

翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*) miR-133a-5p 的时空表达特征及饥饿对其节律性表达的影响

谢 敏^{1,2}, 丁 颖¹, 茹 惠¹, 秦家鑫¹, 何雅芝¹, 义巧如¹, 廖 欣¹, 褚武英¹,
朱 鑫^{1*}

(1. 长沙学院 生物与化学工程学院 水产动物营养与品质调控湖南省重点实验室, 中国湖南 长沙 410022; 2. 湖南省水产科学研究所, 中国湖南 长沙 410022)

摘 要: 为了解翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*) miR-133a-5p 的时空表达规律以及短期饥饿对其昼夜节律性表达的影响, 本研究利用实时荧光定量 PCR 检测了 miR-133a-5p 在翘嘴鲌不同组织、不同胚胎发育阶段的表达谱, 以及短期饥饿后 miR-133a-5p 昼夜节律的表达特征。结果显示, miR-133a-5p 在红肌中表达最高, 在白肌和心肌组织中表达较高, 在其他组织中的表达较低; miR-133a-5p 在胚胎发育的 2 细胞期就有较高表达, 随着胚胎的发育其表达量逐渐降低, 从囊胚晚期开始直至出膜期, 其表达均维持在一个较低的水平, 且各阶段的表达无显著性差异; miR-133a-5p 在正常投喂的翘嘴鲌白肌中的表达没有明显的昼夜节律性, 而在饥饿 5 d 后其表达呈现昼高夜低的节律性。本研究结果表明, miR-133a-5p 在翘嘴鲌肌源性组织中高表达, 推测其在肌肉组织中有重要作用; miR-133a-5p 呈母源性高表达, 推测其调控的靶基因可能抑制胚胎早期的发育; miR-133a-5p 在饥饿 5 d 后呈节律性表达, 提示其可能通过调节生物节律参与饥饿胁迫下的适应性调控。

关键词: miR-133a-5p; 翘嘴鲌; 表达特征; 短期饥饿; 昼夜节律

中图分类号: Q752, S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)04-0283-07

Spatio-temporal Expression Characteristics of miR-133a-5p and Effect of Fasting on Its Rhythmic Expression in *Siniperca chuatsi*

XIE Min^{1,2}, DING Ying¹, RU Hui¹, QIN Jiabin¹, HE Yazhi¹, YI Qiaoru¹,
LIAO Xin¹, CHU Wuying¹, ZHU Xin^{1*}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Nutrition and Quality Control of Aquatic Animals, Department of Biological and Chemical Engineering, Changsha University, Changsha 410022, Hunan, China; 2. Hunan Fisheries Science Institute, Changsha 410022, Hunan, China)

Abstract: To understand the spatio-temporal expression pattern of miR-133a-5p and the effect of short-term fasting on circadian rhythm of its expression in *Siniperca chuatsi*, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the miR-133a-5p expression in different tissues and embryonic developmental stages and its circadian rhythm after short-term fasting. The results showed that the expression of miR-133a-5p was highest in slow-twitch muscles, higher in fast-twitch muscles and myocardium, but lower in other tissues. The expression level of miR-133a-5p was high at the two-cell stage during embryonic development, and gradually decreased with the development of the embryo. It maintained at a low level from the late blastula stage to the hatching larvae with no significant difference between each stage. The expression of miR-133a-5p showed no obvious circadian rhythm in fast-twitch muscles of normally fed *S. chuatsi*, but a

收稿日期: 2022-06-24; 修回日期: 2022-11-16; 网络首发日期: 2023-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32002370, U21A20263); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ40629); 湖南省教育厅创新平台开放基金项目(20K014)

作者简介: 谢敏(1990—), 男, 湖南张家界人, 硕士, 助理研究员; 谢敏和丁颖对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; *通信作者: 朱鑫(1989—), 男, 湖南长沙人, 博士, 副教授, 主要从事水产动物营养及品质调控研究, E-mail: xinzhu1219@163.com。

circadian rhythm appeared after 5 days of fasting, with high expression during the day and low at night. Taken together, miR-133a-5p was specifically highly expressed in muscle related tissues, suggesting that it may play an important role in the muscular tissue. Its high expression during embryonic development revealed that the target genes regulated by miR-133a-5p may inhibit early embryonic development of *S. chuatsi*. The rhythmic expression of miR-133a-5p after fasting indicated that miR-133a-5p may be involved in the adaptive regulation of *S. chuatsi* muscles in response to fasting stress by regulating biological rhythm.

Key words: miR-133a-5p; *Siniperca chuatsi*; expression pattern; short-term fasting; circadian rhythm

(*Life Science Research*, 2023, 27(4): 283–289)

翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)是真鲈科鲌属鱼类, 又称桂鱼、季花鱼等, 属于淡水名贵经济鱼类。翘嘴鲌肉质细嫩且易消化, 具有高优质蛋白质、低脂肪等特点, 因此有较高的经济价值^[1]。肌肉组织既是鱼类的主要结构组织, 也是人类食用的主要部位, 同时其功能正常对机体能量代谢平衡和健康具有重要意义^[2]。目前, 翘嘴鲌肌肉生长和生理特性的分子调控机制尚未完全阐明, 有待进一步的研究来揭示。

微 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内生的、长度为 20~24 个核苷酸的非编码小 RNA。近年来的研究显示, miRNA 可调节脂质和糖等物质的代谢^[3-4], 对体内代谢平衡有至关重要的作用, 但其作用机制和调控方式, 尤其在经济鱼类中, 还有待深入研究。miRNA 的调控是一个复杂的网络调控过程, 一个 miRNA 可以调控多个靶基因的表达, 或者几个 miRNA 通过组合来精细地调控某个基因的表达^[5-6]。在动物体内, miRNA 与靶基因 mRNA 3' 非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)不完全碱基配对, 抑制靶基因 mRNA 翻译或者促进靶基因 mRNA 降解。研究显示, 一系列与肌肉增殖、生长分化相关的 miRNA 在肌肉组织中呈现高水平表达, 被称为肌肉特异性 miRNA, 其中 miR-133 是对肌肉组织中的基因表达影响最大的肌肉特异性 miRNA 之一^[7-8]。miR-133 家族有 miR-133a 和 miR-133b 两个成员, 其中 miR-133a 在肌肉组织中有较高表达, 其在肌细胞分化过程中被诱导, 能指导成肌细胞分化为成熟的肌管^[9-10]。目前, 关于 miR-133a 在经济鱼类中的表达特征以及功能的研究较少。

昼夜节律是生物体各种生理机能适应外界环境昼夜变化而建立起的规律周期, 又称近日节律, 是机体行为、生理和生化呈近似 24 h 周期性的变化规律。昼夜节律与生理周期的脑波活动、激素生产、细胞再生及其他生理活性模式相关联, 在所有动物确定睡眠和进食模式中起重要作用^[11]。节律

性振荡不仅存在于生物节律中枢, 也存在于外周器官、组织及细胞, 其产生依赖于节律基因转录、转录后及翻译后水平调控。miRNA 作为基因表达的调控因子, 能够直接靶向节律基因或其他基因, 从而调控外周生物节律^[12]。相关研究报道, 在翘嘴鲌红肌及白肌组织中有 21 个 miRNA 具有显著的昼夜节律性^[13], 表明 miRNA 可能参与调控翘嘴鲌红肌和白肌生理功能的节律性。

外界环境因子(包括营养限制)会影响生物体昼夜节律的表达, 能使节律重新设置^[14]。由于季节更替或环境剧变以及食物分布在空间上的不均匀等因素, 鱼类经常会在生活周期的一定阶段面临食物资源缺乏, 从而受到饥饿胁迫^[14]。受到饥饿胁迫的鱼类可通过调动体内不同器官的储能物质, 调节自身的能量分配, 降低代谢水平, 以适应食物的缺乏^[15-16]。在人工饲养条件下, 由于饵料分配不均或者个体之间争夺, 部分翘嘴鲌也很可能会受到饥饿胁迫。前期研究显示, 在饥饿复投喂处理的翘嘴鲌中, 一些 miRNA 对营养变化能快速应答^[17], 说明 miRNA 参与翘嘴鲌饥饿胁迫下的适应性调控, 但其具体的功能及机制尚不明确。本研究聚焦 miR-133a-5p 在翘嘴鲌的时空表达谱及饥饿胁迫下的节律表达特征, 以期揭示 miR-133a-5p 的功能及饥饿胁迫下的适应性调控机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

翘嘴鲌人工繁殖实验亲鱼来自于湖南水产科学研究所鲌鱼原种场, 用于组织表达谱研究以及饥饿实验的翘嘴鲌购自湖南省长沙市望城区团山湖村绿康之星鲌鱼养殖场。

1.2 实验方法

1.2.1 翘嘴鲌不同发育阶段胚胎的收集

翘嘴鲌的人工繁殖与胚胎孵化培养等操作技

术参考刘希良等^[18]的研究方法。待胚胎发育至 2 细胞期(2-cell, 1 h)、32 细胞期(32-cell, 2.5 h)、囊胚早期(early-blastula, 5 h)、囊胚晚期(late-blastula, 7 h)、原肠早期(early-gastrula, 12 h)、原肠晚期(late-gastrula, 17 h)、神经胚期(neurula, 18 h)、视泡期(optic vesicle, 20 h)、尾芽期(tail bud, 23 h)、肌效期(muscular effect, 38 h)、心搏期(heart beating, 41 h)和出膜期(hatching larvae, 58 h), 分别取 30 枚胚胎保存于装有 1 mL Trizol 试剂的离心管中, 然后立即置于-80 ℃超低温冰箱内备用。

1.2.2 翘嘴鲌短期饥饿处理及组织样品的收集

挑选健康无病、体重相近的翘嘴鲌(145 g±12 g) 114 尾, 所有翘嘴鲌先采用 12 h 光照、12 h 黑暗的 LD (light-dark)光制进行 30 d 的驯养试验。随机挑选 6 尾翘嘴鲌用于组织表达谱研究, 在冰上分别取其心(heart)、肝(liver)、脾(spleen)、肠(gut)、肾(kidney)、近尾部侧线处红肌(slow-twitch muscle)以及背部(dorsal)、腹部(ventral)和尾部(tail)白肌(fast-twitch muscle)组织, 置于液氮快速冷冻后保存于-80 ℃超低温冰箱备用。将剩余的翘嘴鲌随机分为正常投喂组和饥饿组, 每组 54 尾, 饥饿组经饥饿处理 5 d。正常投喂组和饥饿组的采样时间均设置在一昼夜的 9 个时间点, 即 06: 00、09: 00、12: 00、15: 00、18: 00、21: 00、24: 00、次日的 03: 00 和 06: 00, 它们分别对应区时(zone time, ZT) ZT0、ZT3、ZT6、ZT9、ZT12、ZT15、ZT18、ZT21 和 ZT24。每个采样时间点随机选 6 尾鱼, 取背部白肌, 用液氮快速冷冻, 随后保存于-80 ℃超低温冰箱内备用。

1.2.3 RNA 提取及 cDNA 合成

胚胎样品和组织样品的总 RNA 使用 Trizol 法提取[RNAiso Plus, 宝日医生物技术(北京)有限公司], 用核酸检测仪与琼脂糖凝胶电泳测定其浓度和纯度。cDNA 合成使用 One Step PrimeScript® miRNA cDNA Synthesis Kit [宝日医生物技术(北京)有限公司]。多腺苷酸[polyadenylic acid, poly (A)]加尾反应与 cDNA 合成反应同步进行, 反应程序为 37 ℃、60 min [poly(A)加尾和反转录反应]; 85 ℃、5 s (酶的失活反应)。

1.2.4 引物设计与合成

根据本实验室前期鉴定的翘嘴鲌 miRNA 数据库^[19], 设计 miR-133a-5p 荧光定量 PCR 引物, 以 *RPL13* 基因作为荧光定量的内参基因^[19-20]。引物通过 Primer 5.0 软件设计, 具体序列见表 1, 设计后由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2.5 荧光定量 PCR

在荧光定量 PCR 仪上进行反应, 反应总体积为 12.5 μL, 包括 SYBR Premix Ex Taq™ II 6 μL、逆转录得到的 cDNA 1 μL、灭菌纯水 4.5 μL、上游引物和下游引物各 0.5 μL。反应程序: 95 ℃预变性 3 min, 95 ℃变性 5 s, 60 ℃退火和延伸 20 s, 39 个循环。每组反应设 3 个技术重复。

1.2.6 数据处理

荧光定量 PCR 数据利用 2^{-ΔΔC_t} 法计算目的基因的相对表达量^[21]。各组相对表达量数据用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析, 数据结果表示为平均值±标准误($\bar{x} \pm s^x$), 当 $P < 0.05$ 时两组数据之间存在显著差异^[22]。

miR-133a-5p 在翘嘴鲌白肌的昼夜节律性表达数据经显著性分析后, 采用 MATLAB 软件进行余弦曲线拟合, 方程式为 $f(t) = M + A \cos(t\pi/12 - \varphi)$ 。式中, $f(t)$ 表示给定时间内基因的表达水平; t 表示以小时为单位的给定时间; M 表示各时间点基因表达的平均值; A 代表振荡振幅; φ 表示峰值相位, 是最高振幅所在时间点所换算出的角度。当显著性差异 $P < 0.05$, MATLAB 输出 $P < 0.3$ 时, 该基因具有昼夜节律性^[23]。

2 结果与分析

2.1 miR-133a-5p 在翘嘴鲌不同组织的表达分析

为了解 miR-133a-5p 在翘嘴鲌不同组织的表达分布情况, 利用荧光定量 PCR 检测了 miR-133a-5p 在心、肝和白肌等 7 个组织的相对表达水平。如图 1 所示, miR-133a-5p 在红肌的表达量最高, 在心脏和白肌的表达次之, 其中在背部、腹部和尾部白肌之间的表达无显著性差异, 而且在肝、脾、肾和肠都只检测到少量的表达, 这表明

表 1 荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 The primers for real-time fluorescence quantitative PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature/℃	Amplification efficiency/(%)
miR-133a-5p-F	CGAGCTGGTAAAATGGAACC	58	97.4
RPL13-RT-F1	CACAAGAAGGAGAAGGCTCGGCT	58	98.6
RPL13-RT-R1	TTTGCTCTCTTGGCACGGAT		

miR-133a-5p 主要在肌源性组织中高表达。

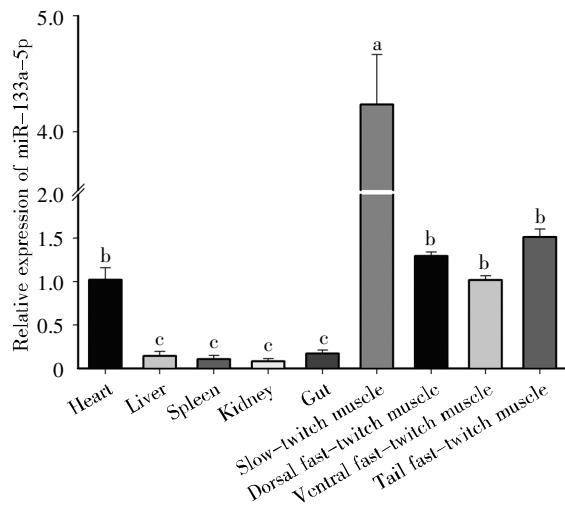


图1 miR-133a-5p 在翘嘴鲌不同组织中的相对表达水平
图中不同字母代表不同组织中的表达水平存在显著性差异($P<0.05$)。

Fig.1 Relative expression levels of miR-133a-5p in different tissues of *S. chuatsi*

Different letters in the figure represent significant differences ($P<0.05$) in different tissues.

2.2 miR-133a-5p 在翘嘴鲌胚胎不同发育阶段的表达分析

为了解 miR-133a-5p 在翘嘴鲌不同胚胎发育阶段的表达情况, 利用荧光定量 PCR 检测了 miR-133a-5p 在 2 细胞期(受精 1 h)、32 细胞期(2.5 h)、囊胚早期(5 h)、囊胚晚期(7 h)、原肠早期(12 h)、原肠晚期(17 h)、神经胚期(18 h)、视泡期(20 h)、尾芽期(23 h)、肌效期(38 h)、心搏期(41 h)和出膜期(58 h)的相对表达水平。如图 2 所示, miR-133a-5p 在翘嘴鲌胚胎的 2 细胞期就有表达, 且此时的表达量最高, 说明 miR-133a-5p 的表达具有母源性; 随后, 32 细胞期至囊胚早期的表达量显著降低; 而且, 随着胚胎的发育, miR-133a-5p 的表达量进一步降低, 从囊胚晚期至出膜期其表达均维持在一个较低的水平, 且各发育阶段的表达无明显差异。

2.3 饥饿 5 d 后 miR-133a-5p 的昼夜节律性表达分析

为确定 miR-133a-5p 在正常投喂和短期饥饿状态下的表达是否具有节律性, 本研究利用荧光定量 PCR 分别检测了正常投喂和饥饿 5 d 的翘嘴鲌在一昼夜 9 个时间点的 miR-133a-5p 相对表达水平。如图 3 所示, miR-133a-5p 的表达在正常投喂翘嘴鲌白肌中无明显节律性($P=0.51$), 振

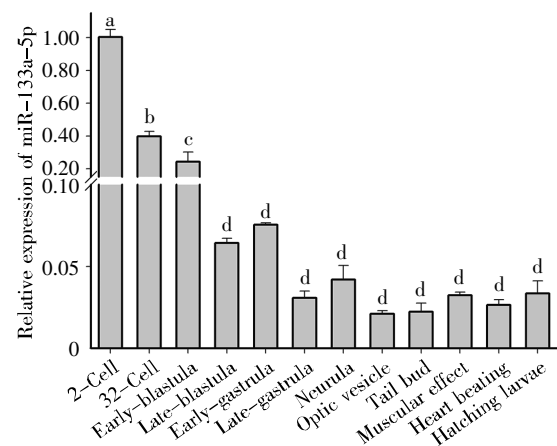


图2 miR-133a-5p 在翘嘴鲌胚胎不同发育阶段的相对表达水平

图中不同字母代表不同发育阶段的表达水平存在显著性差异($P<0.05$)。

Fig.2 Relative expression levels of miR-133a-5p in different embryonic stages of *S. chuatsi*

Different letters in the figure represent significant differences ($P<0.05$) in different developmental stages.

幅是 0.39, 表达的平均值为 1.56, 峰值相位对应的时间点为 ZT0.81。饥饿 5 d 后, 白肌中 miR-133a-5p 的表达具有显著的昼夜时间差异性(图4), 即 miR-133a-5p 的表达呈现昼夜节律性($P=0.01$), 为昼高夜低的节律性振荡, 振幅为 0.51, 达到峰值相位的时间点为 ZT8.97。相比于正常投喂组, 饥饿导致 miR-133a-5p 的表达峰值出现时间推迟约 8 h。以上结果说明, 在正常情况下, miR-133a-5p 不呈现节律性表达, 但是饥饿后外周生物钟可能通过调控 miR-133a-5p 的节律性表达调节翘嘴鲌肌肉在逆境下的适应性生理功能。

3 讨论

一些 miRNA 具有组织特异性, 例如 miR-1、miR-133 家族、miR-206 和 miR-208a/b 等仅在骨骼肌和心肌中呈现高水平表达, 又被称为肌肉特异性 miRNA^[9, 24-25], 它们的表达与肌肉相关组织的生长、发育密切相关。习欠云等^[26]的研究结果表明, miR-133 在不同品种猪的肌肉组织中存在特异性表达, 这些特征在某种程度上与骨骼肌发育紧密相关。吴秋雪等^[27]对散养和笼养肉仔鸡各部位肌肉组织中的 miR-133 进行了表达量分析, 结果显示散养鸡翅肌和腿肌中 miR-133 的表达量比笼养鸡要低, 而笼养鸡心肌和胸肌的 miR-133 表达量比散养鸡要低。以上信息说明 miR-133 可根据环境的变化调节不同部位肌肉组织的生长、

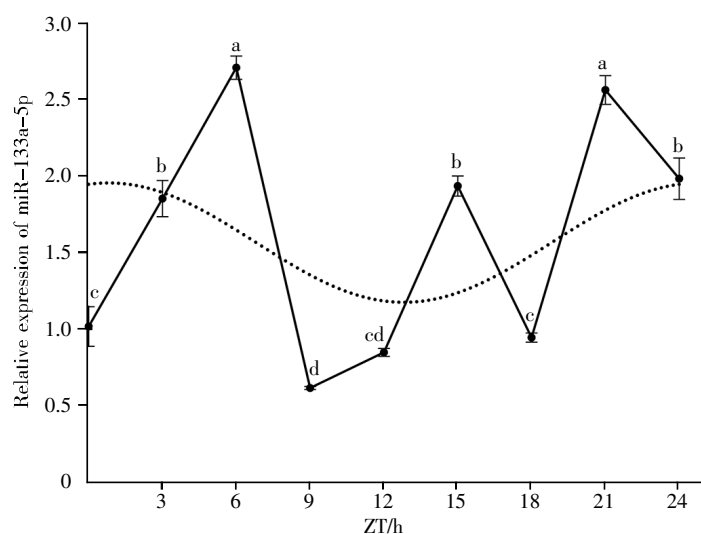


图3 miR-133a-5p 在正常投喂翘嘴鲌白肌中 24 h 内的表达水平

ZT: 区时; 黑色虚线为余弦拟合曲线; 横轴中 ZT0~ZT12 为光照阶段, ZT12~ZT24 为黑暗阶段; 图中不同字母表示不同时间点的表达水平有显著差异性 ($P<0.05$)。

Fig.3 Expression levels of miR-133a-5p in fast-twitch muscles of normally fed *S. chuatsi* within 24 h

ZT: Zone time. The black dotted line is a fitted cosine curve. On the horizontal axis, ZT0~ZT12 are the light period, and ZT12~ZT24 are the dark period. Different letters in the figure indicate significant differences ($P<0.05$) at different time points.

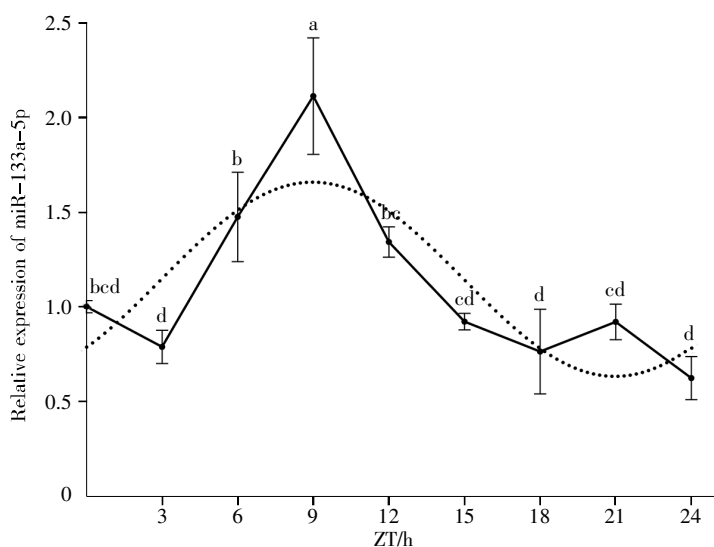


图4 miR-133a-5p 在饥饿 5 d 后的翘嘴鲌白肌中 24 h 内的表达水平

ZT: 区时; 黑色虚线为余弦拟合曲线; 横轴中 ZT0~ZT12 为光照阶段, ZT12~ZT24 为黑暗阶段; 图中不同字母表示不同时间点的表达水平有显著差异性 ($P<0.05$)。

Fig.4 Expression levels of miR-133a-5p in *S. chuatsi* fast-twitch muscles within 24 h after 5 days of fasting

ZT: Zone time. The black dotted line is a fitted cosine curve. On the horizontal axis, ZT0~ZT12 are the light period, and ZT12~ZT24 are the dark period. Different letters in the figure indicate significant differences ($P<0.05$) at different time points.

发育, 使该物种更好地适应所处环境。张伟等^[28]对巴什拜羊的 miR-133 做了表达分析, 结果显示 miR-133 在骨骼肌以及心肌组织中呈现高水平表达, 当 miR-133 水平上调时, 骨骼肌卫星细胞的增殖受到抑制, 细胞逐渐向分化状态转变。还有研究表明, miR-133a 可能与平滑肌向骨样细胞转化以及间充质干细胞分化为成肌细胞有关^[29-30]。本

研究对 miR-133a-5p 在翘嘴鲌的心、肝、脾、肠、肾、红肌和白肌组织中的表达进行了分析。结果显示, miR-133a-5p 在红肌中的表达水平最高, 在白肌和心肌的表达水平次之, 在肝、肾、脾、肠中仅有少量表达(图 1), 表明 miR-133a-5p 在翘嘴鲌中的表达也呈肌肉特异性。但目前关于 miR-133a-5p 在翘嘴鲌肌肉中的功能及作用机理尚不

明确, 仍需进一步研究。

动物骨骼肌发育形成的关键时期是胚胎期, 其中 miR-133 能抑制血清反应因子 (serum response factor) 的表达, 从而起到促进成肌细胞增殖和抑制分化的作用^[9]。本研究采用实时荧光定量 PCR 对 miR-133a-5p 在翘嘴鲌胚胎不同发育时期的表达水平进行了检测, 结果显示 miR-133a-5p 在翘嘴鲌胚胎发育的 2 细胞期就有高水平的表达, 但表达量随发育阶段的进行逐步降低, 从囊胚晚期开始其仅呈低水平的表达 (图 2)。以上结果说明, miR-133a-5p 在翘嘴鲌呈母源性表达, 暗示 miR-133a-5p 抑制其靶基因在胚胎早期的表达, 从而使靶基因主要在胚胎发育后期发挥作用。Mishima 等^[7]在斑马鱼的研究显示, miR-133 在胚胎发育过程中调节肌动蛋白相关基因、肌动蛋白结合基因和囊泡运输基因的表达, 影响肌动蛋白的编排, 从而参与肌节的组装过程。Yin 等^[31]的研究揭示, miR-133 通过调节 Mps1 和 Cx43 的表达来发挥心肌细胞增殖的内源性抑制剂作用。另外, Huang 等^[32]发现 miR-133a 的下调会引起肌细胞过度增殖, 导致斑马鱼胚胎的心脏缺陷和功能障碍。上述研究都表明, miR-133 对斑马鱼胚胎期的肌肉组织发育有重要作用, 但是 miR-133a-5p 在翘嘴鲌胚胎期肌肉发育中的调控作用及其靶基因还需进一步的研究。

骨骼肌是维持动物个体蛋白质代谢稳态的重要组织, 当肠道吸收的氨基酸受限时, 骨骼肌就充当氨基酸的主要来源库^[33-34]。肌肉质量和肌纤维大小的调节本质反映了蛋白质的转换, 即肌纤维中蛋白质合成和降解之间的平衡^[35]。骨骼肌占鱼体质量的 40%~60%, 肌肉组织中蛋白质的氨基酸分解代谢可以提供饥饿期间机体所需的葡萄糖^[36]。在外界食物来源匮乏的状态下, 饥饿胁迫很可能会通过改变部分生物钟基因以及成肌因子的表达进而影响到鱼类肌肉的生长^[37]。因此, 本研究对 miR-133a-5p 在正常投喂以及饥饿 5 d 的翘嘴鲌白肌中的表达进行了 24 h 内连续 9 个时间点的检测, 发现 miR-133a-5p 的表达在正常情况下无昼夜节律性 (图 3), 但在饥饿 5 d 之后出现明显的节律性 (图 4)。一些研究也表明 miRNA 可以影响生物节律的调节, 多种 miRNA 已经被证明在多个器官中与时钟基因转录后的调节有关^[38-39]。肌肉特异性 miR-206 不仅能调节肌肉发育, 而且在转录后水平参与哺乳动物昼夜节律调控^[40]。常雪蕊

等^[40]的研究发现, miR-133a-5p 可能通过介导生物钟基因 *RORA* 的表达调节各物质在猪体内的分泌和代谢, 从而影响生理活动。结合本研究结果可知, miR-133a-5p 可能不参与翘嘴鲌正常状态下的生物节律性, 但是能在特定条件下 (如饥饿) 通过调控生物节律对肌肉的生理功能或生长发育起到调控作用。

总之, 本研究对 miR-133a-5p 在翘嘴鲌不同组织、不同胚胎发育阶段的表达量以及其在翘嘴鲌饥饿 5 d 后的节律性表达进行了初步研究, 为深入探究 miR-133a-5p 在翘嘴鲌中的功能以及利用生物节律提高翘嘴鲌养殖效益等提供了一些新的参考。

参考文献 (References):

- [1] 张家国, 沈益娟, 张长峰. 翘嘴鲌肌肉营养价值研究进展[J]. 食品研究与开发 (ZHANG Jianguo, SHEN Yijuan, ZHANG Changfeng. Advances in research on muscle nutritional value of *Siniperca chuatsi* [J]. Food Research and Development), 2019, 40(22): 209-214.
- [2] JOHNSTON I A, BOWER N I, MACQUEEN D J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish[J]. Journal of Experimental Biology, 2011, 214(10): 1617-1628.
- [3] AGBU P, CARTHEW R W. MicroRNA-mediated regulation of glucose and lipid metabolism[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021, 22(6): 425-438.
- [4] 罗杰, 杨淞, 杜杰, 等. 摄食不同种类饵料的鲤肝组织 miRNA 表达谱分析及验证[J]. 淡水渔业 (LUO Jie, YANG Song, DU Jie, et al. Analysis and validation of miRNA expression profiles in liver of *Cyprinus carpio* feeding with different types of diets [J]. Freshwater Fisheries), 2020, 50(1): 31-37.
- [5] 金晓露, 杨建香, 李真, 等. 乳腺发育及泌乳相关 miRNA 研究进展[J]. 遗传 (JIN Xiaolu, YANG Jianxiang, LI Zhen, et al. Progress on the miRNA related with mammary gland development and lactation [J]. Hereditas), 2013, 35(6): 695-702.
- [6] 金怡. MicroRNA-375、microRNA-205 在肺癌中的表达及相关靶基因的研究[D]. 上海: 复旦大学 (JIN Yi. Deregulation of miR-205 and miR-375 in Lung Cancer and Their Putative Targeted Genes [D]. Shanghai: Fudan University), 2013.
- [7] MISHIMA Y, ABREU-GOODGER C, STATON A A, et al. Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization[J]. Genes & Development, 2009, 23(5): 619-632.
- [8] XU C Q, LU Y J, PAN Z W, et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes[J]. Journal of Cell Science, 2007, 120(17): 3045-3052.
- [9] CHEN J F, MANDEL E M, THOMSON J M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation[J]. Nature Genetics, 2006, 38(2): 228-233.
- [10] KOUTSOULIDOU A, MASTROYIANNPOULOS N P, FURLING D, et al. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle[J]. BMC Developmental Biology, 2011, 11: 34.
- [11] 吴萍. 鳊肌肉生物钟相关基因节律性表达研究[D]. 长沙: 湖南大学 (WU Ping. Analysis of *Siniperca chuatsi* Slow Muscle Transcriptome and Skeletal Rhythmic [D]. Changsha: Hunan University), 2016.

- [12] 王艳利, 曲丽娜, 李莹辉. 生物节律基因非编码 RNA 调控机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报(WANG Yanli, QU Lina, LI Yinghui. Regulation of circadian gene by non-coding RNAs[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology), 2016, 32(4): 353–358.
- [13] 刘佩. 翘嘴鲌肌肉及肝脏 miRNA 的节律性表达分析[D]. 长沙: 湖南农业大学(LIU Pei. Rhythmic Expression Analysis of miRNA in *Siniperca chuatsi* Muscle and Liver[D]. Changsha: Hunan Agricultural University), 2016.
- [14] BARNEA M, MADAR Z, FROY O. High-fat diet delays and fasting advances the circadian expression of adiponectin signaling components in mouse liver[J]. Endocrinology, 2009, 150(1): 161–168.
- [15] 谢小军, 邓利, 张波. 饥饿对鱼类生理生态学影响的研究进展[J]. 水生生物学报(XIE Xiaojun, DENG Li, ZHANG Bo. Advances and studies on ecophysiological effects of starvation on fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica), 1998, 22(2): 181–188.
- [16] 李育培, 刁晓明, 阮少云, 等. 饥饿对白鲫能量物质消耗的影响[J]. 淡水渔业(LI Yupei, DIAO Xiaoming, RUAN Shaoyun, et al. The effect of starvation on energy and substance consumption in *Carassius auratus cuvieri*[J]. Freshwater Fisheries), 2008, 38(4): 57–62.
- [17] ZHU X, CHEN D X, 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.
- [18] 刘希良, 宾石玉, 王开卓, 等. 翘嘴鲌的人工繁殖与胚胎发育观察[J]. 广西师范大学学报(自然科学版)(LIU Xiliang, BIN Shiyu, WANG Kaizhuo, et al. Artificial propagation and embryonic development observation of Mandarin fish[J]. Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)), 2013, 31(2): 100–106.
- [19] CHU W Y, LIU L S, LI Y L, et al. Systematic identification and differential expression profiling of microRNAs from white and red muscles of *Siniperca chuatsi*[J]. Current Molecular Medicine, 2013, 13(8): 1397–1407.
- [20] 李迪, 吴萍, 何美凤, 等. qRT-PCR 分析鳊鱼内参基因的筛选[J]. 生命科学研究(LI Di, WU Ping, HE Meifeng, et al. Screening of reference genes in *Siniperca chuatsi* for qRT-PCR analysis[J]. Life Science Research), 2016, 20(3): 214–217.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [22] 农小献, 赵发兰, 宾石玉, 等. 斑鳊轻链 3 基因(*MLC3*) cDNA 的克隆及纵向表达分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报(NONG Xiaoxian, ZHAO Falan, BIN Shiyu, et al. cDNA cloning and vertical expression analysis of the myosin light chain 3 (*MLC3*) gene in *Siniperca scherzeri*[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University), 2011, 34(2): 79–83.
- [23] 陈圆华, 李虹辉, 王利香, 等. GSK4112 对尼罗罗非鱼肝脏 *Nr1d1* 和 *Ulk1b* 基因昼夜节律性表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学(CHEN Yuanhua, LI Honghui, WANG Lixiang, et al. Effects of GSK4112 on circadian rhythmicity expression of *Nr1d1* and *Ulk1b* in liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Genomics and Applied Biology), 2021, 40(2): 584–590.
- [24] ZHAO Y, SAMAL E, SRIVASTAVA D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis[J]. Nature, 2005, 436(7048): 214–220.
- [25] VAN ROOIJ E, SUTHERLAND L B, QI X X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA[J]. Science, 2007, 316(5824): 575–579.
- [26] 习欠云, 周莲莲, 李虹仪, 等. 不同品种猪肌肉组织 miR-1 和 miR-133 基因的表达分析[J]. 畜牧兽医学报(XI Qianyun, ZHOU Lianlian, LI Hongyi, et al. The expression analysis of miR-1 and miR-133 in *Longissimus dorsi* muscle from different pig breeds[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica), 2012, 43(6): 843–848.
- [27] 吴秋雪, 张伟伟, 常鑫, 等. AA 肉仔鸡肌肉组织中 miR-133 在不同饲养方式下的表达研究[J]. 中国家禽(WU Qiuxue, ZHANG Weiwei, CHANG Xin, et al. Study on the expression of miR-133 in AA broiler muscle tissue under different feeding methods[J]. China Poultry), 2020, 42(11): 22–26.
- [28] 张伟, 王世银, 邓双义, 等. oar-miR-133 的表达对巴什拜羊骨骼肌细胞增殖和分化的影响[J]. 西北农业学报(ZHANG Wei, WANG Shiyin, DENG Shuangyi, et al. Effect of oar-miR-133 expression on proliferation and differentiation of skeletal muscle satellite cell of Bashbay sheep (*Ovis aries*)[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica), 2019, 28(3): 315–322.
- [29] 李莎, 胡明亮. miR-133a 调控 BMP-2 诱导的血管平滑肌细胞向成骨样细胞分化的机制[J]. 南昌大学学报(医学版)(LI Sha, HU Mingliang. Mechanism of regulation of BMP-2-induced osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells by miR-133a[J]. Journal of Nanchang University (Medical Sciences)), 2018, 58(5): 21–25, 39.
- [30] 宋维文. MicroRNA-133 诱导绵羊间充质干细胞分化为成肌细胞的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学(SONG Weiwen. The Study of MicroRNA-133 Induced Sheep Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Myoblasts[D]. Harbin: Northeast Forestry University), 2015.
- [31] YIN V P, LEPILINA A, SMITH A, et al. Regulation of zebrafish heart regeneration by miR-133[J]. Developmental Biology, 2012, 365(2): 319–327.
- [32] HUANG Y J, JIANG B, XIA Y, et al. Downregulation of miR-133a contributes to the cardiac developmental toxicity of trichloroethylene in zebrafish[J]. Chemosphere, 2020, 251: 126610.
- [33] LECKER S H, GOLDBERG A L. Slowing muscle atrophy: putting the brakes on protein breakdown[J]. The Journal of Physiology, 2002, 545(3): 729–729.
- [34] WOLFE R R. The underappreciated role of muscle in health and disease[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2006, 84(3): 475–482.
- [35] SCHIAFFINO S, DYAR K A, CICILIOT S, et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy[J]. The FEBS Journal, 2013, 280(17): 4294–4314.
- [36] NAVARRO I, BLASCO J, BAÑOS N, et al. Effects of fasting and feeding on plasma amino acid levels in brown trout[J]. Fish Physiology & Biochemistry, 1997, 16(4): 303–309.
- [37] 汪建华. 短期饥饿对锦鲤肌肉和肝脏中生物钟相关基因表达的影响[D]. 桂林: 广西师范大学(WANG Jianhua. Effects of Short-term Fasting on the Rhythmic Expression of Clock-related Genes in Skeletal Muscle and Liver of *Carassius auratus*[D]. Guilin: Guangxi Normal University), 2016.
- [38] SHENDE V R, GOLDRICK M M, RAMANI S, et al. Expression and rhythmic modulation of circulating microRNAs targeting the clock gene *Bmal1* in mice[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22586.
- [39] KADENER S, MENET J S, SUGINO K, et al. A role for microRNAs in the *Drosophila* circadian clock[J]. Genes & Development, 2009, 23(18): 2179–2191.
- [40] 常雪蕊, 赵志显, 赵俊金, 等. ssc-miR-133a-5p 的靶基因预测及其相关信号通路的生物信息学分析[J]. 猪业科学(CHANG Xuerui, ZHAO Zhixian, ZHAO Junjin, et al. Bioinformatics analysis of ssc-miR-133a-5p target gene prediction and related signal pathways[J]. Swine Industry Science), 2020, 37(12): 102–105.