



鲑降钙素对虹鳟鳞组织 miRNA 表达的影响

周启苓¹, 马 骞^{1,2*}, 王刘永¹, 毛非凡¹, 杨二军¹, 陈 刚^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东海洋大学, 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江), 广东 湛江 524025)

摘要: miRNA 作为一类非编码小 RNA 分子, 在脊椎动物骨代谢的分子调控网络中占有重要地位。本研究旨在探究钙调节因子对硬骨鱼类骨组织 miRNA 表达水平的影响。采用鲑降钙素 (salmon calcitonin, sCT) 对虹鳟幼鱼进行腹腔注射, 并在注射 24 h 后采集鳞片, 利用高通量测序技术和生物信息学方法对其中的 miRNA 表达谱进行分析。注射组及对照组样品 miRNA 测序分别获得 14 051 631 和 15 816 147 条高质量 miRNA 序列 (18~26 nt), 并分别从中鉴定出 568 和 592 种成熟 miRNA。注射 sCT 后的虹鳟鳞片中共筛选出 24 个差异表达 miRNA (DEMs, 其中 9 个表达上调, 15 个表达下调)。随后, 从中随机选取 8 个 miRNA 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测, 其检测结果与高通量测序结果一致。GO 注释和富集分析结果显示, DEMs 的预测靶基因主要被注释在金属离子结合、钙离子结合、G 蛋白偶联受体信号通路、Wnt 信号通路和经典 Wnt 信号通路等功能上, 靶基因主要在 NF-kappaB 输入细胞核的负调节、IL-1 β 分泌的负调节和 TGF- β 结合等功能上显著富集。KEGG 富集分析结果显示, DEMs 的靶基因显著富集在 Toll 样受体和雌激素等信号通路中。基于上述分析结果, 本研究筛选出 omy-miR-29a-5p、omy-miR-30d-5p、omy-miR-125b-2-p3、omy-miR-138、omy-miR-199b-5p 和 omy-miR-200b 等多个可能参与虹鳟骨代谢调控过程的 miRNA。本实验筛选出的差异 miRNA 可为硬骨鱼类骨代谢调控机制研究提供素材。

关键词: 虹鳟; miRNA; 鲑降钙素; 鳞; 钙代谢; 骨代谢

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

硬骨鱼体内约 99% 的钙以碳酸钙和羟基磷灰石的形式储存在各种骨组织中^[1]。这些骨组织通过形成和再吸收的动态循环过程不断被重塑, 以维持鱼体的骨稳态, 骨骼的这种新陈代谢过程即为鱼类的骨代谢。骨代谢的表现形式主要为钙的生物矿化 (骨形成) 及再活化 (骨吸收), 分别由成骨细胞^[2] 和破骨细胞^[3] 来完成。因此, 钙代谢可作为骨代谢的重要表征之一。鱼类的骨骼系统由内骨骼 (头骨、脊柱和肋骨等) 及外骨骼 (鳍和鳞) 共同组成。鳞是鱼类外骨骼的重要组成部分, 其

在细胞组成方面与其他高等脊椎动物骨骼相似^[2-3]。据报道, 硬骨鱼类中鳞组织的钙含量可高达机体总钙的 20%^[1,3]。与其他内骨骼相比, 鳞组织中的钙化盐在机体对钙的需求增加时最优先被活化利用^[1,3-4]。此外, 鳞组织还具有数量多、易于采集等特点, 因此可作为鱼类骨代谢研究的优良载体。

降钙素 (calcitonin, CT) 是由甲状腺滤泡旁细胞 (C 细胞) 分泌的一种小分子多肽激素, 可特异性作用于破骨细胞上的降钙素受体, 抑制破骨细胞的活性, 从而达到抑制骨盐溶解、阻碍钙由骨

收稿日期: 2021-09-07 修回日期: 2021-10-09

资助项目: 国家自然科学基金 (31772828); 广东海洋大学科研启动经费 (R19022)

第一作者: 周启苓 (照片), 从事鱼类生物学与遗传育种研究, E-mail: 18738627206@163.com

通信作者: 马骞, 从事海水鱼类发育生物学、生理学与遗传育种研究, E-mail: maq@gdou.edu.cn



组织中释出并最终降低血钙的作用, 在维持钙稳态方面具有重要作用^[5-6]。此外, CT能够刺激成骨细胞增殖和分化, 增强成骨细胞黏附能力; 还可通过促进 *OPG* 表达, 抑制成骨细胞的凋亡, 使成骨细胞数量增加^[7-8]。已有研究表明, CT对骨形成过程的调节作用主要通过 Wnt/ β -catenin 和 RANKL/RANK/*OPG* 信号通路完成^[9]。

鲑降钙素 (salmon calcitonin, sCT) 主要是从鲑科 (Salmonidae) 鱼类鳃中分离纯化而来, 具有活性高、半衰期长等优点^[10]。Gou 等^[11] 研究发现, 皮下注射 sCT 可减轻大鼠 (*Rattus norvegicus*) 软骨表面病变并显著增加其软骨厚度。在饥饿处理的金鱼 (*Carassius auratus*) 中, 腹腔注射 sCT 可降低其血浆中的 Ca 含量, 并促进鳞、肋骨和咽骨等组织的钙沉积^[12]。腹腔注射 sCT 也能够显著降低乌鳢 (*Channa punctatus*) 血钙水平, 同时显著提高骨骼中的钙含量^[13]。由此可见, sCT 作为脊椎动物、尤其是硬骨鱼类钙代谢过程的有效钙调因子, 对于骨代谢水平具有较强的调节作用。

miRNA 是一类长约 18~25 nt 的具有调控功能的非编码单链 RNA^[14]。脊椎动物中, miRNA 可通过与 mRNA 的 3'端非翻译区 (UTR) 中的互补序列结合, 在转录后调节基因表达。已有研究表明, 部分 miRNA 可通过调节成骨细胞、破骨细胞和软骨细胞等骨细胞的增殖和分化, 参与调控高等脊椎动物的骨代谢过程^[15]。例如, 在人 (*Homo sapiens*) 和大鼠的骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 中, miR-31 可通过抑制其靶基因 *OSTERIX*^[16]、*SATB2* 和 *RUNX2*^[17] 的表达来抑制成骨细胞分化。在人和小鼠 (*Mus musculus*) 的 BMSCs 中, miR-204 和 miR-211 可通过抑制 *RUNX2* 基因的表达来参与骨代谢调控^[18]。Wang 等^[19] 研究发现, 在人胚胎成骨细胞系 (hFOB) 中, miR-27 通过激活 Wnt 信号通路, 从而促进成骨分化, 也可通过促进碱性磷酸酶 (ALP) 和骨钙素 mRNA 的表达来促进成骨。He 等^[20] 研究发现, 在 miR-20b 介导的人间充质干细胞 (hMSCs) 成骨过程中, miR-20b 可通过负调控 *PPAR γ* 、*BAMBI* 和 *CRIM1*, 提高 *RUNX2* 表达量, 分阶段激活 BMP/Runx2 信号通路, 促进成骨细胞分化; miR-140 可通过调控斑马鱼 (*Danio rerio*) 软骨组织中骨转化因子 *sox9* 来抑制成骨^[21]。目前, 关于 miRNA 在鱼类骨代谢调控过程中的作用机制鲜有报道。

虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 属鲑形目 (Sal-

moniformes) 鲑科太平洋鲑属 (*Oncorhynchus*), 是我国养殖产量最高的鲑鳟鱼类^[22], 是 sCT 的天然来源生物之一。本研究通过对虹鳟幼鱼进行 sCT 腹腔注射, 并于注射后 24 h 采集鳞片用于转录组测序。通过分析注射组及对照组鳞片组织中 miRNA 的表达水平, 筛选差异表达 miRNA (DEMs), 并对其靶基因进行预测。随后, 对预测的靶基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析, 进一步分析 miRNA 在骨代谢过程中的作用机制。最后, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对部分 DEMs 的表达量进行检测, 验证测序结果的可靠性。本研究筛选到的可能参与虹鳟骨代谢调控过程的 miRNA, 可为阐明鱼类骨代谢的调控机制提供研究素材。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼来自山东省潍坊市临朐县淡水虹鳟养殖基地。实验开始前置于有效体积为 1 000 L (直径 1.6 m, 高 0.6 m) 的 PE 桶中, 水深约为桶高度的 1/2, 暂养 7 d (盐度 28, 水温 14~16 °C), 光周期为 12 h : 12 h, 每天早上 8:00 和下午 4:00 投喂配合饲料 (总投喂量约为鱼体重的 3%)。随后挑选健康且有活力的个体进行实验。

1.2 鲑降钙素注射处理及样品的采集

使用 MS-222 麻醉虹鳟幼鱼后, 注射组 (IG) 虹鳟腹腔注射 sCT (sCT 配制浓度为 0.2 μ g/mL, 注射剂量为 2 μ g/kg 鱼体重), 对照组 (CG) 腹腔注射等体积生理盐水^[13, 23]。注射 24 h 后分别刮取两组虹鳟幼鱼 [体长 (16.33 \pm 1.30) cm, 体重 (52.21 \pm 7.24) g] 鱼体左侧鳞片 (背鳍基部下方便至尾柄处), 并立即置于液氮速冻, 后转移至 -80 °C 保存, 用于转录组测序和 qRT-PCR 检测。实验过程中操作人员严格遵守相关法律法规及伦理规范, 并按照广东海洋大学动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

1.3 总 RNA 提取及 miRNA 测序

使用 TRIzol (Invitrogen, 美国) 提取 IG 和 CG 组的鳞组织总 RNA。采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 使用 Nanodrop 2 000 核酸蛋白测定仪检测样品的浓度及纯度。对检测合格的样品, 利用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离纯化 18~26 nt 的小分子 RNA。使用 TruSeq Small

RNA Sample Prep 试剂盒 (Illumina, 美国) 进行 miRNA 文库构建。通过 Illumina HiSeq 2 500 测序平台进行高通量测序, 测序读长为 single-end (SE) 50 nt。miRNA 测序由杭州联川生物技术股份有限公司完成。

1.4 数据处理及生物信息学分析

使用 miRNA 分析软件 ACGT101-miR (LC Sciences, 美国) 过滤数据, 得到碱基长度为 18~26 nt 的序列。将剩余序列比对到 mRNA、RFam 和 Rcpbase 数据库, 筛选并剔除 mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 和重复序列等相关序列后获得 Valid read。再将 Valid read 与 miRBase 数据库比对, 序列完全匹配的为已知 miRNA。根据 miRNA 标志性发夹结构, 通过 Pre-miRNA (mirs/MIRs) 数据库信息比对, 运用 miREvo^[24] 和 miRDeep2^[25] 软件预测新的 3p 和 5p miRNA。

计算各样品中 miRNA 的表达量, 使用 TPM 进行归一化处理。采用 *t* 检验方法对 IG 和 CG 组中 miRNA 进行差异表达分析, 按照表达量倍数差异 (fold change) > 2.0 或 < 0.5 和表达差异显著性

$P < 0.05$ 筛选出 DEMs。使用 TargetScan (筛选阈值为 > 80) 和 miRanda (筛选阈值为 < -20) 数据库对显著性差异的 miRNA 分别进行靶基因预测, 取两数据库的交集作为差异 miRNA 的最终靶基因。再利用 GO 和 KEGG 数据库分别对 DEMs 靶基因的集合进行功能注释和通路富集分析。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

随机选取 8 个 DEMs 进行 qRT-PCR 检测。以 U6 为内参, 通用下游引物 qPCR-MICRO-R 由 SYBR Green QPCR Mix (DF Biotech, 中国) 试剂盒提供, 上游引物由北京擎科生物科技有限公司合成 (表 1)。所有 qRT-PCR 反应均为 3 个生物重复, 每个重复包括 4 个技术重复。根据试剂盒说明书进行 qRT-PCR 检测。10 μ L 反应体系: cDNA 模板 1 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, 2 \times SYBR[®] Green Supermix 5 μ L, ddH₂O 3 μ L。利用 analytikjena-qTOWER 2.2 型 qRT-PCR 仪 (Analytik Jena AG, 德国) 进行扩增反应, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 39 次; 阈循环 (C_t) 值采用软件默认

表 1 用于 qRT-PCR 检测的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for qRT-PCR

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
PC-5p-14073_217_F	TGAATTCTCCCCAGCTCTTTG
PC-5p-14073_217_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAGAG
omy-miR-200b-5p_F	CTTACGAGGCAGCATTGGAGT
omy-miR-200b-5p_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCCAAT
omy-miR-2184-3p_1ss4CT_F	CACGTAGGCTCTTACAGTACAGTCG
omy-miR-2184-3p_1ss4CT_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGTACT
omy-let-7b-3p_1ss22CT_F	GTCCAACCTACTGCCTTCCTG
omy-let-7b-3p_1ss22CT_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGAAG
omy-miR-181a-3p_F	TGATTGTACCGTCGTATCCAGTG
omy-miR-181a-3p_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGTACA
omy-miR-2188-5p_F	CGGTCCAACCTCACATGTCC
omy-miR-2188-5p_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGACA
omy-mir-125b-2-p3_F	CGGGTTAGGCTCTCGGGA
omy-mir-125b-2-p3_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCTCC
omy-miR-30d-5p_F	CGGTGTAAACATCCTTGACTGAAA
omy-miR-30d-5p_RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCTTT
U6_F	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT
U6_R	ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC
qPCR-MICRO-R (common use)	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT

设置, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各样品的 miRNA 相对表达量^[26]。以平均值 \pm 标准差 ($\bar{n}=3$) 表示差异 miRNA 的相对表达值。利用 SPSS 19.0 软件中的单因素方差 (One-Way ANOVA) 法, 分析 miRNA 表达量在 IG 和 CG 组鳞片中的差异水平, 并进行 Duncan 氏多重比较, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 虹鳟鳞片转录组测序结果

对 IG 和 CG 组的虹鳟鳞片进行转录组测序及数据处理, 分别获得 27 877 410 和 33 156 331

条 Raw read, 经多次过滤后, 分别获得 14 051 631 (唯一序列 739 250 条) 和 15 816 147 (唯一序列 783 756 条) 条 Valid read (表 2)。两组样品的 Valid read 特征相似, 其中 22 nt 的 miRNA 最丰富, 分别占 IG 和 CG 组鳞片 miRNA 总数的 24.75% 和 25.73%, 其次是 23 nt 的 miRNA, 分别占两组样品 miRNA 总数的 22.21% 和 24.01% (图 1)。

2.2 虹鳟鳞片组织 miRNA 鉴定

将 Valid read 与 miRBase 数据库比对, 共鉴定到 629 种已知成熟 miRNA, 分属于 103 个不同的 miRNA 家族, 其中 IG 组包括 568 种 miRNA, CG 组包括 592 种 (图 2)。

表 2 虹鳟鳞片中表达 miRNA 的原始数据及已过滤序列的读取分布

Tab. 2 Original data of miRNA expression in *O. mykiss* scales and the sequence reading distribution of filtered sequences

类型 type	注射组 injection group (IG)				对照组 control group (CG)			
	总序列 total read	百分率/% percentage	唯一序列 unique sequences	百分率/% percentage	总序列 total read	百分率/% percentage	唯一序列 unique sequences	百分率/% percentage
Raw read	27 877 410	100.00	2 466 751	100.00	33 156 331	100.00	2 473 874	100.00
3ADT & length filter	12 341 334	44.49	1 693 919	68.54	15 473 606	45.88	1 657 731	66.90
Junk read	25 957	0.09	5 925	0.24	69 377	0.21	7 514	0.30
Rfam	1 351 145	4.84	24 809	1.01	1 694 971	5.15	21 399	0.88
mRNA	103 680	0.37	2 932	0.12	101 606	0.32	3 501	0.14
Repeats	211 264	0.76	1 568	0.06	462 333	1.37	1 444	0.06
rRNA	893 483	3.20	15 973	0.65	907 798	2.80	13 298	0.55
tRNA	305 986	1.10	3 904	0.16	581 152	1.72	3 013	0.12
snoRNA	22 742	0.08	1 016	0.04	27 663	0.09	1 062	0.04
snRNA	49 345	0.18	938	0.04	75 650	0.23	1 136	0.05
other Rfam RNA	79 589	0.29	2 978	0.12	102 708	0.31	2 890	0.12
Valid read	14 051 631	50.19	739 250	30.09	15 816 147	48.45	783 756	31.77

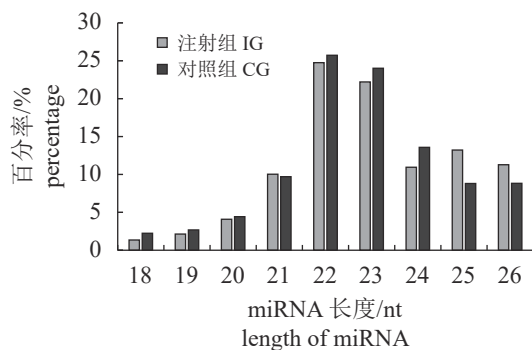


图 1 虹鳟鳞片中表达的 miRNA 的片段长度分布

Fig. 1 Fragment length distribution of miRNA expressed in scales of *O. mykiss*

2.3 差异表达 miRNA 筛选及其靶基因预测

根据筛选标准 ($|\log_2(\text{fold change})|>1$, 且 $P<0.05$) 对差异 miRNA 进行评估, 共获得 24 个 DEMs。其中已知 miRNA 21 个, 新预测的 miRNA 3 个。这些 DEMs 中有 9 个表达上调, 15 个表达下调 (图 3)。利用 TargetScan 和 miRanda 数据库分别对上述 24 个 miRNA 进行靶基因预测, 共获得 5 376 个靶基因, 其中每一 DEMs 的靶基因预测结果见表 3。

2.4 差异表达 miRNA 靶基因 GO 注释及富集分析

对 DEMs 的靶基因进行 GO 功能注释和富集分析。靶基因注释结果包括细胞组分 (cellular

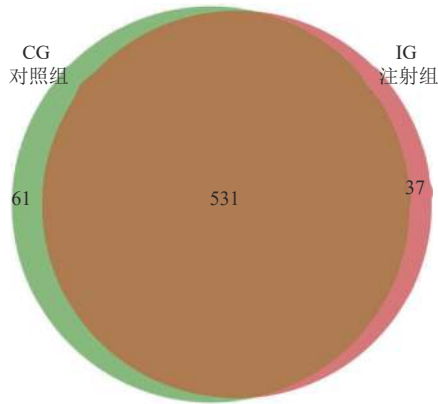


图2 虹鳟鳞片表达的 miRNA 的鉴定

橙色区域为共有 miRNA, 粉色区域为注射组特异表达 miRNA, 绿色区域为对照组特异表达 miRNA。

Fig. 2 Identification of miRNA expressed in *O. mykiss* scales

The orange region is the common miRNA, the pink region is the miRNA specific to injection group (IG), and the green region is the miRNA specific to control group (CG).

component)、生物过程 (biological process) 和分子功能 (molecular function) 三大功能类别 (图 4)。在生物过程类别中, 注释到靶基因数目最多的功能依次为: 转录调控-DNA 模板、信号转导、多细胞生物发育和细胞黏附等。在细胞组分分类中, 以膜、膜的组成部分、核和细胞质等功能注释靶基因较多。分子功能类别中以金属离子结合、蛋白质结合、DNA 结合和钙离子结合等功能注释靶基因最多。最显著富集的靶基因 GO 功能依次为 NF-kappaB 输入细胞核的负调节、β-连环蛋白结合、宿主对病毒基因组复制的负调控和 TGF-β 结合等功能 (图 5)。

2.5 差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 富集分析

虹鳟鳞片 DEMs 靶基因共富集到 315 条通路, 其中显著富集通路 79 条。排名前 20 的 DEMs 靶基因富集通路信息见图 6。最显著富集的通路是细菌入侵上皮细胞, 其次为黑色素生成、

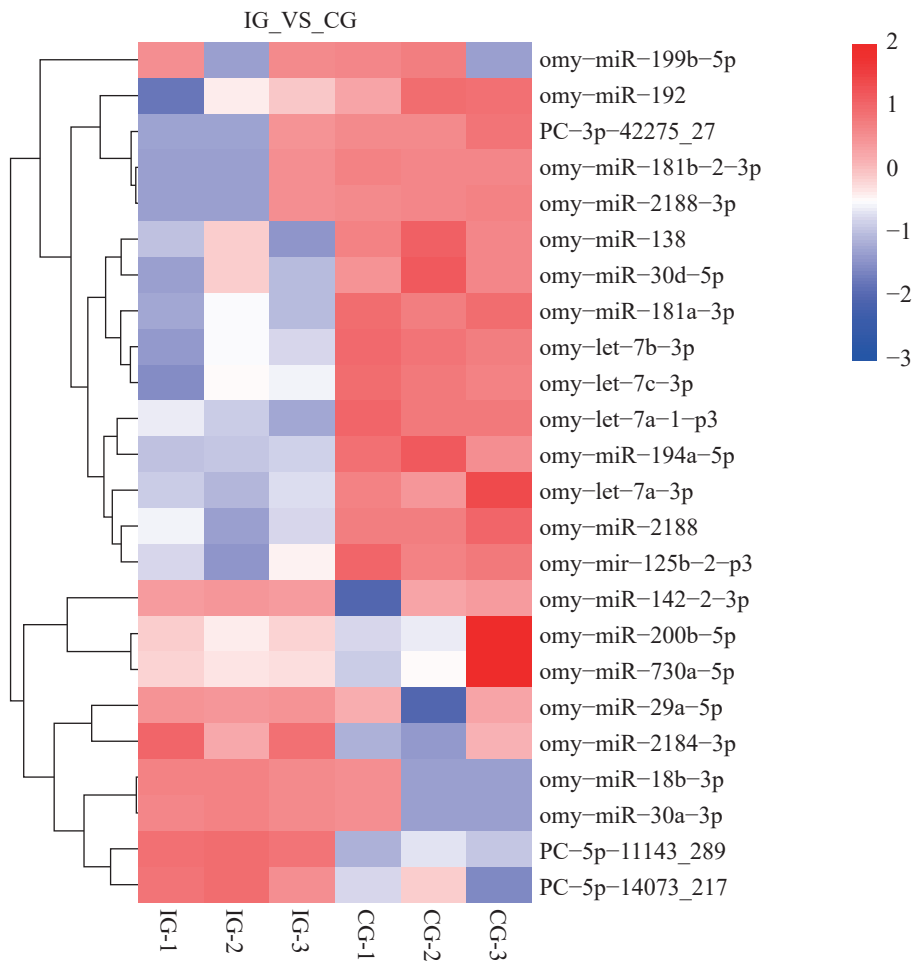


图3 差异表达 miRNA 热图

Fig. 3 Heat map of differentially expressed miRNA

表 3 差异表达 miRNA 与预测靶基因数

Tab. 3 Differentially expressed miRNA and the number of target genes

miRNA名称 miRNA name	序列(5'-3') sequences (5'-3')	注射组表达水平 injection group (IG)	对照组表达水平 control group (CG)	log ₂ 差异倍数 log ₂ (Fold change)	P值 P value	靶基因数 target gene
PC-5p-11143_289	TGATCCCTCCGGATGACCCTGTT	58	16	1.84	7.87E-05	173
omy-let-7b-3p	CTGTACAACCTACTGCCTTCCT	200	803	-2.01	6.73E-04	190
omy-miR-181a-3p	ACCATCGACCGTTGATTGTACC	297	676	-1.18	8.55E-04	38
omy-let-7a-1-p3	CTATAACAACCTCCTAGCTTTCC	13	51	-1.92	1.18E-03	74
omy-let-7c-3p	CTGTACAACCTTCTAGCTTTCC	2	7	-1.77	1.29E-03	163
omy-miR-2188	AAGGTCCAACCTCACATGCCT	16	71	-2.18	4.40E-03	172
omy-miR-29a-5p	CTGGTTTCACATGGTGGTTTAGA	11	2	2.64	5.14E-03	518
PC-5p-14073_217	TAATGAATTCTCCCCAGCTCTTT	60	16	1.87	5.96E-03	165
omy-miR-181b-2-3p	ACTCGCTGAACAATGAATGCA	2	12	-3.03	6.50E-03	44
omy-miR-138	AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG	1	4	-1.39	8.08E-03	383
omy-mir-125b-2-p3	ACGGGTTAGGCTCTCGGGAGCT	37	204	-2.45	1.16E-02	81
omy-miR-30d-5p	TGTA AACATCCTTGACTGAAAGCT	48	106	-1.13	1.91E-02	427
omy-miR-18b-3p	ACTGCCCTAAGTGCCCTTCTG	10	1	3.22	2.28E-02	231
omy-miR-2188-3p	GCTGTGTGAGGTCGGACCTATC	2	12	-3.03	2.48E-02	777
omy-miR-194a-5p	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA	17	54	-1.65	2.85E-02	343
omy-miR-192	ATGACCTATGAATTGACAGCCA	7	20	-1.41	3.10E-02	152
omy-miR-30a-3p	CTTTCAGTCGGATGTTGCAGCCA	16	2	2.94	3.19E-02	658
omy-miR-199b-5p	CCCAGTGTTTAGACTACCTGTTC	2	7	-1.83	3.72E-02	290
omy-miR-200b-5p	CATCTTACGAGGCAGCATTGGA	71	32	1.15	3.74E-02	130
omy-miR-730a-5p	TCCTCATTGTGCATGCTGTGTG	30	15	1.06	3.78E-02	369
omy-miR-2184-3p	GCATGTAGGCTCTTACAGTACA	122	32	1.91	3.87E-02	291
PC-3p-42275_27	ACTCGCTGAACAATGAATGCAT	2	7	-2.30	3.89E-02	50
omy-miR-142-2-3p	TGTAGTGTTCCTACTTTATGG	6	1	2.46	3.92E-02	294
omy-let-7a-3p	CTGTACAGCCTCCTAGCTTTCC	4	17	-2.21	4.22E-02	273

甘油磷脂代谢、致心律失常性右心室心肌病 (ARVC)、醚脂代谢和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染等通路。

2.6 miRNA 的 qRT-PCR 检测

随机选择 8 个 DEMs (7 个已知 miRNA 和 1 个新预测 miRNA) 进行 qRT-PCR 检测。8 个 miRNA 在 IG 与 CG 组鳞片中的表达量差异均极显著 ($P < 0.01$)。8 个差异 miRNA 中有 3 个 miRNA 上调、5 个下调, 各 miRNA 的表达模式均与测序结果一致 (图 7), 表明转录组测序结果可靠。

3 讨论

注射 sCT 24 h 后, 虹鳟鳞片中共筛选出 24 个显著 DEMs (9 个表达上调, 15 个表达下调)。表达上调的 miRNA 中, omy-miR-29a-5p 和 omy-

miR-200b-5p 的靶基因主要富集于 Wnt、TGF- β 和 Notch 等信号通路。据报道, 经典 Wnt 通路中的部分基因不仅能促进小鼠成骨细胞的分化、骨基质的形成及矿化, 还能够抑制破骨细胞的发生及骨吸收功能^[27]。其中, miR-29a/b 靶向基因为成骨细胞外基质蛋白编码基因, 是促进成骨细胞分化的关键调控因子。在体外培养的 hFOB 中, miR-29a 可通过下调 *DKK1*、*KREMEN2* 和 *SFRP2* 等在 Wnt 信号通路中起负调控作用的基因, 来增强 Wnt 信号转导, 进而促进成骨细胞分化^[28-29]。而 miR-29b 可通过下调抑制成骨细胞分化的 *HDAC4*、*TGF- β 3*、*ACVR2A*、*CTNNBIP1* 和 *DUSP2* 等靶基因的表达来促进成骨^[29-30]。由此可推测, omy-miR-29a-5p 在虹鳟鳞片的骨代谢过程中具有调节作用。此外, miR-200b 可通过激活成骨样细胞系 (MG-63) 中骨形成信号及软骨相关信号通路, 促进成

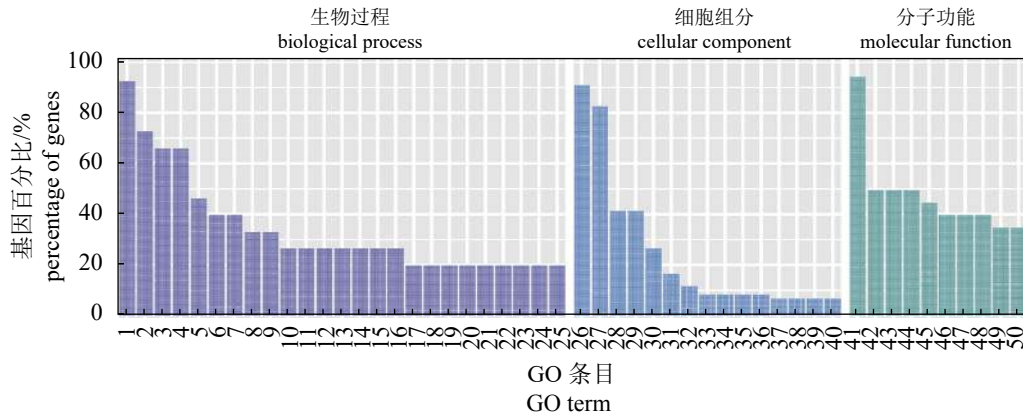


图4 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 富集

1. 转录调控, DNA-模板; 2. 信号转导; 3. 转录, DNA-模板化; 4. 多细胞生物发育; 5. 细胞黏附; 6. RNA 聚合酶 II 启动子的转录调控; 7. G-蛋白偶联受体信号通路; 8. 蛋白质水解; 9. Wnt 信号通路; 10. 运输; 11. 神经系统发育; 12. 磷酸化; 13. 确定左右对称性; 14. 小 GTPase 介导的信号转导; 15. 蛋白质磷酸化; 16. 神经嵴细胞迁移; 17. RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控; 18. 经典 Wnt 信号通路; 19. 氨基酸跨膜转运; 20. 外胚层参与原肠形成及口腔第二次形成; 21. 氧化还原过程; 22. 脂质代谢过程; 23. 背/腹模式形成; 24. 细胞分化; 25. 基因表达的正调控; 26. 膜; 27. 膜的组成部分; 28. 核; 29. 细胞质; 30. 质膜; 31. 质膜的组成部分; 32. 内质网; 33. 内质网膜; 34. 细胞外泌体; 35. 细胞外间隙; 36. 胞外区; 37. 胞质溶胶; 38. 高尔基体; 39. 蛋白质细胞外基质; 40. 线粒体; 41. 金属离子结合; 42. 蛋白质结合; 43. DNA 结合; 44. 钙离子结合; 45. 序列特异性 DNA 结合; 46. 转移酶活性; 47. 核酸结合; 48. 核苷酸结合; 49. ATP 结合; 50. 锌离子结合。

Fig. 4 GO enrichment of target genes of differentially expressed miRNA

1. regulation of transcription, DNA-templated; 2. signal transduction; 3. transcription, DNA-templated; 4. multicellular organism development; 5. cell adhesion; 6. regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; 7. G-protein coupled receptor signaling pathway; 8. proteolysis; 9. Wnt signaling pathway; 10. transport; 11. nervous system development; 12. phosphorylation; 13. determination of left/right symmetry; 14. small GTPase mediated signal transduction; 15. protein phosphorylation; 16. neural crest cell migration; 17. positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; 18. canonical Wnt signaling pathway; 19. amino acid transmembrane transport; 20. epiboly involved in gastrulation with mouth forming second; 21. oxidation-reduction process; 22. lipid metabolic process; 23. dorsal/ventral pattern formation; 24. cell differentiation; 25. positive regulation of gene expression; 26. membrane; 27. integral component of membrane; 28. nucleus; 29. cytoplasm; 30. plasma membrane; 31. integral component of plasma membrane; 32. endoplasmic reticulum; 33. endoplasmic reticulum membrane; 34. extracellular exosome; 35. extracellular space; 36. extracellular region; 37. cytosol; 38. Golgi apparatus; 39. proteinaceous extracellular matrix; 40. mitochondrion; 41. metal ion binding; 42. protein binding; 43. DNA binding; 44. calcium ion binding; 45. sequence-specific DNA binding; 46. transferase activity; 47. nucleic acid binding; 48. nucleotide binding; 49. ATP binding; 50. zinc ion binding.

骨^[31]。在人牙龈上皮细胞 Ca9-22 中, miR-200b 还可通过靶向作用于 *IKK β* 和 *ZEB1* 基因来抑制 *AMTN* 基因的表达, 并抑制 *IL-6* 的表达, 抑制破骨细胞活性^[32]。本研究中, omy-miR-200b-5p 靶基因预测结果显示, 该 miRNA 靶向作用于 *bmp4* 和 *bmp15* 等骨形态发生家族基因, 进一步揭示了 omy-miR-200b 参与调节骨细胞分化增殖过程的作用机制, 印证了 BMP 和 TGF- β 等相关信号通路在促进成骨过程的重要作用。综上, 上述两个差异 miRNA 及其靶基因富集的信号通路在虹鳟骨代谢过程中具有重要调节作用。

表达下调的 DEMs 中, omy-miR-30d-5p 靶基因因为蛋白激酶 C α (*protein kinase C alpha type*) 基因, 该基因的 KEGG 富集分析结果显示其参与 MAPK、Wnt 和 VEGF 等骨代谢相关信号通路的调控过程。此外, miR-30 家族成员可通过靶向作用于小鼠

Smad1 和 *Runx2* 基因, 抑制 *Bmp-2* 诱导的成骨细胞分化, 从而抑制 BMSCs 向成骨细胞分化^[33]。因此, 可选取该 miRNA 家族作为候选基因深入开展鱼类骨代谢研究。另一显著下调 DEMs, omy-miR-138 靶基因包括可促进成骨细胞分化及骨形成的 *bmp1a* 和 *bmp4* 基因。miRNA-138 是 hMSCs 成骨细胞分化的负调节因子, 可通过抑制 FAK-ERK1/2 信号通路中与成骨过程密切相关的 *RUNX2* 和 *OSX* 的表达来抑制成骨作用^[34]。据此推测, omy-miR-138 表达水平下降对于维持虹鳟鳞组织中成骨细胞分化过程具有重要意义。omy-miR-199b-5p 靶基因因为钙/钙调素依赖的蛋白激酶 II 型亚基 β (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta*), 该基因富集于钙信号通路和 Wnt 信号通路。上述表达下调的 DEMs 其靶基因多富集于 Wnt、MAPK 和 TGF- β 等信号通

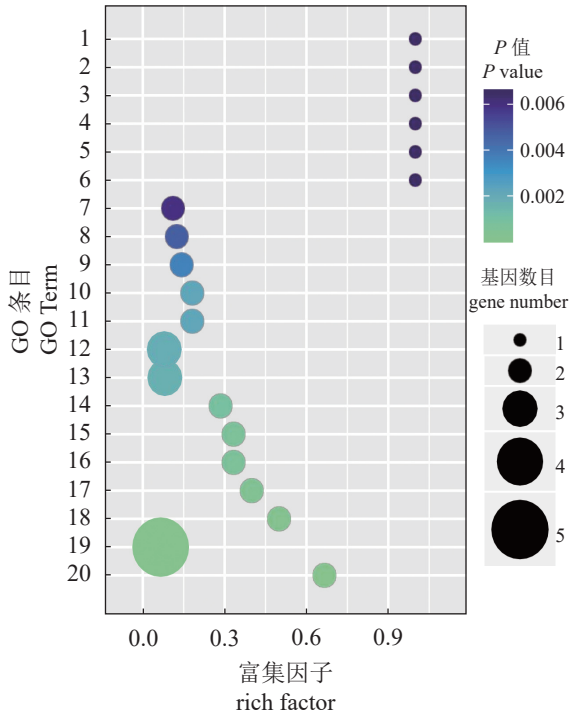


图 5 差异表达 miRNA 靶基因显著富集的前 20 个 GO 注释条目

圆圈代表一个 GO 条目，圆圈颜色代表 P 值，颜色越绿代表显著富集性越可靠，圆圈越大代表富集的靶基因数目越多，下同。1. 白细胞介素-1 β 分泌的负调节；2. 茎环结合；3. 参与炎症的细胞因子产生的负调节；4. 甲基化-DNA-[蛋白质]-半胱氨酸 S-甲基转移酶活性；5. 内质网膜的外在成分；6. RNA 磷酸二酯键水解；7. 表皮发育；8. 阴离子运输的调节；9. 自噬的正调控；10. 轴突再生的正调控；11. 蛋白质寡聚化；12. 氨基酸跨膜转运；13. 钙依赖性半胱氨酸型内肽酶活性；14. 细胞对酸性 pH 值的反应；15. 脊髓背侧/腹侧模式；16. 对活性氧反应的调节；17. TGF- β 结合；18. 宿主对病毒基因组复制的负调控；19. β -连环蛋白结合；20. NF-kappaB 输入细胞核的负调节。

Fig. 5 Top 20 GO terms with significant enrichment of differentially expressed miRNA target genes

The circle represents a GO term, the color of the circle represents P. The deeper the green color, the more reliable the significant enrichment, and the larger the circle, the greater the number of enriched target genes, the same below. 1. negative regulation of interleukin-1 beta secretion; 2. RNA stem-loop binding; 3. negative regulation of cytokine production involved in inflammation; 4. methylated-DNA-[protein]-cysteine S-methyltransferase activity; 5. extrinsic component of endoplasmic reticulum membrane; 6. RNA phosphodiester bond hydrolysis; 7. epidermis development; 8. regulation of anion transport; 9. positive regulation of autophagy; 10. positive regulation of axon regeneration; 11. protein oligomerization; 12. amino acid transmembrane transport; 13. calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity; 14. cellular response to acidic pH; 15. spinal cord dorsal/ventral patterning; 16. regulation of response to reactive oxygen species; 17. transforming growth factor beta binding; 18. negative regulation by host of viral genome replication; 19. Beta-catenin binding; 20. negative regulation of NF-kappaB import into nucleus, NF-kappaB.

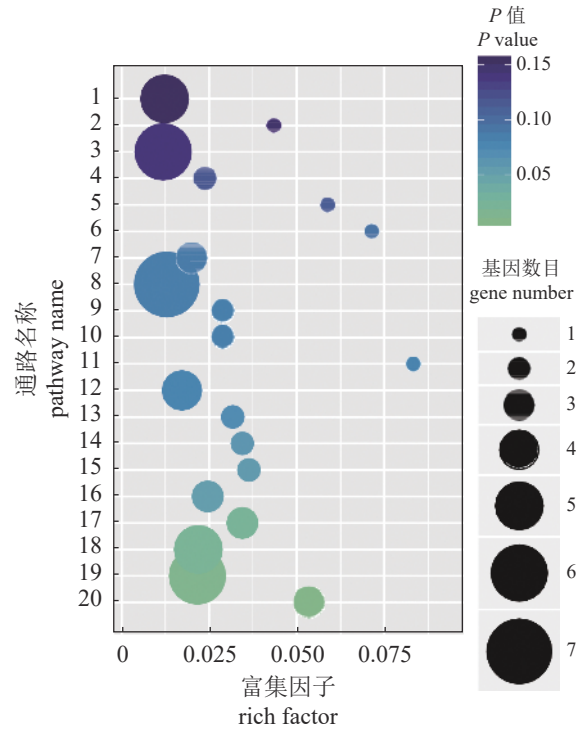


图 6 差异表达 miRNA 靶基因显著富集的前 20 条 KEGG 通路

1. 细胞因子-细胞因子受体相互作用；2. 长寿通路调节-蠕虫；3. 吞噬体；4. 阿尔茨海默氏症；5. 咖啡因代谢；6. 酮体的合成与降解；7. Hippo 信号通路；8. 内质网中的蛋白质加工；9. 病毒性心肌炎；10. 雌激素信号通路；11. 化学致癌；12. toll 样受体信号通路；13. 磷酸戊糖途径；14. 麻疹；15. 金黄色葡萄球菌感染；16. 醚脂类代谢；17. 致心律失常性右心室心肌病 (ARVC)；18. 甘油磷脂代谢；19. 黑色素生成；20. 细菌入侵上皮细胞。

Fig. 6 Top 20 KEGG pathways with significant enrichment of differentially expressed miRNA target genes

1. cytokine-cytokine receptor interaction; 2. longevity regulating pathway-worm; 3. phagosome; 4. alzheimer's disease; 5. caffeine metabolism; 6. synthesis and degradation of ketone bodies; 7. hippo signaling pathway; 8. protein processing in endoplasmic reticulum; 9. viral myocarditis; 10. estrogen signaling pathway; 11. chemical carcinogenesis; 12. Toll-like receptor signaling pathway; 13. pentose phosphate pathway; 14. measles; 15. *Staphylococcus aureus* infection; 16. ether lipid metabolism; 17. arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC); 18. glycerophospholipid metabolism; 19. melanogenesis; 20. bacterial invasion of epithelial cells.

路，其在鱼类钙代谢及骨代谢过程的调节作用有待进一步研究。

本研究筛选出的 DEMs 靶基因多注释到钙离子结合、金属离子结合和 G 蛋白偶联受体信号通路等功能上，这些功能在钙代谢调控过程中具有重要作用。钙代谢作为骨代谢的重要表征之一，在一定程度上反映了 sCT 对于虹鳟骨代谢过程的

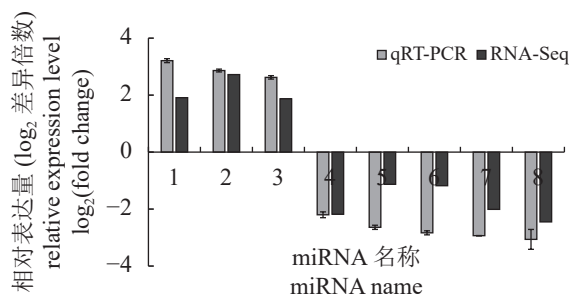


图 7 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 检测

Fig. 7 qRT-PCR detection of differentially expressed miRNA

1. omy-miR-2184-3p_1ss4CT; 2. omy-miR-200b-5p; 3. PC-5p-14073_217; 4. omy-miR-2188-5p; 5. omy-miR-30d-5p; 6. omy-miR-181a-3p; 7. omy-let-7b-3p_1ss22CT; 8. omy-mir-125b-2-p3.

调节作用。据报道, 小鼠 G 蛋白偶联受体信号通路可通过激活 Wnt 信号通路, 促进 MSCs 向成骨细胞方向分化。由此可见, 各关键信号通路在成骨细胞分化过程中的作用各异且相互调节。此外, DEMs 靶基因极显著富集在 NF-kappaB 输入细胞核的负调节和 *il-1β* 分泌的负调节功能上。NF-KB 在破骨细胞形成、分化、成熟和抗凋亡过程中具有重要作用^[35]。*IL-1β* 可通过多种方式促进破骨细胞的增殖分化, 促进骨吸收; 还可通过抑制 *OPG* 的表达, 抑制骨形成^[36]。据此, 基于 GO 注释结果筛选出的关键 DEMs 可为揭示骨代谢调控机制提供研究素材。

KEGG 富集分析结果显示, DEMs 靶基因主要被显著富集于 Toll 样受体信号通路、雌激素信号通路等重要的骨代谢调节通路。在 Toll 样受体信号通路 (TLR 信号通路) 中, TLR2 可通过诱导小鼠巨噬细胞分泌 TNF- α 或激活 *Nf-kb* 促进破骨细胞分化以及介导骨吸收, TLR4 可促进 *IL-1β* 过表达, 促进破骨细胞形成及骨吸收^[37]。雌激素是重要的骨代谢调节激素, 可直接作用于成骨细胞, 促进成骨细胞的增殖和抗凋亡; 可通过促进胶原及 BMP 合成, 来促进骨矿化; 与雌激素受体结合抑制破骨细胞活性; 或通过抑制成骨细胞分泌 *IL-6* 以及通过调节 *OPG*、*RANKL* 和 *M-CSF* 等细胞因子的平衡来抑制破骨细胞活性, 还可通过促进 *TGF-β* 的表达诱导破骨细胞凋亡^[36-38]。除此之外, DEMs 靶基因还被富集于各种能量代谢相关信号通路中, 可见该通路中的相关基因在鱼类骨代谢调节过程中可能具有重要作用。

本研究应用高通量测序技术对 sCT 注射组和对照组虹鳟鳞片进行 miRNA 测序, 获得了鳞片

miRNA 表达谱, 并利用生物信息学方法从中筛选可能参与鱼类钙代谢、骨代谢调控过程的 DEMs。基于 DEMs 靶基因功能注释及富集分析结果, 筛选到 omy-miR-29a-5p、omy-miR-200b-5p、omy-miR-30d-5p、omy-miR-138 和 omy-miR-199b-5p 等多个目标 miRNA, 这些 miRNA 在表达水平上受到 sCT 影响, 其对应的靶基因不仅在功能上参与骨形成、骨吸收等骨代谢的调控过程, 还多显著富集于与骨代谢相关的代谢通路, 上述 DEMs 的发现可为揭示鱼类骨代谢的调控机制研究提供素材。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Flik G, Fenwick J C, Kolar Z, *et al.* Effects of low ambient calcium levels on wholebody Ca²⁺ flux rates and internal calcium pools in the freshwater cichlid teleost, *Oreochromis mossambicus*[J]. *Journal of Experimental Biology*, 1986, 120(1): 249-264.
- [2] Bereiter-Hahn J, Zylberberg L. Regeneration of teleost fish scale[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1993, 105(4): 625-641.
- [3] Persson P, Johannsson S H, Takagi Y, *et al.* Estradiol-17 β and nutritional status affect calcium balance, scale and bone resorption, and bone formation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1997, 167(7): 468-473.
- [4] Berg A. Studies on the metabolism of calcium and strontium in freshwater fish. I. Relative contribution of direct and intestinal absorption[J]. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Dott. Maroco Marchi*, 1968, 23: 161-196.
- [5] Xie J B, Guo J, Kanwal Z, *et al.* Calcitonin and bone physiology: *in vitro*, *in vivo*, and clinical investigations[J]. *International Journal of Endocrinology*, 2020, 2020: 3236828.
- [6] Adeyemi W J, Olayaki L A. Effects of salmon calcitonin and Omega-3 fatty acids on glucoregulatory indices, lipid profile and antioxidant markers in experimental knee osteoarthritis in Wistar rats[J]. *Nigerian Journal of Physiological Sciences: Official Publication of the Physiological Society of Nigeria*, 2017, 32(2): 179-188.
- [7] 张柳, 张龙, 赵文国, 等. 降钙素对卵巢切除大鼠股骨

- 骨折愈合的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(5): 330-333,347.
- Zhang L, Zhang L, Zhao W G, *et al.* Effects of calcitonin on femoral fracture healing in ovariectomized rats[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2007, 13(5): 330-333,347 (in Chinese).
- [8] 田庆显, 黄公怡, 周君琳, 等. 降钙素对小鼠成骨细胞增殖及OPG/RANKL表达的影响[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(21): 1501-1505.
- Tian Q X, Huang G Y, Zhou J L, *et al.* Effects of calcitonin on osteoblast cell proliferation and OPG/RANKL expression: experiment with mouse osteoblasts[J]. *National Medical Journal of China*, 2007, 87(21): 1501-1505 (in Chinese).
- [9] Catalano A, Loddo S, Bellone F, *et al.* Pulsed electromagnetic fields modulate bone metabolism via RANKL/OPG and Wnt/ β -catenin pathways in women with postmenopausal osteoporosis: a pilot study[J]. *Bone*, 2018, 116: 42-46.
- [10] 高岩, 黄维清, 王敬东, 等. 鲑鱼降钙素对大鼠钙化血管中OPG/RANKL表达的影响[J]. *武汉大学学报 (理学版)*, 2009, 55(3): 359-364.
- Gao Y, Huang W Q, Wang J D, *et al.* Effect of salmon calcitonin on expression of OPG/RANKL in rat arterial calcification[J]. *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 2009, 55(3): 359-364 (in Chinese).
- [11] Gou Y, Tian F M, Kong Q F, *et al.* Salmon calcitonin attenuates degenerative changes in cartilage and subchondral bone in lumbar facet joint in an experimental rat model[J]. *Medical Science Monitor*, 2018, 24: 2849-2857.
- [12] Shinozaki F, Mugiya Y. Effects of salmon calcitonin on calcium deposition on and release from calcified tissues in fed and starved goldfish *Carassius auratus*[J]. *Fisheries Science*, 2000, 66(4): 695-700.
- [13] Mukherjee D, Sen U, Bhattacharyya S P, *et al.* The effects of calcitonin on plasma calcium levels and bone metabolism in the fresh water teleost *Channa punctatus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2004, 138(4): 417-426.
- [14] 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.
- [15] 黄杨竣, 周红海, 陈龙豪, 等. 非编码RNA对强直性脊柱炎的调控机制研究进展[J]. *海南医学院学报*, 2023(17): 1353-1360.
- Huang Y J, Zhou H H, Chen L H, *et al.* Research progress on regulatory mechanism of non-coding RNA in ankylosing spondylitis[J]. *Journal of Hainan Medical University*, 2023(17): 1353-1360 (in Chinese).
- [16] Baglio S R, Devescovi V, Granchi D, *et al.* MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals osterix regulation by miR-31[J]. *Gene*, 2013, 527(1): 321-331.
- [17] Deng Y, Wu S, Zhou H F, *et al.* Effects of a miR-31, *Runx2*, and *Satb2* regulatory loop on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells and Development*, 2013, 22(16): 2278-2286.
- [18] Huang J, Zhao L, Xing L P, *et al.* MicroRNA-204 regulates *Runx2* protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2): 357-364.
- [19] Wang T, Xu Z Y. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 402(2): 186-189.
- [20] He J, Zhang J F, Yi C, *et al.* miRNA-mediated functional changes through co-regulating function related genes[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13558.
- [21] Nakamura Y, He X J, Kato H, *et al.* Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(1): 64-71.
- [22] 户国, 王炳谦. 国际虹鳟育种产业简介及其对我国的借鉴意义[J]. *水产学杂志*, 2017, 30(3): 1-6.
- Hu G, Wang B Q. An overview of global rainbow trout breeding industry with insight into reference to China[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2017, 30(3): 1-6 (in Chinese).
- [23] Srivastav A K, Singh S, Mishra D, *et al.* Ultimobranchial gland of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*, in response to calcitonin administration[J]. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2009, 29(12): 963-968.
- [24] Wen M, Shen Y, Shi S H, *et al.* miREvo: an integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 140.

- [25] Friedländer M R, Mackowiak S D, Li N, *et al.* MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(1): 37-52.
- [26] 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.
- [27] Westendorf J J, Kahler R A, Schroeder T M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases[J]. *Gene*, 2004, 341: 19-39.
- [28] Kapinas K, Kessler C, Ricks T, *et al.* miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(33): 25221-25231.
- [29] Horita M, Farquharson C, Stephen L A. The role of miR-29 family in disease[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2021, 122(7): 696-715.
- [30] Li Z Y, Hassan M Q, Jafferji M, *et al.* Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(23): 15676-15684.
- [31] Annalisa P, Furio P, Ilaria Z, *et al.* Anorganic bovine bone and a silicate-based synthetic bone activate different microRNAs[J]. *Journal of Oral Science*, 2008, 50(3): 301-307.
- [32] Yamazaki-Takai M, Takai H, Iwai Y, *et al.* MiR-200b suppresses TNF- α -induced *AMTN* production in human gingival epithelial cells[J]. *Odontology*, 2021, 109(2): 403-410.
- [33] Wu T T, Zhou H B, Hong Y F, *et al.* miR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(10): 7503-7511.
- [34] Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, *et al.* MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells *in vivo*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(15): 6139-6144.
- [35] 沈逸, 何东仪. 调控破骨细胞分化发育的信号转导通路的研究进展[J]. *现代免疫学*, 2013, 33(4): 341-345,349.
- Shen Y, He D Y. Research progress on signal transduction pathways regulating the differentiation and development of osteoclasts[J]. *Current Immunology*, 2013, 33(4): 341-345,349 (in Chinese).
- [36] 张萌萌, 张秀珍, 邓伟民, 等. 骨代谢生化指标临床应用专家共识(2020)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(6): 781-796.
- Zhang M M, Zhang X Z, Deng W M, *et al.* Expert consensus on clinical application of biochemical indicators of bone metabolism (2020)[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2020, 26(6): 781-796 (in Chinese).
- [37] Zhang P, Liu J Z, Xu Q G, *et al.* TLR2-dependent modulation of osteoclastogenesis by *Porphyromonas gingivalis* through differential induction of NFATc1 and NF- κ B[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(27): 24159-24169.
- [38] Eastell R. Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche[J]. *Journal of Endocrinology*, 2005, 185(2): 223-234.

Effects of salmon calcitonin on the expression of miRNA in *Oncorhynchus mykiss* scales

ZHOU Qiling¹, MA Qian^{1,2*}, WANG Liuyong¹, MAO Feifan¹, YANG Erjun¹, CHEN Gang^{1,2}

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: As a class of small non-coding RNA molecules, miRNA plays an important role in the molecular regulatory network of vertebrate bone metabolism. Normally, bone metabolism is referred to the modeling and remodeling processes in regulating calcium homeostasis, and scale tissue of fish is an ideal model for the study of bone metabolism due to its abundant quantity and easy acquisition. Salmon calcitonin (sCT) is a small peptide hormone isolated from the gills of salmonidae, which can inhibit the activity of osteoclasts to regulate calcium homeostasis of fish. In order to explore the regulatory mechanism of teleost bone metabolism, intraperitoneal injection of sCT was performed in *Oncorhynchus mykiss* juveniles and scales were collected 24 h after the injection. High-throughput sequencing technology and bioinformatics methods were performed to evaluate the effect of sCT on the miRNA expression profiles in scales. The results showed that 14 051 631 and 15 816 147 high quality miRNA sequences (18-26 nt) were obtained from the samples of the injection group (IG) and control group (CG), respectively, and 568 and 592 mature miRNA were identified in IG and CG scales, respectively. A total of 24 differentially expressed miRNAs (DEMs) including nine up regulated and 15 down regulated DEMs were identified. Eight miRNAs were randomly selected for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) detection, and results were consistent with the RNA-Seq results. GO annotation and enrichment analysis revealed that the predicted target genes of DEMs were mainly annotated in the functions of metal ion binding, calcium ion binding, G protein coupled receptor signaling pathway, Wnt signaling pathway and classical Wnt signaling pathway; these genes were enriched in the negative regulation of NF-kappaB input into the nucleus, the negative regulation of interleukin-1 β (IL-1 β) secretion and the binding of transforming growth factor β (TGF- β). KEGG enrichment analysis showed that the predicted target genes of DEMs were significantly enriched in toll-like receptor and estrogen-related signaling pathways. A total of six miRNA (omy-miR-29a-5p, omy-miR-30d-5p, omy-miR-125b-2-p3, omy-miR-138, omy-miR-199b-5p and omy-miR-200b) were identified, which could provide materials for future studies on the molecular mechanism of bone metabolism in teleosts.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; miRNA; salmon calcitonin; scales; calcium metabolism; bone metabolism

Corresponding author: MA Qian. E-mail: maq@gdou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31772828); Program for Scientific Research Start-up Funds of Guangdong Ocean University (R19022)