

饲料中添加共轭亚油酸对猪肌肉组织 miRNA 表达谱的影响

王琪^{1,2}, 齐仁立^{1,2}, 刘虹¹, 王敬^{1,2}, 黄金秀^{1,2*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460)

摘要: 旨在探讨共轭亚油酸(CLA)通过影响猪肌肉 miRNA 表达调控肌肉代谢的分子机制。本研究选用体重相近的初产荣昌母猪 12 头, 随机分为对照组和 CLA 组, CLA 组母猪饲料从妊娠初期开始添加 1.5% CLA, 持续到仔猪 28 日龄断奶; 断奶后分别从对照组和 CLA 组挑选仔猪各 30 头, 原 CLA 组仔猪饲料中继续添加 1.5% CLA。待仔猪体重约 30 kg 时, 每组各选择 6 头进行屠宰, 采集背最长肌和腿肌样品。提取 RNA 后将对照组和 CLA 组的背肌和腿肌进行建库; 通过 Solexa 高通量测序技术检测 CLA 对猪肌肉组织 miRNA 表达谱的影响, 利用生物信息学进行差异显著表达 miRNA 的靶基因预测和功能分析。结果显示: 1) 背肌和腿肌分别获得了 44 869 982 条和 45 105 806 条 clean reads, 大多数序列长度在 20~23 nt。2) 背肌和腿肌分别鉴定到 306 和 304 个已知 miRNAs, 有 295 个 miRNAs 共表达。3) 添加 CLA 后能改变猪肌肉中 miRNA 的表达, 分析表明, CLA 对腿肌 miRNA 表达的影响要强于背肌; 背肌和腿肌中分别发现 5 个和 12 个差异显著表达的 miRNAs ($P < 0.05$), 其中 ssc-miR-224 在两种组织中都差异表达, 因此共有 16 个差异表达 miRNAs。4) 对 16 个差异表达 miRNAs 进行靶基因预测和 KEGG 通路富集分析, 发现它们的靶基因主要富集于 292 个通路, 其中 24 个通路显著富集 ($P < 0.05$), 包括与肌肉代谢密切相关的 MAPK 信号通路和 Notch 信号通路。5) 利用荧光定量 PCR 对随机选择的 6 个差异表达 miRNAs 进行验证, 证实其表达水平和测序结果基本一致。以上结果说明, CLA 可能通过影响肌肉 miRNA 表达, 调控重要肌肉代谢通路。

关键词: 共轭亚油酸; 猪; miRNA; Solexa 测序; 肌肉组织

中图分类号: S828.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)09-1908-11

Effects of Conjugated Linoleic Acid Supplementation in Diet on the Expression Profile of miRNAs in Porcine Muscle Tissue

WANG Qi^{1,2}, QI Ren-li^{1,2}, LIU Hong¹, WANG Jing^{1,2}, HUANG Jin-xiu^{1,2*}

(1. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China;

2. Key Laboratory of Pig Industry Sciences of Ministry of Agriculture, Chongqing 402460, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the molecular mechanisms of muscle metabolism regulated by conjugated linoleic acid (CLA) through affecting the expression of miRNA in porcine muscle. Twelve purebred Rongchang gilts with similar body weight were randomly divided into control and CLA groups. The pregnant gilts in CLA group were fed with 1.5% CLA diet from the beginning of pregnancy to weaning at 28 days old; After weaning, 30 piglets were respectively selected from the control and CLA groups, and the diet of piglets in original CLA group was also added 1.5% CLA. When the body weight of piglets was about 30 kg, 6 piglets from each group were slaughtered to collect the back muscle and leg muscle samples. After RNA

收稿日期: 2017-12-28

基金项目: 国家“973”计划项目(2012CB124702); 重庆市农发资金项目(15430)

作者简介: 王琪(1984-), 女, 四川自贡人, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物肌肉代谢相关研究, Tel: 023-46792097, E-mail: wangq0418@126.com

* 通信作者: 黄金秀, 研究员, 主要从事动物营养原理研究, E-mail: short00@163.com

extraction, cDNA libraries were constructed by the back muscle and leg muscle samples of the control and CLA groups; The Solexa deep sequencing was performed to analyze the effect of CLA on the miRNA expression profiles in porcine muscle tissue, the target genes prediction and function analysis for differentially expressed miRNA were carried out through the bioinformatics method. The results showed that: 1) There were 44 869 982 and 45 105 806 clean reads in the back muscle and leg muscle tissues, respectively, and most of the small RNA sequence were 20-23 nt. 2) 306 and 304 known miRNAs were respectively found in the back muscle and leg muscle tissues, 295 known miRNAs were co-expressed in two tissues. 3) The expression of miRNA in porcine muscle was changed by CLA supplementation and the effect of CLA on miRNA expression in leg muscle was stronger than that in back muscle; 5 miRNAs in the back muscle and 12 miRNAs in the leg muscle were differentially expressed in corresponding CLA treatment ($P < 0.05$), of which only the ssc-miR-224 was differentially expressed in both two tissues, thus 16 differentially expressed miRNAs were identified. 4) KEGG analysis revealed that the target genes of 16 differentially expressed miRNAs were involved in 292 biological pathways, of which 24 pathways were significantly enriched ($P < 0.05$), including the MAPK and Notch signaling pathways, which were known to regulate muscle metabolism. 5) Six differentially expressed miRNAs were randomly selected to validate the sequencing results by qRT-PCR, the qRT-PCR expression results corresponded well with the results from the sequencing. This study suggests that CLA may regulate muscle metabolic pathways by affecting the expression of miRNA.

Key words: CLA; pig; miRNA; Solexa sequencing; muscle tissue

共轭亚油酸(conjugated linoleic acids, CLA)是一类含有共轭双键的十八碳脂肪酸的统称,常见于反刍动物的脂肪中,具有抗肿瘤、改善动物免疫、抑制氧化应激、减少体内脂肪沉积和调控肌肉生长等多种生理功能^[1-3]。肌肉组织是动物体内最重要的组织之一,研究表明,CLA 可通过改变骨骼肌的肌纤维类型来改善猪肉品质;CLA 还能通过影响肌肉的生理变化如调控肌肉代谢信号传导通路、影响肌肉能量代谢,从而增加动物机体瘦肉重和改变肌肉蛋白质含量^[4-6]。

microRNAs(miRNAs)是一类长度为 20~24 nt 的非编码小 RNA。miRNA 通过碱基互补配对与靶基因 3' 非编码区结合,降解靶基因 mRNA 或抑制其翻译,在转录后水平调节基因表达,从而参与多种生物学功能^[7]。研究证实,miRNA 在肌肉细胞分化和组织生长发育过程中发挥重要作用,而动物膳食结构的改变能影响其肌肉组织 miRNA 的表达;如肥胖小鼠饲料中添加烟酸可显著改变骨骼肌中 42 个 miRNAs 表达^[8-9],生长猪饲喂不同能量来源的饲料能显著影响肌肉组织中 miR-23a、miR-409 和 miR-208b 的表达^[10]。饲料中添加 CLA 也能影响机体组织 miRNA 表达,但目前 CLA 对 miRNA

表达影响的研究仅集中在脂肪上,Parra 等^[11-12]发现,小鼠饲料中添加 CLA 能显著改变脂肪组织中 miR-143、miR-103 和 miR-107 等的表达,猪饲料中添加 CLA 则能显著下调脂肪组织 miR-143 和 miR-27 的表达。

本实验室前期研究发现,生长育肥期饲料中添加 1%~1.5% CLA 能显著促进生长猪背最长肌的重量,增加肌内脂肪的含量并改变肌肉中脂肪酸的组成^[13-14]。Corino 等^[15]研究证实,母猪妊娠期和泌乳期饲料添加 CLA 可显著提高仔猪生长性能。然而,饲料中长期添加 CLA 对猪肌肉 miRNA 表达谱造成怎样的影响及其存在的分子机理目前还未见报道。因此,本试验在母猪及其子代饲料中添加 1.5% CLA,研究其对于子代肌肉组织 miRNA 表达谱的影响,从而探明 CLA 对猪肌肉组织中 miRNA 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料和样品采集

试验选取 12 头平均体重为 60.83 kg 和背膘厚为 24.16 mm 的初产荣昌母猪,随机分为对照组和 CLA 组,每组 6 个重复,每个重复 1 头母猪。CLA

组母猪的饲料从妊娠初期开始添加 1.5% CLA 混合物,持续到仔猪 28 日龄断奶;仔猪断奶后,按照公母各半的原则分别从对照组和 CLA 组挑选健康仔猪各 30 头,分成 6 个重复,每个重复 5 头仔猪;断奶后原 CLA 组仔猪饲料中继续添加 1.5% CLA 混合物,对照组仔猪饲料中不添加。对照组母猪和断奶后仔猪的饲养水平参照荣昌猪饲养标准(GB/T 7223-2008)和中国猪饲养标准(NY/T65-2004)进行配制,试验组饲料中的 CLA 等比例替代基础饲料中的大豆油,其他组分和营养成分与对照组一致。仔猪 30 kg 左右时,每组选择 6 头仔猪(3 头母猪和 3 头公猪)进行屠宰,采集背最长肌(背肌)及腿肌组织样品,于液氮速冻后转移至-80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 RNA 文库的构建

Trizol 试剂法提取肌肉组织总 RNA,每组 3 份样品进行等量混合,检测混合后总 RNA 质量,保证 RIN(RNA integrity number)值为 7.5~9.0。使用 PAGE 胶分离不同片段大小的 RNA,切取 18~30 nt 之间的条带进行回收;分别配制 3' 和 5' 连接体系,混匀离心后适温连接;配制反转录体系,在 PCR 仪上适温反应一定时间,使连接产物反转录成双链,再配制 PCR 反应体系,在 PCR 仪上按照一定程序进行扩增;使用 PAGE 胶对 PCR 产物进行切胶回收纯化,完成文库构建。分别对对照组和 CLA 组的背肌和腿肌(混样)进行建库,每个组设定一个重复,因此共有 8 个库,包括背肌对照组 I、背肌对照组 II、背肌 CLA 组 I、背肌 CLA 组 II、腿肌对照组 I、腿肌对照组 II、腿肌 CLA 组 I 和腿肌 CLA 组 II。构建好的文库进行质检后在 Illumina HiSeq 2000 平台进行高通量测序,测序工作由深圳华大基因科技有限公司完成。

1.3 已知 miRNA 的鉴定

测序原始序列(raw reads)去除低质量、接头污染和长度小于 18 nt 的序列,获得 clean reads。通过 SOAP 和 bowtie 将筛选后的 sRNA 定位到猪参考基因组上(ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-87/gtf/sus_scrofa/),去除 rRNA、tRNA、scRNA、snRNA 和 snoRNA 等小 RNA。然后将剩余序列与 miRBase 21.0 (<http://www.mirbase.org/>)中猪的已知 miRNA 进行比对,确定已知的 miRNA,用 mirdeep 软件预测新 miRNA。

1.4 差异表达 miRNA 筛选和候选靶基因功能分析

对样本中已知 miRNA 进行表达量的统计,用

TPM^[16] 进行表达量归一化处理,采用 SPSS 18.0 中的描述统计(descriptive statistics)分析数据,以“平均值±标准差”表示 miRNA 表达量。使用 ExpDiff 方法比较对照组和 CLA 组之间 miRNA 表达量的差异,分析对照组和 CLA 组中已知 miRNA 的差异倍数(fold change)及 P 值,筛选差异表达的 miRNA。用 miRanda 和 RNAhybrid 软件对差异表达的已知 miRNA 进行靶基因预测,取交集作为预测结果。使用 KEGG 代谢通路分析确定候选靶基因参与的主要生化代谢途径和信号转导途径。

1.5 荧光定量 PCR 验证测序

为验证高通量测序结果的准确性,在背肌和腿肌各选择 3 个差异表达的 miRNAs 进行荧光定量 PCR 试验。按照反转录 SYBR[®] Prime Script[™] miRNA RT-PCR 试剂盒(TaKaRa, Japan)的说明书步骤获得 cDNA,特异性上游引物根据所选 miRNA 的自身序列进行设计,由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 1),下游引物为通用引物,选择 U6 为内参基因。用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒(TaKaRa, Japan)进行荧光定量 PCR 反应,体系:模板 2.0 μL cDNA, 10 μL 2×SYBR Premix Ex Taq II, 0.4 μL ROX Reference Dye, 0.8 μL miRNA 特异引物, 0.8 μL 下游引物(试剂盒自带),加 ddH₂O 使总体积为 20 μL。所有的反应设置 3 个重复,数据结果通过 2^{-ΔΔCT} 法进行相对定量的统计分析。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The primers sequence for qRT-PCR

miRNA 名称 miRNA name	引物序列(5'→3') Primer sequence
ssc-miR-224	CAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTA
ssc-miR-4332	CACGGCCGCCGCCGGCGCC
ssc-miR-628	ATGCTGACATATTTACTAGAGG
ssc-miR-151-5p	TCGAGGAGCTCACAGTCTAGT
ssc-miR-144	TACAGTATAGATGATGTAC
ssc-miR-1285	CTGGGCAACATAGCGAGACCCCGT
U6	GCTTCGGCAGCACATATACT

2 结果

2.1 猪肌肉组织测序数据过滤和 sRNA 序列信息

经过 Solexa 测序得到的 raw data 数据进行过滤处理,主要包括去除接头、污染及低质量序列等。本试验一共构建 8 个文库,背肌组 4 个文库总共获得了 44 869 982 条 clean reads,占总数的 95.10%;

而腿肌组 4 个文库则获得了 45 105 806 条 clean reads, 占总数的 95.09% (表 2)。背肌和腿肌中小 RNA 序列长度分布见图 1, 绝大多数序列长度为 20~23 nt, 其中 22 nt 长度序列占的比例最大。miRNA 在由前体发育为成熟体时其过程是由 Dicer 酶切完成的, 酶切位点的特异性使得 miRNA 成熟体的首位碱基具有很强的偏好性, 图 2 统计了背肌和腿肌中长度为 18~30 nt miRNA 首位碱基分布情况, 发现第一个碱基对 U 具有强烈的偏好性。

2.2 猪肌肉组织已知 miRNA 鉴定分析

通过 blast 或 bowtie 将 sRNA 与 miRBase 21.0 中猪 (*Sus scrofa*) miRNAs 序列进行比对, 背肌和

腿肌组织中分别鉴定出 306 和 304 个已知 miRNAs, 有 295 个 miRNAs 共表达, 其中 ssc-miR-206、ssc-miR-1、ssc-miR-133a-3p、ssc-miR-26a、ssc-miR-10b 和 ssc-miR-128 等多个 miRNAs 在背肌和腿肌组织中均高表达。作为肌肉特异性 miRNA, ssc-miR-1、ssc-miR-206 和 ssc-miR-133a-3p 的表达量均超过百万拷贝数 (图 3)。

2.3 添加 CLA 对猪肌肉 miRNA 表达的影响

在饲料中持续添加 CLA 影响猪背肌和腿肌 miRNA 表达, 对 CLA 组和对照组标准化之后的表达值进行差异比较, 并把差异倍数取 2 为底的对数, 以 \log_2 (Fold change) 表示, 正值代表上调, 负值代

表 2 测序文库的小 RNA 片段质量分类

Table 2 The classification of small RNA tags in sequencing libraries

分类 Type	背肌 Back muscle			
	对照组 I Control group I	对照组 II Control group II	CLA 组 I CLA group I	CLA 组 II CLA group II
原始序列 Total reads	12 039 290	11 319 172	12 054 534	11 766 943
高质量序列 High quality	11 992 921	11 268 066	12 001 613	11 712 746
无 3'接头 3'adapter null	211 522	255 760	172 667	188 809
无插入片段 Insert null	123 251	111 545	155 638	150 713
5'接头污染 5'adapter contaminant	29 963	25 709	34 716	27 803
小于 18 nt Smaller than 18 nt	111 414	117 133	158 020	230 238
包含 polyA Poly A	72	126	122	143
纯净序列 Clean reads	11 516 699	10 757 793	11 480 450	11 115 040
分类 Type	腿肌 Leg muscle			
	对照组 I Control group I	对照组 II Control group II	CLA 组 I CLA group I	CLA 组 II CLA group II
原始序列 Total reads	11 319 172	11 547 164	12 419 842	12 144 824
高质量序列 High quality	11 268 066	11 496 610	12 363 660	12 098 777
无 3'接头 3'adapter null	255 760	187 021	214 316	292 296
无插入片段 Insert null	111 545	103 416	111 132	201 319
5'接头污染 5'adapter contaminant	25 709	31 035	47 271	48 732
小于 18 nt Smaller than 18 nt	117 133	120 093	114 339	139 781
包含 polyA Poly A	126	145	75	63
纯净序列 Clean reads	10 757 793	11 054 900	11 876 527	11 416 586

每个组设定一个重复, 以 I 和 II 表示

The replicate expressed as I and II in each group

表下调。结果表明,添加 CLA 后背肌中有 151 个 miRNA 表达上调,155 个表达下调;腿肌中有 141 个 miRNA 表达上调,163 个表达下调。腿肌中有 17 个 miRNAs 的 $\log_2(\text{Fold change})$ 大于 1,而背肌中只有 7 个;腿肌中有 13 个 miRNA 的 $\log_2(\text{Fold change})$ 小于 -1,而背肌中只有 6 个(表 3)。说明 CLA 对腿肌 miRNA 表达的影响要强于背肌。

以 $\log_2(\text{Fold change}) > 1$ 或 $< -1, P < 0.05$ 为标准筛选对照组和 CLA 组之间显著差异表达的 miRNA,发现饲料中添加 CLA 显著改变了背肌中 ssc-miR-224、ssc-miR-9841-3p、ssc-miR-4332、ssc-miR-628 和 ssc-miR-339-3p 的表达;显著改变了腿肌中 12 个 miRNAs 的表达,其中 5 个表达上调,7 个表达下调,其中只有 ssc-miR-224 在猪背肌和腿肌都差异表达(表 4)。此外,背肌和腿肌组织中有 8 个差异表达 miRNAs 的差异倍数发生了 4 倍以上的改变,包括背肌中的 ssc-miR-9841-3p 和 ssc-miR-339-3p,以及腿肌中的 ssc-miR-151-5p、ssc-miR-215、ssc-miR-194b-5p、ssc-miR-452、ssc-miR-205 和 ssc-miR-545-3p。

2.4 肌肉中 16 个差异表达 miRNA 的靶基因预测和功能分析

CLA 组猪的背肌和腿肌中分别有 5 个和 12 个 miRNAs 显著差异表达,其中 ssc-miR-224 在两种组织中都差异表达,因此共有 16 个差异表达 miRNAs。用 RNAhybrid 和 miRanda 分析软件对差异表达的 16 个 miRNAs 进行靶基因预测,共预测到 5 155 个靶基因。对靶基因进行 KEGG 功能分析,发现其共富集到 292 条生物学通路中,其中有 24 个显著富集通路($P < 0.05$,表 5)。显著富集通路中,Notch 信号通路和 MAPK 信号通路都曾报道与肌肉发育和代谢密切相关。靶基因富集最多的前 5 个通路包括:代谢通路(376 个)、肌动蛋白细胞骨架调控(182 个)、癌症通路(160 个)、黏着斑(148 个)、MAPK 信号通路(138 个),其中,肌动蛋白细胞骨架调控、黏着斑和 MAPK 信号通路都为显著富集通路($P < 0.05$)。

2.5 荧光定量 PCR 验证差异表达 miRNA

在表 4 中随机选择 6 个差异表达的 miRNAs,进行荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证。在背肌中检

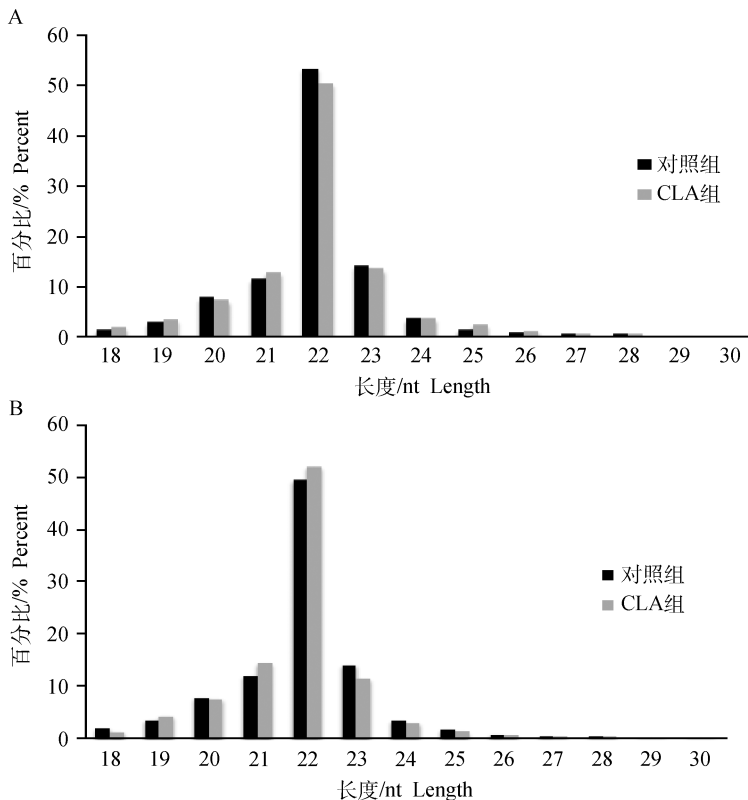


图 1 背肌(A)和腿肌(B)中小 RNA 序列长度分布

Fig. 1 Length distribution of small RNA sequence in back muscle(A) and leg muscle(B)

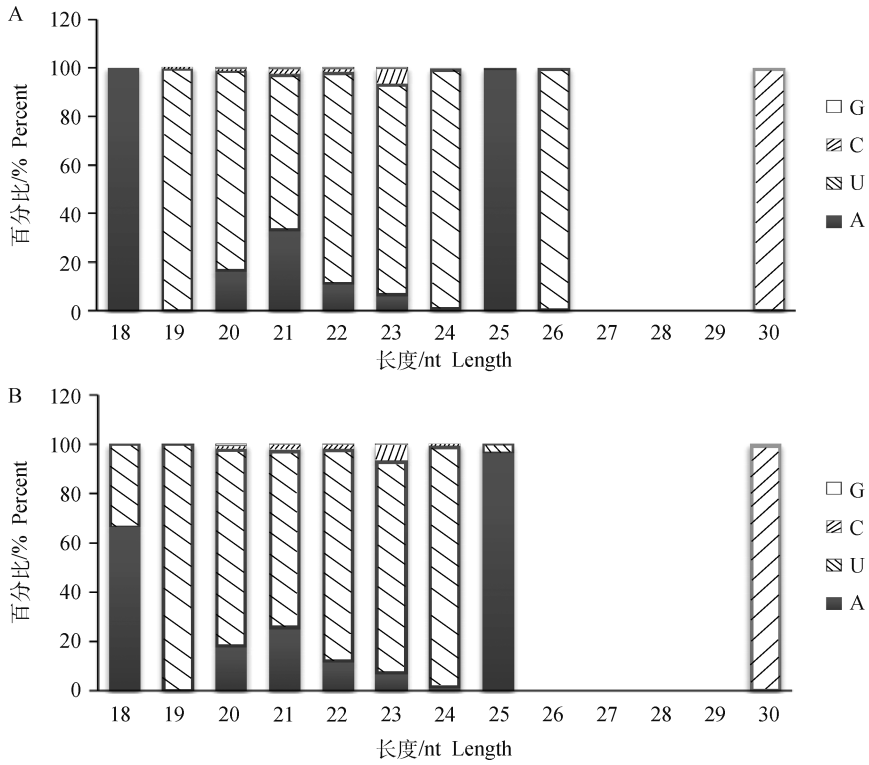


图 2 背肌(A)和腿肌(B)中 18~30 nt miRNA 的首位碱基偏向性
 Fig. 2 First nucleotide bias of miRNA with 18-30 nt in back muscle(A) and leg muscle(B)

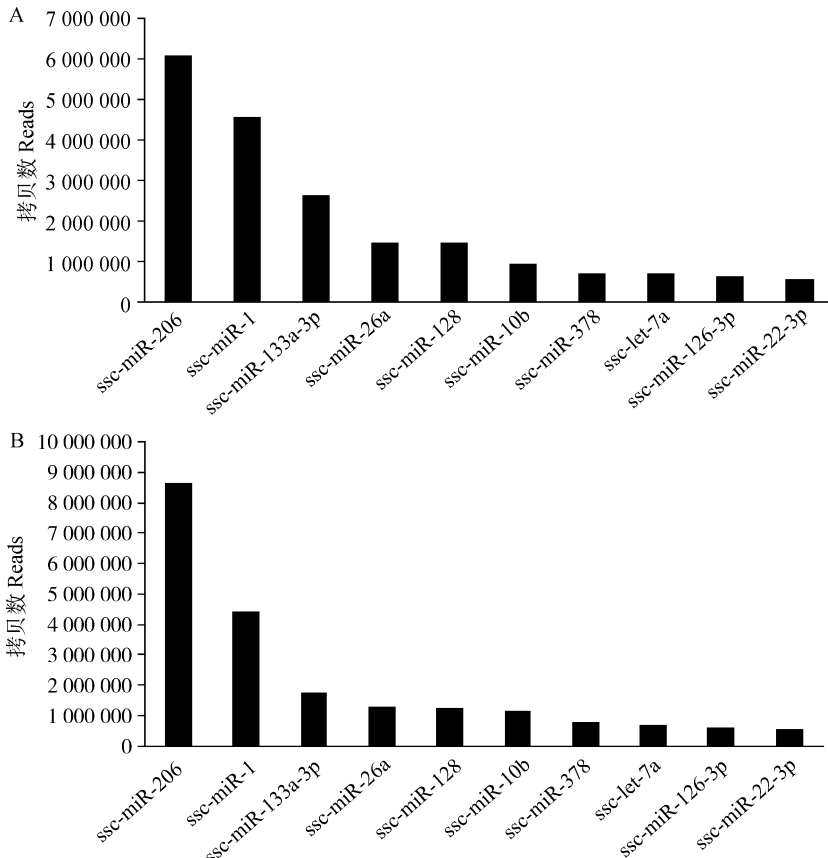


图 3 背肌(A)和腿肌(B)表达量前 10 的 miRNAs
 Fig. 3 The top 10 expressed miRNAs in back muscle(A) and leg muscle(B)

表 3 添加 CLA 后对背肌和腿肌中 miRNAs 差异表达倍数的影响

Table 3 Effects of CLA supplementation on \log_2 (Fold change) of miRNAs in back muscle and leg muscle

\log_2 差异倍数 \log_2 (Fold change)	背肌 Back muscle		腿肌 Leg muscle	
	miRNAs 数量	百分比/%	miRNAs 数量	百分比/%
	Number of miRNAs	Percent	Number of miRNAs	Percent
>3	0	0.00	2	0.66
>1 且 ≤ 3	7	2.29	15	4.93
>0.5 且 ≤ 1	23	7.52	23	7.57
>0.1 且 ≤ 0.5	78	25.49	68	22.37
>0 且 ≤ 0.1	43	14.05	33	10.86
>-0.1 且 ≤ 0	29	9.48	29	9.54
≤ -0.1 且 > -0.5	101	33.01	78	25.66
≤ -0.5 且 > -1	19	6.21	43	14.14
≤ -1 且 > -3	6	1.96	13	4.28

表 4 添加 CLA 后肌肉中显著差异表达的 miRNAs

Table 4 Significant differentially expressed miRNAs in muscle responding to CLA treatment

miRNA 名称 miRNA name	对照组 Control group	CLA 组 CLA group	差异倍数 Fold change	\log_2 差异倍数 \log_2 (Fold change)	P 值 P-value
背肌 Back muscle					
ssc-miR-224	43.08 \pm 6.96	20.40 \pm 4.50	0.47	-1.08	0.01
ssc-miR-9841-3p	0.93 \pm 0.14	7.26 \pm 0.90	7.77	2.96	0.01
ssc-miR-4332	5.40 \pm 0.41	16.33 \pm 3.50	3.03	1.60	0.01
ssc-miR-628	20.63 \pm 0.70	43.16 \pm 4.24	2.09	1.07	0.01
ssc-miR-339-3p	1.52 \pm 0.50	7.00 \pm 1.51	4.60	2.20	0.04
腿肌 Leg muscle					
ssc-miR-151-5p	702.27 \pm 34.65	4 148.04 \pm 388.31	5.91	2.56	0.00
ssc-miR-215	6.81 \pm 1.28	63.30 \pm 2.73	9.30	3.22	0.00
ssc-miR-194b-5p	1.98 \pm 0.00	24.60 \pm 3.23	12.42	3.63	0.00
ssc-miR-122	75.37 \pm 9.19	231.04 \pm 38.89	3.07	1.62	0.00
ssc-miR-452	71.78 \pm 6.87	15.58 \pm 4.34	0.22	-2.20	0.00
ssc-miR-144	554.78 \pm 53.50	254.21 \pm 49.00	0.46	-1.13	0.00
ssc-miR-184	34.03 \pm 4.14	99.47 \pm 9.09	2.92	1.55	0.01
ssc-miR-1285	293.46 \pm 26.87	143.85 \pm 13.44	0.49	-1.03	0.01
ssc-miR-224	88.18 \pm 8.28	29.35 \pm 2.82	0.33	-1.59	0.01
ssc-miR-205	14.20 \pm 2.53	3.14 \pm 0.83	0.22	-2.18	0.03
ssc-miR-299	118.55 \pm 7.07	53.28 \pm 4.74	0.45	-1.15	0.03
ssc-miR-545-3p	9.38 \pm 0.71	1.60 \pm 0.50	0.17	-2.55	0.03

表 5 16 个差异表达 miRNAs 靶基因的 KEGG 通路富集分析

Table 5 KEGG pathway analysis for target genes of 16 differentially expressed miRNAs

KEGG 通路 KEGG pathway	靶基因数 Gene number	P 值 P-value	通路 ID 号 Pathway ID
氨基苯甲酸降解 Aminobenzoate degradation	12	0.000	ko00627
血管平滑肌收缩 Vascular smooth muscle contraction	125	0.000	ko04270
心肌收缩 Cardiac muscle contraction	82	0.001	ko04260
昼夜节律-植物 Circadian rhythm-plant	6	0.001	ko04712
紧密连接 Tight junction	127	0.001	ko04530
轴突导向 Axon guidance	113	0.002	ko04360
叶酸合成 Folate biosynthesis	13	0.002	ko00790
肌动蛋白细胞骨架调控 Regulation of actin cytoskeleton	182	0.002	ko04810
酗酒 Alcoholism	79	0.002	ko05034
5-羟色胺能神经突触 Serotonergic synapse	69	0.003	ko04726
肥厚型心肌病 Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	109	0.005	ko05410
唾液分泌 Salivary secretion	60	0.008	ko04970
可卡因成瘾 Cocaine addiction	35	0.009	ko05030
谷氨酸能突触 Glutamatergic synapse	67	0.011	ko04724
扩张型心肌病 Dilated cardiomyopathy	109	0.011	ko05414
胰岛素信号通路 Insulin signaling pathway	86	0.013	ko04910
致病性大肠埃希菌感染 Pathogenic Escherichia coli infection	59	0.016	ko05130
沙门氏菌感染 Salmonella infection	89	0.023	ko05132
丁酰菌素和新霉素的生物合成 Butirosin and neomycin biosynthesis	6	0.024	ko00524
Notch 信号通路 Notch signaling pathway	31	0.032	ko04330
双组分系统 Two-component system	20	0.034	ko02020
黏着连接 Adherens junction	63	0.035	ko04520
黏着斑 Focal adhesion	148	0.043	ko04510
MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	138	0.044	ko04010

测 ssc-miR-224、ssc-miR-4332 和 ssc-miR-628 的表达,在腿肌中则检测 ssc-miR-151-5p、ssc-miR-144 和 ssc-miR-1285 的表达。qRT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算,并以 \log_2 (CLA 组/对照组) 得出相对表达情况。由图 4 可知,miRNA 的表达变化趋势与测序结果基本一致,但 qRT-PCR 检测到的表达水平变化幅度要小于测序。

3 讨论

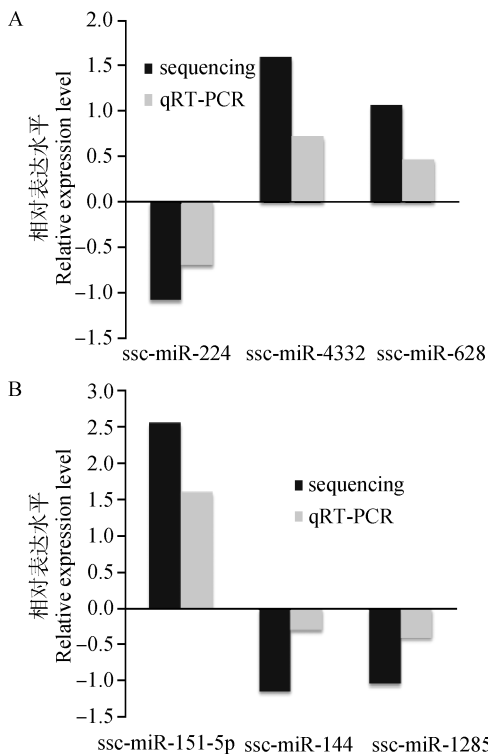
3.1 猪肌肉组织中高表达的 miRNA

骨骼肌是机体进行能量代谢的主要场所,主要作用是控制运动及维持姿势。所有的身体活动和体育活动,都是由骨骼肌收缩完成^[17]。miRNA 作为重要的调控因子,与骨骼肌的发育代谢密切相关^[18]。本研究中,背肌和腿肌表达量前 10 的 miRNAs 包括

ssc-miR-206、ssc-miR-1、ssc-miR-133a-3p、ssc-miR-26a、ssc-miR-10b、ssc-miR-128、ssc-miR-378、ssc-let-7a、ssc-miR-126-3p 和 ssc-miR-22-3p。其中,miR-206、miR-1 和 miR-133a-3p 属于肌源 miRNA,主要参与肌细胞增殖和分化等过程^[19]。Qin 等^[20]研究发现,miR-26a、miR-10b、miR-128、miR-378 和 let-7a 在猪骨骼肌中高表达,与本研究的结果一致。另外两个高表达 miRNAs,miR-126-3p 和 miR-22-3p 则报道与平滑肌细胞的增殖有关^[21-22]。结果说明,这些高表达的 miRNA 在肌肉组织中发挥着重要的生物学功能。

3.2 添加 CLA 后肌肉中差异表达 miRNA 功能分析

CLA 对 miRNA 表达影响的研究主要集中在脂肪上,目前尚未有 CLA 对肌肉组织 miRNA 表达谱影响的报道。本研究通过在猪饲料中添加 1.5% CLA,对猪背肌和腿肌组织进行 miRNA 测序和生



A. 背肌; B. 腿肌

A. Back muscle; B. Leg muscle

图4 差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证

Fig. 4 qRT-PCR validation for the differentially expressed miRNA

物信息学分析,旨在探明 miRNA 在 CLA 调控肌肉发育和代谢中发挥何种作用。结果显示,添加 CLA 对腿肌 miRNA 表达的影响要强于背肌,说明 CLA 对不同的部位肌肉影响效果不同。背肌和腿肌组织中共发现 16 个差异显著表达的 miRNAs,其中只有 ssc-miR-224 在两种组织中都差异表达。有报道称,miR-224 与动物脂肪细胞的成脂分化相关,可通过长链酰基辅酶 A 合成酶 4 (ACSL4) 调节脂肪酸代谢;也有报道认为,miR-224 通过调控过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR α) 的转录水平,从而影响脂肪酸分解代谢并控制脂肪堆积^[23-24]。另外 15 个差异表达的 miRNAs 中,Wang 等^[25-29] 研究认为,miR-4332 能调控猪肌肉中脂肪沉积,miR-122、miR-215、miR-194 和 miR-205 等则被证实与脂代谢相关;其他一些 miRNAs,如 miR-628、miR-151-5p 和 miR-339-3p 等报道与肌肉的发育或疾病的发生有关^[30-32]。说明 CLA 可能通过影响肌肉中重要 miRNA 表达调控肌肉脂肪沉积和发育代谢。

3.3 差异表达 miRNAs 靶基因功能和通路分析

通过对 16 个差异表达 miRNAs 靶基因进行功

能分析,发现 5 155 个靶基因显著富集到 24 条代谢通路中,其中 MAPK 信号通路和 Notch 信号通路与肌肉代谢密切相关。MAPK 家族成员主要包括 P38 MAPK、ERK 1/2 和 JNK,这些因子参与到细胞的生长发育、增殖分化、凋亡等多种生理过程^[33-34]。Segalés 等^[35-37] 发现,这 3 条 MAPK 通路在调控肌细胞的成脂转分化中起到不同的作用,抑制 P38 MAPK 能促进细胞成脂分化,增强脂肪代谢;阻断 ERK 1/2 抑制脂肪形成;阻断 JNK 则刺激脂肪分解,促进细胞凋亡。另外,P38 MAPK 还具有促进肌细胞成肌分化,抑制其增殖的作用。Lee 等^[38-39] 研究证实,肌细胞增殖过程中,添加 c9, t11-CLA 能增加细胞 ERK 1/2 和 JNK 的磷酸化水平,增加细胞分化过程中 ERK 1/2 的磷酸化水平,说明 CLA 可能通过影响 MAPK 通路中关键蛋白来调节肌细胞的增殖和分化。

Notch 通路在调节骨骼肌发育和再生中起关键作用,Bi 等^[40-41] 发现,Notch1 通过激活效应基因 Hes5,来调节猪骨骼肌卫星细胞增殖并维持细胞状态;激活 Notch 信号通路能促进肌细胞增殖,但抑制肌细胞分化。有报道显示,Notch 通路还能调控肌肉糖代谢^[42]。目前未见关于 CLA 对肌细胞中 Notch 通路影响的相关报道,但添加 CLA 能显著提高肌肉中棕榈酸的含量^[14],而体外试验证实棕榈酸能提高肌细胞趋化因子配体 1 (CXCL1) 表达水平,敲除 CXCL1 可减少肌细胞增殖,显著降低 Notch 蛋白质水平,因此推测,CLA 可能是通过影响肌肉中其他脂肪酸含量变化来调控 Notch 信号通路的^[43]。

4 结论

猪饲料中持续添加 1.5% CLA 可以显著改变背肌和腿肌组织 miRNA 的表达,背肌和腿肌组织中共得到 16 个差异表达的 miRNAs,且其靶基因显著富集到 24 个信号通路,包括 MAPK 信号通路和 Notch 信号通路,提示 CLA 可通过改变肌肉 miRNA 表达调控肌肉重要代谢通路,进而影响猪肌肉生长发育。

参考文献 (References):

- [1] LEHNEN T E, DA SILVA M R, CAMACHO A, et al. A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism[J]. *J Int Soc Sports Nutr*, 2015, 12:36.

- [2] WANG Y W, JONES P J H. Dietary conjugated linoleic acid and body composition[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79(6): 1153S-1158S.
- [3] FERLAY A, BERNARD L, MEYNADIER A, et al. Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: a review[J]. *Biochimie*, 2017, 141: 107-120.
- [4] QI R L, YANG F Y, HUANG J X, et al. Supplementation with conjugated linoleic acid decreases pig back fat deposition by inducing adipocyte apoptosis[J]. *BMC Vet Res*, 2014, 10: 141.
- [5] KIM Y, KIM J, WHANG K Y, et al. Impact of conjugated linoleic acid (CLA) on skeletal muscle metabolism[J]. *Lipids*, 2016, 51(2): 159-178.
- [6] 黄金秀, 杨飞云, 刘作华, 等. 共轭亚油酸对体外培养的猪骨骼肌纤维类型组成的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(3): 295-300.
- HUANG J X, YANG F Y, LIU Z H, et al. Effect of conjugated linoleic acid on the composition of myofiber types in skeletal muscle cells of pigs *in vitro*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(3): 295-300. (in Chinese)
- [7] VIENBERG S, GEIGER J, MADSEN S, et al. microRNAs in metabolism[J]. *Acta Physiol*, 2017, 219(2): 346-361.
- [8] 盛熙晖, 邓桂馨, 倪和民, 等. microRNAs 调控动物骨骼肌发育的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(2): 179-185.
- SHENG X H, DENG G X, NI H M, et al. Research progress on microRNAs regulating animal skeletal muscle development [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(2): 179-185. (in Chinese)
- [9] COUTURIER A, KELLER J, MOST E, et al. Niacin in pharmacological doses alters microRNA expression in skeletal muscle of obese Zucker rats[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98313.
- [10] LI Y J, LI J L, ZHANG L, et al. Effects of dietary energy sources on *Post mortem* glycolysis, meat quality and muscle fibre type transformation of finishing pigs[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131958.
- [11] PARRA P, SERRA F, PALOU A. Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice[J]. *PLoS One*, 2010, 5(9): e13005.
- [12] QI R L, CHEN Y, HUANG J X, et al. Effects of conjugated linoleic acid on the expression levels of miR-27 and miR-143 in pig adipose tissue[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 6985-6992.
- [13] HUANG J X, QI R L, CHEN X L, et al. Improvement in the carcass traits and meat quality of growing-finishing Rongchang pigs by conjugated linoleic acid through altered gene expression of muscle fiber types[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 7061-7069.
- [14] 王 琪, 齐仁立, 王 敬, 等. 从胚胎期到育肥期饲料添加共轭亚油酸对猪肉品质、脏器指数及脂肪酸组成的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(2): 79-84.
- WANG Q, QI R L, WANG J, et al. Effects of CLA supplementation on meat quality, organ index and fatty acid composition of pigs from embryo to finishing period [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2017, 53(2): 79-84. (in Chinese)
- [15] CORINO C, PASTORELLI G, ROSI F, et al. Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation in sows on performance and immunoglobulin concentration in piglets [J]. *J Anim Sci*, 2009, 87(7): 2299-2305.
- [16] ZHOU L, CHEN J, LI Z, et al. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs; microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15224.
- [17] FRONTERA W R, OCHALA J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function[J]. *Calcif Tissue Int*, 2015, 96(3): 183-195.
- [18] 吴望军, 陈 杰, 黄瑞华, 等. 高通量技术挖掘猪 microRNA 的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(12): 1857-1866.
- WU W J, CHEN J, HUANG R H, et al. Advances in porcine microRNA research using high-throughput technologies[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(12): 1857-1866. (in Chinese)
- [19] GE Y J, CHEN J. microRNAs in skeletal myogenesis [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(3): 441-448.
- [20] QIN L J, CHEN Y S, LIU X H, et al. Integrative analysis of porcine microRNAome during skeletal muscle development [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72418.
- [21] JANSEN F, STUMPF T, PROEBSTING S, et al. Intercellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 104: 43-52.
- [22] HUANG S C, WANG M, WU W B, et al. Mir-22-3p Inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and

- migration and neointimal hyperplasia by targeting HMGB1 in arteriosclerosis obliterans[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6):2492-2506.
- [23] PENG Y D, XIANG H, CHEN C, et al. MiR-224 impairs adipocyte early differentiation and regulates fatty acid metabolism[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(8):1585-1593.
- [24] STACHOWIAK M, SZYDŁOWSKI M, FLISIKOWSKI K, et al. Polymorphism in 3' untranslated region of the pig *PPARA* gene influences its transcript level and is associated with adipose tissue accumulation[J]. *J Anim Sci*, 2014, 92(6):2363-2371.
- [25] WANG Z X, LI Q G, CHAMBA Y, et al. Identification of genes related to growth and lipid deposition from transcriptome profiles of pig muscle tissue[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2):e0172930.
- [26] 陈 晨, 胡雄贵, 朱 吉, 等. 猪脂肪发育相关 miRNAs 的功能研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(12):2117-2126.
- CHEN C, HU X G, ZHU J, et al. Progress on the research of miRNAs associated with fat development in pigs[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(12):2117-2126. (in Chinese)
- [27] CASAS-AGUSTENCH P, FERNANDES F S, DO CARMO M G T, et al. Consumption of distinct dietary lipids during early pregnancy differentially modulates the expression of microRNAs in mothers and offspring[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2):e0117858.
- [28] JEONG B C, KANG I H, HWANG Y C, et al. MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5:e1532.
- [29] YU J W, CHEN Y S, QIN L M, et al. Effect of miR-205 on 3T3-L1 preadipocyte differentiation through targeting to glycogen synthase kinase 3 beta[J]. *Bio-technol Lett*, 2014, 36(6):1233-1243.
- [30] YU Y H, LI X, LIU L Y, et al. miR-628 promotes burn-induced skeletal muscle atrophy via targeting IRS1[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(10):1213-1224.
- [31] ZHANG Y, WANG R J, DU W J, et al. Downregulation of miR-151-5p contributes to increased susceptibility to arrhythmogenesis during myocardial infarction with estrogen deprivation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e72985.
- [32] HENDGEN-COTTA U B, MESSIHA D, ESFELD S, et al. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial *in vivo* ischemia/reperfusion[J]. *Free Radic Res*, 2017, 51(1):91-102.
- [33] SELIM K A, ABDELRASOUL H, ABOELMAGD M, et al. The role of the MAPK signaling, topoisomerase and dietary bioactives in controlling cancer incidence[J]. *Diseases*, 2017, 5(2):13.
- [34] KYOSSEVA S V. Targeting MAPK signaling in age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmol Eye Dis*, 2016, 8:23-30.
- [35] SEGALÉS J, PERDIGUERO E, MUÑOZ-CÁNOVES P. Regulation of muscle stem cell functions; a focus on the p38 MAPK signaling pathway[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4:91.
- [36] QI R, LIU H, WANG Q, et al. Expressions and regulatory effects of P38/ERK/JNK Mapks in the adipogenic trans-differentiation of C2C12 myoblasts[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6):2467-2475.
- [37] BRIEN P, PUGAZHENDHI D, WOODHOUSE S, et al. p38 α MAPK regulates adult muscle stem cell fate by restricting progenitor proliferation during postnatal growth and repair[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(8):1597-1610.
- [38] LEE J H, TACHIBANA H, MORINAGA Y, et al. Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids[J]. *Life Sci*, 2009, 84(13-14):415-420.
- [39] HUANG W C, TU R S, CHEN Y L, et al. Conjugated linoleic acids suppress inflammatory response and ICAM-1 expression through inhibition of NF- κ B and MAPK signaling in human bronchial epithelial cells[J]. *Food Function*, 2016, 7(4):2025-2033.
- [40] BI P P, YUE F, SATO Y, et al. Stage-specific effects of Notch activation during skeletal myogenesis[J]. *eLife*, 2016, 5:e17355.
- [41] QIN L L, XU J, WU Z F, et al. Notch1-mediated signaling regulates proliferation of porcine satellite cells (PSCs)[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(2):561-569.
- [42] PAJVANI U B, QIANG L, KANGSAMAKSIN T, et al. Inhibition of Notch uncouples Akt activation from hepatic lipid accumulation by decreasing mTorc1 stability[J]. *Nat Med*, 2013, 19(8):1054-1060.
- [43] MASUDA S, TANAKA M, INOUE T, et al. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 is a myokine induced by palmitate and is required for myogenesis in mouse satellite cells[J]. *Acta Physiol*, 2017, 222(3):e12975.