

孙瑞萍,王峰,晁哲,等. 1月龄五指山猪与长白猪骨骼肌 miRNA 转录组比较[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(3):620-625.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.03.013

1月龄五指山猪与长白猪骨骼肌 miRNA 转录组比较

孙瑞萍^{1,2}, 王峰¹, 晁哲^{1,2}, 刘海隆^{1,2}, 郑心力¹, 刘圜炜^{1,2}, 黄丽丽¹,
邢漫萍¹, 魏立民^{1,2}

(1.海南农业科学院畜牧兽医研究所,海南海口 571100; 2.海南省热带动物繁育与疫病控制重点实验室,海南海口 571100)

摘要: 为研究 microRNA (miRNA) 在五指山猪和长白猪肌肉生长发育中的差异和探究差异 miRNA 对骨骼肌发育转录后调控的影响,以 1 月龄的五指山猪和长白猪背最长肌为材料,通过转录组测序和生物信息学分析筛选与骨骼肌发育相关的差异 miRNA。结果显示,从 2 个文库中共鉴定获得 318 种已知的猪 miRNA,五指山猪和长白猪分别鉴定出 312 个和 306 个已知 miRNA,同时分别发现了 83 个和 88 个新的 miRNA。获得 17 个差异显著的 miRNA,其中 16 个 miRNA 表达上调,1 个 miRNA 表达下调。靶基因预测和生物学功能预测发现 17 个差异 miRNA,共预测到 535 个靶基因,靶向作用于 mTOR 信号通路和肌动蛋白细胞骨架调控的 ssc-miR-486, ssc-miR-204, ssc-miR-338 和 ssc-miR-885-3p 4 个 miRNA 可能参与骨骼肌生长发育过程。

关键词: 五指山猪; 骨骼肌; miRNA; 高通量测序

中图分类号: S828.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)03-0620-06

Comparative analysis on miRNA transcriptomes of skeletal muscle between one-month-old Wuzhishan pig and Landrace

SUN Rui-ping^{1,2}, WANG Feng¹, CHAO Zhe^{1,2}, LIU Hai-long^{1,2}, ZHENG Xin-li¹, LIU Quan-wei^{1,2},
HUANG Li-li¹, XING Man-ping¹, WEI Li-min^{1,2}

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Hainan Academy of Agricultural Science, Haikou 571100, China; 2. Hainan Key Lab of Tropical Animal Reproduction & Breeding and Epidemic Disease Research, Haikou 571100, China)

Abstract: To investigate the differences of microRNA (miRNA) in growth and development of skeletal muscle between Wuzhishan pig and Landrace and to explore the effects of differential miRNAs on post-transcriptional regulation of skeletal muscle development, the longissimus dorsi muscles of one-month-old Wuzhishan pig and Landrace were used as materials to screen their differential miRNAs related to skeletal muscle development by transcriptome sequencing and bioinformatics analysis. A total of 318 known porcine miRNAs were identified from two libraries, 312 and 306 known miRNAs were identified in Wuzhishan and Landrace pigs respectively, and 83 and 88 new miRNAs were found at the same time. Seventeen differential

miRNAs were obtained, of which 16 miRNAs were up-regulated and one miRNA was down-regulated. A total of 535 target genes were predicted by 17 differential miRNAs, targeting ssc-miR-486, ssc-miR-204, ssc-miR-338 and ssc-miR-885-3p, which were regulated by the mTOR signaling pathway and actin cytoskeleton. The four miRNAs can participate in the growth and development of skeletal muscle.

Key words: Wuzhishan pig; skeletal muscle; microRNA; high-throughput sequencing

收稿日期:2019-10-14

基金项目:海南省农业科学院农业科技创新专项项目(cxzx201607);
国家自然科学基金项目(31560628、31760646);海南省省
属科研院所技术开发研究专项(KYYS-2015-02);中央引
导地方科技发展专项资金项目(ZY2019HN01)

作者简介:孙瑞萍(1982-),女,山西运城人,博士,副研究员,主要研
究方向为家畜遗传育种与繁殖。(E-mail) ruiping937@
126.com

通讯作者:魏立民,(E-mail) liminedu@126.com

猪是重要的经济动物之一,其骨骼肌发育与肉类生产和肉质形成密切相关,其肌肉生长发育的机理一直为猪遗传改良研究的热点。五指山猪具有体型矮小、生长速度慢、瘦肉率低但肉质优良等特征,而国外引进的长白猪具有体型高大、生长速度快、肉质差但瘦肉率高等特点,这2个品种之间存在极端显著的性状差异,是研究品种差异的理想模型。

小分子 RNA (microRNA, miRNA) 是生物体内一类重要的特殊分子,通过靶向 mRNA 的 3' 端来调控靶基因的表达,它的发现为研究生物的基因表达调控机制提供了新的视角。研究证实,miRNA 在参与猪肌肉发育和生长过程中发挥重要作用,主要包括肌肉细胞的增殖和分化、骨骼肌发育阶段肌纤维增值及转换,以及一些肌肉疾病的发生等。如 Sodhi 等^[1] 通过 RNA-Seq 技术分析了济州岛本地猪 (JNP) 和来自美国伯克希尔 (Berkshire) 的猪背最长肌组织的转录组,共发现了 39 个差异表达基因,它们富集到代谢、免疫反应和蛋白质结合等通路上。陈伟^[2] 利用 RNA-seq 技术分析 miRNA 在莱芜猪与大白猪中的表达模式,总共筛选出 265 个已知 miRNA,还预测到 94 个新 miRNA,在莱芜猪与大白猪骨骼肌中显著差异表达的有 25 个 miRNA,这些 miRNA 的靶基因主要被富集到代谢过程等信号通路中。因此研究 miRNA 在五指山猪和长白猪出生后骨骼肌生长发育和肉质性状差异等方面所起的调控作用及其分子机理具有重要的意义。本研究通过比较分析 1 月龄五指山猪和长白猪背部骨骼肌生长发育差异 miRNA 的表达情况,为进一步评估 miRNA 在猪生长发育中的功能和解析品种间肌肉生长发育差异分子机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与文库构建

6 头 1 月龄的去势雄性五指山猪 (1W) 采自海南五指山猪国家级保种场,6 头 1 月龄去势长白猪 (1C) 购买自海南罗牛山种猪育种有限公司。试验猪屠宰后,分别采集同一部位的背最长肌组织样品于液氮中速冻,带回实验室后转移至 -80°C 冰箱中保存备用。每个样品提取总 RNA,经质量检测合格的每个品种的 RNA 样品分别混池构建成一个 RNA 文库用于后期的测序和生物信息学分析。该工作委

托深圳市恒创基因科技有限公司完成。

1.2 miRNA 测序结果的生物信息学分析

miRNA 测序得到原始数据 (Raw reads),经过数据过滤获得 Clean reads。运用 Bowtie2 软件将 Clean tag 比对到猪参考基因组上,统计 Clean tag 的比对率以及在基因组上的分布情况。为确定已知 miRNA,将剩余高质量读段与 miRbase 21.0 (<http://www.mirbase.org>) 中已知的猪 miRNA 前体/miRNA 成熟序列进行比对。对于比对上的基因组外显子反义链、内含子、基因间区且未注释上任何 RNA 类型的 Clean tag,结合 miRNA 的生物学特征,运用 mireap 软件预测新 miRNA。

1.3 差异 miRNA 筛选及其靶基因功能分析

对于有 Clean tag 比对上的 miRNA,综合前体和成熟体两方面比对情况得到 2 个试验组猪 miRNA 的表达量,然后利用 TPM (Tag per million) 进行表达量标准化处理。利用 DEGseq 和 DESeq2 软件找出不同样本间差异表达的 miRNA,以差异倍数大于等于 2 和 Q 值小于等于 0.01 作为差异 miRNA 筛选条件。运用 RNAhybrid、miRanda、TargetScan 3 种 miRNA 靶基因预测软件,预测差异 miRNA 的靶基因。对多个预测软件结果取交集,作为最终的结果。使用 KEGG pathway 在线软件对靶基因的代谢通路或者信号转导途径进行富集分析。

2 结果

2.1 五指山猪和长白猪 miRNA 测序数据

经过对原始数据 (Raw data) 的过滤筛选和质量评估,共构建了五指山小型猪和长白猪的 2 个背最长肌 miRNA 文库。从 2 个 miRNA 文库中分别获得 21 178 739 条和 20 725 847 条 miRNA 原始序列,去除低质量 Read 后,分别获得高质量 Clean reads 20 165 360 条和 19 565 284 条,分别占总 Read 的 95.22% 和 94.4%。能够定位到猪基因组上的特异性 Unique 序列分别有 420 645 条和 678 594 条,分别达到 59.47% 和 61.44%。由图 1 可知,这些读段序列长度大多数分布在 20~23 nt,其中序列长度 22 nt 所占比例最大,与典型的 miRNA 长度分布相符。同时我们对已知 miRNA 碱基偏向性进行统计,发现五指山猪和长白猪背肌中 18~26 nt miRNA 首位碱基对 U 具有强烈的偏好性 (图 2),与前人的研究结果相同^[3]。

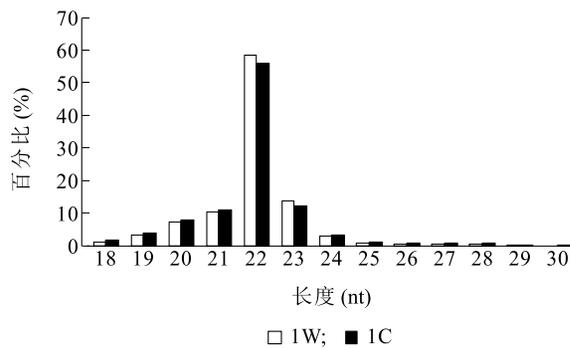


图1 五指山猪(1W)和长白猪(1C) miRNA 文库长度分布图
Fig.1 Length distribution of miRNA in Wuzhishan pig (1W) and Landrace (1C)

2.2 已知的猪 miRNA 的鉴定和统计分析

首先,将测序所得的 Clean reads 与 miRbase21.0 中已知的猪 miRNA 前体序列进行比对,结果显示,从 2 个文库中共鉴定获得 318 种已知的猪 miRNA,

从五指山猪和长白猪中分别鉴定出 312 个和 306 个已知 miRNA,其中有 300 个 miRNA 共表达,这些 miRNA 分别能被定位到 280 个和 277 个已知的猪 miRNA 前体上。对于比对上的猪基因组但未注释上任何 RNA 类型的 Clean reads,结合 miRNA 的生物学特征,运用 Mireap 预测软件对其进行新 miRNA 预测分析,在五指山猪中发现了 83 个新 miRNA,在长白猪中发现了 88 个新 miRNA。对 miRNA 表达量进行统计后发现,ssc-miR-206、ssc-miR-1、ssc-miR-let7 家族、ssc-miR-26a、ssc-miR-10a 等多个 miRNA 在 1 月龄五指山猪和长白猪背肌组织中均高表达(图 3)。而作为肌肉特异性 ssc-miR-133a-3p 在 1 月龄五指山猪和长白猪背肌组织样品中表达量分别排在第 14 和 20 位。这些新发现的 miRNA 表达量都很低,RPKM>300 的 miRNA 仅有 2 个,分别为 ssc-novel-miR-4 和 novel-miR-45。

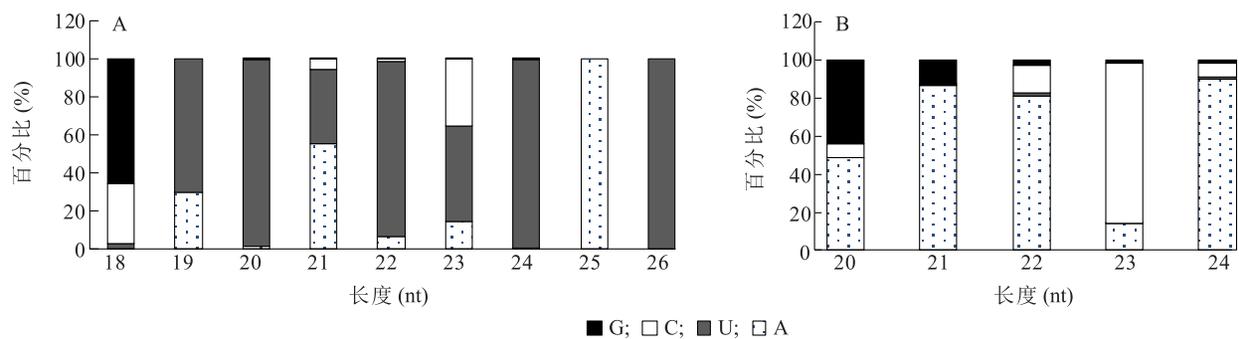
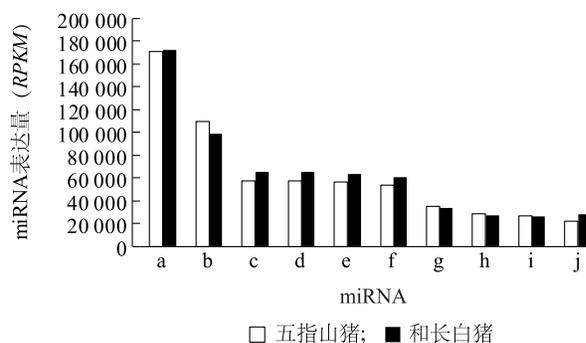


图2 已知的 miRNA (A) 和预测的新 miRNA (B) 首位碱基偏向性
Fig.2 The first base bias of known miRNAs(A) and predicted new miRNAs(B)



a; ssc-miR-206; b; ssc-miR-1; c; ssc-let-7a; d; ssc-let-7g; e; ssc-let-7f; f; ssc-let-7c; g; ssc-miR-26a; h; ssc-miR-10b; i; ssc-miR-10a-5p; j; ssc-let-7e。

图3 表达量前 10 的猪 miRNA 统计
Fig.3 Statistics of pig miRNAs with the top 10 expression

2.3 五指山猪和长白猪的差异 miRNA

选择差异倍数大于等于 2 和 Q 值小于等于 0.01 作为差异 miRNA 的选择标准,对五指山猪和长白猪的差异 miRNA 进行筛选,发现有 17 个 miRNA 符合上述条件,其中在五指山猪中表现上调的有 16 个,仅有 1 个 miRNA (ssc-miR-376a-3p) 表现为下调。由于 ssc-miR-205 在 1 月龄长白猪种表达量很低,所以差异倍数最大。而表达量较高、差异倍数最大的为 ssc-miR-486 和 ssc-miR-9 家族(表 1)。

2.4 五指山猪和长白猪差异 miRNA 的功能分析

运用 miRNA 靶基因预测软件 RNAhybrid、miRanda 和 TargetScan 预测五指山猪和长白猪差异 miRNA 的靶基因,17 个差异 miRNA 共预测到 535

个靶基因。为深入了解这些基因的生物学功能,对靶基因进行 KEGG 通路富集分析,共富集到 249 条生物学通路,其中有 18 个显著富集通路($P < 0.05$)。这些显著富集通路中,有已报道的在介导肌肉生长中起重要作用的 mTOR 信号通路和肌动蛋白细胞骨架调控(表 2)。

表 1 五指山猪和长白猪差异表达 miRNA 统计

Table 1 Statistics of differentially expressed miRNA in Wuzhishan pig and Landrace

| 名称 | 长白猪 | 五指山猪 | 倍数 | Q 值 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|
| ssc-miR-486 | 17 732.32 | 42 014.85 | 2.37 | 0 |
| ssc-miR-9 | 384.44 | 1 037.58 | 2.70 | 1.54×10^{-60} |
| ssc-miR-9-1 | 384.44 | 1 037.58 | 2.70 | 1.54×10^{-60} |
| ssc-miR-9-2 | 384.44 | 1 037.58 | 2.70 | 1.54×10^{-60} |
| ssc-miR-122 | 308.51 | 664.20 | 2.15 | 1.54×10^{-25} |
| ssc-miR-885-3p | 224.15 | 603.24 | 2.69 | 1.69×10^{-35} |
| ssc-miR-204 | 247.05 | 535.93 | 2.17 | 3.71×10^{-21} |
| ssc-miR-183 | 128.95 | 318.77 | 2.47 | 9.30×10^{-17} |
| ssc-miR-885-5p | 95.21 | 266.70 | 2.80 | 2.48×10^{-17} |
| ssc-miR-338 | 67.49 | 175.26 | 2.60 | 1.73×10^{-10} |
| ssc-miR-205 | 0.000 1 | 43.18 | 43 179.42 | 7.67×10^{-11} |
| ssc-miR-935 | 10.85 | 43.18 | 3.98 | 3.89×10^{-5} |
| ssc-miR-217 | 8.44 | 35.56 | 4.22 | 1.29×10^{-4} |
| ssc-miR-34c | 3.62 | 29.21 | 8.08 | 1.25×10^{-5} |
| ssc-miR-7857-3p | 6.03 | 25.40 | 4.22 | 1.43×10^{-3} |
| ssc-miR-452 | 8.44 | 25.40 | 3.01 | 9.85×10^{-3} |
| ssc-miR-376a-3p | 53.03 | 19.05 | 0.36 | 4.02×10^{-5} |

3 讨论

猪肌肉的生长发育受到许多因素的影响且具有明显的时空特性,时空特异性表达基因间相互调控的信息传递网络是决定猪生长速度和肌肉品质的分子基础。作为一类广泛存在于动、植物体内具有调控功能的非编码 RNA,miRNA 不仅参与生物机体内的多种生命活动,包括细胞的发育、分化、增殖和凋亡等^[4-6],miRNA 对肌肉的形成和生长也是必不可少的^[7]。许多研究团队使用高通量测序的方法检测并分析了不同猪种骨骼肌中 miRNA 在不同生长阶段和不同肌肉组织中的表达情况,不仅在猪的肌肉组织中鉴定出一批新的 miRNA,而且发现 miRNA

表 2 差异 miRNA 靶基因的 KEGG 通路分析

Table 2 KEGG pathway analysis of different miRNA target genes

| 通路 | 条目 | 百分比(%) |
|--|----|--------|
| Fc gamma R-mediated phagocytosis | 11 | 2.97 |
| Small cell lung cancer | 9 | 2.43 |
| Acute myeloid leukemia | 7 | 1.89 |
| mTOR signaling pathway | 7 | 1.89 |
| Toxoplasmosis | 9 | 2.43 |
| Pancreatic cancer | 7 | 1.89 |
| Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) | 9 | 2.43 |
| Epstein-Barr virus infection | 13 | 3.51 |
| Dilated cardiomyopathy | 9 | 2.43 |
| Regulation of actin cytoskeleton | 16 | 4.32 |
| Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) | 8 | 2.16 |
| Circadian rhythm - fly | 2 | 0.54 |
| Phosphatidylinositol signaling system | 9 | 2.43 |
| Apoptosis | 7 | 1.89 |
| Regulation of lipolysis in adipocytes | 5 | 1.35 |
| F cepsilon RI signaling pathway | 6 | 1.62 |
| TNF signaling pathway | 8 | 2.16 |
| Adipocytokine signaling pathway | 6 | 1.62 |
| Endocytosis | 14 | 3.78 |
| Amoebiasis | 9 | 2.43 |

的表达具有时序性和组织特异性^[8-10]。其中 miR-1、miR-133a、miR-206 是研究最多的肌特异性 miRNA^[11]。miR-206 在猪胚胎的不同发育阶段和成年猪中表达丰度非常高,但在肌肉卫星细胞增殖期无表达^[12]。miR-1 在猪胚胎各个发育阶段中度表达,但在成年猪中高表达,而 miR-133 在猪的整个胚胎发育阶段以及新生仔猪发育阶段几乎检测不到,但在猪成年期 miR-133 的表达量适中^[13];miR-432 在猪胚胎发育阶段表达量最高,出生后随着年龄增长逐渐下降。miR-378、miR-1 和 miR-206 在骨骼肌和心肌中均高丰度表达^[13]。与许多学者的研究结果一致,本研究中 1 月龄背肌中表达量排名前第 1 和第 2 的 miRNA 分别为 mi-206、miR-1,而 miR-133a 相对于这 2 个 miRNA 表达量较低,但在背肌中也属于高表达的 miRNA。五指山猪小型猪与长白猪由于遗传背景和环境的差异形成了不同的体型外貌和肌肉特性。

越来越多的 miRNA 被确认参与猪品种间肌肉发育和肉质差异相关的重要信号调控通路。miR-1 和 miR-206 可以通过靶向 *Pax7* 基因影响骨骼肌细胞的增殖,促进肌肉的生长^[13];miR-133 不仅可以促进肌细胞的增殖,还可以抑制骨骼肌细胞的分化^[14]。我们在 1 月龄五指山猪和长白猪的背肌组织中共发现 17 个差异显著表达的 miRNA,其中只有 ssc-miR-376a-3p 在五指山猪背肌中表达下调,其余 16 个 miRNA 表达均上调,ssc-miR-486 的表达量最高。有报道称^[15],ssc-miR-486 在猪肌肉生长发育中发挥重要作用,在 1、60、90、180 日龄巴马小型猪中的表达量高于长白猪,可能通过靶向 p85 α 、PTEN 和 FoxO1 调控猪骨骼肌 IGF1-PI3K/AKT-mTOR 信号通路。陈伟^[2]利用高通量测序技术分析莱芜猪与大白猪骨骼肌中差异表达 miRNA 与差异表达基因,发现 ssc-miR-486 在生长缓慢的莱芜猪中表达量显著上调,此外,ssc-miR-486 可通过靶向 AKT 信号通路的负调控因子磷酸酶基因(*PTEN*)影响骨骼肌再生,过表达 ssc-miR-486 会导致包括 *PTEN* 在内的许多靶基因错误调控而使骨骼肌再生异常。在饲料中持续添加共轭亚油酸(Conjugated linoleic acids, CLA)后腿肌中 miR-452 的表达量显著上调 4 倍以上,CLA 可能通过影响肌肉中 miR-452 的表达量调控重要肌肉代谢通路^[3]。此外,本研究中发现的差异 miR-204 和 miR-34c 也已被报道与骨骼肌的发育相关。Wnt/ β -catenin 信号通路参与骨骼肌的发育,可以使成肌细胞从增殖状态转变进入分化状态,miR-204 通过作用于 Wnt/ β -catenin 信号通路而发挥对骨骼肌发育的调控,在 C₂C₁₂ 细胞成肌分化过程中过表达 miR-204 能明显抑制肌细胞的融合程度和肌管的形成速度^[16]。miR-34c 可通过 *YY1* 基因调控骨骼肌细胞的增殖及分化^[17]。本研究中 17 个差异表达 miRNA 的 535 个靶基因共富集到 249 条生物学通路,其中有 18 个富集通路差异显著,其中包括在肌肉生长中起重要作用的 mTOR 信号通路和肌动蛋白细胞骨架调控。mTOR 信号通路在多种疾病中扮演着不可忽视的角色,具有促进物质代谢、参与细胞凋亡、自噬等功能,它能够将感受到的上游信号分子传递给下游的 S6K1 和 4E-BP1 2 个效应分子,促进细胞 mRNA 的转录翻译,进而增加肌肉蛋白质合成。Guertin 等^[18]的试验结果也已证明 mTOR 信号通路在动物出生后肌肉发育、肌肉

再生、肌细胞分化和肌纤维生长中起重要作用。若特异性敲除肌肉中的 mTOR,动物在出生后慢肌纤维生长受阻,从而导致严重的肌肉疾病^[19]。在本研究中靶向 mTOR 信号通路中关键基因的差异 miRNA 除了与已报道的肌肉生长发育相关的 ssc-miR-486 和 ssc-miR-204 外,还有 ssc-miR-338 和 ssc-miR-885-3p,这 2 个 miRNA 是否与肌肉生长发育相关,还需进一步的功能验证。

本研究通过 RNA-Seq 得到 1 月龄五指山猪和长白猪背最长肌肉组织中 miRNA 转录组文库,并比较了两者之间的差异。通过靶基因预测和生物信息学分析发现,很多 miRNA (ssc-miR-486、ssc-miR-204、ssc-miR-338 和 ssc-miR-885-3p) 可能影响一些与动物肌肉发育相关的细胞信号通路,尤其是靶向 mTOR 信号通路和肌动蛋白细胞骨架调控,它们可能部分揭示了 1 月龄五指山猪和长白猪骨骼肌功能的差异,同时也为进一步研究 miRNA 调控猪肌肉发育相关的研究提供了基础。

参考文献:

- [1] SODHI S S, SONG K D, GHOSH M, et al. Comparative transcriptomic analysis by RNA-seq to discern differential expression of genes in liver and muscle tissues of adult Berkshire and Jeju Native Pig[J]. *Gene*, 2014, 546(2):233-242.
- [2] 陈伟. 莱芜猪和长白猪背最长肌 miRNA 与 mRNA 转录组测序及特征分析[D]. 泰安:山东农业大学, 2014.
- [3] 王琪,齐仁立,刘虹,等. 饲料中添加共轭亚油酸对猪肌肉组织 miRNA 表达谱的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(9):1908-1918.
- [4] 刘哲,许园园,娄丽娜,等. 植物抗逆和开花相关 miRNA 研究进展及在丝瓜上的应用[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(16):6-9.
- [5] 张玉霞,袁小远,王友令,等. *p53* 基因 3'UTR 双荧光素酶报告质粒的构建及其与 miRNA-2127 靶向关系的验证[J]. *山东农业科学*, 2019, 51(1):14-17.
- [6] 刘潮,褚洪龙,韩利红,等. 桑树 NBS-LRR 类基因家族的全基因组鉴定及其调控 microRNAs 分析[J]. *江苏农业学报*, 2019, 35(3):544-553.
- [7] 凌笑笑,唐朋,梁春年,等. miRNA 对骨骼肌调控的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(6):1486-1492.
- [8] WANG X, ZHANG P, LI L, et al. miRNA editing landscape reveals miR-34c regulated spermatogenesis through structure and target change in pig and mouse[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 502(4):486-492.
- [9] 王睿琪. 猪肌肉生长相关 microRNA-1a, 133b 和 206a 的表达分析[D]. 长沙:湖南农业大学, 2011.
- [10] SATO M M, NASHIMOTO M, KATAGIRI T, et al. Bone morpho-

- genetic protein-2 down-regulates miR-206 expression by blocking its maturation process[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383(1): 125-129.
- [11] 王 敬,王 琪,黄金秀,等. 动物肌肉生长发育相关 microRNA 的表达模式和调控机制[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(3): 687-694.
- [12] CHEN J F, TAO Y J, DENG Z, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 190(5): 867-879.
- [13] KATARZYNA G W, HELIO P, TINA R, et al. Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(15): 3590-3600.
- [14] 张春兰,秦孜娟,纪志宾,等. MicroRNA 在畜禽肌肉生长发育中的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(10): 195-198.
- [15] 郭晓萍. 猪骨骼肌 miRNA 转录组分析及 miR-486 功能的初步研究[D]. 南宁:广西大学, 2015.
- [16] 游 路. miR-204-5p 对 C2C12 细胞成肌分化的影响[D]. 成都:四川农业大学, 2016.
- [17] WANG M, LIU C, SU Y, et al. miRNA-34c inhibits myoblasts proliferation by targeting YY1[J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(18): 1661-1672.
- [18] GUERTIN D A, STEVENS D M, THOREEN C C, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1[J]. *Developmental Cell*, 2006, 11(6): 859-871.
- [19] WILLETT M, COWAN J L, VLASAK M, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling in C2C12 myoblasts prevents myogenic differentiation without affecting the hyperphosphorylation of 4E-BP1[J]. *Cellular Signalling*, 2009, 21(10): 1504-1512.

(责任编辑:张震林)