

张冬杰, 马守正, 汪 亮, 等. 猪 lncRNA5791 的表达模式及互作蛋白质分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(1): 112-118.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.01.013

猪 lncRNA5791 的表达模式及互作蛋白质分析

张冬杰, 马守正, 汪 亮, 刘 娣

(黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 为了揭示冷刺激下 lncRNA5791 的应答模式, 本研究利用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)、核质分离技术、RNA 沉降(Pull down)技术全面分析 lncRNA5791 生物功能。结果表明, lncRNA5791 在冷刺激处理的民猪背部脂肪和腹股沟脂肪中相对表达量较高, 在臀部脂肪中相对表达量较低。冷刺激处理后猪不同部位脂肪中 lncRNA5791 的相对表达量均极显著高于常温对照($P < 0.01$)。lncRNA5791 定位于猪的 9 号染色体, 其在细胞核和细胞质中均有分布。在脂肪细胞增殖期, lncRNA5791 的表达持续受到抑制; 在脂肪细胞分化期, lncRNA5791 的相对表达量呈现先升高后下降的趋势。质谱分析结果表明, lncRNA5791 可能与膜联蛋白 A2(ANXA2)、泛素 A52 残留核糖体蛋白融合产物 1(UBA52)和组蛋白 H4(H4)互作。本研究结果为揭示 lncRNA5791 在冷刺激应答中的具体调控机制奠定了重要基础。

关键词: 猪; lncRNA5791; 相对表达量; 亚细胞定位; 互作蛋白

中图分类号: S828 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)01-0112-07

Expression patterns and interacting protein analysis of pig lncRNA5791

ZHANG Dongjie, MA Shouzheng, WANG Liang, LIU Di

(Institute of Animal Husbandry, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to reveal the response pattern of lncRNA5791 under cold stimulation, this study comprehensively analyzed the biological functions of lncRNA5791 by using real-time fluorescence quantitative PCR technology (qRT-PCR), nuclear-cytoplasmic separation technology and RNA pull-down technology. The results showed that the relative expression level of lncRNA5791 was relatively high in the back fat and inguinal fat of Min pigs treated with cold stimulation, and relatively low in the gluteal fat. The relative expression levels of lncRNA5791 in the fats of different parts of pigs treated with cold stimulation were all extremely significantly higher than those of the normal temperature control group ($P < 0.01$). lncRNA5791 was located on chromosome 9 of pigs and was distributed in both the nucleus and the cytoplasm. During the proliferation period of adipocytes, the expression of lncRNA5791 was continuously inhibited. During the differentiation period of adipocytes, the relative expression level of lncRNA5791 showed a trend of increasing first and then decreasing. The results of mass spectrometry analysis indicated that lncRNA5791 might interact with annexin A2 (ANXA2), ubiquitin A52 residue ribosomal protein fusion product 1 (UBA52) and histone H4 (H4). The results of this study lay an important foundation for revealing the specific regulatory mechanism of lncRNA5791 in the response to cold stimulation.

Key words: pig; lncRNA5791; relative expression; subcellular localization; interacting protein

收稿日期: 2024-06-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172696); 国创中心先导项目(NCTIP-XD/B01); 黑龙江省农业科学院创新工程重大项目(CX23ZD06)

作者简介: 张冬杰(1980-), 女, 黑龙江佳木斯人, 博士, 研究员, 主要从事民猪资源研究。(E-mail) djzhang8109@163.com

通讯作者: 刘 娣, (E-mail) liudi1963@163.com

在哺乳动物中, 仅有 1%~2% 的 DNA 被转录成编码蛋白质的信使 RNA(mRNA), 而其余的 DNA 则被转录成非编码 RNA(Non-coding RNA, ncRNA)^[1]。长度小于 200 nt 的 ncRNA 被称为小 ncRNA(Small ncRNA, sncRNA), 长度大于 200 nt 的则被称为长

ncRNA(lncRNA)。lncRNA 广泛存在于真核生物中,具有较强的时间和空间特异性以及组织特异性^[2]。lncRNA 在物种间保守性较差,参与调控基因转录、组蛋白修饰、DNA 甲基化修饰等重要生命活动^[3]。

脂肪是重要的代谢和内分泌组织,也是机体主要的能量储存部位。目前,对人类脂肪组织的研究主要集中在肥胖和糖尿病的治疗方面,对家养动物脂肪组织的研究主要集中在背膘厚^[4]、肌内脂肪含量^[5]和抗逆性^[6]等方面。研究表明,lncRNA 参与许多重要生物过程,包括脂肪分泌、脂质代谢等。如 lncRNAU90926 可以通过调控 PPAR 信号通路及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)调控脂肪沉积^[7]。lncRNAGm15290 可以竞争性吸附 miR-27b,促进脂肪关键转录因子 PPAR γ 和 CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)基因表达,从而调控脂质代谢^[8]。与 mRNA 相比,lncRNA 表达水平较低,且在物种间保守性较差;与 miRNA 相比,lncRNA 序列较长,能够形成更为复杂的空间结构,lncRNA 调控靶基因转录的机制也更复杂多样。目前 lncRNA 的作用机制尚未完全阐明。

民猪是中国华北型猪的主要代表之一,具有高繁殖力、产仔数多、抗寒和抗病力强、耐粗饲料、肉质优良的特点。本课题组利用转录组测序技术对冷刺激民猪的脂肪组织中差异表达的 lncRNA 进行鉴定与筛选,发现了 1 个表达量上调 7.8 倍的 lncRNA,与 NCBI 数据库比对后,将其命名为 lncRNA5791^[9]。冷刺激会促进脂肪细胞的能量代谢,改变其增殖分化模式。本研究拟利用分子生物学技术对冷刺激民猪的生物学特征进行分析,为揭示 lncRNA5791 在猪低温应答中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

6 头 6 月龄体重相近的雌性民猪购自黑龙江省农业科学院民猪保种场。6 头民猪随机分为常温对照和冷刺激处理,每处理 3 头。民猪均在室内饲养,室内温度控制在 $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$,当室外平均温度降至 -20°C 时,将冷刺激处理民猪放于室外饲养,对照猪仍在室内饲养。试验期间保证充足的饲料和饮水,冷刺激 3 d 后,集中屠宰所有民猪,分别取民猪背部脂肪、臀部脂肪、颈部脂肪、胸部脂肪、腹股沟脂肪和腹部脂肪,于 -80°C 冰箱保存。

1.2 试剂

主要试剂有 Trizol、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)、RNA 反转录试剂盒、胶回收纯化试剂盒、Universal DNA 纯化回收试剂盒、脂肪组织胞质核分离试剂盒、TranscriptAid T7 高产率转录试剂盒。

1.3 RNA 提取及反转录

使用 Trizol 试剂提取民猪不同部位脂肪组织的 RNA,利用 NanoDrop 2000&8000 微量分光光度计检测纯度,利用安捷伦生物分析仪 2100 检测 RNA 的浓度及完整性,使用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。

1.4 lncRNA5791 在民猪不同部位脂肪组织中的表达情况

为检测冷刺激 3 d 后 lncRNA5791 在民猪背部脂肪、臀部脂肪、颈部脂肪、腹股沟脂肪及腹部脂肪组织中的表达水平,本研究利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)进行检测。依据 NCBI 数据库中已公布的 lncRNA5791 基因序列 (GenBank 登录号:XR_002335791),通过 Primer 5.0 软件设计引物 (lncRNA5791 F: 5'-GACGCCCTTGCTTGTACCTGA-3'; lncRNA5791 R: 5'-TGTGCCCTTTGACTCTTCCA-3'),引物由吉林省库美生物科技有限公司合成。PCR 反应体系: cDNA 模板 0.5 μL , 2 \times SYBR Green PCR Mixture 10.0 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 灭菌水 8.5 μL 。PCR 反应程序: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参基因,其引物序列为 GAPDH F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'; GAPDH R: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 lncRNA5791 的相对表达量, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t_{\text{冷刺激处理}} - \Delta C_t_{\text{对照}}$, 其中 $\Delta C_t = C_{t_{\text{lncRNA5791}}} - C_{t_{\text{GAPDH}}}$ 。

1.5 lncRNA5791 的染色体定位

依据 NCBI 数据库中已公布的 lncRNA5791 序列,利用 Primer 5.0 软件设计 PCR 扩增引物 (lncRNA5791 LF: 5'-CCGAGGGAACACCTACCGA-3', lncRNA5791 LR: 5'-ACAACGATCATCACAACCCA-3')。采用 PCR 扩增目标序列后进行克隆测序,并与 NCBI 数据库中的序列进行比对分析,以确认 lncRNA5791 在染色体上的定位。

1.6 lncRNA5791 的亚细胞定位

按照脂肪组织胞质胞核分离试剂盒 (Invent) 说明书分离细胞核和细胞质。取 120~150 mg 民猪背

部脂肪组织,37 ℃ 解冻后切成2~3 mm³小块,放入无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中,加入 600 μL N/C 缓冲液和 15 μL RNA 抑制剂,研磨2~3 min 后,全部转移至预冷的离心管柱中,-20 ℃ 孵育 20 min,4 ℃、500 g 离心 5 min,弃离心管柱,4 ℃、100 g 离心 5 min,小心吸取上清液,加入 1.5 mL 离心管中(无 RNA 酶),30 μL PBS 溶液重悬细胞核,完成细胞核和细胞质的分离。使用 Mini Universal RNA 提取试剂盒分别提取细胞核和细胞质 RNA。通过 qRT-PCR 检测 lncRNA5791 在脂肪细胞中的核质分布情况,以 *GAPDH*(主要在细胞质表达)和 *Neat1*(主要在细胞核表达)作为对照,引物序列为 *Neat1* F:5'-AGAGTGATGCCTGGTAGATGG-3';*Neat1* R:5'-GTG-GCTTCCTGTGAGTATTGG-3'。

1.7 lncRNA5791 在猪脂肪细胞增殖和分化阶段表达特征分析

取实验室冻存的民猪前脂肪细胞,37~39 ℃ 温水复苏后接种至完全培养基培养。培养 12 h 首次收集细胞,之后每隔 12 h 收集 1 次细胞,直到培养 48 h,待细胞汇合度达到90%~100%时,加入脂肪细胞诱导培养基 I (5.0 μg/mL胰岛素,1.0 μmol 地塞米松,1.0 μmol 吡啶美辛,0.5 μmol 磷酸二酯酶抑制剂),诱导 2 d 后,将脂肪细胞诱导培养基 I 更换为脂肪细胞诱导培养基 II (5 μg/mL胰岛素),并于 4 d、6 d、8 d 同一时间更换新的脂肪细胞诱导培养基 II,在每次更换培养基时收集细胞,直至诱导第 8 d。将所提 RNA 反转录成 cDNA,保存于-20 ℃。以 cDNA 为模板,采用实时荧光定量 PCR 检测 lncRNA5791 在脂肪细胞增殖期和分化期的表达情况。

1.8 lncRNA5791 互作蛋白的筛选与分析

以材料与方法 1.5 中克隆获得的 *lncRNA5791* 片段为模板,通过 PCR 扩增获得含有 T7 启动子的 DNA 粗产物,引物序列如下:lncRNA5791-正义链-F:5'-taatacgaactactatagggCCGAGGGAACACCTACCGACC-CAGCGGC-3',lncRNA5791-正义链-R:5'-CATTTTTT-TATTTTTATTTTTATTTT-3'(小写字母为 T7 启动子序列)。扩增反义链的引物序列如下:lncRNA5791-反义链-F:5'-taatacgaactactatagggCATTTTTTATTTTT-ATTTTTATTTTATTTT-3',lncRNA5791-反义链-R:5'-CCGAGGGAACACCTACCGACCCAGCGGC-3'。扩增片段作为 RNA pull down 试验的阴性对照。PCR 反

应体系:10×Buffer for KOD-Plus 10 μL,2 mmol dNTPs 8 μL,25 mmol MgSO₄ 4 μL,100 μm 上下游引物各 2 μL,DNA 模板 2 μL,1.0 U/μL KOD-Plus 2 μL,加高纯度水(DEPC)补至 100 μL。使用 Universal DNA 纯化回收试剂盒回收目的条带。

以回收的目的条带为模板,使用高产率转录试剂盒进行体外转录。反应体系:DNA 模板 1 μg,5×TranscriptAid Reaction Buffer 4 μL,10 mmol ATP 2 μL,10 mmol/L CTP 2 μL,10 mmol GTP 2 μL,10 mmol UTP 2 μL,T7 enzyme mix 2 μL。在 37 ℃ 下反应 40 min 后加入 1 μL DNase I,37 ℃ 孵育 15 min 以去除残余 DNA,加入 28 μL DEPC 水,5 mol 醋酸铵 5 μL 混合均匀。加入 60 μL 无水乙醇和 1 μL EDTA,于-20 ℃ 静置 1 h,然后 16 000 g 离心 10 min,弃上清液后用 70 %乙醇漂洗沉淀,沉淀物晾干后,将沉淀物溶于 20 μL DEPC 水,通过琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 片段的大小。

严格按照 PierceTM Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit 试剂盒的操作说明,获取 lncRNA5791 与结合蛋白的复合物溶液。配制 15 mL 分离胶(15%)和 5 mL 浓缩胶(5%),进行复合物溶液 SDS-PAGE 电泳,电泳条件:浓缩胶,80 V 电压电泳 30 min;分离胶,120 V 电压电泳 60 min,电泳结束后,将胶置于去离子水中清洗 5 min,弃掉清洗液,加入固定液,室温下固定 30 min,随后弃掉固定液,加入去离子水清洗 2 次,加入致敏液浸泡 30 min,弃掉致敏液后,加入去离子水清洗 2 次,加入染色液,室温下染色 20 min,弃掉染色液,加入去离子水清洗 2 次,加入显色液,显色 2 min 左右,溶液变浑浊后弃掉显色液,加入新的显色液直至出现清晰的目的条带,清洗后拍照留存。

切下 lncRNA5791 正义链编码蛋白质与反义链编码蛋白质间存在差异的条带,送到武汉金开瑞生物工程有限公司进行质谱分析。

1.9 数据统计分析

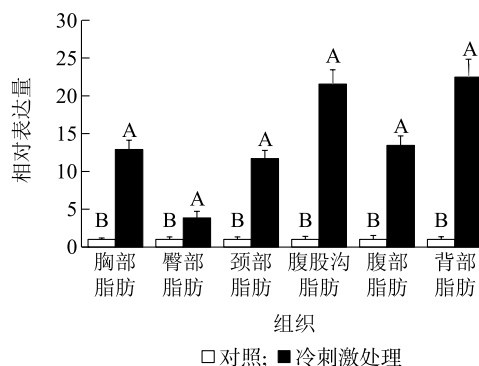
使用 SPSS20.0 软件进行单因素方差分析,每组 3 个生物学重复和 3 个技术重复。

2 结果与分析

2.1 lncRNA5791 在不同部位脂肪组织中的表达情况

如图 1 所示,lncRNA5791 在冷刺激处理的民猪

背部脂肪和腹股沟脂肪中相对表达量较高,在臀部脂肪中相对表达量较低。冷刺激处理猪不同部位脂肪中 lncRNA5791 的相对表达量均极显著高于常温对照 ($P < 0.01$),但猪不同部位脂肪中 lncRNA5791 的相对表达量上升幅度存在差异。说明冷刺激会诱导 lncRNA5791 在脂肪中的表达。



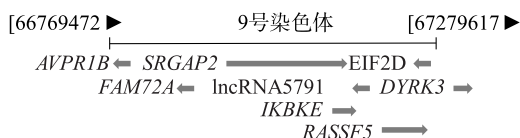
同一部位脂肪组织图柱上不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图1 冷刺激处理民猪不同部位脂肪组织中 lncRNA5791 的相对表达量

Fig.1 Relative expression of lncRNA5791 in adipose tissues of different parts of Min pigs under cold stimulation treatment

2.2 lncRNA5791 的染色体定位

以 lncRNA5791 LF/lncRNA5791 LR 为引物,PCR 扩增后获得 808 bp 目的片段,通过 BLAST 比对,在 NCBI 数据库中获得 1 段与其序列相似度达 99% 的非编码 RNA 序列,该序列位于 9 号染色体,与序列相似家族 72 成员 A (*FAM72A*) 和双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 3 (*DYRK3*) 等基因相邻 (图 2)。



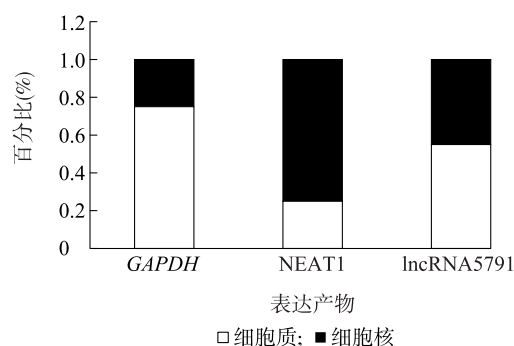
AVPR1B:精氨酸加压素受体 1B 基因;SRGAP2:SLIT-ROBO Rho GTPase 激活蛋白 2 基因;EIF2D:真核翻译起始因子 2D;FAM72A:序列相似家族 72 成员 A 基因;DYRK3:双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 3 基因;IKBKE:kappaB 激酶 ϵ 抑制因子基因;RASSF5:Ras 关联域家族成员 5 基因。

图2 lncRNA5791 在染色体上的位置

Fig.2 Chromosomal localization of lncRNA5791

2.3 lncRNA5791 的亚细胞定位

亚细胞定位结果表明,lncRNA 在细胞核和细胞质均有分布 (图 3)。



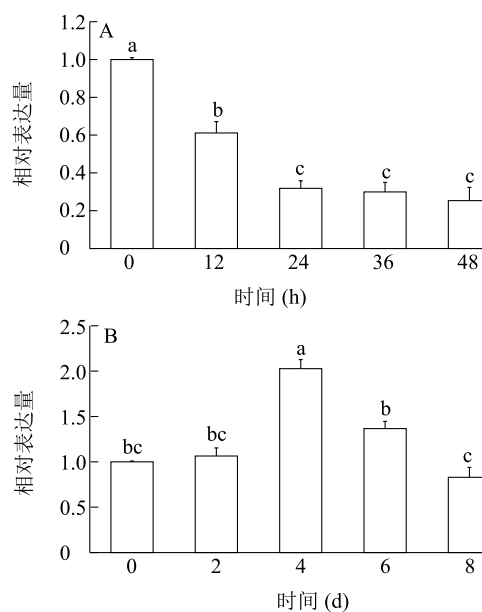
GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;NEAT1:核旁斑组装转录本 1。

图3 lncRNA5791 的亚细胞定位

Fig.3 The subcellular localization of lncRNA5791

2.4 lncRNA5791 在脂肪细胞增殖期和分化期的表达

由图 4 可知,在细胞增殖期,lncRNA5791 0 h 时相对表达量最高,显著高于 12 h、24 h、36 h、48 h ($P < 0.05$),随着时间的延长相对表达量呈下降趋势。在细胞分化期,lncRNA5791 相对表达量呈先上升后下降的趋势,在第 4 d lncRNA5791 相对表达量达到最高,显著高于 0 d、2 d、6 d、8 d ($P < 0.05$)。



A:增殖期;B:分化期。图柱子上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图4 lncRNA5791 在脂肪细胞增殖期 (A) 和分化期 (B) 的表达

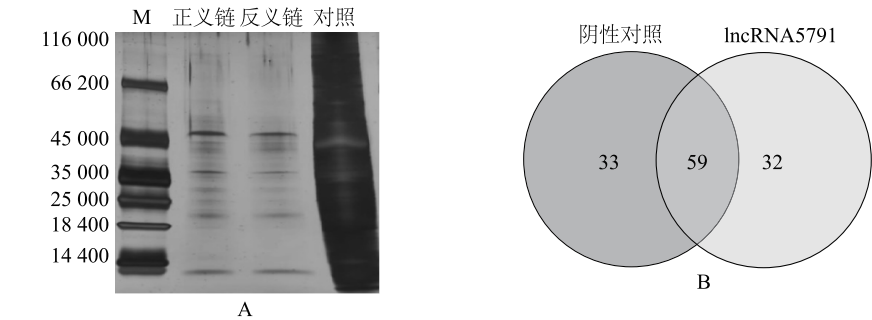
Fig.4 Expression of lncRNA5791 during adipocyte proliferation (A) and differentiation (B)

2.5 lncRNA5791 互作蛋白的筛选

如图 5A 所示,通过 RNA pull down 试验获得与

lncRNA5791 互作的蛋白。质谱分析结果(图 5B)表明,与 lncRNA5791 和阴性对照互作的蛋白质分别有 91 个和 92 个,与两者共同互作的蛋白质有 59 个。将与 lncRNA5791 互作的 91 个蛋白质按照得分高低进

行排序,排名前 10 的蛋白质如表 1 所示,从中去掉与阴性对照共有的蛋白质,获得的 3 个特异性蛋白质分别为膜联蛋白 A2(ANXA2)、泛素 A52 残留核糖体蛋白融合产物 1(UBA52)和组蛋白 H4(H4)。



M:蛋白质相对分子量标准。
图 5 RNA 沉降技术联合质谱技术筛选的与 lncRNA5791 互作蛋白
Fig.5 Proteins interacting with lncRNA5791 screened by RNA pull down combined with mass spectrometry

表 1 与 lncRNA5791 互作蛋白
Table 1 Proteins interacting with lncRNA5791

蛋白质	覆盖率(%)	相对分子量	唯一肽段数	是否与反义链探针结合
胰蛋白酶(TRYF)	53.25	25 895.1	32	是
β-肌动蛋白(ACTB)	40.39	40 015.4	2	是
前胸腺素 α(PTMa)	18.94	14 318.4	7	是
热休克蛋白 90 α 家族 B 类成员 1(HSP90AB1)	10.80	83 038.2	5	是
热休克蛋白 90 β 家族成员 1(HSP90B1)	8.08	92 430.8	6	是
膜联蛋白 A2(ANXA2)	14.16	38 578.6	5	否
肌球蛋白(MYO1)	3.27	218 249.7	2	是
波形蛋白(VIM)	13.52	53 667.2	4	是
泛素 A52 残留核糖体蛋白融合产物 1(UBA52)	13.44	34 426.8	6	否
组蛋白 H4(H4)	31.07	11 367.3	3	否

3 讨论

脂肪组织是一种富含脂肪细胞的特殊结缔组织,可分为白色脂肪组织(WAT)和棕色脂肪组织(BAT)。脂肪组织不仅是储存能量的场所,还是调控多种生理过程的重要代谢传感器和内分泌器官^[10]。机体遭受冷刺激后,BAT 通过线粒体内膜上的 H⁺转运蛋白——解偶联蛋白 1(UCP1),以非颤抖性产热的形式将储存的能量转化为热量,从而维持体温平衡^[11]。WAT 可通过褐变增强动物对寒冷环境的耐受性。Zhang 等^[12]发现,在寒冷季节,耐寒的蒙古绵羊肩胛和皮下的白色脂肪细胞直径显著增

加,脂肪生成基因相对表达量显著升高,腹膜和肾周的白色脂肪组织(WAT)发生季节性褐变。本课题组在前期研究发现,冷刺激处理会改变民猪皮下脂肪组织基因的表达模式,且同一基因在不同部位脂肪中的表达存在差异^[13]。由于猪缺失 UCP1 基因,无法形成传统意义上的褐色脂肪^[14],其脂肪组织在冷刺激下的产热机制仍有待进一步探究。
本研究进一步利用 qRT-PCR 技术检测了 lncRNA5791 在不同部位脂肪的表达情况,结果表明其在民猪背部脂肪和腹股沟脂肪中相对表达量较高,在臀部脂肪中相对表达量较低,这与潘建飞等^[15]对巴马猪的研究结果一致。说明背部脂肪和

腹股沟脂肪虽同为皮下脂肪,但对冷刺激的应答模式存在差异。李倩文等^[16]研究发现,低温诱导冬季藏猪腹股沟和肩胛处脂肪细胞呈现多腔脂滴形态,同时脂肪细胞褐变基因相对表达量显著提高。Engelhard等^[17]研究发现,冷刺激处理小鼠肩胛部棕色脂肪(iBAT)中 lncRNAGm1555 表达受到抑制,相对表达量较低,在肩胛部白色脂肪(iWAT)中相对表达量中等;lncRNAGm1555 在附睾白色脂肪(eWAT)中相对表达量较高。结合本研究结果综合分析,lncRNA对冷刺激产生了应答,但其在不同脂肪组织中的调控机制不同,导致其相对表达量存在差异。

lncRNA 的调控作用与其亚细胞定位密切相关。大多数 lncRNA 定位于细胞核中,作为细胞核组织和功能的调节因子,参与基因转录、组蛋白修饰等生物过程;部分 lncRNA 则被输出到细胞质中,通过调控 mRNA 的稳定性、调节翻译效率发挥作用^[18]。此外,也有一些 lncRNA 可同时在细胞质和细胞核中表达。例如 lncRNAPYCARD-AS1 是一种靶向促凋亡基因 PYCARD 的反义 lncRNA。在细胞核中,它将 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)和组蛋白甲基转移酶(G9a)募集到 PYCARD 启动子区,以促进 DNA 甲基化和组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸残基的二甲基化(H3K9me2)修饰。在细胞质中,它与 PYCARD mRNA 相互作用,抑制核糖体的组装和 PYCARD 的翻译^[19]。本研究发现,lncRNA5791 同时定位于细胞核和细胞质中,但其具体作用机制尚不明确,仍需进一步探究。

前脂肪细胞通过增殖和分化最终形成成熟的脂肪细胞,这一过程受到多条信号通路的调控,其中包含多种转录因子^[20]。lncRNA 的发现进一步完善了脂肪细胞调控网络。有研究表明,lncBATE10 通过与 CUGBP Elav 样家族成员 1(Celf1)的竞争性结合,减少过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α)的释放,进而促进脂肪组织褐变^[21]。lncRNA MSTRG4710 通过 miR-29b-3p/IGF1 轴正向调控脂肪细胞增殖和脂肪生成^[22]。在前脂肪细胞分化期,lncRNA Acart 相对表达量迅速升高,lncRNA Acart 过表达可加速脂肪细胞的增殖并减少细胞凋亡^[23]。本研究中,在脂肪细胞增殖期,lncRNA5791 表达持续受到抑制;在脂肪细胞分化过程中,lncRNA5791 相对表达量呈先上升后下降的趋势,在第 4 d 相对表达量达到最高。由此推测,lncRNA5791 可能在抑制脂肪细胞增殖的同时,促进脂肪细胞早期分化。

RNA pull down 技术是检测 RNA 结合蛋白与其靶向 RNA 相互作用的主要技术。对于已知的互作蛋白,可通过免疫印记试验(Western blotting)进行验证。对于未知的互作蛋白,则需采用质谱分析方法进行鉴定。lncRNA5791 是 1 个新发现的 lncRNA,本研究利用其反义链探针作为阴性对照,筛选到 3 个可能与其发生互作的蛋白。其中,ANXA2 是一种钙离子依赖的磷脂结合蛋白,属于膜联蛋白家族,在细胞质中以游离单体形式存在,参与跨膜转运及钙调蛋白调控的膜相关生物活动^[24],泛素 A52 残留核糖体蛋白融合产物 1(UBA52)是一种高度保守的核质分布蛋白,具有维持染色质结构、调控基因表达及调控应激反应等多种功能^[25]。组蛋白 H4(H4)是染色体中含量最少的组蛋白之一,主要位于染色体的轴心位置,对染色体的稳定性和 DNA 的包装具有重要作用,同时还可结合特定转录因子以调节基因表达^[26]。本研究结果表明,在冷刺激下,lncRNA5791 可能通过与这 3 种蛋白互作,参与调控钙离子转运以及维持染色质结构的稳定性。

4 结论

lncRNA5791 在冷刺激处理的民猪背部脂肪和腹股沟脂肪中相对表达量较高,在臀部脂肪中相对表达量较低。冷刺激处理后猪不同部位脂肪中 lncRNA5791 的相对表达量均极显著高于常温对照($P < 0.01$)。lncRNA5791 定位于猪的 9 号染色体,其在细胞核和细胞质中均有分布。在脂肪细胞增殖期,lncRNA5791 的表达持续受到抑制;在脂肪细胞分化期,lncRNA5791 的相对表达量呈现先升高后下降的趋势,在第 4 d 时相对表达量最高。lncRNA5791 可能与膜联蛋白 A2(ANXA2)、泛素 A52 残留核糖体蛋白融合产物 1(UBA52)和组蛋白 H4(H4)互作。

参考文献:

- [1] STEFANI G, SLACK F J. Small non-coding RNAs in animal development[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9: 219-230.
- [2] IWAKIRI J, TERA I G, HAMADA M. Computational prediction of lncRNA-mRNA interactions by integrating tissue specificity in human transcriptome[J]. Biology Direct, 2017, 12: 1-8.

- [3] ZHANG P W, WU S, HE Y X, et al. lncRNA-mediated adipogenesis in different adipocytes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 7488.
- [4] DING R R, ZHUANG Z W, QIU Y B, et al. Identify known and novel candidate genes associated with backfat thickness in Duroc pigs by large-scale genome-wide association analysis[J]. *Journal of Animal Science*, 2022, 100(2): skac012.
- [5] HAN H Y, GU S H, CHU W W, et al. MiR-17-5p regulates differential expression of NCOA3 in pig intramuscular and subcutaneous adipose tissue[J]. *Lipids*, 2017, 52(11): 939-949.
- [6] HOU L J, XIE M Y, CAO L B, et al. Browning of pig white preadipocytes by co-overexpressing pig PGC-1 α and mice UCP1[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 48(2): 556-568.
- [7] CHEN J, LIU Y, LU S, et al. The role and possible mechanism of lncRNA U90926 in modulating 3T3-L1 preadipocyte differentiation[J]. *International Journal of Obesity*, 2017, 41(2): 299-308.
- [8] LIU W H, MA C L, YANG B, et al. lncRNA Gm15290 sponges miR-27b to promote PPAR γ -induced fat deposition and contribute to body weight gain in mice[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 493(3): 1168-1175.
- [9] ZHANG D J, WANG W T, LI Z Q, et al. Deciphering the lncRNA and mRNA profiles of Min pig backfat after acute cold stress[J]. *Journal of Applied Animal Research*, 2022, 50(1): 620-628.
- [10] SHEN W, REN S P, HOU Y Y, et al. Single-nucleus RNA-sequencing reveals NRF1/NFE2L1 as a key factor determining the thermogenesis and cellular heterogeneity and dynamics of brown adipose tissues in mice[J]. *Redox Biology*, 2023, 67: 102879.
- [11] LAU K H, WALDHART A N, DYKSTRA H, et al. PPAR γ and C/EBP α response to acute cold stress in brown adipose tissue[J]. *iScience*, 2022, 26(1): 105848.
- [12] ZHANG Y M, ERDENE K, ZHAO Y B, et al. Role of white adipose tissue browning in cold seasonal acclimation in grazing Mongolian sheep (*Ovis aries*) [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2022, 109: 103333.
- [13] 张冬杰, 汪亮, 王文涛, 等. 冷处理对民猪皮下脂肪组织基因表达模式的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59(8): 207-213.
- [14] ZHOU Y B, XU Z Y, WANG L Y, et al. Cold exposure induces depot-specific alterations in fatty acid composition and transcriptional profile in adipose tissues of pigs[J]. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2022, 13: 827523.
- [15] 潘建飞, 郑千涛, 陶聪, 等. 急性冷刺激后巴马猪背膘和腹股沟皮下脂肪组织的脂质组比较[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(9): 2759-2766.
- [16] 李倩文, 杨榛, 杨雅楠, 等. 冬夏两季环境温度对藏猪生理特征及相关基因表达的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(3): 873-881.
- [17] ENGELHARD C A, HUANG C, KHANI S, et al. Comprehensive transcriptional profiling and mouse phenotyping reveals dispensable role for adipose tissue selective long noncoding RNA Gm15551 [J]. *Noncoding RNA*, 2022, 8(3): 32.
- [18] BRIDGES M C, DAULAGALA A C, KOURTIDIS A. LNCcation: lncRNA localization and function [J]. *Journal of Cell Biology*, 2021, 220(2): e202009045.
- [19] MIAO H, WANG L L, ZHAN H M, et al. A long noncoding RNA distributed in both nucleus and cytoplasm operates in the PYCARD-regulated apoptosis by coordinating the epigenetic and translational regulation [J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(5): e1008144.
- [20] 史明月, 张雪莲, 杨晓奋, 等. *NR1H3* 基因调控猪前体脂肪细胞分化的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(7): 2094-2103.
- [21] BAI Z Q, CHAI X R, YOON M J, et al. Dynamic transcriptome changes during adipose tissue energy expenditure reveal critical roles for long noncoding RNA regulators[J]. *PLoS Biology*, 2017, 15(8): e2002176.
- [22] TANG T, JIANG G L, SHAO J H, et al. lncRNA MSTRG4710 promotes the proliferation and differentiation of preadipocytes through miR-29b-3p/IGF1 axis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(21): 15715.
- [23] HUANG R Y, SHI C Y, LIU G B. Long noncoding RNA ACART knockdown decreases 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation[J]. *Open Life Sciences*, 2023, 18(1): 20220552.
- [24] 马良, 李晓林, 韩晶. 膜联蛋白 A2 在恶性肿瘤中作用的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2024, 31(1): 82-88.
- [25] TIWARI S, SINGH A, GUPTA P, et al. UBA52 is crucial in HSP90 ubiquitylation and neurodegenerative signaling during early phase of Parkinson's disease[J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3770.
- [26] KUMAR K, MOIRANGTHEM R, KAUR R. Genome protection: histone H4 and beyond[J]. *Current Genetics*, 2020, 66(5): 945-950.

(责任编辑: 成纾寒)