

魏清宇, 吴鹏飞, 叶红心, 等. 边鸡快长型与慢长型品系胚胎骨骼肌发育中差异可变剪切[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 444-452.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.02.017

边鸡快长型与慢长型品系胚胎骨骼肌发育中差异可变剪切

魏清宇¹, 吴鹏飞², 叶红心¹, 李培峰¹, 崔少华¹, 张旗¹, 张丽¹, 张跟喜²

(1. 山西农业大学动物科学学院, 山西 太原 030032; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 骨骼肌生长发育对肉鸡产业至关重要, 可变剪切(AS)作为生物体内一种普遍存在的调控机制, 在骨骼肌发育过程中发挥着重要作用。本研究以快长型、慢长型边鸡品系为试验材料, 收集受精蛋后孵化至 14 胚龄和 20 胚龄, 然后采集鸡胚腿肌进行转录组测序, 用于分析骨骼肌发育过程中的差异可变剪切事件。在 14 胚龄慢长型(S14)与 14 胚龄快长型(F14)比较组中共发生 230 个差异可变剪切事件, 其对应了 200 个基因, 在 20 胚龄慢长型(S20)与 20 胚龄快长型(F20)比较组中共发生 373 个差异可变剪切事件, 其对应了 324 个基因, 且 2 个比较组中存在 47 个相同的基因。GO 富集分析结果表明, 前 20 个富集条目中包括丝氨酸家族氨基酸分解代谢过程、肌球蛋白 II 细丝组装和肌动球蛋白结构组织等与骨骼肌发育相关的生物学过程。KEGG 通路富集分析结果表明, 前 20 条通路中有多条通路与骨骼肌发育相关, 包括黏附连接、肌动蛋白细胞骨架调节和黏着斑等。基于 STRING 数据库对所有差异可变剪切事件的来源基因进行蛋白质互作网络分析, 然后利用 Cytoscape(3.8.2)软件中的插件 CytoHubba 筛选核心基因, 结合富集分析结果在 S14 与 F14 比较组中发现 *TLN2*、*PARVB* 和 *ITGA6* 等多个关键候选基因, 在 S20 与 F20 比较组中发现 *LDB3*、*PDLIM3*、*ITGB5*、*DMD*、*TNS3* 和 *RAC1* 等多个关键候选基因, 同时, 筛选到的 *PDLIM5* 和 *GIT1* 候选基因在 14 胚龄、20 胚龄边鸡骨骼肌发育中均发挥重要作用。本研究结果为进一步解析骨骼肌发育调控机理奠定了基础, 也为黄羽肉鸡的选育工作提供一定参考。

关键词: 骨骼肌; 可变剪切; 鸡

中图分类号: S831.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)02-0444-09

Differential alternative splicing during embryonic skeletal muscle development in fast-growing and slow-growing strains of Bian chicken

WEI Qing-yu¹, WU Peng-fei², YE Hong-xin¹, LI Pei-feng¹, CUI Shao-hua¹, ZHANG Qi¹,
ZHANG Li¹, ZHANG Gen-xi²

(1. College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030032, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The growth and development of skeletal muscle is vital to the broiler industry. Alternative splicing (AS)

收稿日期: 2022-06-04

基金项目: 山西省重点研发项目(201703D221022-3); 生物育种工程项目(yzgc129); 国家肉鸡产业技术体系项目(CARS-41); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD); 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(2022-07)

作者简介: 魏清宇(1973-), 男, 山西太谷人, 硕士, 副研究员, 主要从事家禽育种研究工作。(E-mail) xmszjc@126.com。吴鹏飞为共同第一作者。

通讯作者: 张跟喜, (E-mail) gxzhang@yzu.edu.cn

is a universal regulation mechanism in organisms and plays an important role in the development of skeletal muscle. The fast-growing and slow-growing groups of Bian chicken were used as trial materials. After the fertilized eggs were collected and incubated to 14 and 20 days, the leg muscles of Bian chickens were collected for RNA-seq. Results showed that 230 and 373 differentially expressed alternative splicing events (DEAS) were found in S14 (14-day embryos of slow-growing chicken) vs F14 (14-day embryo-

os of fast-growing chicken) and S20 (20-day embryos of slow-growing chicken) vs F20 (20-day embryos of fast-growing chicken) groups, corresponding to 200 and 324 host genes respectively. There were 47 same host genes in the two comparison groups. GO analysis results showed that biological processes (BP) terms related to skeletal muscle development in the top 20, such as serine family amino acid catabolic process, myosin II filament assembly and actomyosin structure organization, were obtained. KEGG enrichment analysis found that some of the top 20 pathways were also related to skeletal muscle development, including adherens junction, regulation of actin cytoskeleton and focal adhesion. Protein-protein interaction network (PPI) analysis was performed for the host genes of all the DEAS. Key candidate host genes were further screened using the plug-in CytoHubba combined with functional enrichment results. Key candidate host genes *TLN2*, *PARVB* and *ITGA6* were found in S14 vs F14 group, and *LDB3*, *PDLIM3*, *ITGB5*, *DMD*, *TNS3* and *RAC1* were found in S20 vs F20 group. The results also showed that *PDLIM5* and *GIT1* were both important in the two comparison groups. These results can lay a foundation for further understanding and analyzing the regulation mechanism of skeletal muscle development, and also provide a reference for the breeding of yellow-feathered broilers.

Key words: skeletal muscle; alternative splicing; chicken

可变剪切(AS)是指前体 mRNA 在剪切体作用下选择性去除或保留外显子和内含子,最终形成成熟 mRNA 的过程^[1-2],该过程普遍存在于高等真核生物中,它是真核生物体内基因表达调控的一种重要机制,是导致真核生物体中转录本差异和蛋白质组多样化的重要原因^[3-6]。

人类基因组中发生可变剪切的基因达 90% 以上^[3-4],可变剪切主要包含以下 7 种(图 1)^[3, 7]。近年来,可变剪切调控在人类疾病中的作用逐渐被重视并揭示^[8-9],此外,广泛存在的各种形式的可变剪切还参与多种正常生命活动和生物学调控过程,包括骨骼肌的发育^[10]。骨骼肌是保持人、动物身体健康并维持运动能力的基础。在畜禽行业,骨骼肌的生长发育情况决定了畜禽的屠宰性能,直接影响经济效益。心肌细胞增强因子 2D(MEF2D)是转录因子 MEF2 家族成员,在肌生成调控过程中发挥着重要作用^[11],*MEF2D* 基因通过可变剪切形成互斥型外显子(MXE)剪切体亚型 *MEF2Dα1*、*MEF2Dα2*^[12],*MEF2Dα1* 在肌肉分化过程中发挥抑制作用,而 *MEF2Dα2* 却发挥着促进作用。在骨骼肌中,胰岛素和胰岛素生长素 1(IGF1)均能通过胰岛素受体(INSR)结合激活 PI3K/AKT/mTOR 通路,调控肌肉肥大^[13],然而,在转录过程中,*INSR* 基因通过可变剪切能形成 2 种亚型 *INSR-A* 和 *INSR-B*,其中,*INSR-A* 亚型缺乏第 11 外显子,其编码的蛋白质与胰岛素、IGF1 均不结合,反而与胰岛素生长素 2(IGF2)结合,而 *INSR-B* 亚型包含第 11 外显子,其编码的蛋白质对胰岛素更加敏感,可调控肌肉肥大^[14]。不同可变剪切对骨骼肌发育影响差异较大,甚至造成相反的功效,因此,对可变剪切的研究具有重要意义。

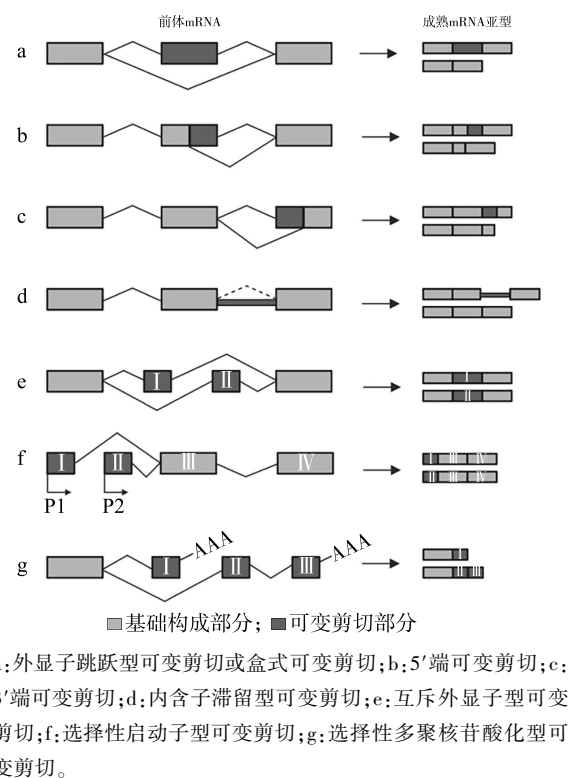


图 1 7 种可变剪切事件

Fig.1 Seven kinds of alternative splicing events

胚胎期是骨骼肌发育的关键时期,直接影响肌纤维的数量。本研究拟以慢长型、快长型边鸡品系为试验材料,分别在 14 胚龄和 20 胚龄运用转录组测序技术(RNA-seq)筛选胚胎期慢长型、快长型边鸡品系骨骼肌发育中的差异可变剪切事件,寻找影响骨骼肌发育的关键可变剪切事件及其来源基因,以期为进一步解析并完善骨骼肌发育中可变剪切的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

边鸡是山西省的优良地方鸡品种,具有耐严寒、耐粗饲料等特点。300 日龄时,收集慢长型、快长型边鸡品系中具有半同胞关系的种蛋进行统一孵化,孵化至 14 胚龄、20 胚龄时破除蛋壳,对胚胎进行质量称量,同时,在 14 胚龄时采集尿囊液、20 胚龄时采集微量全血用于性别鉴定,最后,统一采集右侧腿肌置于液氮中保存。

母鸡发育过程中右侧性腺退化,通过解剖雏鸡初步判断其性别。然后利用鸡尿囊液或微量全血进行 *CHDI* 基因 PCR 扩增,快速准确鉴定其性别^[15]。本研究使用的 *CHDI* 基因引物为 F: 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3', R: 5'-ATTGAAATGATC-CAGTGCTTG-3',使用的 PCR 试剂为 2×*Taq* Plus Master Mix (Dye)。PCR 反应体系为:尿囊液 2.0 μl 或血液 0.5 μl,正、反向引物各 2.0 μl (10.0 μmol/L),2×*Taq* Plus Master Mix (Dye) 25.0 μl,用灭菌双蒸水补足至 50.0 μl。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,进行 35 个循环,72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 保温 10 min。最后,在 14 胚龄快长型 (F14)、14 胚龄慢长型 (S14)、20 胚龄快长型 (F20) 和 20 胚龄慢长型 (S20) 中分别选择体质量最接近的 4 只母鸡的腿肌,提取 RNA 用于转录组测序。

1.2 总 RNA 提取及文库构建

采用传统 TRIzol 法提取鸡胚腿部组织 RNA,样品质检合格后委托北京诺禾致源科技股份有限公司构建测序文库^[16],测序文库质检合格后利用测序仪器 NovaSeq 6000 (Illumina 公司产品) 进行双端测序,测序原理是边合成边测序,最后生成 150 bp 长度的原始测序序列,用于后续生物信息学分析。

1.3 测序数据质控

原始数据中包含少量带有测序接头或测序质量较低的测序序列,需对其进行过滤:(1) 去除带接头的测序序列;(2) 去除 N (N 表示无法确定的碱基) 占比大于 0.002 的测序序列;(3) 去除低质量测序序列。

1.4 测序数据比对分析

将过滤得到的有效测序数据比对到基因组后用于后续分析,比对软件采用 Hisat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/hisat2>)^[17],参考基因组为 GRCg6a (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-97/fasta/gallus_gallus/dna/)。

1.5 可变剪切事件差异分析及其功能富集

基于比对结果,利用 rMATS 软件^[18]对可变剪切事件进行统计分析、定量分析和差异分析。rMATS 软件可分析 5 种可变剪切事件,分别为外显子跳跃型可变剪切 (SE)、内含子滞留型可变剪切 (RI)、互斥外显子型可变剪切 (MXE)、5'端可变剪切 (A5SS) 和 3'端可变剪切 (A3SS)。

差异可变剪切事件来源基因的功能富集分析涉及 GO 和 KEGG。GO 是描述基因功能的综合性数据库,包括分子功能 (MF)、生物过程 (BP) 和细胞组成 (CC) 3 个部分。KEGG^[19]是整合了基因组和系统功能信息的综合性数据库,在生物体内,不同基因相互协调行使其生物学功能,通过 KEGG 通路富集分析可以探寻差异表达可变剪切事件来源基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。本研究利用 GOseq^[20]软件进行 GO 富集分析,用 KOBAS (3.0)^[21]软件进行 KEGG 通路富集分析。

1.6 基于蛋白质互作网络筛选关键核心基因

利用 STRING 数据库进一步对 2 个比较组中所有差异可变剪切事件来源基因进行蛋白质互作网络分析 (PPI),用 Cytoscape (3.8.2) 软件中的插件 Cyto-Hubba 采用最大集团中心性 (MCC) 算法筛选核心基因,筛选标准为 MCC 值 > 50。

1.7 统计分析方法

本研究利用 SPSS13.0 软件对体质量进行显著性分析,采用的方法为独立样本 *t* 检验,最终数据以平均值±标准差的形式进行表示。

2 结果与分析

2.1 个体体质量统计

对送样个体体质量进行统计, S14: (9.26±0.55) g; F14: (11.24±0.54) g; S20: (32.60±1.47) g; F20: (39.26±2.07) g。独立样本 *t* 检验结果显示,快长型个体 14 胚龄时的平均体质量极显著高于慢长型个体 ($P=0.005$),20 胚龄时快长型个体平均体质量也极显著高于慢长型个体 ($P=0.004$)。说明快长型个体与慢长型个体的体质量在胚胎期具有较大的表型差异。

2.2 测序数据质控及比对结果分析

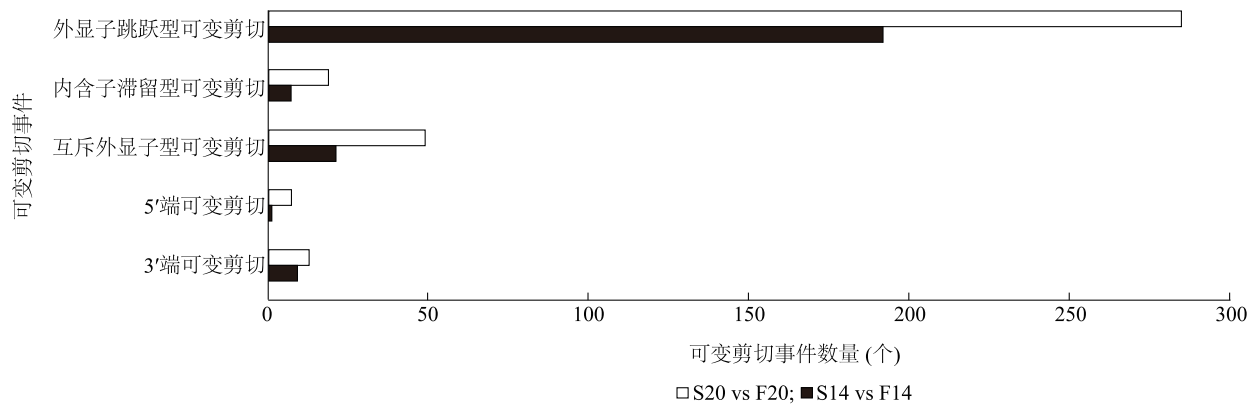
对原始数据进行质控分析,发现每个个体有效测序序列正确识别率>99.90%(Q30)的碱基数占93.99%以上,正确识别率>99.00%(Q20)的碱基数占98.00%以上。同时,每个个体有效测序序列中(G+C)含量为45.26%~48.49%,无碱基分离现象,以上结果表明测序数据良好。

与参考基因组进行比对,发现测序序列可比对到外显子、内含子和基因间区3个部分,且比对到外显子的比例最高,符合预期,可用于后续分析。

2.3 差异可变剪切事件统计结果

以错误发现率(FDR) ≤ 0.01 为筛选标准,对可变剪切事件进行统计(图2),在14胚龄快长型个体

与14胚龄慢长型个体之间发生了230个差异可变剪切事件,其中外显子跳跃型可变剪切事件有192个,内含子滞留型可变剪切事件有7个,互斥外显子型可变剪切事件有21个,5'端可变剪切事件只有1个,3'端可变剪切事件有9个。对20胚龄快长型个体与20胚龄慢长型个体之间发生的可变剪切事件进行统计分析,共发现373个差异可变剪切事件,其中,外显子跳跃型可变剪切事件有285个,互斥外显子型可变剪切事件有49个。外显子跳跃型可变剪切事件在14胚龄快长型与慢长型比较组和20胚龄快长型与慢长型比较组中所占比例均为最高,且远高于其他类型,推测该种可变剪切在生物体内普遍存在并发挥着重要作用。



F14: 14 胚龄快长组; S14: 14 胚龄慢长组; F20: 20 胚龄快长组; S20: 20 胚龄慢长组。

图2 可变剪切事件统计结果

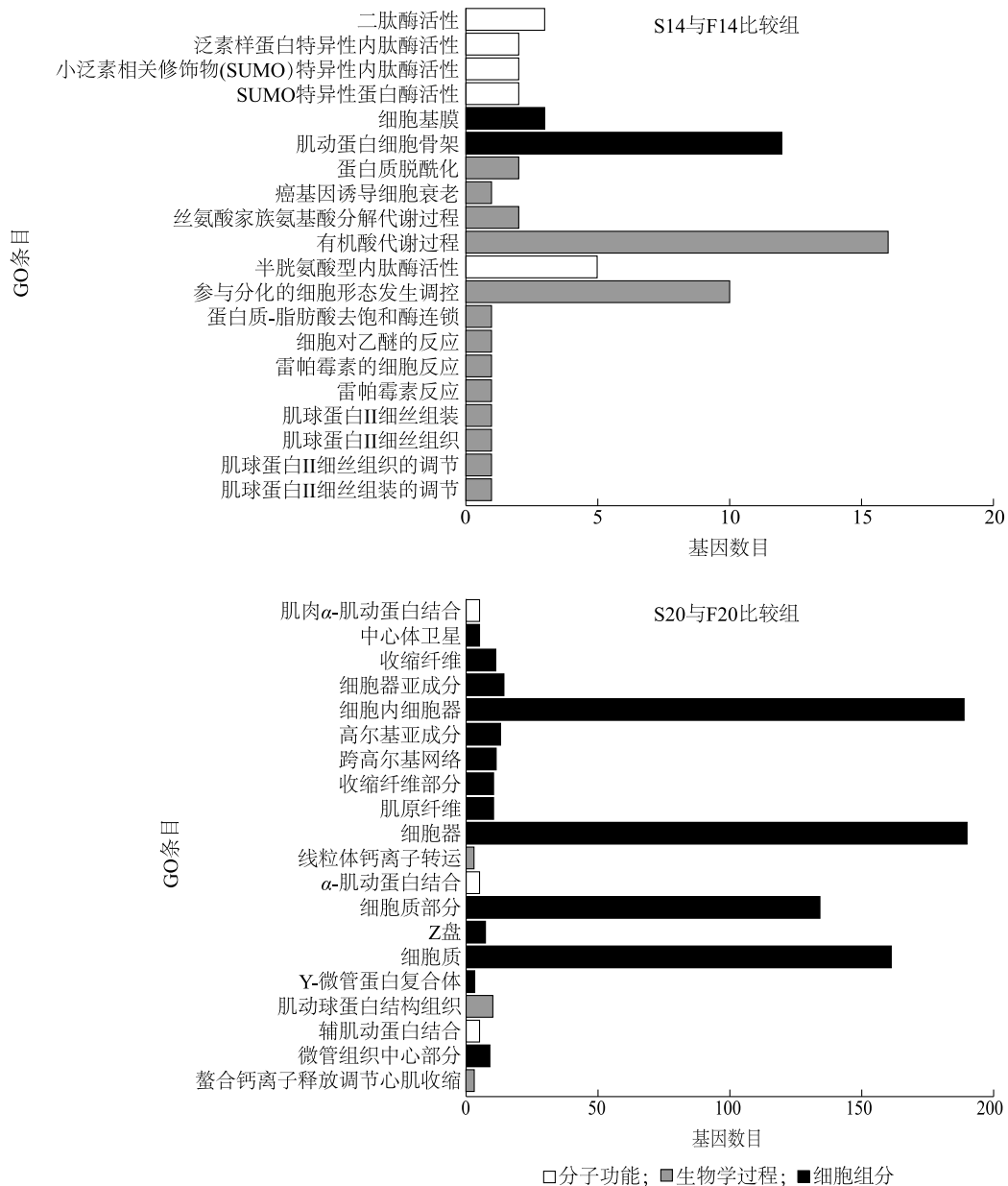
Fig.2 Statistics of different alternative splicing events

2.4 差异可变剪切事件来源基因功能富集分析

对差异结果进行深入分析,发现S14与F14比较组中得到的230个差异可变剪切事件对应了200个来源基因,S20与F20比较组中得到的373个差异可变剪切事件对应了324个来源基因,2个比较组中相同的来源基因共47个。分别对S14与F14、S20与F20比较组中得到的可变剪切事件来源基因进行GO富集分析和KEGG通路富集分析。GO富集分析结果(图3)表明,在S14与F14比较组中显著富集的前20个条目中有13个生物学过程(BP)条目,包含丝氨酸家族氨基酸分解代谢过程和肌球蛋白II细丝组装等与骨骼肌发育相关的条目;在S20与F20比较组中显著富集的前20个条目中只有3个BP条目,其中线粒体钙离子转运和肌动球蛋白结构组织与骨骼肌发育相关。此外,骨骼肌收缩的调节、肌原纤维组装和肌细胞内稳态等显著富集的前20个条目之外的其他

BP条目也与骨骼肌发育相关。

KEGG通路富集分析结果(图4)表明,在S14与F14比较组中前20条富集通路中有4条达到显著水平,分别为细胞外基质(ECM)受体相互作用、2-氧羧酸代谢、氨基酸的生物合成和黏附连接,它们均在动物骨骼肌发育过程中发挥重要作用;在S20与F20比较组中前20条KEGG通路中筛选到8条显著富集的通路,其中mTOR信号通路、肌动蛋白细胞骨架调节和黏附连接等对骨骼肌的生长发育具有重要调节作用。在2个比较组的前20条KEGG通路中发现4条共同富集的通路,分别为黏附连接、肌动蛋白细胞骨架调节、黏着斑和真核生物核糖体生物发生,其中黏附连接是唯一共同显著富集的通路,说明这4条通路及其基因以及发生的可变剪切事件可能在鸡胚14胚龄、20胚龄骨骼肌发育时均发挥着重要作用。



S14、F14、S20、F20 见图 2 注。

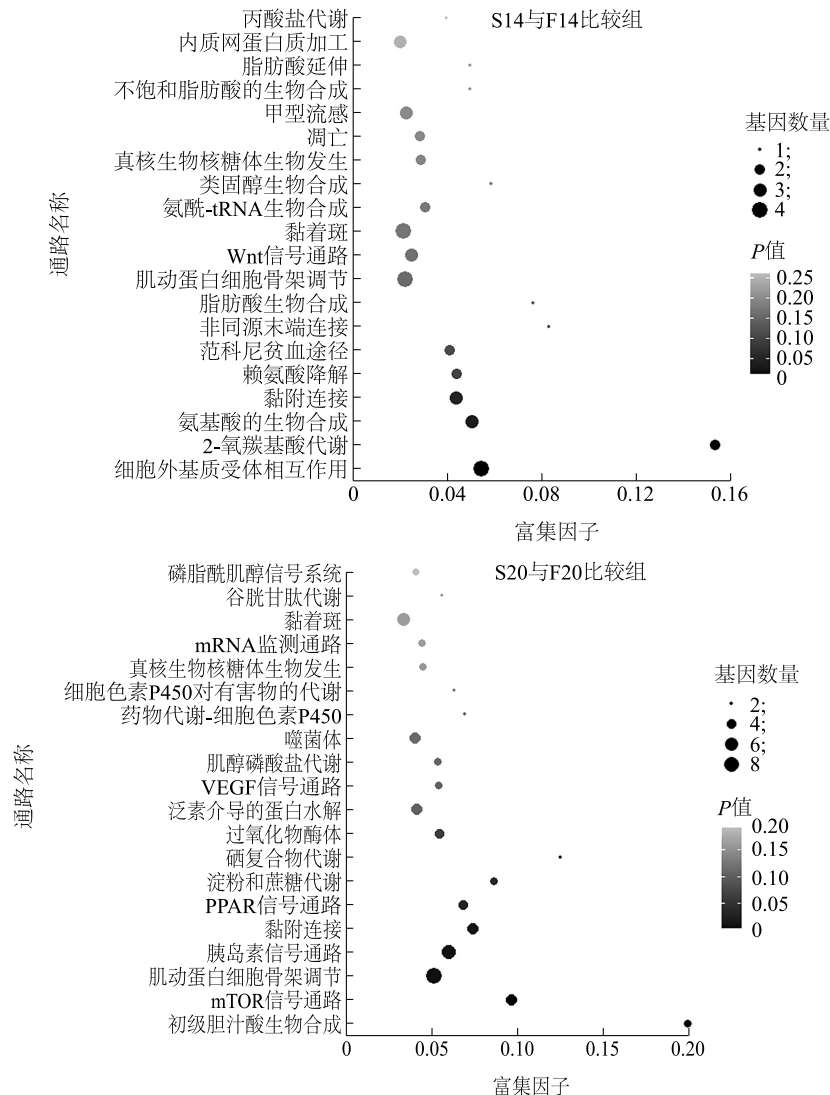
图 3 GO 功能富集分析结果

Fig.3 Results of GO functional enrichment analysis

2.5 蛋白质互作网络筛选关键核心基因

利用 STRING 数据库进一步对 2 个比较组中差异可变剪切事件来源基因进行蛋白质互作网络分析,图 5 为前 100 个蛋白质的互作网络图,颜色越深表示其所处位置越核心。以 MCC 值>50 为条件,同时结合 KEGG 分析结果,在 S14 与 F14 比较组中我们发现多个具有调控作用的核心蛋白质,包括 TLN2、PARVB 和 ITGA6。同时,KEGG 结果显示,在前 20 条通路中,TLN2、PARVB 和 ITGA6 基因均富集

在黏着斑通路中,ITGA6 也富集在细胞外基质受体相互作用和肌动蛋白细胞骨架调节通路中;在 S20 与 F20 比较组中发现多个调控生长发育的核心蛋白质,包括 LDB3、PDLIM3、ITGB5、DMD、TNS3 和 RAC1 等,其中,LDB3 的 MCC 值最高。KEGG 结果显示,在前 20 条通路中,RAC1 基因富集的通路高达 5 条,包括肌动蛋白细胞骨架调节、黏附连接、黏着斑等骨骼肌发育重要信号通路,ITGB5 基因富集在肌动蛋白细胞骨架调节和黏着斑 2 条骨骼肌发育相



S14、F14、S20、F20 见图 2 注。

图 4 KEGG 通路富集分析结果

Fig.4 KEGG pathway enrichment analysis

关通路中。此外,我们发现 *PDLIM5* 和 *GIT1* 在 14 胚龄和 20 胚龄快长型、慢长型边鸡骨骼肌发育过程中均具有调控作用,结合可变剪切事件发生类型进行分析,发现在 14 胚龄快长型与慢长型比较组中 *PDLIM5* 基因发生了 SE 型和 MXE 型 2 种差异的可变剪切事件,而在 20 胚龄快长型与慢长型比较组中只发生 SE 型差异可变剪切事件, *GIT1* 基因在 2 个不同胚龄快长型与慢长型比较组中均发生了 SE 型差异可变剪切事件。

3 讨论

可变剪切是真核生物体内一种重要的调控机制,它能使同一基因产生多种蛋白质,极大丰富了生物体

内蛋白质的多样性^[22]。目前,关于可变剪切的研究涉及癌症^[23]、衰老^[7]以及脂肪肝^[24]等。同样,骨骼肌的发育也离不开可变剪切。Zhang 等^[25]通过 *Rbm24* 基因敲除的小鼠活体试验结果证明了 *Rbm24* 能通过调控 *MEF2D*、*Naca*、*Rock2* 和 *Lrrfip1* 等肌源性基因的可变剪切进而调节成年小鼠的骨骼肌再生;Li 等^[26]采集兔子的肥胖模型和对照个体腿肌后进行转录组测序和 DNA 甲基化测序联合分析,结果发现 15 个基因可通过可变剪切和 DNA 甲基化这 2 种类型的遗传修饰共同调控骨骼肌生长发育;Shu 等^[27]采集肌肉脂肪含量不同的 2 种猪背最长肌用于转录组测序分析,结果发现 *MRPL27*、*AAR2*、*PYGM*、*PSMD*、*MYL1*、*TNNT3* 和 *TNNT1* 等基因的可变剪切亚型可调控肌肉

一种特殊结构,这种结构中的整合素受体可以与细胞外基质和肌动蛋白细胞骨架相连,黏着斑在细胞中起着机械连接和信号传递的作用,与生长发育密切相关^[30-31]。细胞外基质由不同的胶原蛋白、蛋白多糖和糖蛋白组成^[32],与细胞表面受体相结合形成复杂的网络,可以进行信号传导,调控细胞生长、迁移和分化等^[33]。肌动蛋白细胞骨架是细胞骨架的重要组成部分,它在骨骼肌的收缩过程中起着关键作用^[34]。

在 S20 与 F20 比较组的前 20 条通路中,*RAC1* 富集的通路高达 5 条,包括肌动蛋白细胞骨架调节、黏附连接、黏着斑等骨骼肌发育重要信号通路。有研究发现,*RAC1* 可在骨骼肌分化后期发挥重要作用,在成肌细胞融合过程中必不可少^[35];其次为 *ITGB5*,本研究发现该基因主要富集在肌动蛋白细胞骨架调节和黏着斑 2 条骨骼肌发育相关通路中。通过蛋白质互作网络筛选关键核心基因,发现 *LDB3* 的 MCC 值最高。Yamashita 等^[36]汇总了 6 种 *LDB3* 的可变剪切亚型,发现肌强直性营养不良 I 型患者体内包含外显子 11 的 *LDB3* 可变剪切亚型极显著升高,该亚型可能对骨骼肌发育造成不良影响。肌营养不良蛋白基因(*DMD*)突变可导致杜氏肌营养不良症,主要引起骨骼肌、心肌退化^[37]。

在 S14 与 F14、S20 与 F20 比较组中我们同时发现了多条与骨骼肌发育相关的可变剪切事件,其来源基因包括 *PDLIM5* 和 *GIT1*。He 等^[38]研究发现,*PDLIM5* 可以通过激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶(*MAPK*)信号通路进而调控鸡骨骼肌卫星细胞(SMSCs)的增殖和分化。Bahri 等^[39]证实了 *GIT1* 基因在果蝇胚胎肌肉发育中必不可少,对其发育具有引导作用。在 14 胚龄快长型与慢长型比较组中发现了 *PDLIM5* 基因 SE 型和 MXE 型 2 种差异的可变剪切事件,而在 20 胚龄快长型与慢长型比较组中只发现了 SE 型差异可变剪切事件;*GIT1* 基因在 2 个不同胚龄快长型与慢长型比较组中均发生了 SE 型差异可变剪切事件,提示不同可变剪切在骨骼肌发育中作用不同,不同胚龄骨骼肌发育过程可能由相同或不同可变剪切调控。

4 结 论

本研究利用转录组测序技术在快长型、慢长型边鸡品系胚胎期鉴定出多个与生长发育相关且存在

差异的可变剪切事件,对其来源基因进行 GO 富集分析,结果发现前 20 个条目中肌球蛋白 II 细丝组装和肌动球蛋白结构组织等与骨骼肌发育相关。KEGG 通路富集分析结果表明,前 20 条通路中包含了黏附连接和黏着斑等与骨骼肌发育相关的通路。对差异可变剪切事件来源基因进行蛋白质互作网络分析,鉴定出多个与骨骼肌发育相关的关键来源基因,包括 *TLN2*、*PARVB*、*LDB3*、*PDLIM3*、*RAC1*、*PDLIM5* 和 *GIT1* 等。以上研究结果对进一步理解和解析骨骼肌生长发育中可变剪切的调控机理具有重要意义,同时,本研究结果对边鸡及中国其他黄羽肉鸡的育种工作具有一定的参考作用。

参考文献:

- [1] BUSH S J, CHEN L, TOVAR-CORONA J M, et al. Alternative splicing and the evolution of phenotypic novelty[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2017, 372(1713): 20150474.
- [2] COOMER A O, BLACK F, GREYSTOKE A, et al. Alternative splicing in lung cancer[J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA) Gene Regulatory Mechanisms, 2019, 1862(11/12): 194388.
- [3] WANG E T, SANDBERG R, LUO S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes[J]. Nature, 2008, 456(7221): 470-476.
- [4] PAN Q, SHAI O, LEE L J, et al. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing[J]. Nature Genetics, 2008, 40(12): 1413-1415.
- [5] NILSEN T W, GRAVELEY B R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing[J]. Nature, 2010, 463(7280): 457-463.
- [6] KEREN H, LEV-MAOR G, AST G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(5): 345-355.
- [7] BHADRA M, HOWELL P, DUTTA S, et al. Alternative splicing in aging and longevity[J]. Human Genetics, 2020, 139(3): 357-369.
- [8] JAKUBAUSKIENE E, KANOPKA A. Alternative splicing and hypoxia puzzle in Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. Genes, 2021, 12(8): 1272.
- [9] SCOTTI M M, SWANSON M S. RNA mis-splicing in disease[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(1): 19-32.
- [10] NIKONOVA E, KAO S Y, SPLETTER M L. Contributions of alternative splicing to muscle type development and function[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2020, 104: 65-80.
- [11] NAKKA K, GHIGNA C, GABELLINI D, et al. Diversification of the muscle proteome through alternative splicing[J]. Skeletal Muscle, 2018, 8(1): 8.

- [12] SEBASTIAN S, FARALLI H, YAO Z, et al. Tissue-specific splicing of a ubiquitously expressed transcription factor is essential for muscle differentiation [J]. *Genes & Development*, 2013, 27(11): 1247-1259.
- [13] BODINE S C, STITT T N, GONZALEZ M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo* [J]. *Nature Cell Biology*, 2001, 3(11): 1014-1019.
- [14] HINKLE E R, WIEDNER H J, BLACK A J, et al. RNA processing in skeletal muscle biology and disease [J]. *Transcription-Austin*, 2019, 10(1): 1-20.
- [15] 王嘉力, 贾存灵, 苏利红, 等. 家鸡 *CHD1* 基因 PCR 快速性别鉴定方法的建立及其在早期鸡胚中的应用 [J]. *家禽科学*, 2009(12): 3-7.
- [16] PARKHOMCHUK D, BORODINA T, AMSTISLAVSKIY V, et al. Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(18): e123.
- [17] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [18] SHEN S, PARK J W, LU Z X, et al. rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-seq data [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(51): E5593-E5601.
- [19] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: D480-D484.
- [20] YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias [J]. *Genome Biology*, 2010, 11: R14.
- [21] BU D, LUO H, HUO P, et al. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W317-W325.
- [22] BARALLE F E, GIUDICE J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(7): 437-451.
- [23] YANG Q, ZHAO J, ZHANG W, et al. Aberrant alternative splicing in breast cancer [J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2019, 11(10): 920-929.
- [24] WU P, ZHANG M, WEBSTER N J G. Alternative RNA splicing in fatty liver disease [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 613213.
- [25] ZHANG M, HAN Y, LIU J, et al. Rbm24 modulates adult skeletal muscle regeneration via regulation of alternative splicing [J]. *Theranostics*, 2020, 10(24): 11159-11177.
- [26] LI Y, WANG J, ELZO M A, et al. Molecular profiling of DNA methylation and alternative splicing of genes in skeletal muscle of obese rabbits [J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2021, 43(3): 1558-1575.
- [27] SHU Z, WANG L, WANG J, et al. Integrative analysis of nanopore and Illumina sequencing reveals alternative splicing complexity in pig longissimus dorsi muscle [J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 877646.
- [28] 邹小利. 不同品种鸡胚胎期腿肌与胸肌发育的形态学对比研究 [D]. 广州: 华南农业大学.
- [29] 李伯江, 李平华, 吴望军, 等. 骨骼肌纤维形成机制的研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(6): 1200-1207.
- [30] BURRIDGE K. Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress [J]. *FEBS Journal*, 2017, 284(20): 3355-3361.
- [31] CHEN B, XU J, HE X, et al. A genome-wide mRNA screen and functional analysis reveal FOXO3 as a candidate gene for chicken growth [J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137087.
- [32] JONES F S, JONES P L. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling [J]. *Developmental Dynamics*, 2000, 218(2): 235-259.
- [33] THEOCHARIS A D, SKANDALIS S S, GIALELI C, et al. Extracellular matrix structure [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 97: 4-27.
- [34] HENDERSON C A, GOMEZ C G, NOVAK S M, et al. Overview of the muscle cytoskeleton [J]. *Comprehensive Physiology*, 2017, 7(3): 891-944.
- [35] RODRIGUEZ-FDEZ S, BUSTELO X R. Rho GTPases in skeletal muscle development and homeostasis [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2984.
- [36] YAMASHITA Y, MATSUURA T, KUROSAKI T, et al. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity [J]. *Neurobiology of Disease*, 2014, 69: 200-205.
- [37] WANG J Z, WU P, SHI Z M, et al. The AAV-mediated and RNA-guided CRISPR/Cas9 system for gene therapy of DMD and BMD [J]. *Brain & Development*, 2017, 39(7): 547-556.
- [38] HE H, YIN H, YU X, et al. PDLIM5 affects chicken skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation via the p38-MAPK pathway [J]. *Animals*, 2021, 11(4): 1016.
- [39] BAHRI S M, CHOY J M, MANSER E, et al. The *Drosophila* homologue of Arf-GAP GIT1, dGIT, is required for proper muscle morphogenesis and guidance during embryogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2009, 325(1): 15-23.

(责任编辑: 王 妮)