

急性高温低氧胁迫下刺参体腔液细胞 miRNA 表达谱的构建和靶标基因的功能分析*

尹英超^{1,2}, 刘富祥³, 张玉钦³, 陈慕雁^{1,2**}

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学), 山东 青岛 266003; 3. 烟台中集蓝海洋科技有限公司, 山东 烟台 264000)

摘要: 为了探究刺参应对极端高温、低氧环境的内在分子调控机制, 促进刺参养殖产业的可持续发展。本研究以刺参体腔液细胞作为研究对象, 分别构建了高温、低氧下 miRNA 的差异表达谱并分析了差异表达 miRNAs 的靶基因功能。研究表明: 高温组中共发掘了 20 个差异表达 miRNA, 其中 11 个上调, 9 个下调; 低氧组中共发掘了 10 个差异表达 miRNA, 其中 6 个上调, 4 个下调。高温和低氧胁迫下共同显著差异表达的 miRNA 为: novel-23、novel-43、novel-45、novel-49、miR-200-3p、miR-71。以三代全长转录组为参考文库, 利用 miRanda 软件对差异表达 miRNA 的靶基因进行预测, 靶标基因 KEGG 富集分析显示, 高温组中共显著富集到 36 条通路, 低氧组中共显著富集到 37 条通路。其中磷脂酰肌醇激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、癌症通路(Pathways in cancer)、黏着斑(Focal adhesion)、丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway-fly)等在高温组和低氧组中均有显著富集。研究结果表明, miRNA 在刺参响应高温、低氧胁迫中参与了一系列关键的免疫相关过程的调控。

关键词: 刺参; 高温; 低氧; 体腔液细胞; miRNA; 靶基因

中图分类号: S917.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2022)04-030-13

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20210148

引用格式: 尹英超, 刘富祥, 张玉钦, 等. 急性高温低氧胁迫下刺参体腔液细胞 miRNA 表达谱的构建和靶标基因的功能分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(4): 30-42.

Yin Yingchao, Liu Fuxiang, Zhang Yuqin, et al. Construction of miRNA expression profile in coelomic fluid cells of *Apostichopus japonicus* and functional analysis of their target genes under acute heat stress and hypoxia stress[J]. Periodical of Ocean University of China, 2022, 52(4): 30-42.

刺参(*Apostichopus japonicus*)属棘皮动物门(Echinodermata)海参纲(Holothuroidea)辛那参目(Synallactida)刺参科(Stichopodidae), 广泛分布于中国、日本、韩国和俄罗斯等东北亚沿海^[1]。刺参作为底栖生物以底泥、碎屑为食, 在维持生态系统平衡中发挥着重要的作用^[2]。此外, 刺参具有很高的营养价值和药用价值, 长期以来在亚洲市场上作为一种食品和民间药物备受欢迎, 是中国重要的海水养殖经济品种之一, 目前已经成为北方水产养殖中的支柱性产业^[1,3]。

全球气候的变化导致海水温度升高和缺氧现象已成为一个世界性环境问题, 严重影响到海洋生物的生存。“厄尔尼诺”是导致太平洋海水表面温度异常升高的因素之一, 可以引发严重而广泛的天气变化, 如高温和暴雨^[4]。2013年夏末以来, 中国山东、河北两省

因“厄尔尼诺”现象引发的连续高温暴雨天气, 导致海水温度高达 30℃, 溶解氧水平降至 2 mg/L 以下; 由于刺参长期营底栖生活, 活动缓慢, 受环境因素影响非常显著, 极端高温、低氧胁迫可导致刺参大量死亡, 严重制约刺参养殖产业的可持续发展。为了给刺参应对逆境关键指标筛选和抗逆品种选育提供理论支持, 刺参在急性高温、低氧胁迫下内在分子调控机制的科学研究亟待开展。

棘皮动物通常缺乏特异性免疫, 体腔液是棘皮动物进行机体防御的重要免疫组织。刺参体腔液中悬浮着各种体腔液细胞, 同时也含有凝集素、水解酶、酚氧化酶、超氧化物歧化酶类白介素和类补体样因子等体液免疫因子, 两者共同作用负责刺参的天然免疫防御^[5-6]。已有大量研究表明棘皮动物在响应外界温度、

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31972767)资助

Supported by the National Natural Science Foundation of China(31972767)

收稿日期: 2021-04-06; 修订日期: 2021-05-07

作者简介: 尹英超(1994—), 男, 硕士生。E-mail: yingchaoyin@163.com

** 通讯作者: E-mail: chenmuyan@ouc.edu.cn

盐度、溶解氧和 pH 等环境胁迫因子时,体腔液及其细胞的相关免疫抗病能力会发生变化^[7-10]。

miRNA 是一类长度为 21~24 nt 的内源性非编码 RNA,miRNA 能够通过种子序列与特定的靶基因位点相结合,引起 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译,从而对靶基因的表达起到调节作用。目前,关于 miRNA 介导高温、低氧胁迫的调节机制在水生生物中进行了广泛研究。Zheng 等在日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)体内共发掘了 15 个 miRNA 参与高温胁迫应答,靶标基因的预测和功能分析表明这些 miRNA 参与了信号传导、转录、抗胁迫应激等细胞过程^[11]。Zhou 等研究发现虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)在致死温度 22.5 °C 胁迫 48 h 下,头、肾组织中共发掘出 12 个上调和 5 个下调的 miRNA,6 个差异表达的 miRNA 共预测到 22 个靶基因,注释结果表明在热应激下 miRNA 主要参与了虹鳟鱼的代谢和免疫反应^[12]。Hadj-Moussa 等发现 miRNA 调控的代谢抑制是保障洪堡鲑鱼(*Dosidicus gigas*)能够在缺氧水域生存的重要机制,在缺氧诱导下鲑鱼的大脑、外套膜肌肉和心脏中表达量变化的 miRNA 主要参与了关键细胞功能维持和细胞保护的过程^[13]。Wang 等在南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)应对缺氧的研究中,鉴定出许多与缺氧耐受相关的 miRNA,其差异表达的 miRNA 可能通过调节应激反应基因(如 *HIF1a* 和 *p53*)的表达来调节宿主对缺氧的反应,并影响与缺氧适应相关的关键细胞事件^[14]。Sun 等在黑鲈(*Micropterus salmoides*)缺氧胁迫的研究中筛选出的 13 个差异表达的 miRNAs 的靶基因在血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和磷脂酰肌醇信号系统中显著富集^[15]。关于刺参 miRNA 研究起步较晚,最早于 2012 年 Li 等从刺参的体腔液细胞中鉴定到 miRNAs^[16],之后的研究表明 miRNA 广泛参与了刺参补体系统、脂多糖以及 Toll 样受体的调控^[17-22]。近年来,关于 miRNA 在刺参响应环境胁迫中的调控作用研究也相继开展。Li 等构建了刺参在高温胁迫下的 miRNA 表达谱,发现大量差异表达的 miRNA 参与免疫过程相关的调节^[23];Huo 等在刺参缺氧胁迫研究中发现 miRNA 可能在氧化还原、运输以及耐缺氧胁迫中发挥作用^[24]。Tian 等研究发现 miR-10 可能通过靶标 *TBC1D5* 基因参与低盐胁迫下刺参的能量调节,并在维持细胞稳态方面起到了关键作用^[25]。Huo 等以刺参呼吸树为研究对象,构建了在高温、低氧胁迫下刺参的 miRNA 表达谱,并在高温(26 °C)、低氧(2 mg/L)和高温低氧复合胁迫条件下,分别鉴定出 21、26 和 22 个差异表达 miRNA,GO 和 KEGG 通路分析显示差异 miRNA 的潜在靶基因参与了生物合成、代谢、免疫、细

胞生长和死亡、翻译及信号转导等过程^[26]。

本研究以刺参高温、低氧胁迫下的体腔液细胞为研究对象(由于高温低氧协同组的刺参全部死亡,无法进行后续的研究),采用 Illumina 测序技术,结合生物信息学分析,构建了刺参在高温、低氧胁迫下的 miRNA 表达谱,使用 miRanda 软件,以构建的三代全长转录组为参考文库,预测了差异表达 miRNA 的靶标基因,并对候选靶标基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,发掘了刺参在高温、低氧胁迫下的差异 miRNA 参与调控的关键通路,探讨了 miRNA 在刺参体腔液细胞响应高温、低氧胁迫中的潜在调控机制,为筛选刺参抗逆关键指标提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物暂养 实验所用的成熟刺参于 2019 年 4 月采集于威海刺参养殖场,低温运到实验室。挑选 120 头健康无病、发育良好的刺参(体质量(120±20)g)分别放入 12 个大小、形状、材质一致的蓝色避光的养殖水箱中,每个水箱中放置 10 头刺参,为了消除环境因素的差异,在海边收集大小不一的碎石经消毒清洗后,放入水箱中供刺参附着,箱内水温(*T*)为(15±1)°C,盐度为 30±1,pH 为 8.0±0.5,充气保持溶解氧(DO)为 8 mg/L,在此环境中驯化 2 周。期间每日上午定时清除水箱底部的粪便和剩余的饲料,饲料与底泥按 1:3 比例混合投喂。

1.1.2 实验处理 对照组的条件设置为 *T*=15 °C、DO=8 mg/L,高温处理组 *T*=30 °C,DO=8 mg/L,低氧处理组 *T*=15 °C,DO=2 mg/L,高温低氧处理组 *T*=30 °C,DO=2 mg/L。高温设置方法为使用功率 1 000 W 的加热棒加热来达到实验所需的水温,并通过控温器来保持水温,水温升高速率为 2 °C/h。低氧设置方法为向水体中充入氮气,控制氮气充入速率,使溶解氧下降速率保持在 0.8 mg/L。达到实验所需溶氧条件后,使用塑料薄膜覆盖水箱的水面,在低氧胁迫期间使用便携式溶氧仪实时监测溶解氧水平。对照组和实验组分别设置 3 个平行,对照组和实验组在达到所需温度溶氧条件后 48 h 进行取样。

1.1.3 样品收集 每个平行组中取 4 头刺参,设 3 个平行组,每个处理组共取 12 头刺参。将每个刺参的体腔液分别取 3 份,每份体积为 1 mL,在 4 °C,1 000 r/min 的冷冻离心机中离心 30 s,去掉上清液后将剩余细胞混合,加入 1 mL 的 Trizol 试剂,立即放入液氮中速冻后转入 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。由于刺参无法耐受 48 h 的高温低氧(*T*=30 °C,DO=2 mg/L)的协同作用而全部死亡,无法取得该实验组样品进行后续分析。

1.2 RNA 文库构建

采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,具体步骤见李兴可等^[27]。使用 Nanodrop 检测 RNA 的纯度(OD260/280 比值);使用 Qubit 对 RNA 浓度进行精确定量;使用 Agilent 2100 精确检测 RNA 的完整性。使用 NEB-Next® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina®(NEB, USA)生成测序文库,文库中对照组为 CO1、CO2、CO3,高温组为 HS1、HS2、HS3,低氧组为 HY1、HY2、HY3,建库流程如图 1 所示。

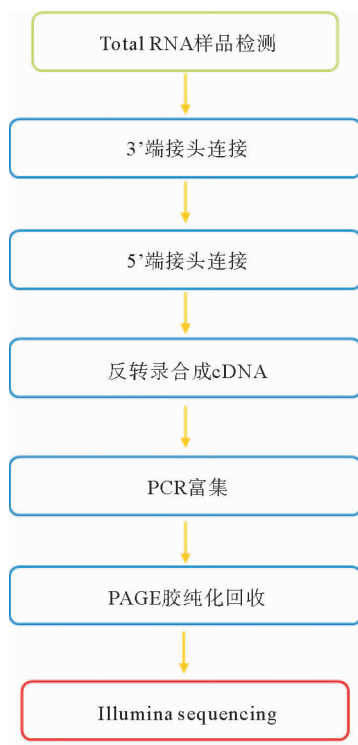


图 1 Illumina 样品检测、建库和测序的流程图

Fig.1 Flow chart of Illumina sample detection, database construction and sequencing

1.3 miRNA 测序与数据分析

采用 Illumina Hiseq 2500 进行 miRNA 测序,去除低质量的 reads(质量值小于等于 20 的碱基占整个 reads 的 30%以上);去除 N(N 表示无法确定碱基信息)的比例大于 10%的 reads;去除接头污染的 reads;去除 3'接头序列;去除 polyA/T/G/C 的 reads。选择一定长度的 clean reads 用于下游的分析,miRNA 的长度集中在 21~22 nt。将小 RNA 标签映射到 Repeat-Masker 和 Rfam 数据库,除去源自蛋白质编码基因、重复序列、rRNA、tRNA、snRNA 和 snoRNA 等。用 bowtie 将长度筛选后的 sRNA 定位到刺参基因组(NCBI BioProject ID: 29023486)序列上,分析 small RNA 在参考序列上的分布情况。

1.4 miRNA 的鉴定和差异表达分析

使用 miRBase20.0 作为参考,鉴定已知的 miRNA;

结合 miRNA 前体发夹结构特征,采用软件 miREvo 和 mirdeep2 预测新的 miRNA。将所有 sRNA 标签与成熟 miRNA 进行比对,检测可能有碱基编辑的 miRNA,已知的 miRNA 使用 miFam.dat(<http://www.mirbase.org/ftp.shtml>)查找家族。将新的 miRNA 前体提交到 Rfam 库(<http://rfam.sanger.ac.uk/search/>),以寻找 Rfam 家族。根据下面算法,应用 TPM(每百万转录本)估算 miRNA 表达水平。

规范化表达式 = (映射的读数/总读数) × 1 000 000。

使用 DESeq R 软件包(1.8.3)对两个实验组进行差异表达分析。使用 Benjamini&Hochberg 方法调整 P 值。默认情况下, $P < 0.05$ 为显著差异表达。

1.5 靶标基因的预测和分析

利用 miRanda 分析软件,以前期构建的三代全长转录组数据作为参考文库,从中提取 3'非编码区域,预测靶标基因。将筛选参数设置为自由能小于 -83.68 kJ/mol 和得分阈值大于 140。

1.6 GO 和 KEGG 富集分析

基于 GOseq 的 Wallenius 非中心超几何分布调整基因长度偏差,用于 GO 富集分析。Pathway 显著性富集分析以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,该分析计算公式如下:

$$p = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

得到的 P 值经 Bonferroni 方法校正,以校正后的 P 值小于 0.05 定义为显著富集的 pathway。

1.7 qRT-PCR 验证

应用 SYBR® Premix Ex Taq™ II Kit(Takara, Japan, Cat No.RR820)试剂盒,分别取刺参对照组、高温组、低氧组的样品各 5 个平行,每个平行样品设置 3 个技术重复,将成熟 miRNA(21~23 nt)的完整序列用作 miRNA 特异性 5'端引物,引物序列如表 1 所示。

qPCR 的 3'端引物使用试剂盒提供的 mRQ 3'通用引物,以 U6 作为内参基因,其引物序列为: F:GGAACGATACAGAGAAGATTAGC, R: TGGAACGCTTCACGAATTTGCG。变性的反应条件:95 °C 10 s, 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环。融解曲线的反应条件:95 °C 60 s, 55 °C 30 s, 95 °C 30 s。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miRNA 的相对表达水平,使用单因素方差分析 miRNA 的组间差异显著性,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

表 1 miRNA qRT-PCR 的引物序列
Table 1 Primer sequences of miRNA for qRT-PCR

miRNA 名称 miRNA ID	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
spu-miR-133	TTTGGTCCCCTTCAACCAGCCGT
spu-miR-71	TGAAAGACATGGGTAGT- GAGATT
spu-miR-10	AACCCTGTAGATCCGAATTT- GTG
spu-miR-2012	TAGTACTGGCATATGGACATTG
spu-miR-200-3p	TAATACTGTCTGGTGATGAT- GTT
spu-miR-2006	GAGCACACTTGGTAGCGGTGCC
Novel-43	AAGCACCAGTTAAAATCAGAGC
Novel-32	CTATACAACCTGCTAGCTTTCC

2 结果与分析

2.1 测序结果分析

建库之后,利用 Illumina HiSeq™ 2500 测序平台将原始图像数据文件经过碱基识别转化为测序序列,

得到的 Raw Data 以 FASTQ 格式储存,原始数据已上传至 NCBI (BioProject ID: PRJNA723369, SubmissionID: SUB9504899)。检查测序错误率异常的碱基位置分布,发现 9 个文库测序结果中每个位置碱基的错误率都低于 0.5%,详细结果见附表 1。

2.2 sRNA 的测序分析结果

为了保证信息分析的质量,对得到的 Raw Data 数据进行过滤,得到 Lean Data,筛选出 sRNA 进行后续的分析,详细结果见附表 2。

用 bowtie 将长度筛选后的 sRNA 比对到刺参参考基因组序列上,发现每组中 90% 以上 sRNA 能够比对上参考基因组,其中 HY3 组能比对到参考基因组的数量最少(91.96%),HY1 组能比对上参考基因组的数量最多(98.27%),与参考基因组方向相同链的 reads 数占全部 clean reads 数的 83% 以上,方向相反链的 reads 数占全部 clean reads 数的 10% 以下,结果如表 2 所示。

2.3 已知 miRNA 与 ncRNA 分析

所有样本中共比对到 33 个已知的 miRNA,比对上的 sRNA 的种类有 3 242 种。对 Novel miRNA 成熟体、前体、种类和总数进行统计,详细结果见附表 3。总共匹配到的前体和成熟体的数目分别为 149 和 159,详细结果见附表 4。

表 2 sRNA 与参考基因组比对结果统计

Table 2 Statistics of mapping results of sRNA with reference genome

样品 Sample	总 sRNA Total sRNA	比对到的 sRNA Mapped sRNA	比对到正链的 sRNA “+” Mapped sRNA	比对到负链的 sRNA “-” Mapped sRNA
CO2	11 016 044(100.00%)	10 343 895(93.90%)	9 591 353(87.07%)	752 542 (6.83%)
CO1	15 554 962(100.00%)	14 919 321(95.91%)	13 999 821(90.00%)	919 500 (5.91%)
CO3	15 049 440(100.00%)	14 420 112(95.82%)	13 468 907(89.50%)	951 205 (6.32%)
HY1	14 865 263(100.00%)	14 607 372(98.27%)	14 348 159(96.52%)	259 213 (1.74%)
HY2	12 728 382(100.00%)	11 839 746(93.02%)	10 567 484(83.02%)	1 272 262 (10.00%)
HY3	12 610 996(100.00%)	11 596 593(91.96%)	10 761 574(85.33%)	835 019 (6.62%)
HS2	10 371 759(100.00%)	9 971 075(96.14%)	9 234 829(89.04%)	736 246 (7.10%)
HS1	13 295 775(100.00%)	12 497 309(93.99%)	11 423 831(85.92%)	1 073 478 (8.07%)
HS3	11 923 768(100.00%)	11 474 605(96.23%)	10 785 598(90.45%)	689 007 (5.78%)

2.4 miRNA 家族分析

对检测到的已知 miRNA 和新预测到的 miRNA 进行家族分析,结果显示,已知 miRNA 和新 miRNA 总共属于 31 个不同的 miRNA 家族,其中 let-7 在物种中的分布最丰富。大多数 miRNA 只检测到一个前体,miR-10、miR-124 和 miR-25 检测到 3 个前体。miRNA 家族分析部分结果见附表 5。

2.5 miRNA 差异表达分析

在 HS 组中共发掘出 20 个差异表达的 miRNA,其中 11 个上调,9 个下调;在 HY 组中共发掘出 10 个差异表达的 miRNA,其中 6 个上调,4 个下调(见表 3)。两组中共同差异表达的 miRNA 有 6 个: novel-23、novel-43、novel-45、novel-49、miR-200-3p 和 miR-71。为验证结果的准确性,分别从高温组和低氧组中随机

表3 高温组和低氧组差异表达 miRNA 的详细结果

Table 3 Detailed results of miRNAs differential expressed in the heat stress group and the hypoxia group

miRNA 名称	倍数变化	P 值
miRNA ID	Fold change	P-value
高温组(Heat stress)		
Novel-135	-2.673 6	0.000 199 45
Novel-32	-2.670 2	$5.92 \times e^{-19}$
Novel-49	-2.520 9	$4.30 \times e^{-10}$
Novel-45	-2.261 4	$8.72 \times e^{-8}$
Novel-193	-1.760 3	0.002 985 8
Novel-23	-1.641 4	$2.76 \times e^{-16}$
miR-375	-1.547 3	0.000 132 11
Novel-131	-1.299 5	0.020 634
Novel-29	-0.918 78	0.033 81
Novel-7	-0.532 85	0.003 897 5
Novel-5	-0.482 12	0.040 332
miR-200-3p	0.432 84	0.049 094
miR-71	0.449 37	0.010 463
Novel-16	0.501 29	0.007 419 1
miR-2012	0.575 97	0.022 17
miR-10	0.652 2	0.009 155 5
Novel-1	0.682 07	0.003 516 2
Novel-43	0.881 64	0.008 831 6
Novel-21	1.556 2	0.007 161
miR-133	1.932 3	0.000 204 57
低氧组(Hypoxia)		
Novel-49	-2.248 2	0.000 156 18
Novel-23	-1.740 5	$8.10 \times e^{-6}$
Novel-45	-1.678 5	0.001 499 2
miR-92c	-0.664 2	0.035 287
miR-200-3p	0.859 72	0.013 822
miR-71	0.953 84	0.009 448 5
miR-1	1.258 7	0.000 286 53
Novel-43	1.682 5	0.000 268 72
miR-2006	2.125 9	0.006 092 1
Novel-160	2.225 7	0.010 251

注:表头中倍数变化是指样本间表达量的差异倍数,对其取以 2 为底的对数。

Note:Multiple change in the header refers to the difference multiple of expression quantity between samples, which is taken as the logarithm based on 2.

选取了 10 个差异 miRNA,其中高温组选取 miR-133、miR-71、miR-10、miR-2012、miR-200-3p 和 Novel-32,低氧组选取 miR-2006、miR-71、miR-200-3p 和 Novel-

43,利用荧光定量 PCR 进行验证。结果表明,高通量测序结果和 qRT-PCR 结果趋势相同(见图 2)。

2.6 靶基因预测和功能富集分析

我们以刺参的三代全长转录组中的 191 141 个转录本作为参考文库,预测差异表达 miRNA 的靶基因。结果表明,高温组中 20 个差异表达 miRNA 共预测到 14 827 个靶基因,低氧组中 10 个差异表达的 miRNA 共预测到 8 577 个靶基因。

我们对每组的差异表达 miRNA 的靶基因分别进行了 GO 和 KEGG 富集分析。富集分析结果显示,在高温胁迫组中,差异表达 miRNA 的靶向基因在细胞组分中聚类最明显的是细胞成分,在分子功能项中聚类最明显的是转运活性和跨膜转运体活性(Transmembrane transporter activity),在生物学进程中跨膜运输(Transmembrane transport)聚类最为明显。在低氧胁迫组中,差异表达 miRNA 的靶向基因在细胞组分中聚类最显著的是细胞成分和膜部分(Membrane part);在分子功能项中聚类最显著的是转运活性,在生物学进程中内肽酶活性(Endopeptidase activity)聚类最显著,详细结果如图 3 所示。

KEGG 富集分析结果显示,高温组中显著富集的通路有 36 个,其中富集到基因数目较多的通路主要集中在磷脂酰肌醇激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、癌症通路(Pathways in cancer)、内质网蛋白质加工(Protein processing in endoplasmic reticulum)和黏着斑(Focal adhesion)。在低氧组中显著富集的通路有 37 个,富集靶基因数目较多的通路主要集中在黏着斑(Focal adhesion)、癌症通路、磷脂酰肌醇激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路和丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway-fly),结果如图 4 所示。

3 讨论

随着高通量测序技术的快速发展,刺参不同组织中(肠道、肌肉、体壁、管足以及体腔液等)miRNA 表达谱得到广泛的构建^[22],表达谱分析表明 miRNA 在刺参生物学过程中具有潜在的关键调控作用,但在刺参体腔液细胞中 miRNA 响应高温、低氧胁迫的调控机制的研究还少有报道。

体腔液作为刺参内外环境的渗透介质,外界环境的变化可能影响体腔液细胞的活性和功能,高温和低氧是目前影响刺参生存最重要的环境因子。本研究共构建了 9 个刺参体腔液细胞的 miRNA 文库,测序结果显示大部分成熟体 miRNA 长度分布在 21~23 nt,峰值大小为 22 nt,这与大部分海洋无脊椎动物的研究结果相似,略微的差异可能是由物种差异和组织特异性导致的。

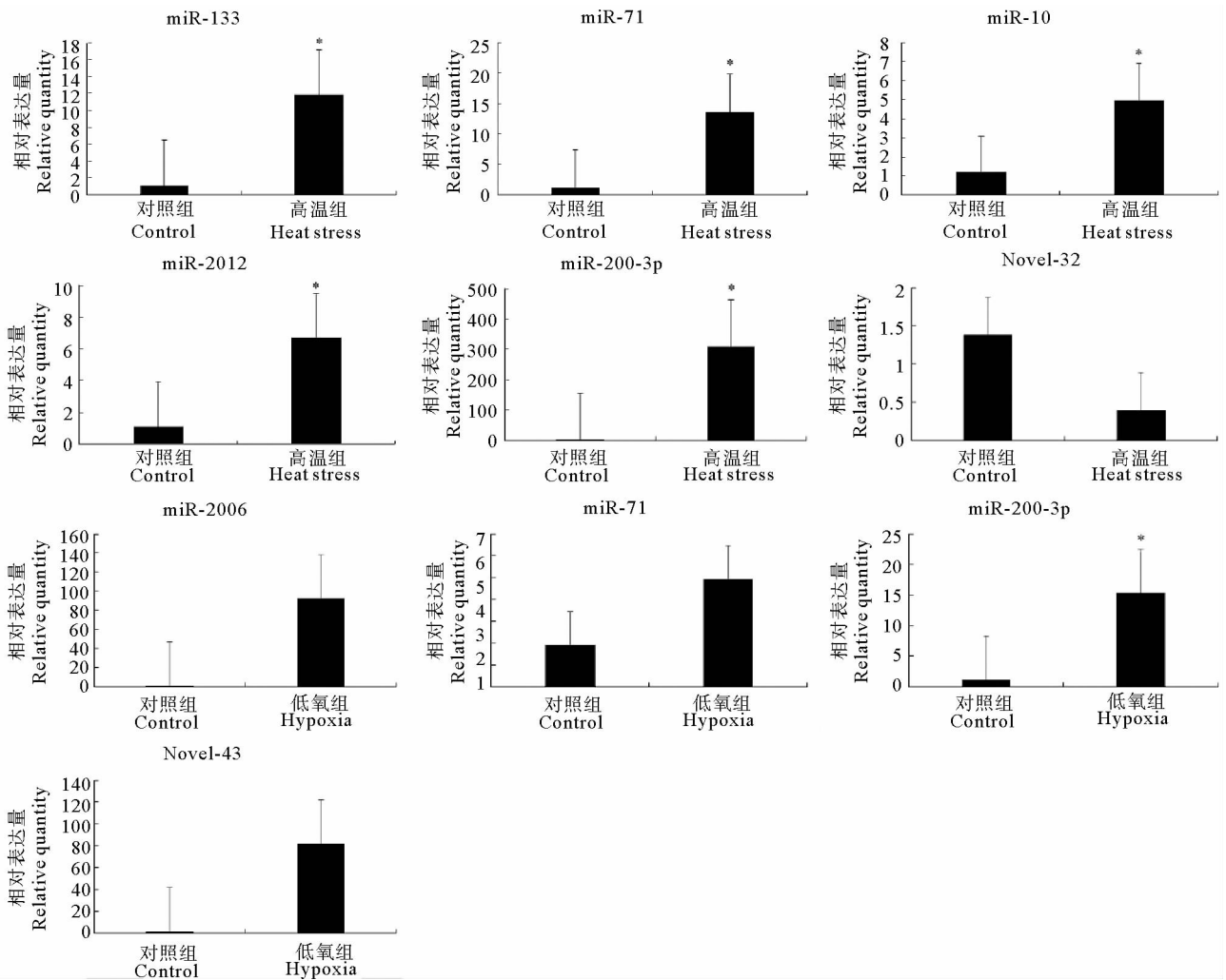


图2 差异表达 miRNAs 的 qRT-PCR 验证结果

Fig.2 The differentially expressed miRNAs confirmation by qRT-PCR

本研究从刺参的体腔液细胞中共鉴定到 33 个已知的 miRNA 和 149 个 Novel miRNA。多数 miRNA 在各物种中是高度保守的,发挥了广泛而重要的调控作用。其中高温组中 miR-133、miR-10、miR-2012、miR-200-3p、miR-71 和低氧组中 miR-1、miR-2006、miR-200-3p、miR-71 都有显著差异表达。有研究表明,miR-10 是刺参体腔液细胞中最丰富的 miRNA^[16],且在细胞凋亡^[28]、蛋白合成^[29]、胚胎发育和分化^[30-31]、造血干细胞调动^[32]和炎症^[33]等生物过程中发挥着重要的调控作用,这表明 miR-10 在刺参响应高温胁迫中同样可能参与调控多个生理学过程。De Lencastre et al 等研究发现 miR-71 与细胞的衰老和 DNA 损伤反应有关^[34],另有研究发现 miR-71 同样可以增强对热休克和氧化应激的抗性^[35]。Huo 等最近研究发现 miR-71 家族成员在高温胁迫中是显著上调的^[26],这和本文的结果一致,也暗示了本研究中 miR-71 在刺参响应高温、低氧胁迫下的潜在功能。miR-1 已被证实与凋亡相关基因如热休克蛋白基因相关,并间接调节 eNOs 以及细

胞凋亡^[36],以往研究也发现刺参呼吸树中 miR-1 在低氧胁迫下显著上调^[24],这和本文的研究结果一致。miR-133 家族因为在抑制人类癌症发生中的关键作用被充分研究^[37],在心肌细胞中 miR-133 通过靶向 Hsp70 抑制细胞凋亡^[38],相关研究还直接证明 miR-133 通过靶向 AjIRAK-1 参与 Toll 样受体(TLR)级联调节,从而促进刺参体腔液细胞吞噬功能^[39]。本研究中 miR-133 在高温胁迫下显著上调,这暗示了 miR-133 可能参与了高温胁迫下体腔液细胞抗凋亡过程和免疫应激。miR-200 家族是哺乳动物中最著名的 miRNA 家族之一。作为该家族的重要一员,miR-200-3p 被报道参与细胞增殖、凋亡和肿瘤发生等生物学过程^[40-41]。本课题组在刺参夏眠的研究中也发现了 miR-200-3p 能够通过靶向 AjEH-HADH 和 AjCA 参与刺参夏眠期间氧化损伤和细胞周期调控^[42-43]。在本研究中,miR-200-3p 在高温和低氧胁迫下均显著上调,揭示了 miR-200-3p 可能在刺参响应高温、低氧胁迫下参与了广泛的生物学功能调节。目前关于 miR-2012 的功能研究还有待开展。

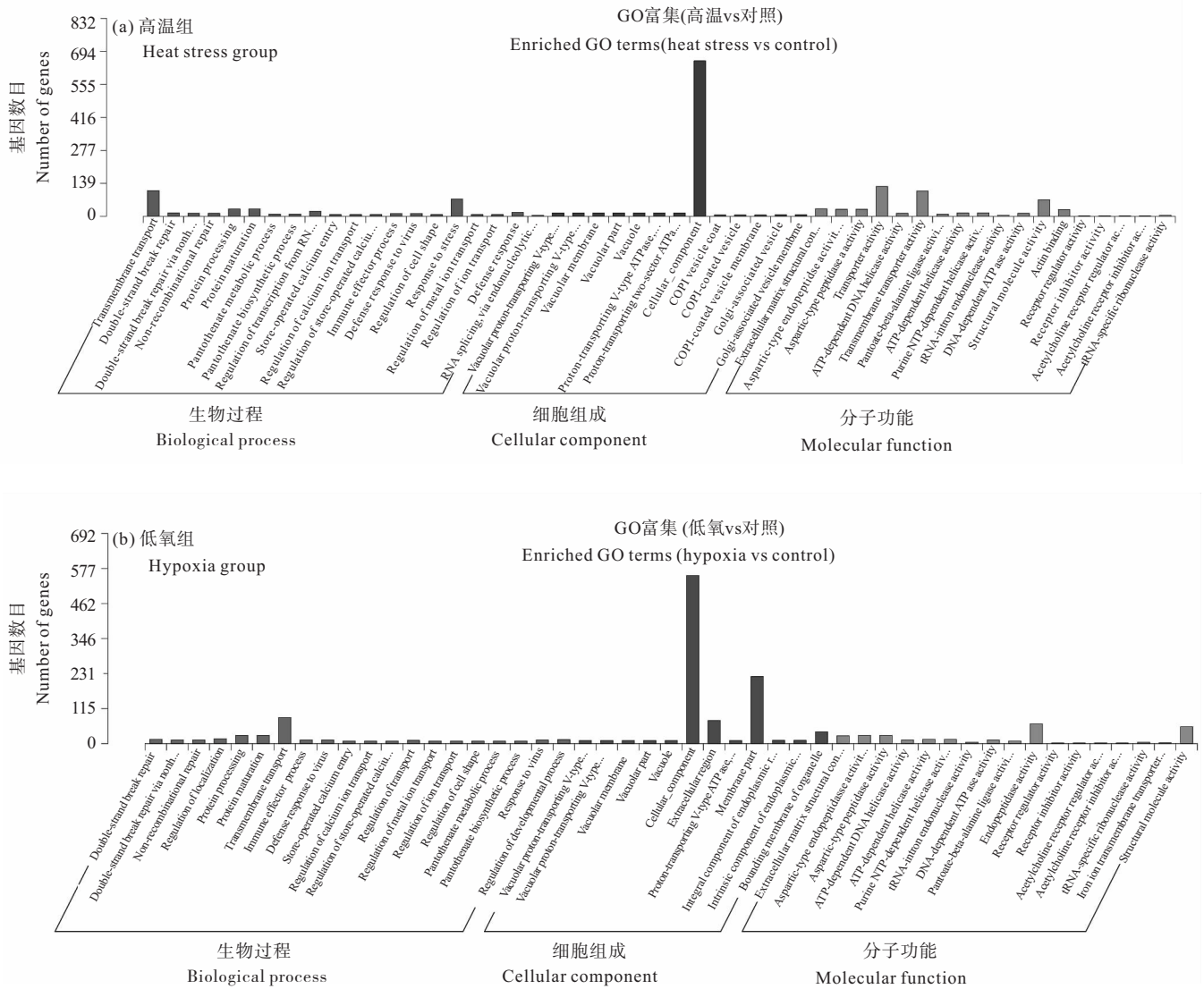
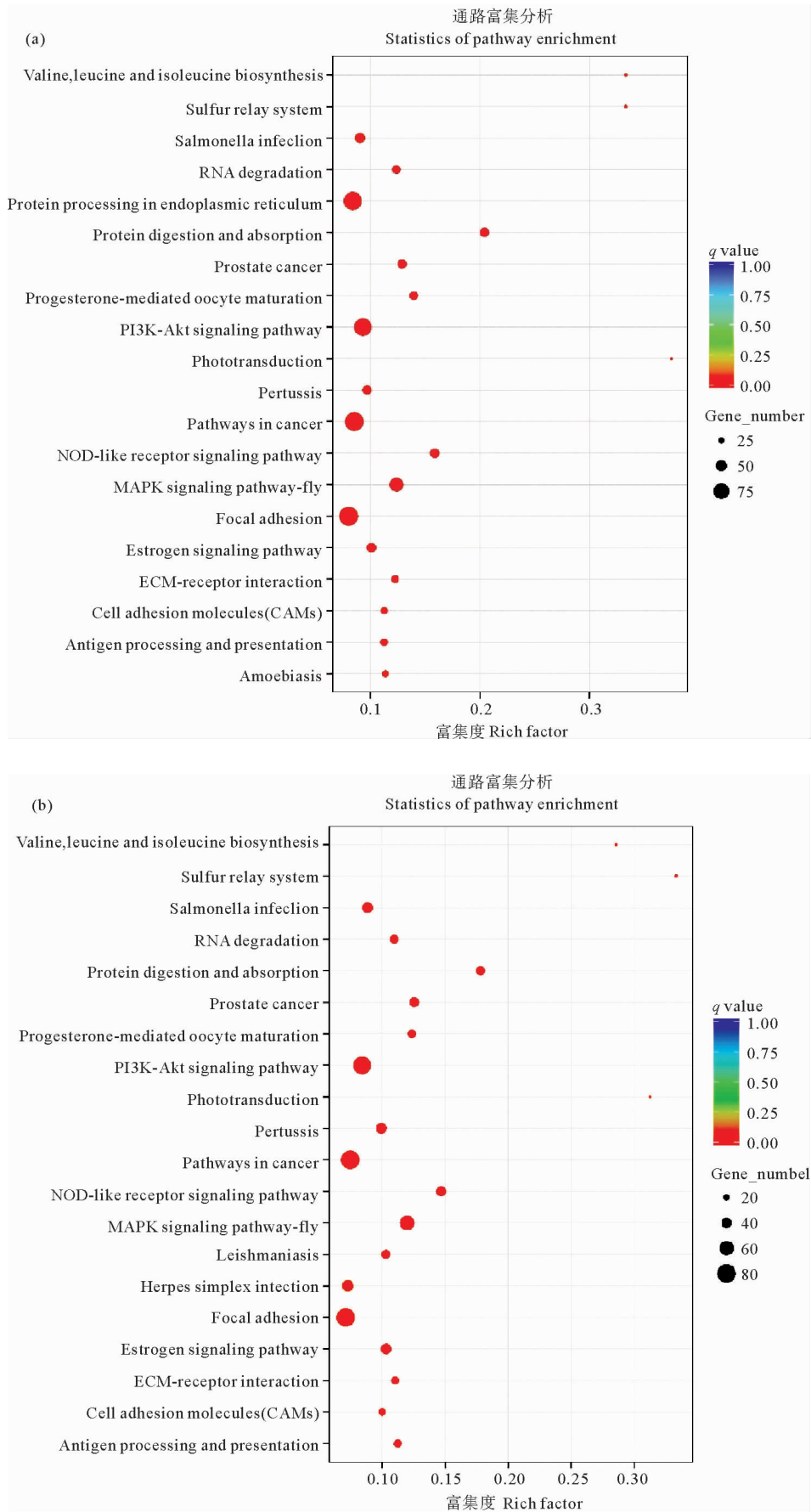


图3 差异表达 miRNA 靶基因的 GO 富集分析

Fig.3 GO enrichment analysis of differentially expressed miRNA target genes heat stress

为进一步发掘 miRNA 潜在的调控机制,我们以三代转录组数据为参考文库,预测了差异表达 miRNA 的候选靶基因。单个 miRNA 可以靶向多个靶基因,每个靶基因也可以被多个 miRNA 调控,因此,miRNA 通过介导复杂的网络结构发挥调控功能。靶基因 GO 分析结果显示,大多数靶基因与细胞组分、转运以及跨膜转运活性有关。靶基因 KEGG 通路富集分析发现多数基因在丝裂原活化蛋白激酶信号通路、磷脂酰肌醇激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶信号通路、寡聚化核苷酸结合结构域样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、黏着斑等信号通路中显著富集。MAPK 级联协同传递各种细胞外信号,从而控制大量不同甚至相反的细胞过程,如增殖、分化、生存、发育、应激反应和凋亡^[44],有研究发现 MAPK 在调节凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)等多种水生生物的先天免疫过程中发挥着重要作

用^[45-46]。同样在刺参体腔液高温胁迫的研究中发现 p44/42MAPK 可能通过靶向 p90RSK 参与温度诱导的代谢抑制^[47]。PKB/Akt 通路同样能够介导多种细胞功能,包括血管生成、代谢、生长、增殖、存活、免疫、转录和细胞凋亡^[48],在水产动物的研究中发现 Akt 基因可能参与介导水产动物机体的免疫防御。如香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)在受到溶藻弧菌等病原菌感染后,其体内 Akt 基因表达上调^[49]。研究发现海胆中第二大免疫受体家族是 NOD-like 受体(NLRs),而在哺乳动物中的 NLRs 通过充当支架蛋白来组装蛋白复合物,从而激活 NFκB 和 MAPK 信号通路,在免疫应答中发挥作用^[6]。在刺参研究中同样发现 AjNLRP10 蛋白参与了对细菌感染的先天免疫应答^[50]。这些都表明了本研究中 miRNA 通过靶向这些免疫相关通路参与刺参响应高温、低氧胁迫下的信号传导、氧化应激以及免疫反应等过程。



((a)高温组;(b)低氧组。(a) Heat stress group;(b) Hypoxia group.)

图4 差异表达 miRNAs 靶基因 KEGG 富集分析

Fig.4 KEGG enrichment analysis of target genes of differentially expressed miRNAs

4 结语

本研究以高温组、低氧组和对照组的体腔液细胞为研究对象,利用 Illumina 测序平台构建了 9 个 miRNA 文库,有效补充了刺参体腔液细胞的 miRNA 表达谱,并筛选了在高温胁迫和低氧胁迫下差异表达的 miRNAs。基于差异表达的 miRNAs,以三代全长转录组为参考文库预测了其候选靶基因,KEGG 富集分析表明靶基因主要参与了刺参应激、存活和免疫等重要生物学过程,进一步揭示了差异表达的 miRNAs 在刺参应对高温胁迫和低氧胁迫过程中的重要调控作用。后期将利用功能实验验证关键 miRNAs 及其靶基因的互作关系,进一步探讨关键差异 miRNA 在刺参应对高温、低氧逆境过程中的调控作用,以期为刺参应对高温、低氧逆境关键分子标记的筛选和刺参抗逆品种与品系的选育提供理论指导。

参考文献:

- [1] Chang Y, Feng Z, Yu J, et al. Genetic variability analysis in five populations of the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) from China, Russia, South Korea and Japan as revealed by microsatellite markers[J]. *Marine Ecology*, 2009, 30(4): 455-461.
- [2] 王智诚. 中国刺参与俄罗斯刺参杂交优势的分子机理研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2018.
Wang Z. The Research on Heterosis of Molecular Mechanism for Chinese Sea Cucumber, Russian Sea Cucumber and Their Hybrids [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2018.
- [3] Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review[J]. *Marine Drugs*, 2011, 9(10): 1761-1805.
- [4] Jacox M G. Marine heatwaves in a changing climate[J]. *Nature*, 2019, 571(7766): 485-487.
- [5] Beck G, Habicht G S. Isolation and characterization of a primitive interleukin-1-like protein from an invertebrate, *Asterias forbesi*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986, 83: 7429-7433.
- [6] Smith L C, Ghosh J, Buckley K M, et al. Echinoderm immunity [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010, 708(2): 260-301.
- [7] 李明. 几种环境因子及药物残留对刺参体内活性氧产生的影响研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2016.
Li M. Effects Research of Environmental Factors and Drug Residues on the Production of ROS by the Coelomocytes of *Apostichopus japonicus*[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016.
- [8] 董晓亮, 李成林, 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参非特异性免疫酶活性及抗菌活性的影响[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 82-87.
Dong X, Li C, Zhao B, et al. Effects of low salinity stress on the activities of non-specific immune enzymes and antibacterial activity of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 82-87.
- [9] Wang F, Yang H, Fei G, et al. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(4): 491-498.
- [10] Suh S S, Hwang J, Park M, et al. Hypoxia-modulated gene expression profiling in sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) immune cells[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2014, 109: 63-69.
- [11] Zheng J, Cao J, Mao Y, et al. Identification of microRNAs with heat stress responsive and immune properties in *Marsupinaeus japonicus* based on next-generation sequencing and bioinformatics analysis: Essential regulators in the heat stress-host interactions [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 81: 390-398.
- [12] Zhou C, Zhou P, Ren Y, et al. Physiological response and miRNA-mRNA interaction analysis in the head kidney of rainbow trout exposed to acute heat stress[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 83: 134-141.
- [13] Hadj-Moussa, Hanane, Logan S M, et al. Potential role for microRNA in regulating hypoxia-induced metabolic suppression in jumbo squids[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms*, 2018, 1861(6): 586-593.
- [14] Wang W, Zhong P, Yi J, et al. Potential role for microRNA in facilitating physiological adaptation to hypoxia in the Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 361-369.
- [15] Sun J, Zhao L, He K, et al. MicroRNA regulation in hypoxic environments: Differential expression of microRNAs in the liver of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(6): 2227-2242.
- [16] 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.
- [17] Lu M, Zhang P, Li C, 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[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 12608.
- [18] Zhong L, Zhang F, Zhai Y, et al. Identification and comparative analysis of complement C3-associated microRNAs in immune response of *Apostichopus japonicus* by high-throughput sequencing [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17763.
- [19] Zhang P, Li C, Zhang R, et al. The roles of two miRNAs in regulating the immune response of sea cucumber [J]. *Genetics*, 2015, 201(4): 1397-1410.
- [20] 杜晓丽, 邵洁, 许艺迪, 等. 温度变化对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 补体 Ajc3 mRNA 和 MicroR-137 活性的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(12): 3380-3383.
Du X, Shao J, Xu Y, et al. Effect of temperature changes on activity of complement Ajc3 mRNA and MicroR-137 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(12): 3380-3383.
- [21] Li C H, Zhao M R, Zhang C, et al. miR210 modulates respiratory burst in *Apostichopus japonicus* coelomocytes via targeting Toll-like receptor[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 65: 377-381.
- [22] Sun H, Zhou Z, Dong Y, et al. Expression analysis of microRNAs related to the skin ulceration syndrome of sea cucumber

- Apostichopus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 49: 205-212.
- [23] Li C, Xu D. Understanding microRNAs regulation in heat shock response in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 81: 214-220.
- [24] Huo D, Sun L, Li X, et al. Differential expression of miRNAs in the respiratory tree of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* under hypoxia stress[J]. G3-Genes Genomes Genetics, 2017, 7(11): 3681-3692.
- [25] Tian Y, Shang Y, Guo R, et al. Salinity stress-induced differentially expressed miRNAs and target genes in sea cucumbers *Apostichopus japonicus*[J]. Cell Stress and Chaperones, 2019, 24(4): 719-733.
- [26] Huo D, Sun L, Sun J, et al. Sea cucumbers in a high temperature and low dissolved oxygen world: Roles of miRNAs in the regulation of environmental stresses[J]. Environmental Pollution, 2021, 268: 115509.
- [27] 李兴可. miR-200-3p 在夏眠刺参 *Apostichopus japonicus* 代谢减退期间基因表达抑制中作用的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2016.
Li X. Preliminary Study on the Regulation of miR-200-3p in Gene Expression During Aestivation of *Apostichopus japonicus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2016.
- [28] Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, et al. Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway[J]. Cancer Research, 2007, 67(22): 10782-10788.
- [29] Ørom U A, Nielsen F C, Lund A H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation[J]. Molecular Cell, 2008, 30(4): 460-471.
- [30] Tzur G, Levy A, Meiri E, et al. MicroRNA expression patterns and function in endodermal differentiation of human embryonic stem cells[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3726.
- [31] Woltering J M, Durston A J, David R. MiR-10 represses HoxB1a and HoxB3a in zebrafish[J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1396.
- [32] Jin P, Wang E, Ren J, et al. Differentiation of two types of mobilized peripheral blood stem cells by microRNA and cDNA expression analysis[J]. Journal of Translational Medicine, 2008, 6: 39.
- [33] Bai G, Ambalavanar R, Wei D, et al. Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain[J]. Molecular Pain, 2007, 3(1): 15.
- [34] De Lencastre A, Pincus Z, Zhou K, et al. MicroRNAs both promote and antagonize longevity in *C. elegans*[J]. Current Biology, 2010, 20(24): 2159-2168.
- [35] Boulias K, Horvitz H R. The *C. elegans* microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO[J]. Cell Metabolism, 2012, 15(4): 439-450.
- [36] He B, Xiao J, Ren A J, et al. Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning[J]. Journal of Biomedical Science, 2011, 18(1): 22.
- [37] Nohata N, Hanazawa T, Enokida H, et al. MicroRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: Dysregulation and functional roles in human cancers[J]. Oncotarget, 2012, 3(1): 9-21.
- [38] Xu C, Lu Y, Pan Z, 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, 2011, 124(18): 3187.
- [39] Lu M, Zhang P, Li C, 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*[J]. Scientific Reports, 2014, 5: 12608.
- [40] Pautke C, Schieker M, Tischer T, et al. Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts[J]. Anticancer Research, 2004, 24(6): 3743-3748.
- [41] Xiao Y, Yan W, Lu L, et al. p38/p53/miR-200a-3p feedback loop promotes oxidative stress-mediated liver cell death[J]. Cell Cycle, 2015, 14(10): 1548-1558.
- [42] Chen M, Wang S, Li X, et al. The potential contribution of miRNA-200-3p to the fatty acid metabolism by regulating AjEH-HADH during aestivation in sea cucumber[J]. PeerJ, 2018, 6(10): e5703.
- [43] Wang S, Chen M, Yin Y, et al. MiR-200-3p is potentially involved in cell cycle arrest by regulating cyclin A during aestivation in *Apostichopus japonicus*[J]. Cells, 2019, 8(8): 843.
- [44] Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: A system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions[J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 661: 3-38.
- [45] Yan H, Zhang S, Li C, et al. Molecular characterization and function of a p38 MAPK gene from *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1421-1431.
- [46] Qu F, Xiang Z, Zhang Y, et al. A novel p38 MAPK identified from *Crassostrea hongkongensis* and its involvement in host response to immune challenges[J]. Molecular Immunology, 2016, 79: 113-124.
- [47] Wang H, Li C, Wang Z, et al. p44/42MAPK and p90RSK modulate thermal stressed physiology response in *Apostichopus japonicus*[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2016, 196-197: 57-66.
- [48] Hemmings B A, Restuccia D F. PI3K-PKB/Akt pathway[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012, 4(9): a011189.
- [49] 王富轩. 香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*) Akt-FoxO 信号通路相关基因的分子克隆与功能鉴定[D]. 北京: 中国科学院大学, 2016.
Wang F. Cloning and Functional Analysis of Akt-FoxO Pathway Related Genes in *Crassostrea hongkongensis*[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2016.
- [50] Li L, Liu X, Wang H, et al. Molecular characterization and expression of NLRP10 in the antibacterial host defense of the sea cucumber(*Apostichopus japonicus*) [J]. Gene, 2018, 675: 110-118.

Construction of miRNA Expression Profile in Coelomic Fluid Cells of *Apostichopus japonicus* and Functional Analysis of Their Target Genes Under Acute Heat Stress and Hypoxia Stress

Yin Yingchao^{1,2}, Liu Fuxiang³, Zhang Yuqin³, Chen Muyan^{1,2}

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. The Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China; 3. Yantai CIMC Blue Ocean Technology Co., Ltd. Yantai 264000, China)

Abstract: In recent years, continuous high temperatures and rainstorm events in Shandong and Hebei Provinces, China, triggered by El Nino, have resulted in mass mortality of sea cucumbers, seriously restricting the sustainable development of sea cucumber aquaculture. In present study, the coelomic fluid cells of *Apostichopus japonicus* were chosen as experimental materials to construct the differentially expressed miRNA profile and conduct the functional analysis of their target genes under heat stress and hypoxia stresses. A total of 20 differentially expressed miRNAs were identified in heat stress group and 11 of them were up-regulated and 9 of them were down-regulated. A total of 10 differentially expressed miRNAs were identified in hypoxia group and 6 of them were up-regulated and 4 of them were down-regulated. And the common differentially expressed miRNAs both in heat stress and hypoxia groups were novel-23, novel-43, novel-45, novel-49, miR-200-3p and miR-71. The target genes of these differentially expressed miRNAs were predicted with miRanda software and 14 827 target genes were predicted for 20 differentially expressed miRNAs in heat stress group, and 8 577 target genes were predicted for 10 differentially expressed miRNAs in hypoxia group. KEGG enrichment analysis showed 36 significantly enriched pathways in heat stress group and 37 pathways significantly enriched in hypoxia group. PI3K-Akt signaling pathway, pathways in cancer, focal adhesion, MAPK signaling pathway-fly and others were significantly enriched both in heat stress and hypoxia group, suggesting that miRNA involve in the regulation of immune-related biological process in responding heat stress and hypoxia stresses in sea cucumber.

Key words: *Apostichopus japonicus*; heat stress; hypoxia; coelomic fluid cells; miRNA; target gene

责任编辑 朱宝象

附录

附表 1 样品测序产出原始数据质量评估情况

Supplementary table 1 Quality evaluation of raw data from sample sequencing

样品 Sample	读数 Reads	长度/G Bases	错误率/% Error rate	Q20/%	Q30/%	GC 含量/% GC content
CO1	16 745 706	0.837	0.01	99.31	97.92	48.11
CO2	11 833 775	0.592	0.01	99.31	97.93	47.51
CO3	16 944 918	0.847	0.01	99.27	97.89	47.84
HY1	16 583 912	0.829	0.01	99.23	97.83	45.01
HY2	14 169 566	0.708	0.01	99.32	98.06	47.92
HY3	13 949 932	0.697	0.01	99.40	98.31	46.57
HS1	14 007 198	0.700	0.01	99.55	98.71	47.41
HS2	10 710 574	0.536	0.01	99.33	97.81	48.18
HS3	12 838 626	0.642	0.01	99.12	97.80	47.69

附表 2 sRNA 种类和数量统计

Supplementary table 2 Statistics of sRNA types and quantity

样品 Sample	总读数 Total reads	sRNA 总长度/bp Total bases	sRNA 种类 Uniq reads	各种 sRNA 的总长度/bp Uniq bases
CO1	15 554 962	351 820 521	311 803	7 915 513
CO2	11 016 044	251 876 278	271 667	6 942 771
CO3	15 049 440	334 970 520	308 071	7 431 283
HY1	14 865 263	328 460 244	96 962	2 384 497
HY2	12 728 382	285 281 522	458 232	11 004 600
HY3	12 610 996	284 025 725	376 914	9 412 669
HS1	13 295 775	312 413 762	357 541	9 586 806
HS2	10 371 759	237 624 738	258 971	6 726 737
HS3	11 923 768	270 569 666	274 512	6 937 202

附表 3 各样本已知 miRNA 比对情况统计表

Supplementary table 3 Statistics of known miRNA mapping situation

类型 Types	总数目 Total	CO1	CO2	CO3	HS1	HS2	HS3	HY1	HY2	HY3
Mapped mature	33	31	29	28	29	29	31	27	30	29
Mapped hairpin	33	30	28	28	28	28	30	26	29	28
Mapped uniq sRNA	3 242	396	350	374	360	364	382	255	385	376
Mapped total sRNA	23 603 344	3 833 581	2 397 821	3 709 518	2 342 166	2 447 053	2 581 536	1 107 752	2 977 904	2 206 013

附表4 预测的新 miRNA 及各样本 sRNA 与之比对情况统计表

Supplementary table 4 Statistical table of comparison between predicted novel miRNA and sRNA of each sample

类型 Types	总数目 Total	CO1	CO2	CO3	HS1	HS2	HS3	HY1	HY2	HY3
Mapped mature	149	85	80	102	78	85	75	42	93	88
Mapped star	66	41	37	42	34	36	35	27	41	40
Mapped hairpin	159	98	91	116	91	98	86	53	108	102
Mapped unique sRNA	4 805	640	558	652	499	537	547	275	554	543
Mapped total sRNA	72 004 471	8 808 024	6 383 287	8 502 030	7 591 345	5 967 176	7 142 955	12 827 676	6 667 106	8 114 872

附表5 miRNA 家族分析结果(部分)

Supplementary table 5 miRNA family analysis results(partial)

物种 Species	miR-2004	miR-184	miR-210	miR-71	miR-29	miR-133
<i>Xenopus tropicalis</i>	—	+	+	—	+	+
<i>Branchiostoma floridae</i>	—	+	+	+	+	+
<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	—	+	—	+	+	+
<i>Petromyzon marinus</i>	—	+	—	—	+	+
<i>Macaca mulatta</i>	—	+	+	—	+	+
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	—	+	+	—	+	+
<i>Pongo pygmaeus</i>	—	+	+	—	+	+
<i>Culex quinquefasciatus</i>	—	+	+	+	+	+

注：“+”表示在该物种中存在对应家族，“—”表示不存在。

Note: “+” indicates the existence of corresponding family in the species, and “—” indicates the absence.