

# 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) miR-223 的表达特征及免疫应答分析\*

颜慧<sup>1,2</sup> 曾艳<sup>1,2</sup> 公光业<sup>2,3</sup> 陈亚东<sup>2</sup>  
陈松林<sup>2</sup> 刘洋<sup>1</sup> 沙珍霞<sup>2①</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** microRNA(miRNA)是一类内源性、长度约为22个核苷酸的非编码小单链RNA分子,由具有发夹结构的70-90个碱基的单链RNA前体经过Dicer酶加工而成。本研究使用荧光实时定量PCR(Quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR)方法,研究了miRNA-223(miR-223)在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)各健康组织、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染后各时间点的免疫组织以及不同病原类似物刺激后头肾细胞中的表达模式。结果显示,miR-223在半滑舌鳎各组织中均有表达,在头肾中表达量最高,在脑和血液中的表达量极低。鳃弧菌感染3组样品4种免疫组织,miR-223表达变化显著,感染后20 h内,鳃弧菌诱导miR-223上调表达。鳃弧菌感染后半滑舌鳎免疫组织miR-223表达变化规律显示,鳃弧菌感染2、6、12、24、48、72、96和168 h后,miR-223在肝、肠、脾、头肾4种组织中出现差异表达。其中,miR-223在半滑舌鳎肝、脾、头肾中表达上调,在肠中表达下调。用LPS、poly I:C、PGN、RGNNV感染半滑舌鳎头肾细胞后,发现经LPS、RGNNV诱导后miR-223上调表达,poly I:C、PGN诱导后miR-223下调表达。研究结果表明,miR-223参与了半滑舌鳎免疫应答过程。本研究结果有助于了解miRNA在半滑舌鳎对病原刺激免疫应答过程中的作用以及半滑舌鳎与病原相互作用中miRNA参与调控的机制。

**关键词** 半滑舌鳎;微小核糖核酸;鳃弧菌;荧光实时定量PCR;表达;免疫  
**中图分类号** Q522 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0037-08

miRNA是一类由22个左右核苷酸组成的非编码小单链RNA分子,能够与靶基因3'-UTR特异结合后引起靶mRNA降解或翻译抑制,借此对基因进行转录后表达调控(Carrington *et al.*, 2003)。miRNA广泛存在于动植物、病毒等多种有机体中,在各种细胞和生物过程中具有重要作用,例如细胞分化(Bushati *et al.*, 2007)、器官发育增殖(Bartel, 2004)、免疫应答(Teleman *et al.*, 2006)和器官生成(Han *et al.*, 2013)等。

为了鉴定半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) miRNA与免疫的相关性,本实验室完成了半滑舌鳎免疫组织

miRNA高通量和芯片研究,鉴定得到452种miRNA(Sha *et al.*, 2014),并有99个miRNA在鳃弧菌感染后出现显著差异表达(Gong *et al.*, 2015),其中miRNA-223表达差异较显著。miR-223是第一个在生物信息学和造血系统均得到确认的miRNA。目前,关于miR-223在免疫方面的研究仅对哺乳动物有相关研究(谭三勤等, 2012; 王卫卫等, 2011; 张勤等, 2012),在半滑舌鳎中尚无报道。

半滑舌鳎是我国一种重要的海水经济养殖鱼类(肖登元等, 2014),但它的产量受到各种细菌和病毒

\* 国家自然科学基金(31172439)资助。颜慧, E-mail: yanhui.1102@163.com

① 通讯作者: 沙珍霞, 研究员, E-mail: shazx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-12-12, 收修改稿日期: 2015-01-10

等病原的严重威胁,而鳃弧菌是其病害发生的主要病原体之一,可以导致半滑舌鳎鱼类发生弧菌病(Sha *et al.*, 2012)。为了研究 miR-223 在健康组织中的表达模式,同时为了探究 miR-223 在免疫反应中可能具有的应答模式,本研究采用 qRT-PCR 方法鉴定 miR-223 在半滑舌鳎健康组织和鳃弧菌感染前后免疫组织肝、肠、脾、头肾的表达特征;同时研究 miR-223 在体外培养的头肾细胞中经 LPS、poly I:C、PGN 和 RGNNV 刺激后的时空性表达,以期了解 miR-223 在半滑舌鳎对病原刺激免疫应答过程中的表达规律,为揭示 miRNA 与半滑舌鳎免疫的相关性提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

半滑舌鳎购自山东昌邑三鑫水产有限公司,鱼为 1.5 龄左右,平均体重 227 g,平均体长 31.5 cm。感染前将鱼在 25℃ 水箱中暂养 15 d,每日更换新鲜除菌海水,投喂商品化的饵料。随机选取 5 条半滑舌鳎进行健康组织收集,每条鱼分别采集头肾、脾、鳃、肠、卵巢、肌肉、胃、肝、皮肤、血、脑 11 种组织,所有提取的组织立即投入液氮中冷冻,然后转移至 -80℃ 保存,以备 RNA 提取。

### 1.2 头肾细胞培养

半滑舌鳎头肾细胞系(TSHKC)为本实验室所建(Zheng *et al.*, 2012)。研究所用为传代至第 6 代的 TSHKC。细胞在含 1%青霉素-链霉素(Invitrogen, 美国)和 5%胎牛血清(L15) (Invitrogen, 美国)的培养基中 25℃ 下培养。

### 1.3 样品采集

鳃弧菌感染参照 Sha 等(2014):鳃弧菌由本实验室保存,实验组用  $3.18 \times 10^5$  CFU/g 鱼体(半致死剂量,  $LD_{50}$ )的鳃弧菌对半滑舌鳎进行腹腔注射,感染时间为 20 h,对照组鱼参照实验组注射与体重相应剂量的 PBS。实验组分两组,分别是感染 20 h 后无明显症状组(NOSG)和感染 20 h 后有明显症状组(HOSG)。注射 PBS 组设为对照组(CG)。每组选取 8 条鱼进行组织收集。每条鱼分别采集肝脏、头肾、脾和肠 4 种免疫组织,将所有采集的组织在液氮中冷冻保存,以备 RNA 提取。

另外,在 2、6、12、24、48、72、96 和 168 h 共 8 个时间点,收集鳃弧菌感染后不同时间点实验样品和 PBS 对照组鱼的肝脏、头肾、脾脏和肠 4 种组织,

每个时间点取 3 条鱼。所有提取的组织立即投入液氮中冷冻,然后转移至 -80℃ 保存,以备 RNA 提取。

赤点石斑鱼神经坏死病毒(RGNNV)分离自自然发病的 40 日龄的半滑舌鳎幼鱼。分别使用 50 ng/ml 的 LPS、100  $\mu$ g/ml 的 PGN、50  $\mu$ g/ml 的 poly I:C、10  $TCID_{50}$  浓度的 RGNNV,感染 6 孔板中接种的半滑舌鳎头肾细胞,每个实验重复 3 次。感染 30 min 后去除包含感染源的培养基,使用 PBS 反复冲洗半滑舌鳎头肾细胞,然后继续用新的培养基培养细胞。分别收集感染 0、2、6、12 和 24 h 后的头肾细胞到相应的离心管中。低温离心后倒掉每个离心管中的培养基并加入 1 ml Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)然后储存在 -80℃ 冰箱中,以备 RNA 提取。

### 1.4 RNA 提取及反转录

总 RNA 提取使用 Trizol(Invitrogen)试剂,并按照说明书操作。用无 RNA 酶的 DNA 酶去除基因组 DNA(天根,北京)。使用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 的质量和浓度,采用电泳的方式检测 RNA 的完整性。参照 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(天根,北京)说明书合成 cDNA: (1) miRNA 3' 末端进行加多聚 A 尾 Poly(A)处理; (2) Poly(A)修饰的 miRNA 进行逆转录反应:使用 oligo(dT)-universal tag 通用逆转录引物进行逆转录反应,最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链, -20℃ 保存备用。

### 1.5 半滑舌鳎 miR-223 前体序列的克隆

半滑舌鳎 miR-223 成熟体序列来自本实验室高通量测序的数据(Sha *et al.*, 2014),将成熟体序列比对到半滑舌鳎基因组(Chen *et al.*, 2014),得到 miR-223 前体的基因组序列,根据所获得的序列设计特异性引物 miR-223-primer(表 1),用于扩增 miR-223 的前体序列,克隆得到了符合预期结果的片段,连接 pMD19-T 载体(宝生物,大连),转化至感受态细胞 Top10 中(天根,北京),挑取单克隆,经过验证得到阳性克隆后测序,将测序结果在 miRBase (<http://www.mirbase.org/>)上进行 BLAST 分析,并使用 miRNA 前体二级结构在线预测软件 The mfold Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>)对 miR-223 前体进行二级结构预测。

### 1.6 半滑舌鳎 miR-223 实时定量分析

使用 qRT-PCR 方法检测 miR-223 的表达特征。qRT-PCR 实验正向引物基于 miRNA 成熟体序列设

表 1 荧光实时定量 PCR 引物序列

Tab.1 Primers and their sequences in qRT-PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
内参引物 U6	R: CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
miR-223 定量引物	F: CGGTGTCAGTTTGTCAAATACCC
miR-223-前体引物	F: TATTTAGGGTTTTTTTTTCTCCTGTCTTT R: CAATTCAACTAATTTCTGATGTCTAATGTAC

计,反向引物使用 miRcute miRNA qPCR(天根,北京)检测试剂盒自带的引物。用半滑舌鲷 U6 基因作为内参(Andersen *et al*, 2004; Sha *et al*, 2014)。引物序列见表 1。qRT-PCR 按照 miRcute miRNA qPCR(天根,北京)检测试剂盒说明书进行操作,20  $\mu$ l 反应体系:2 $\times$ miRcute miRNA Premix 10  $\mu$ l,正向引物 0.4  $\mu$ l,反向引物 0.4  $\mu$ l,miRNA 第一链 cDNA 2.0  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ l。正向引物为 miR-223 引物(表 1),反向引物为试剂盒引物。在 ABI PRISM 7500 实时定量扩增仪上进行 qRT-PCR 反应程序设置:第一步起始模板变性:94 $^{\circ}$ C,2 min,循环 1 次。第二步:94 $^{\circ}$ C,20 s;60 $^{\circ}$ C,34 s,循环 40 次。实验设置阴性对照,每个样品设置 3 个平行。程序运行完成后根据熔解曲线分析确定引物的特异性及扩增效率。使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相对表达量, $C_t$  值取 3 个重复的平均值。

### 1.7 半滑舌鲷 miR-223 的 qRT-PCR 数据统计分析

使用 SPSS 17.0 统计软件对 qRT-PCR 检测结果的数据进行分析。实时定量数据用 3 组重复平均值 $\pm$ 标准误(SE)表示;结果采用  $t$  检验,采用单因素方差分析法(ANOVA)中的 LSD 法对多组样本均数间的两两比较进行分析, $P<0.01$  为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 半滑舌鲷 miR-223 前体克隆

对半滑舌鲷 miR-223 前体进行 PCR 扩增和测序,测序结果去除载体后显示片段大小为 330 bp,将该序列在 miRBase(<http://www.mirbase.org/>)数据库进行 BLAST 分析,结果显示该序列与斑马鱼、斑点绿河豚、日本虎河豚、人、小鼠等的 miR-223 具有同源性。通过 The mfold Web Server 分析半滑舌鲷 miR-223 前体序列的二级结构(图 1),可以看出半滑舌鲷 miR-223 前体序列二级结构具有典型的颈环结构特征,最小折叠自由能( $\Delta G$ )为-46.20 kJ/mol。经二级结构分析和 miRBase 前体序列同源性分析,并且在前期序列中发现了半滑舌鲷 miR-223 的成熟体序列,确认克隆得到的序列为半滑舌鲷 miR-223 前体序列。

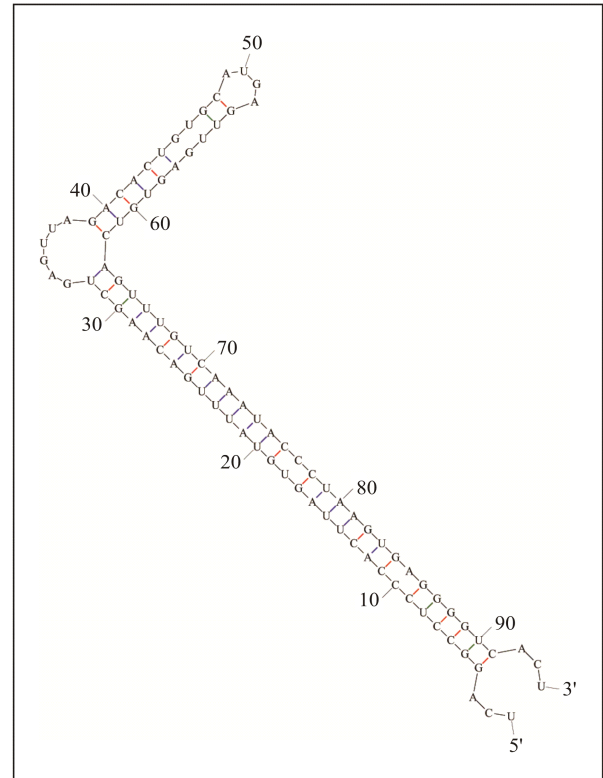


图 1 miR-223 前体序列形成的颈环结构

Fig.1 Hairpin structures formed by precursor sequences of miR-223

### 2.2 半滑舌鲷 miR-223 的表达

采用 qRT-PCR 方法检测 RNA 样品的结果显示,miR-223 及内参 U6 特异性扩增,熔解曲线均为单一峰,特异性较好,且 miR-223 引物及 U6 引物的 PCR 反应扩增效率均在 95%–103%之间,可以采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算相对表达量,因此采用实时定量 PCR 方法可以准确反映 miRNA 表达情况。经过统计分析获得了 miR-223 的表达特征。

#### 2.2.1 miR-223 在半滑舌鲷健康组织中的表达

miR-223 在健康半滑舌鲷的头肾、脾、鳃、肠、卵巢、肌肉、胃、肝、皮肤、血、脑组织中均有表达(图 2),表达量由高到低,miR-223 的相对表达峰值在头肾组织(35.90),其次是脾(14.96)、鳃(5.24),在脑和血中的表达量极低(脑 0.002、血 0.021)。miR-223 在不同组织中表达存在显著差异。

#### 2.2.2 miR-223 在 CG、NOSG、HOSG 样品组免疫组织中的表达分析

miR-223 在 CG、NOSG 和 HOSG 的 4 种免疫组织中的 qRT-PCR 结果如图 3 所示。miR-223 在 3 组样品中的表达峰值均出现在头肾中,其次是脾脏和肠,在肝脏中的表达最低,但表达量呈现明显差异。miR-223 在 CG、NOSG 和 HOSG

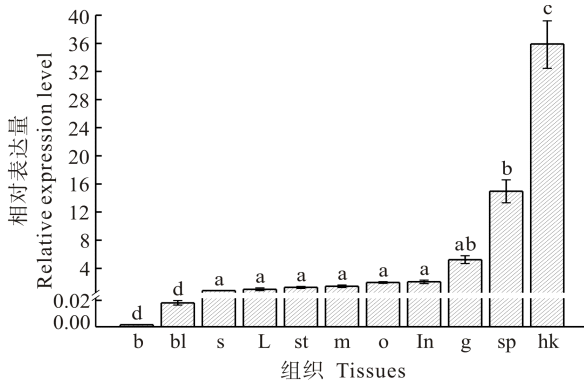


图2 qRT-PCR方法检测miR-223在半滑舌鲷健康组织中的相对表达量

Fig.2 The expressions of miR-223 in normal tissues of *Cynoglossus semilaevis*

字母“a, b, c, d”代表SPSS多重分析不同分组

‘a, b, c, d, and e’ indicated the Duncan grouping in SPSS  
b. 脑 Brain; bl. 血 Blood, s. 皮肤 Skin; L. 肝脏 Liver;  
st. 胃 Stomach; m. 肌肉 Muscle; o. 卵巢 Ovary; In. 肠  
Intestine; g. 鳃 Gill; sp. 脾 Spleen; hk. 头肾 Head kidney

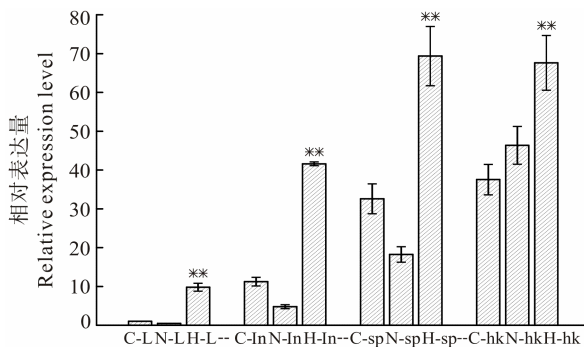


图3 miR-223在CG、NOSG和HOSG的4种组织中的相对表达量

Fig.3 Relative expression levels of miRNA-223 in CG, NOSG, and HOSG

“\*\*\*”代表与CG组之间差异极显著( $P < 0.01$ )

Significant differences ( $P < 0.01$ ) compared with CG were marked by “\*\*\*”. C. CG; N. NOSG; H. HOSG; L. 肝脏 Liver; In. 肠 Intestine; sp. 脾 Spleen; hk. 头肾 Head kidney

头肾中的相对表达峰值分别为37.52、46.35和67.62。miR-223在HOSG组脾脏中表达量最高,但在NOSG组脾脏的表达量最低。miR-223在肝脏和肠中的表达变化趋势与在脾脏中相同,表达量由高到低的顺序为HOSG、CG和NOSG。同一样品组不同组织miR-223的表达最小值和最大值也存在显著性差异,如miR-223在NOSG组肝脏和头肾的最大表达差异倍数达96倍,miR-223在N-L相对表达量为0.48,在N-hk中为46.35。miR-223的表达在同一组织不同样本组中

同样存在显著性差异,如在C-L和H-L中最大的差异倍数达到9.8倍;在肠、脾脏和头肾中的差异倍数为3.7倍、2.1倍和1.8倍。研究表明,鳃弧菌可以诱导miR-223在4种不同的组织中上调表达,对肝脏这一重要免疫组织的诱导作用更为显著。

### 2.2.3 半滑舌鲷感染鳃弧菌后miR-223的时空表达

为了进一步研究miR-223在鳃弧菌感染后不同时间点的表达变化,检测了miR-223在PBS对照组和感染组感染2、6、12、24、48、72、96和168 h后在肝脏、肠、头肾和脾脏中的表达水平(图4),图中每个时间点的miRNA表达量是同一时间点感染组相对PBS组表达量。结果显示,miR-223在肝脏中表达峰值出现在鳃弧菌感染后72 h,其总体表达趋势为随着感染时间表达量先升高后下降,在肠中的表达为先升高,在12 h后下降,72 h时出现峰值之后迅速降低。miR-223在脾脏中随着感染时间表达量表现为先下降,在72 h表现为最低值,然后迅速升高,在7 d有最大表达量。miR-223在头肾中随着感染时间延长表达量持续降低。以上数据表明,鳃弧菌诱导miR-223在肝脏、脾和头肾中表达上调,在肠中表达下调。

### 2.2.4 病原替代物刺激后半滑舌鲷头肾细胞miR-223的表达

在病原替代物LPS、poly I:C、PGN、RGNNV分别刺激后,通过实时定量PCR研究了miR-223在半滑舌鲷头肾细胞中的表达,结果如图5所示。LPS对其诱导的表达趋势为:在2 h达到峰值,然后开始下降,到12 h时表达量最低,最后表达恢复到相当于2 h时的水平。Poly I:C的诱导表达趋势与LPS有很大的不同,先下降,在2 h出现最低值,但此后逐渐升高,到12 h达到峰值,之后急剧下降。PGN诱导的表达趋势为:最初下降,然后开始升高,最后稍有下降。RGNNV的诱导表达趋势为:最初升高,在6 h达到峰值,然后开始下降,在12 h时表达量最低,最后稍有升高。总体上,LPS和RGNNV对miR-223的诱导表达趋势非常相似,在大多数情况下,在LPS诱导下最终的表达水平要高于初始时的表达水平,而RGNNV与其相似。poly I:C诱导下最终的表达水平要低于初始时的表达水平,PGN规律不明显。总之,LPS和RGNNV诱导miR-223在头肾细胞中上调表达,poly I:C和PGN诱导miR-223在头肾细胞中下调表达。

## 3 讨论

miRNA参与调控超过30%的编码基因,在先天免疫和适应性免疫功能中起着重要作用(Berezikov *et al.*, 2005)。miRNA在免疫调控和免疫细胞的发育中扮演

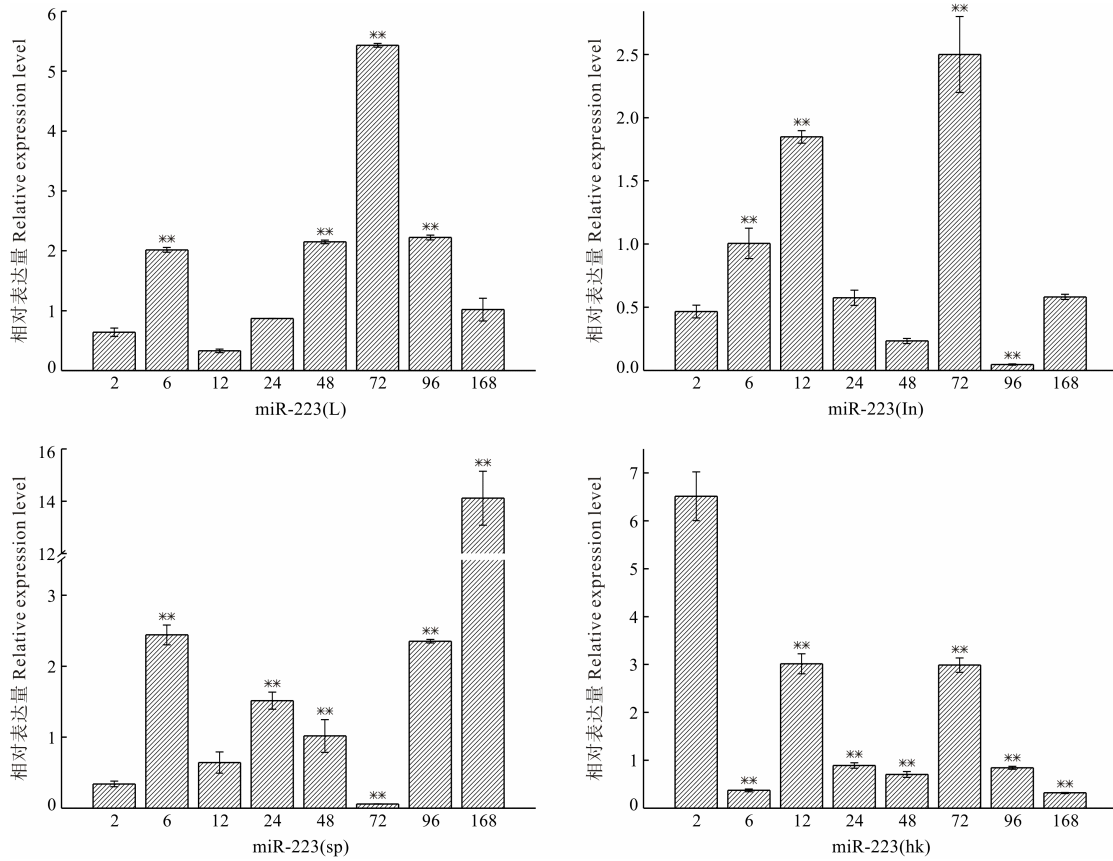


图 4 miR-223 在鳎弧菌感染后不同时间点 4 种组织中的相对表达水平

Fig.4 Relative expression levels of miRNA-223 in four tissues (liver, intestine, spleen, and head kidney) at different time points

每个时间点的 miRNA 表达量为实验组相对于与 PBS 对照组表达量。“\*\*”)代表与第一个时间点之间差异极显著( $P<0.01$ )

Data of miRNA at each time point was presented by the tissues at different value of its mean relative level in infected group divided by that in PBS group. Significant differences ( $P<0.01$ ) compared with the first time point were marked by “\*\*”)”

L. 肝脏; In. 肠; sp. 脾; hk. 头肾 L. Liver; In. Intestine; sp. Spleen; hk. Head kidney

着极其重要的角色。部分 miRNA 参与了固有性免疫应答和炎症反应的调控，是一类新的免疫调控因子。据悉，miR-223 于 2003 年最早通过生物信息学方法发现表达于血液细胞，如粒细胞、单核细胞及白细胞，能够促进白细胞向粒细胞分化与成熟，miR-223 在多种病理条件下出现差异表达。有研究证明，miR-223 的表达与急性白血病有密切关系(谭三勤等，2012)。Volinia 等(2006)研究证实，miR-223 在前列腺癌、胃癌等不同的上皮性肿瘤中表达上调。Stamatopoulos 等(2009)研究发现，miR-223 与 miR-29c 在慢性淋巴细胞性白血病(CLL)患者外周血中表达显著下调。Gottardo 等(2007)研究发现，miR-223 在膀胱癌组织较正常的膀胱组织中表达上调。罗小洋等(2009)研究证实，miR-223 对免疫系统的先天免疫分支的功能和发育非常关键，参与免疫调节，并对炎症和白血病的治疗具有重要意义。

在之前的研究中(Sha *et al*, 2014; Gong *et al*,

2015)，使用 solexa 高通量测序技术对在正常条件下和鳎弧菌感染后有和无明显症状的半滑舌鲷 4 种免疫相关组织构成的 3 组小 RNA 文库进行测序，鉴定得到 452 种 miRNA，并有 99 个 miRNA 被发现在鳎弧菌感染后表现出显著差异表达，选择 miR-223 进一步研究 miRNA 在鳎弧菌感染后表达量变化。miR-223 基因在进化中高度保守，在人类和鼠类的骨髓细胞中均特异性表达(Chen *et al*, 2004; Fukao *et al*, 2007)。Chen 等(2004)研究还发现，miR-223 几乎专一性地在主要的造血器官骨髓中表达，在肝脏和脾脏中也有少量表达，而在胸腺中几乎无表达。miR-223 被证实参与哺乳动物的免疫调节功能，尤其是在人类中，但是此前并没有系统性的半滑舌鲷 miR-223 的研究成果发表。本研究首先克隆得到半滑舌鲷 miR-223 前体，经 The mfold Web Server 对前体进行二级结构预测，miR-223 能形成典型的颈环结构。对半滑舌鲷各组织 miR-223 的表达谱进行研究，结果显示，MiR-223

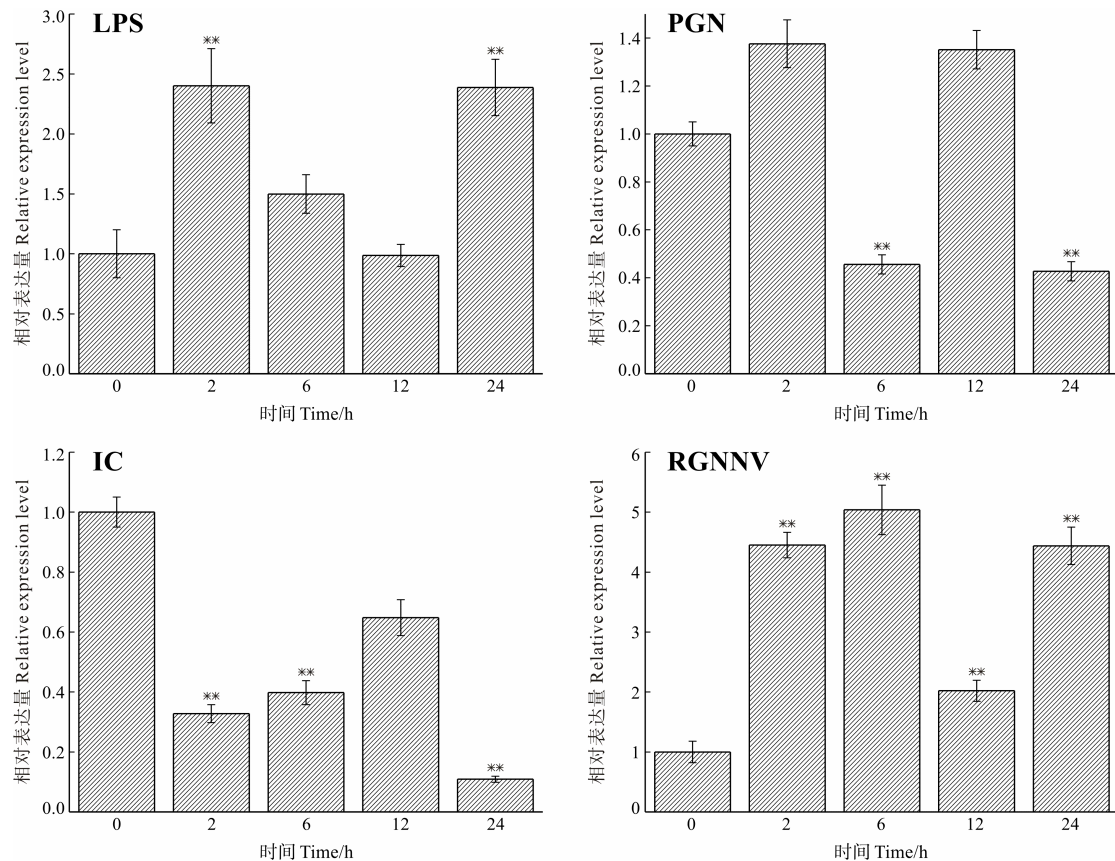


图5 实时定量方法检测半滑舌鳎头肾细胞中 miR-223 在 LPS、PGN、poly I:C 和 RGNNV 刺激下的表达  
Fig.5 Quantitative real-time PCR results on the relative expression of miRNA-223 in *C. semilaepis* head-kidney cell response to LPS, PGN, poly I:C, and RGNNV

“\*\*\*”代表与第一个时间点之间差异极显著( $P<0.01$ )

Significant differences ( $P<0.01$ ) compared with the first time point were marked by “\*\*\*”

在半滑舌鳎的肝、肠、脾、头肾、皮肤、肌肉、鳃、脑、血、胃、卵巢健康组织中均有表达,在头肾中有最高表达,在肝脏和脾脏中相对其他组织表达量较高,在脑和血中的表达量极低。半滑舌鳎感染鳃弧菌 7 d 内 miR-223 在各组织中呈现差异表达,鳃弧菌诱导 miR-223 在半滑舌鳎肝、脾和头肾中上调表达,在肠中出现下调表达。Chen 等(2008)采用 qRT-PCR 的方法对 75 例正常人及 152 例肺癌患者血清中的 miR-223 进行检测,miR-223 在正常组织和患病组织中存在差异表达,在肺癌患者血清中高表达得到验证。Volinia 等(2006)也在其研究中证实,正常组织和实体瘤中 miR-223 的表达存在明显差异,并指出 miR-223 可能在机体免疫中具有重要作用,这些研究中 miR-223 的表达变化与本研究相一致。鳃弧菌感染 3 样品组 4 种免疫组织,miR-223 差异表达显著,感染后 20 h 内,鳃弧菌诱导 miR-223 上调表达。LPS、poly I:C、PGN 和 RGNNV 感染半滑舌鳎头肾细胞,诱导 miR-223 差异表达,LPS 和 RGNNV 诱导 miR-223

上调表达,poly I:C 和 PGN 诱导 miR-223 出现下调表达。

免疫组织在经过病原刺激后均存在 miR-223 表达上调的情况,说明 miR-223 在病原入侵后表现出免疫应答反应,而头肾细胞在不同的病原处理后表现出不同的表达变化,miR-223 在革兰氏阴性菌及病毒入侵后可能表达上调,在革兰氏阳性菌入侵后表达下调。miR-223 在所有的病原入侵后均存在表达特征的变化,说明 miR-223 具有较宽的病原识别谱,对半滑舌鳎进行免疫反应一定具有重要的作用。综上所述,miRNAs 可能对半滑舌鳎鳃弧菌感染反应过程中的免疫相关基因的调节发挥一定的作用,本研究为后续阐明 miRNA 在半滑舌鳎体内的作用及 miRNA 的调控机制奠定了理论基础。

## 参 考 文 献

- 王卫卫, 刘建强, 黄浩杰, 等. miR-223 在胰腺癌组织中的表达及意义. 医学研究杂志, 2011, 40(6): 38-41  
张勤, 李涛, 周克元. miR-223 与恶性肿瘤. 广东医学, 2012,

- 33(16): 2524–2526
- 肖登元, 梁萌青, 王新星, 等. 饲料中不同水平维生素 A 对半滑舌鳎亲鱼繁殖性能及后代质量的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 50–59
- 罗小洋, 张吉翔. 微 RNA miR-223. 生命的化学, 2009(5): 666–668
- 谭三勤, 王光平, 崔亚娟, 等. 微小 RNA-128b 与-181a 和-223 在急性白血病患者中的表达. 中国组织工程研究, 2012, 16(36): 6790–6794
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5245–5250
- Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281–297
- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, *et al.* Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 2005, 120(1): 21–24
- Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 175–205
- Carrington JC, Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301(5631): 336–338
- Chen CZ, Li L, Lodish HF, *et al.* MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, 303(5654): 83–86
- Chen S, Zhang G, Shao C, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- Chen X, Ba Y, Ma L, *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18(10): 997–1006
- Fukao T, Fukuda Y, Kiga K, *et al.* An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell*, 2007, 129(3): 617–631
- Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, *et al.* micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier, 2007, 25(5): 387–392
- Gong G, Sha Z, Chen S, *et al.* Expression profiling analysis of the microRNA response of *Cynoglossus semilaevis* to *Vibrio anguillarum* and other stimuli. *Mar Biotechnol*, 2015: 1–15
- Han H, Peng J, Hong Y, *et al.* microRNA expression profile in different tissues of BALB/c mice in the early phase of *Schistosoma japonicum* infection. *Mol Biochem Parasitol*, 2013, 188(1): 1–9
- Sha Z, Wang Q, Liu Y, *et al.* Identification and expression analysis of goose-type lysozyme in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish & Shellfish Immunol*, 2012, 32(5): 914–921
- Sha Z, Gong G, Wang S, *et al.* Identification and characterization of *Cynoglossus semilaevis* microRNA response to *Vibrio anguillarum* infection through high-throughput sequencing. *Dev Comp Immunol*, 2014, 44(1): 59–69
- Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, *et al.* microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*, 2009, 113(21): 5237–5245
- Teleman AA, Cohen SM. Drosophila lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis. *Genes Dev*, 2006, 20(4): 417–422
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(7): 2257–2261
- Zheng Y, Wang N, Xie MS, *et al.* Establishment and characterization of a new fish cell line from head kidney of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiol Biochem*, 2012, 38(6): 1635–1643

(编辑 冯小花)

## The Expression Pattern of miR-223 in Different Tissues of *Cynoglossus semilaevis* and the Regulation of Expression in Response to Infections

YAN Hui<sup>1,2</sup>, ZENG Yan<sup>1,2</sup>, GONG Guangye<sup>2,3</sup>, CHEN Yadong<sup>2</sup>, CHEN Songlin<sup>2</sup>,  
LIU Yang<sup>1</sup>, SHA Zhenxia<sup>2</sup>①

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** MicroRNAs (miRNAs) are a type of endogenous small single-stranded noncoding RNAs that contain approximately 22 nucleotides (nt). miRNAs are the products of single-stranded pre-mRNAs which have 70-90 nt and a stem-loop structure, and spliced by dicer enzyme. Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) is an important economic marine fish species. The cloning of *C. semilaevis* miR-223 precursor was predicted to have a typical hairpin structure, which suggested that the precursor sequence we obtained was reliable. To investigate the role of immune related miRNAs in *C. semilaevis*, we applied quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and studied the expression patterns of miR-223 in different tissues of healthy *C. semilaevis*. miR-223 was expressed in all tested tissues including head kidney, spleen, gill, intestine, ovary, muscle, stomach, liver, skin, blood, and brain. The expression was the highest in head kidney and weak in brain and blood. We also performed qRT-PCR on three small RNA libraries (CG, NOSG and HOSG) prepared from *C. semilaevis* immune tissues. The results showed that the expression of miR-223 was very diverse, depending on different tissues and samples. In response to the infection of *V. anguillarum* at different time-points, there was a great difference in the expression of miR-223 between the control and the challenged group, in tissues including head kidney, intestine, liver and spleen. miR-223 was up-regulated in liver, spleen, and head kidney, and down-regulated in intestine. We infected head-kidney cells with LPS, poly I:C, PGN and RGNNV. It was found that the expression of miR-223 was up-regulated in response to LPS and RGNNV, and was down-regulated in response to PGN and poly I:C. The sequence of miR-223 precursor was obtained through gene cloning and expression profile analysis after infection with bacteria or virus, and it was proved that miR-223 might play a key role in the innate immune response to pathogens. Our study shed lights on the molecular functions of miRNAs in the host-pathogen interaction in *C. semilaevis*.

**Key words** *Cynoglossus semilaevis*; micro RNA; *Vibrio anguillarum*; qRT-PCR; Expression; Immunity

① Corresponding author: SHA Zhenxia, E-mail: shazx@ysfri.ac.cn