



越冬期体色变异红罗非鱼差异表达 miRNA 的鉴定

王兰梅^{1,2}, 朱文彬¹, 傅建军¹, 罗明坤¹, 董在杰^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用

重点实验室, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128)

摘要: 为了探究红罗非鱼越冬期体色变异的分子机制, 实验构建了其 2 种体色 (正常粉红体色和变黑体色) 皮肤组织的小 RNA 文库, 每组 4 个重复, 组装后平均每组分别获得 12 190 544 和 11 891 890 条过滤后的读长 (clean reads), 获得 miRNA 成熟序列 669 个, 其中 337 个是已知的 miRNAs。鉴定出越冬期变黑体色相对于正常粉红体色鱼的差异表达 miRNAs 26 个, 其中上调 11 个, 下调 15 个, 且 12 个为已知的 miRNAs, 可能在红罗非鱼越冬期体色变异过程中发挥重要作用。富集分析发现了大量代谢和体色调控相关的通路。研究表明, 红罗非鱼越冬期的体色变异可能是色素细胞的增殖和迁移形成的, 与代谢相关的调控通路在其中发挥重要作用, 为解析红罗非鱼越冬期体色变异的机制奠定了基础。

关键词: 红罗非鱼; 越冬; 体色变黑; microRNA (miRNA)

中图分类号: S 965.125

文献标志码: A

罗非鱼原产于热带和亚热带地区, 由于其生长速率快、繁殖力强, 是人类重要的动物蛋白来源, 同时, 其加工副产品在全球水产养殖中占据重要的经济地位。红罗非鱼 (*Oreochromis* spp.) 一般认为是由突变型红色莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambicus*) 与其他种罗非鱼如尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) 杂交, 经多代选育而成的优良品种, 是世界性的重要经济鱼类^[1]。因其体色艳丽、腹腔无黑膜、适应性强、口感清新以及市场价格高等优点, 在我国的养殖面积不断扩大^[2]。然而在遗传选育过程中其体色分化以及越冬期间体色变异正成为限制其产业化发展的瓶颈, 体色变异主要表现为越冬期间体色变黑, 且随着环境温度的升高具有一定的可逆性^[3-5]。在我国大部分地区, 红罗非鱼要转入温室进行越冬, 否则会出现大量死亡以及

鱼体变黑的现象, 从而造成严重的经济损失。

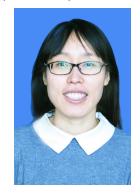
动物的表型变异受适应、生理阶段、遗传效应和环境等因素影响^[6]。当鱼体受到环境刺激时, 通过调节包括新陈代谢、渗透压和内分泌系统等, 激活体内两大生理调节系统: 神经系统和内分泌系统, 以维持细胞内的稳态^[7]。温度是影响动物代谢、发育和生长的主要环境因素^[8], 许多动物在寒冷的条件下都会出现体色变深的现象。如豹纹林蛙 (*Rana chiricahuensis*) 在低温 (5 °C) 条件下其背部和腹部皮肤颜色都明显暗于 25 °C 条件^[9]。金鱼 (*Carassius auratus*) 皮肤色素沉着的最佳温度为 26~30 °C^[10]。越冬期红罗非鱼在 16 °C 的水温下养殖 50 d 后, 其体色呈现青灰色, 明显深于 25~30 °C 水温下的粉红体色^[5]。Pavlidis 等^[8] 研究发现, 赤鲷 (*Pagrus pagrus*) 在低水温 (15 °C) 时背

收稿日期: 2022-01-18 修回日期: 2022-03-23

资助项目: 国家自然科学基金青年基金 (31802290); 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20221208); 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2020TD37)

第一作者: 王兰梅 (照片), 从事水产动物遗传育种方面研究, E-mail: wanglm@ffrc.cn

通信作者: 董在杰, 从事水产动物遗传育种方面研究, E-mail: dongzj@ffrc.cn



部皮肤颜色较深, 在 19 °C 时皮肤颜色较浅, 并认为水温通过改变色素体的运动改变了体色。研究者试图进一步探索鱼类耐低温的遗传模型和遗传基础^[11-14], 但目前, 温度诱导鱼类体色变异的机制和途径仍不清楚。

目前, 本课题组在红罗非鱼体色分化和变异的遗传分子机制的解析方面已经开展了较多研究。包括 3 种不同体色 (体色分化) 红罗非鱼皮肤转录组和 microRNA(miRNA) 文库的构建与分析, 筛选出了差异表达的基因和 miRNAs, 鉴定了红罗非鱼的黑色素合成和调控通路^[3, 15], 并对其中关键基因的功能进行了探讨^[16-17]。同时, 针对红罗非鱼越冬期的体色变异, 研究了温度^[5]、饲料^[18]和背景色^[4]等对红罗非鱼体色表型和黑色素合成通路相关基因表达的影响。为了探究红罗非鱼越冬期体色变异的机制, 本课题组在转录组水平已开展了相关研究, 本研究进一步对红罗非鱼在越冬期体色变异相关差异表达的 miRNA 进行了鉴定, 以期解析可能参与红罗非鱼越冬期体色变异的 miRNA 和调控通路, 从而为进一步完善和补充鱼类低温条件下引起体色变异的机制提供基础。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼与样品采集

实验用红罗非鱼养殖于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴岢亭试验基地。2020 年 11 月至 2021 年 3 月越冬期, 全身体色粉红的红罗非鱼养殖于 0.13 hm² (2 亩) 塑料棚池塘中, 期间水温保持在 (18±1) °C。2021 年 4 月越冬期结束时, 一部分鱼体色由全身粉红色变黑 (图 1)。此时, 分别从 10 月龄体色粉红 (WP) 和体色变黑 (PB) 个体中随机挑选 4 尾鱼, 获得其侧线上方背部中间的皮肤组织, 样品分别命名为 WP1、WP2、WP3、WP4、PB1、PB2、PB3 和 PB4。液氮速冻后置于



图 1 红罗非鱼越冬期 2 种体色类型

(a) 体色粉红个体, (b) 体色变黑个体。

Fig. 1 Two skin color types of red tilapia during overwintering

(a) WP, (b) PB.

-80 °C 冰箱中保存, 用于后续 RNA 提取建库。

1.2 RNA 提取、文库构建和测序

采用 TRIzol (Invitrogen, 美国) 方法提取红罗非鱼皮肤组织的总 RNA。提取的 RNA 样品首先用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度以及是否有污染, 28S (Sedimentation coefficient 沉降系数) 核糖体 DNA (ribosomal DNA, rDNA) 和 18S rDNA 条带清晰, 且 28S : 18S 亮度比例大约是 2 : 1, 5 S 位置见不到带, 然后用 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, BRIMS, Cambridge, 美国) 检测 RNA 的纯度 (OD_{260/280} 比值为 1.8~2.2), 接着用 Qubit (Thermo Fisher Scientific, 美国) 对 RNA 浓度进行精确定量 (RNA 样品浓度 ≥ 500 ng/μL), 用 Agilent 2100 (Agilent Technologies, 美国) 精确检测 RNA 的完整性, RNA 分子完整数 RIN (RNA integrity number) ≥ 7。

WP 和 PB 组 4 尾鱼的皮肤 RNA 样品分别建库, 对于质量合格的总 RNA 样本, 使用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行小 RNA (18~30 nt) 分离; 分离后的小 RNA 经乙醇沉淀离心富集; 富集后的小 RNA 样本, 根据 TruSeq Small RNA (sRNA) Sample Preparation Kit (Illumina, RS-200-0048) 方法及流程构建 8 个文库 (WP 和 PB 组各 4 个), 包括 T4 连接酶连接, RNA 反转录为 cDNA, PCR 扩增, 140~160 bp 核苷酸片段纯化等环节, 获得最终的小 RNA 文库。对构建好的文库用 Illumina HiSeq 进行 150 bp × 2 双端测序。

1.3 miRNA 鉴定

对原始数据 (raw reads) 进行质控分析, 使用 FastQC 软件 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) 对样本的测序数据质量进行可视化评估。使用 cutadapt^[19]、FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit) 和 NGSQCxToolkit^[20] 滤除含有 adapter、含 N 过多或含大量低质量碱基的读长 (reads), 过滤后保留的数据为过滤后的读长 (clean reads), 用于后续分析。使用 SOAP 程序 (<http://soap.genomics.org.cn>) 将 clean reads 比对到尼罗罗非鱼全基因组 (NCBI 登录号: GCF_001858045.2), 然后通过比对到 Rfam (<http://rfam.sanger.ac.uk/>) 和 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 数据库筛选出核糖体 RNAs (rRNAs), 转移 RNAs (tRNAs), 小核 RNAs (snRNAs) 和小核仁 RNAs (snoRNAs)。随后, 筛选的序列比对到

miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 鉴定出已知的 miRNAs。使用 MIREAP 软件 (<https://sourceforge.net/projects/mireap/>) 对未注释 sRNAs reads 进行新 miRNAs 的预测, 通过 RNA 标签的二级结构、切割位点和未注释 sRNA 可比对到基因组的最小自由能等特征来进行预测。使用 ggplot2 (<http://www.R-project.org/>) 进行 sRNA 的长度分布统计。

1.4 差异表达 miRNAs 分析

首先对各 miRNA 在各样本中的 reads 数进行统计, 用 RPM (reads per million) 对不同样本间 miRNA 的表达进行表达量标准化处理。处理公式: $RPM = \frac{\text{每个 miRNA 条目数} \times 10^6}{\text{所有 miRNA 条目数}}$ 。对原始序列数据采用 edgeR R 包^[21] 进行不同组之间的比较, 获取 miRNA 是否差异表达的结果, 差异表达 miRNA (differentially expressed miRNAs, DEMs) 的筛选条件: 错误发现率 (FDR) ≤ 0.05 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ 。

1.5 DEMs 靶基因预测

miRNA 通过与特定的 mRNA 靶向结合来调节相应基因的表达, 这些基因被称为 miRNA 的靶基因。基于已知和新预测的 miRNA, 根据其种子区与靶基因 3'-UTR 区或全序列的互补关系, 结合自由能和得分情况来预测 miRNA 的靶基因。为了进一步提高预测结果的准确性, 本研究同时采用 miRanda^[22]、TargetsScan^[23] 和 RNAhybrid^[24] 等 3 个软件对所有鉴定到的 miRNA 进行靶基因预测, 参数: miRanda, 能量阈值 (energy threshold) ≤ -20 且 score ≥ 140 ; RNAhybrid: 能量阈值 ≤ -20 且 P 值 < 0.01 。3 个软件都成功预测出的靶基因作为最终 miRNA 靶基因预测结果。

1.6 DEMs 靶基因功能富集分析

基因富集分析的目的是找出特定的基因集合的主要功能。Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) 是基因功能国际标准分类体系。使用 clusterProfiler R 包^[25] 对显著差异表达 miRNA 靶基因在整个基因组的注释背景下进行功能富集分析。通常当矫正后的 P 值 (P adjust) < 0.05 时, 认为该功能存在显著富集情况。KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 是有关代谢通路的主要公共数据库。KEGG 富集分析以通路为单位, 使用 clusterProfiler R 包^[25], 应用超几何检验, 找出与整个基因组注释背景相比, 在差异表达 miRNA 靶基因中显著性富集的通路。通常当矫正后的

$P < 0.05$ 时, 认为该通路存在显著富集情况, 也即我们关注的基因集显著集中在该通路中。

1.7 实时荧光定量 PCR (qPCR) 验证

为了验证测序结果的准确度, 实验随机挑选了 10 个 DEMs 进行了 qPCR 验证。采用 miRNeasy 试剂盒 (TaKaRa, 中国) 提取 miRNA, 然后根据 Mir-XTM miRNA 第一链合成试剂盒 (TaKaRa, 中国) 的操作步骤反转录成 cDNA 模板。qPCR 在 CFX-96 Real-time PCR 系统 (BioRad, 美国) 进行, 反应体系为 25 μ L: 12.5 μ L 2 \times SYBR Advantage Premix (TaKaRa, 中国), 2 μ L cDNA 模板, 0.5 μ L miRNA 特异性引物和 0.5 μ L miScript 通用引物 (10 μ mol/L), 9.5 μ L H₂O₂。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。U6 snRNA 作为内参基因, miRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

2 结果

2.1 sRNA 测序结果

使用 FastQC 对样本的测序数据质量进行评估后, 发现样本测序质量良好。对数据进行过滤后, 红罗非鱼 WP 和 PB 文库分别平均获得 14 748 358 和 12 981 453 条 raw reads, 对应 12 190 544 和 11 891 890 条 clean reads (表 1)。对质控后的序列进行 sRNA 长度分布统计发现, 其峰值均为 22 nt。

2.2 miRNA 的鉴定和差异表达分析

对过滤后的 clean reads 进行 miRNA 的预测, 共获得 miRNA 成熟序列 669 个, 其中 337 个已知的 miRNAs, 332 个新的 miRNA。对 8 个样本中 1 个以上 RPM 值大于 1 的 369 个原始 miRNAs 序列进行差异表达分析, 结果显示, PB 组和 WP 组共鉴定出 26 个显著差异表达的 miRNA, 其中上调 11 个, 下调 15 个 (图 2)。26 个显著差异表达的 miRNAs 包括 14 个新的 miRNAs, 12 个已知的 miRNAs, 其中 PB 相对于 WP 上调的 9 个已知 miRNAs, 包括 miR-203a、miR-200a、miR-200b、miR-725、miR-10544、miR-204a、miR-429b、miR-129 和 miR-10581c, 下调的 3 个已知 miRNAs, 包括 miR-10581a、miR-217 和 miR-499。

采用 miRanda、TargetsScan 和 RNAhybrid 3 个软件对所有鉴定到的 miRNA 进行靶基因预测。3 个下调的 miRNAs 中, miR-10581a 预测到 4 个靶

表 1 红罗非鱼皮肤 small RNAs (sRNAs) 测序数据评估

Tab. 1 Summary of the small RNAs (sRNAs) sequencing data in red tilapia

样品名 samples	原始序列 raw reads	过滤后序列 clean reads	原始碱基数/G raw base	过滤后碱基/G clean base	Q20/%	Q30/%
PB1	12 103 583	11 349 976	0.605 2	0.267 9	99.24	97.35
PB2	12 964 308	12 120 464	0.648 2	0.277 3	99.17	97.33
PB3	12 135 178	9 628 621	0.606 8	0.213 1	99.31	97.69
PB4	14 722 746	14 468 499	0.736 1	0.362 8	99.30	97.69
WP1	16 442 786	16 032 249	0.822 1	0.419 9	99.27	97.53
WP2	14 408 097	12 632 980	0.720 4	0.286 2	97.71	95.09
WP3	12 839 919	6 756 960	0.642 0	0.147 1	99.28	97.53
WP4	15 302 630	13 339 987	0.765 1	0.303 4	99.21	97.29

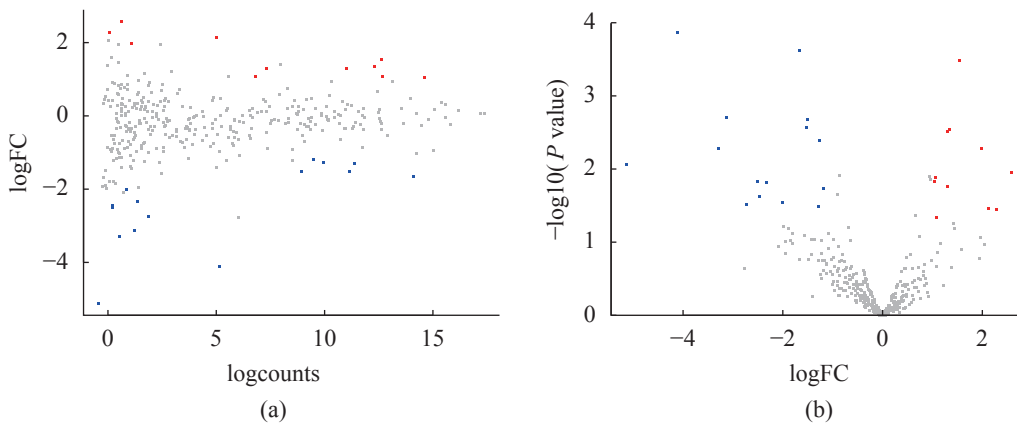


图 2 越冬期不同体色红罗非鱼 miRNA 差异表达 MA 图 (a) 和火山图 (b)

(a) MA 图, 反映 miRNA 表达量与表达倍数之间的关系, 横坐标表示 counts 数对数值, 纵坐标表示差异表达倍数的对数值; (b) 火山图, 反映 miRNA 表达倍数与统计学显著程度之间关系, 横坐标表示差异表达倍数的对数值, 纵坐标表示取对数后的 FDR 值, 纵坐标值越大, 差异越显著; 图中每个点代表一个 miRNA, 其中红色表示上调显著差异 miRNA, 蓝色代表下调显著差异 miRNA, 灰色表示非显著差异 miRNA。

Fig. 2 MA (a) and volcano diagram (b) of miRNA differential expression in different skin colors of red tilapia during overwintering period

(a) MA plot, which reflects the relationship between miRNA expression level and expression multiple, the y-axis represents the logarithm of fold change and the x-axis represents the logarithm of read counts; (b) volcano diagram, reflecting the relationship between miRNA expression multiple and statistical significance, the x-axis represents the log value of differential expression multiple, and the y-axis represents the logarithmic FDR value; the larger the y-axis value, the more significant the difference; each point in the figure represents a miRNA, where red represents a miRNA with significant up-regulation difference, blue represents a miRNA with significant down-regulation difference, and gray represents a miRNA with no significant difference.

基因, 分别为角蛋白 18a (keratin 18a、tandem duplicate 1)、铜转运 ATP 酶 (ATP7a)、翻译延伸因子 (Tu translation elongation factor) 和神经元膜糖蛋白 (neuronal membrane glycoprotein M6)。MiR-217 靶标到 2 个基因, 分别为抗凋亡蛋白 NR13 (anti-apoptotic protein NR13) 和胆碱转运蛋白 1 (choline transporter-like protein 1)。而 miR-499 只预测到 1 个含有 18b 的富含亮氨酸重复序列 (leucine rich repeat containing 18b) 的靶基因。

上调的 DEMs 中, miR-725 靶标到 4 个有注

释的基因, 分别为纺锤蛋白受体 (netrin receptor UNC5C) 基因、小核 RNA 激活复合体多肽 3 (small nuclear RNA activating complex polypeptide 3) 基因、E3 泛素连接酶 (E3 ubiquitin-protein ligase rnf146) 基因和锚蛋白重复序列 (ankyrin repeat domain 33Bb) 基因。MiR-10581c 靶标到 14 个基因, 包括酪氨酸蛋白激酶 JAK2 (tyrosine-protein kinase JAK2) 基因、富含半胱氨酸基因和甘氨酸的蛋白质 2 (cysteine and glycine-rich protein 2) 基因、酮戊二酸脱氢酶 [oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydro-

genase b] 基因、血管细胞黏附蛋白 1 (vascular cell adhesion protein 1) 基因、叶酸脱氢酶 (methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase) 基因、锌指蛋白 501 (zinc finger protein 501) 基因和肌动蛋白丝相关蛋白 1 (actin filament-associated protein 1) 基因等。MiR-204a 同样预测到 14 个靶基因, 包括冷应激蛋白 C2 (cold shock domain-containing protein C2) 基因、肾上腺素样受体 (α -1A adrenergic receptor-like) 基因、缝隙连接蛋白 8 (gap junction protein alpha 8) 基因、锚蛋白重复链 (ankyrin repeat) 基因、内皮素 (endothelin-2) 基因、泛素特异性肽酶 10 (ubiquitin specific peptidase 10) 基因和 GTP 结合蛋白 (rho-related GTP-binding protein) 基因等。MiR-129 靶标到 17 个基因, 包括 LIM 结构域激酶 1 (LIM domain kinase 1) 基因、线粒体核糖体蛋白 S15 (mitochondrial ribosomal protein S15) 基因、角蛋白 (keratin) 基因、ADP 聚合酶家族成员 3 (ADP-ribose polymerase family, member 3) 基因和细胞凋亡蛋白酶 7 (caspase 7) 基因等。MiR-10544 预测到靶基因 24 个, 包括 GTP 结合蛋白 (GTP-binding protein Rhes-like) 基因、视黄醇 X 受体 (retinoid X receptor) 基因、RAS 致癌基因家族成员 (RAB39B, member RAS oncogene family) 基因、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine-protein kinase BRSK2) 基因、钙/钙调素依赖性蛋白激酶 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) 基因和髓鞘蛋白零基因 (myelin protein zero) 基因等。

为了验证测序结果的准确性, 实验随机挑选了 10 个 DEMs 进行了 qPCR 验证, 其中 PB 相对于 WP 组上调和下调的 DEMs 分别 5 个。结果显示, 所有上调 miRNAs 的表达模式与测序结果一致, 5 个下调 miRNAs 中的 4 个表达模式与测序结果一致, 表明测序结果的可信度高 (图 3)。

2.3 差异表达 miRNA 靶基因功能富集分析

对所有差异表达 miRNA 的靶基因进行 GO 富集和 KEGG 通路分析, 以获得其潜在的功能注释。GO 富集分析主要匹配到 3 大类, 分别为生物学过程、细胞组分和分子功能, 其中生物进程富集的靶基因数最多, 其次是细胞组分。对 3 个类别中富集程度最高的前 20 个 GO 功能类绘制散点图 (图 4), 发现生物学进程中显著富集度最高的功能是翻译延伸、体节发生、造血作用和红细胞发育, 值得注意的是, 和体色相关的色素沉积和

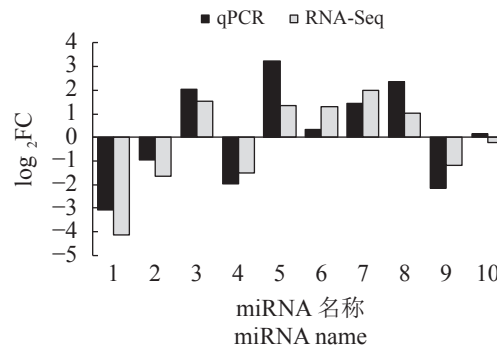


图 3 测序和 qPCR 的 miRNA 表达比较

Fig. 3 Comparison of expression between qPCR and Illumina sequencing in one comparative group between PB and WP of red tilapia

1. miR-1058a, 2. CUGGCGGCGACUCUGGACGCG, 3. miR-203a, 4. GGGGAUGUAGCUCAGUGGUAGAGC, 5. miR-200b, 6. miR-725, 7. miR-10544, 8. miR-204a, 9. miR-217, 10. miR-499.

背部聚集功能也在富集之列。细胞组分中显著富集度最高的功能是线粒体内膜、线粒体、线粒体基质、中间丝状体和 MICOS 复合物等。分子功能中显著富集度最高的功能是 2-氧化戊二酸依赖的双氧化活性、甲基转移酶活性和翻译延伸因子活性。

此外, KEGG 通路分析结果显示, 卵母细胞减数分裂、Wnt 信号通路、Notch 信号通路、钙信号通路和 Apelin 信号通路为主要的富集通路 (图 5)。

3 讨论

本研究中, 越冬期体色变黑红罗非鱼相对于未变黑个体, 有 9 个已知 miRNAs 表现出了上调, 包括 miR-203a、miR-200a、miR-200b、miR-725、miR-10544、miR-204a、miR-429b、miR-129 和 miR-10581c。miRNA 在鱼类中的功能研究十分有限。在高等动物中, miR-203a 可抑制相关癌细胞的增殖^[26], 可抑制人角膜上皮细胞和体外培养的人脐静脉内皮细胞的增殖和迁移^[27-28]。miR-200 家族成员 (miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429) 被认为是上皮表型的基本调控因子之一, 其结合锌指 E-box homeobox1 和 2 (ZEB1 和 ZEB2) 3'UTR (3'非编码区) 上的 miRNA 反应元件来抑制 ZEB1 和 ZEB2 的表达^[29], 同时过表达 miR-200 可抑制多种恶性肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[30-31]。有限的报道指出, miR-204 可导致胰腺癌细胞死亡^[32], miR-129 作为一个抑癌分子抑制肿瘤的发展^[33-34]。

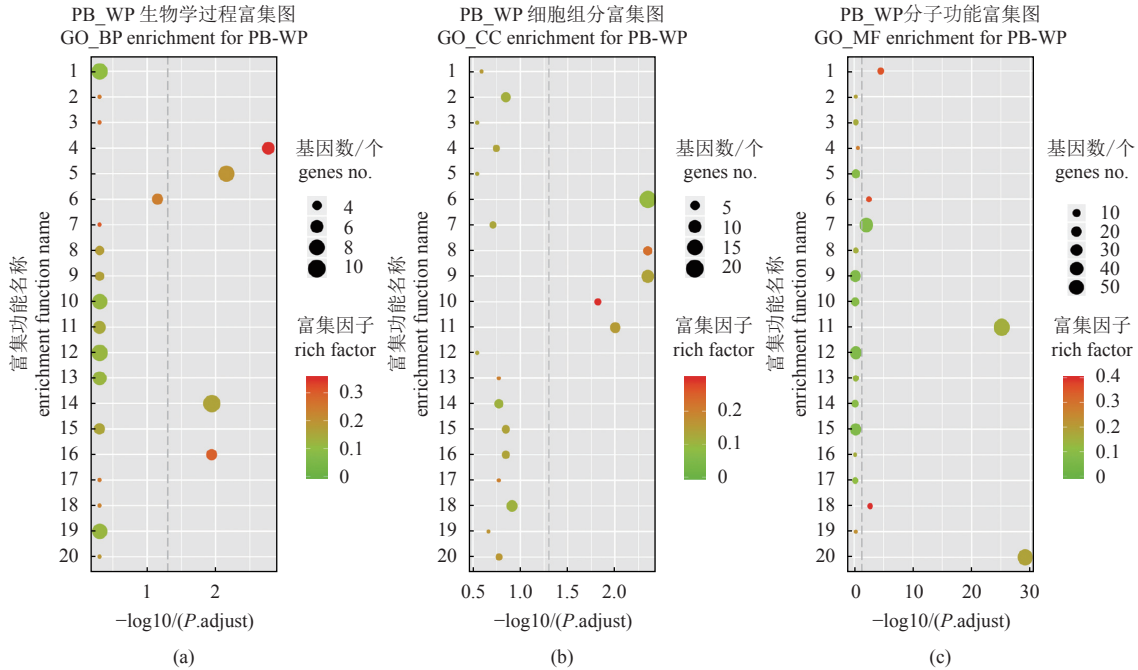


图 4 GO 富集功能散点图

(a) 生物学过程富集图, 1. 视觉感知, 2. tRNA 摆动尿苷修饰, 3. tRNA 甲基化, 4. 翻译延伸, 5. 体节发生, 6. 光刺激反应, 7. 造血干细胞分化调节, 8. 色素沉积, 9. 神经形成, 10. 转录负调控, DNA-模板化, 11. mRNA 通过剪接体剪接, 12. mRNA 加工, 13. 代谢过程, 14. 造血作用, 15. 红细胞分化, 16. 红细胞发育, 17. 背部聚集, 18. DNA 复制起始, 19. 细胞交流, 20. 腺苷酸环化酶-调节 G 蛋白-偶联受体信号通路; (b) 细胞组分富集图, 1. Z 阔瓣, 2. 转录因子复合体, 3. SWI/SNF 复合体, 4. 剪接体复合体, 5. 核膜孔, 6. 线粒体, 7. 线粒体膜, 8. 线粒体基质, 9. 线粒体内膜, 10. MICOS 复合体, 11. 中间丝状体, 12. 内质网膜组成, 13. Ino80 复合体, 14. 连接蛋白复合体, 15. 胶原蛋白-包含细胞外基质, 16. 纤毛, 17. 细胞膜穴样内陷, 18. 双细胞的紧密连接, 19. 质膜锚定组件, 20. 膜的锚定组件; (c) 分子功能富集图, 1. 翻译延伸因子活性, 2. 转移酶活性, 转移含磷基团, 3. 特异性 DNA 结合的转录调控区序列, 4. 突触融合蛋白结合, 5. 结构分子活性, 6. 眼球晶状体的结构成分, 7. 特定 DNA 结合序列, 8. 蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性, 9. 蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性, 10. 蛋白异源二聚体活性, 11. 甲基转移酶活性, 12. 激酶活性, 13. 水解酶活性, 水解 O 型糖基化合物, 14. 解旋酶活性, 15. GTP 酶活性, 16. 双链 DNA 结合, 17. 钙调素结合, 18. 钙通道调节活性, 19. 肾上腺素受体活性, 20. 2-氧化戊二酸依赖的双氧化活性; x 轴代表富集程度, 以校正的 P 值表示, 值越大表明富集越显著, y 向虚线右侧的点为显著富集; y 轴代表富集条目, 点的颜色表示富集因子, 代表富集的程度, 为注释到该类别的靶基因数与注释到该 GO 的所有基因的比值; 点的大小代表靶基因的数目; 每张图仅挑选对应分类中富集程度最高的前 20 个 GO 功能类绘制。

Fig. 4 Scatter diagram of GO enrichment function

(a) scatter diagrams of biological process, 1. visual perception, 2. tRNA wobble uridine modification, 3. tRNA methylation, 4. translational elongation, 5. somitogenesis, 6. response to light stimulus, 7. regulation of hematopoietic stem cell differentiation, 8. pigmentation, 9. neurogenesis, 10. negative regulation of transcription, DNA-templated, 11. mRNA splicing, via spliceosome, 12. mRNA processing, 13. metabolic process, 14. hemopoiesis, 15. erythrocyte differentiation, 16. erythrocyte development, 17. dorsal convergence, 18. DNA replication initiation, 19. cell communication, 20. adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway; (b) scatter diagrams of cellular component, 1. Z disc, 2. transcription factor complex, 3. SWI/SNF complex, 4. spliceosomal complex, 5. nuclear pore, 6. mitochondrion, 7. mitochondrial membrane, 8. mitochondrial matrix, 9. mitochondrial inner membrane, 10. MICOS complex, 11. intermediate filament, 12. integral component of endoplasmic reticulum membrane, 13. Ino80 complex, 14. connexin complex, 15. collagen-containing extracellular matrix, 16. cilium, 17. caveola, 18. bicellular tight junction, 19. anchored component of plasma membrane, 20. anchored component of membrane; (c) scatter diagrams of molecular function, 1. translation elongation factor activity, 2. transferase activity, transferring phosphorus-containing groups, 3. transcription regulatory region sequence-specific DNA binding, 4. syntaxin binding, 5. structural molecule activity, 6. structural constituent of eye lens, 7. sequence-specific DNA binding, 8. protein serine/threonine phosphatase activity, 9. protein serine/threonine kinase activity, 10. protein heterodimerization activity, 11. methyltransferase activity, 12. kinase activity, 13. hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, 14. helicase activity, 15. GTPase activity, 16. double-stranded DNA binding, 17. calmodulin binding, 18. calcium channel regulator activity, 19. adrenergic receptor activity, 20. 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase activity; the x-axis represents the degree of enrichment, which is represented by the corrected P value; the higher the value is, the more significant the enrichment is; the point to the right of the longitudinal dotted line is significant enrichment, the y-axis represents the enrichment items; the color of the dots represents the enrichment factor, representing the enrichment degree, and is the ratio of the number of target genes annotated to this category to all genes annotated to the GO; the size of the dot represents the number of target genes; the top 20 GO functional classes with the highest enrichment degree in the corresponding classification were selected and drawn.

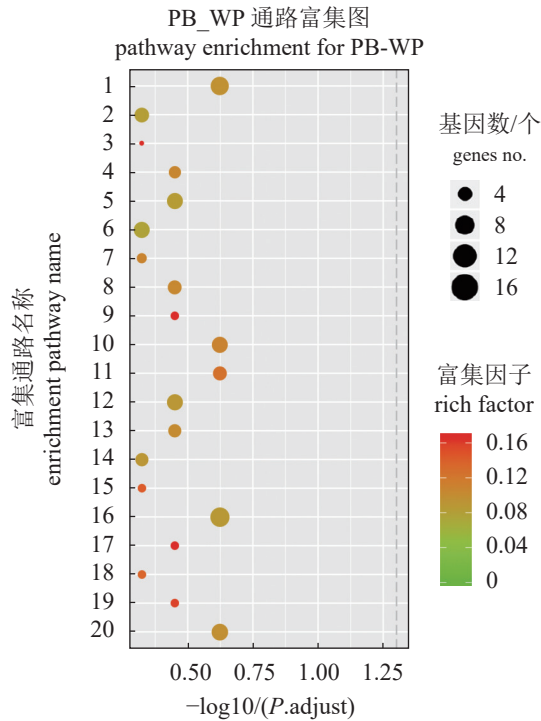


图 5 KEGG 通路富集散点图

1. Wnt 信号通路, 2. TGF-β 信号通路, 3. 牛磺酸和亚牛磺酸代谢, 4. 鞘脂类代谢, 5. RNA 转运, 6. 内质网蛋白质加工, 7. 光传导, 8. 磷脂酰肌醇信号系统, 9. 其他多糖降解, 10. 卵母细胞减数分裂, 11. Notch 信号通路, 12. 坏死性凋亡, 13. 磷酸肌醇代谢, 14. ErbB 信号通路, 15. 柠檬酸循环 (TCA 循环), 16. 钙信号通路, 17. 丁酸甲酯代谢, 18. 自噬-其他, 19. 精氨酸生物合成, 20. Apelin 信号通路。

Fig. 5 Scatter diagram of KEGG pathway enrichment

1. Wnt signaling pathway, 2. TGF-beta signaling pathway, 3. taurine and hypotaurine metabolism, 4. sphingolipid metabolism, 5. RNA transport, 6. protein processing in endoplasmic reticulum, 7. phototransduction, 8. phosphatidylinositol signaling system, 9. other glycan degradation, 10. oocyte meiosis, 11. Notch signaling pathway, 12. necroptosis, 13. inositol phosphate metabolism, 14. ErbB signaling pathway, 15. citrate cycle (TCA cycle), 16. calcium signaling pathway, 17. butanoate metabolism, 18. autophagy - other, 19. arginine biosynthesis, 20. Apelin signaling pathway.

同时, 本研究中越冬期体色变黑红罗非鱼相对于未变黑个体下调的 3 个已知 miRNAs 包括 miR-10581a、miR-217 和 miR-499。在高等动物中研究发现, 抑制 miR-217 可抑制癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[35-36]。miR-499 在心脏中含量丰富, 参与心肌缺血的保护^[37], 同时可作为肺癌细胞对放射治疗的增敏剂^[38]。值得注意的是, miR-499 只预测到 1 个靶基因, 其基因注释为含有 18b 的富含亮氨酸重复序列, 而富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 6 通过 Wnt/β-连环蛋白通路可对结肠癌 SW480 细胞的增殖、侵袭和凋亡产生影响^[39]。

由于 miRNA 在水产动物上的功能研究还十分有限, DEMs 在高等动物中的功能大多与细胞的增殖和迁移有关, 王兰梅等^[5]在研究温度对马来西亚红罗非鱼越冬期体色的影响时, 也指出温度刺激引起的鱼类体色变异可能是色素细胞的运动所致。

对 DEMs 的靶基因研究发现, 其大多为上皮细胞相关蛋白, 代谢转运相关酶和细胞信号转导相关酶等。值得注意的是, miR-10581c 的靶基因酪氨酸蛋白激酶 JAK2 和富含半胱氨酸和甘氨酸的蛋白质可能参与红罗非鱼越冬期体色的调节。酪氨酸蛋白激酶是近几年来鉴定出的在细胞信号传导过程中起重要作用的蛋白, 与其受体结合后的信号转导通路广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡及免疫调节过程。而在黑素生成途径中, 酪氨酸被氧化生成多巴醌, 然后通过聚合和氧化反应在细胞内被催化成为真黑色素, 而半胱氨酸和多巴醌则可使真黑素的合成转向褐黑色素的合成^[40-41]。此外, 差异表达的 miR-204a 靶标到冷应激蛋白和肾上腺素样受体基因, 说明红罗非鱼越冬期的体色变异可能受到冷应激和内分泌系统的调节。

本实验中, GO 生物学过程富集中, 色素沉积和背侧会聚 (dorsal convergence) 功能可能和红罗非鱼的色素细胞迁移和体色变黑直接相关, GO 细胞组分主要富集到与线粒体代谢相关的基因。KEGG 富集通路主要为卵母细胞减数分裂、Wnt 信号通路、Notch 信号通路、钙信号通路和 Apelin 信号通路等, 提示这些通路可能在红罗非鱼越冬期体色变黑过程中起重要作用。富集到卵母细胞减数分裂通路可能与红罗非鱼正处于性腺发育期有关。Wnt 信号通路已被证实参与脊椎动物黑色素细胞的发育^[42], Notch 信号通路参与细胞增殖和凋亡等过程^[43-44]。在小鼠 (*Mus musculus*) 上研究发现, miR-129-1-3p 介导的钙信号通路在乳腺癌细胞的生长和转移中发挥作用^[45], miR-129 也是本研究中鉴定出的上调 miRNA。Apelin 作为一种新型内分泌因子, 与其受体结合后在体内发挥广泛的生物学作用, 参与心血管功能、体液平衡、免疫功能、糖脂代谢和摄食等活动的调节^[46]。

相对于哺乳动物的只有一种黑色素细胞, 鱼类目前已经发现了 6 种色素细胞, 使得鱼类体色的形成变化更加复杂^[3]。本研究表明, 红罗非鱼越冬期的体色变异可能是色素细胞的增殖和迁移形成的, 与代谢相关的调控通路在其中发挥重要

作用, 而 miRNA 介导的多通路调控机制仍需要进一步深入研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Abdullah S, Omar N, Yusoff S M, *et al.* Clinicopathological features and immunohistochemical detection of antigens in acute experimental *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia (*Oreochromis spp.*)[J]. *Springer-Plus*, 2013, 2: 286.
- [2] Pradeep P J, Srijaya T C, Hassan A, *et al.* Optimal conditions for cold-shock induction of triploidy in red tilapia[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(3): 1163-1174.
- [3] Zhu W B, Wang L M, Dong Z J, *et al.* Comparative transcriptome analysis identifies candidate genes related to skin color differentiation in red tilapia[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31347.
- [4] Wang L M, Luo M K, Yin H R, *et al.* Effects of background adaptation on the skin color of Malaysian red tilapia[J]. *Aquaculture*, 2020, 521: 735061.
- [5] 王兰梅, 宋飞彪, 朱文彬, 等. 温度对马来西亚红罗非鱼越冬期体色的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 72-79. Wang L M, Song F B, Zhu W B, *et al.* Effects of temperature on body color of Malaysian red tilapia during overwintering period[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(1): 72-79 (in Chinese).
- [6] Nitzan T, Kokou F, Doron-Faigenboim A, *et al.* Transcriptome analysis reveals common and differential response to low temperature exposure between tolerant and sensitive blue tilapia (*Oreochromis aureus*)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 100.
- [7] McCormick S D, Moriyama S, Björnsson B T. Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 278(5): R1352-R1361.
- [8] Pavlidis M, Karkana M, Fanouraki E, *et al.* Environmental control of skin colour in the red porgy, *Pagrus pagrus*[J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(8): 837-849.
- [9] Fernandez P J, Bagnara J T. Effect of background color and low temperature on skin color and circulating α -MSH in two species of leopard frog[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1991, 83(1): 132-141.
- [10] Gouveia L, Rema P. Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2005, 11(1): 19-23.
- [11] Long Y, Song G L, Yan J J, *et al.* Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 612.
- [12] Liang L Q, Chang Y M, He X L, *et al.* Transcriptome analysis to identify cold-responsive genes in amur carp (*Cyprinus carpio haematopterus*)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130526.
- [13] Hung I C, Hsiao Y C, Sun H S, *et al.* MicroRNAs regulate gene plasticity during cold shock in zebrafish larvae[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 922.
- [14] Qiang J, Cui Y T, Tao F Y, *et al.* Physiological response and microRNA expression profiles in head kidney of genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) exposed to acute cold stress[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 172.
- [15] Wang L M, Zhu W B, Dong Z J, *et al.* Comparative microRNA-seq analysis depicts candidate miRNAs involved in skin color differentiation in red tilapia[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 1209.
- [16] Wang L M, Bu H Y, Song F B, *et al.* Characterization and functional analysis of *slc7a11* gene, involved in skin color differentiation in the red tilapia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2019, 236: 110529.
- [17] Wang L M, Jiang B J, Zhu W B, *et al.* The role of melanocortin 1 receptor on melanogenesis pathway in skin color differentiation of red tilapia[J]. *Aquaculture reports*, 2022, 22: 100946.
- [18] Wang L M, Zhu W B, Yang J, *et al.* Effects of dietary cystine and tyrosine on melanogenesis pathways involved in skin color differentiation of Malaysian red tilapia[J]. *Aquaculture*, 2018, 490: 149-155.
- [19] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. *EMBnet Journal*, 2011, 17(1): 10-12.
- [20] Patel R K, Jain M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data[J]. *PLoS*

- One, 2012, 7(2): e30619.
- [21] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [22] Betel D, Koppal A, Agius P, *et al.* Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(8): R90.
- [23] Agarwal V, Bell G W, Nam J W, *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J]. *eLife*, 2015, 4: e05005.
- [24] Krüger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34: W451-W454.
- [25] Wu T Z, Hu E Q, Xu S B, *et al.* ClusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. *The Innovation*, 2021, 2(3): 100141.
- [26] Yuan Y, Zeng Z Y, Liu X H, *et al.* MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing Δ Np63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 57.
- [27] 朱华宇, 张翔, 张晓, 等. miR-203真核表达载体的构建和重组慢病毒的制备及其对人脐静脉内皮细胞增殖和迁移的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(6): 589-592.
- Zhu H Y, Zhang X, Zhang X, *et al.* Construction and expression of recombinant lentivirus encoding miR-203 and its inhibitory effect on proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2013, 29(6): 589-592 (in Chinese).
- [28] 徐微微, 罗广营. microRNA-203通过靶向SRC抑制人角膜上皮细胞增殖与迁移[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(7): 900-907.
- Xu W W, Luo G Y. microRNA-203 inhibits proliferation and migration of human corneal epithelial cells by targeting SRC[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 37(7): 900-907 (in Chinese).
- [29] Farokhimanesh S, Moghadam M F, Ebrahimi M, *et al.* Metastasis inhibition by cell type specific expression of BRMS1 gene under the regulation of miR200 family response elements[J]. *Cell Journal*, 2021, 23(2): 225-237.
- [30] Diaz-riascos Z V, Ginesta M M, Fabregat J, *et al.* Expression and role of microRNAs from the miR-200 family in the tumor formation and metastatic propensity of pancreatic cancer[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2019, 17: 491-503.
- [31] Sun L J, Chen T W, Li T, *et al.* LncRNA IUR downregulates ZEB1 by upregulating miR-200 to inhibit prostate carcinoma[J]. *Physiological Genomics*, 2019, 51(11): 607-611.
- [32] Chen Z Y, Sangwan V, Banerjee S, *et al.* miR-204 mediated loss of Myeloid cell leukemia-1 results in pancreatic cancer cell death[J]. *Molecular Cancer*, 2013, 12(1): 105.
- [33] 李志强, 孙洋, 万鸿兴, 等. 过表达N-myc下游调节基因2(NDRG2)抑制直肠癌细胞的增殖和迁移并促进细胞凋亡[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(1): 48-52.
- Li Z Q, Sun Y, Wan H X, *et al.* Overexpression of N-myc downstream regulated gene 2 (NDRG2) inhibits proliferation, migration and promotes apoptosis in SW480 rectal cancer cells[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2017, 33(1): 48-52 (in Chinese).
- [34] Li G, Xie J H, Wang J H. Tumor suppressor function of miR-129-5p in lung cancer[J]. *Oncology Letters*, 2019, 17(6): 5777-5783.
- [35] Ji F C, Lang C, Gao P F, *et al.* Knockdown of circ_0000144 suppresses cell proliferation, migration and invasion in gastric cancer via sponging miR-217[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 31(6): 784-793.
- [36] Zhao W L, Wang X L, Jiang Y Q, *et al.* miR-217-5p inhibits invasion and metastasis of prostate cancer by targeting clusterin[J]. *Mammalian Genome*, 2021, 32(5): 371-380.
- [37] Huang Z, He Y, Li Q J, *et al.* Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting complement activation and upregulation of miR-499[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2021, 22(1): 684.
- [38] Ma Y S, Shi B W, Lu H M, *et al.* MicroRNA-499 serves as a sensitizer for lung cancer cells to radiotherapy by inhibition of CK2 α -mediated phosphorylation of p65[J]. *Molecular Therapy Oncolytics*, 2021, 21: 171-182.
- [39] 王康, 贾军梅, 仇海乐, 等. 富含亮氨酸重复序列的G蛋

- 白偶联受体6通过Wnt/ β -连环蛋白通路对结肠癌SW480细胞增殖、侵袭和凋亡的影响[J]. *安徽医药*, 2021, 25(2): 313-317.
- Wang K, Jia J M, Qiu H L, *et al.* LGR6 affects proliferation, invasion and apoptosis of colon cancer cells through Wnt/ β catenin pathway[J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2021, 25(2): 313-317 (in Chinese).
- [40] Hoekstra H E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates[J]. *Heredity*, 2006, 97(3): 222-234.
- [41] Ito S, Wakamatsu K. Human hair melanins: what we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation[J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2011, 24(1): 63-74.
- [42] Fujimura N, Taketo M M, Mori M, *et al.* Spatial and temporal regulation of Wnt/ β -catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium[J]. *Developmental Biology*, 2009, 334(1): 31-45.
- [43] 林棋, 刘世雄, 李欣, 等. 原苏木素A通过调控Notch1信号通路增加前列腺癌细胞的放疗敏感性[J]. *中国药师*, 2020, 23(5): 834-838,949.
- Lin Q, Liu S X, Li X, *et al.* Radiosensitivity of prostate cancer cells enhanced by protosappanin A through regulating Notch1 signaling pathway[J]. *China Pharmacist*, 2020, 23(5): 834-838,949 (in Chinese).
- [44] He G F, Mu T L, Yuan Y L, *et al.* Effects of Notch signaling pathway in cervical cancer by curcumin mediated photodynamic therapy and its possible mechanisms in vitro and in vivo[J]. *Journal of Cancer*, 2019, 10(17): 4114-4122.
- [45] 李琪. miRNA-129-1-3p 在芦丁减轻吡柔比星所致心脏毒性并增敏抗乳腺癌药效中的介导作用 [J]. 长春: 吉林大学, 2021.
- Li Q. miRNA-129-1-3p in reducing the pirubicin-induced cardiotoxicity by rutin and the sensitization of pirubicin anti-breast cancer effects[J]. Changchun: Jilin University, 2021 (in Chinese).
- [46] 聂国兴, 邓大鹏, 闫潇. Apelin与鱼类摄食[J]. *水产学报*, 2020, 44(11): 1926-1934.
- Nie G X, Deng D P, Yan X. Apelin and fish feeding[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(11): 1926-1934 (in Chinese).

Identification of differentially expressed miRNA involved in skin color variation in red tilapia during overwintering

WANG Lanmei ^{1,2}, ZHU Wenbin ¹, FU Jianjun ¹, LUO Mingkun ¹, DONG Zaijie ^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Centre of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China)

Abstract: Red tilapia (*Oreochromis* spp.) is a valuable fish due to its uniform red skin, the absence of black peritoneum, fast growth and adaptability to any culture system, and it has a huge market in many parts of the world, such as China, Malaysia and Thailand. However, the skin color differentiation in genetic breeding and skin color variation (whole pink to black) during the overwintering period are the main problems limiting the development of commercial red tilapia culture. MicroRNAs (miRNAs) play important roles in biological processes by regulating specific gene expression. Limited microRNA (miRNA) information is available on skin color variation in fish so far. In this study, a high-throughput Illumina sequencing of sRNAs was conducted on two color varieties of red tilapia during the overwintering. The two skin color varieties were normal whole pink (WP) and pink to black color (PB). A mean of 14 748 358 and 12 981 453 raw reads from WP and PB groups, respectively, corresponded to 12 190 544 and 11 891 890 clean reads. We summarized the length distribution of all samples and found that the peak length was 22 nt. A total of 669 mature miRNAs were identified, including 337 known miRNAs and 332 novel miRNAs. Moreover, we identified 26 significant differential expression miRNAs in PB compared with WP group, including 11 up-regulated miRNAs and 15 down-regulated miRNAs. And 12 known miRNAs, i.e. miR-203a, miR-200a, miR-200b, miR-725, miR-10544, miR-204a, miR-429b, miR-129, miR-10581c, miR-10581a, miR-217 and miR-499 may play an important role in the skin color variation of red tilapia during overwintering. Enrichment analysis found many pathways related to metabolic and skin color regulation including oocyte meiosis, Wnt, Notch, calcium, Apelin signaling pathway and so on. These results would provide a basis for exploring the mechanism of skin color variation of red tilapia during overwintering.

Key words: red tilapia (*Oreochromis* spp.); overwintering; skin color black; microRNA (miRNA)

Corresponding author: DONG Zaijie. E-mail: dongzj@ffrc.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China-Youth Fund Project (31802290); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221208); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD37)