



低氧胁迫下鲢 miR-17a-5p 及其靶基因分析

李晓晖¹, 冯 翠¹, 王巧欣¹, 邹桂伟^{1*}, 梁宏伟^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 华中农业大学湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了探究 miR-17a-5p 在鲢低氧胁迫下的功能, 在前期鲢 small RNA 测序的基础上对鲢 miR-17a-5p 进行靶基因预测及功能富集分析, 通过双荧光素酶活性验证其与 *HIF-1α* 的靶向关系, 并检测低氧胁迫下 miR-17a-5p 和其靶基因在鲢肝脏、脑、心脏和鳃四个组织中的动态表达特征。结果显示, 鲢 miR-17a-5p 在不同物种间高度保守, 预测出 381 个 miR-17a-5p 的潜在靶基因显著富集在硫代谢、mTOR 信号通路以及萜类骨架的生物合成 3 个 KEGG 信号通路上。miR-17a-5p 可与 *HIF-1α* mRNA 的 3'UTR 结合, 并降低 *HIF-1α* mRNA 水平, 低氧胁迫下 miR-17a-5p 的表达呈下降趋势, 而 *HIF-1α* 表达则呈上升趋势; 3 个显著富集 KEGG 通路中的 11 个 miR-17a-5p 潜在靶基因在低氧胁迫过程中的不同组织中的表达, 尤其是肝脏中的表达, 除 *SGK1* 外, 均呈显著上升趋势。研究表明, 低氧胁迫下鲢各组织中 miR-17a-5p 的表达下调减弱了其对靶基因的抑制作用, 进而导致 *HIF-1α*、*ddit4* 和 *Lrp5* 等响应低氧胁迫的基因表达上调。本研究为低氧胁迫下鲢 miRNA 的表达与调控机制提供新见解, 也为培育耐低氧的鲢新品系(种)提供了参考。

关键词: 鲢; miR-17a-5p; 低氧; 双荧光素酶; 靶基因; 信号通路

中图分类号: S 965.113

文献标志码: A

溶解氧是需氧生物生存和代谢所必需的环境因素, 生物对低氧环境的适应是一个错综复杂的过程^[1-2]。与大气中的氧含量相比, 水体溶解氧易受到温度、深度以及养殖密度等因素的影响。目前, 低氧胁迫已成为鱼类主要的环境胁迫因素之一^[3]。低氧胁迫通常会引起鱼类的一系列应激反应, 如摄食量降低、生长迟缓和疾病易感性增加等, 同时也会诱发鱼类明显的组织特异性代谢反应^[4]。虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 在急性低氧胁迫 6 h 后会出现游泳异常、血清皮质醇升高和鳃中 *HIF-1α* 转录上调等应激反应, 低氧还会严重影响

肌肉和骨骼功能, 并导致幼鱼体内钙离子失调^[5]。Buentello 等^[6]发现, 斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 生长速率和摄食量与水体中溶解氧含量呈正相关, 在相同条件下, 低氧胁迫下斑点叉尾鲷的体重明显低于正常溶解氧条件下。

微小核糖核酸 microRNA (miRNA) 是一类内源性非编码单链小 RNA, 其长度约为 22 nt, 具有高度保守性, 广泛存在于生物体内, 参与细胞凋亡、机体免疫、生长发育等一系列生物体重要的生命活动过程, 在生物抵抗环境胁迫方面发挥着重要作用^[7]。目前, 对低氧胁迫下鱼类 miRNA 的

收稿日期: 2022-10-30 修回日期: 2022-12-03

资助项目: 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-45); 湖北省洪山实验室开放课题 (2021hskf014); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (YFI202211, 2020TD33)

第一作者: 李晓晖 (照片), 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: lixiaohui@yfi.ac.cn

通信作者: 邹桂伟, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: zougw@yfi.ac.cn;

梁宏伟, 从事水产动物种质资源挖掘与遗传育种研究, E-mail: lianghw@yfi.ac.cn



研究也取得一定进展^[7]。急性低氧胁迫下, 在大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 肝脏中鉴定出 miR-130a-3p、miR-2188-5p 和 miR-15b-5p 等 13 个参与糖脂代谢的差异表达 miRNAs^[8]。通过急性低氧和复氧处理, 发现团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 中大量差异表达的 miRNA 参与 HIF-1 通路的调控, 进而影响能量代谢和细胞凋亡^[9]。截止目前, 低氧诱导因子是被鉴定到的低氧信号传导途径中最为关键的因子, 低氧诱导因子介导的转录激活反应是细胞感受低氧的最为关键的信号传导途径^[10-11]。低氧信号传导途径在动物界非常保守, 低氧诱导因子 HIF-1 α 与 HIF-1 β 形成异源二聚体, 与其下游基因的低氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 结合, 再在一些转录激活因子的共同作用下, 激活下游基因的表达, 从而引起一系列的生理、生化反应^[10, 12]。近年来, miR-17 被发现可通过抑制低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 来维持生理分解代谢和合成代谢的平衡^[13]。

基于前期鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) miRNA 测序发现, 低氧胁迫下 miR-17a-5p 表达下调^[14], 本研究通过对鲢的 miR-17a-5p 进行序列分析, 预测其靶基因并验证其与 HIF-1 α 的靶向关系, 检测不同程度低氧胁迫下 miR-17a-5p 和其靶基因在鲢肝脏、脑、心脏和鳃四个组织中的动态表达特征, 为揭示低氧胁迫下鲢 miRNA 的表达与调控机制提供新见解。

1 材料与方法

1.1 实验材料与低氧处理

实验所用鲢均由农业农村部鲢遗传育种中心提供。实验开始前, 将鱼放置在装有循环水系统的水箱中暂养 2 周 [水温 (23.0 \pm 0.5) $^{\circ}$ C, 溶解氧 > 6 mg/L]。待其适应条件后, 随机挑选体表无损伤且规格大小一致 [体长 (15.06 \pm 1.23) cm, 体重 (53.64 \pm 4.84) g] 的鲢 120 尾, 每 10 尾实验鱼放置于 1 个玻璃水缸 (50 cm \times 35 cm \times 30 cm) 中, 用塑料薄膜密封, 使水体中的溶解氧自然消耗, 并观察实验鱼的活动状况。实验期间使用哈希 HQ40d 便携式多参数仪表 (美国) 测定水温 [(23.5 \pm 0.2) $^{\circ}$ C], pH (7.74 \pm 0.04) 和溶解氧含量。当大部分实验鱼浮

头时, 取样作为低氧组 [DO: (0.76 \pm 0.03) mg/L, 90 min]; 当半数实验鱼身体失去平衡时, 取样作为半窒息组 [DO: (0.62 \pm 0.09) mg/L, 110 min]; 当半数实验鱼开始下沉且没有节律地开合鳃瓣时, 取样作为窒息组 [DO: (0.27 \pm 0.06) mg/L, 190 min]; 常氧对照组在实验期间保持正常溶解氧 [(6.90 \pm 0.04) mg/L]。一个玻璃缸作为一个重复, 每组设置 3 个重复。取样后立即用 100 mg/L MS-222 麻醉实验鱼, 解剖后取肝脏、脑、心脏和鳃四个组织, 液氮速冻后放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱储存, 用于后续 RNA 提取。实验方法均经中国水产科学研究院长江水产研究所动物伦理委员会批准。

1.2 miR-17a-5p 的序列分析、靶基因预测及功能富集

通过 miRbase (<https://www.mirbase.org/>) 数据库获取斑马鱼 (*Danio rerio*, 登录号: MI0001897)、鲤 (*Cyprinus carpio*, 登录号: MI0023342)、斑点叉尾鲷 (登录号: MI0024524)、大西洋鳕 (*Gadus morhua*, 登录号: MI0036194)、红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*, 登录号:)、青斑河鲀 (*Tetraodon nigroviridis*, 登录号: MI0003232)、青鳉 (*Oryzias latipes*, 登录号: MI0019542)、大西洋鲑 (*Salmo salar*, 登录号: MI0026535)、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*, 登录号: MI0004803)、斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*, 登录号: MI0013784)、人 (*Homo sapiens*, 登录号: MI0000071)、小鼠 (*Mus musculus*, 登录号: MI0000687)、倭狐猴 (*Microcebus murinus*, 登录号: MI0039918)、白颊长臂猿 (*Nomascus leucogenys*, 登录号: MI0040207)、穴兔 (*Oryctolagus cuniculus*, 登录号: MI0039225)、山羊 (*Capra hircus*, 登录号: MI0030648)、九带犰狳 (*Dasyurus novemcinctus*, 登录号: MI0038909)、眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*, 登录号: MI0031372)、树鼩 (*Tupaia chinensis*, 登录号: MI0031174)、蟒蛇 (*Python bivittatus*, 登录号: MI0030161)、原鸽 (*Columba livia*, 登录号: MI0029912) 和原鸡 (*Gallus gallus*, 登录号: MI0001184) miR-17 的前体序列, 并利用 MEGA-X 构建不同物种 miR-17 的系统发育树^[15]。通过 UNAFold 网站 (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form-v2.php>) 获得 miR-17a 的二

级结构。采用 MiRanda 软件和 qTar 软件进行 miR-17a-5p 的靶基因预测, 取两个软件所得结果的交集作为潜在靶基因。使用基迪奥云平台在线工具 (<https://www.omicshare.com/tools/>) 对获得的潜在靶基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。

1.3 miR-17a-5p 模拟物的合成

基于高通量测序获得的鲢 miR-17a-5p 序列, 由湖州河马生物科技有限公司进行 miR-17a-5p 模拟物 (mimics) 的合成, mimics 具有双链结构, 正义链 (sense) 能够模拟 miRNA 的活性, 反义链 (antisense) 则不能, 但可作为阴性对照, 序列见表 1。

1.4 双荧光素酶报告野生型与突变型基因载体的构建

根据本课题组已获得的鲢基因组序列, 由武汉转导生物实验室有限公司设计合成 *HIF-1α* 的野生型 (WT) 与突变型 (MUT) 3'UTR 片段, 片段包含 miR-17a-5p 与 *HIF-1α* 预测到的结合位点, 其中突变型 3'UTR 片段中, miR-17a-5p 与 *HIF-1α* 的结合位点设计为其互补序列。将两种 3'UTR 克隆到 pmirGLO 双荧光素酶报告基因载体中, 并测序验证, 构建 *HIF-1α* 野生型 (WT-pmirGLO-*HIF-1α* 3'UTR) 和突变型 (MUT-pmirGLO-*HIF-1α* 3'UTR) 双荧光素酶报告基因载体。

1.5 双荧光素酶活性检测实验

从武汉普诺赛 (Procell) 生命科技有限公司购买 293T 细胞系, 用含有 10% 胎牛血清和 1% 的青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基进行培养, 待细胞密度高于 80% 时, 将细胞传代至 24 孔板中继续培养, 确保每个孔的细胞密度达到约 70% 后进行转染。将 *HIF-1α* 野生型和突变型双荧光素酶表达载体与 miR-17a-5p 模拟物共转染至 293T 细胞。转染前更换新的细胞培养液, 按照 Lipo6000™ 转染试剂盒说明书进行转染, 取 2 μg 双荧光素酶报告基因质粒加入到含有 8 μL miRNA mimics 的

50 μL DMEM 培养基中, 轻轻吹打混匀后再加入 1 μL Lipo6000 转染试剂, 充分混匀后室温静置 20 min, 将混合液均匀滴加到细胞培养板中, 轻轻摇匀后放入培养箱, 6 h 后更换培养基, 继续培养 48 h。按照 Dual-Luciferase® Reporter 测定体系, 用 Synergy 2 多功能检测仪检测转染后的细胞的荧光素酶活性。

1.6 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

按照 Trizol (Invitrogen) 操作指南提取总 RNA。利用超微量分光光度计 (NP80, IMPLÉN) 检测 RNA 的浓度, 并用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。miRNA 逆转录按照 MiRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop) 试剂盒说明书操作, 其中 miR17a-5p 茎环引物为 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA TACGACTACCTG, 内参 U6 茎环引物为 AAAACAGCAATATGGAGCGC。mRNA 逆转录按照 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 试剂盒说明书操作, 获得的 cDNA 保存于 -20 °C 备用。

1.7 荧光定量 PCR

基于鲢 miR-17a-5p、*U6*、*Ethel*、*BPNT1* 和 *β-actin* 等基因序列设计引物 (表 2), 并由武汉天一辉远生物科技有限公司进行引物的合成。以鲢肝脏、脑、心脏和鳃组织的 cDNA 为模板, 以 *U6* 和 *β-actin* 为内参, 按照 ChamQ™ SYBR® qPCR Master Mix 试剂说明书进行荧光定量 PCR。数据采用 2^{-ΔΔC_t} 方法进行分析。

1.8 数据分析

数据采用 Excel 2016 和 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 利用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 氏多重比较对数据进行差异分析, 统计值均为平均值±标准差 (mean±SD), *P*<0.05 表示数据之间存在显著差异。

表 1 miR-17a-5P mimics 序列

Tab. 1 miR-17a-5P mimics sequence

名称 name	序列方向 sequence direction	引物序列(5'→3') primer sequence (5'→3')
mimics miR-17a-5p	正义链 sense	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA
mimics NC	反义链 antisense	UACCUGCACUGUAAGCACUUUG

表 2 荧光定量 PCR 通用引物和特异性引物序列
Tab. 2 Universal primer and specific primer sequences for RT-qPCR

引物名称 primer name		引物序列(5'→3') primer sequence (5'→3')
miR-17a-5p	F	GCGCGCCAAAGTGCTTACAGTG
	R	GCAGGGTCCGAGGTATTC
U6	F	TGCTCGCTACGGTGGCACA
	R	AAAACAGCAATATGGAGCGC
HIF-1α	F	GCACAGAGCCGAAGGAAGAAGG
	R	GCAGGTAGCGGATTGTGAGACG
Ethe1	F	CAACCTCCCAAACCTAAAAAA
	R	AAACCGACAAGAACAACACTGAC
BPNT1	F	TGGAGTCATCAATCAGCCCTTC
	R	GGTCACAAGTTTATTGCTATGGGA
ddit4	F	TCCACTCCAACATCTGACGCTCT
	R	ACCACTTCTTTGCACAACGCTCT
SGK1	F	TCCAGCGTGAGAGGGTGTTC
	R	GTGGTTGTGCCATTGGGTTTC
Rps6ka2	F	TCCAGCGTGAGAGGGTGTTC
	R	GTGGTTGTGCCATTGGGTTTC
slc38a9	F	GATTGGTGCGATGGTGGTCT
	R	TGAATGTGCTGTCTCTGTCTG
Lrp5	F	CCCTCAACTTCATCGCACCC
	R	GGAGGAGGGTTGAGCATCTGT
seh11	F	TCAGATGGTTGTTGGGGCGG
	R	TCAGTGGGTTGATTGGTGGAGT
fd3	F	ATTACATCCATCGACAACCTT
	R	CCTTCTCAACCAAATAACGCC
icmt	F	GTTACAGCCATCATCAACCCACG
	R	CCCACAGAGAACCATCACCAGAC
PCYOX1	F	CAAGTTGGGCGAAGGGGTTT
	R	TGTGCAGGTTAAGGGGGTGA
β-actin	F	TGAGAGGTTCAAGGTGCCACG
	R	TGTCAGCAATCCAGGGTAC

2 结果

2.1 miR-17a-5p 序列保守性分析

通过测序验证鲢 miR-17a-5p 序列后, 通过 UNAFold 网站预测其二级结构, 发现其带有典型

<https://www.china-fishery.cn>

的单一茎环结构, 且成熟序列位于茎环结构上 (图 1)。从 miRbase 数据库中获得不同物种的 miR-17a-5p 成熟序列, 发现 miR-17a-5p 的成熟序列长度为 22~24 nt, 其中 1~22 位碱基序列高度一致, 仅后 2 位碱基在不同物种中存在不同程度的缺失, miR-17a-5p 在不同物种间具有高度保守性 (表 3)。利用 MEGA-X 软件构建不同物种 miR-17a-5p 的前体序列的系统进化树, 鲢 miR-17 的前体序列与鲤科 (Cyprinidae) 鱼类首先聚为一支, 其次与海水鱼类聚为一支, 最后与两栖类、鸟类以及哺乳类聚为一支 (图 2)。

2.2 鲢 miR-17a-5p 在不同组织中的相对表达

荧光定量表达分析发现, 鲢 miR-17a-5p 在成鱼不同组织 (肝脏、心脏、脑和鳃) 中表达量存在差异, 以肝脏组织为对照, miR-17a-5p 在心脏中的表达量最高 ($P < 0.05$) (图 3)。

2.3 miR-17a-5p 靶基因预测及功能分析

利用 MiRanda 和 qTar 软件进行 miR-17a-5p 靶基因预测, 得到共有的潜在靶基因 381 个。对获得的 381 个靶基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 在生物学过程水平, miR-17a-5p 靶基因主要显著富集在单有机体细胞过程、生物过程的调节、细胞发育过程等 GO Term ($P < 0.05$); 在细胞组分水平, 靶基因主要富集在泛素连接酶复合体、线粒体内膜等 GO Term ($P < 0.05$); 在分子功能水平, 靶基因显著富集于泛素蛋白转移酶、氧化还原酶、S-腺苷甲硫胺酸甲基转移酶等 GO Term ($P < 0.05$) (表 4)。KEGG 富集结果显示, miR-17a-5p 靶基因显著富集在硫代谢、mTOR 信号通路以及萜类骨架的生物合成 3 个通路上。此外, 一些与低氧相关的通路如 MAPK 信号通路、FoxO 信号通路、HIF-1 信号通路等也发生了富集 (图 4)。

2.4 低氧胁迫减弱 miR-17a-5p 对其靶基因 HIF-1α 的抑制作用

低氧诱导因子是被鉴定到的低氧信号传导途径中最为关键的因子, 而 HIF-1α 恰好是 miR-17a-5p 381 个潜在靶基因中的一员。MiRanda 和 qTar 软件的靶基因预测结果均显示 HIF-1α 与 miR-17a-5p 存在靶向关系, miR-17a-5p 在其 3'UTR 上的结合位点如图 5-a 所示。为了进一步得到验证, 构

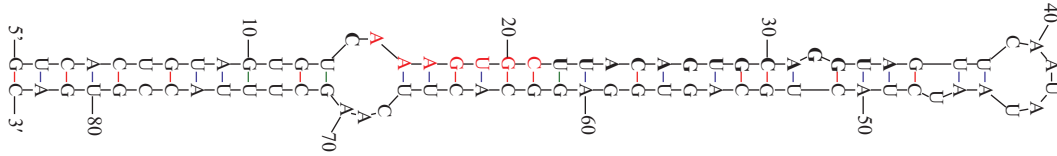


图 1 miR-17a 的二级结构

加粗部分为 miR-7a 的成熟序列, 红色部分为 HIF 结合位点

Fig. 1 Secondary structure of miR-17a

The bold part is the mature sequence of miR-7a, and the red part is the HIF binding site

表 3 不同物种 miR-17 的登录号及成熟序列

Tab. 3 Accession number and mature sequence of miR-17 in different species

物种 species	拉丁名 Latin names	登录号 accession	miRNA ID	成熟序列 mature sequence
鲤	<i>Cyprinus carpio</i>	MI0023342	ccr-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	MI0001897	dre-mir-17a-1	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA
斑点叉尾鮰	<i>Ictalurus punctatus</i>	MI0024524	ipu-mir-17a	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA
红鳍东方鲀	<i>Fugu rubripes</i>	MI0003231	fru-mir-17-1	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA
青斑河鲀	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	MI0003232	tni-mir-17-1	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA
大西洋鲑	<i>Salmo salar</i>	MI0026535	ssa-mir-17-1	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
大西洋鳕	<i>Gadus morhua</i>	MI0036194	gmo-mir-17-1	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA
青鳉	<i>Oryzias latipes</i>	MI0019542	ola-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA
热带爪蟾	<i>Xenopus tropicalis</i>	MI0004803	xtr-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU
斑胸草雀	<i>Taeniopygia guttata</i>	MI0013784	tgu-mir-17a	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
人类	<i>Homo sapiens</i>	MI0000071	hsa-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
小鼠	<i>Mus musculus</i>	MI0000687	mmu-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
倭狐猴	<i>Microcebus murinus</i>	MI0039918	mmr-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
白颊长臂猿	<i>Nomascus leucogenys</i>	MI0040207	nle-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
穴兔	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	MI0039225	ocu-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
山羊	<i>Capra hircus</i>	MI0030648	chi-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU
九带犰狳	<i>Dasyurus novemcinctus</i>	MI0038909	dno-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
眼镜王蛇	<i>Ophiophagus hannah</i>	MI0031372	oha-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU
树鼩	<i>Tupaia chinensis</i>	MI0031174	tch-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
蟒蛇	<i>Python bivittatus</i>	MI0030161	pbv-mir-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA
原鸽	<i>Columba livia</i>	MI0029912	cli-mir-17	UCCAGUGAUUCACACCAGCUGU
原鸡	<i>Gallus gallus</i>	MI0001184	gga-mir-17	UCGCCUUCUUCCCGCCUUC

建了野生型 (WT-pmirGLO-HIF-1 α 3'UTR) 和突变型 (MUT-pmirGLO-HIF-1 α 3'UTR) 双荧光素酶报告基因载体。细胞转染后发现, 仅 WT-pmirGLO-HIF-1 α 3'UTR 与 mimics miR-17a-5p 共转染时相对荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$), 其余各转染组间的相对荧光素酶活性无显著变化 ($P > 0.05$) (图 5-b),

证实了 miR-17a-5p 可以靶向结合 HIF-1 α 基因 3'UTR 区域序列。

通过荧光定量 PCR 分析 miR-17a-5p 和 HIF-1 α 在低氧胁迫下不同组织中的相对表达。结果显示, 在不同程度的低氧胁迫下, miR-17a-5p 的表达均低于对照组 (图 6), HIF-1 α 的表达均高于对

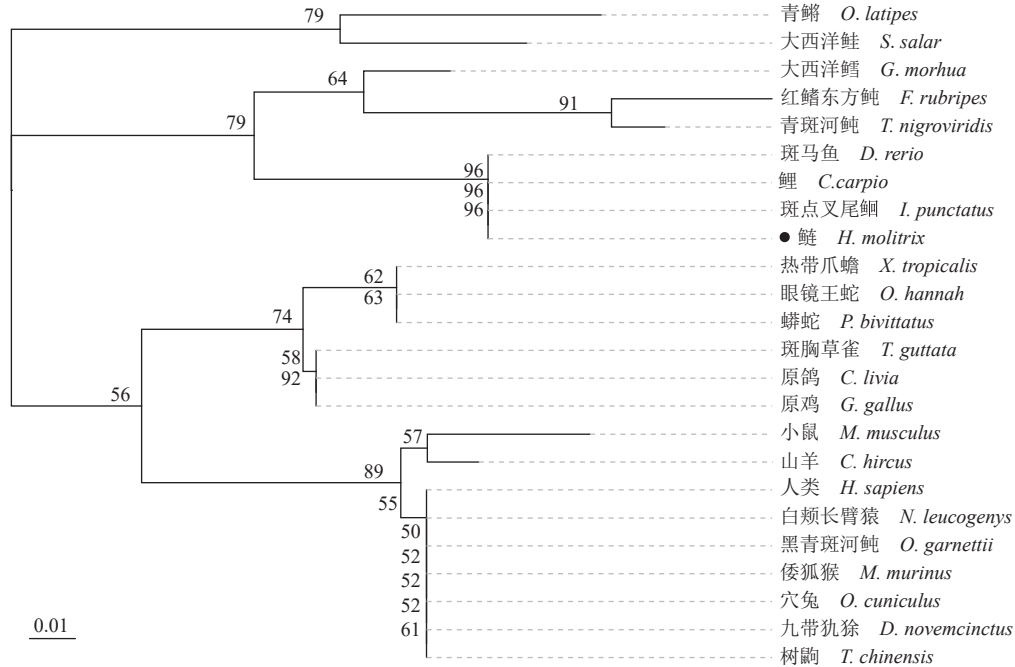


图 2 miR-17a 前体序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of miR-17a precursor sequences in different species

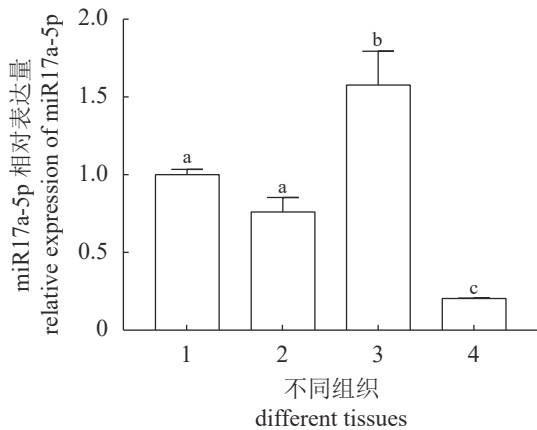


图 3 miR-17a-5p 在鲢组织中的表达分布

1. 肝脏, 2. 脑, 3. 心脏, 4. 鳃。不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

Fig. 3 Expression distribution of miR-17a-5p in *H. molitrix* tissues

1. liver, 2. brain, 3. heart, 4. gill. Different letters mean significant difference, $P < 0.05$

对照组 (图 7)。在肝脏组织中, miR-17a-5p 的表达水平在低氧组和窒息组中显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 6-a), 而 *HIF-1 α* 的表达量在低氧组和窒息组显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 7-a)。在脑组织中, miR-17a-5p 的表达水平在半窒息组显著低于对照和其他处理组 ($P < 0.05$) (图 6-b), 而 *HIF-1 α* 表达水平则在整个低氧胁迫过程中均高于对照组 (图 7-b)。在心脏和鳃组织中, miR-17a-5p 的表达水平在所

有低氧处理组均显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 6-c,d), 而 *HIF-1 α* 的表达水平则相反, 显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 7-c,d)。以上结果表明, miR-17a-5p 可与 *HIF-1 α* mRNA 的 3'UTR 结合, 并降低 *HIF-1 α* mRNA 的稳定性, 在低氧胁迫下, miR-17a-5p 的表达呈下降趋势, 而 *HIF-1 α* 表达则呈上升趋势, 增强了机体对低氧胁迫的适应。

2.5 miR-17a-5p 靶基因在低氧胁迫下不同组织中的相对表达量

对 3 个显著富集的 KEGG 信号通路, 硫代谢 (sulfur metabolism)、mTOR 信号通路 (mTOR signaling pathway) 和萜类骨架的生物合成 (terpenoid backbone biosynthesis) 中的 11 个 miR-17a-5p 的靶基因进行低氧胁迫下的表达分析 (图 8)。低氧处理后硫代谢通路中 *Ethe1* 和 *BPNT1* 的表达在低氧组和半窒息组的肝脏和心脏组织中显著上调 ($P < 0.05$), 而鳃组织中 *Ethe1* 的表达在窒息组显著上调 ($P < 0.05$), *BPNT1* 表达则先下调再上调 ($P < 0.05$); mTOR 信号通路中 *ddit4*、*Lrp5*、*fzd3* 在不同低氧胁迫下的不同组织中均呈上调表达, *Seh1l* 仅在窒息组的肝脏组织中和低氧组的脑组织中上调表达 ($P < 0.05$), *RPs6ka2* 和 *Slc38a9* 仅在肝脏中表达, 呈上调趋势 ($P < 0.05$), *SGK1* 在脑和肝脏中表达均

表 4 miR-17a-5p 潜在靶基因 GO 富集分析

Tab. 4 GO enrichment analysis of miR-17a-5p target genes

GO 术语(第1层) GO term (level 1)	GO 术语(第2层) GO term (level 2)	富集基因数目 number of gene	基因名 gene names	参考文献 references
生物学过程 biological process	细胞过程 cellular process	218	<i>EIF2B3</i>	[16]
	代谢过程 metabolic process	142	<i>ccnf</i>	[17]
	生物调节 biological regulation	139	<i>Opn3</i>	[18]
分子功能 molecular function	分子功能调控 molecular function regulator	13	<i>Retsat, EIF2B3</i>	[16, 19]
	电子载体活性 electron carrier activity	3	<i>AOX1</i>	[20]
细胞组分 cellular component	细胞组成 cell part	186	<i>ddit4, CALM</i>	[21-23]
	细胞外区部分 extracellular region part	9	<i>CALM, WNT9A</i>	[23-24]
	细胞外基质 extracellular matrix	6	<i>MMP2, WNT9A</i>	[24-25]
	突触 synapse	6	<i>CALM</i>	[23]
	突触部分 synapse part	4	<i>CALM</i>	[23]

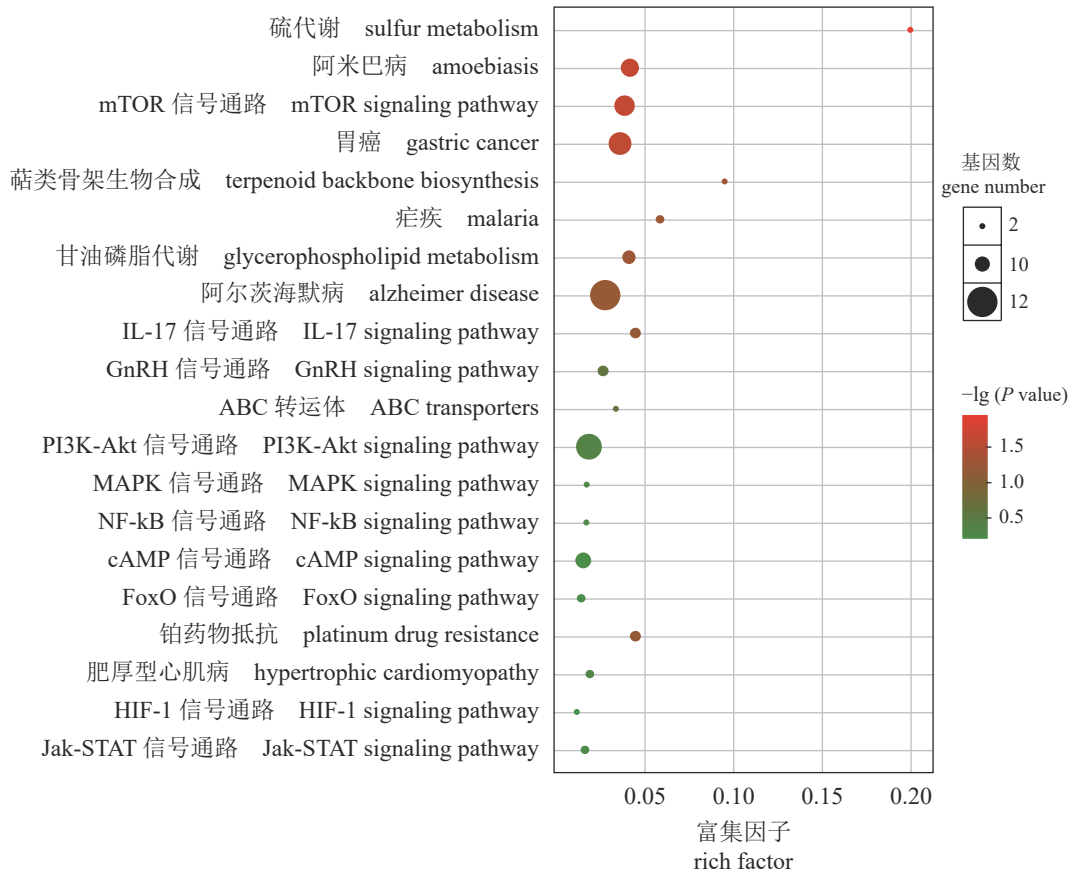


图 4 miR-17a-5p 潜在靶基因 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of miR-17a-5p target genes

呈下调趋势, 在心脏和鳃中先下调后上调 ($P < 0.05$); 同时萜类骨架的生物合成通路中 *icmt* 和 *PCYOX1* 在低氧处理后也仅在肝脏组织中呈上调表达 ($P < 0.05$), 但 *icmt* 在窒息组时差异不显著

($P > 0.05$)。综上所述, miR-17a-5p 的靶基因在不同低氧胁迫程度下以及不同组织中表达趋势不同, 但总体呈上调趋势, 尤其是在肝脏组织中, 表现最为显著, miR-17a-5p 靶基因及其所在的通路可

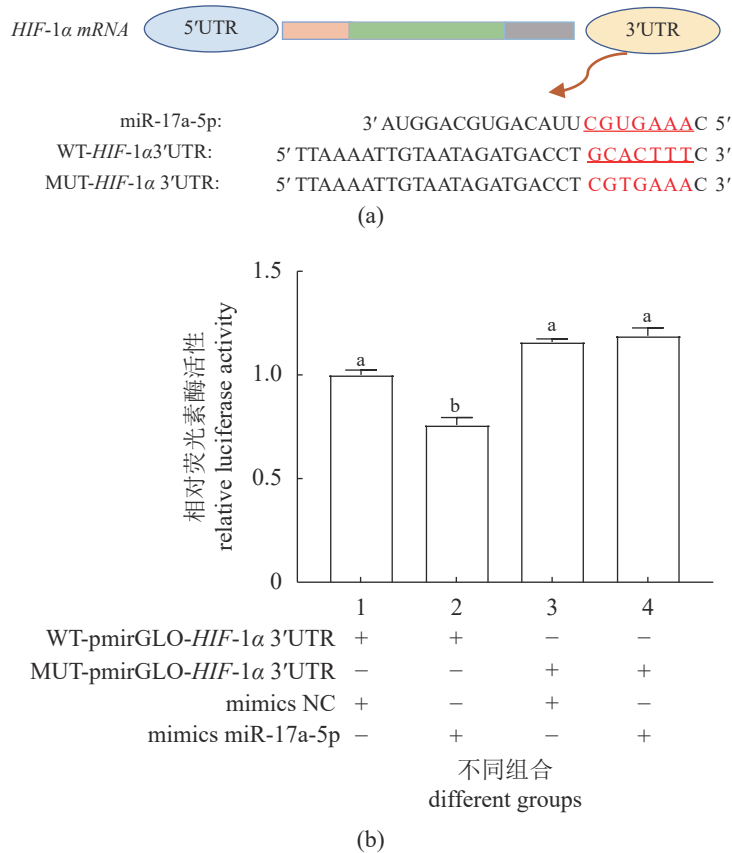


图5 miR-17a-5p与HIF-1α的靶向关系验证

(a) miR-17a-5p与HIF-1α 3'UTR的结合位点序列, 红色加下划线表示miR-17a-5p和WT-HIF-1α 3'UTR的结合位点序列, 红色不加下划线表示MUT-HIF-1α 3'UTR中结合位点互补序列。(b) 双荧光素酶报告基因检测miR-17a-5p与HIF-1α的靶向关系。1. WT-pmirGLO-HIF-1α 3'UTR质粒与mimics NC共转染; 2. WT-pmirGLO-HIF-1α 3'UTR质粒与mimics miR-17a-5p共转染; 3. MUT-pmirGLO-HIF-1α 3'UTR质粒与mimics NC共转染; 4. MUT-pmirGLO-HIF-1α 3'UTR质粒与mimics miR-17a-5p共转染。“+”表示添加,“-”表示不添加。不同字母表示存在显著差异, P<0.05, 图6和图7同

Fig. 5 miR-17a-5p binds to the 3'UTR region of HIF-1α

(a) the sequence of the bind site of miR-17a-5p and HIF-1α 3'UTR, the red underlined sequence represents the binding site sequence of miR-17a-5p and WT-HIF-1α 3'UTR, while the red underlined sequence represents the complementary binding site sequence in MUT-HIF-1α 3'UTR. (b) dual-luciferase reporter gene assay verified the targeted relationship between HIF-1α and miR-17a-5p. 1. 293T cells co-transfected with the WT-pmirGLO-HIF-1α 3'UTR plasmid and mimics NC; 2. 293T cells co-transfected with the WT-pmirGLO-HIF-1α 3'UTR plasmid and mimics miR-17a-5p; 3. 293T cells co-transfected with the MUT-pmirGLO-HIF-1α 3'UTR plasmid and mimics NC; 4. 293T cells co-transfected with the MUT-pmirGLO-HIF-1α 3'UTR plasmid and mimics miR-17a-5p. "+" and "-" represent addition and no addition, respectively. Different letters indicate the existence of a significant difference, P<0.05, the same as Fig. 6 and Fig. 7

能在鲢肝脏低氧适应过程中发挥重要作用。

3 讨论

低氧胁迫对鲢的生长、运动、免疫等各方面都有潜在的不利影响, 严重影响肝脏和鳃等组织的功能^[26]。越来越多的研究证实, miRNA在许多水生生物的低氧应激反应中发挥着重要作用^[27]。在低氧胁迫下, 黑点青鲢 (*O. melastigma*) 的 miR-125-5p 可靶向常染色质组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶-2, 影响其睾丸功能^[28]。Lai 等^[29]发现, 低氧可

诱导黑点青鲢卵巢中的 miRNAs 调控失调, 抑制 miRNAs 靶向多种类固醇生成酶, 改变类固醇生成酶和激素受体。

研究发现, 在低氧胁迫下, 鲢 miR-17a-5p 存在差异表达^[14]。在本研究中, 进一步探讨了 miR-17a-5p 与其靶基因的关系及其调控机制。多重序列比对发现, miR-17 序列在不同物种中具有高度保守性, 对 miR-17a-5p 的靶基因预测获得包括低氧诱导因子 HIF-1α 在内的潜在靶基因 381 个。HIF-1α 作为低氧状态下的特异性转录因子, 参与

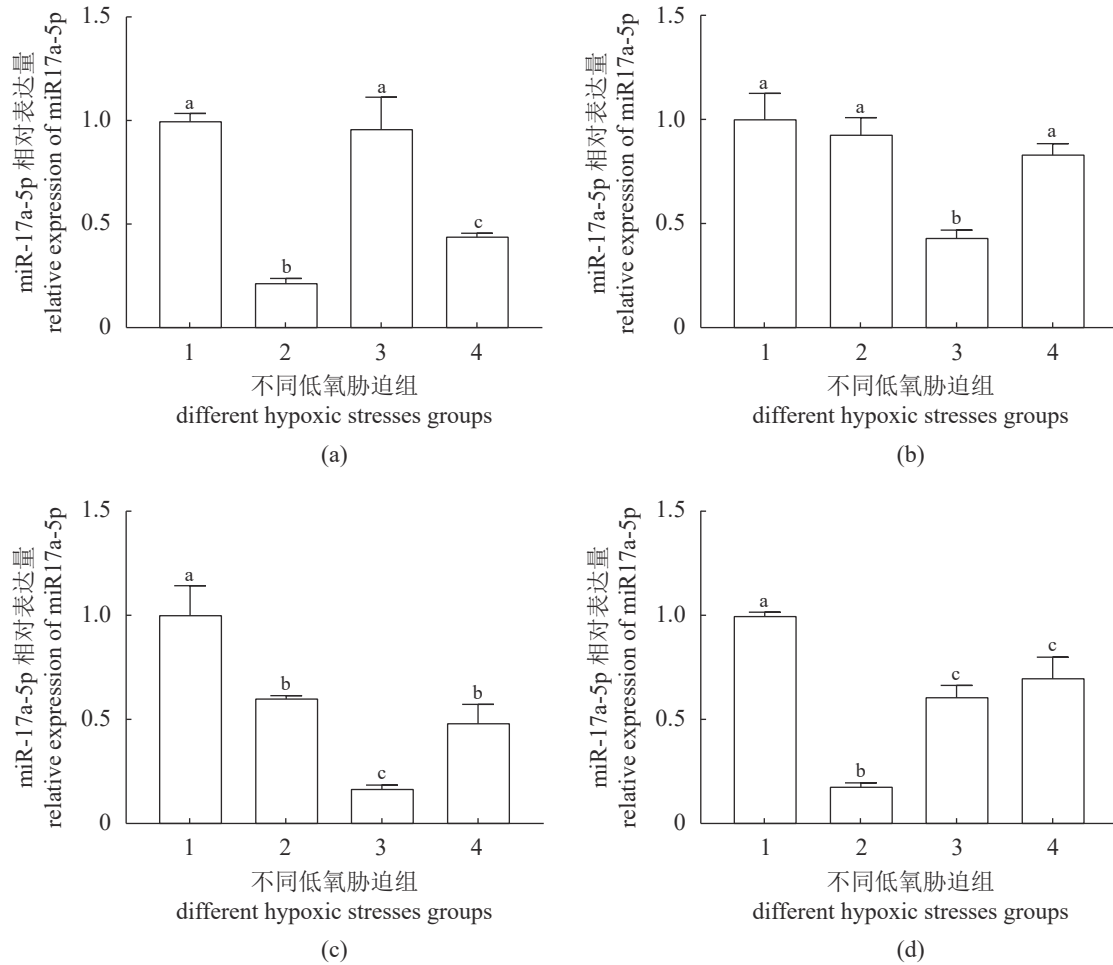


图 6 低氧胁迫下鲢 miR-17a-5p 在 (a) 肝脏、(b) 脑、(c) 心脏和 (d) 鳃中的相对表达量

1.对照组, 2.低氧组, 3.半窒息组, 4.窒息组, 下同

Fig. 6 Relative expression of miR-17a-5p in liver (a), brain (b), heart (c) and gill (d) of *H. molitrix* under hypoxia stress

1. normoxia, 2. hypoxia, 3. semi-asphyxia, 4. asphyxia, the same below

细胞的生长和凋亡, 并通过增加氧气输送或促进代谢使机体适应低氧环境, 维持机体组织或细胞在低氧条件下内环境的稳定^[30]。双荧光素酶报告基因检测系统证实 miR-17a-5p 与 *HIF-1α* 存在靶向关系。不同程度低氧胁迫下, 鲢 miR-17a-5p 的表达量显著低于对照组, 而 *HIF-1α* 在低氧胁迫后表达呈上调趋势。miR-17a-5p 可通过与 *HIF-1α* 的 3'UTR 结合, 促使 *HIF-1α* mRNA 降解, 在低氧条件下, miR-17a-5p 在不同组织中的低表达使得 *HIF-1α* mRNA 的稳定性增强, 进而促进了机体对低氧环境的适应性。

miR-17a-5p 潜在靶基因的 KEGG 功能富集表明, miR-17a-5p 靶基因显著富集于硫代谢、mTOR 信号通路以及萜类骨架的生物合成 3 个通路上。在硫代谢通路中, *Ethel* 具有硫双加氧酶活性, 其

在线粒体基质中的硫化氢分解中起着重要作用, 另外通过代谢硫化氢和防止超生理硫化氢水平的积累对机体产生毒性, 在线粒体的代谢稳态中发挥重要作用^[31]。BPNT1 参与神经系统的发育过程^[32], 哺乳动物大脑缺氧会导致硫化氢的产生增加。当这种气体在组织中积聚时, 硫化氢会阻止神经元的能量代谢并导致死亡^[33]。该通路的富集可能是大脑适应长期低氧环境, 减轻类似于哺乳动物缺氧引起硫化氢积累而对机体造成严重损伤的一种自我调控机制^[33], 此外亦可清除血液中硫化氢对血红素的影响, 以调整对氧的吸收能力。mTOR 信号通路可以正向调控低氧诱导因子 (*HIF-1α*)^[34], 不仅能够对生长因子、氧化应激和机能状态转变的刺激产生应答, 还调控多种生理过程, 如细胞生长、细胞骨架组织及代谢等。*ddit4* 是一种受低

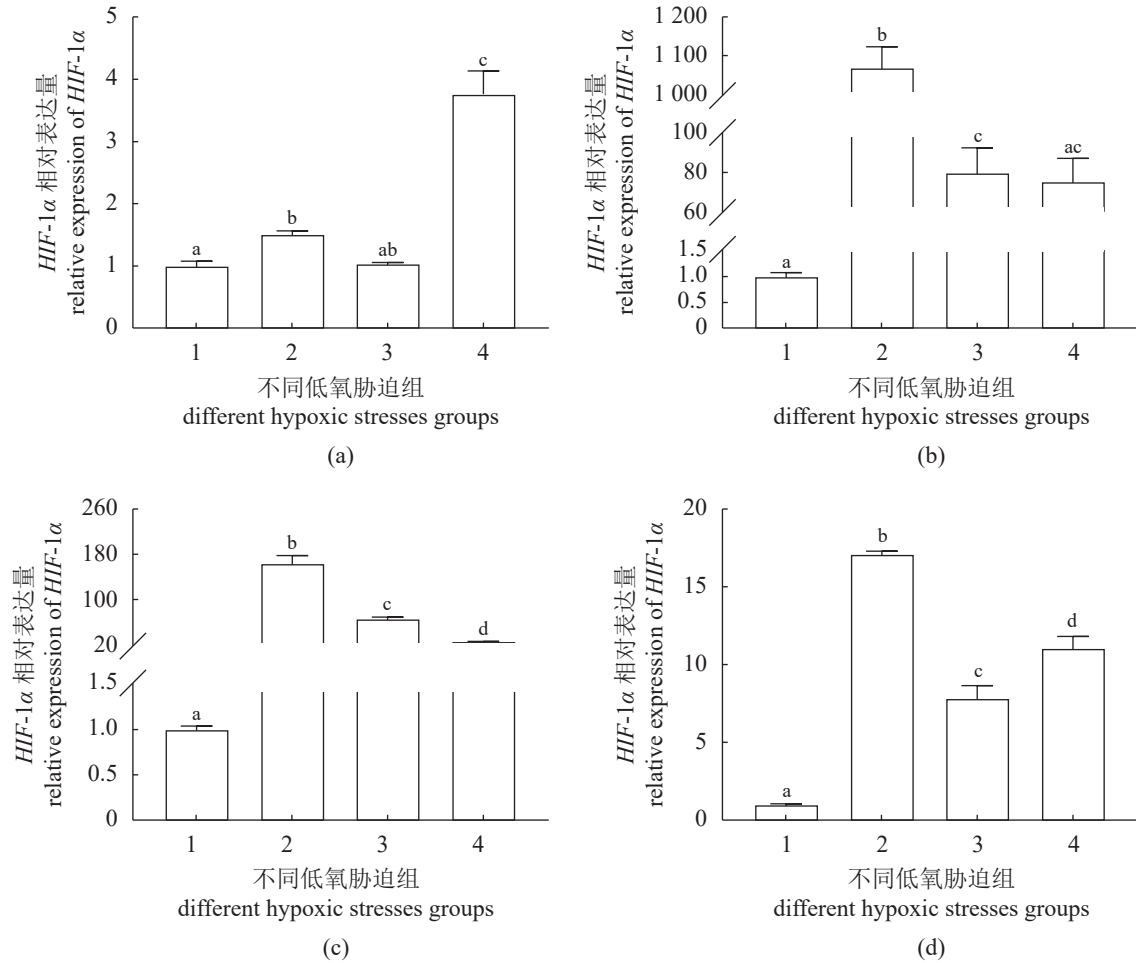


图 7 低氧胁迫下鲢 *HIF-1α* 在肝脏 (a), 脑 (b), 心脏 (c) 和鳃 (d) 不同组织中的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *HIF-1α* in liver (a), brain (b), heart (c) and gill (d) of *H. molitrix* under hypoxia stress

氧和 DNA 应激诱导的蛋白质^[35]。*ddit4* 作为代谢适应和治疗耐药的中介作用，可以抑制 mTORC1 活性来干扰低氧诱导的细胞死亡^[22]，本研究结果也表明，*ddit4* 在低氧胁迫下通过表达量的上调来调控机体的损伤或者细胞死亡。*slc38a9* 作为 mTORC1 通路精氨酸传感器，在一系列的营养稳态中发挥重要作用^[36]。Wu 等^[37] 敲除 *slc38a9* 基因，发现 *slc38a9* 的缺失会导致斑马鱼 HIF-1α 蛋白水平显著降低，这与本研究结果相似，*slc38a9* 在低氧适应过程中发挥作用。Ju 等^[38] 发现，*Lrp5* 可以通过与脯氨酰羟化酶 2 (PHD2) 相互作用，诱导 *HIF-1α* 的下降。在鲢中，*Lrp5* 和 *HIF-1α* 在低氧胁迫后表达量均上调，这可能是由于低氧胁迫下 miR-17a-5p 表达水平下降对 *HIF-1α* 的促进作用强于 *Lrp5* 上调对 *HIF-1α* 的抑制作用。目前在动物中还没有萘类骨架的生物合成通路与低氧响应相

关报道，本研究首次发现低氧胁迫下其在肝脏中被激活，而在脑、鳃和心脏中被抑制。通过对低氧胁迫过程中 3 个通路 11 个靶基因在 4 种组织中的表达特征的比较分析，发现 *Ethe1* 和 *BPNT1* 基因仅在肝脏和心脏中迅速响应低氧胁迫上调表达，说明硫代谢主要在鲢肝脏和心脏中发挥低氧适应作用；mTOR 信号通路中 *fzd3* 和 *Seh1l* 在脑和鳃中迅速响应低氧胁迫，*ddit4*、*Lrp5*、*RPs6ka2* 和 *Slc38a9* 在肝脏中迅速响应低氧胁迫，该通路在不同组织中以不同方式进行低氧适应；萘类骨架的生物合成通路中的 *icmt* 和 *PCYOX1* 仅在肝脏中迅速响应低氧胁迫上调表达，miR-17-5p 发挥功能最主要的靶器官为肝脏。

低氧胁迫下 miR-17a-5p 的下调表达可促使 *HIF-1α* 等响应低氧环境的基因上调表达，进而提高机体的低氧适应性，本研究为低氧胁迫下鲢

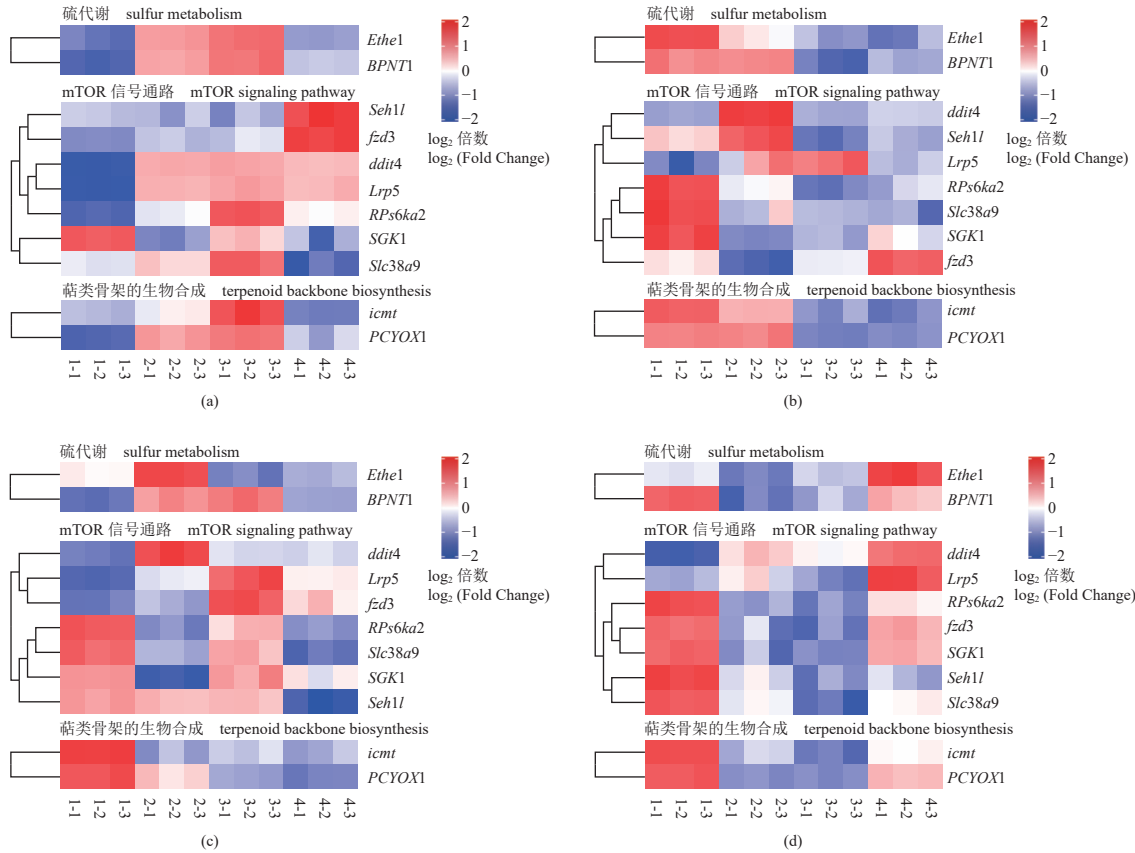


图 8 低氧胁迫下 3 个 KEGG 信号通路中 11 个鲢 miR-17a-5p 靶基因在肝脏 (a)、脑 (b)、心脏 (c) 和鳃 (d) 中的相对表达量

1-1、1-2、1-3.对照组的 3 个重复, 2-1、2-2、2-3.低氧组的 3 个重复, 3-1、3-2、3-3.半窒息组的 3 个重复, 4-1、4-2、4-3.窒息组的 3 个重复

Fig. 8 Relative expression of 11 miR-17a-5p target genes in 3 KEGG pathway liver (a), brain (b), heart (c) and gill (d) under hypoxia stress

1. three replicates of normoxia group, 2. three replicates of hypoxia group, 3. three replicates of semi-asphyxia group, 4. three replicates of asphyxia group

miRNA 的表达与调控机制解析提供了参考, 也为培育耐低氧的鲢新品系 (种) 提供了借鉴。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Breitburg D. Effects of hypoxia, and the balance between hypoxia and enrichment, on coastal fishes and fisheries[J]. *Estuaries*, 2002, 25(4): 767-781.

[2] Feng C, Li X H, Sha H, *et al.* Comparative transcriptome analysis provides novel insights into the molecular mechanism of the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) brain in response to hypoxia stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology D: Genomics & Proteomics*, 2022, 41: 100951.

[3] 阮雯, 纪炜炜, 郑亮, 等. 鱼类低氧胁迫及营养调控和应对研究进展[J]. *海洋渔业*, 2020, 42(6): 751.

Ruan W, Ji W W, Zheng L, *et al.* On hypoxia stress in fish and its nutritional regulation and response[J]. *Marine Fisheries*, 2020, 42(6): 751 (in Chinese).

[4] Huo D, Sun L, Ru X S, *et al.* Impact of hypoxia stress on the physiological responses of sea cucumber *Apostichopus japonicus*: respiration, digestion, immunity and oxidative damage[J]. *Peerj*, 2018, 6: e4651.

[5] Hou Z S, Wen H S, Li J F, *et al.* Environmental hypoxia causes growth retardation, osteoclast differentiation and calcium dyshomeostasis in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 705: 135272.

[6] Buentello J A, Gatlin D M, Neill W H. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Aquaculture*, 2000, 182(3-4): 339-52.

- [7] Jia J Y, Dong C C, Han M Q, *et al.* Multi-omics perspective on studying reproductive biology in *Daphnia sinensis*[J]. *Genomics*, 2022, 114(2): 110309.
- [8] Sun J L, Zhao L L, He K, *et al.* MiRNA-mRNA integration analysis reveals the regulatory roles of miRNAs in the metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) livers during acute hypoxic stress[J]. *Aquaculture*, 2020, 526: 735362.
- [9] Sun S M, Xuan F J, Ge X P, *et al.* Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to hypoxia and reoxygenation in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Scientific reports*, 2017, 7: 1-11.
- [10] Dunwoodie S L. The role of hypoxia in development of the mammalian embryo[J]. *Developmental Cell*, 2009, 17(6): 755-773.
- [11] Schofield C J, Ratcliffe P J. Oxygen sensing by HIF hydroxylases[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(5): 343-354.
- [12] Semenza G L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. *Cell*, 2012, 148(3): 399-408.
- [13] Zhang Y, Li S J, Jin P S, *et al.* Dual functions of microRNA-17 in maintaining cartilage homeostasis and protection against osteoarthritis[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1-14.
- [14] Wang Q X, Li X H, Sha H, *et al.* Identification of microRNAs in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) response to hypoxia stress[J]. *Animals*, 2021, 11(10): 2917.
- [15] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X. Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [16] Schnitzer S E, Schmid T, Jie Z, *et al.* Inhibition of GSK3beta by indirubins restores HIF-1alpha accumulation under prolonged periods of hypoxia/anoxia[J]. *Febs Letters*, 2005, 579(2): 529-533.
- [17] 周杨, 曹子鹏, 陈筱鸣, 等. 低氧对小鼠海马神经元发育相关分子表达的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2022, 38(4): 417-422.
- Zhou Y, Cao Z P, Chen X M, *et al.* The effects of hypoxia on the expression of molecules related to neuronal development in murine hippocampal neurons[J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2022, 38(4): 417-422 (in Chinese).
- [18] 鲍金, 刘川川, 陈辛玲, 等. OPN对低氧诱导的SD大鼠肺动脉平滑肌细胞自噬及增殖能力的影响[J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2019, 40(4): 223-231.
- Bao J, Liu C C, Chen X L, *et al.* Effect of OPN on autophagy and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxia condition in SD rats[J]. *Chinese High Altitude Medicine and Biology*, 2019, 40(4): 223-231 (in Chinese).
- [19] Tu Q, Liu X, Yao X, *et al.* RETSAT associates with DDX39B to promote fork restarting and resistance to gemcitabine based chemotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022, 41(1): 1-22.
- [20] Li W X, Liang S W, Wang H H, *et al.* The effects of chronic hypoxia on thermoregulation and metabolism in *Phrynocephalus vlanguilii*[J]. *School of Life Science*, 2016(2): 103-111.
- [21] 王嵩, 梅林, 闫博, 等. 生理低氧对人晶状体上皮细胞系基因表达谱的影响[J]. *眼科新进展*, 2015, 35(5): 409-412.
- Wang S, Mei L, Yan B, *et al.* Effects of physiological hypoxia on gene expression profile of human lens epithelial cells[J]. *Recent Advances in Ophthalmology*, 2015, 35(5): 409-412 (in Chinese).
- [22] Foltyn M, Luger A L, Lorenz N I, *et al.* The physiological mTOR complex 1 inhibitor DDIT4 mediates therapy resistance in glioblastoma[J]. *British Journal of Cancer*, 2019, 120(5): 481-487.
- [23] Mai S, Tanaka H, Tanimura A, *et al.* The clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization in mice[J]. *Plos One*, 2012, 7(2): e31854.
- [24] 张维华, 於丽明, 韩欣欣, 等. 低氧对骨骼肌成肌细胞增殖分化的影响及相关机制研究进展[J]. *生理科学进展*, 2019, 50(5): 326-332.
- Zhang W H, Yu L M, Han X X, *et al.* Research advances on the effects of hypoxia on proliferation and differentiation of skeletal muscle cells and related mechanisms[J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2019, 50(5): 326-332 (in Chinese).
- [25] 徐倩, 杨佳佳, 刘志华, 等. 低氧和牙周炎对牙周组织中HIF-1 α 和MMP2表达的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2017, 39(7): 616-621.
- Xu Q, Yang J J, Liu Z H, *et al.* Effect of periodontitis

- under hypoxia on expression of HIF-1 α and MMP2 in rat periodontium[J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2017, 39(7): 616-621 (in Chinese).
- [26] Saxton R A, Sabatini D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. *Cell*, 2017, 168(6): 960-976.
- [27] Yin S S, Liu L, Gan W J. The roles of post-translational modifications on mTOR signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4): 1784.
- [28] Tse A C-K, Li J-W, Wang S Y, *et al.* Hypoxia alters testicular functions of marine medaka through microRNAs regulation[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 266-273.
- [29] Lai K P, Li J-W, Tse A C-K, *et al.* Hypoxia alters steroidogenesis in female marine medaka through miRNAs regulation[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 172: 1-8.
- [30] Benita Y, Kikuchi H, Smith A D, *et al.* An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(14): 4587-4602.
- [31] Tiranti V, Viscomi C, Hildebrandt T, *et al.* Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy[J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(2): 200-205.
- [32] Reppert S M, Weaver D R, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses[J]. *Neuron*, 1994, 13(5): 1177-1185.
- [33] Marutani E, Morita M, Hirai S, *et al.* Sulfide catabolism ameliorates hypoxic brain injury[J]. *Nature communications*, 2021, 12(1): 1-19.
- [34] 吴龙华, 梁化亮, 戈贤平, 等. 鱼类雷帕霉素靶蛋白信号通路生物学功能的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(10): 5486-5496.
- Wu L H, Liang H L, Ge X P, *et al.* Research progress on biological function of target of rapamycin signaling pathway in fish[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(10): 5486-5496 (in Chinese).
- [35] Shoshani T, Faerman A, Mett I, *et al.* Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22(7): 2283-2293.
- [36] Wyant G A, Abu-Remaileh M, Wolfson R L, *et al.* mTORC1 activator SLC38A9 is required to efflux essential amino acids from lysosomes and use protein as a nutrient[J]. *Cell*, 2017, 171(3): 642-654.
- [37] Wu X Y, Chen J Y, Liu C D, *et al.* Slc38a9 deficiency induces apoptosis and metabolic dysregulation and leads to premature death in zebrafish[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(8): 4200.
- [38] Ju S, Lim L, Wi K, *et al.* LRP5 regulates HIF-1 alpha stability via interaction with PHD2 in ischemic myocardium[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6581.

Analysis of miR-17a-5p and its target genes in *Hypophthalmichthys molitrix* under hypoxia stress

LI Xiaohui¹, FENG Cui¹, Wang Qiaoxin¹, ZOU Guiwei^{1*}, LIANG Hongwei^{1,2*}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Hubei Hongshan Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) is an important freshwater economic fish in China's aquaculture industry. In 2020, six species of freshwater farmed fish in China had production greater than a million tons, of which the yield of silver carp was 3.8129 million tons, ranking second. Silver carp is widely distributed in natural waters, and plays a major role in regulating the ecological environment. In the process of *H. molitrix* culture, hypoxia has become an important factor restricting the increase of its yield. In previous studies, miR-17a-5p was identified and differentially expressed in *H. molitrix* under hypoxia stress based on the small RNA sequencing. The micro-ribonucleic acids (miRNAs), a class of endogenous and noncoding small RNA, play an important role in biological resistance to environmental stresses. In order to explore the role of miR-17a-5p in *H. molitrix* under hypoxia, sequence analysis and target gene prediction of miR-17a-5p was performed. The results showed that the miR17a-5p are highly conserved among species, and 381 target genes were identified, including *HIF-1 α* . Dual-luciferase reporter assay results demonstrated that when 293T cells were co-transfected with miR17a-5p mimics and WT-pmirGLO-HIF-1 α 3'UTR, the luciferase activity decreased, confirming *HIF-1 α* to be a target gene of miR17a-5p. This conclusion is in agreement with the observation of the increasing trend of *HIF-1 α* alongside the decreasing pattern of miR17a-5p under hypoxic stress in different tissue. KEGG pathway analysis revealed that the target genes were significantly enriched in Sulfur metabolism, mTOR signaling pathway and Terpenoid backbone biosynthesis. The expression of 11 target genes involved in the above three signaling pathways under hypoxia in liver, brain, heart and gill were detected by quantitative real-time PCR. The results showed that the overall trend of increase for the relative expressions of these genes, and upregulation was most pronounced in liver. In this study, we analyzed the bioinformatics of miR-17a-5p, predicted and further identified its target genes, and subjected *H. molitrix* to different degree of hypoxia stress, revealing that the downregulation of miR-17a-5p expression in *H. molitrix* under hypoxia stress attenuates its inhibitory effect on its target genes. Our finding provides a new idea for miR-17a-5p regulation of its target genes in *H. molitrix* under hypoxia stress, and provides a reference for further analysis of the role of miRNAs in the process of hypoxia tolerance of fish.

Key words: *Hypophthalmichthys molitrix*; miR-17a-5p; hypoxia; dual-luciferase reporter assay; target genes; pathway

Corresponding authors: ZOU Guiwei. E-mail: zougw@yfi.ac.cn;

LIANG Hongwei. E-mail: lianghw@yfi.ac.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-45); Foundation of Hubei Hongshan Laboratory (2021hskf014); Funded Project for Fundamental Scientific Research Business Expenses of Chinese Academy of Fishery Sciences (YFI202211, 2020TD33)