

刘京鸽,吴结革,徐世永,等. 南阳黑猪肌内脂质沉积相关 lncRNA 鉴定和功能预测[J]. 江苏农业科学,2023,51(12):149-157.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.12.021

南阳黑猪肌内脂质沉积相关 lncRNA 鉴定和功能预测

刘京鸽,吴结革,徐世永,陈 清,马凡华,张金璧

(金陵科技学院动物科学与食品工程学院,江苏南京 210038)

摘要:为了探讨长链非编码 RNA(Long non-coding RNA,lncRNA)在南阳黑猪肌内脂肪沉积中的重要作用,通过分析已发表的南阳黑猪高脂组和低脂组背最长肌转录组数据,通过编码潜能预测获得可能的 lncRNA,结合 DESeq2 软件筛选出在南阳黑猪高脂组和低脂组背最长肌差异表达基因和 lncRNA,并通过 GO 和 KEGG 通路富集分析,找出与南阳黑猪肌内脂肪沉积相关的差异表达 lncRNA。结果表明,通过编码潜能预测获得 61 个新的 lncRNAs,新鉴定 lncRNAs 和已知 lncRNAs 与编码基因相比较表现出一些典型特征,如转录本长度较短、外显子数较少。差异表达分析发现,814 个编码基因和 98 个 lncRNA 在低脂和高脂组背最长肌间差异表达。差异表达的基因参与了多种与脂质代谢相关的信号通路,如甘油三酯代谢、PPAR 信号通路、脂肪酸生物合成、脂肪酸降解等。联合差异表达 lncRNAs 的靶基因预测和差异表达基因结果分析表明,一些 lncRNA 可能作用于潜在的靶基因,参与脂质代谢过程,调控背最长肌脂质沉积。研究结果为进一步深入研究与猪脂质沉积相关的 lncRNA 生物学功能及调控机制奠定了基础,在未来育种中改善猪肉性状,促进猪的选择进程。

关键词:南阳黑猪;背最长肌;lncRNA;脂质代谢

中图分类号:S828.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)12-0149-09

长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)是一类长度 > 200 nt 非编码 RNAs^[1]。lncRNA 在多种生物过程中发挥重要作用,如胚胎发育^[2]、表达调节^[3]、重编程^[4]、基因组印记^[5]等。此外,发现许多 lncRNAs 参与调控脂质代谢:LncRNA IMFNCR 通过海绵化 miR-128-3p 和 miR-27b-3p 促进鸡肌内脂肪细胞分化^[6],lncRNA 332443 通过靶向 Runx1 和 p38 MAPK 及 ERK1/2-MAPK 信号通路抑制前脂肪细胞分化^[7],LncLSTR 可与 TDP-43 形成分子复合物,调控 Cyp8b1 的表达水平,进而影响 FXR 调节通路致使 apoC2 增多,对甘油三酯水平产生影响。LNCLSR 直接与 TDP-43 结合并抑制 Cyp8b1 表达,以下调甘油三酯水平^[8]。

与西方商品猪相比,中国地方猪的生长速度较慢,瘦肉率较低,但脂质沉积优越。由于中国地方品种选择强度较低导致明显的遗传和表型分化^[9]。南阳黑猪是原产于中国中部地区的优良地方良种,早熟易肥,适应性、杂交配合力、抗病力均较强,耐近交^[10-11]。南阳黑猪猪肉的矿物质含量、大理石条纹、肉色和肌内脂肪含量均显著高于进口品种^[11-14]。因此,南阳黑猪是脂质沉积的理想研究模型。本研究利用已经发表的来自南阳黑猪背最长肌的转录组数据进行长链非编码 RNA(lncRNA)的鉴定,并进行了编码基因和 lncRNA 的差异表达研究,构建了表达调控网络,为进一步解析猪脂质沉积性状的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 数据的来源、质控、比对和组装

6 个转录组测序数据来源于 NCBI GEO 数据库中的数据(GSE165613)^[15]。使用 FastQC 软件对原始测序数据(raw reads)进行质量评估。使用 trim_galore 对原始测序数据进行质量控制,获得高质量的 clean reads。使用 Hisat2 软件将获得的高质量 clean reads 比对到猪参考基因组 Sus scrofa 11.1 中。利用 StringTie 软件进行转录本组装。

收稿日期:2022-07-31

基金项目:国家自然科学基金(编号:32002175);国家自然科学基金(编号:31902123);金陵科技学院 2021 年科教融合项目(2021KJRH32);金陵科技学院博士科研启动基金(编号:jit-b-202035)。

作者简介:刘京鸽(1984—),女,江苏徐州人,博士,讲师,主要从事动物遗传育种与繁殖教学及科研研究。E-mail:waqbmig@163.com。

通信作者:张金璧,博士,副教授,主要从事动物遗传育种与繁殖教学及科研研究。E-mail:zhangjinbi@jit.edu.cn。

1.2 lncRNAs 鉴定

本研究所用 lncRNAs 鉴定与分析主要是参考已报道研究方法^[16-18]。研究是对合并后非冗余转录本进行过滤和筛选 lincRNAs。具体步骤为：

(1)用 gffcompare 软件将合并后的非冗余转录本比对到猪参考基因组 Sus scrofa 11.1 的注释文件,筛选获得 class_code 为“u”的转录本用于后续分析。

(2)筛选获得 exon > 1 且长度 > 200 bp 的转录本。

(3)利用软件 CPC2、CNCI、PLEK、LGC 对转录本进行编码潜能预测,获得不具有编码潜能的转录本。

(4)采用 Transeq 软件将转录本翻译成 6 种可能的氨基酸序列,然后利用 hmmer 软件将这些翻译好的氨基酸序列与 Pfam 进行比对,去掉能比对上的转录本。

(5)利用 BLASTX 将转录本序列和蛋白数据库(nr,uniref90)进行比较,去掉比对上的转录本。

(6)筛选在至少 1 个样品中 FPKM 值≥0 的转录本。

1.3 lncRNA 和蛋白质编码转录本之间的比较

选择基因注释文件中注释为“蛋白质编码”的转录本,并通过“blastn”命令对获得的 lncRNA 进行“已知”和“新的”筛选。然后,在转录本长度、外显子数量和长度、表达水平和 FPKM 几个方面将 lncRNA(“已知”和“新的”)与这些蛋白质编码转录本进行比较。

1.4 编码基因和 lncRNA 的差异表达分析

DESeq2 工具用于对低脂组和高脂组背最长肌之间的 mRNA 和 lncRNA 进行差异表达分析^[19]。筛选标准为|log₂ fold change| > 1 且 P < 0.05。

1.5 差异表达 lncRNA 靶基因预测

将 lncRNA 上下游 100 kb 内的蛋白编码基因预测为 lncRNA 顺式调控的靶基因。通过计算 lncRNA 与 mRNA 的共表达关系,选择其中 Pearson 相关系数 > 0.95 且 P < 0.05 的蛋白编码基因作为 lncRNA 反式调控的靶基因。

1.6 功能富集分析

利用 clusterProfiler^[20] 软件进行功能富集分析。

2 结果与分析

2.1 序列比对及转录本拼接

利用 HISAT2 软件分别将南阳黑猪高脂组和低

脂组背最长肌质控后的 clean reads 比对到猪参考基因组上,来自每个文库大约 95.21% ~ 95.63% 的数据比对到猪参考基因组,86.71% ~ 88.05% 的数据是单一比对(表 1)。然后,通过 StringTie 为每个文库进行转录本组装,并采用 StringTie - Merge 将所有转录本合成为非冗余转录本。由图 1 可知,获得了 61 个新的 lncRNA。

表 1 测序数据统计

样本	质控后的序列	质控后的碱基数	比对率 (%)	唯一比对率 (%)
HF01	52 920 492	7 938 073 800	95.23	86.71
HF02	58 711 272	8 806 690 800	95.14	87.00
HF03	54 788 332	8 218 249 800	95.08	87.49
LF01	60 436 906	9 065 535 900	94.94	87.26
LF02	59 761 944	8 964 291 600	95.02	87.29
LF03	56 164 520	8 424 678 000	95.40	88.05

注:HF 表示高脂肪沉积组;LF 表示低脂肪沉积组。

2.2 编码基因和 lncRNA 特征的比较

先前研究表明,蛋白质编码转录本和 lncRNA 之间存在许多差异^[16-18,21]。根据组装的转录组,lncRNA 和蛋白质编码转录本的特征进行了比较。总共获得 54 078 个蛋白质编码转录本,对应于在猪中注释的 15 120 个蛋白质编码基因。新 lncRNA 的平均转录本长度为 730 bp,而已知 lncRNA 平均转录本长度为 2 902 bp,两者均短于蛋白质编码的转录本(3 986 bp)(图 2 - A)。此外,新 lncRNA 的平均外显子数为 2.7,已知 lncRNA 平均外显子数为 2.8,两者均低于蛋白质编码转录本的外显子数(13.5)(图 2 - B)。

2.3 编码基因和 lncRNAs 的差异表达研究

在 2 组样本中共发现 15 120 个编码基因、3 886 个已知 lncRNA 和 61 个新鉴定的 lncRNA。为探索这些编码基因和 lncRNA 在南阳黑猪背最长肌中的潜在生物学功能,对编码基因和 lncRNA 进行了差异表达研究。通过对高脂组和低脂组的背最长肌样本进行比较,总共获得了 814 个差异表达的 mRNA(DEG);其中,560 个基因在高脂组中上调,254 个基因在高脂组中下调(图 3 - A)。此外,还鉴定了 98 个差异表达的 lncRNA(DEL)。其中,高脂组与低脂组相比较,有 70 个 lncRNA 表达上调,18 个 lncRNA 表达下调(图 3 - B)。

2.4 差异表达基因(DEG)的功能分析

为研究 DEG 的功能,进行了单独的 GO 和

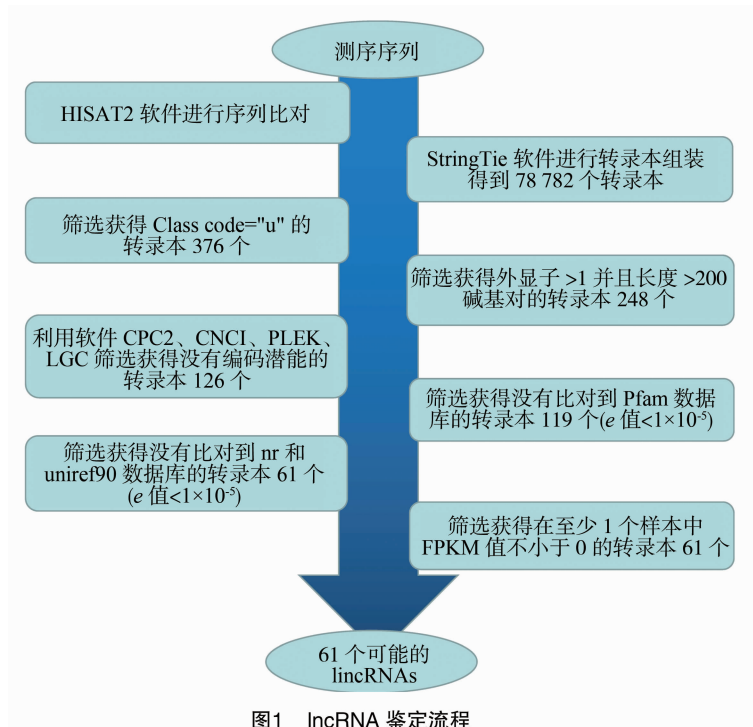


图1 lincRNA 鉴定流程

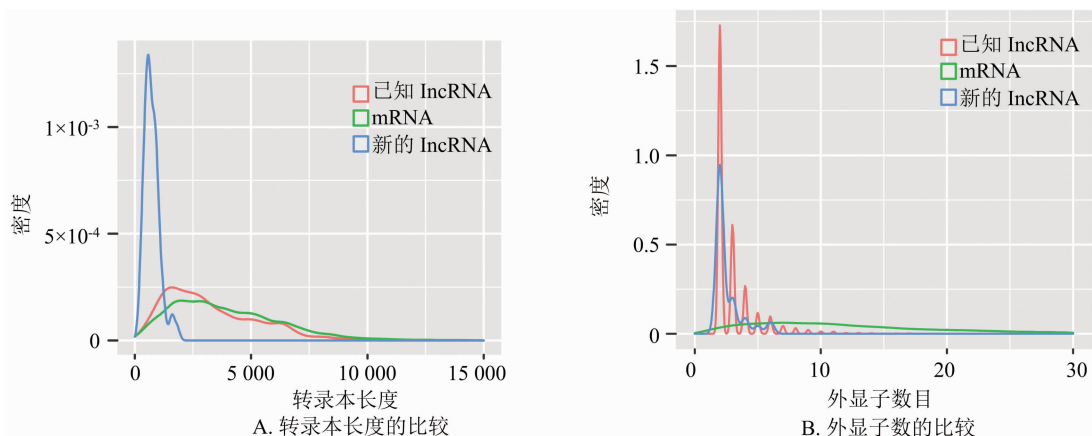


图2 蛋白质编码基因和 lincRNA 的特征比较

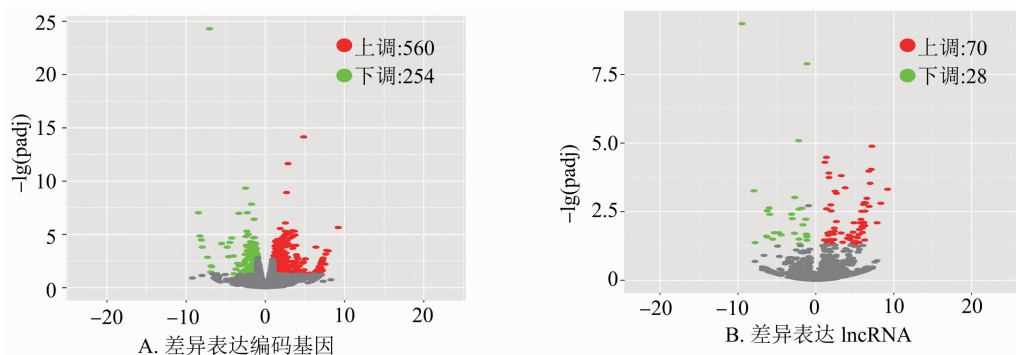


图3 两组差异表达的编码基因和 lincRNA 的火山图

KEGG 分析。DEG 的 GO 分析表明,蛋白酶体泛素非依赖性蛋白质分解代谢过程、泛素依赖的蛋白质分解代谢过程、修饰依赖的蛋白质分解代谢过程、

修饰依赖的大分子分解代谢过程和蛋白酶体介导的泛素依赖性蛋白质分解代谢过程是生物过程类别中最丰富的本体。在细胞成分类别中,蛋白酶体

复合物、内肽酶复合物、肽酶复合物、蛋白酶体调节颗粒和蛋白酶体核心复合物位居前 5 位,而苏氨酸型内肽酶活性、苏氨酸型肽酶活性、细胞外基质结构成分、生长因子结合和肽酶活性则是分子功能中富集最多的本体(图 4 - A)。一些 DEGs 参与了脂质代谢的生物过程,如脂肪细胞分化的调控、长链

脂肪酸代谢过程、脂质代谢过程、脂肪酸生物合成过程、脂质储存、脂肪酸 β - 氧化、脂质转运等。KEGG 分析表明,DEGs 显著富集了 43 条 KEGG 通路(图 4 - B)。在富集通路中,脂肪酸代谢、甘油脂代谢、PPAR 信号通路、脂肪酸生物合成、脂肪酸降解等通路参与脂质代谢过程。

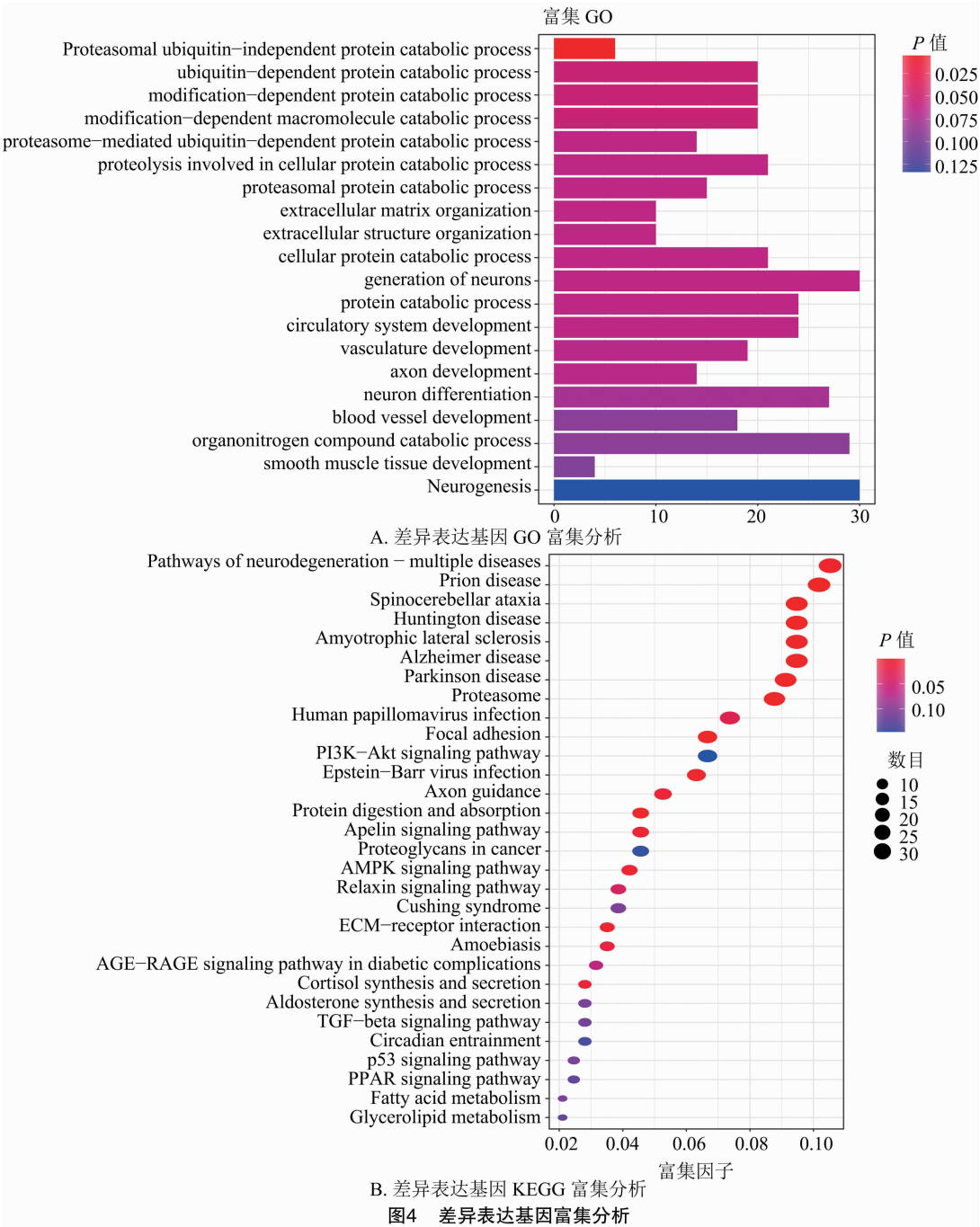


图4 差异表达基因富集分析

2.5 lncRNA 的靶基因预测和功能预测

越来越多研究表明,lncRNA 可能以顺式方式(cis)调节相邻基因^[22-25]。本研究对 lncRNAs 顺式

调节(<100 kb)的潜在靶基因(PTG)进行筛选,对于 98 个 DEL 共鉴定出 672 个 PTG,672 个 PTG 中有 67 个在猪高脂和低脂组背最长肌之间差异表达。

67 个 PTG 发现多个参与脂质代谢的基因,如 *EGR2*、*PPARA*、*SAR1B* 等。

lncRNA 也能够通过反式作用发挥调控功能^[26-29]。本研究对 lncRNAs 反式调节的潜在靶基因 (PTG) 进行筛选,使用 clusterProfiler 对 PTG 基因进行 GO 和 KEGG 分析。结果表明,785 个 PTG 中有 235 个显著参与了 154 个生物过程 ($P < 0.05$)

(图 5 - A)。通路分析显示,275 个 PTG 显著参与了 39 个通路 ($P < 0.05$),其中 4 个与脂质代谢相关,包括脂肪酸代谢、PPAR 信号通路、甘油酯代谢、脂肪酸生物合成(图 5 - B)。此外,还发现了与脂质代谢相关的其他几种通路,包括胆固醇代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸降解、脂肪酸延长。

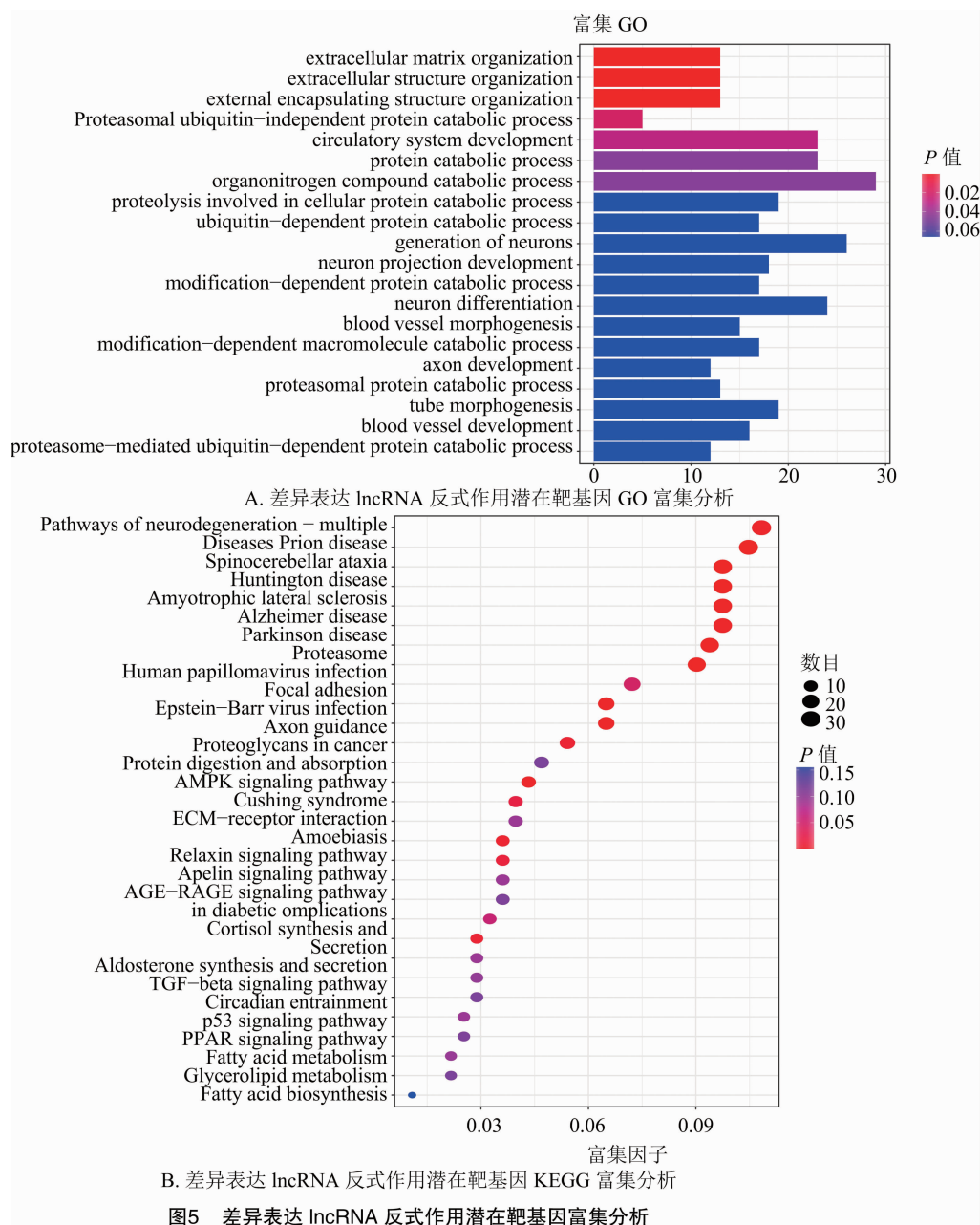


图5 差异表达 lncRNA 反式作用潜在靶基因富集分析

3 讨论

在本研究中,使用来自南阳黑猪低脂组和高脂组背最长肌的转录组测序来研究与猪背最长肌脂质代谢相关的基因和 lncRNA。共鉴定出 15 120 个

编码基因、3 886 个已知 lncRNA 和 61 个新鉴定的 lncRNA。与编码基因相比,新鉴定的 lncRNA 和已知的 lncRNA 表现出一些典型特征,如转录本长度较短、外显子数较少,这一结果与之前的一些研究一致^[16-18,21]。

差异表达分析显示有 814 个差异表达基因,其中,高脂组与低脂组相比较,560 个基因上调表达、214 个基因下调表达。其中,一些基因在脂质代谢方面可能发挥着关键作用。正如预期,GO 分析表明,相当多的差异表达基因参与了脂质代谢的生物过程,如脂肪细胞分化的调控、长链脂肪酸代谢过程、脂质代谢过程、脂肪酸生物合成过程、脂质储存、脂肪酸 β -氧化、脂质转运等。KEGG 分析表明,差异表达基因显著富集了 43 条 KEGG 通路。在富集的通路中,脂肪酸代谢、甘油酯代谢、PPAR 信号通路、脂肪酸生物合成、脂肪酸降解等通路参与脂质代谢过程。

6 个差异表达基因参与脂肪酸代谢。乙酰辅酶 A 羧化酶 α 由乙酰辅酶 A 羧化酶 α 基因 (acetyl-CoA carboxylase alpha, ACACA) 编码,参与脂肪酸合成的第 1 步反应,催化乙酰辅酶 A 生成丙二酸单酰辅酶 A,是长链脂肪酸生物合成过程中的重要限速酶^[30-32]。长链酯酰辅酶 A 合成酶家族 (long-chain acyl-CoA synthetase family, ACSL) 在脂肪酸代谢中起着重要作用,是机体重要的脂肪酸代谢酶^[33], ACSL4 参与对花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 和二十碳五烯酸的调控^[34-35]。在真核生物的脂肪酸代谢过程中, CPT1A 是长链脂肪酸由胞浆转移至线粒体氧化供能的关键限速酶^[36-37]。ELOVL5 与延长单不饱和脂肪酸 (C16、C18) 及多不饱和脂肪酸 (C18、C20、C22) 相关,在花生四烯酸、油酸、硬脂酸、棕榈酸、亚麻酸和二十碳五烯酸的延伸反应中起限制作用^[38-39]。脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FASN) 的主要功能是催化乙酰辅酶 A (CoA) 和丙二酸单酰辅酶 A 合成一种长链软脂酸^[40-41]。硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (stearoyl-CoA desaturase, SCD) 是一种在内质网上催化合成单不饱和脂肪酸的关键酶^[42-43]。本研究发现,与低脂组相比, ACACA、ELOVL5、FASN 和 SCD 在高脂组中上调表达,而 ACSL4 和 CPT1A 则下调表达,这些基因可能通过脂肪酸代谢通路参与高脂背最长肌脂质沉积的调控。

6 个差异表达基因参与甘油酯代谢。DGAT2 是三酰甘油合成反应的关键限速酶,催化二酰甘油通过共价键的形式与脂肪酸酰基辅酶 A 结合形成三酰甘油^[44-46]。甘油二酯激酶 (DGK) 是将甘油二酯/DAG 转化为磷脂酸/磷脂酸酯/PA,并调节这 2 种生物活性脂质各自水平的甘油二酯激酶, DGKG

和 DGKH 是 DGK 家族成员^[47-48]。葡萄糖激酶 (Glucokinase, GK), 是糖酵解中的关键酶之一,其主要功能是促进糖酵解过程发生,加快合成肝糖原,降低血糖^[49-50]。单酰甘油酰基转移酶 (MOGAT) 是单酰甘油通路中的重要组成部分,能够将小肠细胞吸收的甘油一酯 (MG) 催化生成甘油二酯 (DG),在广泛的代谢通路中发挥作用,包括脂肪沉积、能量平衡以及脂肪合成等^[51-53]。MOGAT2 基因是 MOGAT 基因中在物种间最保守的一个^[54-55]。PNPLA3 蛋白属于 patatin 样磷脂酶家族,能够快速参与营养调节,主要参与脂肪的积累和动员^[56-57]。本研究发现,与低脂组相比,6 个差异表达基因 DGAT2、DGKG、DGKH、GK、MOGAT2 和 PNPLA3 均在高脂组中都上调表达,这些基因可能通过甘油酯代谢通路参与高脂背最长肌脂质沉积的调控。

7 个差异表达基因参与 PPAR 信号通路,其中,包括 ACSL4、ANGPTL4、CPT1A、GK、PLIN2、PPARA 和 SCD。血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4) 是一类具有高效生物活性的分泌蛋白,与动物脂肪代谢密切相关^[58-60]。PLIN2 是一种脂滴包被蛋白,主要参与脂质代谢^[61-63]。PPARA 属于核激素受体超家族成员,能够调节许多脂肪酸氧化相关酶基因的表达,参与调控脂质代谢^[64-65]。本研究发现,与低脂组相比, GK、PPARA 和 SCD 在高脂组中上调表达,而 ACSL4、ANGPTL4、CPT1A 和 PLIN2 在高脂组中下调表达,这些基因可能通过 PPAR 信号通路参与高脂背最长肌脂质沉积的调控。

先前的研究表明, lncRNA 能够以顺式作用方式调节基因表达^[22-25]。本研究对 lncRNAs 顺式 (< 100 kb) 调节的潜在靶基因 (PTG) 进行筛选,对于 98 个 DEL 共鉴定出 672 个 PTG, 672 个 PTG 中有 67 个在猪高脂和低脂组背最长肌之间差异表达。在 67 个 PTG 中发现多个参与脂肪细胞分化和脂质代谢的基因,如 EGR2、PPARA、SAR1B 等。ENSSSCT00000080260、ENSSSCT00000081557 和 ENSSSCT00000084279 分别靶向 EGR2、PPARA、SAR1B。EGR2 属于 Egrs 家族,是具有锌指结构的转录因子,参与调控脂肪细胞分化^[66-67]。如上所述, PPARA 参与调控脂质代谢。SAR1B 是细胞内进行乳糜微粒转运的重要功能分子之一,对于维持脂肪代谢平衡起着重要作用^[68-70]。这些 lncRNA 可能通过顺式作用方式调控靶基因参与脂质代谢通路。

本研究对差异表达 lncRNAs 反式调节的潜在靶基因 (PTG) 进行筛选, 并进行富集分析。结果表明, 785 个 PTG 中有 235 个显著参与了 154 个生物过程。通路分析显示, 275 个 PTG 显著参与了 40 个通路 ($P < 0.05$), 其中 5 个与脂质代谢相关, 包括脂肪酸代谢、PPAR 信号通路、甘油酯代谢、脂肪酸生物合成。此外, 还发现了与脂质代谢相关的其他几种通路, 包括胆固醇代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸降解、脂肪酸延长等。

本研究发现, *PPARA* 既能够被 lncRNA 顺式作用方式调控, 也能够被反式作用方式调控。ENSSSCT00000081557 可能通过顺式作用方式调控 *PPARA*, 10 个 lncRNA (ENSSSCT00000065517、ENSSSCT00000066499、ENSSSCT00000070131、ENSSSCT00000072712、ENSSSCT00000077236、ENSSSCT00000080778、ENSSSCT00000082277、ENSSSCT00000085757、ENSSSCT00000087325、MSTRG. 6748. 2) 可能通过反式作用方式调控 *PPARA*。

本研究发现大量 lncRNA 通过反式作用方式调控靶基因。ENSSSCT00000080778 靶向 7 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*ACACA*、*SCD*、*PPARA*、*DGAT2*、*DGKG*、*DGKH*、*MOGAT2*)。ENSSSCT00000065517 靶向 7 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*FASN*、*SCD*、*PPARA*、*DGKG*、*DGKH*、*MOGAT2*、*PNPLA3*)。ENSSSCT00000070131 靶向 6 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*FASN*、*SCD*、*PPARA*、*DGKG*、*DGKH*、*PNPLA3*)。ENSSSCT00000082277 靶向 5 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*FASN*、*SCD*、*PPARA*、*DGKH*、*PNPLA3*)。ENSSSCT00000066499 靶向 4 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*FASN*、*SCD*、*PPARA*、*PNPLA3*)。ENSSSCT00000090934 靶向 3 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*ACACA*、*DGKG*、*DGKH*)。ENSSSCT00000087325 靶向 3 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*PPARA*、*DGKG*、*DGKH*)。ENSSSCT00000080375 和 ENSSSCT00000090824 同时靶向 2 个相同的差异表达基因 (*CPT1A*、*ANGPTL4*)。ENSSSCT00000072712 和 ENSSSCT00000085757 同时靶向 2 个相同的差异表达基因 (*PPARA*、*DGKH*)。ENSSSCT00000075972 靶向 2 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*ACSL4*、*PLIN2*)。MSTRG. 6748. 2 靶向 2 个与脂质代谢相关的差异表达基因 (*FASN*、*PPARA*)。以上结果表明, lncRNA 可能参与调控脂

质代谢过程。

此外, 研究发现, *FASN* 和 *SCD* (脂肪酸代谢通路) 被 4 个相同的差异表达 lncRNA 调控 (ENSSSCT00000065517、ENSSSCT00000066499、ENSSSCT00000070131、ENSSSCT00000082277)。PPARA 和 *SCD* (PPAR 信号通路) 被 5 个相同的差异表达 lncRNA 调控 (ENSSSCT00000065517、ENSSSCT00000066499、ENSSSCT00000070131、ENSSSCT00000080778、ENSSSCT00000082277)。ANGPTL4 和 *CPT1A* (PPAR 信号通路) 被 2 个相同的差异表达 lncRNA 调控 (ENSSSCT00000080375、ENSSSCT00000090824)。DGKG 和 *DGKH* (甘油酯代谢通路) 被 5 个相同的差异表达 lncRNA 调控 (ENSSSCT00000065517、ENSSSCT00000070131、ENSSSCT00000080778、ENSSSCT00000087325、ENSSSCT00000090934)。DGKG、*DGKH* 和 *MOGAT2* (甘油酯代谢通路) 被 2 个相同的差异表达 lncRNA 调控 (ENSSSCT00000065517、ENSSSCT00000080778)。以上结果表明, lncRNA 在功能上可能是保守的。之前的研究也表明 lncRNA 在功能上是保守的^[71,72]。尽管序列存在差异, 但功能保守是 lncRNA 的一个特征。

本研究利用南阳黑猪背最长肌的转录组数据鉴定并获得了 61 个新的 lncRNAs。差异表达分析确定了高脂组和低脂组之间差异表达的编码基因和 lncRNA。差异表达基因被发现参与了多种与脂质代谢相关的生物学过程。联合差异表达 lncRNAs 的靶基因预测和差异表达基因结果分析表明, 一些 lncRNA 可能作用于潜在的靶基因, 参与脂质代谢过程, 调控背最长肌脂质沉积。本研究为未来脂质沉积性状分析提供了宝贵的资源, 可能会在未来的育种中改善猪肉性状, 促进猪的选择进程。

参考文献:

- [1] Zou C, Li S, Deng L L, et al. Transcriptome analysis reveals long intergenic noncoding RNAs contributed to growth and meat quality differences between Yorkshire and wannanhua pig[J]. Genes, 2017, 8(8): 203.
- [2] Zhang K S, Huang K F, Luo Y P, et al. Identification and functional analysis of long non - coding RNAs in mouse cleavage stage embryonic development based on single cell transcriptome data[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 845.
- [3] Ransohoff J D, Wei Y N, Khavari P A. The functions and unique features of long intergenic non - coding RNA[J]. Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 2018, 19(3): 143 - 157.
- [4] Loewer S, Cabili M N, Guttman M, et al. Large intergenic non -

- coding RNA – RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells[J]. *Nature Genetics*,2010,42(12):1113 – 1117.
- [5] Prickett A R, Oakey R J. A survey of tissue – specific genomic imprinting in mammals [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012,287(8):621 – 630.
- [6] Zhang M, Li F, Sun J W, et al. LncRNA IMFNCR promotes intramuscular adipocyte differentiation by sponging miR – 128 – 3p and miR – 27b – 3p[J]. *Frontiers in Genetics*,2019,10:42.
- [7] Xiao F, Tang C Y, Tang H N, et al. Long non – coding RNA 332443 inhibits preadipocyte differentiation by targeting Runx1 and p38 – MAPK and ERK1/2 – MAPK signaling pathways [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*,2021,9:663959.
- [8] Li P, Ruan X B, Yang L, et al. A liver – enriched long non – coding RNA, lncLSTR, regulates systemic lipid metabolism in mice[J]. *Cell Metabolism*,2015,21(3):455 – 467.
- [9] Xing K, Zhu F, Zhai L W, et al. The liver transcriptome of two full – sibling Songliao black pigs with extreme differences in backfat thickness[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*,2014,5(1):32.
- [10] Li S J, Yang S H, Zhao S H, et al. Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites[J]. *Journal of Animal Science*,2004,82(2):368 – 374.
- [11] 鲁云凤, 姚航航, 曾 涛, 等. 南阳黑猪与大白猪活体背膘厚差异比较研究[J]. *养猪*,2017(4):81 – 83.
- [12] Qiao R, Li X, Han X, et al. Population structure and genetic diversity of four Henan pig populations[J]. *Animal Genetics*,2019,50(3):262 – 265.
- [13] 王 明, 霍晓婷, 任广志. 不同品种猪肉矿物质元素含量研究 [J]. *肉类工业*,2008(4):34 – 36.
- [14] 鲁云凤, 张晓娜, 曾 涛. 南阳黑猪肉质性状相关基因筛选 [J]. *黑龙江畜牧兽医*,2017(18):61 – 63.
- [15] Wang L Y, Zhang Y W, Zhang B, et al. Candidate gene screening for lipid deposition using combined transcriptomic and proteomic data from Nanyang black pigs[J]. *BMC Genomics*,2021,22(1):441.
- [16] Chen L, Shi G L, Chen G T, et al. Transcriptome analysis suggests the roles of long intergenic non – coding RNAs in the growth performance of weaned piglets[J]. *Frontiers in Genetics*,2019,10:196.
- [17] Shi G L, Chen L, Chen G T, et al. Identification and functional prediction of long intergenic non – coding RNAs related to subcutaneous adipose development in pigs [J]. *Frontiers in Genetics*,2019,10:160.
- [18] Chen G T, Cheng X F, Shi G L, et al. Transcriptome analysis reveals the effect of long intergenic noncoding RNAs on pig muscle growth and fat deposition[J]. *BioMed Research International*,2019,2019:2951427.
- [19] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA – seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*,2014,15(12):550.
- [20] Wu T Z, Hu E Q, Xu S B, et al. ClusterProfiler 4. 0; a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. *Innovation*,2021,2(3):100141.
- [21] Zou C, Li L, Cheng X F, et al. Identification and functional analysis of long intergenic non – coding RNAs underlying intramuscular fat content in pigs[J]. *Frontiers in Genetics*,2018,9:102.
- [22] Gil N, Ulitsky I. Regulation of gene expression by cis – acting long non – coding RNAs[J]. *Nature Reviews Genetics*,2020,21(2):102 – 117.
- [23] Zhou H Y, Simion V, Pierce J B, et al. LncRNA – MAP3K4 regulates vascular inflammation through the p38 MAPK signaling pathway and cis – modulation of MAP3K4 [J]. *FASEB Journal*, 2021,35(1):e21133.
- [24] Szafranski P, Gambin T, Karolak J A, et al. Lung – specific distant enhancer cis regulates expression of FOXF1 and lncRNA FENDRR [J]. *Human Mutation*,2021,42(6):694 – 698.
- [25] Degani N, Lubelsky Y, Perry R B T, et al. Highly conserved and cis – acting lncRNAs produced from paralogous regions in the center of HOXA and HOXB clusters in the endoderm lineage [J]. *PLoS Genetics*,2021,17(7):e1009681.
- [26] Gabory A, Ripoche M A, Le Digarcher A, et al. H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice [J]. *Development*,2009,136(20):3413 – 3421.
- [27] Yan P X, Luo S, Lu J Y, et al. Cis – and trans – acting lncRNAs in pluripotency and reprogramming[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*,2017,46:170 – 178.
- [28] Li J, Yang T T, Tang H F, et al. Inhibition of lncRNA MAAT controls multiple types of muscle atrophy by cis – and trans – regulatory actions [J]. *Molecular Therapy*, 2021,29(3):1102 – 1119.
- [29] Carmona S, Lin B, Chou T, et al. LncRNA Jpx induces Xist expression in mice using both trans and cis mechanisms[J]. *PLoS Genetics*,2018,14(5):e1007378.
- [30] Wakil S J, Abu – Elheiga L A. Fatty acid metabolism; target for metabolic syndrome [J]. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50 (Suppl):S138 – S143.
- [31] Hunkeler M, Hagmann A, Stüttfeld E, et al. Structural basis for regulation of human acetyl – CoA carboxylase [J]. *Nature*,2018, 558(7710):470 – 474.
- [32] 石学红. 牦牛 *ACACA* 基因遗传特征及其对乳、肉品质的影响 [D]. 兰州:甘肃农业大学,2020:5 – 32.
- [33] Ellis J M, Frahm J L, Li L O, et al. Acyl – coenzyme A synthetases in metabolic control [J]. *Current Opinion in Lipidology*,2010,21(3):212 – 217.
- [34] 张依迪, 任亚轩, 周 军, 等. *ACSL4* 基因的功能及其研究进展 [J]. *中国牛业科学*,2020,46(5):52 – 58.
- [35] Kuwata H, Hara S. Role of acyl – CoA synthetase *ACSL4* in arachidonic acid metabolism [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*,2019,144:106363
- [36] 梁计峻, 林亚秋, 俞雨阳, 等. 山羊 *CPT1A* 基因的克隆表达及肌肉脂肪含量的相关性分析 [J]. *华北农学报*,2019,34(5):231 – 238.
- [37] Gobin S, Thuillier L, Jogl G, et al. Functional and structural basis of

- carnitine palmitoyltransferase 1A deficiency [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (50): 50428 – 50434.
- [38] Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals; their regulation and roles in metabolism [J]. Progress in Lipid Research, 2006, 45 (3): 237 – 249.
- [39] 张小雪, 赵利明, 刘佳, 等. 绵羊 *ELOVL5* 基因的生物信息学分析 [J]. 甘肃农业科技, 2022, 53 (4): 24 – 29.
- [40] Chirala S S, Wakil S J. Structure and function of animal fatty acid synthase [J]. Lipids, 2004, 39 (11): 1045 – 1053.
- [41] 张雄, 史开志, 张勇, 等. 猪 *FASN* 基因表达与胴体及肉质性状相关性研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021 (9): 64 – 67.
- [42] 关家伟, 孙瑜彤, 邱丽霞, 等. 广灵驴 *SCD* 基因克隆、生物信息学及组织差异表达分析 [J]. 山西农业大学学报 (自然科学版), 2021, 41 (2): 65 – 73.
- [43] 王家麒, 韩福慧, 赵乐, 等. miR-18b-3p 靶向 *SCD* 调控绵羊前体脂肪细胞分化的研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57 (5): 117 – 123.
- [44] 吴东旺, 孙丽媛, 袁再美, 等. 动物 *DGAT* 基因的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46 (7): 1945 – 1952.
- [45] 邓章超, 赵娟娟, 夏琴, 等. 陆川猪 *DGAT2* 基因克隆、序列分析及表达水平研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019 (21): 6 – 10, 17.
- [46] 李武峰, 关家伟, 孙瑜彤, 等. 广灵驴 *DGAT2* 基因克隆、生物信息学分析及组织表达研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48 (2): 407 – 416.
- [47] Murakami T, Sakane F, Imai S I, et al. Identification and characterization of two splice variants of human diacylglycerol kinase eta [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (36): 34364 – 34372.
- [48] Kai M, Sakane F, Imai S, et al. Molecular cloning of a diacylglycerol kinase isozyme predominantly expressed in human retina with a truncated and inactive enzyme expression in most other human cells [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1994, 269 (28): 18492 – 18498.
- [49] 张月. 倒刺鲃 *PG*、*GK* 基因的克隆、时空表达及其在血糖调节中的作用初步研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2018: 25 – 47.
- [50] 鄢胜飞, 黄建芳, 郭晓萍, 等. 广西巴马小型猪 *GK* 基因真核表达载体的构建及鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34 (11): 2351 – 2356.
- [51] Shi Y G, Cheng D. Beyond triglyceride synthesis; the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism [J]. American Journal of Physiology (Endocrinology and Metabolism), 2009, 297 (1): E10 – E18.
- [52] 田方圆, 王台安, 李艳敏, 等. 鸡 *MOGAT* 和 *DGAT* 基因的克隆及表达特性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48 (2): 214 – 224.
- [53] Mostafa N, Bhat B G, Coleman R A. Increased hepatic monoacylglycerol acyltransferase activity in streptozotocin-induced diabetes; characterization and comparison with activities from adult and neonatal rat liver [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1993, 1169 (2): 189 – 195.
- [54] Yen C L E, Farese R V Jr. *MGAT2*, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (20): 18532 – 18537.
- [55] Cao J S, Lockwood J, Burn P, et al. Cloning and functional characterization of a mouse intestinal acyl-CoA: monoacylglycerol acyltransferase, *MGAT2* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (16): 13860 – 13866.
- [56] 苟圣松, 林亚秋, 王永, 等. 山羊 *PNPLA3* 基因克隆及序列分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57 (4): 73 – 78.
- [57] 王晓倩. *PNPLA3* 基因多态性及血清甘油三酯与脂肪肝的关联性研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2019: 1 – 76.
- [58] 佟桂芝, 刘学峰, 李信涛, 等. 羊血管生成素样蛋白 4 基因 (*ANGPTL4*) 与羊肌内脂肪含量关系的研究 [J]. 现代畜牧科技, 2020 (9): 1 – 3.
- [59] 侯彦茹, 赵旭, 黄华山, 等. 鸡血管生成素样蛋白 4 重组蛋白对肉鸡肝脏和胸肌脂肪代谢的影响 [J]. 动物营养学报, 2022, 34 (2): 1260 – 1267.
- [60] 赵希桐, 潘永杰, 张丰霞, 等. 干扰 *ANGPTL4* 基因对 3T3-L1 前体脂肪细胞系成脂过程的影响研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57 (S1): 120 – 125.
- [61] 胡瀨月, 黄英, 杨明华, 等. *PLIN2* 对脂类代谢的调控研究 [J]. 中国医药科学, 2018, 8 (15): 40 – 43.
- [62] 吴俊静, 阮航, 乔木, 等. 猪 *PLIN2* 基因变异筛选及其与猪肌内脂肪含量性状的关联分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57 (S1): 158 – 163.
- [63] 孙建富. *PLIN2* 基因在油酸诱导延边牛骨骼肌卫星细胞成脂分化中的作用机制研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2021: 1 – 54.
- [64] 李格. 低氧训练诱导 AMPK 对小鼠骨骼肌 PPAR α 表达的影响 [D]. 北京: 北京体育大学, 2014: 1 – 46.
- [65] 徐文静. PPAR α 参与脂代谢通路与非酒精性脂肪性肝病 [J]. 肝脏, 2020, 25 (8): 894 – 896.
- [66] Chen Z, Torrens J I, Anand A, et al. Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBP β - dependent and - independent mechanisms [J]. Cell Metabolism, 2005, 1 (2): 93 – 106.
- [67] 王杉杉. Gdf6 和 Egr2 在多潜能干细胞向前脂肪细胞定向过程中的作用及机制研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2013: 1 – 61.
- [68] 王学敏. 猪 *Sar1b* 基因的克隆、染色体定位、原核表达及其与部分性状的关联分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005: 1 – 57.
- [69] 王学敏, 李碧侠, 任守文. 猪 *Sar1b* 基因真核表达载体构建及鉴定 [J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34 (4): 573 – 576.
- [70] Jones B, Jones E L, Bonney S A, et al. Mutations in a Sar1 GTPase of COP II vesicles are associated with lipid absorption disorders [J]. Nature Genetics, 2003, 34 (1): 29 – 31.
- [71] Ulitsky I, Shkumatava A, Jan C H, et al. Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution [J]. Cell, 2011, 147 (7): 1537 – 1550.
- [72] Nitsche A, Rose D, Fasold M, et al. Comparison of splice sites reveals that long noncoding RNAs are evolutionarily well conserved [J]. RNA, 2015, 21 (5): 801 – 812.