

孟科, 赵薇, 郭晨浩, 等. 不同品种绵羊肌内脂肪沉积相关 miRNA 的筛选与功能预测[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(7): 1554-1566.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.07.012

不同品种绵羊肌内脂肪沉积相关 miRNA 的筛选与功能预测

孟科^{1,2}, 赵薇¹, 郭晨浩¹, 聂伟¹, 陶毛孩¹, 袁晓春¹, 孙昊然¹, 冯登侦¹
(1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏中卫市沙坡头区畜牧水产技术推广服务中心, 宁夏 中卫 755000)

摘要: 为明确不同品种绵羊(*Ovis aries*)肌肉组织 miRNA 的表达情况, 筛选影响绵羊肌内脂肪沉积的关键 miRNA, 以滩羊、杜泊羊和小尾寒羊为研究对象, 测定背最长肌肌内脂肪含量并对其进行转录组测序(RNA-Seq), 筛选绵羊脂肪沉积相关的差异表达 miRNA。结果表明, 滩羊肌内脂肪含量显著高于杜泊羊, 极显著高于小尾寒羊; 杜泊羊肌内脂肪含量显著高于小尾寒羊。转录组测序质量良好。3 个品种绵羊共鉴定到 134 个已知 miRNA 和 153 个预测 miRNA, 这些 miRNA 的长度主要介于 21~23 nt, 且首位碱基对 U 碱基具有明显偏好性。以 $P \leq 0.05$ 和 $|\log_2 FC| > 1$ (FC 为差异倍数) 为筛选条件, 3 个比较组共获得 42 个差异表达 miRNA; 杜泊羊与滩羊比较组中筛选出 22 个差异表达 miRNA; 小尾寒羊与杜泊羊比较组中筛选出 21 个差异表达 miRNA; 小尾寒羊与滩羊比较组中筛选出 12 个差异表达 miRNA。筛选出的 42 个 miRNA 靶向到 326 个靶基因, 显著富集到减数分裂 I、肌肽-寡糖 1, 2- α -甘露糖苷酶活性和甘露寡糖甘露糖苷酶活性等 303 个基因本体(GO)条目, 以及富集到 α -亚麻酸代谢、亚油酸代谢、多巴胺能突触、胰岛素信号传导途径及 N-聚糖生物合成等 320 个京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路。根据 GO 和 KEGG 的功能描述进一步筛选出 23 个 miRNA 及其靶向的 119 个靶基因可能参与脂肪沉积。进一步构建 miRNA 靶向调控网络, 最终筛选到 oar-miR-133、oar-miR-485-5p、novel_6、novel_85 和 novel_103 等绵羊肌内脂肪沉积的关键 miRNA。随机选择的 8 个差异表达 miRNA 的实时荧光定量 PCR 结果与转录组测序结果一致, 表明转录组测序结果可靠。本研究为深入开展绵羊肌内脂肪沉积的分子调控机理、高品质绵羊品种的选育提供理论依据。

关键词: 绵羊; 肌内脂肪沉积; 转录组; miRNA

中图分类号: S826 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)07-1554-13

Screening and functional prediction of miRNA related to intramuscular fat deposition in different sheep breeds

MENG Ke^{1,2}, ZHAO Wei¹, GUO Chen-hao¹, NIE Wei¹, TAO Mao-hai¹, YUAN Xiao-chun¹, SUN Hao-ran¹, FENG Deng-zhen¹

(1. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Animal Husbandry and Fishery Technology Extension and Service Center, Shapotou District, Zhongwei City, Zhongwei 755000, China)

Abstract: In order to clarify the expression of miRNAs in muscle tissues of different breeds of sheep (*Ovis aries*) and screen the key miRNAs affecting intramuscular fat deposition in sheep, Tan sheep, Dorper sheep and Small Tail Han sheep were used as experimental materials. The intramuscular fat content of longissimus dorsi muscle was measured and transcriptome sequencing (RNA-Seq) was performed to screen the differentially expressed miRNAs related to fat deposition in sheep.

收稿日期: 2022-07-01

基金项目: 宁夏回族自治区自然科学基金项目(2020AAC03082); 宁夏回族自治区农业育种专项(NXNYZ20150101)

作者简介: 孟科(1996-), 男, 宁夏中卫人, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与分子育种研究。(E-mail) 1131988962@qq.com

通讯作者: 冯登侦, (E-mail) fdzh126@sohu.com

The results showed that the intramuscular fat content of Tan sheep was significantly higher than that of Dorper sheep, and extremely significantly higher than that of Small Tail Han sheep, and the intramuscular fat content of Dorper sheep was significantly higher than that of Small Tail Han sheep. The quality of transcriptome sequencing was good. A total of 134 known miRNAs and 153 predicted miRNAs were identified in three breeds of sheep. The length of these miRNAs mainly ranged from 21 nt to 23 nt, and the first base had obvious preference for U base. With $P \leq 0.05$ and $|\log_2 FC| > 1$ (FC was the fold change) as the screening conditions, a total of 42 differentially expressed miRNAs were obtained from the three comparison groups. Twenty-two differentially expressed miRNAs were screened in the comparison group of Dorper sheep and Tan sheep, 21 differentially expressed miRNAs were screened in the comparison group of Small Tail Han sheep and Dorper sheep, and 12 differentially expressed miRNAs were screened in the comparison group of Small Tail Han sheep and Tan sheep. The screened 42 miRNAs targeted to 326 target genes, which were significantly enriched into 303 gene ontology (GO) entries such as meiosis I, mannosyl-oligosaccharide 1,2- α -mannosidase activity and mannosyl-oligosaccharide mannosidase activity, and 320 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) metabolic pathways such as α -linolenic acid metabolism, linoleic acid metabolism, dopaminergic synapses, insulin signaling pathway and *N*-glycan biosynthesis. According to the functional description of GO and KEGG, 23 miRNAs and 119 target genes might be involved in fat deposition. The miRNA targeted regulatory network was further constructed, and finally the key miRNAs for fat deposition in sheep such as oar-miR-133, oar-miR-485-5p, novel_6, novel_85 and novel_103 were screened. The qRT-PCR results of the eight randomly selected differentially expressed miRNAs were consistent with transcriptome sequencing results, indicating that the transcriptome sequencing results were reliable. This study provides a theoretical basis for further research on the molecular regulation mechanism of intramuscular fat deposition in sheep and the breeding of high-quality sheep breeds.

Key words: sheep; intramuscular fat deposition; transcriptome; miRNA

随着生活质量的提升,人们对羊肉的需求不仅满足于数量,羊肉的品质更加成为人们关注的焦点。羊肉的品质主要由肉质性状决定,而肌内脂肪(IMF)含量是评价肉品质的重要指标。IMF 含量的高低影响到羊肉的风味、嫩度、适口性及多汁性^[1-2]。肌内脂肪的形成以及含量受到遗传、环境、营养等多种因素的共同影响^[3]。已有研究结果表明肌内脂肪含量具有较高的遗传力;在相同的环境和营养条件下,遗传背景成为影响羊肉肌内脂肪的重要因素^[4]。探究不同品种绵羊 IMF 含量差异及其分子调控机制对绵羊肉质性状改善具有重要意义。

MicroRNA(miRNA) 作为一类不编码的小分子 RNA,主要通过与其 mRNA 的 3'UTR 区结合来抑制靶基因的表达而发挥作用^[5]。近年来,国内外许多学者研究报道 miRNA 在动物脂肪的形成过程中发挥重要的调控作用。邵静等^[6]研究发现,miR-17-3p 通过靶向调控 *KCTD15* 基因的表达从而影响延边黄牛前体脂肪细胞分化;Ma 等^[7]研究结果表明,miR-26b-5p 通过靶向调控 *FGF21* 基因促进脂肪生成,参与调控山羊肌内脂肪细胞的分化。Chen 等^[8]研究发现 miR-376a 靶向调控 *KLF15* 基因,参与秦川牛的脂肪细胞增殖分化过

程;Deng 等^[9]发现 miR-27a 通过特异性结合视黄醇 X 受体 α (RXR α) 抑制绵羊前脂肪细胞的分化。随着测序技术不断发展,应用转录组测序(RNA-Seq)技术探究影响 IMF 沉积的研究也越来越多。Cheng 等^[10]通过 RNA-Seq 技术比较了不同肌内脂肪含量猪背最长肌的 miRNA 表达情况,筛选到 18 个差异 miRNA 可能参与调控脂肪酸合成和脂质代谢;喻世刚等^[11]通过比较高和低肌内脂肪含量鸡胸中 miRNA 的表达差异,筛选到 5 个 miRNA 参与到脂肪生成过程;Huang 等^[12]通过比较中国沼泽水牛肌肉和脂肪组织之间的差异 miRNA,筛选到 8 个 miRNA 在水牛肌内脂肪沉积过程中发挥重要作用。上述研究结果表明,应用 RNA-Seq 技术探究 IMF 沉积相关 miRNA 表达谱的研究较为成熟且已取得一定成果。但目前有关不同品种绵羊肌内脂肪沉积相关 miRNA 的研究较少。本研究基于杜泊羊、滩羊和小尾寒羊 3 个品种绵羊的肌内脂肪含量差异,通过 RNA-Seq 技术鉴定并筛选绵羊 IMF 沉积过程中差异表达的 miRNA,探索 miRNA 调节绵羊肌内脂肪沉积的分子机制。旨在为探究分子水平调控绵羊肉质性状提供参考,为高品质绵羊品种的选育提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

从宁夏宇泊科技有限公司石嘴山威震肉羊繁育场选择饲养条件一致的8月龄健康绵羊品种杜泊羊、滩羊和小尾寒羊各8只(公母各4只)为试验材料。对绵羊进行屠宰后,取第3肋骨到第12肋骨之间的背最长肌组织作为样品,放置于液氮中冷藏备用。

1.2 绵羊肌内脂肪含量的测定

采用索氏脂肪抽提法对试验绵羊的肌内脂肪含量进行测定。具体测定方法是:(1)取适量冷藏样品,剔除肉样筋膜后,绞为肉糜,65℃烘干,测定100g样品中水分含量记为A;(2)取测试样称质量记为W(g),用滤纸包好;(3)在102℃烘箱中烘干至恒质量,记为W₁(g);(4)将滤纸包好的样品放入索氏抽提器的抽提筒内,倒入2/3体积的乙醚后接上冷凝装置,在55℃恒温水浴中抽提6~8h。抽提结束后,在102℃烘箱中烘干至恒质量,记为W₂(g)。每品种3个重复。肌内脂肪含量(IMFC)计算公式为:

$$IMFC = (W_1 - W_2) / [(100 - A) \times W]$$

1.3 总RNA提取与质量控制

选择上述3个绵羊品种母羊各3只,采用Trizol法提取样品背最长肌组织的总RNA,利用琼脂糖凝胶电泳、Nanodrop分光光度计(Thermo公司产品,美国)和Agilent 2100生物分析仪(Agilent公司产品,美国)检测RNA样品的浓度、纯度以及完整性。

1.4 cDNA文库的构建与测序

RNA样品检测合格后,使用小RNA样品制备试剂盒(Small RNA Sample Pre Kit)进行cDNA文库的构建。构建方法为:首先利用小RNA的3'和5'端的特殊结构,以总RNA为起始样品在小RNA两端加上接头,进行反转录合成cDNA,随后经过PCR扩增和PAGE胶电泳对目标DNA片段进行分离,切胶回收后得到cDNA文库。对构建好的文库进行检验,检验合格后在Illumina平台进行测序。

1.5 miRNA鉴定与表达分析

获得原始序列后经过数据质量控制得到有效序列,对有效序列进行小RNA的种类和长度筛选。使用Bowtie_0.12.9软件将筛选得到的长度为18~35 nt的小RNA对比到绵羊基因组(Oar_rambouillet_v1.0)参考序列上。将对比到参考序列的数据与miRBase

数据库进行对比,注释分析已知的miRNA;在miRBase数据库未比对到的数据,通过miREvo_v1.1软件预测新的miRNA,并利用mirdeep2_0_0_5软件进行分析。对鉴定到的miRNA利用Stringtie v1.3.3软件进行表达量计算,采用TPM(transcript per million)值作归一化处理。利用DESeq_1.2.10软件分析样本间miRNA的表达差异,以 $P \leq 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ (FC为差异倍数)作为标准筛选表达差异miRNA。

1.6 差异miRNA靶基因预测及功能注释和富集分析

使用miRanda-3.3a和RNAhybrid v2.0软件预测表达差异miRNA的靶基因,取交集作为预测结果。miRanda-3.3a软件参数设置为:-sc 140 -en -10 -scale 4-strict -out;RNAhybrid v2.0软件参数设置为:-e 10 -p 0.05。以 $P \leq 0.05$ 为显著阈值,分别对表达差异miRNA的靶基因进行基因本体(GO)功能注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。

1.7 候选miRNA与其靶基因的互作网络分析

利用Cytoscape 3.9.1软件对筛选到的靶基因绘制互作网络图。

1.8 测序结果可靠性分析

为验证测序数据的准确性,利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)技术,测定不同绵羊品种8个差异表达miRNA的相对表达量,与RNA-seq测序表达量进行一致性比较。利用Primer Premier 6.0软件并采用颈环法设计miRNA引物,以U6作为内参基因(表1)。荧光染料为TB Green Premix Ex Taq TM II (TaKaBa,大连),所用的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR反应体系为:2×TB Green Premix Ex Taq II 10.0 μl,正向引物0.8 μl,反向引物0.8 μl,cDNA模板2.0 μl,RNase-free双蒸水6.4 μl。qPCR扩增程序为:95℃预变性2 min;95℃变性5 s,58℃退火30 s,39个循环;95℃延伸5 s,60℃维持1 min。每个样品设置3次重复。

1.9 统计分析

以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行miRNA相对表达量的计算,利用SPSS 26.0软件对3个品种绵羊的肌内脂肪含量和miRNA的表达量进行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。实时荧光定量结果图片由GraphPad Prism V8.0软件绘制。

表 1 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 所用引物

Table 1 List of primers used in real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>U6</i>	ACGGACAGGATTGACAGATT	TCGCTCCACCAACTAAGAA
<i>oar-miR-99a</i>	AGGTGTTCAACCCGTAGATCC	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
<i>oar-miR-26a</i>	AAGCTGAGTTCAAGTAATCCAGG	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
<i>oar-miR-374b</i>	CCACGTCGCGATATAATACAACCTG	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
<i>oar-miR-19b</i>	ACTTCCTCTGTGCAAATCCATG	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
<i>novel_9</i>	AACGATAAACCCGTAGATCCGA	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
<i>novel_202</i>	AACAGATGAGACCTCCGGGT	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
<i>novel_82</i>	AGTCATGCGCGCAGAGGTTAAA	CAGTGCAGGGTCCGAGGT
<i>novel_62</i>	ACGTATGCACCGATTTCTCCT	CAGTGCAGGGTCCGAGGT

2 结果与分析

2.1 绵羊肌肉脂肪含量差异分析

3 个绵羊品种肌肉脂肪含量如表 2 所示。滩羊肌肉脂肪含量最高,达 5.42%,而小尾寒羊肌肉脂肪含量最低,2.10%。滩羊肌肉脂肪含量显著高于杜泊羊,且极显著高于小尾寒羊;杜泊羊肌肉脂肪含量显著高于小尾寒羊。

2.2 RNA-seq 数据分析

本研究建立 3 个品种绵羊的 9 个背最长肌组织样品文库,通过 Illumina 平台进行深度测序后,获得原始序列共 108 813 537 条,质控后获得有效序列共

107 166 390 条。每个样本的 Q20 在 99% 以上, Q30 在 96% 以上,错误率均为 0.01%,碱基组成稳定均衡(表 3)。上述结果表明测序质量良好,可用于进一步分析。

表 2 3 个绵羊品种肌肉脂肪含量

Table 2 Intramuscular fat content of three sheep breeds

品种	肌肉脂肪含量(%)
滩羊	5.42±0.83Aa
杜泊羊	3.14±0.41ABb
小尾寒羊	2.10±0.31Bc

数据后不同大写字母表示品种间肌肉脂肪含量差异极显著 ($P < 0.01$),不同小写字母表示品种间肌肉脂肪含量差异显著 ($P < 0.05$)。

表 3 测序数据质量评估

Table 3 Sequencing data quality assessment

品种	样品	原始序列(条)	有效序列(条)	错误率(%)	Q20(%)	Q30(%)	G+C 含量(%)
杜泊羊	1	11 302 204	11 185 170	0.01	99.15	96.51	48.97
	2	10 617 482	10 380 780	0.01	99.18	97.13	49.53
	3	12 058 893	11 602 400	0.01	99.20	96.87	49.17
滩羊	1	12 449 500	12 312 405	0.01	99.37	97.54	47.67
	2	13 771 179	13 645 512	0.01	99.39	97.55	46.54
	3	13 548 701	13 400 969	0.01	99.36	97.47	46.54
小尾寒羊	1	13 879 489	13 729 275	0.01	99.16	96.70	44.88
	2	10 408 638	10 254 694	0.01	99.31	97.28	47.26
	3	10 777 451	10 655 185	0.01	99.35	97.42	47.87

2.3 miRNA 的注释与鉴定

在 18~35 nt 范围内,筛选各样品中的有效序列^[13]。筛选到的有效序列长度在 22 nt 的序列所占比例最高,滩羊和小尾寒羊 22 nt 的 read 所占比例高于杜泊羊(图 1)。每个样本至少有 87% 以上的小

RNA 序列比对到了绵羊基因参考序列上(表 4)。在 3 种绵羊肌肉组织中共鉴定到 134 个已知 miRNA 和 153 个预测 miRNA。对鉴定到的 miRNA 进行首位碱基偏好性分析发现,已知 miRNA 和预测 miRNA 的首位碱基均对 U 碱基具有明显偏好性(图 2)。

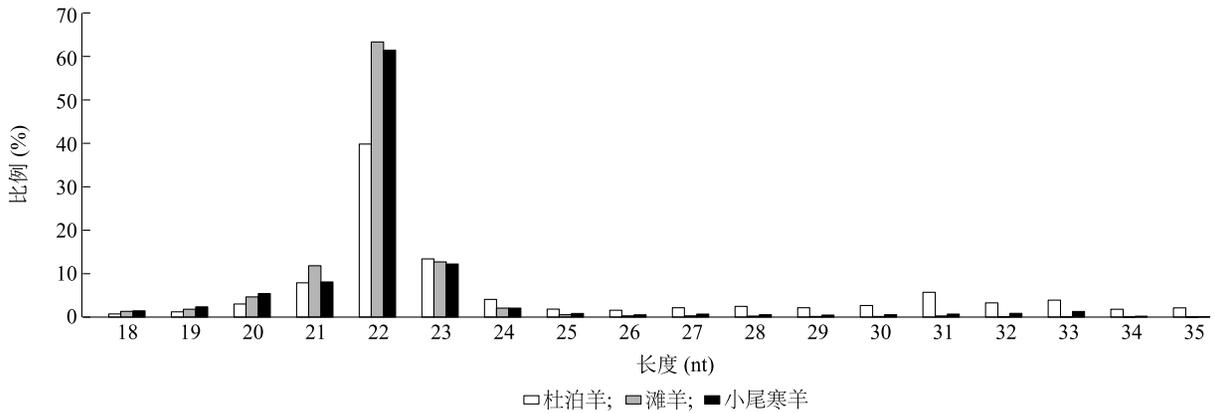


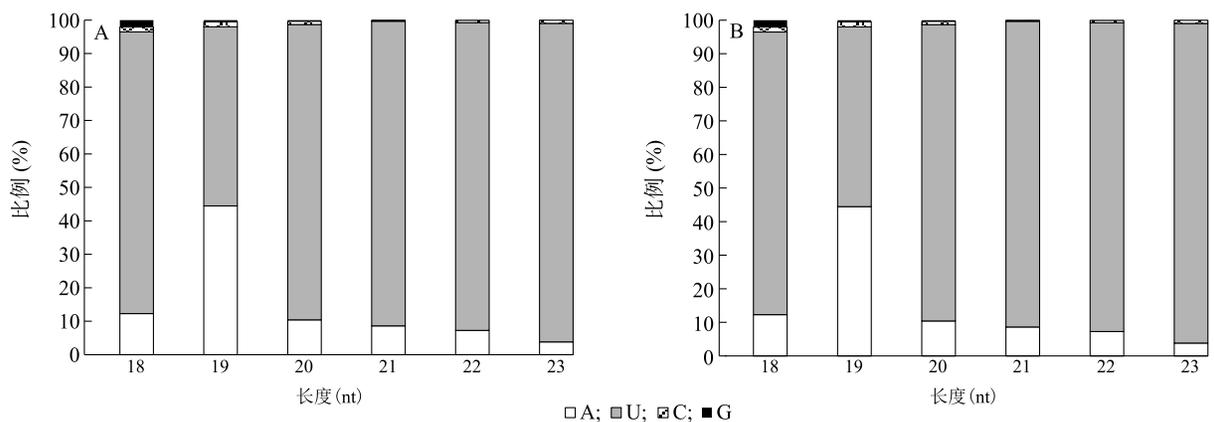
图 1 3 个不同品种绵羊肌肉组织中小 RNA 长度的分布

Fig.1 Distribution of small RNA length in muscle tissues of three different sheep breeds

表 4 筛选出的小 RNA 与参考基因组比对结果

Table 4 Comparison of the screened small RNAs with the reference genome

品种	样品	总 read 数	比对到参考序列的 read 数	已知 miRNA 数目	预测 miRNA 数目
杜泊羊	1	10 593 700 (100.00%)	9 485 492 (89.54%)	106	125
	2	9 124 443 (100.00%)	7 996 146 (87.63%)	101	113
	3	9 942 299 (100.00%)	8 872 071 (89.24%)	107	121
滩羊	1	11 431 856 (100.00%)	10 914 193 (95.47%)	104	121
	2	13 407 530 (100.00%)	12 963 362 (96.69%)	102	107
	3	13 129 124 (100.00%)	12 599 869 (95.97%)	104	119
小尾寒羊	1	13 077 159 (100.00%)	12 593 909 (96.30%)	111	102
	2	9 659 222 (100.00%)	9 087 930 (94.09%)	106	115
	3	10 366 203 (100.00%)	9 283 532 (89.56%)	100	114



A: 已知 miRNA; B: 预测 miRNA。

图 2 miRNA 的首位碱基偏向好分析

Fig.2 Preference analysis of the first base of miRNAs

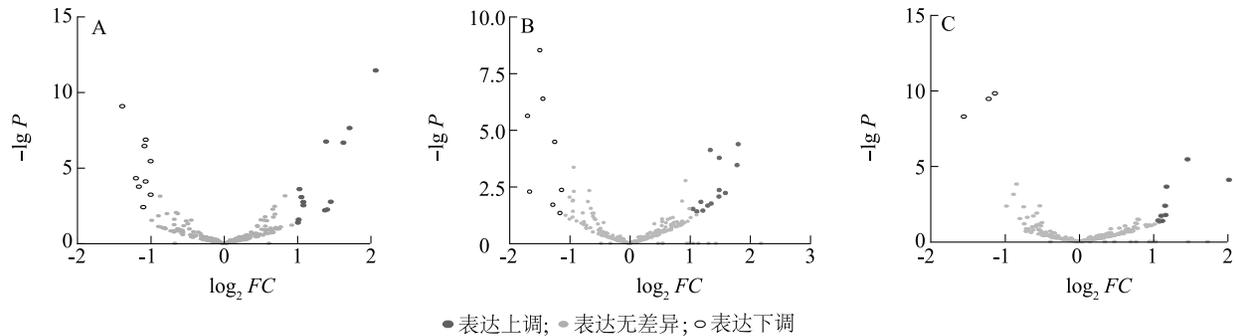
2.4 差异表达 miRNA 的筛选与分析

对 3 个绵羊品种 miRNA 的表达量进行两两比较

分析。杜泊羊与滩羊比较组中筛选出差异表达 miRNA 22 个,其中上调表达 13 个,下调表达 9 个;小尾寒

羊与杜泊羊比较组中筛选出 21 个差异表达 miRNA, 其中上调表达 13 个, 下调表达 8 个; 小尾寒羊与滩羊比较组中筛选出 12 个差异表达 miRNA, 其中上调表达 9 个, 下调表达 3 个(图 3)。3 个比较组中没有共表达的差异表达 miRNA, 小尾寒羊与滩羊比较组与杜泊羊与滩羊比较组, 小尾寒羊与杜泊羊比较组之间

均有 4 个共表达的差异表达 miRNA, 杜泊羊与滩羊比较组与小尾寒羊与杜泊羊比较组之间有 5 个共表达的差异表达 miRNA。3 个比较组中共筛选出 42 个差异表达 miRNA(图 4)。筛选出的 miRNA 包括 23 个已知 miRNA 和 19 个新预测的 miRNA。筛选出的已知 miRNA 的差异表达信息如表 5 所示。



A: 杜泊羊与滩羊比较组; B: 小尾寒羊与杜泊羊比较组; C: 小尾寒羊与滩羊比较组。

图 3 miRNA 表达量差异分析

Fig.3 Analysis on expression differences of miRNAs

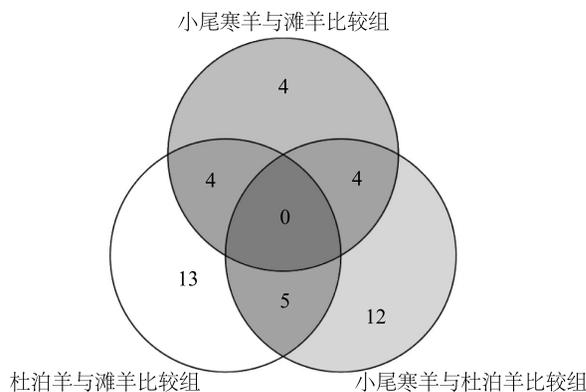


图 4 差异表达 miRNA 韦恩图

Fig.4 Venn diagram of differentially expressed miRNAs

2.5 差异表达 miRNA 靶基因预测及功能分析

筛选出的 42 个差异表达 miRNA 预测到 326 个靶基因, 形成 411 个靶向关系对。其中, novel_85、oar-miR-133 和 oar-miR-485-5p 预测到的靶基因数量较多。novel_85 预测到 99 个靶基因, 包括糖原合酶基因(*GYS1*)、组蛋白脱乙酰酶 3 基因(*HDAC3*)、胰岛素样生长因子 II 基因(*IGF2*)等; oar-miR-133 预测到 55 个靶基因, 包括肌球蛋白 IA 基因(*MYO1A*)、鸟氨酸脱羧酶 1 基因(*ODC1*)、磷脂酶 A2 基因(*PLA2*)等; oar-miR-485-5p 预测到 29 个靶基因, 包括甘露糖-6-磷酸异构酶

基因(*MPI*)、羟酰基谷胱甘肽水解酶基因(*HAGH*)、跨膜丝氨酸蛋白酶 2 基因(*TMRSS2*)等。对每组预测到的靶基因进行功能分析。GO 功能富集分析发现, 杜泊羊与滩羊比较组显著富集到 111 个 GO 条目, 其中生物学过程 51 个, 细胞组分 24 个, 分子功能 36 个; 小尾寒羊与杜泊羊比较组显著富集到 97 个 GO 条目, 其中生物学过程 51 个, 细胞组分 11 个, 分子功能 35 个; 小尾寒羊与滩羊比较组显著富集到 95 个 GO 条目, 其中生物学过程 41 个, 细胞组分 6 个, 分子功能 48 个。根据 *P* 值大小每组前 20 的 GO 条目如图 5 所示, 显著富集在减数分裂、减数分裂前期、清道夫受体活性、货物受体活性、肌肽-寡糖 1,2- α -甘露糖苷酶活性和甘露寡糖甘露糖苷酶活性等 GO 条目。KEGG 信号通路富集分析发现, 杜泊羊与滩羊比较组富集到 106 个通路, 7 个通路显著富集; 小尾寒羊与杜泊羊比较组富集到 168 个通路, 4 个通路显著富集; 小尾寒羊与滩羊比较组富集到 46 个通路, 5 个通路显著富集。根据 *P* 值大小每组前 20 个信号富集通路如图 6 所示, 显著富集的通路主要有 α -亚麻酸代谢、亚油酸代谢、多巴胺能突触、胰岛素信号传导途径、*N*-聚糖的生物合成和苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成等代谢通路。根据 GO 和 KEGG 的功能描述筛选出 23 个差异表达 miRNA 及其靶向的 119 个基因可能参与脂肪沉积。

表 5 三个比较组中差异表达的已知 miRNA

Table 5 Known miRNAs differentially expressed in the three comparison groups

组别	miRNA	$\log_2 FC$	P 值	
杜泊羊与滩羊比较组	oar-miR-133	-1.163 6	$1.786 5 \times 10^{-4}$	
	oar-miR-143	-1.390 6	$8.552 5 \times 10^{-10}$	
	oar-miR-26a	-1.070 8	$1.418 7 \times 10^{-7}$	
	oar-miR-27a	-1.002 8	$6.101 1 \times 10^{-4}$	
	oar-miR-29b	1.081 3	$3.048 5 \times 10^{-3}$	
	oar-miR-362	1.054 0	$8.803 9 \times 10^{-4}$	
	oar-miR-380-3p	-1.103 7	$4.039 3 \times 10^{-3}$	
	oar-miR-3956-5p	1.006 2	$4.275 9 \times 10^{-2}$	
	oar-miR-99a	-1.003 4	$3.686 2 \times 10^{-6}$	
小尾寒羊与杜泊羊比较组	oar-let-7b	1.123 4	$3.923 4 \times 10^{-2}$	
	oar-miR-127	1.347 8	$7.660 0 \times 10^{-5}$	
	oar-miR-19b	1.793 1	$3.552 6 \times 10^{-4}$	
	oar-miR-200c	-1.660 3	$5.244 1 \times 10^{-3}$	
	oar-miR-221	-1.128 4	$4.405 1 \times 10^{-3}$	
	oar-miR-362	-1.490 6	$3.060 0 \times 10^{-9}$	
	oar-miR-376a-5p	1.304 9	$2.164 9 \times 10^{-2}$	
	oar-miR-380-3p	1.191 4	$1.487 9 \times 10^{-2}$	
	oar-miR-3955-5p	1.059 6	$3.039 1 \times 10^{-2}$	
	oar-miR-411b-5p	1.224 2	$3.593 4 \times 10^{-2}$	
	oar-miR-432	1.495 8	$4.465 5 \times 10^{-3}$	
	oar-miR-433-3p	1.599 7	$6.003 1 \times 10^{-3}$	
	小尾寒羊与滩羊比较组	oar-let-7b	1.069 5	$3.999 3 \times 10^{-2}$
		oar-miR-19b	2.022 9	$8.150 0 \times 10^{-5}$
oar-miR-26a		-1.130 9	$1.540 0 \times 10^{-10}$	
oar-miR-374b		1.181 5	$2.308 3 \times 10^{-4}$	
oar-miR-376c-5p		1.087 7	$4.392 9 \times 10^{-2}$	
oar-miR-381-3p		1.169 2	$1.730 9 \times 10^{-2}$	
oar-miR-3955-5p		1.110 1	$1.951 0 \times 10^{-2}$	
oar-miR-485-5p		1.124 5	$4.248 3 \times 10^{-2}$	
oar-miR-99a		-1.215 4	$3.570 0 \times 10^{-10}$	

FC : 差异倍数。

2.6 miRNA 靶向调控网络

筛选出的 119 个可能参与脂肪沉积的靶基因与 23 个差异表达 miRNA 构成 129 个靶向关系对,其调控网络如图 7 所示。通过调控网络图发现,oar-miR-133、oar-miR-485-5p、novel_6、novel_85 和 novel_103 靶向到较多的靶基因且构成了完整的调控网络,故推测其可能是调控绵羊脂肪沉积的关键 miRNA。

2.7 miRNA 表达验证

利用 qRT-PCR 得到 3 个绵羊品种 8 个差异表达 miRNA (oar-miRNA-99a、oar-miR-26a、oar-miR-374b、oar-miR-19b、novel_9、novel_202、novel_82、novel_62) 的相对表达量与 RNA-seq 测序得到的这 8 个 miRNA 表达趋势基本保持一致(图 8),说明测序结果真实可靠。

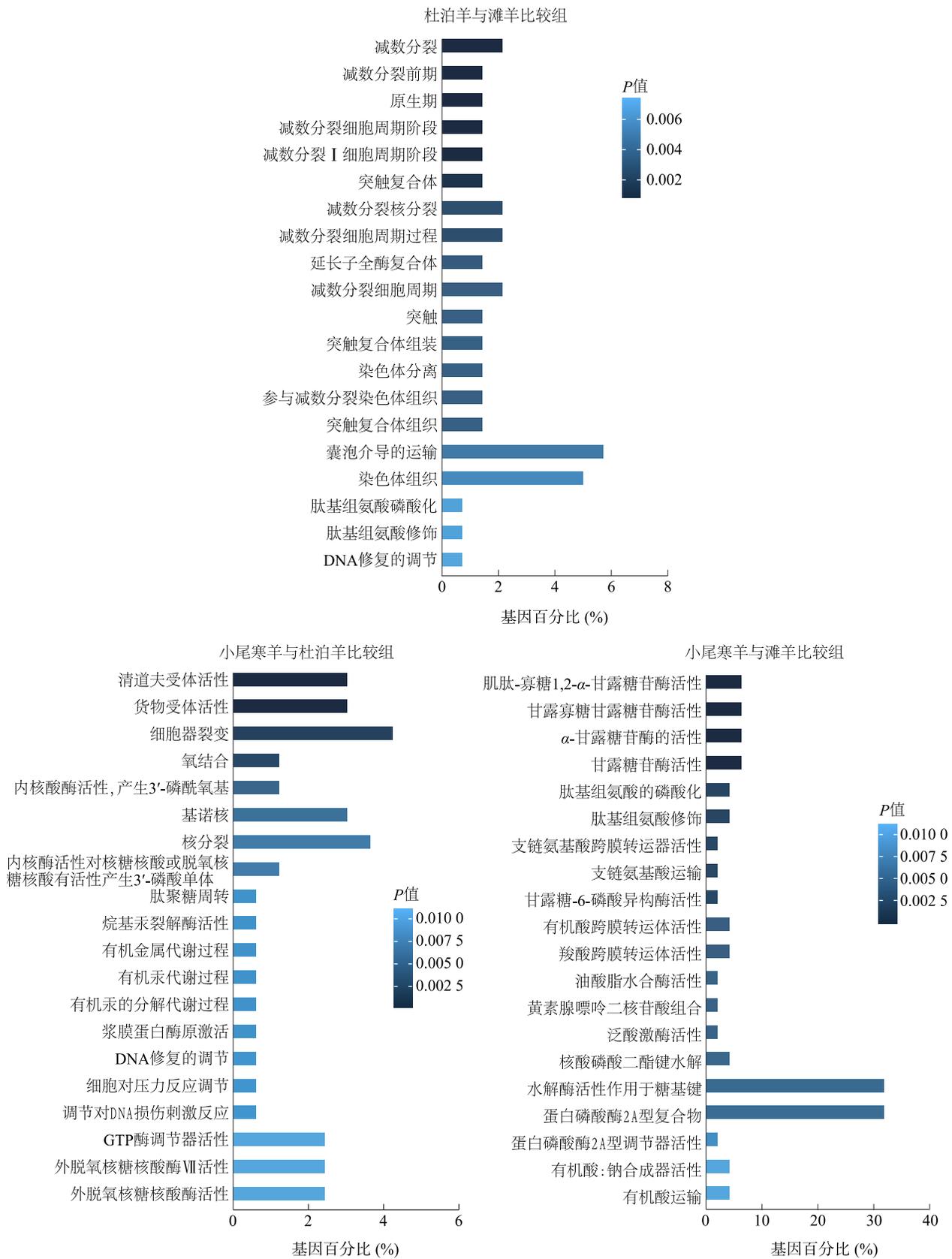


图 5 预测靶基因前 20 个 GO 条目
Fig.5 Top 20 GO entries of target genes

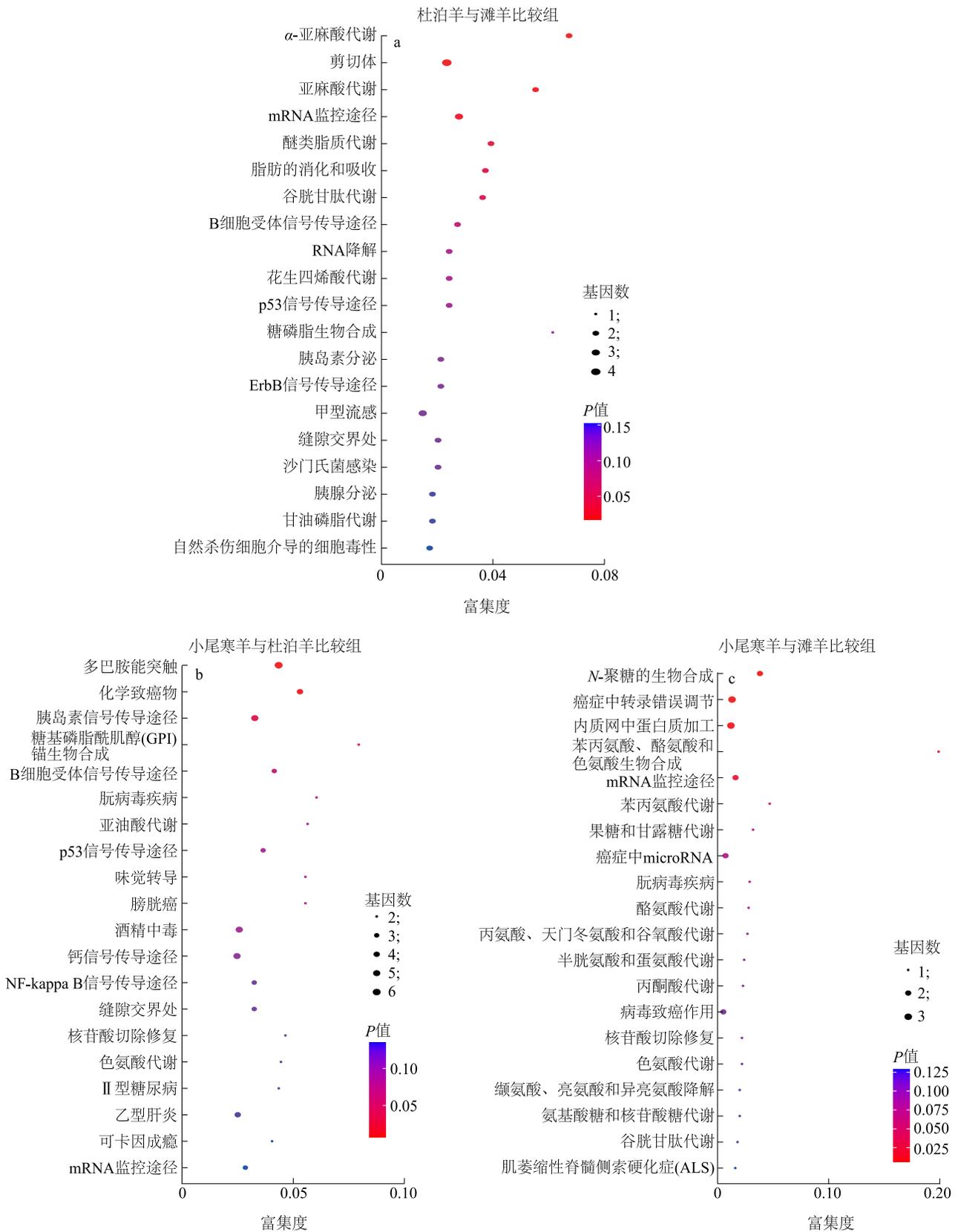


图 6 预测靶基因前 20 个 KEGG 通路

Fig.6 Prediction of the first 20 KEGG pathways of target genes

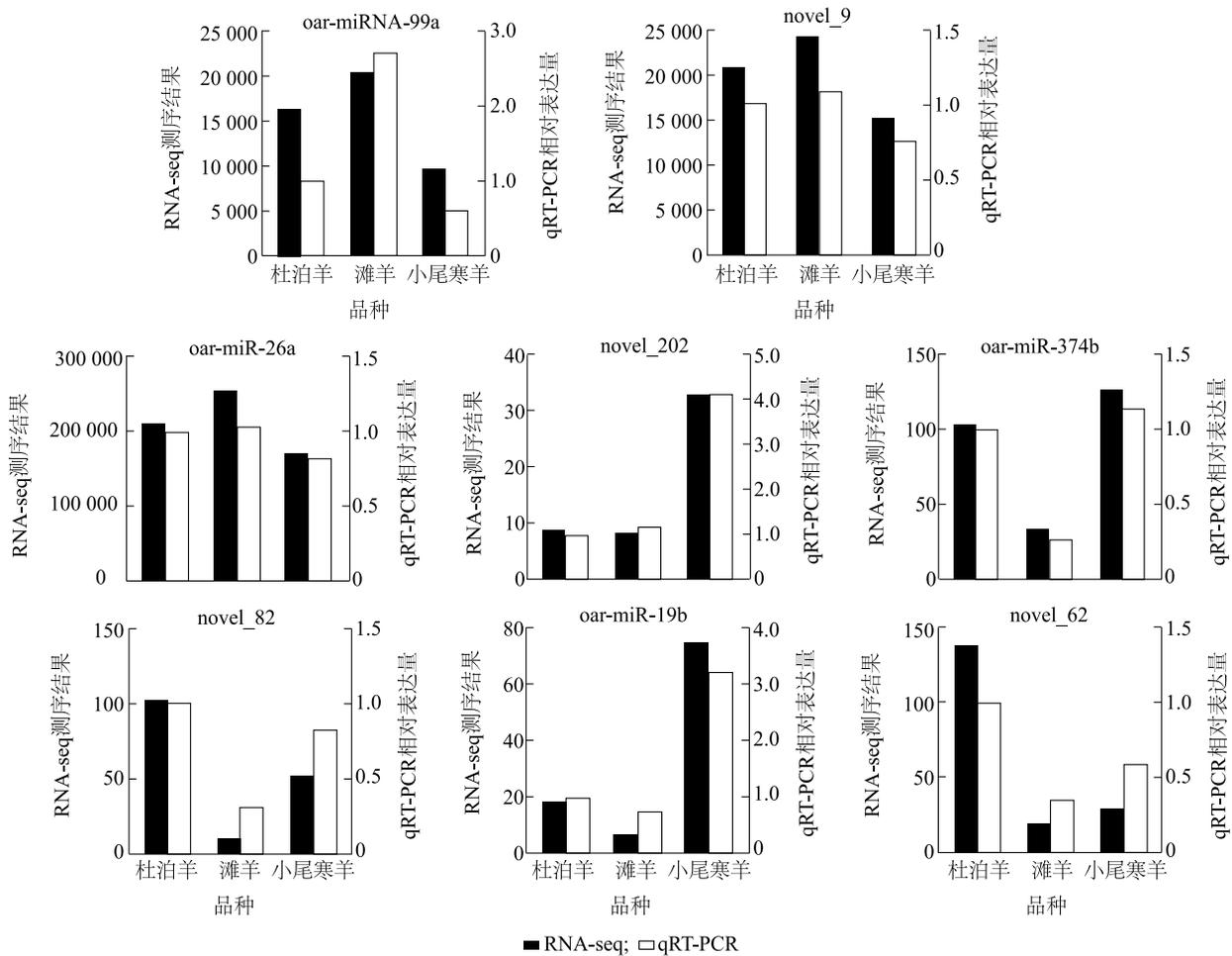


图 8 差异表达 miRNA 表达量验证

Fig.8 Verification of differentially expressed miRNA expression

143 在杜泊羊与滩羊比较组中被筛选出来,该 miRNA 在滩羊肌肉组织中表达量高于杜泊羊。在 3 个品种绵羊肌肉脂肪含量分析中,滩羊 IMF 含量最高而小尾寒羊最低,上述 2 个 miRNA 表达量的研究结果也符合该特征。同样,let-7b 是小尾寒羊与杜泊羊比较组和小尾寒羊与滩羊比较组中筛选出共有的差异表达 miRNA,且与 miR-26a 在 3 个品种绵羊肌肉组织中的表达趋势一致,即高肌肉脂肪含量的组织中 let-7b 表达量亦高。这个结果与喻世刚等^[11]发现的鸡胸肌内脂肪含量与 let-7b 表达量的关系一致。上述结果也进一步说明本研究筛选出的 miRNA 作为与绵羊肌肉脂肪含量相关的候选 miRNA 的可靠性。但这些 miRNA 对绵羊肌肉脂肪含量的影响机制还需进一步研究。

3.4 差异 miRNA 的靶基因预测及功能分析

筛选出的 42 个差异表达 miRNA 预测到 326 个

靶基因,形成 411 个靶向关系对。值得注意的是 novel_85 预测到 99 个靶基因,为差异表达 miRNA 中靶向到最多候选基因的 miRNA。这些候选的靶向基因可以参与脂肪沉积。*GYS1* 基因与糖原代谢相关,其突变影响到肌糖原的沉积^[23];HDAC3 蛋白的复合物使过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma 2$ (Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma 2$) 基因 (*PPARG2*) 转录失活,从而参与到脂肪生成过程^[24]; *IGF2* 基因的突变造成猪肌肉内脂肪和脂肪酸含量存在差异,可以参与到脂肪组织中脂肪酸的形成。上述研究结果表明, novel_85 可能是参与绵羊脂肪沉积及脂肪代谢的关键 miRNA。另外也有一些差异表达 miRNA 靶向的基因与脂肪沉积和脂肪代谢相关的研究。如 oar-miR-133 和 oar-miR-485-5p 同时靶向的谷胱甘肽硫转移酶基因 (*PIGSTP1*) 可以参与到脂质代谢过程^[25]; novel_103 靶向的丙酮酸脱

氢酶激酶 4 基因(*PKD4*),在中国草原红牛的研究中发现该基因的多态性与其肌内脂肪含量相关^[26]; oar-miR-433-3p 靶向的色氨酸 3 基因(*SESN3*)参与调节前脂肪细胞脂肪生成^[27]。为了进一步了解筛选出的差异 miRNA 的功能,对其预测的靶基因进行功能分析。GO 功能富集分析发现,富集显著的条目包括糖原代谢过程、油酸酯水合酶活性、三羧酸循环过程、低密度脂蛋白颗粒受体结合等与糖代谢及脂质代谢相关的条目。KEGG 信号通路富集分析发现,可以富集到 α -亚麻酸代谢、亚油酸代谢、多巴胺能突触、胰岛素信号传导途径以及脂肪的消化和吸收通路。已有研究表明, α -亚麻酸会影响奶牛乳腺中的脂肪酸代谢^[28],亚油酸可以增加呼吸链解耦联蛋白 1(UCP1)和肉碱-棕榈油转移酶 1(*CPT1*)的表达,促进脂肪降解^[29],并且不同共轭亚油酸对小鼠的脂肪沉积具有显著差异^[30]。上述研究结果表明,筛选出差异表达 miRNA 的靶基因可能参与脂肪沉积。根据 GO 和 KEGG 的功能描述筛选出可能参与绵羊脂肪沉积的 119 个靶基因,并对靶向关系进行调控网络构建。研究认为, oar-miR-133、 oar-miR-485-5p、 novel_6、 novel_85 和 novel_103 可能是参与绵羊肌内脂肪沉积的关键 miRNA。但 miRNA 对靶基因和 IMF 沉积的影响和调控机制尚需进行进一步阐明。

4 结论

杜泊羊,滩羊和小尾寒羊这 3 个品种绵羊 IMF 含量存在差异,滩羊肌内脂肪含量最高而小尾寒羊最低。筛选出 23 个已知的和 19 个未知的差异表达 miRNA 可能参与绵羊肌内脂肪沉积, oar-miR-133、 oar-miR-485-5p、 novel_6、 novel_85 和 novel_103 可能是绵羊肌内脂肪沉积的关键调控 miRNA。

参考文献:

- [1] FRANK D, WATKINS P, BALL A, et al. Impact of brassica and lucerne finishing feeds and intramuscular fat on lamb eating quality and flavor. a cross-cultural study using Chinese and non-Chinese Australian consumers [J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(36): 6856-6868.
- [2] 闫伟,王玉涛,张永浩,等. 绵羊肌内前体脂肪细胞 *CNRI* 和 *FABP4* 基因表达研究[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(3): 95-102.
- [3] LIANG C, QIAO L, HAN Y, et al. Regulatory roles of *SREBF1* and *SREBF2* in lipid metabolism and deposition in two Chinese representative fat-tailed sheep breeds [J]. Animals, 2020, 10(8): 1317.
- [4] MOHSEN A, HOSEIN M S, MOHAMMAD M S, et al. Association of the calpastatin genotypes, haplotypes, and SNPs with meat quality and fatty acid composition in two Iranian fat- and thin-tailed sheep breeds[J]. Small Ruminant Research, 2016, 149: 40-51.
- [5] HORAK M, NOVAK J, BIENERTOVA-VASKU J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development [J]. Dev Biol, 2016, 410(1): 1-13.
- [6] 邵静,张珈溯,尹宝珍,等. miR-17-3p 靶向 *KCTD15* 调控延边黄牛前体脂肪细胞分化[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(11): 2689-2698.
- [7] MA J Q, LIN Y Q, ZHU J J, et al. MiR-26b-5p regulates the preadipocyte differentiation by targeting *FGF21* in goats [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2021, 57: 257-263.
- [8] CHEN X Y, SAYED H A R, CHENG G, et al. Bta-miR-376a targeting *KLF15* interferes with adipogenesis signaling pathway to promote differentiation of Qinchuan beef cattle preadipocytes [J]. Animals, 2020, 10(12): 2362.
- [9] DENG K, REN C, FAN Y, et al. miR-27a is an important adipogenesis regulator associated with differential lipid accumulation between intramuscular and subcutaneous adipose tissues of sheep [J]. Domestic Anim Endocrinol, 2020, 71: 106393.
- [10] CHENG F, LIANG J, YANG L, et al. Systematic identification and comparison of the expressed profiles of lncRNAs, miRNAs, circRNAs, and mRNAs with associated co-expression networks in pigs with low and high intramuscular fat [J]. Animals, 2021, 11(11): 3212.
- [11] 喻世刚,王钢,廖娟,等. 沐川乌骨黑鸡肌内脂肪沉积相关 miRNAs 的筛选与鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(8): 2713-2726.
- [12] HUANG J P, WANG S Z, FENG X, et al. miRNA transcriptome comparison between muscle and adipose tissues indicates potential miRNAs associated with intramuscular fat in Chinese swamp buffalo [J]. Genome, 2019, 62(11): 729-738.
- [13] BARTEL D P. Metazoan MicroRNAs [J]. Cell, 2018, 173(1): 20-51.
- [14] 孟科,张天闻,梁鹏,等. 绵羊 *MYF5* 基因多态性及其与生长性状的关联分析 [J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(3): 496-505.
- [15] BUSHATI N, COHEN S M. microRNA functions [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23: 175-205.
- [16] LIU Z J, LI C Y, LI X Y, et al. Expression profiles of microRNAs in skeletal muscle of sheep by deep sequencing [J]. Asian-Australian Journal of Animal Sciences, 2019, 32(6): 757-766.
- [17] 付雪峰,赵冰茹,索朗达,等. 不同绒细度的西藏绒山羊皮肤组织 miRNA 分析与鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(11): 2118-2128.

- [18] 袁钰洁,周婧雯,殷实,等.不同发育阶段牦牛睾丸组织 miRNA 的分析及鉴定[J].中国兽医学报,2022,42(1):165-174.
- [19] 闫晓茹,师涛,潘洋洋,等. MiR-433-3p 靶向调节绵羊 *BCK-DHB* 表达[J].中国农业科学,2017,50(22):4389-4397.
- [20] ZHANG L, WU Z Q, WANG Y J, et al. MiR-143 regulates milk fat synthesis by targeting smad3 in bovine mammary epithelial cells [J]. *Animals*, 2020, 10(9): 1453.
- [21] WANG H Y, ZHENG Y, WANG G L, et al. Identification of microRNA and bioinformatics target gene analysis in beef cattle intramuscular fat and subcutaneous fat [J]. *Molecular Biosystems*, 2013, 9(8): 2154-2162.
- [22] 汪海洋,郑月,李惠侠,等.西门塔尔牛肌肉和皮下脂肪 miRNA 表达谱及 miR-27b 靶基因分析[J].中国农业科学,2013,46(18):3894-3900.
- [23] FANG L, SHEN B, IRWIN D M, et al. Parallel evolution of the glycogen synthase 1 (muscle) gene *Gys1* between old world and new world fruit bats (order: chiroptera) [J]. *Biochem Genet*, 2014, 52: 443-458.
- [24] LAI P H, WANG W L, KO C Y, et al. *HDAC1/HDAC3* modulates *PPARG2* transcription through the sumoylated CEBPD in hepatic lipogenesis [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1783(10): 1803-1814.
- [25] 王晶.延黄牛 *GSTP1* 基因遗传变异分析及其对脂代谢的影响[D].延吉:延边大学,2021.
- [26] 马彦茹,于永生,曹阳,等.中国草原红牛 *PDK4* 基因多态性及其与肉质性状的关联分析[J].中国畜牧兽医,2022,49(6):2186-2194.
- [27] LIN W, ZHAO J, YAN M, et al. *SESN3* inhibited *SMAD3* to relieve its suppression for MiR-124, thus regulating pre-adipocyte adipogenesis [J]. *Genes*, 2021, 12(12): 1852.
- [28] YANG G, BU D P, WANG J Q, et al. Duodenal infusion of α -linolenic acid affects fatty acid metabolism in the mammary gland of lactating dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(10): 5821-5830.
- [29] 伏春燕,张燕,魏祥法,等.共轭亚油酸降低脂肪沉积的分子机制研究进展[J].动物营养学报,2019,31(8):3456-3462.
- [30] 陈林,赵伟杰,张枫琳,等.不同共轭亚油酸异构体对小鼠脂肪沉积、能量代谢和肠道微生物的影响[J].华南农业大学学报,2022,43(3):1-8.

(责任编辑:石春林)