

李瑞瑞, 张子晓, 赵振华, 等. gga-miR-26a 的组织特异性表达及其靶基因的预测分析[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(5): 64-69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.05.009

gga-miR-26a 的组织特异性表达 及其靶基因的预测分析

李瑞瑞^{1,2}, 张子晓³, 赵振华¹, 韩威¹, 向海², 王钱保², 黄正洋², 李春苗², 宗毅², 黄华云¹

(1. 江苏省家禽科学研究所, 江苏扬州 225125; 2. 佛山科学技术学院广东省动物分子设计与精准育种重点实验室, 广东佛山 528225;
3. 河北科技师范大学, 河北秦皇岛 066600)

摘要:为初步阐明 gga-miR-26a 在鸡脂肪沉积中的作用, 以矮小品系 S3 系(DW)和隐性白羽鸡(RR)为试验素材, 采用实时荧光定量 PCR 法检测 gga-miR-26a 在 2 个品种不同生长发育时期肝脏、腹脂及腿肌组织, 腹脂和肌内脂肪细胞增殖期和分化期的表达变化, 并利用生物信息学的方法, 对 gga-miR-26a 靶基因进行预测和分析。结果表明, gga-miR-26a 在 S3 系鸡(DW)和隐性白羽鸡(RR)16 W 时肝脏组织中的表达存在显著的品种差异, S3 系鸡在 5 个发育阶段表达均高于隐性白羽鸡; 腹脂组织中, gga-miR-26a 在 0 W 时存在极显著的品种差异($P < 0.01$)且显著高于其他周龄; gga-miR-26a 在腿肌组织中的表达无显著的品种差异($P > 0.05$); 在脂肪细胞中, gga-miR-26a 在分化 4 d 的表达显著高于增殖期($P < 0.05$)。利用 TargetScan、miRDB、miRmap 等 3 个软件对 gga-miR-26a 靶基因进行预测, 共预测到 163 个交集靶基因; GO 及 KEGG 分析提示 gga-miR-26a 可能通过靶向调节 *PTEN*、*ULK2* 和 *PRKCD* 的表达, 进而调控鸡的脂肪沉积。综上所述, gga-miR-26a 在 2 个品种鸡脂肪相关组织及脂肪细胞中均有表达, 且具有显著的品种差异; gga-miR-26a 参与了鸡的脂肪沉积过程, *PTEN*、*ULK2* 和 *PRKCD* 可能是 gga-miR-26a 调控脂肪沉积的预测靶基因。

关键词: gga-miR-26a; 鸡; 表达特性; 靶基因

中图分类号: S831.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2024)05-0064-06

在我国, 由于鸡的生产成本比较低, 而且具有很高的饲料转化率, 它已经成为继猪肉之后的第二大肉食性食品。在很长时间内, 将快速增长/增重作为肉鸡选择的主要目标, 但这也造成了屠体脂肪

含量过多, 进而引发了一系列的问题, 比如降低了饲料转换效率, 还会影响到屠宰的质量, 对肉、蛋鸡的产蛋性能产生影响^[1]。脂肪性状是畜禽肉品质评价的重要指标, 胴体组成、肉色和嫩度等因素决定肉质性状, 脂肪沉积量和沉积部位则是肉质性状的影响因素^[2]。脂肪性状是数量性状, 受多基因调控, 挖掘出与脂肪沉积密切相关的基因将为进一步揭示脂肪沉积的分子机制奠定基础。

miRNA 是一个小的 (20 ~ 23 nt) 非蛋白质编码 RNA 家族, 它主要是发挥基因表达的转录后调节因子的作用, 在翻译层面上, miRNA 是通过根据序列互补性的靶向 mRNA 来控制基因表达的^[3-4]。miR-26a 在第 3 条染色体和第 12 条染色体上均表

收稿日期: 2023-04-14

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-41-Z05); 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目 [编号: JBGS(2021)109、JBGS(2021)029]; 国家家养动物种质库建设项目 (编号: 2023); 国家自然科学基金 (编号: 32102538)。

作者简介: 李瑞瑞 (1998—), 女, 山东泰安人, 硕士, 从事家禽遗传育种研究。E-mail: liruirui117@163.com。

通信作者: 黄华云, 博士, 副研究员, 主要从事家禽遗传育种研究。E-mail: huanghuayun520@163.com。

瘟病基因的分子检测[J]. 分子植物育种, 2020, 18(11): 3626-3633.

[27] 杨健源, 陈深, 曾列先, 等. 稻瘟病主效抗性基因对广东省籼稻稻瘟病菌的抗性评价[J]. 中国水稻科学, 2008(2): 190-196.

[28] Jiang H, Li Z, Liu J, et al. Development and evaluation of improved lines with broad-spectrum resistance to rice blast using nine

resistance genes[J]. Rice, 2019, 12(1): 29.

[29] Xiao W M, Peng X, Luo L X, et al. Development of elite restoring lines by integrating blast resistance and low amylose content using MAS[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(1): 16-27.

[30] 黄乾龙, 管玉圣, 欧阳杰, 等. 重庆自育水稻骨干亲本稻瘟病抗性评价及其抗病基因分布分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(1): 8-15.

达,分别是 miR - 26a - 1、miR - 26a - 2^[5]。研究表明,miR - 26a 的表达量与癌症的进展关系密切。miR - 26a 可以作为一种乳腺癌的抑癌基因,它可以通过靶向作用于 *FAM98A* 来抑制癌细胞的生长和侵袭^[6],miR - 26a 介导的 *PTE*N 可以促进体内胶质瘤的发生^[7],还能靶向 *NEK6* 并抑制马立克氏病淋巴瘤细胞增殖^[8],*FBXO11* 介导 miR - 26a 对肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭有抑制作用^[9]。

miR - 26a 不但调控癌症过程,而且与生理功能有关,包括血管生成、骨骼肌细胞分化和骨骼肌损伤后再生以及脂质代谢^[10-12]。miR - 26a 可抑制 *TGF - β* 诱导的韧带成纤维细胞增殖^[13];在高脂肪饮食的小鼠中,miR - 26a 可通过减少脂肪酸合成从而减轻肥胖引起的代谢并发症^[14];lncRNA *GAS5* 敲低通过调节 miR - 26a - 5p/*PDE4B* 来激活 cAMP/*CREB* 途径来减轻肝脏脂质积累^[15];miR - 26a 被抑制后,会导致创面血管生成和细胞增殖,进而加快创面愈合速度^[16]。综上所述,miR - 26a 参与了哺乳动物的肌肉生成和脂肪代谢过程。在家禽上,gga - miR - 26a 的研究尚不完善。有研究报道,gga - miR - 26a 是光感受器 L 型电压门控钙通道 $\alpha 1C$ 亚基 (*L - VGCC $\alpha 1C$*) 昼夜节律调控表达的关键转录后调节因子^[17]。目前关于 gga - miR - 26a 与优质肉鸡脂肪沉积 (腹脂和肌内脂肪沉积) 的关系知之甚少。本试验以江苏省家禽科学研究所自主选育的矮小品系 S3 (DW) 和隐性白羽鸡 (RR) 为试验材料,分析 gga - miR - 26a 在不同时期的肝脏、腹脂、腿肌组织以及腹脂和肌内脂肪细胞增殖期和分化期的表达差异,将为明确 gga - miR - 26a 在鸡脂肪沉积中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验以江苏省家禽科学研究所的 DW 及 RR 为材料,分别采集 0 天 (0 W)、2 周 (2 W)、8 周 (8 W)、14 周 (14 W)、16 周 (16 W) 的肝脏、腹部脂肪及腿部肌肉样本,每个样本 6 个重复,并将其快速冷冻后置于 -80 ℃ 条件下进行贮藏。

1.2 细胞培养

鸡原代脂肪细胞的培养根据 Cryer 等借鉴哺乳动物的方法^[18],利用胶原酶消化法进行细胞提取。在原代细胞融合率达到 70% 的情况下,传代铺板。

当传代后的细胞融合到 70% 的时候,用 0.1%

油酸进行诱导分化,将这一时刻界定为分化 0 h,没有添加油酸组的为增殖期细胞,在分化后的第 1 天、第 4 天、第 6 天以及增殖期收集细胞。

1.3 总 RNA 提取

使用 miRNA 提取分离试剂盒与紫外分光光度计,分别对各组织与细胞样本中的总 RNA 进行提取,并对 RNA 浓度和纯度进行检测 ($1.8 \leq D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} \leq 2.0$)。

1.4 实时荧光定量

实时定量 qPCR 引物使用 miRNA Design v1.01 设计 (表 1)。各样本中提取 3 μ L 总 RNA,用逆转录酶对 miRNA 进行第一链 cDNA 的反转录以及以第一链 cDNA 为模板的 qPCR 反应。以矮小品系 S3 鸡 0 W 的表达量为参照日龄,以 *U6* 作为用于归一化的基因 (内参),采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法对 miRNA 相对表达的数据进行分析。

表 1 引物合成的序列

引物名	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)
gga - miR - 26a	TTCAAGTAATCCAGGATAGGC	46.2
<i>U6</i>	CTCGCTTCGGCAGCACATATACT	52.2

1.5 靶基因预测及信号通路富集分析

利用 3 个软件对 miRNA 靶基因进行预测,分别是 TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_72/)、miRDB (<http://www.mirdb.org/.org/>)、miRmap (<https://mirmap.ezlab.org/>)。根据预测结果绘制 venny 图,选择 3 个在软件预测中出现次数超过 2 次的基因作为候选目标基因。将预测的靶基因集合,通过 DAVID 在线工具和 KOBAS 3.0 在线工具对靶基因的生物学术功能进行分析。

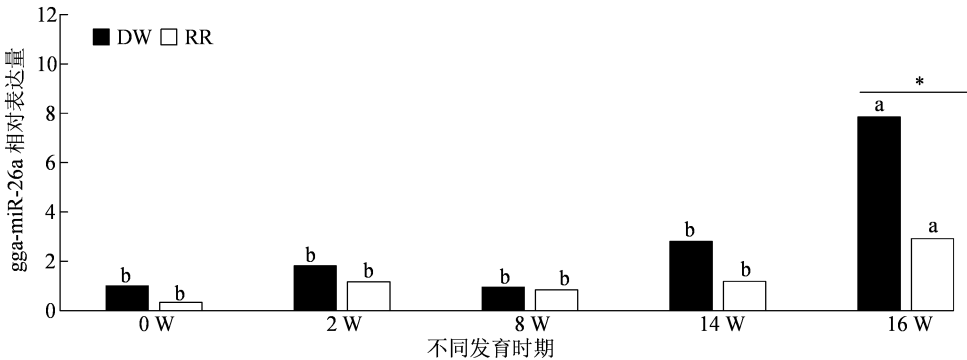
1.6 数据处理

鸡 gga - miR - 26a 的相对表达水平可以采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析。试验结果用平均数 \pm 标准差表示。用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 肝脏组织中 gga - miR - 26a 的表达

肝脏组织中 gga - miR - 26a 的表达在 16 W 时具有显著品种特异性。5 个时间点 DW 鸡的表达量均高于 RR 鸡。gga - miR - 26a 在 DW 鸡的表达量 8 W 时最低,8 W 后直线上升。除 16 W 外,gga - miR - 26a 在 RR 鸡各周龄的表达量差异不显著 (图 1)。



不同小写字母表示同一品种不同时期在 0.05 水平上表达差异显著; “*”表示不同品种同一发育时期差异显著($P<0.05$); “***”表示不同品种同一发育时期差异极显著($P<0.01$)。图 2、图 3 同

图1 gga-miR-26a 在鸡肝脏组织中的表达

2.2 腹脂组织中 gga - miR - 26a 的表达

gga - miR - 26a 在腹脂组织中 0 W 时的表达量存在显著的品种差异。0 W 时 DW 鸡与 RR 鸡的

gga - miR - 26a 相对表达量最高,显著高于其他周龄。gga - miR - 26a 在 2 ~ 16 W 相对稳定地保持在低表达水平(图 2)。

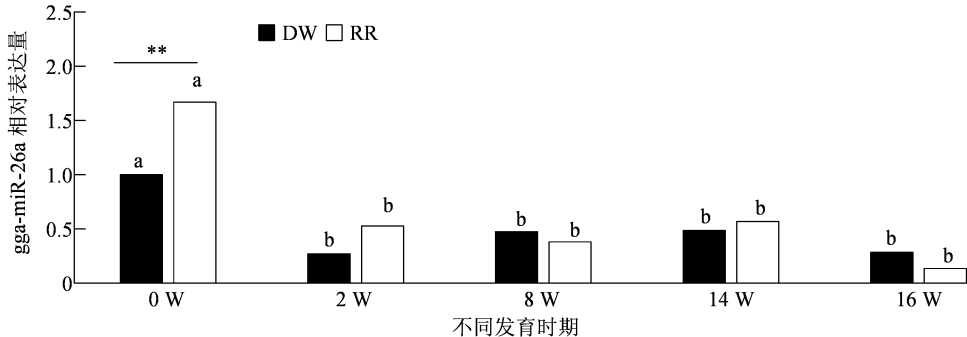


图2 gga-miR-26a 在鸡腹脂组织中的表达

2.3 腿肌组织中 gga - miR - 26a 的表达

gga - miR - 26a 在腿肌组织中的表达存在一定的品种差异,0 W 时 gga - miR - 26a 在 DW 鸡与 RR 鸡中的相对表达量最低,8 W 前 gga - miR - 26a 在

DW 鸡中的相对表达量高于 RR 鸡,而 14 W 开始 DW 鸡低于 RR 鸡($P>0.05$)。2 个品种间,gga - miR - 26a 在同一周龄的表达相对稳定,差异不显著(图 3)。

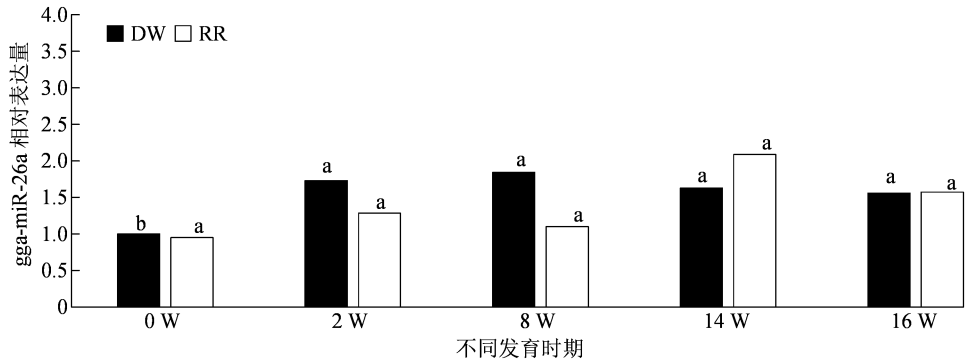


图3 gga-miR-26a 在鸡腿肌组织中的表达

2.4 脂肪细胞中 gga - miR - 26a 的表达

在鸡腹脂脂肪细胞中,gga - miR - 26a 的相对表达量在分化 1 d 最低,显著低于增殖期(图 4, $P<0.05$);在肌内脂肪细胞中,gga - miR - 26a 在分化 4 d 和 6 d 的相对表达量显著高于增殖期($P<$

0.05,图 5),在分化 1 d 开始表达量呈现直线上升趋势。

2.5 gga - miR - 26a 靶基因预测及功能分析

利用在线软件 TargetScan、miRDB 和 miRmap,预测出了 gga - miR - 26a 的靶基因,它们分别是

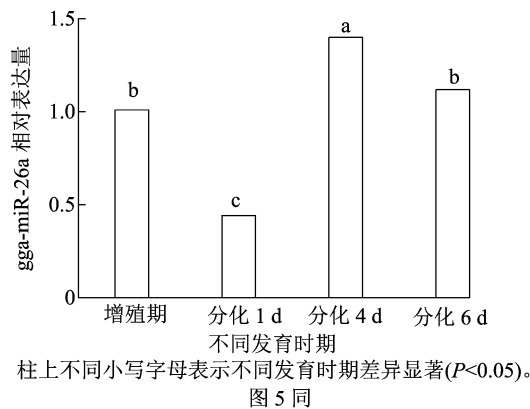


图4 gga-miR-26a 在鸡腹脂脂肪细胞中的表达

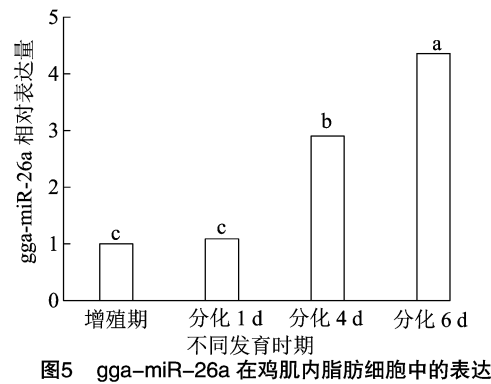


图5 gga-miR-26a 在鸡肌肉脂肪细胞中的表达

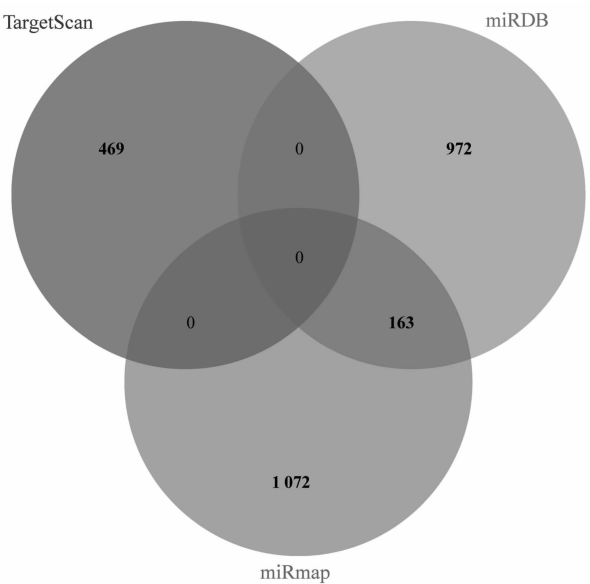


图6 gga-miR-26a 靶基因预测分析

在生物学过程分类中,靶基因主要富集到肽基苏氨酸磷酸化、肽基丝氨酸磷酸化、蛋白质去磷酸化、蛋白质自磷酸化、转录调控,DNA 模板、GTP 酶活性的正向调节等过程;在细胞组分分类中,靶基因主要富集到胞质溶胶、核质、质膜等活动中;在分子功能分类中,靶基因主要富集到蛋白激酶结合、小 GTP 酶结合、相同蛋白结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等分子功能。KEGG 通路富集分析结果如图 8 所示,预测到的靶基因在 mTOR 信号通路 (*ULK2*、*RPTOR*、*RPS6KA6*、*PTEN*、*MTOR*、*STRADB*)、自噬 - 其他 (*ULK2*、*RPTOR*、*MTOR*)、自噬 - 动物 (*ULK2*、*PTEN*、*RPTOR*、*MTOR*、*PRKCD*)、信使核糖核酸监测

469、972、1 072 个。将 3 种方式中超过 2 次的基因进行并集,得到了 163 个目标基因(图 6)。

对 163 个靶基因进行 GO 功能富集分析,GO 分析结果(图 7)分为细胞组分 (cellular component, 简称 CC)、分子功能 (molecular function, 简称 MF) 和生物过程 (biological process, 简称 BP) 等 3 个部分。

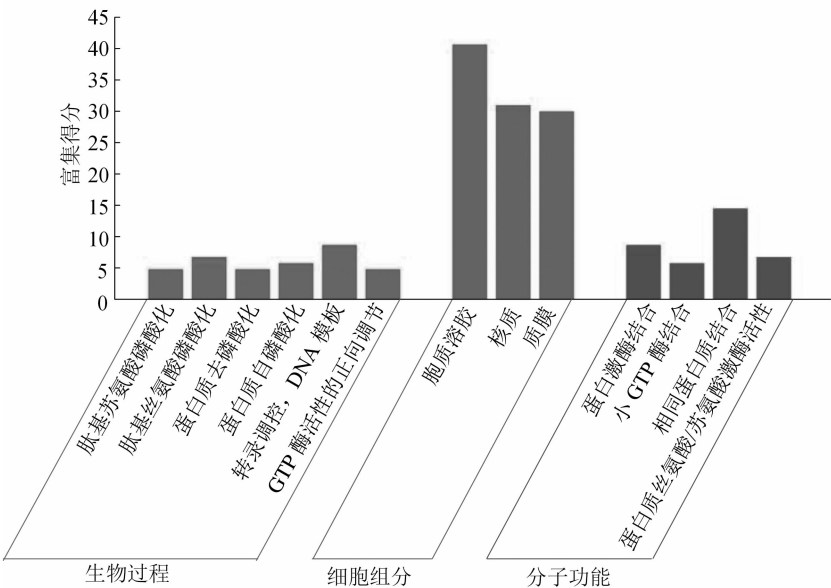


图7 gga-miR-26a 靶基因 GO 注释分析结果

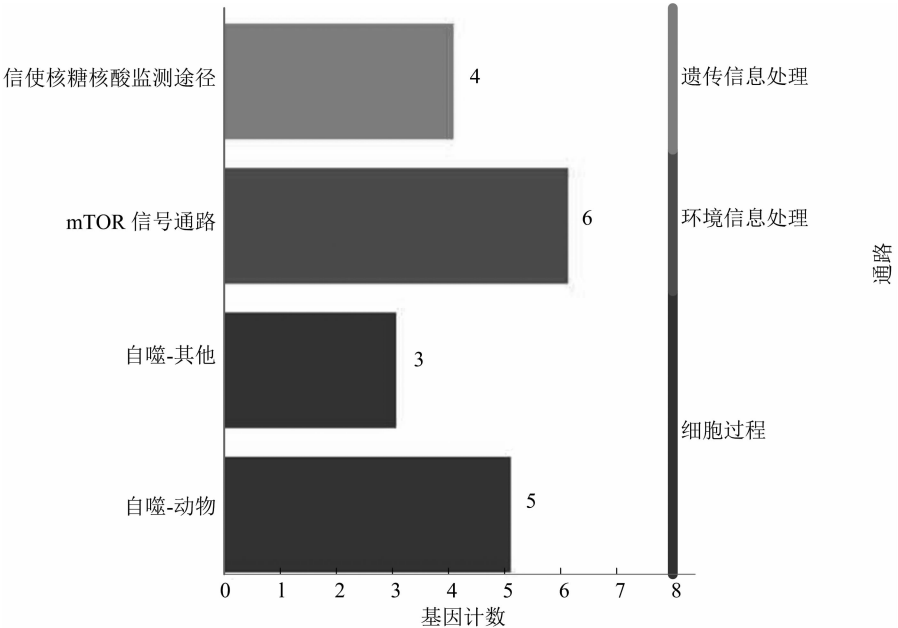


图8 gga-miR-26a 靶基因 KEGG 通路富集分析结果

途径(*PPP2R3B*、*ETF1*、*CPSF4*、*PPP2R5A*)等途径显著富集。

3 讨论

本试验结果表明,不同发育阶段的肝脏、腹脂和腿肌组织中,gga - miR - 26a 在呈现不同的表达模式。gga - miR - 26a 在 2 个品种肝脏组织中的表达具有显著的差异,DW 鸡在肝脏组织中 gga - miR - 26a 的相对表达量始终高于 RR 鸡,gga - miR - 26a 在腹脂组织中 0 ~ 2 W 时的相对表达量 RR 鸡高于 DW 鸡,gga - miR - 26a 在腿肌组织中的相对表达量 8 W 以前 DW 鸡高于 RR 鸡。综上所述,miR - 26a 不但参与哺乳动物肌肉发育及脂肪代谢的调控过程,同时也参与了优质肉鸡肌肉发育和脂肪代谢的调控,而 gga - miR - 26a 对肌肉发育和脂肪沉积调控作用的时间因品种而异。gga - miR - 26a 在体外腹脂和肌肉脂肪细胞分化后期的表达量显著高于增殖期,推测脂肪细胞分化后期是 gga - miR - 26a 主要调控时期。有研究报道,哺乳期间通过乳汁供应的 miR - 26a 表达量的改变能够改变后代中靶基因的表达,并可能影响脂肪组织的发育^[18];miR - 26a 是一种有效的脂肪前体细胞分化抑制剂,其作用靶点是 *Fbxl19*^[19];miR - 26a 是一个抑制猪前体脂肪细胞分化的基因,它通过介导 *ACSL3* 来促进肌前体脂肪细胞中脂滴的累积^[20];高表达的 AP2 - microRNA - 26a 具有降低内脏脂肪

含量及血脂的作用^[21]。这表明 miR - 26a 对脂肪的调节不仅在同一物种不同品种中有差异,在物种间也存在一定的差异,后期将进一步验证这一推论。

miRNA 对相关性状的调控都是通过靶向基因来实现的,靶基因的预测是深入研究 miRNA 功能的重点。本研究采用 3 种预测软件进行预测,共得到 163 个交集靶基因,显著富集在 mTOR 信号通路、信使核糖核酸监测途径等信号通路,其中富集在 mTOR 信号通路、自噬 - 其他、自噬 - 动物 3 条通路中的靶基因都有报道与脂肪沉积密切相关。富集在 mTOR 信号通路、自噬 - 其他和自噬 - 动物的 *ULK2* 基因,有研究报道其主要在脂肪细胞中发挥调控脂类代谢的作用^[22];富集在 mTOR 与自噬 - 动物通路的 *PTEN*,有研究表明,miR - 26a 正向调控 3T3 - L1 细胞成脂分化,其机制可能与 *PTEN* 有关^[23],miR - 21 能促进 BMSCs 成骨分化,且能负性调控 *PTEN*,抑制 BMSCs 成脂分化^[24];富集在自噬 - 动物的 *PRKCD* 在诱导 3T3 细胞的脂肪形成中起重要作用,并对脂肪形成起抑制作用^[25]。综上所述,推测 *PTEN*、*ULK2* 和 *PRKCD* 可能是 miRNA - 26a 参与调控鸡脂肪代谢或肌肉发育的靶基因,后续通过体外功能试验和荧光素酶报告基因进行验证时将重点关注这 3 个靶基因。

参考文献:

[1] 韩浩月, Esmail S H. 肉鸡脂肪沉积调控[J]. 国外畜牧学(猪与

- 禽),2016,36(12):32–34.
- [2] Mossab A, Lessire M, Guillaumin S, et al. Effect of dietary fats on hepatic lipid metabolism in the growing Turkey [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*,2002,132(2):473–483.
 - [3] Rupaimoole R, Slack F J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*,2017,16(3):203–222.
 - [4] Zamore P D, Haley B. Ribo – gnomes: the big world of small RNAs [J]. *Science*,2005,309(5740):1519–1524.
 - [5] 王淑芬,董巍蕾,谢 晶,等. miR – 26a 通过调节 *MTDH* 基因表达抑制 CAOV3 细胞系生长[J]. *中南医学科学杂志*,2014,42(6):563–566.
 - [6] Liu T, Wang Z M, Dong M H, et al. MicroRNA – 26a inhibits cell proliferation and invasion by targeting FAM98A in breast cancer[J]. *Oncology Letters*,2021,21(5):367.
 - [7] Huse J T, Brennan C, Hambardzumyan D, et al. The PTEN – regulating microRNA miR – 26a is amplified in high – grade glioma and facilitates gliomagenesis *in vivo* [J]. *Genes & Development*, 2009,23(11):1327–1337.
 - [8] Li X, Lian L, Zhang D X, et al. Gga – miR – 26a targets NEK6 and suppresses Marek’s disease lymphoma cell proliferation[J]. *Poultry Science*,2014,93(5):1097–1105.
 - [9] Ma Y, Deng F, Li P, et al. The tumor suppressive miR – 26a regulation of FBXO11 inhibits proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018,101:648–655.
 - [10] Icli B, Wara A K M, Moslehi J, et al. MicroRNA – 26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/ SMAD1 signaling [J]. *Circulation Research*, 2013, 113(11): 1231–1241.
 - [11] 张 芃,李 纲,杨 颖,等. 牙种植修复在慢性牙周炎患者与牙周健康者的疗效对比分析[J]. *重庆医学*,2013,42(11): 1245–1247.
 - [12] Fu X H, Dong B N, Tian Y, et al. MicroRNA – 26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids[J]. *The Journal of Clinical Investigation*,2015,125(6):2497–2509.
 - [13] 孙军健,王朝阳,贾永鹏,等. miR – 26a 抑制转化生长因子 β 诱导的韧带成纤维细胞增殖[J]. *现代生物医学进展*,2014,14(29):5655–5657,5694.
 - [14] 徐 军,徐 华,田 燕,等. miR – 26a 在代谢与肝癌中的应用 [C]//美国华人生物科学家学会(SCBA),中国生物化学与分子生物学学会(CSBMB). 全球华人生物学家大会暨第十六届美洲华人生物科学学会学术研讨会摘要集. 2017:103–104.
 - [15] Xu S Z, Wang Y J, Li Z Y, et al. LncRNA GAS5 knockdown mitigates hepatic lipid accumulation via regulating miR – 26a – 5p/ PDE4B to activate cAMP/CREB pathway [J]. *Frontiers in Endocrinology*,2022,13:889858.
 - [16] 俞楠泽,朱 琳,白 明,等. 局部应用 miR – 26a 抑制剂对小鼠创面愈合的促进作用[J]. *医学研究杂志*,2014,43(7):69–72.
 - [17] Shi L H, Ko M L, Ko G Y P. Rhythmic expression of microRNA – 26a regulates the L – type voltage – gated calcium channel $\alpha 1C$ subunit in chicken cone photoreceptors [J]. *Journal of Biological Chemistry*,2009,284(38):25791–25803.
 - [18] Cryer J, Woodhead B G, Cryer A. The isolation and characterisation of a putative adipocyte precursor cell type from the white adipose tissue of the chicken (*Gallus domesticus*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1987, 86(3): 515–521.
 - [19] Pomar C A, Serra F, Palou A, et al. Lower miR – 26a levels in breastmilk affect gene expression in adipose tissue of offspring[J]. *The FASEB Journal*,2021,35(10):E21924.
 - [20] Acharya A, Berry D C, Zhang H, et al. MiR – 26 suppresses adipocyte progenitor differentiation and fat production by targeting *Fbxl19* [J]. *Genes & Development*,2019,33(19/20):1367–1380.
 - [21] 丁 宁. Ssc – miR – 26a 靶向 ACSL3 调控猪肌内脂肪细胞的成脂分化[D]. 泰安:山东农业大学,2019:32–44.
 - [22] Ro S H, Jung C H, Hahn W S, et al. Distinct functions of *Ulk1* and *Ulk2* in the regulation of lipid metabolism in adipocytes [J]. *Autophagy*,2013,9(12):2103–2114.
 - [23] 宁椿游,李贵林,杨羽晨,等. MiR – 26a 靶向调节 PTEN 对 3T3 – L1 前脂肪细胞分化的促进效应[J]. *农业生物技术学报*, 2017,25(8):1314–1325.
 - [24] Zhou Y, Qiao H, Liu L, et al. MiR – 21 regulates osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs by targeting *PTEN* [J]. *Musculoskelet Neuronal Interact*,2021,21(4):568–576.
 - [25] Zhou Y R, Wang D M, Li F Q, et al. Different roles of protein kinase C – $\beta 1$ and – δ in the regulation of adipocyte differentiation [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006,38(12):2151–2163.