

microRNA在水产动物中的研究进展

李法君^{1,2}, 李明爽³, 付春鹏¹, 李群峰¹, 罗永巨⁴, 傅洪拓^{2*}

(1. 潍坊科技学院, 山东 寿光 262700;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 全国水产技术推广总站, 北京 100125;

4. 广西水产科学研究院, 广西 南宁 530021)

摘要: miRNAs 是一类在真核生物中广泛存在的非编码小分子RNA, 通过与靶mRNA互补配对在转录水平上对基因的表达进行负调控, 导致mRNA的翻译抑制或降解。大量研究表明, miRNA在躯体发育、癌症、细胞分化、细胞增殖与凋亡、脂肪代谢等方面发挥作用。近来在水产动物中, 有关miRNA的研究取得了众多的科研成果, 然而对其进行全面总结的报道较缺乏。本文综述了miRNA在水产动物中的研究进展, 结果显示miRNA在水产动物中表现为多样化的生物学功能, 本文也对其研究前景进行了展望, 旨在为以后更好地研究水产动物miRNA的功能提供参考。

关键词: 鱼类; 甲壳动物; 水产动物; miRNA; 负调控

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

MicroRNA (miRNA) 是一类长度为19~25个核苷酸(nt)(一般为22个nt)的内源性非编码小分子单链RNA^[1-4], 可以与靶基因的3'非翻译区(untranslated regions, UTR)结合从而抑制靶基因的翻译或降解靶基因。1993年在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)时序性发育调控过程中发现了首个miRNA(lin-4)^[5]; 2000年又在线虫中找到了第2个调控时序性发育的miRNA基因let-7^[6]。此后研究人员逐渐认识到miRNA是一类在真核生物细胞中广泛存在, 在多种生化途径中发挥作用的具有高度的保守性、时序性、组织特异性的转录后调控因子。这些调控途径包括发育^[7-8]、免疫^[9-10]、癌症发生^[11-12]、细胞分化^[13-14]、细胞增殖和凋亡^[15-17]、脂肪代谢^[18-19]等。近来在水产动物中有关miRNA的研究也取得了众多成果, 但国内外尚缺乏对其进行全面总结的报道, 鉴于

此, 本文对miRNA在水产动物中的研究进行了综述, 以期以后更好地研究水产动物miRNA的功能提供参考。

1 miRNA的合成及作用机制

作为21世纪生命科学领域重大发现之一, 大量研究表明, miRNA是一类由基因组DNA转录生成的非编码蛋白质的调控RNA序列。在动物细胞中编码miRNA的DNA序列多位于基因间隔区和基因内含子区域。miRNA的合成分为细胞核内和细胞质中2个阶段: (1)首先在细胞核内, miRNA基因在RNA聚合酶II的作用下形成较长的茎环结构, 称为初级miRNA(pri-miRNA); 此时的pri-miRNA在5'端有帽子结构, 3'端有一个多聚腺苷酸尾巴。随后pri-miRNA在Drosha-DGCR8复合物的作用下形成长度约60~70个nt的

收稿日期: 2015-10-31 修回日期: 2016-05-04

资助项目: 国家自然科学基金(31572617); 中央级基本科研业务费专项(2015JBFM11); 江苏省农业科技自主创新资金[CX(15)1012-4]; 江苏省水产三新工程(D2015-16); 无锡市科技发展资金(CLE02N1514)

通信作者: 傅洪拓, E-mail: fuht@ffrc.cn

发卡状结构, 成为前体miRNA(pre-miRNA); pre-miRNA在Exportin-5复合物的协助下通过核孔复合物到达细胞质中。(2)pre-miRNA在细胞质中由Dicer剪切成为19~25nt的双链miRNA结构, 随后双链miRNA中的一条链在解旋酶的作用下分解, 另一条链则成为成熟的miRNA分子。成熟的单链miRNA与Argonaute蛋白和Dicer结合形成RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)^[20-22]。

RISC复合物与靶mRNA的3'UTR的碱基结合, 对靶基因进行降解或翻译抑制。如果miRNA与靶mRNA完全匹配, 则RISC复合体降解该mRNA; 若二者序列部分匹配, 尤其是miRNA的5'端2~8个被称为种子序列(seed sequence)的碱基与靶mRNA完全匹配, 则通过抑制靶mRNA的翻译来沉默该基因(图1)。

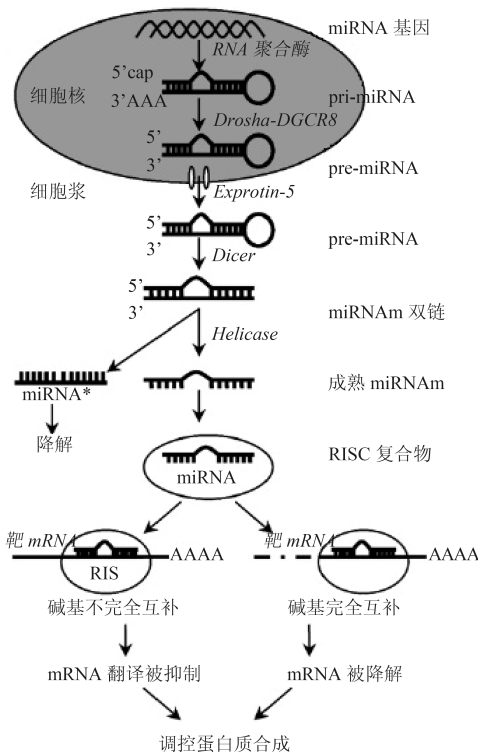


图1 miRNA的合成和作用机制^[23]

Fig. 1 Generating and action mechanism of miRNA^[23]

2 水产动物miRNA信息的获取

对水产动物进行目标组织的miRNA测序是获得miRNA信息的主要途径。水产动物miRNA的组织测序一般分为两种情况。其一, 对某个组织或者几个组织的混合样本进行测序; 其二,

设置实验组和对照组, 对两者分别测序找出其中差异表达的miRNA进行分析。前者在于获取目标组织的miRNA信息, 后者侧重分析miRNA对目标基因的调控机制。

水产动物中相应的组织或组织混合池miRNA测序如下: Chen等^[24]研究了刺参(*Apostichopus japonicus*)夏眠阶段肠道中miRNA表达情况, 共发现308个保守miRNA, 18个新的miRNA。其中miR-200-3p等7个miRNA在夏眠阶段的肠道中高度表达, 暗示这些miRNA可能参与了转录抑制与细胞分化的过程。Wei等^[25]对光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)的雌雄生殖腺、口部肌肉、肠和管足等5个组织的miRNA进行了检测, 共发现345个保守miRNA, 70个miRNA为海胆所特有。Mi等^[26]进一步检测了光棘球海胆雌雄生殖腺中的miRNA, 结果显示分别有47个和51个miRNA在雄性和雌性性腺中特异性表达。类似的miRNA组织测序在软体动物的太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[27]、栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[28]、食用牡蛎(*Ostrea edulis*)^[29]、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[30]、欧洲帽贝(*Patella vulgata*)^[31]; 甲壳动物的蚤状溞(*Daphnia pulex*)^[32]、明钩虾(*Parhyale hawaiiensis*)^[33]、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[34-35]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[36]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[37-38]、大西洋中脊盲虾(*Rimicaris exoculata*)^[39]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[40]、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[41]、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)^[42]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[43]; 鱼类中的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[44]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[45]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[46]等多个物种中均有所报道。详细miRNA测序物种、组织及筛选出的重要miRNA信息见表1。

除了直接的组织测序, 通过生物信息学对已有物种的miRNA序列进行分析比对也是获取miRNA信息的方法之一。例如, 柳承璋等^[47]通过生物信息学方法对蚤状溞miRNA进行了数据挖掘, 分析得到252个pre-miRNA, 可编码262个功能miRNA, 发现6个miRNA簇; Yang等^[48]通过生物信息学总结了虹鳟的miRNA及其靶基因, 共发现196个miRNA分别属于124个家族, 这些miRNA的靶基因有2466个, 其功能涉及代谢、细胞分化等多个方面。Barozai^[49]在大西洋鲑(*Salmo salar*)中发现102个miRNA分属46个家族, 靶基因

有258个, 这些基因主要参与免疫、生长、转录调控等过程。

miRNA是在真核生物中广泛存在的调控因子。当前有关水产动物miRNA调控机制的研究虽取得了初步成果, 但尚有众多功能基因的转录水平调控不甚清晰。要阐明其调控机制, 获得miRNA序列是首要任务, 因此, 无论是组织测序还是生物信息学分析, 都为研究水产动物功能基因的转录调控提供了基本的miRNA数据。

3 水产动物miRNA的功能

无论是诸如棘皮动物、软体动物此类的低等无脊椎水产动物, 还是像鱼类一样的高等脊椎水产动物, 作为普遍存在的转录后调控机制, miRNA均在其体内实施多种生物学功能。

3.1 免疫

免疫反应是一个复杂而精细的调控系统, 一方面, 动物体需要对外源性刺激做出迅速而准确的反应; 另一方面, 又要避免对机体造成过度损伤。miRNA只需通过几个碱基互补便可发挥作用, 因此在免疫反应中, miRNA快速、精细而又柔和的调控就显得至关重要。

研究人员通过用灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)感染刺参(*in vivo*)和用脂多糖诱导刺参体腔细胞(*in vitro*)的方法证实, miR-92a^[50], miR-31^[51], miR-200^[52]在刺参的免疫系统中发挥作用。Chen等^[29]在急性病毒性坏死病毒(acute viral necrobiosis virus, AVNV)感染的栉孔扇贝中发现37个miRNA较对照组显著差异表达; 在牡蛎包纳米虫(*Bonamia ostreae*)感染食用牡蛎^[29]和灿烂弧菌感染太平洋牡蛎^[30]中也存在类似的现象。现有的甲壳动物中, Huang等^[35]对感染对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的日本囊对虾血淋巴进行miRNA测序, 较对照组在实验组中发现31个差异表达miRNA。Huang等^[53]进一步研究证实, 日本囊对虾的miR-7能与WSSV的早期基因wsv477的3'UTR结合从而降低其转录水平, 将人工合成的miR-7注射到感染WSSV的日本囊对虾体内, 72 h之后可使WSSV的数量减少1000倍。Ou等^[38]在颤抖病螺原体(*Spiroplasma eriocheiris*)感染克氏原螯虾, Li等^[42]在副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染拟穴青蟹的实验中也分别发现33个和161个显著差异表达

miRNA。

无脊椎动物缺乏后天获得特异性免疫功能的能力, 不产生免疫球蛋白。如甲壳动物是依靠血细胞吞噬和包裹化作用发挥其免疫防御功能。Labreuche等^[54]进一步阐述了对虾可能存在的miRNA抗病毒机制: 病毒分子侵染对虾, 使感染细胞核内产生Ars2和Pasha两种相互作用的蛋白, Ars2和Pasha复合物及相关蛋白将pri-miRNA剪切成pre-miRNA, 在细胞质中DCR1将pre-miRNA加工成成熟的双链miRNA, miRNA与AGO1及相关因子组成复合物与靶基因结合, 调控靶基因的表达。

鱼类中, Sha等^[55]在用鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染的半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)的肝脏、头肾、脾和肠中发现10个显著差异表达miRNA。Xu等^[56]在嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染的草鱼(*Ctenopharyngodon idella*), Zhang等^[57]在肿大细胞病毒RBIV-C1感染的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), Qi等^[58]在聚肌苷酸胞苷酸(poly(I:C))感染的大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的实验中也发现存在类似的差异性表达。不同于无脊椎动物, 鱼类免疫系统包括先天性的或非特异性的防御系统, 以及获得性的或特异性的防御系统, 从而表明miRNA在鱼类免疫系统的分子机制更接近于哺乳动物。

现有研究证实, 在免疫过程中, 细胞的miRNA可以通过作用于病毒基因或有利于病毒基因复制的寄主基因来抑制病毒的增殖。因此, 在水产动物的免疫反应中, 上述发生显著差异表达的miRNA, 很有可能是与病毒的核酸序列或者是有利于某个病毒复制的寄主基因相结合, 在数量和结合程度上影响其表达, 从而达到抵御外来入侵的目的。研究miRNA在水产动物免疫反应中的分子机制, 有助于我们从源头上阐明某些水产动物疾病的病原和发病机制, 为从根本上防治这些疾病提供一个新的切入点。

3.2 器官形成

鱼类眼睛的发育是一个多因子参与的复杂生物学过程, 而miRNA在其中的调控作用不可或缺。Kapsimali等^[59]在斑马鱼(*Danio rerio*)中研究发现, miR-181a和miR-181b在斑马鱼的视网膜细胞中特异性表达, miR-92b和let-7b则在睫状体边缘区域细胞中表达, miR-9在眼睛内核层的无长突

细胞和睫状体边缘区域细胞中表达, miR-204和miR-184则在水晶体中表达, 表明上述miRNA参与了斑马鱼眼睛的发育过程。Ivan等^[60]在青(*Oryzias latipes*)中的研究表明, miR-204与靶基因*Meis2*在水晶体和视网膜的形成过程中发挥作用。Ramachandran等^[61]研究证实let-7的调控对于斑马鱼视网膜的发育同样不可或缺。Xia等^[62]对尖吻鲈(*Lates calcarifer*)的9个组织miRNA测序发现, miR-184-1和miR-184-2在尖吻鲈眼睛组织中高度表达, 而miR-183-1和miR-183-2在眼睛组织中特异性表达, 表明这些miRNA可能参与了尖吻鲈眼的形成过程。视网膜从前脑发育而来, 其中要经历复杂的细胞分化过程。miRNA则被视为具有重要应用潜质的调控神经干细胞增殖和分化的新成员, 能对视网膜中的细胞命运进行调控。上述过程在脊椎动物中都是类似的, 而其中具体的调控机制尚未明确。斑马鱼作为模式生物, 基因组测序工作已经完成, 为研究上述过程奠定了坚实的数据基础。因此, 在斑马鱼中开展miRNA在眼形态发生过程的作用机制研究, 可以为研究脊椎动物, 特别是人类眼睛的发育提供很好的借鉴和参考。

在脊椎动物胚胎发育的过程中, 心脏是最早形成且行使功能的器官。斑马鱼易培养, 胚胎数量多, 且完全透明, 便于观察, 是研究鱼类心脏发育的理想材料。miR-138是斑马鱼心脏发育过程中不可缺少的调控因子, 在胚胎发育过程中, miR-138负调控*aldh1a2*和*cspg2*基因的表达, 沉默miR-138可使斑马鱼心肌细胞出现缺陷, 此结果表明miR-138参与斑马鱼心脏的形成过程^[63]。miR-218通过Slit/Robo信号系统调控心脏前体细胞向中轴迁移会聚的过程, 是斑马鱼心脏环化的重要调控因素^[64]; 另有研究表明, miR-128还可以和转录因子*Tbx5*基因结合参与到心脏细胞分化和心脏瓣膜形成的过程中^[65]。此外, miR-21也在心脏瓣膜的形成过程中发挥作用^[66]。Lalwani等^[67]分别通过沉默和过度表达miR-142-3p发现, miR-142-3p在斑马鱼心脏血管的发育、重塑、再生等方面发挥作用。

作为循环系统中最重要的器官, 心脏的发育过程一直是人们研究的热点问题。在哺乳动物中相关研究表明, miR-1和miR-133在心脏发育过程中发挥关键作用。而至今还未见miR-1和miR-133在鱼类心脏发育过程有调控作用的报道。这

可能与鱼类和哺乳动物的心脏构造不同有关。在鱼类中除斑马鱼外, 其他鱼类心脏的发育模式还少有研究。作为水产动物中为数不多的模式生物, 阐释miRNA在斑马鱼心脏发育中的作用, 无疑对研究其他鱼类的心脏发育研究有重要的参考意义。

鱼类骨骼要经历软骨化和硬骨化的过程, 此过程受多种转录因子的调控, 如*Sox9*^[68], *Runx2*^[69]等。miR-140在斑马鱼的软骨组织中特异性表达, 并且*Sox9*是miR-140的上游调控因子^[70], 此结果揭示, miR-140是*Sox9*调控体系的一部分; 而miR-204和miR-211则负调控*Runx2*基因的表达^[71]。以上结果表明, miRNA是调控鱼类骨骼形成的重要因素。近来, miRNA在动物骨骼发育过程中的作用越来越受到重视, 研究发现, miRNA一般是通过多个信号(Hn, Twist, BMP和FGF等)通路来调控骨骼发育^[72]。水产动物骨骼发育过程中, miRNA是否通过以上信号通路发挥作用还需进一步研究。

3.3 发育

Chen等^[73]在蚤状溞中发现miR-8等5个miRNA在不同的发育时期差异性表达, 表明这5个miRNA在蚤状溞生长发育过程中发挥作用。斑马鱼胚胎阶段的研究表明, miR-430从受精卵就开始转录, 在囊胚期转录水平达到高峰, 主要负责降解受精卵中的驻留(原来卵母细胞遗留的)母系基因^[74-75]。进一步研究表明, miR-430还参与了斑马鱼原肠胚和脑室的形成过程^[76]。miR-206则通过丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号体系调控原肠胚的形成^[77]。miR-314是驻留miRNA, 在卵母细胞中高度表达, 其在斑马鱼早期神经系统的形成过程中发挥作用^[78]。而其他一些驻留miRNA(如miR-24, miR-30, miR-126, miR-146, miR-221)的功能尚未可知^[79-80], 还需深入研究。受精卵是生命过程中的开始点, 受精完成后大部分驻留蛋白的功能已经结束, 因此随着胚胎不断发育, 这部分驻留蛋白将会被降解, 而miRNA可能是其降解的动力。

动物的生殖嵴起源于中胚层, 具有双向性发育的特点。原始的生殖细胞通过细胞迁移, 到达正在发育的生长嵴处, 与不同的生殖嵴细胞结合, 继而分别发育成精巢或卵巢。斑马鱼中

研究表明,正常的生殖细胞会在胚胎发育时期与其他细胞集中在身体中线,然后开始向将来的生殖腺迁移,SDF-1和Cxcr4b则是性腺细胞从发生位置迁移到日后性腺的“路标”和“盲公棒”^[81]。而miR-430通过调控SDF1a的表达在性腺的形成过程中发挥作用^[82]。由此可见,miRNA从起始阶段就调控性腺的发育。

鲮形目鱼类在生长发育过程中要经历一个从两侧对称体型到扁平体型变化的阶段,而miRNA在此过程中发挥作用。在大西洋庸鲮(*Hippoglossus hippoglossus*)^[83]和褐牙鲆^[84]不同发育时期的miRNA测序结果表明,多个miRNA在变形的过程中呈差异性表达。进一步研究发现,Let-7是参与牙鲆躯体形变过程的miRNA之一^[85]。褐牙鲆的多个mRNA的3'UTR都存在Let-7的结合位点^[86],可见Let-7可以作用于多个基因,参与包括:蛋白质合成、信号转导、免疫和细胞周期等一系列过程图。这与鲮形目躯体形变是一个复杂的过程(此过程中必然会涉及上述的生物学过程)相一致。

3.4 生长

脊椎动物肌肉的生长分化过程中需要Hedgehog信号途径、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)信号途径、视黄酸信号途径等多种因子的调控。肌肉中成肌细胞的增殖和分化受生肌调节因子(myogenic regulatory factors, MRF)调控。MyoD是MRF家族的一员,主要参与肌肉分化过程。对尼罗罗非鱼的研究表明,miR-203b负调控MyoD基因的表达^[87]。对斑马鱼的研究则表明,let-7, miR-19和miR-130参与了肌管由增长向衰减的转变过程^[88]。在骨骼肌的生成过程中,肌细胞分化为慢肌纤维和快肌纤维,miR-214通过结合靶基因Sufu(suppressor of fused)正调控慢肌纤维表型,而Sufu是Hedgehog信号的负调控因子。Hedgehog信号是肌细胞特化所必需的,所以miR-214通过Hedgehog信号来指定肌细胞的命运^[89];已有的研究表明,Sox6基因促进快肌纤维的分化,而miR-499则通过负调控Sox6基因来维持慢肌纤维的分化^[90]。

在骨骼肌的形成过程中存在IGF-1/IGF-1R(IGF-1受体)和miR-133相互调控的负反馈机制,IGF-1可以促进miR-133表达,而miR-133反过来则可以抑制IGF-1R的转录水平^[91]。在尼罗罗非鱼

中miR-206负调控靶基因IGF-1表达,抑制miR-206可以促进尼罗罗非鱼的生长^[92],此结果暗示miRNA可能参与了鱼类的下丘脑-垂体调控系统。另有研究表明,骨骼肌中miR-1, miR-27a, miR-133a和miR-206随着尼罗罗非鱼的生长,表达量逐渐升高^[93];而miR-1等8个miRNA(见表1)在鲤鱼中也存在类似的现象^[94],表明这些miRNA可能与转录调控因子结合调控鱼类生长。

水产动物是人们重要的蛋白质来源,肌肉的生长发育也是水产科研人员研究的一个重要课题。在水产动物中寻找鉴定新的miRNA,并对其靶基因进行标识,会进一步丰富水产动物肌肉细胞增殖、定向分化、肌肉纤维膨大的分子机制,进而为改善某些水产动物肌肉的品质奠定理论基础,最终可以提高水产养殖的效益。

鱼类的生长除了内因(基因)调控之外,摄食、营养等外因也起着关键作用。研究表明miRNA也参与到外因诱导的生长调控途径中。肌纤维细胞由胚胎发育早期的成肌细胞经过增殖和肥大形成,大鼠中的研究表明miR-1/133是成肌细胞肥大的负调控因子^[95]。虹鳟幼体发育要经历内源性营养、混合营养和外源性营养3个阶段。研究发现,miR-1/133在虹鳟的肌肉中特异表达,且在此3个阶段中表达量逐渐下降,表明随着鱼类的开口摄食,miR-1/133通过调控肌细胞的形成参与鱼类的生长过程^[96]。Zhu等^[97]分别对禁食和饱食后的鳊(*Siniperca chuatsi*)开展研究,结果发现miR-10c等7个miRNA在骨骼肌中差异表达,表明这些miRNA可能参与了肌肉的生长过程。

通过以上结果可以发现,随着鱼类食物的摄入和生长过程食性的转换,miRNA表达会发生明显变化,这些可能与所摄取的食物有关。本文推测这些miRNA很可能会调控与营养代谢相关的基因,而食物摄入、食性转换则诱导并影响了上述miRNA的表达。

3.5 生殖

水产动物的性腺是其繁衍生殖的物质基础,有关性腺发育的调控机制也是水产动物研究的前沿领域。众多的生化过程参与其中,miRNA也在性腺的发育过程中扮演重要角色。雄性大西洋庸鲮性成熟要早于雌性,Bizuayehu等^[98]发现,同龄(5龄)的雌雄个性相比(精巢成熟而卵巢未成熟),let-7a, miR-143, miR-202-3p在精巢中

的表达量要高于卵巢。对雌鱼幼体进行雄性化处理过程中, let-7a和miR-143表达量上升, 如果终止雄性化处理, 则let-7a和miR-143表达量又恢复到原来水平。表明let-7a, miR-143和miR-202-3p参与了性腺发育的过程。斑马鱼中的研究发现, miR-17a和miR-430b调控卵泡发育和卵母细胞的成熟^[99]。尼罗罗非鱼中的研究表明, miR-129-3p和miR-727-3p在卵巢中的表达量高于精巢, 而miR-132a和miR-212则呈现相反的表达趋势^[100]。Song等^[101]通过对中华绒螯蟹卵巢的miRNA测序分析发现, miR-2和miR-133在卵母细胞减数分裂成熟过程中出现差异表达, 表明miRNA可能在转录后水平调控细胞周期蛋白B(cyclin B)的表达。

卵巢是雌性动物最重要的生殖器官, 在人类中的研究已经证实, miRNA与卵巢癌的发病密切相关, 可见miRNA是调控卵巢正常发育的关键因子。鱼类中的卵巢发育分为多个阶段, 包括卵子发生、卵泡发育、卵巢退化等多个生理过程, 每个阶段miRNA所起的作用也不尽相同。然而, 在水产动物中关于此方面的研究还相对薄弱。需要特别指出的是, 在水产动物中, 有关miRNA在雄性精巢发育过程中的作用还少有研究。哺乳动物的研究表明, miRNA一方面参与了调控精子形成早期相关蛋白的翻译过程^[102], 另一方面与生殖细胞的凋亡密切相关。总之, miRNA调控水产动物性腺发育的研究刚刚起步, 随着研究的逐步深入, 其中具体的调控机制将会逐渐明确。

3.6 调节渗透压

Lv等^[43]在低盐胁迫三疣梭子蟹的鳃中发现12个较对照组显著差异表达的miRNA, 这些miRNA的靶基因主要参与离子转运和甲壳素代谢等调节渗透压的过程。渗透胁迫转录因子1(osmotic stress transcription factor 1, OSTF1)在鱼类的渗透压调节过程中起着重要作用。尼罗罗非鱼中的研究发现, miR-429通过调控OSTF1基因的表达来调节血浆中的离子浓度^[103]; 另外的研究证实, 降低miR-30c的表达, 可使罗非鱼血浆中的离子失衡, 表明miR-30c也是重要的渗透压调节因子^[104]。在斑马鱼中的胚胎发育过程中, miR-8家族在离子细胞中高度表达, 通过调节Nherfl基因的表达来调控Na⁺的转运^[105]。

广盐性的水产种类, 例如, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在海水和淡水中均可进行人工养殖, 其渗透压的调节机制尚不明确, 从上述研究的结果来看, miRNA在其中的调控作用不容忽视。更重要的是, 我国幅员辽阔, 盐碱地区众多, 这些地区多不适宜农作物种植, 因此荒废。对盐碱地的水质、离子成分进行分析, 针对具体物种的渗透压调节机制, 必要时补充相关离子, 进行水产养殖可以提高盐碱地区的经济效益。因此研究水产动物的渗透压调节机制, 特别是miRNA在其中的作用就显得尤为关键。

3.7 代谢

Ordas等^[106]在感染鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)的斑马鱼胚胎中沉默miR-146, 引起载脂蛋白基因的表达量上升, 表明miR-146参与了脂类的代谢过程。Tang等^[107]通过在尼罗罗非鱼中饲喂维生素E发现, miR-21等8个miRNA在实验组高丰度表达, 表明这8个miRNA参与了维生素E的代谢过程。脂肪是鱼类的供能物质, 对鱼体组织的修补、新组织的生长至关重要。在脊椎动物中已有研究表明, miRNA参与了脂肪代谢的过程^[18-19]。虽然在水产动物中有关脂肪代谢的研究尚少, 根据miRNA的作用机制可以分析发现: miRNA通过与靶基因的作用, 影响脂类的生成、运输和氧化分解等过程, 从而调节水产动物体脂类的代谢平衡。开展此方面的研究对于理解miRNA的多功能性和解析水产动物营养物质的代谢过程均具有重要意义。

3.8 其他功能

珍珠形成 Jiao等^[108]对马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)闭壳肌、鳃、珍珠囊、肝脏等8个组织的混合样品进行了miRNA测序及分析, 预测miR-2305和miR-0046可能会参与生物矿化(珍珠形成)的过程; Jiao等^[109]进一步确认, miR-2305可以结合靶基因pearlin在珍珠的形成过程中发挥作用。Zheng等^[110]在上述miRNA测序数据的基础上, 继续挖掘了可能参与马氏珠母贝珍珠形成的miRNA, 结果表明, pm-miR-2386和pm-miR-13b是另外2个可能在珍珠形成过程发挥作用的miRNA。作为一种古老的有机宝石, 珍珠由软体动物的珍珠层分泌而成, 阐释miRNA在珍珠

矿化过程中的作用将有助于明确此过程所蕴含的分子机制, 进一步提高珍珠的产量和品质。

色素沉淀 Yan等^[111]在鲤中发现, miR-429在红色鲤中的表达量要显著高于白色个体。在红色鲤鱼中沉默miR-429, 可使其肤色变淡, 表明miR-429参与了色素沉淀过程。目前关于鱼类体色是如何随鱼体生长保持动态平衡的原因尚不清楚, 比较认可的观点是, 干细胞不断分化为新的色素细胞, 从而使体色在鱼体生长过程中保持稳定^[112]。据此推测, miR-429可能参与了干细胞向色素细胞转化的某个反应。

内参基因 Xu等^[113]发现草鱼的miR-126-3p等7个miRNA呈稳定的表达, 可以作为内参基因使用。

综上所述, miRNA在水产动物中呈现多样的生物学功能。通常情况下, miRNA与已知功能的靶基因结合, 通过调控靶基因的表达来实现自己的生物学功能。

4 展望

靶基因的确定 miRNA作为新发现的一类基因表达调控因子, 目前通过大规模深度测序, 新miRNA的发现相对来说比较容易。很多水产动物的组织均进行了miRNA测序, 且获得了大量的miRNA序列数据, 但是其中大部分miRNA序列的靶基因尚未确定。虽然在挖掘miRNA靶基因方面存在多种方法如生物信息学方法、差异表达谱分析法、miRISC免疫共沉淀法等^[114], 但每种方法都有其不足之处, 且miRNA存在多个靶基因的特性。因此在水产动物中开发高通量特异的、灵敏度高的miRNA靶基因筛选与鉴定方法已成为当前亟待研究的课题。

miRNA的保守性 作为模式生物, 斑马鱼中大量的miRNA功能已被阐述, 这为研究其他鱼类的miRNA功能提供了很好的借鉴和参考。这里就包括在脊椎动物中功能保守的miRNA, 而这些保守的miRNA在软体动物和甲壳动物中是否存在相似的功能, 现在来看, 结果并不像我们想象的那么乐观。如上所述, miR-1和miR-133在其哺乳动物的心脏发育过程发挥关键作用, 而其在鱼类心脏发育过程中的作用还未见报道。因为软体动物和甲壳动物隶属于无脊椎动物, 特别是甲壳动物处于无脊椎动物向脊椎动

物进化的过渡阶段, 独特的进化地位决定了miRNA功能的特殊性。仍就心脏发育而言, 软体动物和甲壳动物的心脏结构明显不同于鱼类, 而miR-138, miR-218, 和miR-21等在斑马鱼心脏发育过程中起作用的miRNA是否会在软体动物和甲壳动物的心脏发育中发挥作用, 还需进一步研究。

miRNA的多功能性 (1)行为: 在果蝇最新的研究中首次揭示了一种控制精确行为的microRNA-miR-iab4/8。如果miR-iab4/8发生了突变, 果蝇幼虫被颠倒之后就难以恢复自己的方位^[115]。此结果揭示了miRNA功能的多样性。目前在水产动物中, 关于与行为有关的miRNA尚无报道。开展此方面的研究将有助于解析水产动物的某些行为(如婚配、捕食、逃避敌害)的分子机制。(2)性别决定: 软体动物作为重要的经济动物, 其双壳类物种中有雌雄同体和性变现象^[116], 在这些物种的雌雄生殖腺的分化和性逆转的过程中, miRNA是否参与了上述过程尚未见报道。鱼类作为低等的脊椎动物, 性别决定因子复杂多样, 温度、激素等外因均可对鱼类的性别分化产生影响, 而在此过程中miRNA的作用还鲜有研究。

参考文献:

- [1] Qu K, Wang Z, Lin X L, *et al.* MicroRNAs: Key regulators of endothelial progenitor cell functions [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 448: 65-73.
- [2] He Y, Ju C, Zhang X. Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans [J]. *Molecular Immunology*, 2015, 68(2): 399-403.
- [3] Wheeler B M, Heimberg A M, Moy V N, *et al.* The deep evolution of metazoan microRNAs [J]. *Evolution & Development*, 2009, 11(1): 50-68.
- [4] Takacs C M, Giraldez A J. MicroRNAs as genetic sculptors: fishing for clues [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(7): 760-767.
- [5] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [6] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.

- [7] Jalali S, Ramanathan G K, Parthasarathy P T, *et al.* Mir-206 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and differentiation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46808.
- [8] Feng Y, Cao J H, Li X Y, *et al.* Inhibition of miR-214 expression represses proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts [J]. *Cell Biochemistry & Function*, 2011, 29(5): 378-383.
- [9] O'Connell R M, Rao D S, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses [J]. *Annual Review of Immunology*, 2012, 30: 295-312.
- [10] Li D, Wang A, Liu X, *et al.* MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2015, 125(8): 3008-3026.
- [11] Lin S, Gregory R I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2015, 15(6): 321-333.
- [12] Blondal T, Thomsen A R, Krummheuer J, *et al.* Exosomal microRNA in cell-free urine samples as a source for liquid prostate cancer biopsy [J]. *Cancer Research*, 2015, 75(15): 3987-3987.
- [13] Yuan J, Xiao G, Peng G, *et al.* MiRNA-125a-5p inhibits glioblastoma cell proliferation and promotes cell differentiation by targeting TAZ [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 457(2): 171-176.
- [14] Warth S C, Hoefig K P, Hiekel A, *et al.* Induced miR-99a expression represses Mtor cooperatively with miR-150 to promote regulatory T-cell differentiation [J]. *The EMBO journal*, 2015, 34(9): 1195-1213.
- [15] Kang D, Skalsky R L, Cullen B R. MicroRNAs target multiple pro-apoptotic cellular genes to promote epithelial cell survival [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(6): e1004979.
- [16] Xu Y, Zhu W, Wang Z, *et al.* Combinatorial MicroRNAs Suppress Hypoxia-Induced Cardiomyocytes Apoptosis [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 37(3): 921-932.
- [17] Choe N, Kwon J S, Kim Y S, *et al.* The microRNA miR-34c inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia by targeting stem cell factor [J]. *Cellular Signalling*, 2015, 27(6): 1056-1065.
- [18] Tate R, Rotondo D, Davidson J. Regulation of lipid metabolism by microRNAs [J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2015, 26(3): 243-244.
- [19] Ono K, Horie T, Nishino T, *et al.* MicroRNA-33a/b in Lipid Metabolism [J]. *Circulation Journal*, 2015, 79(2): 278-284.
- [20] Wang C, Wang W J, Yan Y G, *et al.* MicroRNAs: New players in intervertebral disc degeneration [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 450: 331-341.
- [21] Ameres S L, Zamore P D. Diversifying microRNA sequence and function [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(8): 475-488.
- [22] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function [J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(4): 605-610.
- [23] 张韶辉, 魏广和. MicroRNA研究的基本方法及流程 [J]. *济宁医学院学报*, 2013, 36(2): 141-146.
Zhang S H, Wei G H, Basic methods and procedures of miRNA [J]. *Journal of Jining Medical University*, 2013, 36(2): 141-146 (in Chinese).
- [24] Chen M, Zhang X, Liu J, *et al.* High-throughput sequencing reveals differential expression of miRNAs in intestine from sea cucumber during aestivation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76120.
- [25] Wei Z, Liu X, Feng T, *et al.* Novel and conserved micromnas in Dalian purple urchin (*Strongylocentrotus nudus*) identified by next generation sequencing [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2011, 7(2): 180-19.
- [26] Mi X, Wei Z, Zhou Z, *et al.* Identification and profiling of sex-biased microRNAs from sea urchin *Strongylocentrotus nudus* gonad by Solexa deep sequencing [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2014, 10(1): 1-8.
- [27] Yu X, Wang H, Lu Y, *et al.* Identification of conserved and novel microRNAs that are responsive to heat stress in *Brassica rapa* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(2): 1025-1038.
- [28] Zhou Z, Wang L, Song L, *et al.* The Identification and Characteristics of immune-related microRNAs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88397.
- [29] Chen G, Zhang C, Jiang F, *et al.* Bioinformatics

- analysis of hemocyte miRNAs of scallop *Chlamys farreri* against acute viral necrobiosis virus (AVNV) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 37(1): 75-86.
- [30] Martín-Gómez L, Villalba A, Kerkhoven R H, *et al.* Role of microRNAs in the immunity process of the flat oyster *Ostrea edulis* against bonamiosis [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2014, 27: 40-50.
- [31] Kenny N J, Namigai E K, Marlétaz F, *et al.* Draft genome assemblies and predicted microRNA complements of the intertidal lophotrochozoans *Patella vulgata* (Mollusca, Patellogastropoda) and *Spirobranchus (Pomatoceros) lamarcki* (Annelida, Serpulida) [J]. Marine Genomics, 2015, 24: 139-146.
- [32] Ünlü E S, Gordon D M, Telli M. Small RNA sequencing based identification of miRNAs in *Daphnia magna* [J]. PLoS ONE, 2015, 10(9): e0137617.
- [33] Blythe M J, Malla S, Everall R, *et al.* High through-put sequencing of the *Parhyale hawaiiensis* mRNAs and microRNAs to aid comparative developmental studies [J]. PLoS ONE, 2012, 7(3): e33784.
- [34] Ruan L, Bian X, Ji Y, *et al.* Isolation and identification of novel microRNAs from *Marsupenaeus japonicus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(2): 334-340.
- [35] Huang T, Xu D, Zhang X. Characterization of host microRNAs that respond to DNA virus infection in a crustacean [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 159-169.
- [36] Meemak P, Phongdara A, Chotigeat W, *et al.* Computational identification of *Penaeus monodon* microRNA genes and their targets [J]. Songklanakarin Journal of Science & Technology, 2013, 35(2): 143-148.
- [37] Xu W N, Liu W B, Yang W W, *et al.* Identification and differential expression of hepatopancreas microRNAs in red swamp crayfish fed with emodin diet [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(1): 1-7.
- [38] Ou J, Li Y, Ding Z, *et al.* Transcriptome-wide identification and characterization of the *Procambarus clarkii* microRNAs potentially related to immunity against *Spiroplasma eriocheiris* infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 607-617.
- [39] Zhou Y, He Y, Wang C, *et al.* Characterization of miRNAs from hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* [J]. Marine Genomics, 2015, 24: 371-378.
- [40] Tan T T, Chen M, Harikrishna J A, *et al.* Deep parallel sequencing reveals conserved and novel miRNAs in gill and hepatopancreas of Giant Freshwater Prawn [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(4): 1061-1069.
- [41] He L, Wang Y L, Li Q, *et al.* Profiling microRNAs in the testis during sexual maturation stages in *Eriocheir sinensis* [J]. Animal Reproduction Science, 2015, 162: 52-61.
- [42] Li S, Zhu S, Li C, *et al.* Characterization of microRNAs in mud crab *Scylla paramamosain* under *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. PloS One, 2013, 8(8): e73392.
- [43] Lv J, Liu P, Gao B, *et al.* The identification and characteristics of salinity-related microRNAs in gills of *Portunus trituberculatus* [J]. Cell Stress and Chaperones, 2016, 21(1) 63-74.
- [44] Yan B, Wang Z H, Zhu C D, *et al.* MicroRNA repertoire for functional genome research in tilapia identified by deep sequencing [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(8): 4953-4963.
- [45] Salem M, Xiao C, Womack J, *et al.* A microRNA repertoire for functional genome research in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Marine Biotechnology, 2010, 12(4): 410-429.
- [46] Zhu Y P, Xue W, Wang J T, *et al.* Identification of common carp (*Cyprinus carpio*) microRNAs and microRNA-related SNPs [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 413-425.
- [47] 柳承璋, 李富花, 相建海. 淡水枝角水蚤 (*Daphnia pulex*) 微小 RNA 的生物信息学发掘与分析[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(4): 837-846.
- Liu C Z, Li F H, Xiang J H, Bioinformatic analysis of microRNA genes in *Daphnia pulex*[J]. Oceanologia eT Limnologia Sinica, 2013, 44(4): 837-846 (in Chinese).
- [48] Yang L, He S. A bioinformatics-based update on microRNAs and their targets in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Gene, 2013, 533(1): 261-269.
- [49] Barozai M Y K. Identification and characterization of the microRNAs and their targets in *Salmo salar* [J]. Gene, 2012, 499(1): 163-168.
- [50] Zhang P, Li C, Shao Y, *et al.* Identification and characterization of miR-92a and its targets modulating *Vibrio splendidus* challenged *Apostichopus japonicus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(2): 383-388.

- [51] Lu M, Zhang P, Li C, *et al.* MiR-31 modulates coelomocytes ROS production via targeting p105 in *Vibrio splendidus* challenged sea cucumber *Apostichopus japonicus* *in vitro* and *in vivo* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 293-299.
- [52] Lv Z, Li C, Zhang P, *et al.* miR-200 modulates coelomocytes antibacterial activities and LPS priming via targeting Tollip in *Apostichopus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 431-436.
- [53] Huang T, Zhang X. Functional analysis of a crustacean microRNA in host-virus interactions [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(23): 12997-13004.
- [54] Labreuche Y, Warr G W. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 1002-1010.
- [55] Sha Z, Gong G, Wang S, *et al.* Identification and characterization of *Cynoglossus semilaevis* microRNA response to *Vibrio anguillarum* infection through high-throughput sequencing [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 44(1): 59-69.
- [56] Xu X, Shen Y, Fu J, *et al.* Next-generation sequencing identified microRNAs that associate with motile aeromonad septicemia in grass carp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(1): 94-103.
- [57] Zhang B C, Zhang J, Sun L. In-depth profiling and analysis of host and viral microRNAs in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with megalocytivirus reveal involvement of microRNAs in host-virus interaction in teleost fish [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 878.
- [58] Qi P, Guo B, Zhu A, *et al.* Identification and comparative analysis of the *Pseudosciaena crocea* microRNA transcriptome response to poly (I: C) infection using a deep sequencing approach [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 39(2): 483-491.
- [59] Kapsimali M, Kloosterman W P, De Bruijn E, *et al.* MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system [J]. *Genome Biology*, 2007, 8(8): 1846-1851.
- [60] Ivan C, Sabrina C, Raffaella A, *et al.* miR-204 is required for lens and retinal development via Meis2 targeting [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(35): 15491-15496.
- [61] Ramachandran R, Fausett B V, Goldman D. Ascl1a regulates muller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway [J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(11): 1101-7.
- [62] Xia J H, He X P, Bai Z Y, *et al.* Identification and characterization of 63 microRNAs in the Asian seabass *Lates calcarifer* [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(3): e17537.
- [63] Morton S U, Scherz P J, Cordes K R, *et al.* microRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(46): 17830-178305.
- [64] Fish J E, Wythe J D, Xiao T, *et al.* A Slit/miR-218/Robo regulatory loop is required during heart tube formation in zebrafish [J]. *Development*, 2011, 138(7): 1409-1419.
- [65] Chiavacci E, Dolfi L, Verduci L, *et al.* MicroRNA 218 mediates the effects of Tbx5a over-expression on zebrafish heart development [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e50536.
- [66] Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, *et al.* Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21 [J]. *Nature Communications*, 2013, 4(3): 131-140.
- [67] Lalwani M K, Sharma M, Singh A R, *et al.* Reverse genetics screen in zebrafish identifies a role of miR-142a-3p in vascular development and integrity [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e52588.
- [68] Yan Y L, Miller C T, Nissen R, *et al.* A zebrafish *sox9* gene required for cartilage morphogenesis [J]. *Development*, 2002, 129(21): 5065-5079.
- [69] Flores M V, Lam E Y N, Crosier P, *et al.* A hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, 235(11): 3166-3176.
- [70] Nakamura Y, He X, Kato H, *et al.* Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(1): 64-71.
- [71] Huang J, Zhao L, Xing L, *et al.* MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2): 357-364.
- [72] Gradus B, Hornstein E. Role of microRNA in skeleton

- development [J]. *Bone and Development*, 2010, 81-91.
- [73] Chen S, McKinney G J, Nichols K M, *et al.* In silico prediction and *in vivo* validation of *Daphnia pulex* micrnas [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e83708.
- [74] Giraldez A J, Mishima Y J, Grocock R J, *et al.* Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs [J]. *Science*, 2006, 312(5770): 75-79.
- [75] Michaela M, U. B T, Erez R. Regulation of hub mRNA stability and translation by miR430 and the dead end protein promotes preferential expression in zebrafish primordial germ cells [J]. *Developmental Dynamics*, 2011, 240(3): 695-703.
- [76] Lee M T, Bonneau A R, Takacs C M, *et al.* Nanog, Pou5f1 and SoxB1 activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition [J]. *Nature*, 2013, 503(7476): 360-364.
- [77] Xiuli L, Guozhu N, Anming M, *et al.* MicroRNA-206 regulates cell movements during zebrafish gastrulation by targeting prickle1a and regulating c-Jun N-terminal kinase 2 phosphorylation [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2012, 32(14): 2934-2942.
- [78] Kartik S, Ashwani C, Ashok P, *et al.* miR-34 is maternally inherited in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(8): 4470-4480.
- [79] Ma H, Hostuttler M, Wei H, *et al.* Characterization of the rainbow trout egg microRNA transcriptome [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): 1717-1720.
- [80] Juanchich A, Le Cam A, Montfort J, *et al.* Identification of differentially expressed miRNAs and their potential targets during fish ovarian development [J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 88(5): 128, 1-11.
- [81] Maria D, Michal R F, Jürg S, *et al.* Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1 [J]. *Cell*, 2002, 111(5): 647-659.
- [82] Staton A A, Holger K, Giraldez A J. miRNA regulation of Sdf1 chemokine signaling provides genetic robustness to germ cell migration [J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(3): 204-211.
- [83] Bizuayehu T T, Lanes C F, Furmanek T, *et al.* Differential expression patterns of conserved miRNAs and isomiRs during *Atlantic halibut* development [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(2): 11-25.
- [84] Fu Y, Shi Z, Wu M, *et al.* Identification and differential expression of microRNAs during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(7): e22957.
- [85] Fu Y, Shi Z, Wang G, *et al.* Expression of let-7 microRNAs that are involved in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) metamorphosis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 165(2): 106-113.
- [86] 吴明林. MiRNA let-7d 在牙鲆变态发育过程中的表达及其靶基因预测[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- Wu M L, Expression and target predictions of let-7d during metamorphosis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011 (in Chinese).
- [87] Yan B, Guo J T, Zhu C D, *et al.* miR-203b: a novel regulator of *MyoD* expression in tilapia skeletal muscle [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(3): 447-451.
- [88] Johnston I A, Lee H T, Macqueen D J, *et al.* Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(12): 1781-1793.
- [89] Flynt A S, Nan L, Thatcher E J, *et al.* Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(2): 259-263.
- [90] Xingang W, Yosuke O, Swee Chuan T, *et al.* Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo [J]. *Development*, 2011, 138(20): 4399-4404.
- [91] Huang M B, Xu H, Xie S J, *et al.* Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e29173.
- [92] Yan B, Zhu C D, Guo J T, *et al.* miR-206 regulates the growth of the teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*) through the modulation of IGF-1 gene expression [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(7): 1265-1269.
- [93] Yan B, Guo J T, Zhao L H, *et al.* microRNA expression

- signature in skeletal muscle of Nile tilapia [J]. *Aquaculture*, 2012, 364: 240-246.
- [94] Yan X, Ding L, Li Y, *et al.* Identification and profiling of microRNAs from skeletal muscle of the common carp [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): e30925.
- [95] McCarthy J J, Esser K A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2007, 102(1): 306-313.
- [96] Mennigen J A, Skiba-Cassy S, Panserat S. Ontogenetic expression of metabolic genes and microRNAs in rainbow trout alevins during the transition from the endogenous to the exogenous feeding period [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(9): 1597-1608.
- [97] Zhu X, Chen D, Hu Y, *et al.* The microRNA signature in response to nutrient restriction and refeeding in skeletal muscle of Chinese perch (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2015, 17(2): 180-189.
- [98] Bizuayehu T, Babiak J, Norberg B, *et al.* Sex-biased miRNA expression in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) brain and gonads [J]. *Sexual Development*, 2012, 6(5): 257-266.
- [99] Abramov R, Fu G, Zhang Y, *et al.* Expression and regulation of miR-17a and miR-430b in zebrafish ovarian follicles [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 188(1): 309-15.
- [100] Xiao J, Zhong H, Zhou Y, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in ovary and testis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by using solexa sequencing technology [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e8682.
- [101] Song Y N, Shi L L, Liu Z Q, *et al.* Global analysis of the ovarian microRNA transcriptome: implication for miR-2 and miR-133 regulation of oocyte meiosis in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda) [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 547-557.
- [102] Ro S, Park C, Sanders K M, *et al.* Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs [J]. *Developmental Biology*, 2007, 311(2): 592-602.
- [103] Yan B, Zhao L H, Guo J T, *et al.* miR-429 regulation of osmotic stress transcription factor 1 (*OSTF1*) in tilapia during osmotic stress [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 426(3): 294-298.
- [104] Yan B, Guo J T, Zhao L H, *et al.* MiR-30c: a novel regulator of salt tolerance in tilapia [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 425(2): 315-320.
- [105] Flynt A S, Thatcher E J, Burkewitz K, *et al.* miR-8 microRNAs regulate the response to osmotic stress in zebrafish embryos [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2009, 185(1): 115-127.
- [106] Ordas A, Kanwal Z, Lindenberg V, *et al.* MicroRNA-146 function in the innate immune transcriptome response of zebrafish embryos to *Salmonella typhimurium* infection [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 696-711.
- [107] Tang X L, Xu M J, Li Z H, *et al.* Effects of vitamin E on expressions of eight microRNAs in the liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(6): 1470-1475.
- [108] Jiao Y, Zheng Z, Du X, *et al.* Identification and characterization of microRNAs in Pearl oyster *Pinctada martensii* by Solexa deep sequencing [J]. *Marine Biotechnology*, 2014, 16(1): 54-62.
- [109] Jiao Y, Zheng Z, Tian R, *et al.* MicroRNA, Pm-miR-2305, participates in nacre formation by targeting pearl in pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9): 21442-21453.
- [110] Zheng Z, Jiao Y, Du X, *et al.* Computational prediction of candidate miRNAs and their potential functions in biomineralization in pearl oyster *Pinctada martensii* [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016, 23(3): 372-378.
- [111] Yan B, Liu B, Zhu C D, *et al.* microRNA regulation of skin pigmentation in fish [J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(15): 3401-3408.
- [112] Rawls J F, Mellgren E M, Johnson S L. How the zebrafish gets its stripes [J]. *Developmental Biology*, 2001, 240(2): 301-314.
- [113] Xu X Y, Shen Y B, Fu J J, *et al.* Determination of reference microRNAs for relative quantification in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1): 374-382.
- [114] 刘悦, 李丹, 张玉, 等. 动物 microRNA 靶基因的筛选与鉴定研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2014, 31(2): 82-86.
- Liu Y, Li D, Zhang Y, *et al.* Progress of screening and

- identifying micro RNA targets in animals[J], *Journal of Biology*, 2014, 31(2): 82-86 (in Chinese).
- [115] Picao J, Johnston J, Landgraf M, *et al.* MicroRNA-encoded behavior in *Drosophila* [J]. *Science*, 2015, 350(6262): 815-820.
- [116] Heller J. Hermaphroditism in molluscs [J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1993, 48(1): 19-42.
- [117] Li C, Feng W, Qiu L, *et al.* Characterization of skin ulceration syndrome associated microRNAs in sea cucumber *Apostichopus japonicus* by deep sequencing [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 436-441.
- [118] Yang L, Yang G, Zhang X. The miR-100-mediated pathway regulates apoptosis against virus infection in shrimp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 146-153.
- [119] Flynt A S, Li N, Thatcher E J, *et al.* Zebrafish miR-214 modulates hedgehog signaling to specify muscle cell fate [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(2): 259-263.

Research progress of miRNA in aquatic animals

LI Fajun^{1,2}, LI Mingshuang³, FU Chunpeng¹, LI Qunfeng¹, LUO Yongju⁴, FU Hongtuo^{2*}

(1. Weifang University of Science and Technology, Shouguang 262700, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081 China;

3. National Fisheries Technical Extension Center, Beijing 100125, China;

4. Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China)

Abstract: MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNA molecules that negatively regulate gene expression at the post-transcriptional levels by base pairing with target mRNAs which leads to mRNA cleavage or translational repression in eukaryotes. A large number of studies show that miRNAs play a vital role in physical development, cancer, cell differentiation, proliferation and apoptosis, lipid metabolism. Recently, numerous research findings about miRNAs have been gained in aquatic animals. However, no comprehensive summary has been reported in this aspect so far. This paper reviews the recent research progress of miRNAs in aquatic animals. The results show that miRNAs present diverse biological functions in aquatic animals. The aim of this review is to provide basic references for analysing prospects of further development about miRNAs in aquatic animals.

Key words: fish; crustacean; aquatic animals; miRNA; negative regulation;

Corresponding author: FU Hongtuo. E-mail: fuht@ffrc.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31572617); the Freshwater Fisheries Research Center, China Central Governmental Research Institutional Basic Special Research Project from the Public Welfare Fund (2015JBFM11); Fund of Independent Innovation of Agricultural Sciences of Jiangsu province [CX (15)1012-4]; the three aquatic projects of Jiangsu Province (D2015-16); the Science and Technology Development Fund of Wuxi (CLE02N1514).

表 1 水产动物的miRNA
Tab. 1 miRNA in aquatic animals

物种 species	组织 tissue	miRNA 数量 number of miRNA	重要 miRNA principal miRNA	靶基因 target gene	功能 function	参考文献 reference	备注 remark	
棘皮动物 Echinodermata	肠(夏眠阶段)	308个保守miRNA, 18个新的miRNA	7个miRNA在实验组和对照组差异性表达			[24]	组织测序	
	血细胞 (皮肤溃烂)	40个保守的miRNA, 86个新的miRNA	miR-31和miR-2008在实验组和对照组呈差异性表达 miR-92a	MEGF, SMURF	免疫反应	[50]	组织测序	
软体动物 Mollusca	光棘球海胆 <i>S. nudus</i>	雌雄生殖腺、口部肌肉、肠、管足	miR-31	<i>4ip105</i>	免疫反应	[51]		
			miR-200	<i>4j7ollip</i>	免疫反应	[52]		
	太平洋牡蛎 <i>C. gigas</i>	雌雄生殖腺	345个保守miRNA, 70个新的miRNA	PC-5p-4087, PC-3p-29066, PC-5p-55119, PC-5p-6321, PC-3p-6677, PC-3p-13592等			[25]	组织测序
			184个miRNA, 其中分别有47和51个miRNA在雄性和雌性性腺中特异性表达	miR-2012, miR-34, let-7, let-7a, PC-5p-15829_327等(雌性性腺)miR-92a, miR-71, miR-219, miR-2007, miR-2004等(雌性性腺) cgi-miR-1991, cgi-miR-1990-3p, cgi-miR-33-5p等			[26]	组织测序
软体动物 Mollusca	消化道、鳃、闭壳肌、血细胞等9个组织和受精卵、囊胚期、担轮幼虫期等12个不同发育时期 血细胞(AVNV感染)	100个pe-miRNA分子转录位点, 19个新的pr-miRNA				[27]	组织测序	
		57个保守miRNA, 11个新的miRNA	37个miRNA在实验组和对照组差异性表达			[28]	组织测序	
		63个miRNA在实验组和对照组差异性表达				[29]	组织测序	
		22个miRNA在实验组和对照组差异性表达				[30]	组织测序	
		71个保守miRNA, 128个新的miRNA				[108]	组织测序	
		205个保守miRNA, 53个新的miRNA						
		miR-4154-3p, miR-666, miR-4661, miR-629, miR-2305, miR-0046等						
		miR-2305	<i>pearlin</i>	珍珠形成		[109]		
		205个miRNA分别隶属于188个不同的家族				[32]	成体测序	
		55个保守的miRNA, 20个新的miRNA				[73]	生长发育	
甲壳动物 Crustacean	成体	miR-317, dma-miR-745等				[32]		
		miR-8, miR-9, miR-12, miR-92, miR-100				[73]		
		miR-2, miR-12, miR-87, miR-275, miR-276, miR-279, miR-307, miR-750, miR-1175 miR-306等				[33]	组织测序	
		mja-miR-156, mja-miR-164, mja-miR-402, 等				[34]	组织测序	
日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	血细胞 血淋巴 (WSSV感染)	31个保守的miRNA, 20个新的miRNA	31个miRNA在实验组和对照组差异性表达			[35]	组织测序	
		48个miRNA, 15个新的miRNA	miR-7	<i>wsv477</i>	免疫反应	[53]	组织测序	
明对虾 <i>P. hanvariensis</i>	血淋巴	miR-100		<i>Trypsin</i>	细胞凋亡	[118]		

·续表1·

物种 species	组织 tissue	miRNA 数量 number of miRNA	重要 miRNA principal miRNA	靶基因 target gene	功能 function	参考文献 reference	备注 remark
斑节对虾 <i>P. monodon</i>	眼柄、肝脏、血细胞、血淋巴、卵巢的cDNA文库		miR-4152, miR-466k, miR-32, lin-4, miR-1346, miR-4310			[36]	组织测序
克氏原螯虾(<i>P. clarkii</i>)	肝脏 (饲喂大黄素)	106个保守的miRNA, 5个新的miRNA	35个miRNA在实验组和对照组差异表达			[37]	组织测序
大西洋中脊盲虾 <i>R. exoculata</i>	血细胞 (颤抖病螺原体感染)	30个保守的miRNA, 48个新的miRNA	33个miRNA在实验组和对照组差异表达			[38]	组织测序
罗氏沼虾 <i>M. rosenbergii</i>	肌肉	159个保守miRNA, 34个新的miRNA	rex-novel-19, rex-novel-9, rex-novel-10, rex-novel-11等			[39]	组织测序
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	鳃、肝脏	3个保守miRNA, 27个新的miRNA	G-m0005, G-m0008/H-m0016, G-m0011/H-m0027, G-m0015, G-m0005, G-m0008/H-m0016, G-m0011/H-m0027等			[40]	组织测序
拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	精巢	15个新的miRNA	miR-21-5p, miR-184, miR-let-7c, miR-17-3p, miR-17-5p等	<i>cyclin B</i>	减数分裂	[41]	组织测序
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	卵巢	55个保守miRNA, 136个新的miRNA	miR-2, miR-133			[101]	组织测序
尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>	脑、心脏、肌肉、鳃等7个组织的混合池(副溶血性弧菌感染)	133个保守miRNA, 8个新的miRNA	161个miRNA在实验组和对照组差异表达			[42]	组织测序
鱼类 Pisces	鳃 (低盐胁迫)	16个保守miRNA, 51个新的miRNA	12个miRNA在实验组和对照组差异表达			[43]	组织测序
	不同发育阶段的混合池	197个保守miRNA, 27个新的miRNA	miR-1, miR-206, miR-7, miR-9, miR-122等			[44]	组织测序
	幼体、稚鱼、成体、老龄4个阶段的骨骼肌	25个保守miRNA	miR-203b	<i>MyoD</i>	肌肉分化	[87]	组织测序
			miR-1, miR-27a, miR-133a, miR-206在不同的发育阶段差异表达			[93]	组织测序
			miR-21, miR-223, miR-146a, miR-125b, miR-181a, miR-16, miR-155 and miR-122		代谢	[107]	组织测序
			miR-429	<i>OSTF1</i>	渗透压调节	[103]	组织测序
			miR-30c	<i>Hsp70</i>	渗透压调节	[104]	组织测序
虹鳟 <i>O. mykiss</i>	肌肉、心脏、大脑、肾脏等个组织的混合池	50个保守miRNA, 4个新的miRNA	miR-429, miR-192, miR-215, miR-199-3p, miR-199-5, miR-133, miR-499等			[45]	组织测序
鲤 <i>C. carpio</i>	脑、皮肤、肾脏、肌肉等11个组织的混合池	92个保守miRNA, 21个新的miRNA	miR-124-5p, miR-460b-5p, miR-150, miR-140-3p, miR-204, miR-22, s0013-5p, s0011-5p, s0010-5p, miR-541, miR-727-5p, and miR-3065-3p等		生长	[96]	组织测序
						[46]	组织测序

· 续表1 ·

物种 species	组织 tissue	miRNA 数量 number of miRNA	重要 miRNA principal miRNA	靶基因 target gene	功能 function	参考文献 reference	备注 remark
	1龄鱼的骨骼肌	188个保守miRNA, 7个新的miRNA	miR-1, miR-21, miR-26a, miR-27a, miR-133a-3p, miR-206, miR-214, miR-222在不同的发育阶段差异性表达 miR-429	<i>Foxd3</i>	色素沉淀	[94]	组织测序
尖吻鲈 <i>L. calcarifer</i>	鳃、脑、眼、肾脏等9个组织	59个保守miRNA, 63个新的miRNA	miR-183-1, miR-183-2, miR-184-1, miR-184-2等 miR-204	<i>Meis2</i>	眼睛形成	[62]	组织测序
青鳉 (<i>O. latipes</i>)	肝脏、头肾、脾、肠(鳃弧菌感染)	152个保守miRNA, 67个新的miRNA	10个miRNA在实验组和对照组的异性表达			[60]	组织测序
半滑舌鳎 <i>C. semilaevis</i>	脾、肾、肝脏、肠、血液(嗜水气单胞菌感染)	61个保守miRNA, 124个新的miRNA	21个miRNA在实验组和对照组的异性表达			[55]	组织测序
草鱼 <i>C. idella</i>						[56]	组织测序
大西洋庸鲽 <i>H. hippoglossus</i>	囊胚、形变早期、形变高峰期、幼体等8个发育时期	199个保守miRNA, 1个新的miRNA	miR-126-3p, miR-101a, miR-451, miR-22a, miR-146, miR-142a-5p and miR-192 let-7a, miR-9, miR-19b, miR-24, miR-122, miR-124, miR-145, miR-430c let-7a, miR-143, miR-202-3p		内参基因	[113]	组织测序
牙鲆 <i>P. olivaceus</i>	脾(肿大细胞病毒感染) RBIV-C1感染)	251个保守miRNA, 130个新的miRNA	121个miRNA在实验组和对照组的异性表达		性腺发育	[98]	组织测序
	10个不同的发育时期	140个保守miRNA	66个miRNA在变形阶段差异性表达 Let-7		(鲆鲽类)躯体形变	[84]	组织测序
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	胸腺、前肾、脾、肝脏(poly(I:C)感染)	158个保守miRNA, 376个新的miRNA	112个miRNA在实验组和对照组的异性表达		生长	[85]	组织测序
鳙 <i>S. chuatsi</i>			miR-10c, miR-107a, miR-133a-3p, miR-140-3p, miR-181a-5p, miR-206, miR-214 miR-146	<i>IRAK1</i> , <i>IRAK6</i>	脂类代谢	[106]	
斑马鱼 <i>D. rerio</i>			miR-430	<i>SDF1a</i>	胚胎发育、生殖腺的形成	[74]; [76]; [82]	
			mir-206	<i>prickle1a</i>	胚胎发育	[77]	
			mir-314		神经系统形成	[78]	
			mir-314	<i>Sufu</i>	肌肉形成	[89]	
			let-7, miR-19和miR-130		肌肉形成	[88]	
			miR-499	<i>Sox6</i>	肌肉形成	[90]	

· 续表1 ·

物种 species	组织 tissue	miRNA 数量 number of miRNA	重要 miRNA principal miRNA	靶基因 target gene	功能 function	参考文献 reference	备注 remark
		miR-181a, miR-181b, miR-92b, let-7b, miR-9, miR-204, miR-184	let-7		眼睛形成	[59]	
			miR-138	<i>aldh1a2, cspg2</i>	眼睛形成	[61]	
			miR-218	<i>Robo1, Robo2</i>	心脏形成	[63]	
				<i>Tbx5</i>	心脏形成	[64]	
			miR-21	<i>Sprout, pdc4d</i>	心脏形成	[65]	
			miR-142-3p	<i>Chd5</i>	心脏形成	[66]	
			miR-204/miR-211	<i>Runx2</i>	骨骼形成	[67]	
			miR-214		生长	[71]	
			miR-133		生长	[119]	
			miR-206	<i>IGF-1</i>	生长	[91]	
		miR-17a 和 miR-430b			性腺发育	[92]	
		miR-138	<i>Nherf1</i>		调节渗透压	[99]	
						[105]	

Notes: MEGF, multiple epidermal growth factor-like domains protein 6; SMURF, E3 ubiquitin-protein ligase SMURF2; Ajp105, P105 of *A. japonicus*; AjTollip, Toll-interacting protein of *A. japonicus*; WSSV, White Spot Syndrome Virus; AVNV, acute viral necrobioitic virus; *cspg2*, chondroitin sulfate proteoglycan 2; sprout, sprout homolog; *pdc4d*, programmed cell death 4; *aldh5*, $\alpha\beta$ hydrolase domain 5; OSTF1, Osmotic stress transcription factor 1