



MiR-155 靶向 *talin-1* 基因调控柱状黄杆菌胞外多糖诱导的 EPC 细胞凋亡

王 骞¹, 王承德², 罗敏意², 黎 果³,
车 行¹, 林 鑫¹, 赵丽娟^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东 广州 510225;

2. 中山市小榄镇农业服务中心, 广东 中山 510230;

3. 高州市百联水产种苗有限公司, 广东 茂名 525200)

摘要: 为研究 miR-155 在柱状黄杆菌胞外多糖 (FC-EPS) 诱导的细胞凋亡中的作用机制, 本实验采用 RNA 干扰 (RNAi) 技术, 通过过表达 miR-155 和敲降踝蛋白基因 (*talin-1*), 皆能抑制 FC-EPS 诱导的细胞凋亡, 并鉴定出 *talin-1* 为 miR-155 的靶蛋白。在 FC-EPS 诱导细胞凋亡的过程中, 踝蛋白水平显著升高, 在凋亡发生阶段检测到凋亡执行蛋白 Caspase-3 的活化, 同时检测到 2 条踝蛋白剪切异构体, 大小分别约为 200 ku 和 250 ku; 将构建的鲤 *Talin-1* 真核表达质粒转染鲤上皮瘤细胞 (EPC), 过表达的 *Talin-1* 延迟且延长了细胞凋亡的进程, 并检测到上述 2 条踝蛋白异构体。然而, 当以 FC-EPS 转染 EPC 细胞时, *Talin-1* 先下降再恢复到正常水平, 细胞不发生凋亡。因此, 在 FC-EPS 诱导细胞凋亡的过程中, 细胞通过上调 miR-155 来调控靶基因 *talin-1* mRNA 和蛋白转录的变化, 以及产生 *Talin-1* 蛋白异构体来抑制细胞发生凋亡。本研究为有效防治柱状黄杆菌疾病提供新思路。

关键词: 柱状黄杆菌; miR-155; *talin-1*; 细胞凋亡; RNA 干扰

中图分类号: Q 933; S 942

文献标志码: A

柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 是一种世界范围内分布的病原, 几乎感染所有的淡水鱼类^[1-2], 造成水产养殖产业巨大经济损失, 目前尚无高效防控措施。研究细菌感染与宿主的免疫反应是开展病原菌高效防控的基础。微生物胞外多糖 (EPS) 是微生物在生长代谢过程中产生的对其本身有保护作用的生物高聚物, 属于微生物的次级代谢产物, 帮助宿主适应外界环境, 具有作为细胞识别、互作以及和宿主识别的信号等作用。EPS 具有多种生物活性, 如抗氧化、抗肿瘤、抗

菌和免疫调节等, 可引起机体不同的生物反应。microRNA 是广泛存在于真核生物中的一类长约 22 nt 的内源性非编码单链 RNA, 在细胞感染、凋亡、增殖和分化及 DNA 修复等多种生理过程中都发挥着重要调节作用^[3-4]。关于 miRNA 在哺乳动物病原感染中的调控作用已经做了较多研究^[5-6], 但 miRNA 在鱼类感染的研究还只是起步阶段, 迄今为止, 尚未有关于柱状黄杆菌感染和 miRNA 调控作用的研究。本课题组在前期研究中发现 miR-155 参与抑制柱状黄杆菌胞外多糖 (FC-EPS) 诱导

收稿日期: 2024-02-28 修回日期: 2024-04-14

资助项目: 国家自然科学基金 (31602190); 中山市 2022 年第二批社会公益与基础研究项目 (2022B2003); 2021 年广东省科技创新和乡村振兴战略专项 (2021S0082); 广东省现代农业产业技术体系创新团队-水产疫病监测与综合防控共性关键技术研发创新团队 (2019KJ141)

第一作者: 王骞, 从事微生物功能研究, E-mail: 296497651@qq.com

通信作者: 赵丽娟 (照片), 从事水产养殖病原致病机理研究, E-mail: zhaolijuan4234@163.com



的细胞凋亡^[7], 解析 miR-155 调控细胞凋亡机制的研究为开展柱形病的高效防控提供重要参考。

Talin-1 是编码 2 541 个氨基酸的大分子蛋白质, 由 N 端大约 50 ku 的球形头部和 C 端大约 220 ku 的杆状区域组成, 包含若干个与其他蛋白质结合的功能区, 在细胞的运动迁移、细胞骨架形态改变及各种疾病的发生发展中有着极其重要的作用^[8]。此外, Talin-1 是细胞内外环境感知信息传递通路(黏着斑、细胞外基质-受体作用等)中的关键调控因子, 在细胞内外信号传导过程中发挥桥梁作用^[9]。据报道, 人类 (*Homo sapiens*) 肠上皮细胞在沙门氏菌 (*Salmonella spp.*) 感染时, 会通过踝蛋白的传导使细胞骨架重排^[10]。炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 感染人类时, 细胞会通过激活钙调蛋白, 随后降解踝蛋白来减少炭疽毒素入侵胞内, 从而抑制细菌的感染^[11]。因此, 踝蛋白在

抑制一些细菌的感染中具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用鲤上皮瘤细胞系 (EPC) 由本课题组保存, 柱状杆菌胞外多糖的提取方法采用乙醇沉淀法^[12]。RNA 的提取采用 TRIzol 提取方法。miR-155、*talin-1* 特异性干扰材料, 荧光定量引物(表 1) 合成和 biotin 标记 RNA 都由生工生物工程(上海)股份有限公司定制。EMSA 试剂盒、Talin-1 单抗、HA 单抗、Caspase-3 酶原单抗 (32 ku) 与活化形式的抗体 (17 ku) 皆购自 Sigma 公司。miR-155 定量用反向引物试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, cDNA 反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, 细胞培养和转染试剂购自 Gibco 公司。

表 1 引物与序列

Tab. 1 Principal oligonucleotide primers and RNA used in this study

基因 gene	引物名称 primer name	序列 (5'-3') sequence (5'-3')
<i>talin-1</i>	talin-F	CATCGGTACAGCGTCTAAGAT
	talin-R	ATCTGGCTGCGACTCTGTCA
miR-155 (biotin)	biotin-miR155-F	TTAATGCTAATCGTGATAGGGG
U6	U6-F	CGCTTCGGCAGCACATATAC
	U6-R	TTCACGAATTGCGTGTC
miR-155 mimic	miR155-F	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG
	miR155-R	CCUAUCACGAUUAGCAUUAUU
inhibitor-155	155-inhi	CCCCUAUCACGAUUAGCAUUA
<i>talin</i> mimic	talm-F	GCCAGAGCCAAACAGUCAAA
	talm-R	UUGACUGUUUGGCUCUGGC
inhibitor- <i>talin</i>	tal-in	AUCAUGGCUAACUUCUCC
NC mimics	NC-F	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	NC-R	AACGUGACACGUUCGAGAATT
inhibitor-NC	NC-inhi	CAGUACUUUUGUGUAGUACAA
<i>talin</i> -hyb155	tal-155	GCGCGGUGACAGACAGCAUAAA

1.2 踝蛋白基因 *talin-1* 真核表达质粒的构建

参考鲤 (*Cyprinus carpio*) 踝蛋白 mRNA 序列 (XM_042731971.1) 设计引物, 提取鲤皮肤与肌肉总 RNA, 随后反转录为 cDNA 作为模板, 克隆出 *talin-1* 的 mRNA 全长序列 7 626 bp, 测序鉴定正确后, 在扩增产物尾端添加 HA 标签, 连接入 pcDNA3.1 载体, 构建出 Talin-1 表达质粒。

1.3 凝胶迁移实验 (EMSA)

talin-hyb155 是踝蛋白 mRNA 上预测被 miR155

作用的 22 nt。分别合成 3 种双链 RNA (*talin*-hyb155、biotin-miR155 和无标记的 miR-155), 当 biotin-miR-155 与 *talin*-hyb155 发生相互作用时, 则会延迟 biotin-miR-155 在电泳中的迁移率。

EMSA 反应体系: 取 1 μ L 的 *talin*-hyb155 与 2 μ L 的 biotin-miR-155 在室温下共同孵育 30 min, 反应体系见表 2, 反应结束后, 取 10 μ L 反应产物点样于聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 电泳结束后, 将凝胶放于荧光成像扫描仪进行拍照。

表 2 EMSA 反应体系

Tab. 2 EMSA reaction mixture

组分 component	体积/ μ L volume
10 \times binding buffer	2
Poly(dI-dC)	2
unlabeled-miR-155	1~3
<i>talin</i> -hyb155	1
biotin-miR-155	2
ddH ₂ O	补足至20
总计 total	20

2 结果

2.1 FC-EPS 诱导 EPC 细胞发生凋亡与凋亡抑制

Caspase-3 的活化状态被认为是凋亡最终的效应分子, 活化的 Caspase-3(cleaved Caspase-3) 的被认为是判断凋亡的标志性分子^[13]。以 2 μ g/mL 的 FC-EPS 孵育 EPC 细胞时, 在孵育后 16~24 h 检测到清晰的 cleaved Caspase-3 蛋白(图 1-a), 表明 FC-EPS 诱导细胞在此段时间发生了凋亡; 对照 FC-

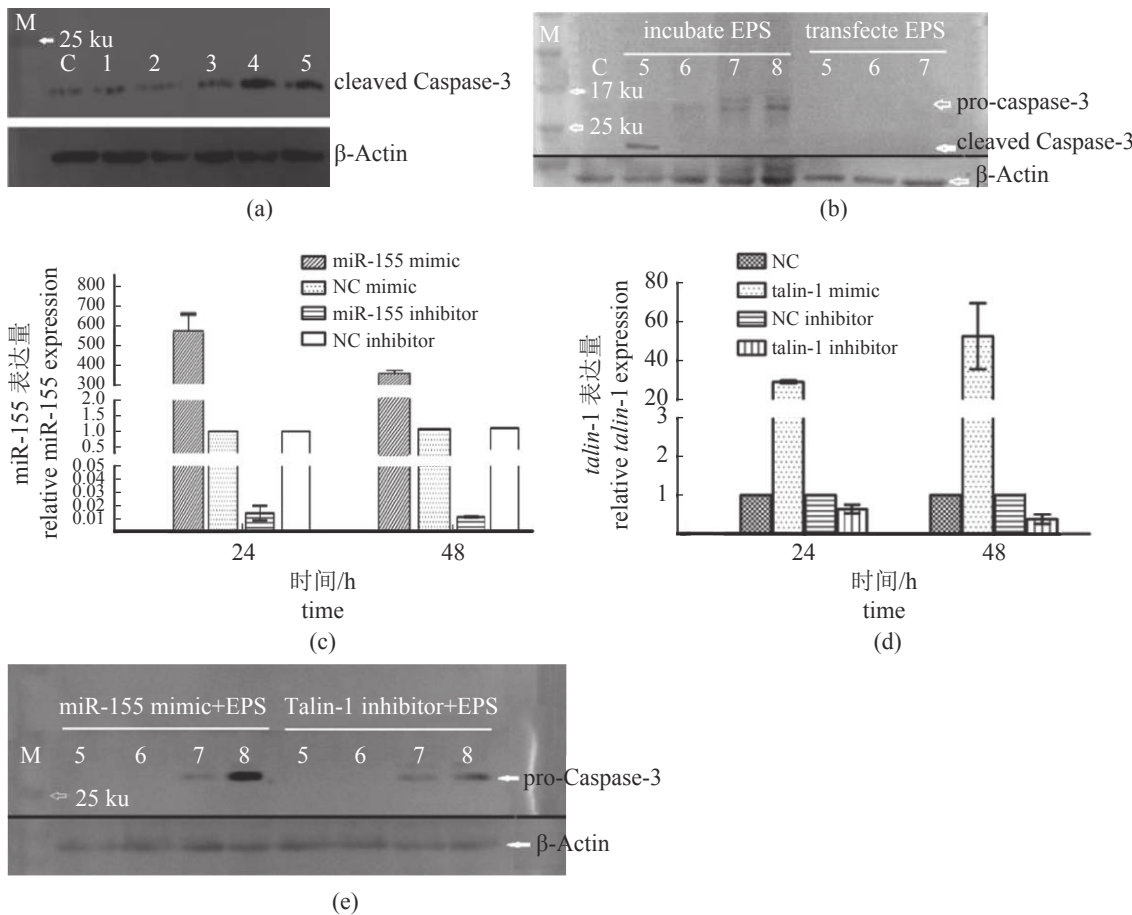


图 1 FC-EPS 作用 EPC 细胞在不同条件下发生凋亡的检测

(a) FC-EPS 孵育 EPC 细胞在不同时间凋亡的检测, (b) FC-EPS 分别以胞外孵育和转染 EPC 方式在不同时间发生凋亡的检测, (c) EPC 转染 miR-155 相关的 4 种人工合成产物后 miR-155 mRNA 的检测, (d) EPC 转染 talin-1 相关的 4 种人工合成产物后 *talin-1* mRNA 的检测, (e) EPC 分别转染 miR-155 mimic 和 talin-1 inhibitor 后被 FC-EPS 诱导凋亡的检测; miR-155 mimic. miR-155 类似物, NC mimic. 类似物对照, inhibitor miR-155. miR-155 抑制剂, inhibitor NC. 抑制剂对照; 泳道 M、C、1、2、3、4、5、6、7、8 分别指 marker、对照、2 h、4 h、8 h、16 h、24 h、48 h、72 h、96 h。

Fig. 1 EPC cell apoptosis induced by FC-EPS under different conditions

(a) EPC cell apoptosis after incubating FC-EPS cells at different time, (b) EPC cell apoptosis incubating EPC cells at different time by extracellular incubation and EPC transfection, (c) expression of miR-155 in EPC after transfecting 4 synthetic products, (d) expression of *talin-1* in EPC after transfecting 4 synthetic products associated with miR-155, (e) apoptosis induced by FC-EPS in EPCs after transfecting with miR-155 mimic and talin-1 inhibitor; miR-155 mimic, miR-155 analogue; NC mimic, negative control of analogue; inhibitor miR-155, miR-155 inhibitor; inhibitor NC, negative control of inhibitor; lanes M, C, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, means marker、control, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h.

EPS 以胞外孵育和转染细胞两种不同方式作用细胞, 仅在 EPS 孵育方式下检测到细胞凋亡, 而 EPS 转染细胞未检测到凋亡发生 (图 1-b)。EPC 分别转染 miR-155 和 *taln-1* 的 4 种人工合成 RNA, 类似物 mimic 分别提高 miR-155 和 *taln-1* 表达量 600 倍 (24 h) 和 50 倍 (48 h), 而抑制剂分别有效抑制 miR-155 和 *taln-1* 倍数为 0.02 和 0.21 (图 1-c, d)。在过表达 miR-155 和敲降 *taln-1* 情况下, 未检测到 EPC 凋亡 (图 1-e), 说明两种情况皆抑制了 FC-EPS 诱导的细胞凋亡。

2.2 *taln-1* 作为 miR-155 靶基因的确证

将 miR-155 mimic 转染 EPC 细胞, 转染后 24 h, EPC 中 miR-155 mRNA 极显著上升 (图 1-c), 细胞中 *taln-1* mRNA 降低至原来的五分之三 (图 2-a), Talin-1 蛋白在 24 h 变化不明显, 而在 48 h 明显降低 (图 2-b)。因此, 高表达的 miR-155 不仅抑

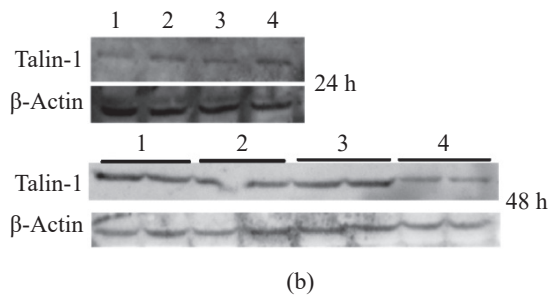
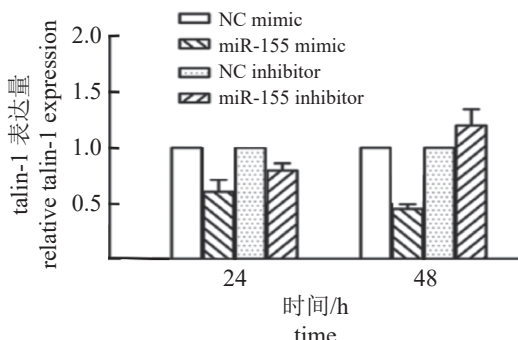


图 2 EPC 分别转染 miR-155 相关的 4 种人工合成 RNA 后 *taln-1* 的表达变化

(a) EPC 分别转染 4 种 miR-155 人工合成产物后 *taln-1* mRNA 的检测, (b) EPC 转染 4 种人工合成产物后 *taln-1* 蛋白的检测; 1. inhibitor NC; 2. inhibitor; 3. NC; 4. miR-155 mimic。

Fig. 2 Expression of *taln-1* after transfecting 4 synthetic RNAs associated with miR-155

(a) detection of *taln-1* mRNA after transfecting 4 synthetic RNAs associated with miR-155, (b) detection of *taln-1* protein after transfecting 4 synthetic RNAs associated with miR-155; 1. inhibitor NC; 2. inhibitor; 3. NC; 4. miR-155 mimic。

制了 FC-EPS 诱导的凋亡, 还降低了 *taln-1* 的 mRNA 表达和蛋白转录, 证明 miR-155 调控 *taln-1*。

miRNA 和靶基因 mRNA 的作用中, 最关键的是 miRNA 的 5'端的 1~8 个核苷酸序列与靶基因的 mRNA 互补, 这个序列称为“种子序列” (seed sequences)^[14]。本实验成功克隆鲤 *taln-1* 的 mRNA 全长序列, 与 (XM_042731971.1) 相同位点 94.71%, 存在 5 处集中差异, 分别位于起始密码子后的 132~228 nt、3 246~3 279 nt、4 442~4 465 nt、6 637~6 653 nt 及 6 728~6 759 nt 位置。将 miR-155 比对 *taln-1* mRNA, 在 *taln-1* 的 4 030~4 037 nt 位置上存在与 miR-155 头部互补的靶位点 (图 3)。

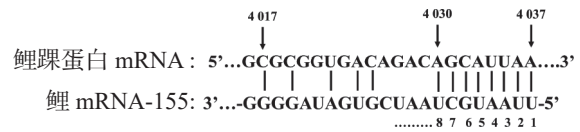


图 3 miR-155 头部与鲤 *taln-1* mRNA 互补图

Fig. 3 Complementary diagram of miR-155 at the head and *taln-1* mRNA of carp

将 *taln-hyb155* 与 biotin 标记的 miR-155 共同孵育后进行电泳, 在电泳中产生 miR-155 延迟带 (图 4, 2~5 泳道), 而没有 *taln-hyb155* 的 miR-155 不产生延迟带 (1 泳道); 当体系中加入非标记的 miR-155 作为竞争 RNA 时, miR-155 延迟带变弱 (2→3 泳道), 随着竞争 RNA 含量的降低, 延迟带逐渐变强 (3→4→5), 证明 miR-155 与 *taln-hyb155* 存在相互作用。

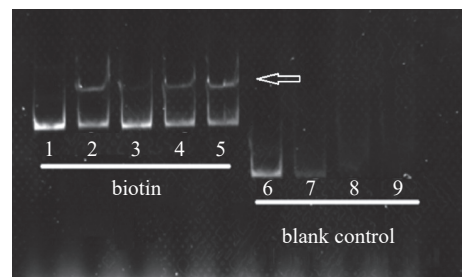


图 4 miR-155 与 *taln-1* 蛋白相互作用的凝胶迁移延迟

Fig. 4 Electrophoretic Mobility Shift Assay of interaction between miR-155 and *taln-1* protein

1. biotin-miR155 (2 μ L), 2. biotin-miR155 (2 μ L) + talin (1 μ L), 3. biotin-miR155 (2 μ L) + talin-hyb155 (1 μ L) + unlabeled-miR155 (3 μ L), 4. biotin-miR155 (2 μ L) + talin-hyb155 (1 μ L) + unlabeled-miR155 (2 μ L), 5. biotin-miR155 (2 μ L) + talin-hyb155 (1 μ L) + unlabeled-miR155 (1 μ L), 6. biotin-155 (1 μ L), 7. biotin-155 (1 μ L) + unlabeled-155 (1 μ L), 8. biotin-155 (1 μ L) + unlabeled-155 (2 μ L), 9. biotin-155 (1 μ L) + unlabeled-155 (3 μ L), arrow means delayed bands of miR-155.

因此, 本研究通过转染 miR-155 mimic, 检测 *taln-1* 在 mRNA 和蛋白质水平的变化, 结果显示, 过表达的 miR-155 同时抑制 *taln-1* 的 mRNA 和蛋白质转录 (图 2); 克隆鲤 *taln-1* mRNA 全长与 miR-155 进行序列比对, 在 *taln-1* 开放阅读框内存在与 miR-155 头部互补的靶位点 (图 3); 合成 *taln-1* 上与 miR-155 互补的 RNA (22 nt), 与 biotin 标记的 miR-155 混合后进行凝胶电泳, *taln-hyb155* 可以与标记的 miR-155 发生结合而产生延迟带。以上 3 方面结果同时指向 *taln-1* 是 miR-155 的靶基因。

2.3 Talin-1 对 FC-EPS 诱导细胞凋亡的调控作用

本实验分别将 FC-EPS 以转染和胞外孵育 EPC 细胞两种方式来检测踝蛋白与 EPS 诱导细胞凋亡的关系。在 FC-EPS 转染 EPC 情况下, Talin-1 在转染后明显降低, 24 h 后再逐渐恢复直至正常水平 (图 5-a), 细胞不发生凋亡 (图 1-b)。在 EPS 孵育情况下, 细胞中踝蛋白量显著升高 (EPS 孵育后 4~96 h) (图 5-b); 细胞发生凋亡期间 (EPS 孵育后 16~24 h), 检测到凋亡执行蛋白 Caspase-3 活化 (图 1-a), 同时检测到踝蛋白的 2 条剪切异构体蛋白 (图 5-b 中箭头所示, 约为 200 和 250 ku); 当 Caspase-3 回到酶原状态, Talin-1 异构体蛋白消失, 余 270 ku (图 5-b, 48~96 h)。

将 *taln-1* 质粒转染 EPC 细胞, Talin-1 蛋白量在转染后 24 h 逐渐升高 (图 6-b), 此时孵育 FC-EPS, 在 48~96 h (即 EPS 孵育后 24~72 h) 细胞发生凋亡 (图 6-c), Talin-1 两条异构体蛋白伴随细胞

凋亡出现。因此, 过表达的 Talin-1 延迟并延长了细胞凋亡的发生, 由 EPS 孵育后 16~24 h 短期内发生凋亡, 延迟到 24~72 h 间持续发生凋亡, 证明踝蛋白 mRNA 变化和蛋白异构体皆参与调控 FC-EPS 诱导的细胞凋亡。

3 讨论

细胞凋亡是细胞为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主有序的死亡^[15]。本实验中 FC-EPS 胞外孵育 EPC 可以诱导细胞发生凋亡, 而将 EPS 转染至细胞内部则不发生凋亡, 证明 EPS 诱导的细胞凋亡是由位于细胞表面的信号识别而发起。感受细胞外环境并随之调整自身状态是细胞生存的必要能力。在柱状杆菌感染鲤的组学研究中, 差异基因首先富集在黏着斑通路 (focal adhesion)^[7]。黏着斑是分布于细胞质膜上, 由整合素 (integrin)、Talin-1 和肌动蛋白等参与构成的多蛋白复合物, 将细胞和细胞外基质连接在一起, 参与细胞内外信号传递, 调控细胞黏附与迁移、细胞生存、免疫监视等多种生理过程^[16]。Talin-1 是整合素激活的关键调控因子, 在黏着斑的成熟、解聚与转化中都发挥着作用, 作为连接细胞骨架与整合素的桥梁, Talin-1 在细胞内外信息转导中起到关键的桥梁作用^[17]。本研究敲降 *taln-1* 表达后, 未检测到凋亡执行蛋白 Caspase-3 活化, 细胞不发生凋亡, 表明在 FC-EPS 诱导的细胞凋亡信息传递中 *taln-1* 起到枢纽作用。而将 Talin-1 蛋白过表达后, 延迟并延长了细胞凋亡的发生, 同时检测到 Talin-1 的 2 条异构体蛋白。正常生理情况下, *taln-1* 转录为 270 ku 的蛋白质, 形成具有类

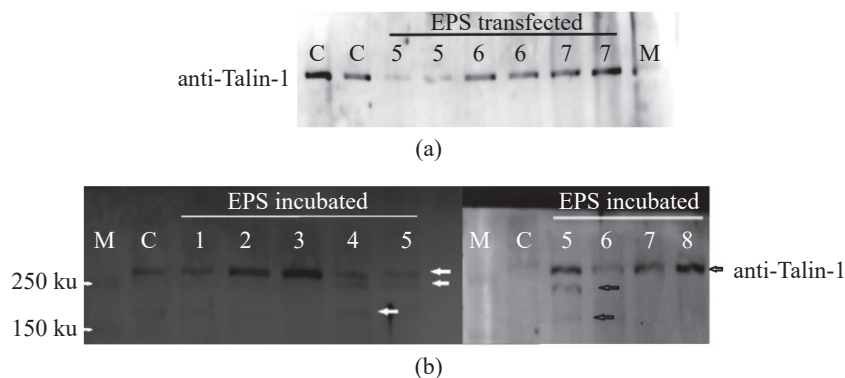


图 5 EPC 转染和孵育 EPS 情况下 Talin-1 蛋白的变化

泳道 M、C、1、2、3、4、5、6、7、8 分别指 marker、control、2 h、4 h、8 h、16 h、24 h、48 h、72 h、96 h; 箭头指 Talin。

Fig. 5 Variation of talin-1 protein in EPC after transfecting or incubating EPS

Lanes M, C, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 means marker, control, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, respectively, arrow means Talin protein.

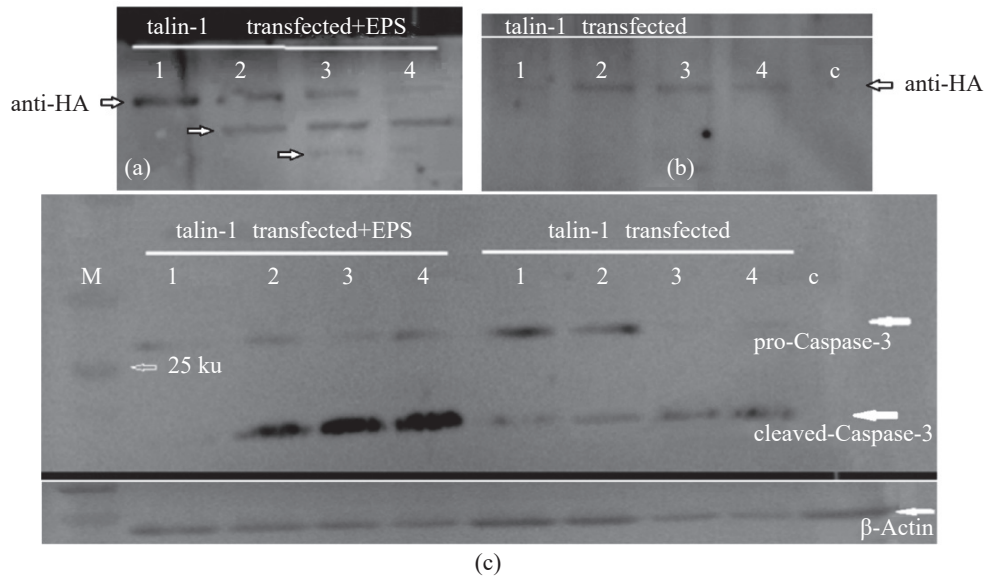


图 6 过表达 talin-1 对 EPS 诱导的细胞凋亡的调控作用

泳道 M、C、1、2、3、4 分别指 marker、control、24 h、48 h、72 h、96 h。

Fig. 6 Regulation of talin-1 overexpression on EPS-induced apoptosis

Lanes M, C, 1, 2, 3, 4 in the figure means marker, control, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h, respectively.

似弹簧的独特构象，非激活状态呈自抑制折叠构象^[8]，在黏着斑的解聚过程中，Talin-1 蛋白被钙蛋白酶切割为头部和杆部而发挥作用^[18]，本实验在凋亡期检测出 200 和 250 ku 的异构体蛋白推测可能是被剪切的 Talin-1。

人类已经研究了 miR-155 在多种疾病模型中的功能，研究表明 miR-155 在非特异性免疫和人类疾病中起到重要和复杂的作用。但关于 miR-155 在细胞凋亡过程中的功能研究极少。秦美灵等^[19]通过转染 miR-155-5p mimics 至 HK-2 细胞，可减弱银杏内酯 B 对高糖诱导的细胞凋亡及炎症因子表达的影响；MGC803 细胞被转染 miR-155-5p 模拟物后细胞活力显著增加，凋亡比例降低^[20]，上述两个研究都证明了 miR-155-5p 高表达具有降低或减弱细胞凋亡的功能。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Declercq A M, Haesebrouck F, Van den Broeck W, et al. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions[J]. *Veterinary Research*, 2013, 44(1): 27.
- [2] Dong H T, Senapin S, LaFrentz B, et al. Virulence assay of rhizoid and non-rhizoid morphotypes of *Flavobac-*

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

terium columnare in red tilapia, *Oreochromis sp.*, fry[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(6): 649-655,doi: 10.1111/jfd.12385.

- [3] Sun W, Julie Li Y S, Huang H D, et al. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2010, 12: 1-27.
- [4] Ho P T B, Clark I M, Le L T T. MicroRNA-based diagnosis and therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 7167.
- [5] Acuña S M, Floeter-Winter L M, Muxel S M. MicroRNAs: biological regulators in pathogen-host interactions [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 113.
- [6] Morishita A, Oura K, Tadokoro T, et al. MicroRNA interference in hepatic host-pathogen interactions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7): 3554.
- [7] Zhao L J, Lu H, Meng Q L, et al. Profilings of MicroRNAs in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Flavobacterium columnare*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 566.
- [8] Zhao Y, Lykov N, Tzeng C. Talin-1 interaction network in cellular mechanotransduction (Review)[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2022, 49(5): 60.
- [9] Senetar M A, McCann R O. Gene duplication and func-
- 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- tional divergence during evolution of the cytoskeletal linker protein Talin[J]. *Gene*, 2005, 362: 141-152,
- [10] Finlay B B, Ruschkowski S, Dedhar S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells[J]. *Journal of Cell Science*, 1991, 99(2): 283-296,
- [11] Jeong S Y, Martchenko M, Cohen S N. Calpain-dependent cytoskeletal rearrangement exploited for anthrax toxin endocytosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(42): E4007-E4015,
- [12] 刘毅, 谢海侠, 昌鸣先, 等. 柱状黄杆菌胞外多糖对草鱼的免疫促进作用 [J]. *水产学报*, 2006, 30(5): 683-689.
- Liu Y, Xie H X, Chang M X, *et al.* Immunologic enhancement of *Flavobacterium columnare* exopolysaccharide in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(5): 683-689 (in Chinese).
- [13] Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, *et al.* Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(4): 1633-1645,
- [14] Friedman R C, Farh K K H, Burge C B, *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs[J]. *Genome Research*, 2009, 19(1): 92-105,
- [15] Fan T J, Han L H, Cong R S, *et al.* Caspase family proteases and apoptosis[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, 37(11): 719-727,
- [16] Danen E H J, Yamada K M. Fibronectin, integrins, and growth control[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2001, 189(1): 1-13,
- [17] Moulik M, Vatta M, Witt S H, *et al.* ANKRD1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009, 54(4): 325-333,doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.076.
- [18] Turner C E. Paxillin and focal adhesion signalling[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(12): E231-E236,
- [19] 秦美灵, 吴春丽, 陈延玲, 等. 银杏内酯 B 调控 miR-155-5p 对高糖诱导肾小管上皮细胞凋亡的影响 [J]. *川北医学院学报*, 2024, 39(2): 150-155.
- Qin M L, Wu C L, Chen Y L, *et al.* Effect of ginkgolide B on renal tubular epithelial cell apoptosis induced by high glucose by regulating miR-155-5p[J]. *Journal of North Sichuan Medical College*, 2024, 39(2): 150-155 (in Chinese).
- [20] 王斐斐, 李炜, 贺礼琴, 等. 氧化苦参碱通过下调 miR-155-5p 对胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭作用 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(7): 1567-1574.
- Wang F F, Li W, He L Q, *et al.* Oxymatrine inhibits the proliferation, apoptosis, migration, and invasion of gastric cancer cells by downregulating miR-155-5p[J]. *Drugs & Clinic*, 2023, 38(7): 1567-1574 (in Chinese).

MiR-155 regulates apoptosis induced by FC-EPS incubation via targeting the *talin-1* gene in EPC

WANG Qian¹, WANG Chengde², LUO Minyi², LI Guo³, CHE Hang¹, LIN Li¹, ZHAO Lijuan^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Agricultural Service Center of Xiaolan Town, Zhongshan, 510230, China;

3. Bailian Aquatic Seedling Company Ltd. of Gaozhou City, Maoming 525200, China)

Abstract: Incubation of *Flavobacterium columnare* exopolysaccharide (FC-EPS) significantly increases the expression of miR-155 in epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cell line, leading to cell apoptosis. In order to study the mechanism of miR-155 in FC-EPS induced apoptosis, RNAi technology was used in this research. It was found that both overexpression of miR-155 and talin-1 knockout could inhibit apoptosis induced by FC-EPS incubation. Then, talin-1 was identified as the target protein of miR-155 by EMSA assay. During the process of apoptosis induced by FC-EPS incubation, the Talin-1 protein was significantly increased, and the activation of apoptosis executioner caspase-3 protein was detected. At the same time, two talin-1 isomers (about 200 ku and 250 ku, respectively) were obtained. Subsequently, the talin-1 gene inserted in plasmid pcDNA3.1 was constructed and transfected into EPC cells, the overexpressed Talin-1 protein delayed and prolonged the process of apoptosis, and two Talin-1 isomers mentioned above were detected. However, apoptosis did not occur when EPC cells were transfected with FC-EPS; on this occasion, the Talin-1 protein in EPC went down at first, then returned to normal level. Hence, in the context of apoptosis induced by FC-EPS incubation, EPC cells reduces apoptosis by regulating the level of mRNA and protein transcription of talin-1 through up-regulation of miR-155 and producing Talin-1 isomers. This paper provides a new idea for effective prevention and treatment of *F. columnare* diseases.

Key words: *Flavobacterium columnare*; microRNA-155; *talin-1*; apoptosis; RNA interference

Corresponding author: ZHAO Lijuan. E-mail: zhaolijuan4234@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31602190); the Social Welfare and Basic Research Fund of Zhongshan City (2022B2003); the Guangdong Provincial Special Fund for Science and Technology Innovation Strategy and Rural Revitalization Strategy (2021S0082); Guangdong Provincial Special Fund for Modern Agriculture Industry Technology Innovation Teams (2019KJ141)