



草鱼 miR-462 通过靶向 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 调控嗜水气单胞菌感染诱导的免疫应答

王安琪¹, 陶丽竹¹, 周丰林¹, 徐晓雁¹, 沈玉帮², 李家乐^{1,2,3*}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 为探究 miR-462 在嗜水气单胞菌感染草鱼肾脏细胞 (*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK) 后的调控机制, 实验利用荧光定量技术检测了 CIK 细胞感染嗜水气单胞菌后 miR-462 表达水平的变化; 运用 RNAhybrid 软件预测 miR-462 的靶基因, 利用双荧光素酶报告基因系统进行确定; 此外还分析了 miR-462 对靶基因下游基因的调控作用。结果显示, 在 CIK 细胞感染嗜水气单胞菌的过程中, miR-462 的表达发生显著变化; *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的表达先降低后升高, 与 miR-462 的表达模式呈负相关。双荧光素酶报告系统显示, miR-462 可靶向 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的 3' 非编码区抑制其表达, 过表达 miR-462 可以显著抑制 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的表达。转染 miR-462 模拟物后, 下游 *slc4a4a*、*tnfrsf5*、*cxcl9* 和 *cxcl11* 基因的表达受到抑制。研究表明, miR-462 参与调控嗜水气单胞菌感染后草鱼 CIK 细胞中的免疫应答。*cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 被鉴定为 miR-462 的靶基因。miR-462 可通过靶向 *slc9a3.1* 和 *tbk1* 影响下游基因的功能。

关键词: 草鱼肾脏细胞; 嗜水气单胞菌; miR-462; 免疫调节

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是世界上养殖产量最高的鱼类^[1]。然而, 因细菌感染而引起的草鱼发病和死亡问题时有发生。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 感染草鱼造成较高的死亡率, 严重影响了草鱼养殖业的健康发展^[2]。嗜水气单胞菌属于气单胞菌属, 在自然界中广泛分布, 是一种典型的人—兽—鱼共患病病原菌^[3]。本实验室前期研究发现, 嗜水气单胞菌感染后, 21 个 miRNAs 在易感和抗病草鱼的脾脏内差异表达, 提示 miRNA 可能在嗜水气单胞菌感染的过程中发挥重要作用^[4]。

microRNA (miRNA) 是一类长约 22 个核苷酸的内源性非编码单链 RNA 分子, 首次发现于秀

丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中^[5]。成熟的 miRNA 通过与 AGO (Argonaute) 蛋白结合, 生成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC), 作用于靶基因的 3' 端非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR), 诱导 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译, 从而实现基因在转录水平后的表达调控^[6-7]。研究发现 miRNA 参与细胞的发育^[8]、分化^[9]、增殖^[10]、凋亡^[11] 等多种生命过程, 且可以对免疫反应进行精细调控。例如, pol-miR-3p-2 通过负调控 p53 抑制迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 感染^[12]; 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染后, miR-122 可负调控鱼体内 *tlr14* 的表达^[13]。pol-miR-194a 过表达可促进 FG

收稿日期: 2020-02-18 修回日期: 2020-04-13

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-45-03); 上海市工程中心提升项目 (19DZ2284300)

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli2009@126.com

细胞内迟缓爱德华氏菌增殖^[14]，研究表明 miR-462 可能参与调控鱼类低氧应答^[15]和免疫应答^[16]。

本实验分析了嗜水气单胞菌感染草鱼肾脏细胞 (*Ctenopharyngodon idella* kidney, CIK) 对 miR-462 表达水平的影响，通过双荧光素酶报告基因系统鉴定 miR-462 的靶基因，分析 miR-462 对下游基因的调控作用，以期为研究 miRNA 在鱼类免疫应答中的调控机制提供更多的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

Opti-MEM 减血清培养基、M199 培养基、胎牛血清、0.25% EDTA-胰蛋白酶、青霉素—链霉素溶液、Lipofectamine 3000 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；miRNA 模拟物/抑制剂 (agomir/antagomir) 及其对照由上海吉玛制药技术有限公司合成；RNAiso Plus 试剂、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™ II 荧光定量 PCR 试剂盒、Quick-Cut™ *Dra* I 和 *Xba* I 限制酶、DNA 连接试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司；miRNA 反转录试剂盒 miScript II RT Kit 和荧光定量 PCR 试剂盒 miScript SYBR® Green PCR Kit 购自德国 Qiagen 公司；快速质粒小提试剂盒和 DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技有限公司；pGEM®-T Easy 载体、pmirGLO 双荧光素酶 miRNA 靶基因表达载体和双荧光素酶报告基因检测试剂盒均购自 Promega 公司。

CO₂ 细胞培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司；Centrifuge 5424 R 冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司；Nanodrop 2000c 分光光度计购自 Thermo Scientific；CFX96 Real-Time System 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养

草鱼肾脏细胞系购自中国典型培养物保藏中心，细胞贴壁生长。采用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 M199 培养基，于 28 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。每 3 天传代 1 次，取对数生长期细胞进行实验。

1.3 细菌感染

实验用嗜水气单胞菌 (AH10 菌株) 由张国亮等^[17]自草鱼体内分离，保存于武汉大学菌种保藏

中心 (保藏号: AB2014155)。感染实验前，将 CIK 细胞 (2×10^6 个/mL) 接种至 6 孔细胞板中，待细胞密度达到 80%~90% 时，用 PBS 缓冲液润洗细胞，更换无抗 M199 培养基 (含 10% 胎牛血清)，然后用 100 μ L 嗜水气单胞菌 (10^3 CFU/mL) 刺激细胞，30 min 后更换为含血清的加抗培养基。分别收集感染后 0、6、12、24 和 36 h 的细胞样品。

1.4 靶位点预测和质粒构建

运用 RNAhybrid 软件对 miR-462 的潜在靶基因进行预测。利用带限制性内切酶位点 *Dra* I 和 *Xba* I 的基因特异性引物，通过 PCR 扩增出候选靶基因的 3'UTR，包含预测的 miR-462 结合位点。用相同的限制酶酶切后克隆到 pmirGLO 荧光素酶报告基因载体中。所有结果均通过测序进行验证。

1.5 荧光素酶报告基因实验

将构建好的 pmirGLO-cx32.2、pmirGLO-slc9a3.1 和 pmirGLO-tbk1 荧光素酶报告质粒与 miR-462 agomir 或对照 NC 共转染到 CIK 细胞中，每组 3 个重复。转染 24 h 后，根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书收集细胞裂解产物，并测定萤火虫荧光素酶 (FL) 及海肾荧光素酶 (RL) 活性值，相对荧光素酶活性 (FL/RL) 可反映 miR-462 与靶基因 3'UTR 的结合能力。

1.6 细胞转染

取处于对数生长期的 CIK 细胞，将其接种至 24 孔细胞板中，待细胞汇合度达到 80%~90% 时，更换新鲜的细胞培养基，然后依据 Lipofectamine 3000 试剂说明书将合成的 miR-462 agomir/antagomir 或阴性对照 negative control (NC)/inhibitor N.C. 转染到细胞中，转染后 24 h 收取细胞样品。每组实验 3 个生物学重复。

1.7 实时定量 PCR

按照 RNAiso Plus 说明书提取细胞的总 RNA，琼脂糖凝胶电泳检验其质量，并用 Nanodrop 2000c 分光光度计进行定量。根据 miRNA 反转录试剂盒和 RNA 反转录试剂盒的说明书分别对 RNA 进行反转录获得 cDNA。miRNA 的 qPCR 反应条件：95 °C 15 min；94 °C 15 s，55 °C 30 s，70 °C 30 s，40 个循环。总 RNA 的 qPCR 反应条件：95 °C 30 s；95 °C 5 s，60 °C 30 s，40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析，以验证产物扩

增的特异性。每个样品 3 个平行,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算不同样品间的表达差异。相对 miRNA 的表达采用 miR-101a 作为内参^[18],相对 mRNA 的表达

采用 18S *rRNA* 作为内参。用于 qPCR 分析的引物见表 1。

表 1 实时定量 PCR 所用的引物序列

Tab. 1 Primers used for quantitative real-time PCR

引物名称 primer name	正向序列(5'→3') forward sequences (5'→3')	反向序列(5'→3') reverse sequences (5'→3')
miR-462	TAACGGAACCCATAATGCAGCT	
miR-101a	TACAGTACTGTGATAACTGAAG	
<i>cx32.2</i>	AGCCTGTGTGTCTCTGCTACTG	CCGCTCTCATACTGCTTGTTT
<i>slc9a3.1</i>	GTGGTGTATTCTACTGTCATTC	CCTGTTCCAACCTCTGGT
<i>tbk1</i>	AGACGATGCACAAGAAAGCG	TTTGCTCCATTGAGGCCAGA
<i>slc4a4a</i>	CAGACAAGCCAGAAAAAGACC	CCAAGCAGAATGAACAGAAATC
<i>tnfrsf5</i>	TGAGGGCTGTATTCGTTCTT	CGCATTGGTTTCTCTTGTT
<i>cxcl9</i>	AACTCTGTGTCTCAATCC	TTCTCTGCCTCCATCTGT
<i>cxcl11</i>	AAGAATGGTGCAGGATGG	GGATGTTGGTGCTGATGAC
18S <i>rRNA</i>	GGACACGGAAAGGATTGACAG	CGGAGTCTCGTTCGTTATCGG

1.8 统计分析

应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,采用单因素方差分析和 Duncan 氏多重比较法进行组间差异性检测,计量数据以平均值±标准差 (mean±SD) 表示。以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌感染对 miR-462 表达的影响

qPCR 结果显示,嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞后,miR-462 的表达水平呈现先升高后降低的趋势 ($P < 0.01$, 图 1)。感染后 6 h,miR-462 表达水平显著高于对照组 ($P < 0.01$),随后逐渐降低;感染后 12 h,miR-462 表达水平降低至与对照组无显著差异;感染后 24 和 36 h 的表达水平极显著低于对照组 ($P < 0.01$)。结果显示,在嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞后对 miR-462 产生了影响。

2.2 miR-462 靶基因的鉴定

结合课题组已有的 miRNA-mRNA 负表达关系和生物信息学软件 RNAhybrid,分析预测 miR-462 的靶基因。结果表明,miR-462 可与 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的 3'-UTR 靶向结合(图 2)。

qRT-PCR 结果显示,嗜水气单胞菌感染过程中,*cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的表达先降低后

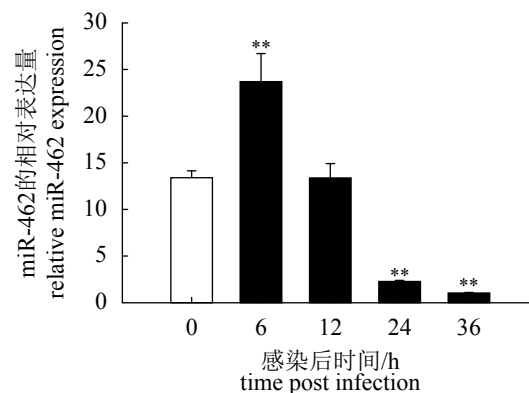


图 1 miR-462 在嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞中的表达
图中数据表示为平均值±标准差 ($n = 4$), “*”代表显著差异, $P < 0.05$; “**”代表极显著差异, $P < 0.01$, 下同

Fig. 1 Expression profiling of miR-462 in CIK cells upon *A. hydrophila* infection

Error bars indicate the mean and standard deviation ($n = 4$). “*” represents significant difference, $P < 0.05$; “**” represents very significant difference, $P < 0.01$, the same below

升高,与 miR-462 的表达模式呈现负相关(图 3)。

包含 miR-462 结合位点的 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 3'-UTR 序列被克隆至荧光素酶报告基因载体下游,构成 pmirGLO 报告质粒: pmirGLO-*cx32.2*、pmirGLO-*slc9a3.1* 和 pmirGLO-*tbk1*。转染 miR-462 agomir 组显著抑制了 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的荧光素酶活性,与对照组相比分别下

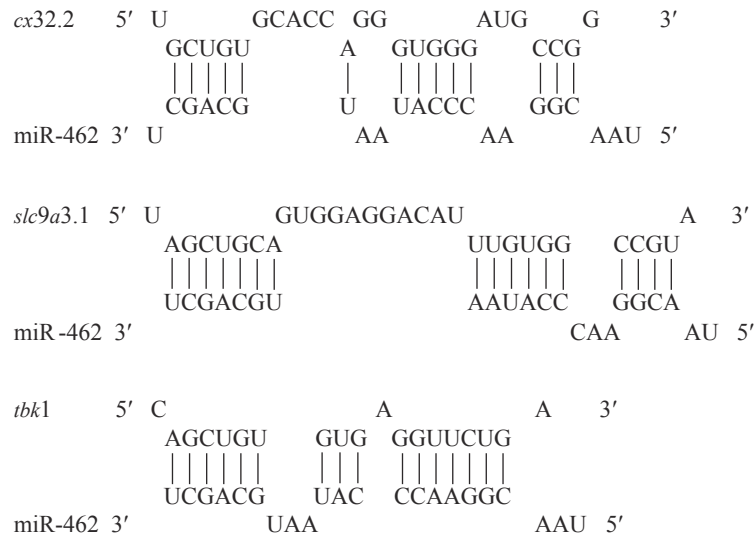


图2 miR-462 靶基因预测

miR-462 与 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的 3'-UTR 结合位点示意图

Fig. 2 Prediction of miR-462 target genes

Schematic diagram of the binding sites of miR-462 to 3'-UTR of *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1*

降约 40.14%、39.22% 和 17.35% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 4)。说明 miR-462 能靶向作用于 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的 3'-UTR 互补位点, 抑制其表达。

miR-462 过表达组的 miR-462 相对表达水平为 (7903.73 ± 1414.21) , 明显高于对照组 (1.10 ± 0.09) ($P < 0.01$, 图 5-a), 提示过表达试剂转染成功, 可特异性提高 CIK 细胞内 miR-462 的表达水平。以 18S *rRNA* 为内参, 检测靶基因 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的相对表达水平 (图 5-b), 与对照组相比, 转染 miR-462 agomir 组的 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的表达水平被抑制, 分别为 (0.64 ± 0.10) 、 (0.51 ± 0.15) 和 (0.54 ± 0.01) 。miR-462 抑制组的 miR-462 相对表达水平为 (0.48 ± 0.14) , 明显低于对照组 (0.97 ± 0.09) ($P < 0.01$, 图 5-c), 提示抑制试剂转染成功, 可特异性降低 CIK 细胞内 miR-462 表达水平。以 18S *rRNA* 为内参, 检测靶基因的相对表达水平 (图 5-d), 与对照组相比, 转染 miR-462 antagomir 组的 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的表达水平分别被诱导至 (4.28 ± 0.48) 、 (1.82 ± 0.28) 和 (1.28 ± 0.09) 。

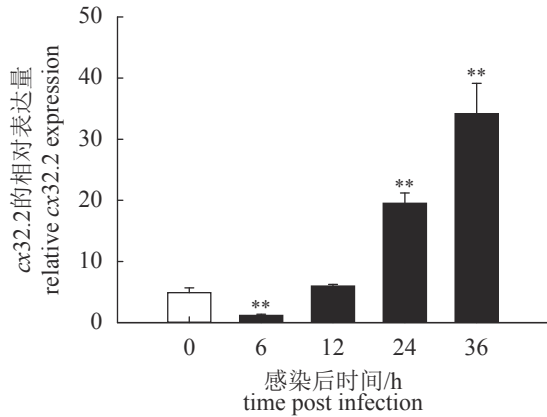
2.3 miR-462 对下游基因的调控作用

qPCR 结果显示, 过表达 miR-462 可以显著下调下游基因 *slc4a4a*、*tnfrsf5*、*cxcl9* 和 *cxcl11* 的表达 ($P < 0.01$, 图 6-a); 同样, 抑制 miR-462 的表达则会显著提高下游基因 *slc4a4a*、*tnfrsf5*、*cxcl9*

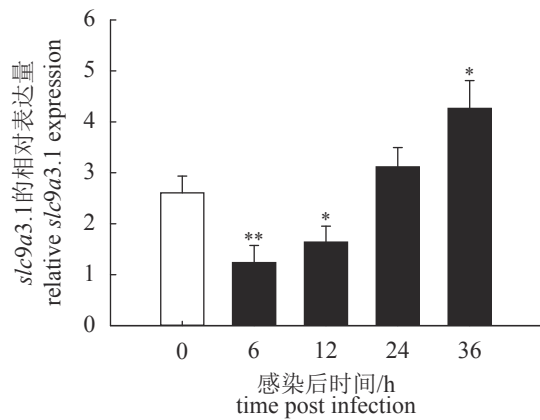
和 *cxcl11* 的表达 ($P < 0.05$, 图 6-b)。

3 讨论

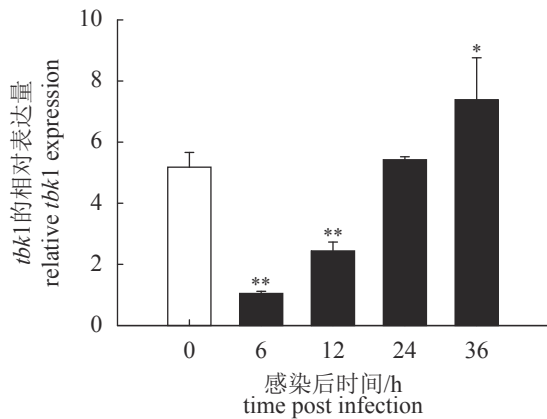
嗜水气单胞菌是条件致病菌, 在各种水体环境中广泛分布, 其对机体细胞的侵袭除与细菌表面黏附因子有关外, 还涉及到细胞表面受体、细胞骨架以及信号转导等机制^[19]。嗜水气单胞菌感染可引发水生动物的运动性气单胞菌败血症^[20], 给水产养殖业带来巨大的经济损失。促炎性细胞因子 (如 *il-1 β* 、*tnf- α*) 通过激活一系列细胞内信号转导机制, 推动炎症发展, 从而调控败血症的发生^[21]。因此, 对嗜水气单胞菌感染相关免疫基因及炎症调控的研究至关重要。miRNAs 控制着多种与内环境稳定、发育和疾病相关的生物过程以及细胞信号传导途径, 同时它们也是调节炎症和免疫反应的关键^[22-23]。不同物种间高度保守的 miRNAs 可能靶向数百种不同的 mRNAs^[24], 单个 miRNA 也可通过靶向多个 mRNAs 调控不同的功能。例如, miR-214 下调 *mkk3* 可以抑制宫颈癌细胞的恶性表型^[25], 靶向 *atf4* 和 *ezh2* 则可以保护红细胞免受氧化应激^[26]。此外, 毒死蜱暴露过程中, miR-2188-3p 和 miR-731 通过靶向 TLR 通路诱导鲤头肾细胞凋亡^[27]。金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染过程中, miR-128 通过调控 *MyD88* 抑制炎症反应的进



(a)



(b)



(c)

图3 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 基因在嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞中的表达

嗜水气单胞菌感染后 CIK 细胞中 *cx32.2* (a), *slc9a3.1* (b) 和 *tbk1* (c) 的表达情况

Fig. 3 Expression profiling of *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1* in CIK cells upon *A. hydrophila* infection

Expression profiles of *cx32.2* (a), *slc9a3.1* (b) and *tbk1* (c) in CIK cells following *A. hydrophila* infection. *n* = 3

一步发展^[28]。梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*) 通过上调 miR-101-3p 的表达, 抑制 *tlr2* 和炎症细胞

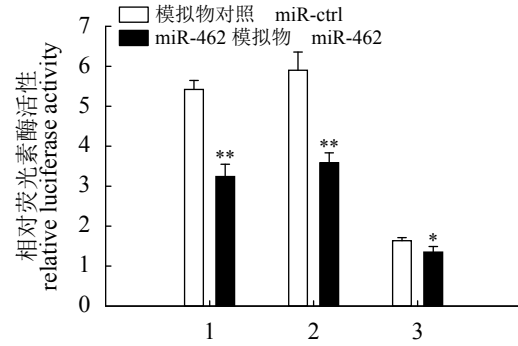


图4 miR-462 抑制 CIK 细胞中 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 的表达

1. *cx32.2*, 2. *slc9a3.1*, 3. *tbk1*; miR-462 agomir 和重组质粒转染 CIK 细胞后的双荧光素酶活性测定, 包括潜在的靶基因 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1*

Fig. 4 miR-462 suppressed *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1* expression in CIK cells

1. *cx32.2*, 2. *slc9a3.1*, 3. *tbk1*; Dual luciferase activity assay after miR-462 agomir and recombinant plasmid were transfected to CIK cells, including potential target genes *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1*

因子的产生^[29]。

早期研究报道显示, miR-462 参与干扰素介导的硬骨鱼抗病毒防御, 推测其在脊椎动物先天免疫中发挥重要作用^[30]。而目前关于 miR-462 参与鱼类抵抗细菌感染的作用和机制尚不明确。课题组前期研究表明, 嗜水气单胞菌感染草鱼后, miR-21^[31]、miR-23a-3p^[32] 和 miR-23a-5p^[32] 通过调控 *jnk*、*ccr7* 和 *CiGadd45ab*, 调节草鱼炎症反应和细胞凋亡。本研究着重于探究嗜水气单胞菌感染 CIK 细胞后, miR-462 如何参与免疫应答反应。CIK 细胞感染嗜水气单胞菌后, miR-462 的表达发生显著变化, 说明 miR-462 参与了免疫反应的调控。miR-462 在感染 CIK 细胞早期的 6 h 表达上调, 但在将分析延长到 36 h 后, miR-462 的表达显著下调。因此, 推测 miR-462 可能是调节嗜水气单胞菌感染早期事件的调节因子。类似的细菌调控 miRNA 的表达在其他鱼类中也有报道, 它们在受到细菌刺激后发生明显的表达模式变化^[12]。然而, miR-462 在嗜水气单胞菌感染过程中对免疫应答的潜在作用尚不清楚。

脊椎动物可依靠自身免疫系统, 通过有效的免疫应答, 如抵御细菌侵袭^[33]、调控炎症发生^[34]、抑制细胞炎症等^[35], 维护体内环境稳定, 抵御细菌感染^[36]。生物信息学软件 RNAhybrid 的预测结果提示 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 可能是

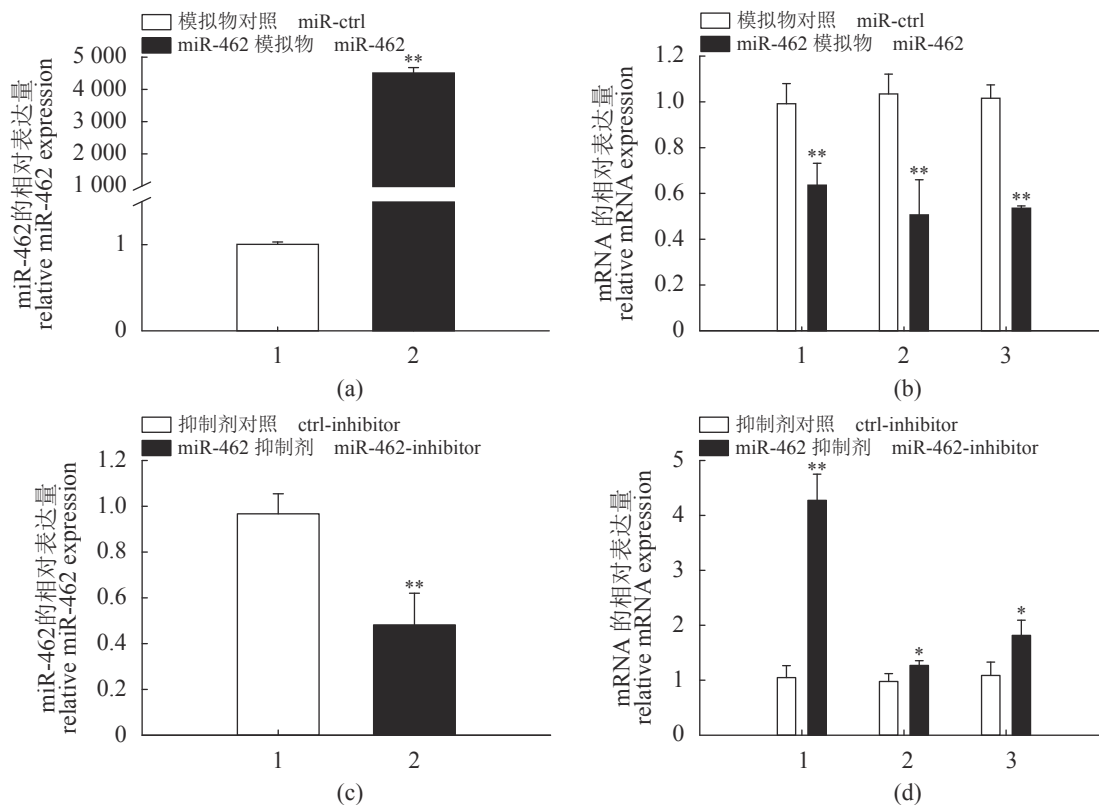


图 5 miR-462 靶向 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1*

miR-462 agomir 转染 CIK 细胞后, qRT-PCR 检测 miR-462 (a) 和靶基因 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* (b) 的表达; miR-462 antagomir 转染 CIK 细胞后, qRT-PCR 检测 miR-462 (c) 和靶基因 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* (d) 的表达; (a) 1. 模拟物对照, 2. miR-462 模拟物; (b) (d) 1. *cx32.2*, 2. *slc9a3.1*, 3. *tbk1*; (c) 1. 抑制剂对照, 2. miR-462 抑制剂

Fig. 5 miR-462 targets *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1*

Expression of miR-462 (a) and target genes *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1* (b) by qRT-PCR after miR-462 agomir was transfected to CIK cells. Expression of miR-462 (c) and target genes *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1* (d) by qRT-PCR after miR-462 antagomir was transfected to CIK cells. (a) 1. miR-Ctrl, 2. miR-462; (b) (d) 1. *cx32.2*, 2. *slc9a3.1*, 3. *tbk1*; (c) 1. ctrl-inhibitor, 2. miR-462-inhibitor

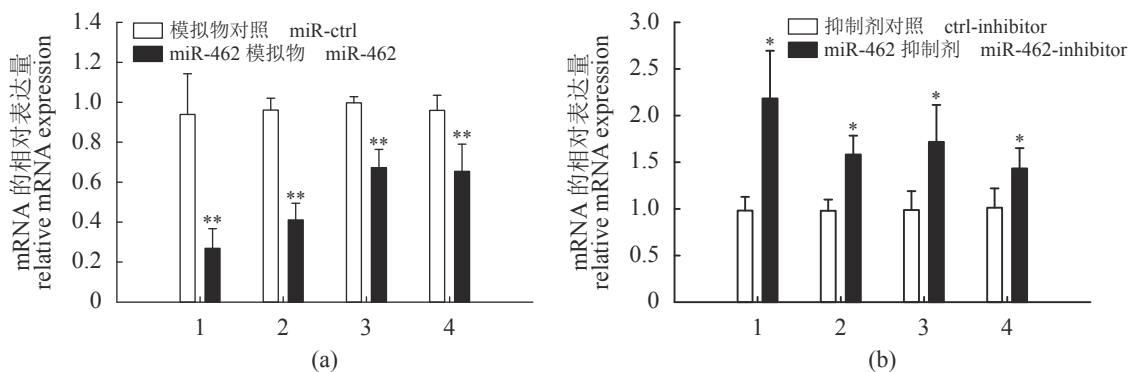


图 6 miR-462 对下游基因的调控作用

miR-462 agomir (a) 或 antagomir (b) 转染 CIK 细胞后, qRT-PCR 检测下游基因 *slc4a4a*、*tnfrsf5*、*cxc19* 和 *cxc111* 的表达; (a) (b) 1. *slc4a4a*, 2. *tnfrsf5*, 3. *cxc19*, 4. *cxc111*

Fig. 6 Regulatory effect of miR-462 on downstream genes

Expression of downstream genes *slc4a4a*, *tnfrsf5*, *cxc19* and *cxc111* by qRT-PCR after miR-462 agomir (a) or antagomir (b) was transfected to CIK cells. (a) (b) 1. *slc4a4a*, 2. *tnfrsf5*, 3. *cxc19*, 4. *cxc111*; n = 3

miR-462 的潜在靶基因。*cx32.2* 来自缝隙连接蛋白家族, 是鱼类所特有的一种蛋白^[37], 主要在肠道防控病原微生物的入侵^[33]。肠盐转运介质 *slc9a3* 也在人体肠道炎症的发生过程中发挥了重要作用^[34]。*tbk1* 属于 IκB 激酶家族, 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞增殖^[38]、凋亡^[39] 和自噬^[40] 等先天性免疫应答中发挥重要作用。CIK 细胞感染嗜水气单胞菌后, *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 与 miR-462 的表达模式呈现负相关。双荧光素酶报告基因系统说明 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 是 miR-462 的可能靶基因。miR-462 的过表达和抑制实验进一步证实了 *cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 是 miR-462 的靶基因, 受到其负调控。此外, 转染 miR-462 后, *slc9a3.1* 和 *tbk1* 的下游基因 *slc4a4a*、*tnfrsf5*、*cxcl9* 和 *cxcl11* 表达量也受到抑制, 说明 miR-462 可通过靶向 *slc9a3.1* 和 *tbk1* 影响下游基因的功能。miR-462 靶向 *slc9a3.1* 影响与之协同作用的 *slc4a4*^[41], 共同调控肠道炎症的发生。*tnfrsf5* 主要参与细胞和体液适应性免疫的启动和发展过程, 包括 T 细胞依赖性免疫球蛋白类别转换等^[42], *cxcl9* 和 *cxcl11* 激活趋化因子受体 CXCR3 可调控 T 细胞向炎症部位的迁移^[43], 因而 miR-462 通过调控下游基因 *cxcl9* 和 *cxcl11* 的表达, 可能进一步影响 T 细胞的适应性免疫。

实验结果表明, 嗜水气单胞菌感染显著影响 miR-462 的表达, miR-462 参与调控草鱼 CIK 细胞中的免疫应答。*cx32.2*、*slc9a3.1* 和 *tbk1* 被鉴定为 miR-462 的靶基因。此外, miR-462 可通过靶向 *slc9a3.1* 和 *tbk1* 影响下游基因的功能。结果表明, miR-462 在鱼类免疫反应调控中起着重要作用。

参考文献 (References):

- [1] FAO. Fishery and aquaculture statistics 2017[M]. Rome: FAO, 2019.
- [2] Song X H, Zhao J, Bo Y X, *et al.* *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): an experimental model[J]. *Aquaculture*, 2014, 434: 171-178.
- [3] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. *水产学报*, 1992, 16(3): 282-288.
Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(3): 282-288(in Chinese).
- [4] Xu X Y, Shen Y B, Fu J 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.
- [5] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [6] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [7] Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation[J]. *Essays in Biochemistry*, 2013, 54: 29-38.
- [8] Farrell B C, Power E M, Mc Dermott K W. Developmentally regulated expression of Sox9 and microRNAs 124, 128 and 23 in neuroepithelial stem cells in the developing spinal cord[J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2011, 29(1): 31-36.
- [9] Nelson L D, Suyama E, Kawasaki H, *et al.* Use of random ribozyme libraries for the rapid screening of apoptosis- and metastasis-related genes[J]. *TARGETS*, 2003, 2(5): 191-200.
- [10] Ma F, Zhang L, Ma L, *et al.* MiR-361-5p inhibits glycolytic metabolism, proliferation and invasion of breast cancer by targeting FGFR1 and MMP-1[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2017, 36: 158.
- [11] Ye Y M, Perez-Polo J R, Qian J Q, *et al.* The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Physiological Genomics*, 2011, 43(10): 534-542.
- [12] Guan X L, Zhang B C, Sun L. Japanese flounder pol-miR-3p-2 suppresses *Edwardsiella tarda* infection by regulation of autophagy via p53[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2020, 103: 103531.
- [13] Cui J X, Chu Q, Xu T J. miR-122 involved in the regulation of toll-like receptor signaling pathway after *Vibrio anguillarum* infection by targeting TLR14 in miuiy croaker[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 67-72.
- [14] Guan X L, Zhang B C, Sun L. pol-miR-194a of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) suppresses type I interferon response and facilitates *Edwardsiella tarda* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87:

- 220-225.
- [15] Huang C X, Chen N, Wu X J, *et al.* The zebrafish miR-462/miR-731 cluster is induced under hypoxic stress via hypoxia-inducible factor 1 α and functions in cellular adaptations[J]. *The FASEB Journal*, 2015, 29(12): 4901-4913.
- [16] Eslamloo K, Inkpen S M, Rise M L, *et al.* Discovery of microRNAs associated with the antiviral immune response of Atlantic cod macrophages[J]. *Molecular Immunology*, 2018, 93: 152-161.
- [17] 张国亮, 王浩, 张也, 等. 嗜水气单胞菌AH10 (CCTCC AB2014155)的全基因组测序及比较分析[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 995-1005.
Zhang G L, Wang H, Zhang Y, *et al.* Whole-genome sequencing and comparative analysis of *Aeromonas hydrophila* AH10 (CCTCC AB2014155)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 995-1005(in Chinese).
- [18] 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(2): 374-382.
- [19] Rosenshine I, Finlay B B. Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria[J]. *Bioessays*, 1993, 15(1): 17-24.
- [20] Nielsen M E, Hoi L, Schmidt A S, *et al.* Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China?[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 46(1): 23-29.
- [21] Chen H J, Yuan G L, Su J G, *et al.* Hematological and immune genes responses in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) with septicemia induced by *Edwardsiella ictaluri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 97: 531-539.
- [22] Hua Y L, Zhang J, Jia Z H, *et al.* Immune-related genes response to stimulation of miR-155 overexpression in CIK (*Ctenopharyngodon idella* kidney) cells and zebrafish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 142-148.
- [23] Yao Y L, Xu K L, Sun Y X, *et al.* MiR-215-5p inhibits the inflammation injury in septic H9c2 by regulating ILF3 and LRRFIP1[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 78: 106000.
- [24] Baek D, Villén J, Shin C, *et al.* The impact of microRNAs on protein output[J]. *Nature*, 2008, 455(7209): 64-71.
- [25] Peng R Q, Cheng X S, Zhang Y, *et al.* miR-214 down-regulates MKK3 and suppresses malignant phenotypes of cervical cancer cells[J]. *Gene*, 2020, 724: 144146.
- [26] Gao M, Liu Y, Chen Y, *et al.* miR-214 protects erythroid cells against oxidative stress by targeting ATF4 and EZH2[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 92: 39-49.
- [27] Liu Q, Yang J, Gong Y F, *et al.* Role of miR-731 and miR-2188-3p in mediating chlorpyrifos induced head kidney injury in common carp via targeting TLR and apoptosis pathways[J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 215: 105286.
- [28] Ma X F, Guo S, Jiang K F, *et al.* MiR-128 mediates negative regulation in *Staphylococcus aureus* induced inflammation by targeting MyD88[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 70: 135-146.
- [29] Huang T, Yang J Y, Zhang J, *et al.* MiR-101-3p down-regulates TLR2 expression, leading to reduction in cytokines production by T. pallidum-stimulated macrophages[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2020.
- [30] Bela-ong D B, Schyth B D, Zou J, *et al.* Involvement of two microRNAs in the early immune response to DNA-vaccination against a fish rhabdovirus[J]. *Vaccine*, 2015, 33(28): 3215-3222.
- [31] Tao L Z, Xu X Y, Fang Y, *et al.* miR-21 targets *jnk* and *ccr7* to modulate the inflammatory response of grass carp following bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 94: 258-263.
- [32] Fang Y, Xu X Y, Shen Y B, *et al.* miR-23a-3p and miR-23a-5p target *CiGadd45ab* to modulate inflammatory response and apoptosis in grass carp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 34-44.
- [33] Pérez-Sánchez J, Benedito-Palos L, Estensoro I, *et al.* Effects of dietary NEXT ENHANCE®150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 117-128.
- [34] Lohi H, Mäkelä K, Pulkkinen K, *et al.* Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis[J]. *American Journal of Physiology-中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries*

- Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2002, 283(3): G567-G575.
- [35] Xu D C, Jin T J, Zhu H, *et al.* TBK1 suppresses RIPK1-driven apoptosis and inflammation during development and in aging[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1477-1491.e19.
- [36] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801.
- [37] Cruciani V, Mikalsen S O. The vertebrate connexin family[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2006, 63(10): 1125-1140.
- [38] Sarraf S A, Sideris D P, Giagtzoglou N, *et al.* PINK1/Parkin influences cell cycle by sequestering TBK1 at damaged mitochondria, inhibiting mitosis[J]. *Cell Reports*, 2019, 29(1): 225-235.e5.
- [39] Yu H Y, Cleveland D W. Tuning apoptosis and neuroinflammation: TBK1 Restrains RIPK1[J]. *Cell*, 2018, 174(6): 1339-1341.
- [40] Kumar S, Gu Y X, Abudu Y P, *et al.* Phosphorylation of syntaxin 17 by TBK1 controls autophagy initiation[J]. *Developmental Cell*, 2019, 49(1): 130-144.e6.
- [41] 郭义敏, 刘颖, 陈历明. 近端肾小管碳酸氢根重吸收的分子机制及代谢性酸中毒[J]. *生理学报*, 2014, 66(4): 398-414.
- Guo Y M, Liu Y, Chen L M. Bicarbonate reabsorption in proximal renal tubule: molecular mechanisms and metabolic acidosis[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2014, 66(4): 398-414(in Chinese).
- [42] Yao X Y, Wu J, Lin M, *et al.* Increased CD40 expression enhances early STING-Mediated type I interferon response and host survival in a rodent malaria model[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(10): e1005930.
- [43] Namkoong H, Song M Y, Seo Y B, *et al.* Enhancement of antigen-specific CD8 T cell responses by co-delivery of Fc-fused CXCL11[J]. *Vaccine*, 2014, 32(10): 1205-1212.

miR-462 modulates cellular immune response by targeting *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1* in CIK cells infected with *Aeromonas hydrophila*

WANG Anqi¹, TAO Lizhu¹, ZHOU Fenglin¹, XU Xiaoyan¹, SHEN Yubang², LI Jiale^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Bacterial septicemia is a systemic inflammatory reaction mainly caused by the infection of *Aeromonas hydrophila*. Excessive development of inflammation may lead to septic shock or death in fish. A large number of studies have confirmed that miRNA is involved in the regulation of immune response after bacterial infection. To explore the regulatory mechanism of miR-462 in *Ctenopharyngodon idella* kidney (CIK) cells infected with *A. hydrophila*, the expression profiles of miR-462 upon *A. hydrophila* infection was detected by real-time quantitative PCR; the target genes of miR-462 were predicted by RNAhybrid software, and identified by dual-luciferase reporter assay system; in addition, the regulatory effect of miR-462 on downstream genes was analyzed. The results showed that the expression of miR-462 changed significantly after *A. hydrophila* infection, indicating that miR-462 participated in the regulation of immune response. Dual-luciferase reporter assay revealed that *cx32.2*, *slc9a3.1* and *tbk1* are the target genes of miR-462, which is further confirmed by the overexpression and inhibition experiments of miR-462. The expression of *slc4a4a*, *tnfrs5*, *cxcl9* and *cxcl11* were suppressed after miR-462 antagonist was transfected, which proved that miR-462 could affect the function of the downstream genes by targeting *slc9a3.1* and *tbk1*. Our results may provide a theoretical basis for investigating the molecular mechanism of miR-462 regulating immune response in *C. idella*.

Key words: *Ctenopharyngodon idella* kidney(CIK); *Aeromonas hydrophila*; miR-462; immunomodulation

Corresponding author: LI jiale. E-mail: jlli2009@126.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-45-03); Shanghai Engineering and Technology Center for Promoting Ability (19DZ2284300)