

马欣雨, 宋雅萍, 焦若普, 等. 牛 bta-miR-15a 靶基因的预测及其在脂肪细胞分化过程中的表达模式鉴定[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(6): 1202-1210.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.06.012

牛 bta-miR-15a 靶基因的预测及其在脂肪细胞分化过程中的表达模式鉴定

马欣雨^{1,2}, 宋雅萍^{1,2}, 焦若普^{1,2}, 马海楠^{1,2}, 姜超^{1,2}, 宋小雨^{1,2}, 杨东梅^{1,2}, 龚红芳^{1,2}, 马艺伦^{1,2}, 魏大为^{1,2}

(1. 宁夏大学动物科技学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏反刍动物分子细胞育种重点实验室, 宁夏 银川 750021)

摘要: 为了探究 bta-miR-15a 的生物学特性, 鉴定其在脂肪分化过程中的表达模式, 应用生物信息学分析方法, 研究 miR-15a 在不同物种中的保守性, 预测其潜在靶基因, 并对其进行功能富集分析。应用实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time polymerase chain reaction, RT-qPCR) 技术鉴定 miR-15a 在牛背最长肌、皮下脂肪中的相对表达量, 探究其在肌内前体脂肪细胞不同分化阶段的表达模式。结果表明, miR-15a 在不同物种间具有高度保守性; 借助 TargetScan、miRWalk 软件共预测出 7 582 个候选靶基因, 整合后得到 462 个候选的共有靶基因; 靶基因主要在对生长因子的应答、细胞分化的负调控及 Wnt 信号通路等基因本体 (GO) 条目上富集。基于京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 数据库的信号通路富集分析结果显示, 其靶基因主要富集在 Notch、丝裂原活化蛋白质激酶 (MAPK)、鞘脂等信号通路中。进一步通过 RT-qPCR 分析发现, bta-miR-15a 在安格斯牛、西门塔尔牛皮下脂肪中的相对表达量极显著高于背最长肌中的相对表达量 ($P < 0.01$), 并且其在西门塔尔牛皮下脂肪中的相对表达量显著高于安格斯牛皮下脂肪中的相对表达量 ($P < 0.05$), 在安格斯牛中, 成年牛背最长肌组织中的相对表达量极显著高于犊牛背最长肌组织 ($P < 0.01$)。研究还发现, bta-miR-15a 在牛肌肉脂肪分化阶段的时序表达过程中呈现先上升后下降的变化。上述结果表明, bta-miR-15a 在牛脂肪的沉积过程中扮演重要角色, 为探究其在脂肪细胞成脂分化过程中的调控作用奠定了基础。

关键词: 牛 bta-miR-15a; 生物信息学分析; 脂肪细胞分化; 表达模式

中图分类号: S823.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2026)06-1202-09

Prediction of bovine bta-miR-15a target gene and identification of its expression pattern during adipocyte differentiation

MA Xinyu^{1,2}, SONG Yaping^{1,2}, JIAO Ruopu^{1,2}, MA Hainan^{1,2}, JIANG Chao^{1,2}, SONG Xiaoyu^{1,2}, YANG Dongmei^{1,2}, GONG Hongfang^{1,2}, MA Yilun^{1,2}, WEI Dawei^{1,2}

(1. School of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Key Laboratory of Ruminant Molecular Cell Breeding, Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750021, China)

收稿日期: 2025-06-11

基金项目: 宁夏重点研发计划项目 (2023BCF01006、2024BBF01007); 宁夏自然科学基金项目 (2025AAC040003、2025AAC030558); 宁夏高等教育本科人才培养提升计划项目

作者简介: 马欣雨 (2002-), 女, 宁夏吴忠人, 本科生, 研究方向为牛的重要经济性状。 (E-mail) 13995035323@163.com

通讯作者: 魏大为, (E-mail) weidawei@nxu.edu.cn

Abstract: To investigate the biological characteristics of bta-miR-15a and identify its expression pattern during adipogenic differentiation, bioinformatics analysis was employed to examine the conservation of miR-15a across different species, predict its potential target genes, and perform functional enrichment analysis. Quantitative real-time polymerase chain reaction

(RT-qPCR) was applied to determine the relative expression of miR-15a in bovine longissimus dorsi muscle and subcutaneous adipose tissue, and to investigate its expression patterns at different stages of intramuscular preadipocyte differentiation. The results showed that miR-15a was highly conserved across different species. A total of 7 582 candidate target genes were predicted using TargetScan and miRWalk software, and 462 common candidate target genes were obtained after integration. The target genes were mainly enriched in Gene Ontology (GO) terms including response to growth factors, negative regulation of cell differentiation, and Wnt signaling pathway. Pathway enrichment analysis based on the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database revealed that the target genes were mainly enriched in Notch, mitogen-activated protein kinase (MAPK), and sphingolipid signaling pathways. Further RT-qPCR analysis revealed that the relative expression of bta-miR-15a was significantly higher in subcutaneous adipose tissue than in longissimus dorsi muscle in both Angus and Simmental cattle ($P < 0.01$), and its expression was significantly higher in subcutaneous adipose tissue of Simmental cattle compared with that of Angus cattle ($P < 0.05$), while the relative expression in longissimus dorsi muscle of adult Angus cattle was significantly higher than that of Angus calves ($P < 0.01$). Additionally, the temporal expression of bta-miR-15a during bovine intramuscular adipocyte differentiation exhibited a pattern of first increasing and then decreasing. These results indicate that bta-miR-15a plays an important role in bovine fat deposition, laying a foundation for further investigation into its regulatory mechanism during adipogenic differentiation.

Key words: bovine bta-miR-15a; bioinformatics analysis; adipocyte differentiation; expression pattern

近年来,随着居民膳食结构的调整,优质牛肉越来越受到消费者的青睐。脂肪是家畜育肥饲养过程中的关键营养物质沉积形式,牛肉中的肌内脂肪含量会直接影响其嫩度、色泽等食用特性^[1]。脂肪组织是一种复杂的内分泌器官,在机体的代谢、能量平衡中扮演着重要角色^[2]。脂肪组织的发育是一个复杂的生物学过程,涉及多种基因和信号通路之间的精准调控。脂肪组织的增殖分化主要包括以下4个时期:(1)间充质干细胞增殖,随后定向分化生成前体脂肪细胞;(2)前体脂肪细胞经过克隆增殖、分化,生成前脂肪细胞;(3)前脂肪细胞生成多室脂肪细胞,并出现大量小脂滴;(4)随着细胞中脂质的形成,大量小脂滴汇聚成大脂滴,在细胞内占据大部分体积^[3]。多室脂肪细胞可以生成单室脂肪细胞,即成熟脂肪细胞。已有研究发现,在间充质干细胞向成熟脂肪细胞分化的过程中,主要经历前脂肪细胞、脂肪祖细胞和成熟脂肪细胞等关键阶段,在这个过程中,一系列转录因子如PPAR γ 、C/EBP、SREBP等被激活^[4],调控脂肪细胞分化相关基因的表达,从而促进前体脂肪细胞分化为脂肪细胞,最终诱导脂肪生成。近年来,大量研究证实,微小RNA(microRNA, miRNA)在脂肪分化过程中发挥着重要的调控作用^[5]。

miRNA是一类长度为19~25个核苷酸的内源性非编码小型RNA分子^[6]。miRNA通过与靶mRNA的3'非翻译区部分互补性结合,抑制其转录和翻译^[7-8]。研究发现,miRNA通过影响其转录因子及信

号通路来调控脂肪细胞的增殖和分化。例如,miR-326通过靶向调控C/EBP α ,抑制细胞的成脂分化^[9];miR-27b可以通过调节脂代谢相关基因PPAR γ 的表达量来促进脂肪细胞分化^[10];miR-450b-3p可以直接靶向SIRT1并通过Wnt/ β -Catenin信号通路促进脂肪形成^[11];miR-15a、miR-15b是miR-15家族中的2个重要成员。近年来的研究发现,miR-15a可能通过调控靶基因ACOX1、SCP2、ABCD3的表达进而参与鸡肌内脂肪的沉积过程^[12],而miR-15b通过调控靶基因FOXO1相对表达量的增加,从而抑制猪前体脂肪细胞的分化^[13]。bta-miR-15a是牛特异性表达的miRNA,通过与靶基因CD163结合从而降低奶牛乳腺炎的发生率^[14]。bta-miR-15a可以通过抑制奶牛细胞活力及 β -酪蛋白、甘油三酯和乳糖的分泌,从而影响奶牛的泌乳功能^[15]。然而,目前关于bta-miR-15a在牛肌内脂肪生成过程中作用的报道较少,并且其调控机制尚不明确。

鉴于此,本研究利用数据库对不同物种的miR-15a成熟序列、种子序列进行保守性分析,并构建系统进化树,利用生物信息学方法预测bta-miR-15a的靶基因,并对其进行基因本体论(Gene ontology, GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库信号通路富集分析。进一步采用实时荧光定量PCR方法检测bta-miR-15a在牛背最长肌、皮下脂肪中的相对表达量,探究bta-miR-15a在牛肌内脂肪

不同分化阶段的时序表达模式。本研究结果旨在为解析 bta-miR-15a 在肉牛肌内脂肪沉积过程中的调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

采集在同一饲养条件下的 24 月龄的成年的健康安格斯牛、西门塔尔牛的皮下脂肪、背最长肌及 6 月龄健康安格斯犊牛的背最长肌组织。

TRIzol、Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 2×M5 HiPer SYBR Premix *EsTaq*, 购自北京聚合美生物科技有限公司; 油红 O, 购自北京索莱宝科技有限公司; 磷酸缓冲盐溶液、油红 O、胎牛血清(FBS)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-Isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、罗格列酮和地塞米松等, 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 无水乙醇、甲醛、三氯甲烷和

异丙醇等, 均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 bta-miR-15a 的生物信息学分析 从美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中获取牛(*Bos taurus*)、野猪(*Sus scrofa*)、鸡(*Gallus*)、鼠(*Mus musculus*)、人(*Homo*)、山羊(*Capra hircus*)、马(*Equus caballus*)的 miR-15a 序列(表 1)。用 MEGA 12.0 软件进行不同物种间 miR-15a 序列的保守性分析, 并构建系统进化树; 用 Targetscan、miRWalk 在线工具预测 bta-miR-15a 的靶基因。将用 2 种算法预测的靶基因通过 Venny 进行整合, 得到共同预测的靶基因。通过 String 对整合得到的靶基因进行筛选, 获得 bta-miR-15a 高置信度的关键靶基因。用 Metascape(<http://metascape.org>)数据库对靶基因进行 GO 功能注释、KEGG 信号通路富集分析, 得到靶基因主要参与的生物学过程与主要参与的信号通路。

表 1 不同物种间 miR-15a 的成熟序列及种子序列

Table 1 Mature sequence and seed sequence of miR-15a in different species

物种	成熟序列(5'→3')	种子序列(5'→3')	NCBI 登录号
牛(<i>Bos taurus</i>)	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	AGCAGCAC	NR_030793.1
野猪(<i>Sus scrofa</i>)	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	AGCAGCAC	NR_035364.1
鸡(<i>Gallus</i>)	TAGCAGCACATAATGGTTTGT	AGCAGCAC	NR_031410.1
鼠(<i>Mus musculus</i>)	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	AGCAGCAC	NR_029733.1
人(<i>Homo</i>)	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	AGCAGCAC	NR_152569.1
山羊(<i>Capra hircus</i>)	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	AGCAGCAC	NR_129605.1
马(<i>Equus caballus</i>)	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	AGCAGCAC	NR_032957.1

NCBI: 美国国家生物技术信息中心。

1.2.2 RNA 的提取、反转录及实时荧光定量 PCR

用 TRIzol 法提取各组织、各细胞的总 RNA。参照 Prime Script™ RT-PCR 试剂盒说明书, 将各 RNA 反转录为 cDNA。用 2×M5 HiPer SYBR Premix *EsTaq* 荧光定量试剂盒对目的基因、标志基因进行实时定量检测。*U6*、*bta-miR-15a* 基因的引物序列见表 2。50 μL RT-qPCR 反应体系包含 25 μL 2×M5 HiPer SYBR Premix *EsTaq* (含有 *Tli RNaseH*)、5 μL cDNA、各 2 μL 上游引物和下游引物、去离子无菌水。PCR 反应在 CFX96 Real-Time PCR Detection System 仪器上采用两步法进行(95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 35 个循环)。

1.2.3 牛肌内前体脂肪的分离培养、诱导分化 本

研究采用优化的组织块法分离牛前体脂肪细胞。具体操作如下: 将脂肪组织剪成 3 mm×3 mm 的小块, 接种于 10 cm 培养皿中; 加入生长培养基[10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)+90% 杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)]进行培养, 待组织块周围长出大量脂肪细胞后, 挑出组织块, 继续培养至脂肪组织汇合度达到 90%; 将培养基换为分化培养基[10% FBS+10 μg/mL 胰岛素+1 μmol/L 地塞米松+0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-Isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)+1 μmol/L 罗格列酮+DMEM]。将分化细胞分别进行分化处理 0 d、2 d、4 d、6 d、8 d。通过表型鉴定(油红 O 染色)分析所分离牛前体脂肪细胞的纯度、分化潜能, 并在显微镜下进行成像观察。

表 2 bta-miR-15a 定量检测所用引物信息

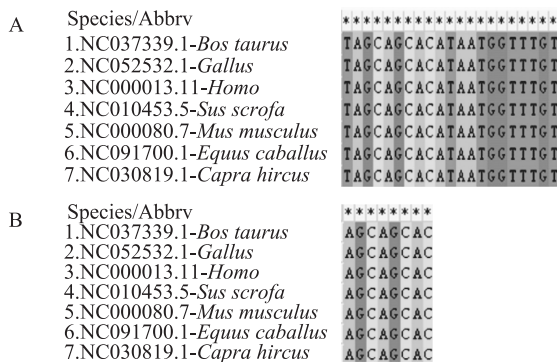
Table 2 Primer information for quantitative detection of bta-miR-15a

名称	引物序列(5'→3')
bta-miR-15a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT- TCGCACTGGATACGACACAAACCA(逆转录) F:TCGGCAGGTAGCAGCACATAA R:GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	F:GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT R:CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA

2 结果与分析

2.1 miR-15a 的序列保守性分析

本研究借助多物种序列比对及进化树构建方

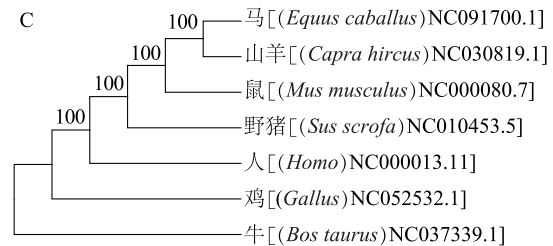


A:成熟序列比对结果;B:种子序列比对结果;C:系统进化树。

图 1 miR-15a 在不同物种间的序列比对结果及系统进化树

Fig.1 Sequence alignment and phylogenetic tree construction of miR-15a among different species

法,以期揭示 miR15a 在进化过程中的保守程度。通过比对牛(*Bos taurus*)、野猪(*Sus scrofa*)、鸡(*Gallus*)、鼠(*Mus musculus*)、人(*Homo*)、山羊(*Capra hircus*)、马(*Equus caballus*)等物种的 miR-15a 成熟序列和种子序列,发现 miR-15a 在不同物种间展现出高度的序列保守性(图 1A、图 1B)。进一步构建系统进化树并进行分析发现,miR-15a 在不同物种间的同源性一致,且在物种间高度保守(图 1C)。上述结果说明,miR-15a 在不同物种间的调控功能上具有稳定性和一致性。



2.2 bta-miR-15a 的靶基因预测

为了探究 bta-miR-15a 在脂肪分化过程中的潜在作用机制,本研究通过 TargetScan、miRWalk 在线网站预测牛 bta-miR-15a 的靶基因。由图 2 可以看出,借助 TargetScan 预测出 1 394 个候选靶基因,借助 miRWalk 预测出 4 003 个唯一的候选靶基因,共计 5 397 个候选靶基因。借助 Venny 软件,将 2 个数据库的数据整合后得到 462 个候选靶基因。通过 String 在线软件筛选关键靶基因,初步获得一批高置信度的靶基因(表 3)。值得注意的是,由于 bta-miR-15a 的预测靶基因 *CDK6*、*PDCD4*、*E2F3* 等参与了脂肪发育相关的生物学过程,因此初步推测 bta-miR-15a 与脂肪发育密切相关。

2.3 bta-miR-15a 靶基因 GO 功能注释

由图 3A 可以看出,bta-miR-15a 的候选靶基因主要集中在生物过程中对生长因子的应答(GO 编号:0070848)、Wnt 信号通路(GO 编号:00160055)、

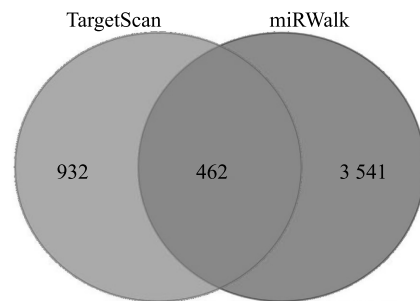


图 2 bta-miR-15a 靶基因预测的韦恩图

Fig.2 Venn diagram of bta-miR-15a target gene prediction

突触组织的调控(GO 编号:0050807)等;bta-miR-15a 的候选靶基因主要集中在细胞组分中的谷氨酸能突触(GO 编号:0098978)、轴突(GO 编号:0030424)等;在分子功能方面,靶基因主要参与蛋白质结构域特异性结合(GO 编号:0019904)、组蛋白 H3 甲基转移酶活性(GO 编号:0140938)、组蛋白修

饰活性(GO 编号:0140993)等。另外,在对 GO 功能进行注释的过程中,发现一些与脂肪分化相关的生物过程,其主要参与对生长因子的应答(GO 编号:0070848)、Wnt 信号通路(GO 编号:00160055)、细胞分化的负调控(GO 编号:0045596)、GTP 水解酶(Guanosine triphosphatase, *GTP*)介导的信号转导的调控(GO 编号:0051056)、生长(GO 编号:

0040007)、组织形态发生(GO 编号:0048729)(图 3B)。已有研究发现,Wnt 参与 β -连环蛋白介导的经典信号通路,通过抑制成脂基因 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 的表达,从而参与前体脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞的过程^[16]。上述结果进一步证明,bta-miR-15a 在脂肪分化过程中具有一定作用。

表 3 bta-miR-15a 预测的关键靶基因及其生物学作用

Table 3 Predicted key target genes of bta-miR-15a and their biological roles

基因名称	登录号	主要生物学作用
<i>CDK6</i>	NM_001192301.2	调节细胞周期的进程、成脂转录,在脂肪前体细胞增殖、脂肪细胞分化与成熟脂肪代谢稳态中发挥作用
<i>PDCD4</i>	NM_001083647.1	参与调控糖脂代谢、胰岛素抵抗、细胞凋亡
<i>E2F3</i>	NM_001192838.1	参与细胞周期相关的基因的表达,抑制脂肪细胞分化及白色脂肪细胞棕色化
<i>NOTCH2</i>	XM_002686114.7	依据微环境信号精细平衡细胞的增殖、凋亡与谱系分化方向
<i>YWHAQ</i>	NM_001078127.2	介导信号转导
<i>CCNYL1</i>	XM_003585764.6	细胞周期蛋白依赖性蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶调节剂活性
<i>ABCF3</i>	NM_001083457.1	利用腺嘌呤核苷三磷酸(Adenosine triphosphate, ATP)酶活性精细调控蛋白质合成
<i>VEGFA</i>	NM_001316956.1	提高血管通透性,促进血管增殖和血管形成等
<i>FGF7</i>	XM_005211861.4	调节多种细胞的迁移、增殖、分化、代谢活动和神经功能
<i>ELL2</i>	NM_001191146.2	帮助 RNA 聚合酶 II 完成转录
<i>KMT2A</i>	XM_059875010.1	参与调控基因的表达,特别是与细胞分化和发育相关的基因
<i>VAMP1</i>	NM_001101088.1	参与脂肪细胞囊泡转运、脂类分泌与代谢调控,影响脂肪分化与脂肪组织发育
<i>BCL2L2</i>	NM_001076533.1	参与调节细胞存活和凋亡
<i>PRKAB2</i>	XM_005203986.5	正向调节腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)的活性
<i>ROCK1</i>	XM_002697789.7	参与调节细胞形态、运动、收缩和增殖等生理过程
<i>SPEN</i>	XM_002694139.6	通过与 DNA 或 RNA 结合,影响基因的表达
<i>COPS7B</i>	NM_001046612.1	调控泛素连接酶活性,进而影响蛋白质泛素化的状态及降解
<i>ERLIN2</i>	XM_005226125.5	调节内质网脂质传递和内质网膜脂质组织
<i>SAR1B</i>	NM_001035315.2	作为小 G 蛋白参与囊泡形成,调控 mTORC1 信号通路
<i>WNT3A</i>	XM_024995392.2	调节多效性细胞功能,包括自我更新、增殖、分化和运动

2.4 bta-miR-15a KEGG 信号通路富集分析

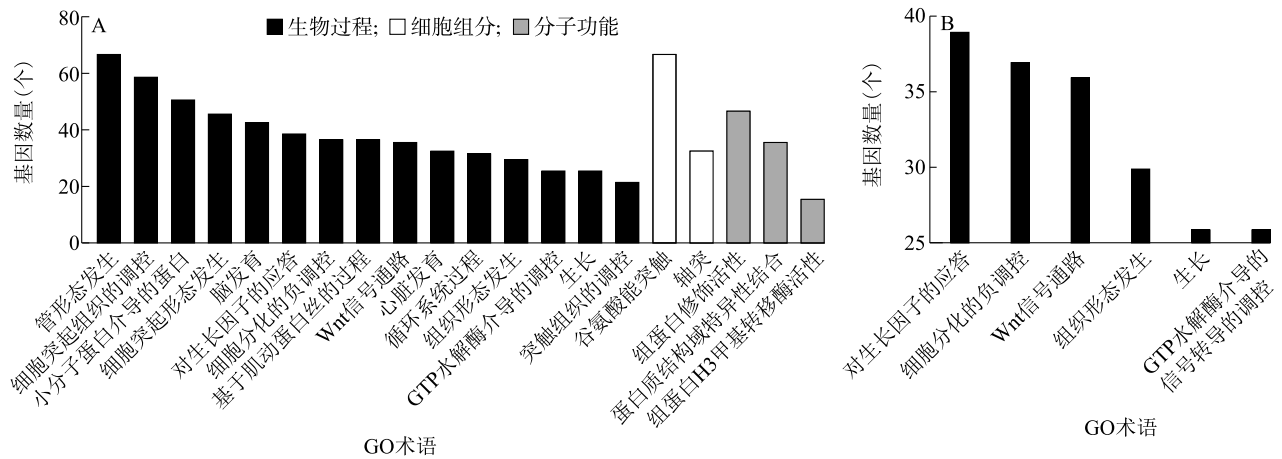
由图 4 可以看出,bta-miR-15a 的候选靶基因显著富集在京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)信号通路中的 Notch(bta04330)、MAPK(丝裂原活化蛋白质激酶,bta04010)、鞘脂(bta04071)、TGF- β (转化生长因子- β 信号通路,bta04350)等信号通路,这些通路在维持脂肪稳态的过程中发挥着重要作用。

2.5 bta-miR-15a 在牛不同组织中的相对表达量

本研究采用 RT-qPCR 技术,分别检测在同一饲养条件下,安格斯牛、西门塔尔牛背最长肌、皮下脂肪中 bta-miR-15a 的相对表达量。由图 5a 可

以看出,bta-miR-15a 在安格斯牛、西门塔尔牛肌肉、脂肪组织中均有表达,其在皮下脂肪中的相对表达量均极显著高于在背最长肌中的相对表达量($P<0.01$)。

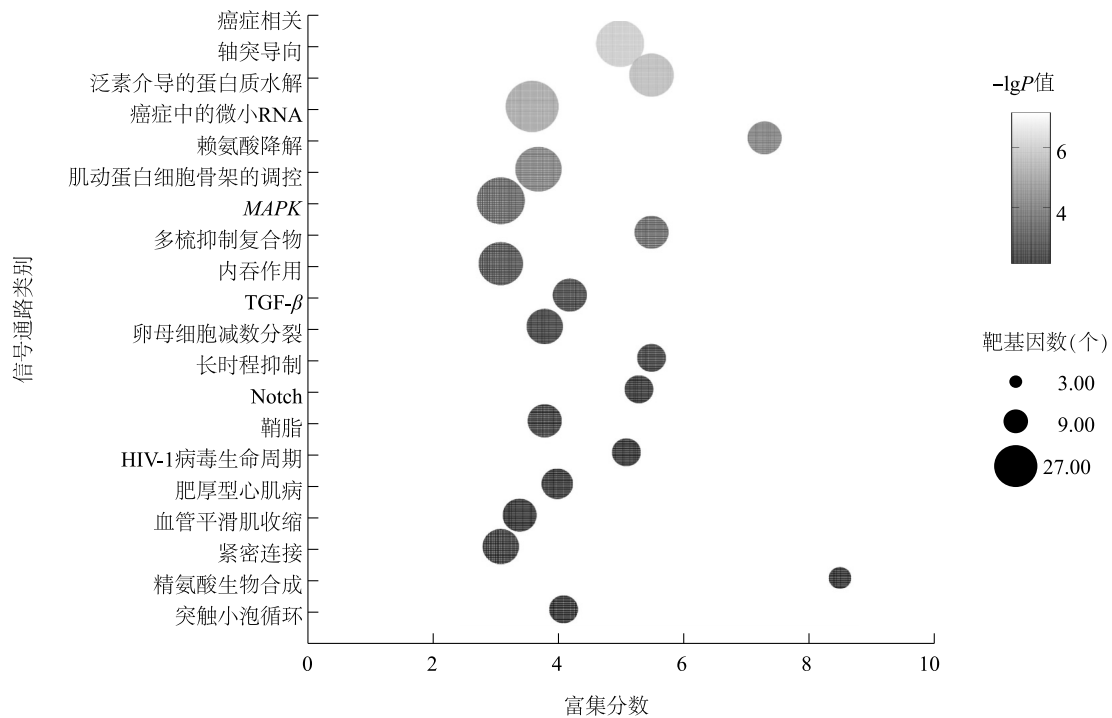
进一步检测 bta-miR-15a 在安格斯牛、西门塔尔牛皮下脂肪中的表达差异。由图 5b 可以看出,bta-miR-15a 在西门塔尔牛皮下脂肪中的相对表达量显著高于安格斯牛皮下脂肪($P<0.05$)。上述结果说明,bta-miR-15a 在不同品种牛肌肉、脂肪中的相对表达水平相似,在脂肪组织中的相对表达量极显著高于肌肉中的相对表达量;bta-miR-15a 的功能与牛中脂肪的沉积密切相关。



A: bta-miR-15a 靶基因的 GO 功能注释; B: bta-miR-15a 靶基因参与脂肪分化相关的生物过程。GTP: 三磷酸鸟苷。

图 3 bta-miR-15a 靶基因的基因本体 (GO) 功能注释分析

Fig.3 Gene Ontology (GO) functional annotation analysis of bta-miR-15a target gene



MAPK: 丝裂原活化蛋白质激酶; TGF: 转化生长因子; HIV: 人类免疫缺陷病毒。

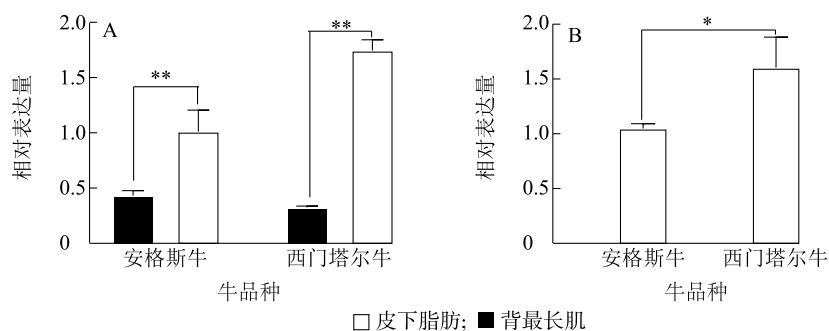
图 4 bta-miR-15a 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库富集分析气泡图

Fig.4 Bubble diagram of bta-miR-15a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis

2.6 bta-miR-15a 在牛不同发育阶段背最长肌组织中的相对表达量

为了探究 bta-miR-15a 的时序表达模式, 本研究采集同一品种牛的不同发育阶段个体的背最长肌组织, 进行 bta-miR-15a 相对表达量的鉴定。由图 6 可

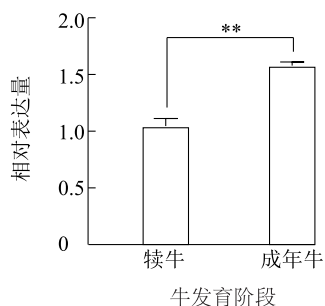
以看出, bta-miR-15a 在安格斯牛的成年牛背最长肌组织中的相对表达量极显著高于犊牛背最长肌组织中的相对表达量 ($P < 0.01$)。上述结果表明, bta-miR-15a 对牛背最长肌的生长有重要的调控作用, 可能对脂肪的沉积起到了负反馈调节作用。



A: bta-miR-15a 在安格斯牛和西门塔尔牛中背最长肌和皮下脂肪中的表达水平测定结果; B: bta-miR-15a 在安格斯牛和西门塔尔牛皮下脂肪中的表达水平测定结果。* 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 5 bta-miR-15a 在牛不同组织中相对表达量的测定结果

Fig.5 Determination of the relative expression of bta-miR-15a in different bovine tissues



** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

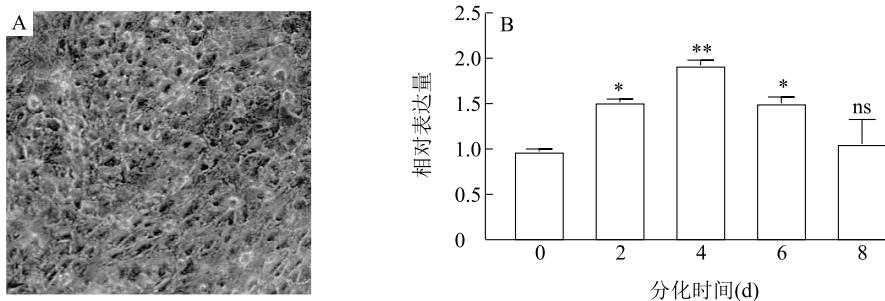
图 6 bta-miR-15a 在安格斯牛不同发育阶段背最长肌组织中相对表达量的测定结果

Fig.6 Relative expression levels of bta-miR-15a in longissimus dorsi muscle of Angus cattle at different developmental stages

2.7 bta-miR-15a 在牛肌内脂肪分化过程中的时序表达

为了进一步验证 bta-miR-15a 在牛肌内脂肪分

化过程中的调控作用,本研究检测了 bta-miR-15a 在牛肌内脂肪的不同分化时间节点上的相对表达量的变化情况,分离并诱导肌内前体脂肪细胞,用油红 O 染色鉴定脂肪细胞,检测脂肪细胞的纯度和分化能力。结果(图 7A)显示,在诱导分化的第 8 d,脂肪细胞中有大量脂滴聚集。bta-miR-15a 在肌内脂肪的不同分化阶段(0 d、2 d、4 d、6 d、8 d)的表达情况见图 7B,与分化初期(0 d)相比,bta-miR-15a 的相对表达量在分化第 2 d 显著上调($P < 0.05$),在分化第 4 d 的相对表达量极显著上调($P < 0.01$),并且达到峰值;分化 4 d 后开始下调,在分化第 6 d 的相对表达量仍然保持显著上调水平($P < 0.05$),至分化第 8 d,其相对表达量与 0 d 相比无显著差异($P > 0.05$)。上述结果说明,bta-miR-15a 的相对表达量在牛脂肪细胞的分化过程中具有显著变化,可能对脂肪细胞分化具有重要的调控作用。



A: 油红 O 染色; B: bta-miR-15a 在牛肌内脂肪分化过程中的时序表达。*、**、ns 分别表示与 0 d 相比差异显著 ($P < 0.05$)、差异极显著 ($P < 0.01$) 及差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 7 bta-miR-15a 的时序表达

Fig.7 Temporal expression of bta-miR-15a

3 讨论

肌肉脂肪是影响牛肉品质和经济效益的重要指标,适当的脂肪含量可以提高牛肉的肉质嫩度、口感和风味^[17]。在动物体内,脂肪细胞主要分布于皮下组织、内脏周围及肌肉组织中^[18]。脂肪细胞不仅具有储能、缓冲、保护等功能,还参与调节能量代谢、细胞信号转导等生理过程^[19],对动物机体的生理健康有着重要作用。脂肪分化是指间充质干细胞向成熟脂肪细胞转化的复杂生物学过程^[20]。脂肪分化受到多种调控基因和信号通路的精准调控,其中 miRNA 是近年来用于研究脂肪分化机制的一类内源性非编码 RNA,miRNA 可通过靶向调控脂肪分化的关键转录因子和信号通路,调控脂肪分化^[21]。miRNA 通过与靶 mRNA 3'非翻译区部分的互补结合,导致 mRNA 被降解或被抑制翻译成蛋白质^[7]。miRNA 广泛参与机体的发育、分化、增殖、凋亡等多种生理过程^[22]。与 mRNA 相比,miRNA 具有序列高度保守、靶基因多样化等特点^[23],对于研究不同物种间基因的保守性、理解生物进化及物种间的亲缘关系等具有重要意义。本研究发现,miR-15a 序列在不同物种间高度保守,说明其可能在哺乳动物进化过程中发挥重要的生物功能。

miRNA 通过靶向特定 mRNA 调控基因的表达、识别其靶标,可以明确 miRNA 在脂肪分化、细胞增殖、凋亡等生理过程中的具体作用^[24]。本研究利用 TargetScan、miRWalk 在线网站预测了 *bta-miR-15a* 的潜在靶基因,并用 Venny 软件对 2 个预测结果进行整合,得到 462 个靶基因。通过 String 软件筛选出 20 个关键靶基因,如 *CDK6*、*E2F3*、*WNT3A* 等。为了进一步了解 *bta-miR-15a* 基因参与的生物学调控过程,本研究用 Metascape 软件对其预测的靶基因进行 GO 功能注释、KEGG 信号通路富集分析。GO 功能注释结果显示,这些靶基因主要富集在对生长因子的应答、细胞分化的负调控、Wnt 信号通路等功能。KEGG 信号通路富集结果显示,其靶基因主要富集在 Notch、MAPK、鞘脂、TGF- β 等信号通路,这些信号通路在脂肪分化方面发挥了重要的调控作用。因此,我们推测 *bta-miR-15a* 通过靶基因调控牛脂肪细胞的分化。

研究发现,*bta-miR-15a* 在奶牛乳腺炎发生和泌乳功能调控间存在紧密联系,然而目前其与肉牛脂

肪沉积之间的相关研究还较少。本研究通过 RT-qPCR 技术进行研究发现,*bta-miR-15a* 在牛的背最长肌、皮下脂肪中都有表达,但 *bta-miR-15a* 在牛皮下脂肪中的相对表达量极显著高于背最长肌中的相对表达量。*bta-miR-15a* 在西门塔尔牛皮下脂肪中的相对表达量显著高于安格斯牛皮下脂肪中的相对表达量。上述结果表明,不同脂肪沉积水平的牛体内可能存在基因表达模式差异。*bta-miR-15a* 可能通过抑制脂肪合成和相关转录因子的表达来调节脂肪沉积过程。在高脂肪沉积品种安格斯牛中,*bta-miR-15a* 表达水平下调有利于脂肪合成。*bta-miR-15a* 基因在同一牛品种不同发育阶段的肌肉脂肪中的表达水平具有极显著差异,其中成年牛的肌肉组织中的脂肪含量较高,这与之前研究发现的牛的年龄与其肌肉组织中脂肪沉积量呈正相关的结果相吻合。本研究进一步鉴定了 *bta-miR-15a* 基因在牛脂肪分化中的作用,发现其动态表达水平与之前关于 miR-135a 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化影响的研究中发现的 miR-135a 对转录因子 PPAR γ 、C/EBP α 表达水平的影响^[25] 相吻合,进一步证明 *bta-miR-15a* 在调控脂肪细胞分化中发挥着重要作用。

4 结论

综上,miR-15a 在不同物种间高度保守,*bta-miR-15a* 的潜在靶基因主要参与对细胞分化的负调控等功能与 MAPK、TGF- β 、鞘脂等信号通路。*bta-miR-15a* 在安格斯牛、西门塔尔牛不同组织中的表达水平存在差异,其中在皮下脂肪中的相对表达量均极显著高于背最长肌中的相对表达量;*bta-miR-15a* 在高脂肪沉积的安格斯牛中的相对表达量显著低于低脂肪沉积的西门塔尔牛中的相对表达量;*bta-miR-15a* 在安格斯成年牛肌肉脂肪中的相对表达量极显著高于犊牛中的相对表达量;*bta-miR-15a* 的相对表达量在牛肌肉脂肪分化过程中呈现先上升后下降的变化。

参考文献:

- [1] 黄 济,涂尾龙,王洪洋,等. 岔路黑猪最佳三元杂交组合模式筛选研究[J]. 中国畜禽种业,2025,21(3):7-12.
- [2] 高 霞,郭 燕,高燕芳. 孕早期血清 CTRP 家族分子的水平预测妊娠期糖尿病的价值分析[J]. 分子诊断与治疗杂志,2024,16(12):2390-2393.
- [3] 王红杨. 胚胎期至生长早期鸡肌肉发育及肌肉脂肪沉积蛋白

- 质组研究[D]. 北京:中国农业科学院,2015.
- [4] KIM H Y, JANG H J, MUTHAMIL S, et al. Novel insights into regulators and functional modulators of adipogenesis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024, 177: 117073.
- [5] 李心语, 安清明, 王大会, 等. miRNA 对畜禽脂肪沉积的影响及在遗传育种中的应用[J]. *湖北农业科学*, 2020, 59(13): 14-18.
- [6] 朱冲, 郭克锋, 赵云, 等. 胃癌患者血清 miRNA-132 和 miRNA-345 表达与肿瘤标志物及预后关系研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2025, 46(9): 1104-1107, 13.
- [7] DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic[J]. *Trends in Genetics*, 2022, 38(6): 613-626.
- [8] 王乐乐, 李天琦, 李淑珍. 基于 CiteSpace 对外泌体 miRNA 在基础医学领域的研究热点及趋势的可视化分析[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2024, 45(15): 1450-1458.
- [9] 冯雁婷. miR-326 通过靶向调控 *C/EBP α* 的表达影响人脂肪干细胞的成脂分化[D]. 广州:南方医科大学, 2018.
- [10] 卢玉兰. MiR-27b 靶向 *PPAR γ* 调控草鱼肝细胞脂肪积累的作用机制研究[D]. 武汉:武汉轻工大学, 2023.
- [11] 刘可可. 猪 miR-196b-3p 和 miR-450b-3p 调控脂肪细胞增殖分化的作用机制[D]. 秦皇岛:河北科技师范学院, 2023.
- [12] 付守艺, 闫峰宾, 陈毅, 等. 鸡 miR-15a 对胸肌肌肉脂肪沉积的调控作用[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(4): 60-65.
- [13] 龙熙, 孙文阳, 潘红梅, 等. 猪微小 RNA-15b 前体突变对其生物学加工过程及前体脂肪细胞分化的影响[J]. *动物营养学报*, 2024, 36(3): 1892-1903.
- [14] JU Z H, HUANG J M, JIANG Q, et al. Identification of bta-miR-15a ~ 16a cluster expression, localization and regulated target in Holsteins[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2018, 40: 8-12.
- [15] 邵丽, 曲波, 王春梅, 等. MiR-15a 对奶牛乳腺上皮细胞泌乳功能的影响[J]. *中国乳品工业*, 2015, 43(3): 4-7.
- [16] 吴胜男. KRT19 作为非小细胞肺癌预后标志物的临床价值及其在肺腺癌铂类耐药中的功能研究[D]. 开封:河南大学, 2024.
- [17] 金诗宇, 季新澎, 滕海龙, 等. 延边牛 *OCT4* 和 *SOX2* 基因组织表达、生物信息学分析及其对牛前体脂肪细胞增殖与分化的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2025, 61(6): 257-265.
- [18] 林影, 林柳微, 王鹏, 等. 姜黄素对代谢综合征的作用机制及临床研究进展[J]. *今日药学*, 2024, 34(6): 473-480.
- [19] 毕谊. circSLC12A2 调控牛脂肪细胞增殖分化的机制解析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2024.
- [20] 刘红霞. 线粒体三功能蛋白 α 亚基在脂肪分化中的作用和机制研究[D]. 上海:上海交通大学, 2017.
- [21] 蓝湘一, 何洋洋, 张明, 等. 牦牛 *MAP3K7* 基因克隆及其与皮下前体脂肪细胞分化关系分析[J]. *华北农学报*, 2025, 40(3): 225-233.
- [22] 邓益森, 何宇辉, 应文伟, 等. 膀胱癌患者尿液外泌体中 miRNA 差异表达谱及其生物信息学分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(3): 446-450.
- [23] 王燕美. 陆地棉 *miR156* 基因家族生物信息学分析及靶基因预测[J]. *生物化工*, 2023, 9(3): 8-10, 6.
- [24] 张潇, 于燕, 宁勇, 等. MicroRNA 促进基因表达研究进展[J]. *遗传*, 2025, 47(7): 729-741.
- [25] 陈晨. miR-135a 和 miR-183 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及脂肪形成的调控作用研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2013.

(责任编辑:徐艳)