其中 121 个宿主 miRNA 在病毒感染后第 2~14 d 基因表达水平发生了显著变化。GO 和 KEGG 富集分析表明, miRNA 的靶基因主要定位在免疫应答、信号转导和凋亡过程通路中。Najib 等^[9]在 VHSV 感染牙鲈、He 等^[10]在草鱼出血病病毒 (GCRV) 侵染草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、Andreassen 等^[11]在鲑鱼甲病毒 (SAV) 感染大西洋鲑心脏、Guo 等^[12]在石斑鱼虹彩病毒 (SGIV) 感染斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 脾脏组织、Poly(I:C) 刺激诱导大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[13]和鲢 (*Müichthys miiuy*)^[14]的实验中也发现存在类似的差异性表达。

为了进一步研究病毒对特定组织免疫应答的影响, 大量病毒敏感细胞系被用于免疫应答研究。Wu 等^[15]发现, 鲤春病毒血症病毒 (SVCV) 感染可导致鲤 (*Cyprinus carpio*) 上皮细胞系 (EPC) 中 10 个 miRNA 表达上调和 4 个 miRNA 表达下调。在乌鳢 (*Channa argus*)^[16]和斜带石斑鱼^[17]中也进行了类似的 miRNA 表达谱研究。近年来硬骨鱼类在病毒病原体感染下的 miRNA 表达谱研究详见表 1。

表 1 硬骨鱼在病毒感染下的 miRNA 表达谱研究概况

Tab. 1 Overview of miRNA expression profiles of teleost fish under viral pathogen infection

物种 species	样本类型 sample types	病毒类型 viral types	差异 miRNA/个 DE miRNA	参考文献 reference
牙鲈 <i>P. olivaceus</i>	脾脏, 2~14 d	细胞肿大病毒 Megalocytivirus	121, 9	[8]
牙鲈 <i>P. olivaceus</i>	头肾, 6~72 h	病毒性出血败血症病毒 VHSV	63	[9]
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	脾脏, 细胞系, 48 h	石斑鱼虹彩病毒 SGIV	45, 43	[12]
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	肝脏, 1~8 d	病毒性出血败血症病毒 VHSV	120	[7]
草鱼 <i>C. idella</i>	脾脏, 1 d、3 d、5 d、7 d	草鱼出血病病毒 GCRV	36	[10]
大西洋鲑 <i>S. salar</i>	心脏, 1~4 周	鲑鱼甲病毒 SAV	20	[11]
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	胸腺、头肾、脾脏、肝脏混样, 30 h	Poly(I:C)	112	[13]
鲢 <i>M. miiuy</i>	脾脏, 24 h	Poly(I:C)	22	[14]
斜带石斑鱼 <i>E. coioides</i>	细胞系, 3 h、24 h	赤点石斑神经坏死病毒 RGNNV	51, 16	[17]
乌鳢 <i>C. argus</i>	细胞系, 3 h、24 h	乌鳢水泡病毒 SHVV	18, 143	[16]
鲤 <i>C. carpio</i>	细胞系, 36 h	鲤春病毒血症病毒 SVCV	14	[15]

受病毒种类、物种、样本类型(组织或细胞系)、感染时间等差异影响,导致目前研究中鉴定的 DE miRNA 数量有很大差异,部分 DE miRNA 并不一定是直接参与免疫应答,有些 DE miRNA 则可能是对感染引起的细胞内稳态变化所作出的反应,而另一些则可能是假阳性 DE miRNA。为了进一步鉴定直接参与免疫应答调控的 miRNA, Andreassen 等^[11]认为可以通过比较多种硬骨鱼在不同病毒感染条件的 miRNA 表达谱,筛选出相同 DE miRNA (3 种鱼中均有发现),并认为筛选出的 DE miRNA 即是潜在参与调节宿主免疫应答

的进化保守 DE miRNA。我们比较分析 9 种硬骨鱼病毒感染表达谱(表 1),发现存在 10 个进化保守的 DE miRNA (表 2)^[18],其中 7 个 miRNA 家族(miR-146、miR-21、miR-181、miR-155、miR-223、miR-100 和 miR-99)同时也参与高等脊椎动物的免疫应答调控^[19],这表明 miRNA 所调控的免疫基因网络中一部分共同靶基因在所有脊椎动物中都是进化保守的。miR-462 和 miR-731 是硬骨鱼特有的 2 个 miRNA,出现在报道的所有硬骨鱼基因组中^[7]。

表 2 硬骨鱼在病毒感染下的保守 DE miRNA 基因家族

Tab. 2 Evolutionarily conserved miRNA genes associated with immune response in teleost fish following viral challenge

miRNA	物种 species
miR-462	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 斜带石斑鱼 ¹ , 乌鳢, 虹鳟, 大西洋鲑
miR-731	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 斜带石斑鱼 ¹ , 乌鳢, 虹鳟, 大西洋鲑
miR-146	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 乌鳢, 虹鳟, 大西洋鲑
miR-21	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 乌鳢, 虹鳟, 大西洋鲑
miR-181	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 斜带石斑鱼 ¹ , 乌鳢, 虹鳟, 鳊, 大西洋鲑, 大黄鱼
miR-155	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 虹鳟, 鳊, 大西洋鲑
miR-223	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 虹鳟, 斜带石斑鱼 ¹ , 大西洋鲑, 斜带石斑鱼 ²
miR-1388	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 乌鳢, 大西洋鲑
miR-100	牙鲆 ¹ , 牙鲆 ² , 斜带石斑鱼 ¹ , 乌鳢, 虹鳟
miR-99	牙鲆 ² , 斜带石斑鱼 ¹ , 乌鳢, 虹鳟, 大黄鱼

注: 牙鲆¹和牙鲆²分别指牙鲆在细胞肿大病毒和病毒性出血败血症病毒感染下的研究; 斜带石斑鱼¹和斜带石斑鱼²分别指斜带石斑鱼在石斑鱼虹彩病毒及斜带石斑鱼鳍条细胞在赤点石斑神经坏死病毒感染下的研究

Notes: *P. olivaceus*¹ and *P. olivaceus*² mean *P. olivaceus* challenged with megalocytivirus and VHSV respectively; *E. coioides*¹ means challenged with SGIV, *E. coioides*² means fin cell line challenged with red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV)

2.2 细菌感染下的 miRNA 表达谱分析

在细菌感染条件下,鱼体内 miRNA 表达谱发生相应变化,调控疾病的发生,目前大量参与细菌感染免疫应答的 miRNA 被发现并进行研究(表 3)。通过同源 PCR 扩增和测序技术在尖吻鲈(*Lates calcarifer*)鉴定到率属于 29 个保守 miRNA 家族的 63 个 miRNA,其中 miR-29、miR-103、miR-125 和几个 let-7 家族成员在所有组织中呈现稳定性表达,而 miR-1、miR-21、miR-183、miR-184 和 miR-192 呈现高度保守的组织特异性表达;同时利用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导处理尖吻鲈,发现其脾脏中所鉴定的 miRNA 50% 以上表达上调,提示这些 miRNA 在急性炎症免疫反应中发挥了重要作用^[20]。斑马鱼在感染哈维

氏弧菌(*Vibrio harveyi*)后, miR-122 和 miR-194 表达量均降低,而用 LPS 处理斑马鱼肝脏细胞(ZFL)后, miR-122、miR-192 和 miR-194a 表达显著上调。用强力霉素(doxycycline)处理后,斑马鱼肝脏细胞中 IL-22、LZM、TLR1、TLR3、TLR4a 和 TNF- α 均出现显著上调^[21]。在感染沙门氏伤寒杆菌(*Salmonella typhi*)及海鱼分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)后,斑马鱼 miR-146 家族经 MyD88-TRAF6 信号通路介导而被激活,引起表达上调,并认为 miR-146 可能具有调节载脂蛋白介导的脂质转运的作用^[22]。鳊感染鳊弧菌(*V. anguillarum*)前后鉴定出 12 个差异表达 miRNA,且这些差异表达的 miRNA 能够通过调控 TLRs (Toll-Like Receptors) 以及 TLR 相关信号通路蛋白的表达,进而

表 3 硬骨鱼在细菌感染下 miRNA 表达谱研究的概况

物种 species	样本类型 sample type	细菌类型 bacterial type	差异 miRNA/个 DE miRNA	参考文献 reference
尖吻鲈 <i>L. calcarifer</i>	脾脏, 24 h	LPS	34	[20]
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	胚胎 8 h, 成年个体 6 d	鼠伤寒沙门氏杆菌 <i>S. typhimurium</i>	15, 57	[22]
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	头肾、脾脏、肝脏、肠混池, 20 h	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	99	[25]
团头鲂 <i>M. amblycephala</i>	头肾、脾脏、肝脏混池, 2~24 h	LPS	113	[27]
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	脾脏, 6~72 h	无乳链球菌 <i>Streptococcus agalactiae</i>	218	[4]
草鱼 <i>C. idella</i>	脾脏, 72 h, 10 d	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	21	[26]
鳊 <i>M. miuy</i>	脾脏, 48 h	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	12	[23]
斑点叉尾鲷 <i>I. punctatus</i>	头肾、脾脏, 48 h	拟态弧菌 <i>V. mimicus</i>	512, 287	[29]
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	肝脏, 40 h	柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columnare</i>	30	[30]

激活 TLR 信号通路中的多个转录因子, 如 AP-1、IRF5、NF- κ B 和 IRF3, 这些转录因子能够引起有效的宿主免疫反应来清除感染的病原体^[23]。在香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 感染鳃弧菌过程中, miR-155 通过调控单核细胞和巨噬细胞中促炎症细胞因子的表达来控制感染^[24]。

半滑舌鲷鳃弧菌侵染表达谱中, 通过对差异 miRNA 进行靶基因预测, 发现靶基因定位在免疫系统发育及免疫反应通路上^[25]。草鱼嗜水气单胞菌感染表达谱分析发现 9 个差异表达的 miRNA^[26], 在无乳链球菌感染尼罗罗非鱼 6~72 h 时, 在脾脏中共有 218 个 miRNA 表达量发生显著变化^[4]。团头鲂在注射 LPS 后中共发现 113 个差异表达的 miRNA, 其中 63 个为高表达 miRNA^[27]。以上数据均说明不同细菌感染研究中获得的 DE miRNA

数目也存在一定差异, 基于上述的病毒感染研究表达谱中保守 DE miRNA 的鉴定标准, 在表 3 列出的 9 个表达谱中鉴定出 8 个保守 DE miRNA, 具体见表 4, 其中 5 个 miRNA (miR-462、miR-731、miR-181、miR-223 和 miR-146) 同时也参与病毒感染下的免疫反应调控, 而 miR-122、miR-192 和 miR-451 被报道广泛参与高等脊椎动物炎症免疫反应^[19,28]。

3 硬骨鱼免疫相关 miRNA 靶基因验证与功能研究

3.1 靶基因验证

目前 miRNA 靶基因的预测与验证主要采用 Western blot 或荧光定量 PCR (RT-PCR) 实验结果

表 4 硬骨鱼在细菌感染下的保守 DE miRNA 基因家族

miRNA	物种 species
miR-462	斑马鱼、尼罗罗非鱼、半滑舌鲷、团头鲂、草鱼
miR-731	斑马鱼、尼罗罗非鱼、半滑舌鲷、团头鲂、草鱼
miR-181	斑马鱼、半滑舌鲷、团头鲂
miR-223	斑马鱼、尼罗罗非鱼、半滑舌鲷、团头鲂、草鱼
miR-146	斑马鱼、尼罗罗非鱼、半滑舌鲷、草鱼
miR-122	半滑舌鲷、鳊、团头鲂
miR-192	尼罗罗非鱼、半滑舌鲷、鳊、团头鲂、尖吻鲈、草鱼
miR-451	尼罗罗非鱼、半滑舌鲷、团头鲂

来直接判定 miRNA 与该靶基因的靶向调控关系以及双荧光素酶报告基因检测的方法。荧光定量方法受限于不能直接确定出 miRNA 精确的特异性靶位点,而一般与高通量测序配合使用^[18]。例如前文提到的牙鲆^[8-9]、斜带石斑鱼^[17]等均通过高通量测序结合荧光定量技术,筛选差异性表达 miRNA 并将预测靶基因定位到相应信号通路上,预测免疫相关 miRNA 的功能。

此外,双荧光素酶报告基因检测方法是目前使用效果比较好的一种 miRNA 靶基因验证方法,在硬骨鱼 miRNA 靶基因验证上得到广泛应用,例如鳊的 miR-192^[31]、miR-122^[32]、miR-214^[33]、miR-217-5p 和 miR-8159^[34]等,加快了硬骨鱼免疫相关 miRNA 的功能研究。

3.2 免疫相关 miRNA 功能研究

免疫相关 miRNA 功能主要体现在影响病毒复制、调控干扰素反应、炎症反应以及通过加快/减缓宿主细胞凋亡等过程进而调节免疫反应。

调控病毒增殖 目前研究认为,乌鳢 miR-130-5p、miR-214 和 miR-216b 可以通过负调控乌鳢水泡病毒基因组中 N 基因和 P 基因的表达来抑制该病毒的复制^[16],同时 miR-214 还可通过靶向宿主糖原合成酶基因正调控病毒的增殖^[35]。石斑鱼虹彩病毒 (SGIV) 编码的 miR-13 可以通过下调病毒 MCP 的表达从而抑制病毒早期的复制,避免宿主过度的抗病毒免疫反应^[36]。

调控宿主干扰素免疫反应 鱼类干扰素本身不能抗病毒,主要通过 JAK-STAT 信号途径激活下游众多抗病毒蛋白的表达建立宿主细胞的抗病毒状态^[37]。在病毒核酸疫苗/干扰素诱导后,虹鳟 miR-462 和 miR-731 表达显著上调,反之敲低 miR-462 和 miR-731 会导致宿主疾病发展进程加快、死亡率上升^[38]。棒状病毒感染鳊巨噬细胞过程中,鳊 miR-3570 显著上调,并通过靶向 MAVS 介导的 NF- κ B 和 IRF3 信号通路,抑制 I 型干扰素和抗病毒基因产生而促进病毒快速增殖^[39]。miR-731 在牙鲆感染细胞肿大病毒早期被诱导表达上调,并且能通过抑制 IRF7 的表达减弱宿主干扰素抗病毒免疫反应,加速病毒的早期复制^[40]。在研究牙鲆感染迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 过程中发现, pol-miR-194a 的表达受该菌调控, pol-miR-194a 下调牙鲆 IRF7 和 I 型干扰素的表达,进而降低牙鲆的抗感染免疫应

答,最终促进迟缓爱德华氏菌的胞内复制^[41]。

调控炎症反应 鱼类 miRNA 对细菌感染引起的炎症反应主要通过靶向多种分子(如 TLRs 或 TLR 相关信号蛋白)来负调控 TLR 信号通路^[23]。鳊 miR-214^[33]、miR-148 和 miR-3570 通过靶向 MyD88,经由 NF- κ B 信号通路调控细菌感染诱导的免疫反应,防止宿主过度炎症反应^[42-43],同时鳊 miR-8159-5p 和 miR-217-5p 还可通过协同负调控 TLR1 调节 LPS 诱导的炎症反应^[34]。草鱼 miR-115 和 miR-142a-3p 通过抑制 TLR5 的表达,进而下调促炎症因子 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 等表达,减弱炎症反应^[44]。在赤点石斑鱼神经坏死病毒感染石斑鱼脾细胞 (GS) 过程中, miR-146a 则能直接靶向 TRAF6 负调控炎症反应过程^[45]。

调控细胞凋亡与自噬 细胞凋亡可抑制病毒复制,而病毒在长期进化过程中也获得了抗细胞凋亡的基因。石斑鱼虹彩病毒 (SGIV) 编码的 miR-homo HSV 可以抑制促凋亡病毒基因 (*LITAF*) 的表达来减弱病毒诱导的细胞凋亡^[46]。miR-731 通过抑制 p53 蛋白表达发挥抑制细胞凋亡的功能从而降低牙鲆脾淋巴细胞凋亡率^[40]。赤点石斑鱼 miR-146a 通过抑制胖头鲮肌肉细胞 (FHM) 中 NF- κ B 的激活而阻止 SGIV 感染引起的细胞凋亡^[47]。过表达香鱼单核细胞/巨噬细胞 MiR-155 基因,会加强炎症反应进而促进细胞凋亡^[24]。细胞自噬是大部分真核细胞所具有的一种程序性死亡机制。迟缓爱德华氏菌感染能够上调牙鲆 miR-3p-2 的表达从而促进牙鲆免疫细胞发生自噬,抑制迟缓爱德华氏菌的胞内复制^[48]。

4 小结与展望

在硬骨鱼-病原体互作过程中,miRNA 不仅可通过作用于病毒或宿主基因直接抑制病毒的增殖,还可以通过调控干扰素反应、炎症因子等的表达来控制感染过程,通过调控感染细胞的凋亡、自噬来减少病毒或细菌复制过程中对其生存环境所带来的不利影响。硬骨鱼免疫相关 miRNA 的功能研究为鱼类疾病研究提供了新的思路,可以考虑通过增强或者抑制某些 miRNA 的表达,进而对鱼类疾病进行预防和治疗。

靶基因预测的准确性依赖于能被有效利用的具有完整 3'UTR 序列高质量全长 mRNA 的转录本。受限于高质量 miRNA 组及 mRNA 组的缺

乏, 仅仅依靠 EST 产生的不完整序列进行预测, 导致靶基因预测准确性较低, 可以预期随着测序技术的进一步成熟, 将会有越来越多特定物种高质量 miRNA 组及 mRNA 组被测定, 因此更多 miRNA 的靶基因及功能将被阐述。

与哺乳动物相比, 鱼类种类繁多, 不同鱼类不仅具有保守的 miRNA 又具有各自独特的 miRNA, 这也导致鱼类 miRNA 靶基因及功能研究的困难, 因此, 未来通过单个靶基因验证结合基因组范围跨物种比较方法应用将更有效地鉴定硬骨鱼中参与免疫应答的 miRNA 所调控的真正靶基因, 同时通过 miRNA 的表达干预(过表达或敲低)实验进一步阐述 miRNA 在病原体感染中发挥的功能。

参考文献 (References):

- [1] Ha M J, Kim V N. Regulation of microRNA biogenesis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(8): 509-524.
- [2] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [3] Chen P Y, Manninga H, Slanchev K, et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning[J]. *Genes and Development*, 2005, 19(11): 1288-1293.
- [4] Wang B, Gan Z, Cai S H, et al. Comprehensive identification and profiling of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) microRNAs response to streptococcus agalactiae infection through high-throughput sequencing[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 54: 93-106.
- [5] Bekaert M, Lowe N R, Bishop S C, et al. Sequencing and characterisation of an extensive Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microRNA repertoire[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e70136.
- [6] Rupaimoole R, Slack F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16(3): 203-222.
- [7] Schyth B D, Bela-Ong D B, Jalali S A, 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.
- [8] Zhang B C, Zhang J, Sun L. In-depth profiling and analysis of host and viral microRNAs in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with megalocytivirus reveal involvement of microRNAs in host-virus interaction in teleost fish[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 878.
- [9] Najib A, Kim M S, Choi S H, et al. Changes in microRNAs expression profile of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in response to viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 51: 384-391.
- [10] He L B, Zhang A D, Chu P F, et al. Deep Illumina sequencing reveals conserved and novel microRNAs in grass carp in response to grass carp reovirus infection[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 195.
- [11] Andreassen R, Woldemariam N T, Egeland I Ø, et al. Identification of differentially expressed Atlantic salmon miRNAs responding to salmonid alphavirus (SAV) infection[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 349.
- [12] Guo C Y, Cui H C, Ni S W, et al. Comprehensive identification and profiling of host miRNAs in response to Singapore grouper iridovirus (SGIV) infection in grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 52(2): 226-235.
- [13] Qi P Z, Guo B Y, Zhu A Y, et al. Identification and comparative analysis of the *Pseudosciaena crocea* microRNA transcriptome response to poly(I: C) infection using a deep sequencing approach[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 483-491.
- [14] 韩京京. MicroRNA 调控鳊鱼 RIG-I 信号通路及功能分析 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2017.
- [15] Han J J. MicroRNA regulation of RIG-I like receptor signaling pathway and analysis of microRNA function in miiuy croaker[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [16] Wu S S, Liu L Y, Zohaib A, et al. MicroRNA profile analysis of *Epithelioma papulosum cyprini* cell line before and after SVCV infection[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2015, 48(1): 124-128.
- [17] Liu X D, Tu J G, Yuan J F, et al. Identification and characterization of microRNAs in snakehead fish cell line upon snakehead fish vesiculovirus infection[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(2): 154.
- [18] Chen W J, Yi L Z, Feng S S, et al. Characterization of microRNAs in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fin cells upon red-spotted grouper nervous necrosis virus infection[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 63: 228-236.
- [19] Andreassen R, Høyheim B. MiRNAs associated with immune response in teleost fish[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 63: 228-236.

- Comparative Immunology*, 2017, 75: 77-85.
- [19] Forster S C, Tate M D, Hertzog P J. MicroRNA as type I interferon-regulated transcripts and modulators of the innate immune response[J]. *Frontiers in Immunology*, 2015, 6: 334.
- [20] Xia J H, He X P, Bai Z Y, *et al.* Identification and characterization of 63 microRNAs in the Asian seabass *Lates calcarifer*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17537.
- [21] Wu T H, Pan C Y, Lin M C, *et al.* *In vivo* screening of zebrafish microRNA responses to bacterial infection and their possible roles in regulating immune response genes after lipopolysaccharide stimulation[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2012, 38(5): 1299-1310.
- [22] Ordas A, Kanwal Z, Lindenberg V, *et al.* MicroRNA-146 function in the innate immune transcriptome response of zebrafish embryos to *Salmonella typhimurium* infection[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 696.
- [23] Xu G L, Han J J, Xu T J. Comparative analysis of the small RNA transcriptomes of miiuy croaker revealed microRNA-mediated regulation of TLR signaling pathway response to *Vibrio anguillarum* infection[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 52: 248-257.
- [24] 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 and Shellfish Immunology*, 2019, 86: 70-81.
- [25] Sha Z X, Gong G Y, Wang S L, *et al.* Identification and characterization of *Cynoglossus semilaevis* microRNA response to *Vibrio anguillarum* infection through high-throughput sequencing[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 59-69.
- [26] 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 and Shellfish Immunology*, 2015, 45(1): 94-103.
- [27] Jiang Y H, Tang L L, Zhang F Y, *et al.* Identification and characterization of immune-related microRNAs in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 49: 470-492.
- [28] Sun Y, Peng R, Peng H M, *et al.* MiR-451 suppresses the NF-kappaB-mediated proinflammatory molecules expression through inhibiting LMP7 in diabetic nephropathy[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 433: 75-86.
- [29] Xu Z Q, Chen J P, Li X G, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by using Solexa sequencing technology[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54174.
- [30] Zhao L J, Lu H, Meng Q L, *et al.* Profilings of microRNAs in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Flavobacterium columnare*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 566.
- [31] Chu Q, Xu T J. MiR-192 targeting IL-1RI regulates the immune response in miiuy croaker after pathogen infection *in vitro* and *in vivo*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 54: 537-543.
- [32] Cui J X, Chu Q, Xu T J. MiR-122 involved in the regulation of toll-like receptor signaling pathway after *Vibrio anguillarum* infection by targeting TLR14 in miiuy croaker[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 58: 67-72.
- [33] Chu Q, Sun Y N, Cui J X, *et al.* Inducible microRNA-214 contributes to the suppression of NF-κB-mediated inflammatory response via targeting *myd88* gene in fish[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(13): 5282-5290.
- [34] Chu Q, Sun Y N, Bi D K, *et al.* Up-regulated of miR-8159-5p and miR-217-5p by LPS stimulation negatively co-regulate TLR1 in miiuy croaker[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 67: 117-125.
- [35] Zhang C, Li N Q, Fu X Z, *et al.* MiR-214 inhibits snakehead vesiculovirus (SHVV) replication by targeting host GS[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 299-303.
- [36] Yan Y, Guo C Y, Ni S W, *et al.* Singapore grouper iridovirus (SGIV) encoded SGIV-miR-13 attenuates viral infection via modulating major capsid protein expression[J]. *Virus Research*, 2015, 205: 45-53.
- [37] Zhang Y B, Gui J F. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 38(2): 193-202.
- [38] Bela-ong D B, Schyth B D, Zou J, *et al.* Involvement of two microRNAs in the early immune response to DNA vaccination against a fish rhabdovirus[J]. *Vaccine*, 2015, 33(28): 3215-3222.
- [39] Xu T J, Chu Q, Cui J X, *et al.* Inducible microRNA-3570 feedback inhibits the RIG-I-dependent innate immune response to rhabdovirus in teleost fish by targeting MAVS/IPS-1[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(2): e01594-17.
- [40] 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

- tos and cell cycle arrest[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28354.
- [41] Guan X L, Zhang B C, Sun L. pol-miR-194a of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) suppresses type I interferon response and facilitates *Edwardsiella tarda* infection[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 87: 220-225.
- [42] 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.
- [43] Chu Q, Sun Y N, Cui J X, *et al.* MicroRNA-3570 modulates the NF- κ B pathway in teleost fish by targeting myD88[J]. *Journal of Immunology*, 2017, 198(8): 3274-3282.
- [44] Xu X Y, Shen Y B, Fu J J, *et al.* MicroRNA-induced negative regulation of TLR-5 in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18595.
- [45] Ni S W, Yu Y P, Wei J G, *et al.* MicroRNA-146a promotes red spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) replication by targeting TRAF6 in orange spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 72: 9-13.
- [46] Guo C Y, Yan Y, Cui H C, *et al.* MiR-homoHSV of singapore grouper iridovirus (SGIV) inhibits expression of the SGIV pro-apoptotic factor LITAF and attenuates cell death[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83027.
- [47] Ni S W, Yan Y, Cui H C, *et al.* Fish miR-146a promotes Singapore grouper iridovirus infection by regulating cell apoptosis and NF- κ B activation[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(6): 1489-1499.
- [48] 管晓璐. 牙鲆 microRNA pol-miR-194a 和 pol-miR-3p-2 的调控机制及在迟缓爱德华氏菌感染过程中的作用研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.
- Guan X L. Study of regulatory mechanisms of Japanese flounder microRNA pol-miR-194a and pol-miR-3p-2 and investigation of their roles in *Edwardsiella tarda* infection[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese).

Advances of immune-related microRNA research in teleost fish

WANG Xiaodong, JIN Shengzhen, ZHAO Xin, XIONG Shuting, XIAO Tiaoyi*

(Hunan Engineering Technology Research Center of Featured Aquatic Resources Utilization,
Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: MicroRNAs, which are small non-coding RNAs with 18-25 nt, play important roles in immune response of teleost fish. Recently, more and more differentially expressed miRNAs (DE miRNAs) associated with immune response have been identified through high-throughput sequencing and RT-PCR technology. It is assumed that if the same miRNAs are detected as DE miRNAs in several species of teleost fish challenged with different viruses/bacteria, they are likely to be evolutionarily conserved miRNAs involved in the regulation of immune gene networks in the hosts. Based on the above assumption, ten miRNAs were discovered as responding to viral challenge, and eight miRNAs were described in response to bacterial challenge. In addition, the functional study of miRNA has also attracted attention with marked progress. It has been identified that miRNAs are involved in many immune response processes, such as in preventing the virus replication, in regulating interferon response, inflammation and cell apoptosis.

Key words: teleost fish; immune response; differentially expressed miRNA; conserved miRNA

Corresponding author: XIAO Tiaoyi. E-mail: tyxiao1128@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31972787); Double First-Class Construction Project of Hunan Agricultural University (SYL201802020)