

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20211228003

http://www.yykxjz.cn/

畅孟阳, 李彬, 荣小军, 王锦锦, 于永翔, 王印庚, 廖梅杰, 张正, 范瑞用, 刘清兵. 刺参响应灿烂弧菌感染差异 microRNAs 鉴定及靶基因分析. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 107-117
CHANG M Y, LI B, RONG X J, WANG J J, YU Y X, WANG Y G, LIAO M J, ZHANG Z, FAN R Y, LIU Q B. Identification of differential expression microRNAs and target genes analysis of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in response to *Vibrio splendidus* infection. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 107-117

刺参响应灿烂弧菌感染 差异 microRNAs 鉴定及靶基因分析*

畅孟阳^{1,2} 李彬^{2,3} 荣小军^{2,3} 王锦锦^{2,3} 于永翔^{2,3} 王印庚^{2,3}
廖梅杰^{2,3}^① 张正^{2,3} 范瑞用⁴ 刘清兵⁴

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;
4. 青岛瑞滋集团有限公司 山东 青岛 266409)

摘要 microRNA 参与基因的转录后调控, 在真核生物的生长发育、细胞分化和免疫防御等过程中发挥重要作用。刺参(*Apostichopus japonicus*)病害问题已成为产业发展的主要限制因素之一, 而其病害发生的分子机制尚待进一步完善。本研究以刺参重大疾病“腐皮综合征”的重要致病原灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)为感染菌株, 通过人工感染实验制备患病刺参样本, 采用 miRNA-seq 技术对感染组(PT16S)和对照组(PT10H)各 3 头刺参的体壁组织进行 miRNA 测序, 通过相关生物信息学软件对 miRNAs 进行鉴定和分析, 筛选差异表达 miRNAs (DEmiRNAs)并预测其靶基因, 构建关键调控途径的 miRNA-mRNA 调控网络。结果显示, PT10H 组平均得到 5 902 588 条有效序列, 194 个已知 miRNA 和 19 个新的 miRNA; PT16S 组平均得到 5 053 529 条有效序列, 182 个已知 miRNA 和 42 个新的 miRNA。对 2 组鉴定到的 miRNA 进行差异表达分析, 共筛选到 2 个上调和 11 个下调的具有显著差异的 DEmiRNAs ($P \leq 0.05$), 上调的 DEmiRNAs 靶基因预测结合到 3010 个靶基因, 注释到 585 个 GO terms 及 24 条信号通路($P \leq 0.05$), 下调的 DEmiRNAs 靶基因预测到 19 072 个靶基因, 注释到 514 个 GO terms 以及 22 条信号通路($P \leq 0.05$)。对筛选到的 DEmiRNAs 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)验证, 显示 miRNA-seq 与 qRT-PCR 的一致率达到 70%。根据 KEGG 分析结果构建泛素介导的蛋白水解途径和 Notch 信号通路的 miRNA-mRNA 调控网络, 结果显示, 13 个 DEmiRNAs 分别靶向结合 134 个与泛素介导的蛋白水解相关的 mRNAs 和 109 个与 Notch 信号通路相关的 mRNAs, Aja-miR-184、Aja-miR-2478 和 Aja-miR-9277p 等 DEmiRNAs 可能参与对 Notch 信号通路和对泛素介导的蛋白水解的调控。相关研究结果将为刺参疾病发生调控网络建立和机制解析提供依据。

关键词 刺参; microRNA; 灿烂弧菌; 胁迫应答; 靶基因; miRNA-mRNA 调控网络

中图分类号 S968.9 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)02-0107-11

* 国家重点研发计划(2018YFD0900305)、山东省农业良种工程课题(2020LZGC015)、中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2020TD40; 2021GH05)共同资助。畅孟阳, E-mail: chang1007644237@foxmail.com

^① 通信作者: 廖梅杰, 研究员, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-12-28, 收修改稿日期: 2022-01-19

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)又称刺参,是我国第五次海水养殖浪潮的代表性经济物种之一,年产量近20万t。然而,随着养殖产业的迅猛发展,养殖过程中出现的病害频发、养殖成活率降低等一系列问题已经成为限制刺参产业可持续发展的主要瓶颈。解析刺参的抗病机制对于指导良种选育和健康养殖具有重要意义。课题组前期完成的刺参重要疾病的流行病学和病原学研究结果表明,刺参腐皮综合征是刺参养殖中最主要的疾病种类,灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)是该疾病的主要致病原之一(张春云等,2006)。因此,解析刺参响应灿烂弧菌侵染的分子机制可为揭示刺参抗病机制提供重要参考。

microRNA(miRNA)是一类内源性的、进化上高度保守的非编码小RNA单链分子,它作为转录后水平的关键调控因子,通过与靶基因3'端非翻译区(UTR)结合而抑制靶基因的翻译或降解靶基因,在调控真核生物的生长发育、细胞分化和免疫防御等生命活动中发挥了重要作用(Krol *et al.*, 2010)。近年来,水生生物miRNA的鉴定及其对靶基因的调控作用机制逐渐成为水产养殖研究的热点之一。研究表明,miRNA可以参与鱼、虾、蟹、贝、参等水生生物的免疫调控过程(Zhang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2017; Boonchuen *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018)。Li等(2012)利用miRNA-seq技术筛选出刺参体腔细胞响应灿烂弧菌的差异表达miRNA,但目前缺乏关于腐皮综合征发病的靶器官——体壁组织miRNA及其调控网络等相关机制的研究报道。因此,本研究以刺参体壁组织为研究对象,采用miRNA-seq技术对健康刺参和灿烂弧菌侵染后患病刺参的体壁组织进行测序,通过生物信息学软件筛选DEmiRNAs并进行验证,构建关键免疫相关通路上miRNA-mRNA的调控网络,以期解析刺参抗病网络调控机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用苗种取自山东青岛瑞滋集团有限公司培育的1龄刺参苗种。本研究选取活力良好、健康无异的刺参苗种,苗种规格为(50.0±2.0)g/只。实验用刺参苗种运回实验室后暂养3d,暂养水温为(13.0±0.5)℃,待苗种状态稳定后用于后续实验。

侵染菌株为本团队水生动物病原库中保存的分离自患腐皮综合征刺参体壁组织的灿烂弧菌菌株(AJ-Vb1801)。对该菌株用胰蛋白胨大豆肉汤固体培养基(TSB固体培养基)复苏,然后用TSB液体培养基

扩大培养。

1.2 实验样品的采集

灿烂弧菌人工侵染与取样:根据实验目的将实验分为2个组,每组设置3个平行,每个平行组中刺参苗种数量为30头,实验水槽容积为30L。对照组(PT10H)刺参苗种使用取自水质良好的自然海域的海水进行健康养殖,侵染组(PT16S)按照水体体积在水槽中投放制备好的灿烂弧菌菌悬液至浓度为 1×10^6 CFU/mL(该浓度为灿烂弧菌对刺参苗种的LD₅₀)。2组实验在温度为(13.0±0.5)℃、盐度为(28.0±0.5)的条件下进行养殖,每天换1/3水,换水后及时添加制备好的灿烂弧菌菌悬液,使其维持在 1×10^6 CFU/mL,每天投喂刺参配合饲料,投喂量为刺参苗种体重的2%,养殖期间保持溶氧充足。实验期间,每天观察刺参苗种的生理状态,及时收集并记录侵染组发生化皮的患病个体。实验开始7d后,分别从侵染组的患病个体和对照组的健康个体中随机挑取3头刺参,剖取刺参样品的体壁组织,置于2mL冻存管后迅速置于液氮中保藏并送回实验室,在-80℃超低温冰箱中保存,用于每个个体组织样品RNA的提取。对照组样品的编号分别为PT10H1、PT10H2和PT10H3,侵染组的编号分别为PT16S1、PT16S2和PT16S3。

1.3 总RNA提取及质量检测

以PT10H组和PT16S组的刺参体壁组织为材料,采用QIAGEN RNeasy mini kit(74106)提取所采集样品的总RNA,以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,用NanoDrop核酸测定仪测定所提取核酸样品的纯度,检测合格的样品(浓度 ≥ 200 ng/ μ L; RIN ≥ 8.0 ; 28S/18S ≥ 1.5)于-80℃保存备用。

1.4 miRNA文库的建立

对于所提取的总RNA样本,采用15% PAGE进行miRNA(18~30 nt)分离,分离后的miRNA经乙醇沉淀离心富集,然后利用TruSeq Small RNA Sample Preparation kit(Illumina, RS-200-0048)的方法及流程进行文库制备。文库构建完成后,先使用Qubit 2.0进行初步定量,稀释至1 ng/ μ L,随后使用Agilent 2100对文库的insert size进行检测,使用Bio-Rad CFX 96荧光定量PCR仪和Bio-Rad iQ SYBR Green进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR),对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 >2 nmol/L)。检测合格后,将所构建的文库利用HiSeq2500测序平台进行单端测序(SE50),得到50 bp的序列reads。HiSeq深度测序由杭州联川生物技术股份有限公司完成。

1.5 miRNA 测序数据处理

原始数据经过质控处理后得到 clean reads, 去除 3' 接头, 并进行长度筛选, 保留碱基长度在 18~26 nt 的序列。再将剩余序列分别与 mRNA 数据库、Rfam 数据库(包含 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 等)和 Rfam 数据库进行比对和过滤, 最后获得的数据即有效数据, 用于后续 miRNA 数据分析。

1.6 miRNA 鉴定和靶基因预测分析

使用 Bowtie 2 (2.2.3)将高质量的 valid reads 映射到本团队前期测序所得刺参基因组(组装完成, 待发表), 鉴定出相关 miRNA。miRNA 的差异表达分析使用 edgeR 软件, 筛选标准是基因表达差异倍数 >2 且 $FDR \leq 0.05$ 为差异显著的基因(DEmiRNA)。

使用 TargetScan (Nam *et al*, 2014)、miRanda (Betel *et al*, 2008)软件对 DEmiRNA 分别进行靶基因预测。对 2 款软件预测出的靶基因分别按照每款软件的评分标准进行筛选。TargetScan 算法中去除 context score percentile < 50 的靶基因, miRanda 算法中去除最大自由能(max energy) > -10 的靶基因。最后取 2 款软件的交集作为 DEmiRNA 的靶基因。

1.7 DEmiRNAs 靶基因 GO 富集与 KEGG 通路分析

利用 Goseq R 软件包进行 DEmiRNAs 靶基因的 GO (gene ontology)富集分析($P < 0.05$)。利用 KOBAS

软件对差异基因进行 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>)信号通路富集分析。

1.8 qRT-PCR 验证差异表达 DEmiRNA 表达量

根据上述实验结果, 随机选择 9 个 DEmiRNA 序列, 并用加尾法设计引物(表 1)。参照 Mir-XmiRNA first-strand synthesis 试剂盒(TR201)说明书, 将测序所用样本的总 RNA 反转录为 cDNA。得到的 cDNA 保存于 -20°C, 用于后续荧光定量实验。qRT-PCR 扩增体系为(20 μ L): 10 μ L 2 \times miRNA qRT-PCR master mix (TaKaRa), 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, RNase-free water 定容至 20 μ L。以 U6 作为 qRT-PCR 的内参基因, 每个样本 3 个重复, 同时设置不加模板的阴性对照。采取 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算所选 DEmiRNAs 的相对表达量。用 3 个重复实验的平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)来表示 DEmiRNA 的相对表达值。最后通过 GraphPad 6 软件对 DEmiRNA 的 qRT-PCR 结果和 miRNA-seq 结果进行绘图。

1.9 关键免疫途径的 miRNA-mRNA 调控网络构建

根据 DEmiRNAs 与 mRNAs 的靶向结合关系, 利用联川生物在线分析软件(<https://www.omicstudio.cn/tool/56>)构建基于 KEGG 分析得到的关键免疫途径的 miRNA-mRNA 调控网络。

表 1 用于 DEmiRNA 表达验证的 qRT-PCR 引物
Tab.1 qRT-PCR primers used for validation of selected DEmiRNA

基因名称 Gene ID	基因序列 Gene sequence	引物序列 Primer sequence (5'~3')
Aja-miR-9277	CGAATCCTGCCGACTACGCCA	CGAATCCTGCCGACTACGC
Aja-miR-2478	ATCCCACTTCTGACACCA	CGCATCCCACTTCTGACACCA
Aja-miR-184	TGGACGGAGAACTGATAAGGGCTTT	CCGACCCTGTTGAGCTTGACTC
Novel-217	TGGACCAGGAGTACTATTACG	TGGACGGAGAACTGATAAGGGCTTT
Aja-miR-1559-3p	GTAGTCGTGGCCGAGTGG	GTAGTCGTGGCCGAGTGG
Aja-miR-7550-5p	TTCCGGCTCGAAGGACCA	TTCCGGCTCGAAGGACCA
Aja-miR-11980-5p	AGGGAACGGGCTTGGCAGA	AGGGAACGGGCTTGGCA
Aja-miR-9277-3p	ATCCTGCCGACTACGCCA	ATCCTGCCGACTACGCCA
Aja-miR-940-5p	CCAGGAGTGGAGCCTGCG	CCAGGAGTGGAGCCTGCG
Aja-miR-1559-5p	GTAGTCGTGGCCGAGTGA	CGTAGTCGTGGCCGAGTGA
U6 Reverse		TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
U6 Forward		GGAACGATACAGAGAAGATTAGC

2 结果

2.1 刺参体壁样品 miRNA 测序数据结果

PT10H 和 PT16S 组刺参体壁样品的 miRNA-seq

分别平均产生 11 929 100 和 10 107 557 条原始序列, 过滤后得到的平均有效序列分别为 5 902 588 和 5 053 529 条, 说明本研究的测序数据质量良好。与 miRbase 数据库比对结果显示, PT10H 比对到 194 个已知 miRNA 和 19 个新的 miRNA, PT16S 组比对到

182 个已知 miRNA 和 42 个新的 miRNA (表 2)。对 PT10H 和 PT16S 组内各生物学重复之间的 Pearson 相

关性系数分析结果显示,组内样品的相关性系数均在 0.95 以上,说明各样品的重复性良好(图 1)。

表 2 刺参体壁样品 miRNA-seq 数据概况
Tab.2 Overview of miRNA-seq data of body wall samples from *A. japonicus*

样品 Sample	原始序列数 Number of raw reads	有效序列数(占比) Number of valid reads (Proportion)	已知的 miRNA 数 Number of known miRNA	新的 miRNA 数 Number of novel miRNA
PT10H1	12 903 436	6 739 101 (52.23%)	176	16
PT10H2	9 406 056	4 125 702 (43.86%)	172	14
PT10H3	13 477 809	6 842 961 (50.77%)	185	17
PT16S1	9 342 684	3 968 310 (42.48%)	158	36
PT16S2	12 798 085	6 639 205 (51.88%)	173	15
PT16S3	8 181 902	4 553 071 (55.65%)	117	12

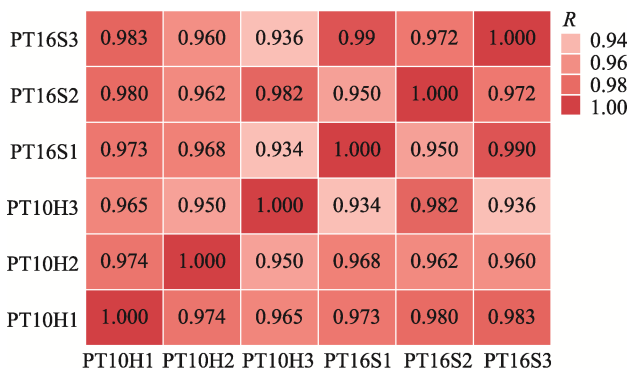


图 1 miRNA 测序结果的各样品间不同生物学重复的 Pearson 相关性分析
Fig.1 Pearson correlations between all the different biological repeats based on the miRNA-seq

2.2 刺参体壁样品 DE miRNAs 的鉴定与筛选

用 Bowtie 2.2.3 软件将长度筛选后的 RNA 定位

到刺参基因组参考序列上,将定位成功的序列与 Rfam database 数据库进行比对,除去 tRNAs、rRNAs、snRNA、snoRNAs 和重复序列。利用 miRDeep2 软件共鉴定出 PT10H 与 PT16S 之间的差异表达 miRNAs ($P \leq 1$) 299 个,其中包括 Aja-miR-2012、Aja-miR-92a 和 Aja-miR-286 在内的 127 个 miRNAs 上调表达, Aja-miR-2007 和 Aja-miR-9277 在内的 172 个 miRNAs 下调表达。进一步筛选出 PT10H 与 PT16S 之间显著性差异表达的 miRNAs (DE miRNAs) 13 个,其中上调和下调 DE miRNAs 的数量分别为 2 个和 11 个(表 3)。筛选出的 13 个 DE miRNAs 中包含 1 个新的 miRNA (Novel-217)和 12 个已知 miRNAs。根据 13 个显著差异的 DE miRNAs 在 6 个样品间的表达量构建聚类分析图(图 2),结果显示, Novel-217 和 Aja-miR-184 上调表达幅度较大, Aja-miR-1559-5p、Aja-miR-940-5p 和 Aja-miR-1559-3p 下调幅度较大。

表 3 PT10H 与 PT16S 间差异表达 miRNAs 信息统计
Tab.3 Information of differentially expressed miRNAs between PT10H and PT16S

miRNA 名称 miRNA name	PT10H 组表达量 Expression level of PT10H	PT16S 组表达量 Expression level of PT16S	差异倍数 $\log_2(\text{fold change})$	上调/下调 up/down
Novel-217	1 576.386	4 750.085	1.591	上调 up
Aja-miR-184	1 863.378	3 355.773	0.848	上调 up
Aja-miR-1559-3p	252.878	79.939	-1.661	下调 down
Aja-miR-7550-5p	351.362	153.732	-1.192	下调 down
Aja-miR-2478	624.861	316.081	-0.983	下调 down
Aja-miR-9277-3p	275.360	46.813	-2.556	下调 down
Aja-miR-9001-5p	13.894	3.715	-1.902	下调 down
Aja-miR-9277	28.066	4.044	-2.794	下调 down
Aja-miR-1260	1 785.472	343.361	-2.378	下调 down
Aja-miR-9277-5p	3.834	0.694	-2.466	下调 down
Aja-miR-11980-5p	35.768	5.357	-2.739	下调 down
Aja-miR-1559-5p	8.765	0	-4.266	下调 down
Aja-miR-940-5p	5.081	0	-3.016	下调 down

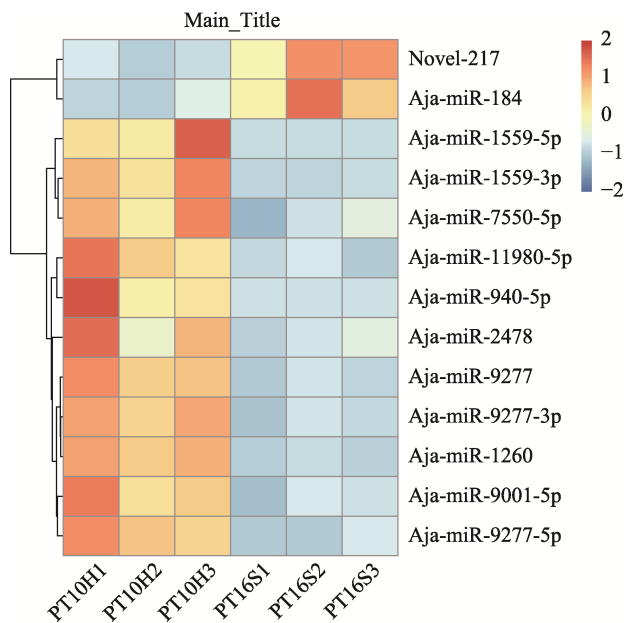


图 2 PT10H 与 PT16S 间差异表达 miRNAs 聚类分析热图
Fig.2 Cluster analysis heatmap of differentially expressed miRNAs between PT10H and PT16S

2.3 DEmiRNA 靶基因预测与功能分析

采用 TargetScan 和 miRanda 软件对上述 13 个 DEmiRNAs 进行靶基因预测, 共预测出 22 082 个靶基因。其中, 上调的 DEmiRNA 共 3010 个靶基因, 下调的 DEmiRNA 共 19 072 个靶基因。

GO 数据库注释结果显示, 上调 DEmiRNAs 的 2119 个靶基因共注释到了 585 个 GO terms ($P \leq 0.05$), 包括生物进程 368 个 terms, 细胞成分 79 个 terms, 分子功能 138 个 terms。分别选取 3 个本体显著性排名前 10 的 GO terms 构建 GO 富集柱状图(图 3a), 结果显示, 富集到生物进程的 GO terms 主要包括多细胞生物发育(GO: 0007275)、肽酰酪氨酸去磷酸化(GO: 0035335)和细胞粘附(GO: 0007155); 富集到细胞成分的 GO terms 主要包括膜的组成部分(GO: 0016021)、核(GO: 0005634)和细胞膜(GO: 0016020); 富集到分子功能的 GO terms 主要包括 ATP 结合(GO: 0005524)、钙离子结合(GO: 0005509)和泛素蛋白转移酶活性(GO: 0004842)。下调 DEmiRNAs 的 8652 个靶基因共注释到 514 个 GO terms ($P \leq 0.05$), 包括生物进程 285 个 terms, 细胞成分 83 个 terms, 分子功能 146 个 terms。分别选取 3 个本体显著性排名前 10 的 GO terms 构建 GO 富集柱状图(图 3b)。结果显示, 富集到生物进程的 GO terms 主要包括多蛋白质磷酸化(GO: 0006468)、细胞内信号转导(GO: 0035556)和多细胞生物发育(GO: 0007275); 富集到细胞成分的 GO terms 主要包括膜的组成部分(GO: 0016021)、核(GO:

0005634)和质膜的组成部分(GO: 0005887); 富集到分子功能的 GO terms 主要包括 ATP 结合(GO: 0005524)、钙离子结合(GO: 0005509)和泛素蛋白转移酶活性(GO: 0004842)。

进一步对 DEmiRNAs 的靶基因进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示, 上调 DEmiRNAs 的 829 个靶基因注释到 24 条代谢通路($P \leq 0.05$), 其中富集基因数较多的是 ECM 受体相互作用(43 个)、泛素介导的蛋白水解(38 个)、FoxO 信号通路(26 个)、Notch 信号通路(26 个)、mRNA 监测通路(23 个)、粘着力(18 个)和 MAPK 信号通路(16 个)(图 4a)。下调 DEmiRNAs 的 3499 个靶基因注释到 22 条代谢通路($P \leq 0.05$), 其中, 富集基因数较多的是神经活性配体-受体相互作用(254 个)、嘌呤代谢(141 个)、泛素介导的蛋白水解(115 个)、溶酶体(115 个)、Notch 信号通路(99 个)和 FoxO 信号通路(66 个)(图 4b)。

2.4 DEmiRNAs 表达量的验证

为验证高通量测序数据的准确性, 从筛选到的 13 个 DEmiRNAs 中随机选取 10 个进行 qRT-PCR 验证。结果显示, 2 个上调 DEmiRNAs (Novel-217 和 Aja-miR-184)和 5 个下调 DEmiRNAs (Aja-miR-2478、Aja-miR-9277、Aja-miR-1559-3p、Aja-miR-7550-5p 和 Aja-miR-11980-5p)与测序数据中相应的 DEmiRNAs 的表达量变化趋势一致(图 5), 验证一致率达到 70%, 上述结果说明本研究的测序结果真实可靠。

2.5 miRNA-mRNA 基因共表达网络构建

根据 KEGG 富集分析结果, 使用联川生物在线分析软件对泛素介导的蛋白水解和 Notch 信号通路上的 DEmiRNAs 及其靶基因构建 miRNA-mRNA 基因共表达网络。结果显示, 13 个 DEmiRNAs 共靶向结合 115 个与细胞免疫中泛素介导的蛋白水解相关的 mRNAs (图 6a)。结合 mRNAs 较多的 DEmiRNA 为 Aja-miR-9277-5p、Aja-miR-9277-3p 和 Aja-miR-2478, 分别结合了 31、24 和 23 个 mRNAs。其中, *UBR5*、*UB2G1*、*UBE3C* 和 *XIAP* 作为关键基因靶向结合多个 DEmiRNAs, 可作为后续泛素介导的蛋白水解通路中的重点基因进行研究。共有 108 个与体液免疫中 Notch 信号通路相关的 mRNAs 被 13 个 DEmiRNAs 靶向结合(图 5b)。Aja-miR-9277、Aja-miR-9277-5p 和 Novel-217 靶向结合的 mRNAs 最多, 分别达到 36、34 和 32 个。其中, *NOTC1*、*SVEP1* 和 *FBP1* 作为关键基因靶向结合多个 DEmiRNAs, 可作为后续 Notch 信号通路中的重点基因进行研究。

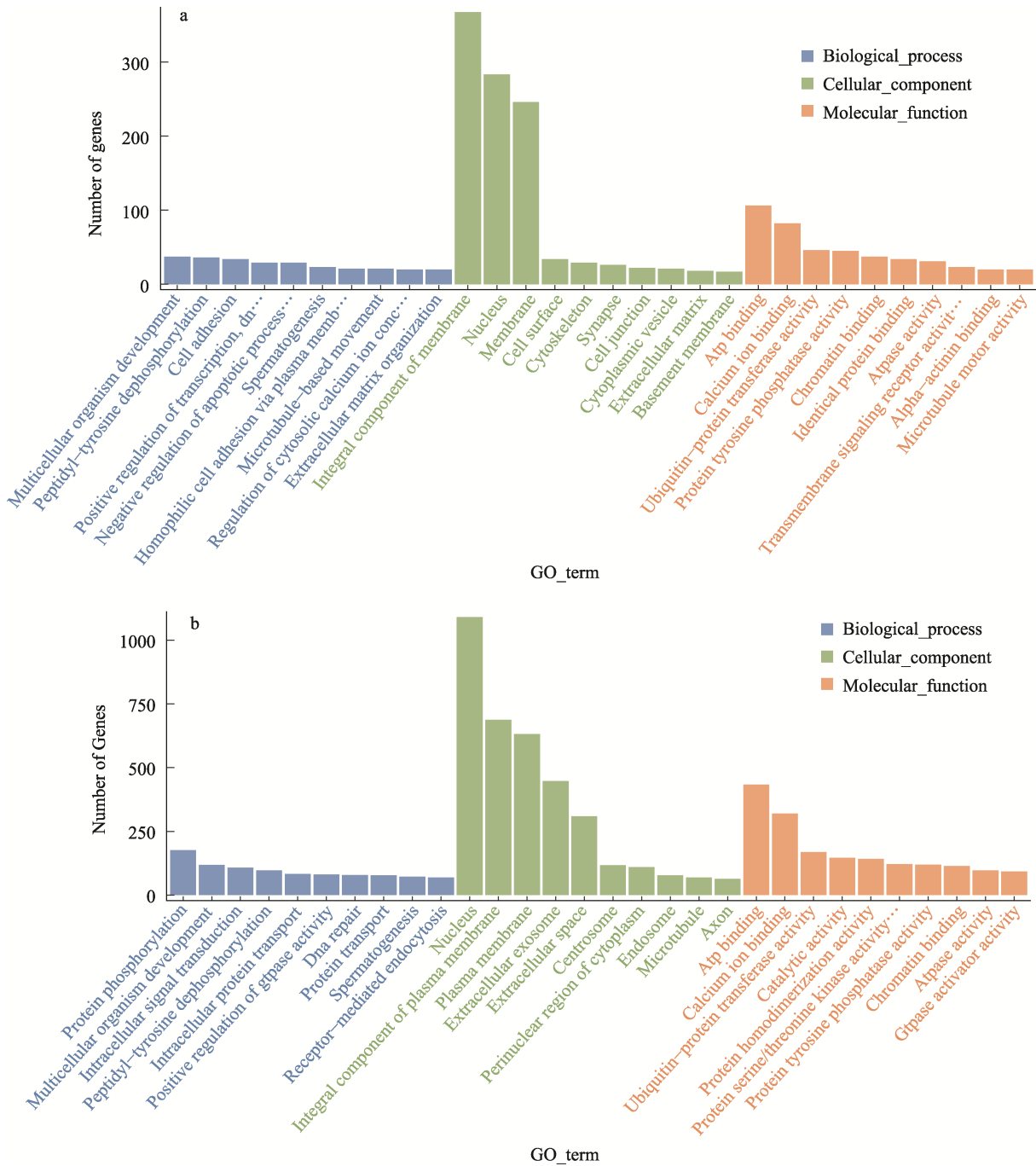


图 3 PT10H 与 PT16S 间 DEmiRNAs 靶基因 GO 富集
 Fig.3 GO categorization of the target genes of DEmiRNAs between PT10H and PT16S

a: 上调 DEmiRNAs 靶基因; b: 下调 DEmiRNAs 靶基因
 a: Target genes of up-regulated DEmiRNAs; b: Target genes of down-regulated DEmiRNAs

3 讨论

目前, 刺参腐皮综合征是对刺参养殖影响最大的疾病种类之一, 本团队前期研究结果显示, 灿烂弧菌是刺参腐皮综合征的重要致病原(张春云等, 2006)。虽然刺参腐皮综合征的致病原菌已被分离鉴定, 但刺参响应该病原侵染的相关分子机制尚不清晰。Li 等

(2012)运用 Illumina Hiseq2000 平台对健康和患腐皮综合征的刺参体腔细胞进行深度测序后, 在 2 个文库中找到了 40 个共同的保守 miRNA; 该研究还发现, miR-31 和 miR-2008 在 2 个刺参文库中呈显著差异表达。Li 等(2016)通过转染 miR-210 模拟物, 证明 miR-210 能够抑制刺参 *AjToll* 基因, 并且其 ROS 变化与 *AjToll* 基因的表达趋势一致, 这意味着 miR-210 在

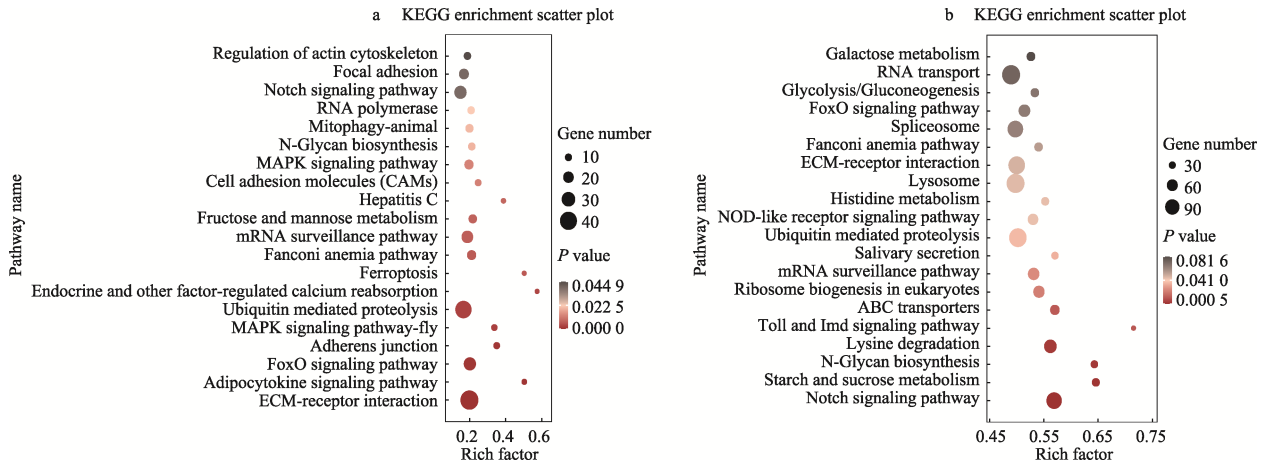


图 4 PT10H 与 PT16S 间 DE miRNAs 靶基因 KEGG 富集图

Fig.4 KEGG pathway of the target genes of DE miRNAs between PT10H and PT16S

a: 上调 DE miRNAs 靶基因; b: 下调 DE miRNA 靶基因

a: Target genes of up-regulated DE miRNAs; b: Target genes of down-regulated DE miRNAs

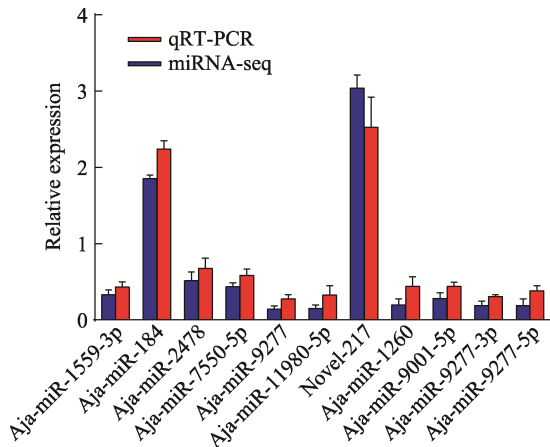


图 5 PT10H 与 PT16S 组间刺参体壁组织 DE miRNAs 的 qRT-PCR 验证

Fig.5 qRT-PCR validation of DE miRNAs in body wall of *A. japonicus* between PT10H and PT16S

一种新的免疫途径中起到了关键作用。Lv 等(2017)研究发现, miR-137 在刺参发病机制中具有调节免疫功能的作用。Lu 等(2015a)发现, miR-31 通过靶向作用于 *Ajp105* 来调节呼吸爆发。Shao 等(2017)研究证明, 在灿烂弧菌和刺参相互作用期间, miR-31 负向调节肿瘤坏死因子的表达, 使得半胱氨酸蛋白酶-3 和半胱氨酸蛋白酶-8 依赖性细胞凋亡。Lv 等(2015)通过转染 miR-200 的模拟物验证其靶基因 *AjTollip* 下游分子的表达情况, 表明 miR-200 能增强刺参体腔细胞的抗菌活性。Lu 等(2015b)通过转染 miR-133 模拟物和 si-*AjIRAK-1*, 表明 miR-133 参与刺参 TLR 联级调节, 并通过双荧光素酶报告基因实验确定了 miR-133 和 *AjIRAK-1* 的靶向关系。以上研究成果都是基于刺参体腔细胞测序, 进而对差异 miRNAs 的表

达及功能进行分析, 本研究以刺参患病的病灶组织作为研究对象, 通过高通量测序从转录组学角度筛选差异表达 miRNAs, 对其靶基因进行富集分析, 可为刺参与病原菌互作关系和发病机制解析提供新思路。

miRNAs 具有高度保守性、组织特异性和表达时序性。本研究通过生物信息学分析筛选到与免疫相关的 3 个 DE miRNAs, 包括 Aja-miR-184、Aja-miR-2478 和 Aja-miR-9277。在其他水产动物中, 梁金荣(2017)研究发现, 在经过副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染后, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的肠道、心脏、肌肉等组织中 miR-184 的表达量显著升高, 并进一步证实 miR-184 可以通过增强对虾体内抗菌肽的合成参与宿主的免疫调控, 从而达到提高机体免疫活力的效果; Ou 等(2013)研究发现, 克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*)的 miR-184 在受到蟹螺原体(*Spiroplasma eriocheiris*)刺激后表达量显著上调; Xu 等(2019)研究发现, 河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)在应对镉(Cd)诱导的氧化应激反应中 miR-184 显著上调。同源 miRNAs 在不同水产动物中可能发挥类似的调控作用。本研究发现, 刺参体壁在灿烂弧菌胁迫后 Aja-miR-184 表达量显著上调, 推测刺参通过上调 Aja-miR-184 的表达来激活相关免疫通路, 以应对灿烂弧菌的侵染。林锋(2018)从罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)野田村病毒(*Macrobrachium rosenbergii nodavirus*, MrNV)的致病性出发, 确定了 bta-miR-2478 参与罗氏沼虾体液免疫, 并可作为免疫增强剂在对虾野田村病毒的诊断和治疗上应用。林德麟(2017)在对牛乳清进行高通量测序后发现, miR-2478 在乳清中显著表达, 并靶向多种免疫球蛋白的合成。本研究

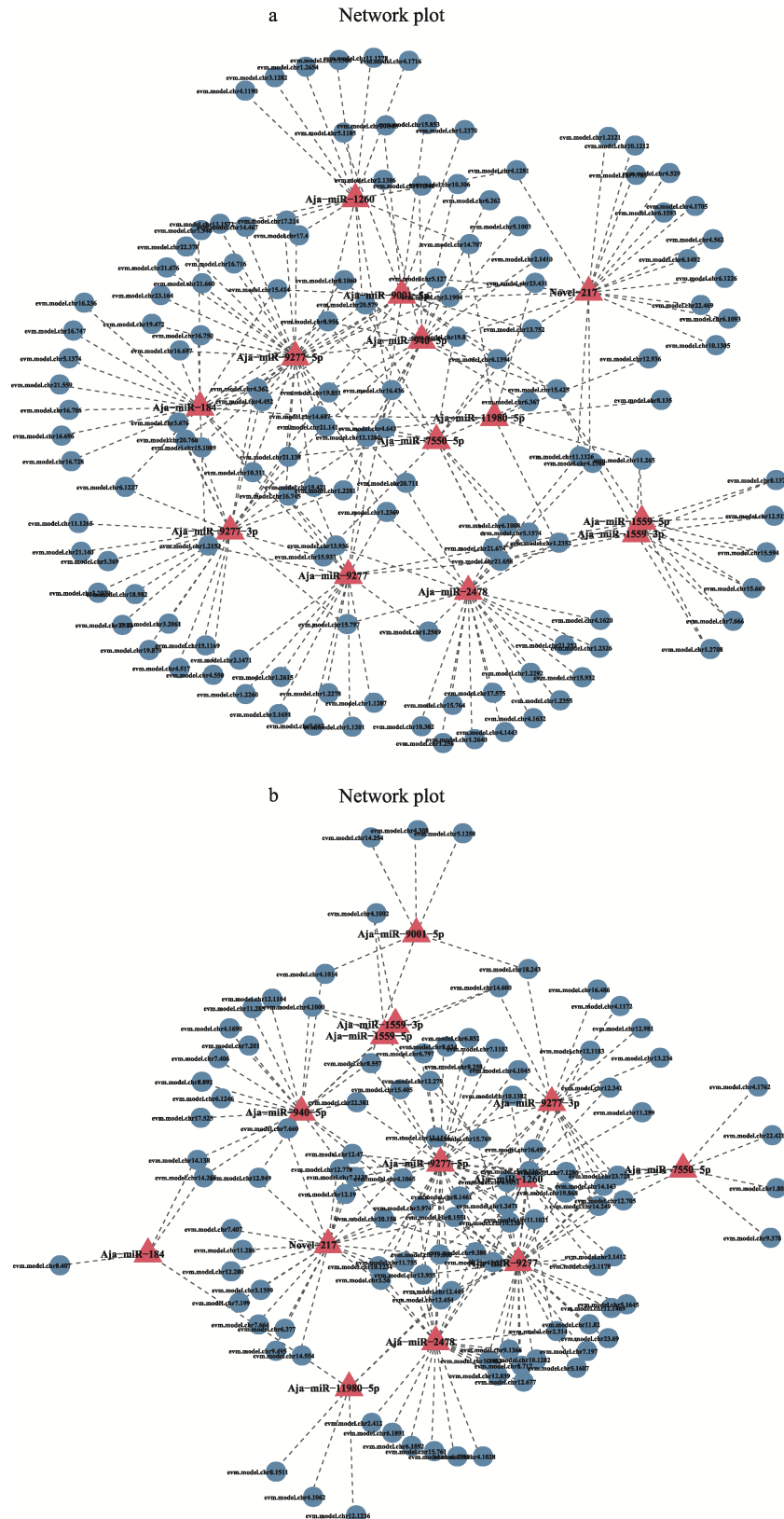


图 6 富集在刺参体壁免疫相关通路上的差异表达 miRNA-mRNA 的调控网络
 Fig.6 Regulation networks of miRNA-mRNA enriched in immune-related pathways in the body wall of *A. japonicus*

a: 泛素介导蛋白水解; b: Notch 信号通路
 a: Ubiquitin-mediated proteolysis; b: Notch signaling pathway

发现, 刺参体壁的 Aja-miR-2478 在灿烂弧菌胁迫后显著下调, 表明 Aja-miR-2478 参与了刺参对灿烂弧菌的胁迫应答, 推测 Aja-miR-2478 通过下调其表达量以解除对部分免疫相关基因的限制, 从而增强刺参抵抗灿烂弧菌感染的能力。相关结果表明, 在水产动物中, Aja-miR-184 和 Aja-miR-2478 在响应细菌感染过程中有着相似的表达趋势。郭睿等(2019)研究发现, 意大利蜜蜂(*Apis mellifera ligustica*)幼虫经蜜蜂球囊菌(*Ascosphaera apis*)胁迫后, 肠道中 miR-9277 显著上调表达, 其靶基因富集分析结果显示, miR-9277 主要参与了丝氨酸蛋白酶和泛素介导的蛋白水解的调控。本研究发现, 刺参体壁在灿烂弧菌胁迫后, Aja-miR-9277 显著下调表达, 并参与了促丝裂原活化蛋白激酶和泛素介导的蛋白水解的调控。然而, Aja-miR-9277 与意大利蜜蜂中的同源 miRNA 表达趋势相反, 推测同源 miRNAs 在不同物种中可能发挥不同的作用, 但这种差异产生的分子机制仍需进一步研究。

本研究中, 筛选到的上调 miRNA 数目及其靶基因的数目都显著低于下调 miRNA 及其靶基因的数目, 同时, 靶基因的 GO 富集显示, 靶基因主要富集在蛋白质磷酸化、膜的组成部分、泛素蛋白转移酶活性等 GO terms 上, 表明刺参体壁的新陈代谢和细胞生命活动在受到灿烂弧菌胁迫后受到了一定程度的抑制。FOXO 信号通路可以直接参与黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)胰岛素调控脂肪代谢的合成(卓梅琴, 2018), 其下游的靶基因 *FOXO1* 对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)的生长发育起着重要的调控作用(谢淑媚, 2018)。Toll 和 IMD 信号通路在调控抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)的表达中占主导地位(Vallet-Gely *et al.*, 2008; Aggarwal *et al.*, 2008)。真菌和革兰氏阳性菌的感染会激活 Toll 信号通路, 从而调控一系列抗菌肽的表达; 革兰氏阴性菌和病毒的感染会激活 IMD 信号通路, 从而参与调控多种抗菌肽的表达(Lan *et al.*, 2013)。促丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是介导细胞外信号到细胞内反应的重要信号转导系统, 对细胞生长、分化、凋亡和程序性死亡等多种生理过程具有重要调控作用(Sigoillot *et al.*, 2002)。Notch 信号通路可调控细胞的分化、增殖和凋亡, 对于细胞生长发育具有重要意义, Notch 信号的异常表达会诱发乳腺癌等多种癌症(Shimizu *et al.*, 2011)。本研究发现, 在 FOXO 信号通路、Toll 和 IMD 信号通路、MAPK 信号通路和 Notch 信号通路分别富集了 66、15、15 和 99 个下调 miRNAs 的靶基因, 推测这些下调 miRNAs 通过下调其表达量, 以解除对部分免疫相关基因的抑制, 从

而增强刺参对灿烂弧菌的抵抗能力。同时, 分别有 38 和 26 个上调 miRNA 的靶基因注释到了泛素介导的蛋白水解和 Notch 信号通路等细胞免疫相关通路, 推测这些 miRNA 及其靶基因广泛参与了上述信号通路的负调控过程, 从而使刺参体壁组织免疫活性和新陈代谢过程受到灿烂弧菌的抑制。He 等(2014)对灿烂弧菌感染的刺参体腔细胞的研究表明, miRNAs 对刺参先天免疫防御的调控主要是通过调控刺参体内补体系统(complement system)和 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)信号通路中的相关因子而实现的。本研究中, TLR 信号通路富集程度较高, 但富集靶基因数较少, 其中大部分靶基因也富集在泛素介导的蛋白水解通路和 Notch 信号通路, 推测可能与所研究的样本组织差异相关, 其具体的作用机制尚需进一步的研究。

本研究通过 miRNA-mRNA 共表达网络分析发现, 泛素介导的蛋白水解是富集基因数最多的通路, 13 个 DE miRNAs 在刺参响应灿烂弧菌胁迫过程中全部参与调控泛素介导的蛋白水解, 其中 11 个下调的 DE miRNAs (Aja-miR-1559-3p、Aja-miR-7550-5p、Aja-miR-2478 和 Aja-miR-9277-3p 等)靶向结合 115 个 mRNAs, 2 个上调的 DE miRNAs (Aja-miR-184 和 Novel-217)靶向结合 19 个 mRNAs; 多数 miRNAs 下调表达以减弱对 mRNAs 的抑制作用, 从而增强相关免疫基因的表达, 少数 miRNAs 上调表达以增强对 mRNAs 的抑制。泛素介导的蛋白水解是重要的细胞免疫通路, 可以通过降解关键的调节蛋白来控制细胞的基本生命活动, 调节细胞应激反应和对病原微生物的免疫反应(陈科等, 2012), 例如, 在青虾(*Macrobrachium nipponensis*)遭受霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)感染时, 体内的泛素化蛋白可以介导机体细胞免疫以应对霍乱弧菌的感染(李席席, 2020)。上述实验结果表明, 灿烂弧菌在参与胁迫时对泛素介导的蛋白水解通路产生影响, 二者之间存在复杂的交互, 但背后的分子机制仍需进一步探明。

综上所述, 本研究对正常及灿烂弧菌胁迫的刺参体壁样品进行高通量测序, 筛选到 13 个与病原胁迫相关的 DE miRNA, 并对其靶基因进行分析, 进而对 2 条关键通路进行了基因共表达分析。研究结果不仅为刺参响应灿烂弧菌胁迫的关键调控 miRNAs 的筛选及功能研究提供了重要的信息和线索, 也为刺参-灿烂弧菌交互机制的阐明打下了基础。

参 考 文 献

AGGARWAL K, SILVERMAN N. Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB*

- Reports, 2008, 41(4): 267–277
- BETEL D, WILSON M, GABOW A, *et al.* The microRNA.org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(suppl 1): D149–D153
- BOONCHUEN P, MARALIT B A, JAREE P, *et al.* MicroRNA and mRNA interactions coordinate the immune response in non-lethal heat stressed *Litopenaeus vannamei* against AHPND-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 787
- CHEN H, XIN L, SONG X, *et al.* A norepinephrine-responsive miRNA directly promotes CgHSP90AA1 expression in oyster haemocytes during desiccation. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 64: 297–307
- CHEN K, CHENG H H, ZHOU R J. Molecular mechanisms and functions of autophagy and the ubiquitin-proteasome pathway. *Hereditas*, 2012, 34(1): 7–20 [陈科, 程汉华, 周荣家. 自噬与泛素化蛋白降解途径的分子机制及其功能. *遗传*, 2012, 34(1): 7–20]
- GUO R, DU Y, ZHOU N H, *et al.* Comprehensive analysis of differentially expressed microRNAs and their target genes in the larval gut of *Apis mellifera ligustica* during the late stage of *Ascospaera apis* stress. *Acta Entomologica Sinica* 2019, 62(1): 49–60 [郭睿, 杜宇, 周倪虹, 等. 意大利蜜蜂幼虫肠道在球囊菌胁迫后期的差异表达微小 RNA 及其靶基因分析. *昆虫学报*, 2019, 62(1): 49–60]
- HE X B, JING Z Z, CHENG G F. MicroRNAs: New regulators of toll-like receptor signalling pathways. *BioMed Research International*, 2014: 945169
- KROL J, LOEDIGE I, FILIPOWICZ W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(9): 597–610
- LAN J F, ZHOU J, ZHANG X W, *et al.* Characterization of an immune deficiency homolog (IMD) in shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 41(4): 608–617
- LI C H, FENG W, QIU L, *et al.* Characterization of skin ulceration syndrome associated microRNAs in sea cucumber *Apostichopus japonicus* by deep sequencing. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(2): 436–441
- LI C, XU D X. Understanding microRNAs regulation in heat shock response in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 81: 214–220
- LI C, ZHAO M, ZHANG C, *et al.* miR210 modulates respiratory burst in *Apostichopus japonicus* coelomocytes via targeting toll-like receptor. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 65: 377–381
- LI X X. Study on pathogenicity of non-O1 *Vibrio cholerae* to *Macrobrachium nipponensis*, host immune response and probiotic effect of antagonistic bacteria. Doctoral Dissertation of Yangzhou University, 2020 [李席席. 非 O1 霍乱弧菌对青虾的致病性、宿主的免疫反应及拮抗菌的益生效果研究. 扬州大学博士研究生学位论文, 2020]
- LIANG J R. Cloning and functional analysis of immune related microRNAs in *Litopenaeus vannamei*. Doctoral Dissertation of Guangdong Ocean University, 2020 [梁金荣. 凡纳滨对虾免疫相关 microRNA 的克隆与功能分析. 广东海洋大学博士学位研究生学位论文, 2020]
- LIN D L. Absorption of milk-derived miRNAs in animals and effects of milk-derived exosomes on mice immune function. Doctoral Dissertation of Southern China Agriculture University, 2017 [林德麟. 乳源 miRNAs 在动物体内的吸收规律及乳 exosome 对小鼠免疫功能的影响. 华南农业大学博士研究生学位论文, 2017]
- LIN F. Study on the rapid detection technology and characterization of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus isolated in China. Doctoral Dissertation of Jiangsu University, 2018 [林锋. 罗氏沼虾野田村病毒致病性及其快速检测技术研究. 江苏大学博士研究生学位论文, 2018]
- LU M, ZHANG P J, LI C H, *et al.* MiR-31 modulates coelomocytes ROS production via targeting p105 in *Vibrio splendidus* challenged sea cucumber *Apostichopus japonicus* *in vitro* and *in vivo*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015a, 45(2): 293–299
- LU M, ZHANG P J, LI C H, *et al.* miRNA-133 augments coelomocyte phagocytosis in bacteria-challenged *Apostichopus japonicus* via targeting the TLR component of IRAK-1 *in vitro* and *in vivo*. *Scientific Reports*, 2015b, 5: 12608
- LV M, CHEN H H, SHAO Y N, *et al.* miR-137 modulates coelomocyte apoptosis by targeting 14-3-3ζ in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 67: 86–96
- LV Z, LI C H, ZHANG P J, *et al.* miR-200 modulates coelomocytes antibacterial activities and LPS priming via targeting Tollip in *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 431–436
- NAM J W, RISSLAND O S, KOPPSTEIN D, *et al.* Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. *Molecular Cell*, 2014, 53(6): 1031–1043
- OU J, LI Y, DING Z F, *et al.* Transcriptome-wide identification and characterization of the *Procambarus clarkii* microRNAs potentially related to immunity against *Spiroplasma eriocheiris* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013: 35(2): 607–617
- SHAO Y N, LI C H, XU W, *et al.* miR-31 links lipid metabolism and cell apoptosis in bacteria-challenged *Apostichopus japonicus* via targeting CTRP9. *Front Immunology*, 2017, 8: 263
- SHIMIZU T, TANAKA T, ISO T, *et al.* Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of *Msx2* gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(21): 19138–19148
- SIGOILLOT F D, EVANS DR, GUY H I. Growth-dependent regulation of mammalian pyrimidine biosynthesis by the protein kinase A and MAPK signaling cascades. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(18): 15745–15751
- VALLET-GELY I, LEMAITRE B, BOCCARD F. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(4): 302–313
- XIE S M. Expression characteristics and preliminary functional analysis of three genes in the lin-like growth factor system of razor clam *Simonovacula constricta*. Doctoral Dissertation of Shanghai Ocean University, 2018 [谢淑娟. 缢蛏类胰岛素生长因子系统 3 个基因表达特征及功能初步分析. 上海海洋大学博士研究生学位论文, 2018]
- XU P, GUO H, WANG H, *et al.* Identification and profiling of

microRNAs responsive to cadmium toxicity in hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Hereditas*, 2019, 156(1): 34

ZHANG C F, TONG C, TIAN F, *et al.* Integrated mRNA and microRNA transcriptome analyses reveal regulation of thermal acclimation in *Gymnocypris przewalskii*: A case study in Tibetan Schizothoracine fish. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186433

ZHANG C Y, WANG Y G, RONG X J. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative

syndrome in *Apostichopus japonicus*. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(1): 118–123 [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定. *水产学报*, 2006, 30(1): 118–123]

ZHUO M Q. Functional analysis of PI3Ks and its related signal pathway in insulin regulating lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018 [卓梅琴. 黄颡鱼 PI3Ks 功能解析及其通路在胰岛素调控脂类代谢中的作用机制. 华中农业大学博士学位研究生学位论文, 2018]

(编辑 冯小花)

Identification of Differential Expression microRNAs and Target Genes Analysis of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) in Response to *Vibrio splendidus* Infection

CHANG Mengyang^{1,2}, LI Bin^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3}, WANG Jinjin^{2,3}, YU Yongxiang^{2,3}, WANG Yingeng^{2,3}, LIAO Meijie^{2,3①}, ZHANG Zheng^{2,3}, FAN Ruiyong⁴, LIU Qingbing⁴

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable and Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Qingdao Ruizi Company, Qingdao, Shandong 266409, China)

Abstract microRNAs (miRNAs), involved in post-transcriptional gene regulation, play important roles in the growth, development, cell differentiation, and immune defense of eukaryotes. *Apostichopus japonicus* has become an economically important species for marine aquaculture in China; however, the outbreak of diseases, such as skin ulcer syndrome (SUS), has led to great losses in aquaculture development. Therefore, molecular mechanisms underlying disease occurrence must be further elucidated. In the present study, *Vibrio splendidus*, an important causative pathogen of SUS, was used as the stress strain (1×10^6 CFU/mL) in an artificial infection experiment. Body wall of the diseased (PT16S) and healthy (PT10H) samples was subjected to miRNA-Seq. Differentially expressed miRNAs (DEmiRNAs) were screened using bioinformatics. The target genes of DEmiRNAs were predicted and used for constructing miRNA-mRNA regulatory networks. Through miRNA-Seq, respectively 5 902 588 and 5 053 529 valid reads were generated for the PT10H and PT16S samples. A total of 13 DEmiRNAs ($P \leq 0.05$) were screened between PT10H and PT16S, of which two were upregulated and 11 downregulated. Target gene prediction revealed that the two upregulated DEmiRNAs bound to 3010 target genes, which were annotated to 585 GO terms and 24 signaling pathways ($P \leq 0.05$), while the 11 downregulated DEmiRNAs bound to 19 072 target genes, which were annotated to 514 GO terms and 22 signaling pathways ($P \leq 0.05$). In the validation test, the consistency rate of the sequencing and qRT-PCR data reached 70%. Two immune-related pathways (ubiquitin-mediated proteolysis and Notch signaling) were selected and used to construct the miRNA-mRNA regulatory networks. The 13 DEmiRNAs could bind 134 ubiquitin-mediated proteolytic mRNAs and 109 Notch signaling mRNAs. Specifically, Aja-miR-1559-3p, Aja-miR-7550-5p, Aja-miR-2478, and Aja-miR-9277-3p may be involved in the regulation of ubiquitin-mediated proteolysis and Notch signaling. Our results provide primary data for understanding the post-transcriptional regulatory mechanisms of diseases in sea cucumber.

Key words *Apostichopus japonicus*; microRNA; *Vibrio splendidus*; Stress response; Target genes; miRNA-mRNA network

① Corresponding author: LIAO Meijie, E-mail: liaomj@ysfri.ac.cn