



朱师良, 余春林, 邱莫寒, 张增荣, 熊霞, 胡陈明, 杨礼, 彭涵, 陈家磊, 宋小燕, 夏波, 杨朝武. 清远麻鸡 miR-142-3p 分析及其关键靶基因的筛选[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(07): 12-22.

ZHU Shiliang, YU Chunlin, QIU Mohan, ZHANG Zengrong, XIONG Xia, HU Chenming, YANG Li, PENG Han, CHEN Jialei, SONG Xiaoyan, XIA Bo, YANG Chaowu. MiR-142-3p analysis of Qingyuan partridge chickens and screening of key target genes[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(07): 12-22.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.07.02

清远麻鸡 miR-142-3p 分析及其关键靶基因的筛选

朱师良 余春林 邱莫寒 张增荣 熊霞 胡陈明 杨礼

彭涵 陈家磊 宋小燕 夏波 杨朝武*

(四川省畜牧科学研究院 动物遗传育种重点实验室, 成都 610066)

摘要 为分析清远麻鸡不同组织中 miR-142-3p 的表达情况,并筛选其在脾脏中的关键靶基因,本研究利用在线数据库预测鸡 miR-142-3p 靶基因,并对靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析以及构建蛋白-蛋白互作网络。利用在线公共数据库,分析脾脏相对于其他组织的 miR-142-3p 表达量;再根据 miRNA 表达量与其靶基因表达量负相关机制,对 miR-142-3p 靶基因与脾脏中相对其他组织显著下调基因取交集,筛选潜在靶基因。结果表明:1)预测获得 85 个靶基因,GO 富集分析显示,靶基因参与多种高分子化合物的合成与转运过程。2)KEGG 结果显示富集到 MAPK、Notch、Wnt 等多条与抗肿瘤免疫相关的信号通路。3)PPI 网络共筛选到 4 个 Hub 基因。4)miR-142-3p 在脾脏中的表达量极显著高于肝脏、肺脏、胸肌、心脏和肾脏($P < 0.01$)。5)共筛选到 *TWF1*、*MYH10*、*NFIB*、*FBNPIL* 和 *FERMT2* 5 个靶基因。综上,鸡 miR-142-3p 在脾脏中很可能通过 *TWF1*、*MYH10*、*NFIB*、*FBNPIL* 和 *FERMT2* 发挥生物学功能。本研究为解析鸡 miR-142-3p 的功能及其分子机制提供了参考和依据。

关键词 清远麻鸡; miR-142-3p; 生物信息学; 组织表达; 脾脏

中图分类号 S831.2

文章编号 1007-4333(2024)07-0012-11

文献标志码 A

MiR-142-3p analysis of Qingyuan partridge chickens and screening of key target genes

ZHU Shiliang, YU Chunlin, QIU Mohan, ZHANG Zengrong, XIONG Xia, HU Chenming,
YANG Li, PENG Han, CHEN Jialei, SONG Xiaoyan, XIA Bo, YANG Chaowu*

(Animal Breeding and Genetics Key Laboratory, Sichuan Animal Science Academy, Chengdu 610066, China)

Abstract The aim of the study is to analyze the expression of miR-142-3p in different tissues of Qingyuan partridge chickens and screen for its key target genes in spleen. In this study, the online database was used to predict the target genes of chicken miR-142-3p, and the GO, KEGG and protein-protein interaction network analysis of the target genes were performed. The online public database was used to analyze the expression of miR-142-3p in spleen compared with other tissues. Based on the mechanism of negative correlation between miRNA expression and target gene expression, the intersection of miR-142-3p target genes and significantly down-regulated genes in spleen compared to other tissues was taken to screen potential target genes. The results showed that: 1) A total of 85 target genes were obtained, and GO enrichment analysis showed that the target genes were involved in the synthesis and transport of a variety of

收稿日期: 2023-12-27

基金项目: 国家肉鸡产业技术体系项目(CARS-41-G07);“十四五”四川省畜禽育种攻关项目(2021YFYZ0031);四川省区域创新合作项目(2023YFQ0035)

第一作者: 朱师良(ORCID:0000-0002-0624-0123),助理研究员,主要从事家禽育种研究,E-mail:981728743@qq.com

通讯作者: 杨朝武(ORCID:0000-0001-6537-268X),研究员,主要从事家禽育种研究,E-mail:cwyang@foxmail.com

polymers. 2) KEGG results showed that MAPK, Notch, Wnt and other signaling pathways related to anti-tumor immunity were enriched. 3) A total of 4 Hub genes were screened by PPI network. 4) miR-142-3p expression was significantly higher in spleen than that in liver, lung, pectoral muscle, heart and kidney. 5) Five target genes were screened including *TWF1*, *MYH10*, *NFIB*, *FNBP1L* and *FERMT2*. In summary, chicken miR-142-3p is likely to exert biological functions in the spleen through *TWF1*, *MYH10*, *NFIB*, *FNBP1L* and *FERMT2*. This study provides a reference and basis for analyzing the function and molecular mechanism of chicken miR-142-3p.

Keywords Qingyuan partridge chickens; miR-142-3p; bioinformatics; spleen

microRNA(miRNA)是一类小的非编码RNA,在真核生物基因组中普遍存在,由20~24个核苷酸组成,其形成过程包括转录、加工和复合体装备^[1]。miRNA抑制靶基因的表达,该作用是通过与靶基因的3'非编码序列(Untranslated regions, UTRs)结合发挥。miRNA有三大特性:保守性、组织特异性和时序性^[2]。

近年来在鸡上对miRNA的研究越来越多,涉及肌肉生长发育、细胞增殖分化、脂肪合成、精子发生、细胞免疫、热应激、肿瘤发生及防治等多个方面。如鸡miR-18a-5p^[3]、miR-10b^[4]分别通过FoxO及Wnt信号通路调控肌肉生长及细胞增殖分化;miR-19b-3p、miR-19a-3p、miR-17-5p、miR-301b-3p和miR-215-5p等参与脂肪生成,是影响鸡腹脂沉积的关键miRNAs^[5];miR-200b-3p靶向*Arih2*基因参与机体的发育和免疫调节^[6];miR-202-5p和miR-301a-5p调控粗线期精母细胞分化及精子形成^[7];miR-26a-5p通过靶向*TNRC6A*促进鸡等级卵泡膜细胞的增殖^[8]。

miR-142-3p广泛参与生物各种细胞、组织的生物学过程,调控细胞的增殖、分化、凋亡、侵袭。近年来,它在免疫抗肿瘤上的研究比较热门,在多种癌症,包括乳腺癌、骨肉瘤、结直肠癌、白血病、肝癌、肾癌、胃癌的发生、发展、临床治疗发挥重要作用^[9]。例如miR-142-3p通过靶向 β -catenin^[10]和*HMG2*^[11]的作用来下调乳腺癌的肿瘤干细胞特性和放射抗性,通过靶向 β -catenin抑制Wnt信号通路的激活抑制结直肠癌的发生^[12];通过靶向*CCNT2*调控胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移从而发挥抑癌作用^[13];通过降低*CD133*表达量,从而导致肝癌细胞自我更新、启动肿瘤生长、侵袭、迁移、诱导血管生成和抵抗化疗的能力减弱^[14];通过靶向cAMP/PKA信号通路诱导急性T淋巴细胞白血病的发生^[15];此外Li等^[16]、Wang等^[17]的研究也分别证实miR-142可调控肾癌、血癌、骨肉瘤的发生和防治。

机体的免疫系统在抑制肿瘤生长中发挥重要作用,脾脏作为体内最大的免疫器官在抗肿瘤免疫系统中占有重要地位。脾脏除含有B淋巴细胞、T淋巴细胞、巨噬细胞等大量的免疫细胞外,还能合成抗体、分泌促吞噬素(Tuftsins)、淋巴因子等免疫活性物质参与抗肿瘤免疫^[18]。筛选出脾脏中高表达的miRNA及其靶基因对探究其抗肿瘤免疫机制具有重要意义。

但目前miR-142-3p的研究主要集中在哺乳动物上,而在家禽育种生产上的研究很少。如李慧铭等^[19]研究表明miR-142-3p可通过调节靶基因催乳素受体(*PRLR*)来调控大鼠乳腺的发育和泌乳的形成;张蕊蕊等^[20]发现猪miR-142-3p通过靶向*ROCK2*调控C2C12细胞的增殖与分化;张兆波等^[21]发现卡介苗刺激小鼠巨噬细胞后,miR-142-3p表达量显著下降,并通过调控免疫相关基因在巨噬细胞抗结核分枝杆菌的免疫应答中发挥重要作用。而miR-142-3p在鸡生长发育过程中的功能还有待挖掘。本研究利用生物信息学分析方法,预测鸡miR-142-3p的靶基因进行GO、KEGG和PPI分析,并结合清远麻鸡miR-142-3p及其靶基因的组织表达分析,筛选出miR-142-3p在脾脏中的关键靶基因,以期对miR-142-3p在鸡上的功能及其作用机制进行解析。

1 材料与方法

1.1 材料

利用miBase (<https://www.mirbase.org/>)下载鸡、人、小鼠、野猪、珍珠鸟、马、猩猩、野鸽等12个物种的miR-142-3p的序列并查询其定位、结构信息。

在NCBI的GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载数据包GSE124418^[22]和GSE93855^[23],分别获取成熟清远麻鸡gga-miR-142-3p测序读数(Counts)、转录组Counts以及清远麻鸡gga-miR-142-3p关键靶基因的相对表达量测

序读数。

1.2 方法

1.2.1 查询 miR-142-3p 在鸡基因组上的位置及其序列、结构

利用 miBase 查询鸡的 miR-142-3p (登录号: MIMAT0001194) 的序列信息及其发夹结构,并在 NCBI 找到其在基因组上的位置。

1.2.2 miR-142-3p 的物种保守性及其靶基因预测

进行不同物种间的 miR-142-3p 序列对比;分别利用 miRDB (<https://www.mirdb.org/index.html>) 和 Targetscan (<https://www.targetscan.org/>) 数据库预测鸡 miR-142-3p 的靶基因,并对结果取交集,减少假阳性,结果以韦恩图的形式呈现。

1.2.3 gga-miR-142-3p 靶基因的 GO 和 KEGG 分析

分别利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 的 GO 和 KEGG 模块,对 gga-miR-142-3p 的靶基因进行 GO 以及 KEGG 富集分析。其中,GO 功能基因富集包括 BP、MF 和 CC 3 个部分,对 GO 和 KEGG 富集结果进行可视化,最终结果以矩状气泡图的形式呈现。

1.2.4 gga-miR-142-3p 靶基因的 PPI 网络

利用在线数据库 STRING,分析 gga-miR-142-3p 靶基因的相互作用关系,并用 Cytoscape_v3.9.0 软件绘制其互作网络图 PPI。

1.2.5 gga-miR-142-3p 的组织表达分析

在 NCBI 的 GEO 数据库中查询并下载数据集 GSE124418,该数据集包含猪、牛、羊、鸡这 4 个物种在心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和胸肌中的非编码 RNA 的高通量测序数据。挑选成熟清远麻鸡子数据集 (GSM3532842-3532859, 200 日龄清远麻鸡) 高通量测序数据,从其中整理 miR-142-3p 在各个组织中的测序读数,并将其进行 TPM (Transcripts per million) 归一化处理,所用公式如下:

$$TPM = T/N \times 10^6$$

T 代表 miRNA count 读数; N 代表样本总 miRNA count 读数。

最后将 TPM 表达数据进行单因素方差分析,导入 GraphPad Prim 9.0 软件进行表达量柱状图的绘制。

1.2.6 gga-miR-142-3p 关键靶基因的筛选

在 GEO 在线数据库中查询数据包 GSE93855,该数据包鸡、猪、牛、绵羊、山羊等不同物种的比较转录组数据,测序的组织包括心脏、肾脏、肝脏、肺脏、胸肌和脾脏。下载鸡 (成熟清远麻鸡: 200 日龄) 的比较转录组数据 (GSE93855-upload-chicken.

txt), 整理成熟清远麻鸡各个组织器官中转录组测序表达值 (已被处理过的 FPKM 表达值), 利用微生信平台的 R 包 Limma 进行转录组差异表达分析,以 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准,筛选脾脏相对于心脏、肝脏、肾脏、胸肌、肺脏表达下调的基因,并取交集,得到脾脏相对各组织下调表达的公共基因集。将脾脏相对各组织下调表达的公共基因集与 gga-miR-142-3p 的靶基因集合再次取交集,初步筛选得到 miR-142-3p 在脾脏中的关键靶基因。上述所有取交集均利用微生信平台的 Veen 模块功能,绘制韦恩图。

1.2.7 关键靶基因的聚类热图及其组织表达谱分析

在 GSM93855-upload-chicken.txt 子数据集中挑选并整理出已筛选关键靶基因的转录组测序表达值,利用微生信平台的聚类热图模块进行热图的绘制;同时将其在各组织中的表达值数据导入 GraphPad Prim 9.0,进行 miR-142-3p 关键靶基因的组织表达谱绘制。

1.3 数据分析

gga-miR-142-3p 和靶基因的组织表达量数据均导入 Excel 进行整理,并使用 SPSS. 24 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。最后将数据导入 GraphPad Prim 9.0 绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 miR-142-3p 在鸡基因组的位置分析

gga-miR-142-3p 位于鸡 19 号染色体上,位于基因 LOC107054776 的 5' UTR 区;前体序列 gga-mir-142 (1034442-1034529) 全长 88 bp,其 5' UTR 和 3' UTR 加工生产 2 个成熟 miRNA,分别为 gga-miR-142-5p (1034495-1034516) 和 gga-miR-142-3p (10344456-1034477),并形成发夹结构 (图 1)。

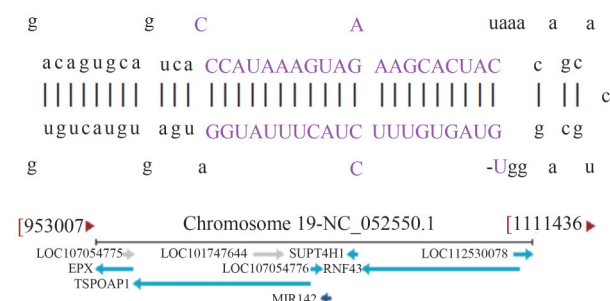


图 1 gga-miR-142-3p 的结构与定位

Fig. 1 Structure and localization of gga-miR-142-3p

2.2 miR-142-3p 的保守性分析

利用在线数据库 miBase 查询到鸡、人、小鼠、野猪、珍珠鸟、马、猩猩、野鸽等 12 个物种的 miR-142-

3p 的序列,发现他们高度保守(表 1),各物种成熟 miR-142-3p 都具有相似的序列和相同的种子区序列(GUAGUGU)。

表 1 各物种 miR-142-3p 的成熟体序列

Table1 Mature sequence of miR-142-3p in each specie

物种 Specie	登录号 Accession	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
鸡 gga-miR-142-3p	MIMAT0001194	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
人 hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
小鼠 mmu-miR-142-3p	MIMAT0000155	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
野猪 ssc-miR-142-3p	MIMAT0020362	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
猕猴 mml-miR-142-3p	MIMAT0006200	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
珍珠鸟 tgu-miR-142-3p	MIMAT0026999	<u>GUAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
变色龙 aca-miR-142-3p	MIMAT0021768	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
家马 eca-miR-142-3p	MIMAT0013023	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
鸭嘴兽 oan-miR-142-3p	MIMAT0006983	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
婆罗洲猩猩 ppy-miR-142-3p	MIMAT0015766	UG <u>UAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA
仓鼠 cgr-miR-142-3p	MIMAT0023771	<u>GUAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGG
野鸽 cli-miR-142-3p	MIMAT0038530	<u>GUAGUGU</u> U ^U CCUACU ^U UAUGGA

注:表格中划线碱基指种子区序列。
Note: The underlined bases in the table refer to the sequence of seed areas.

2.3 gga-miR-142-3p 靶基因预测

利用在线数据库 miRDB 和 Targetscan 分别预测出了鸡 miR-142-3p 的靶基因 165 和 331 个;作出韦恩图取这 2 个数据库预测结果的交集降低其假阳性,共得到 85 个靶基因(图 2)。

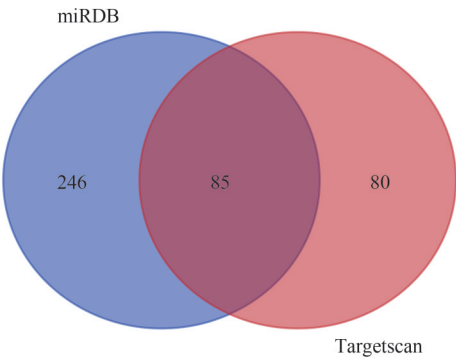


图 2 鸡 miR-142-3p 的靶基因预测

Fig. 2 The predicted target genes of chicken miR-142-3p

2.4 gga-miR-142-3p 靶基因的 GO 富集分析

将结果 2.3 中得到的靶基因交集用来进行 GO 富集分析,分成 BP(生物学过程)、CC(细胞组分)、MF(分子功能)3 个部分,结果表明:在 BP 中,靶基因主要

参与蛋白质、多肽、酰胺、氮化合物等高分子化合物的转运以及基因、细胞大分子化合物表达负调控等生物学过程;在 CC 中,靶基因主要富集在肌动蛋白细胞骨架、膜蛋白复合物、核内体、内质网系统、多泡体、核基质/核骨架等条目;MF 结果表明,靶基因主要具有细胞因子结合、肌动蛋白丝结合、肌动蛋白结合、肌球蛋白结合、乙酰转移酶活性、钙调素结合、双链 DNA 结合、DNA 结合转录激活子活性等分子功能(图 3)。

2.5 gga-miR-142-3p 靶基因的 KEGG 通路富集分析

将结果 2.3 中得到的靶基因交集用来进行 KEGG 通路富集分析,结果表明:gga-miR-142-3p 靶基因主要参与细胞吞吐、MAPK、肌动蛋白细胞骨架调控、病毒生命周期-HIV-1、细胞衰老、血管平滑肌收缩、Wnt、O 型聚糖降解、Apelin、Notch 等信号通路(图 4);各通路富集到的基因信息和基因数目见表 2。

2.6 gga-miR-142-3p 靶基因的 PPI 网络

将 gga-miR-142-3p 预测靶基因交集导入蛋白互作分析网站 STRING,得到靶蛋白的互作网络信息,随后利用 cytoscape 9.0 软件的 cytoHubba 插件筛选出 4 个 Hub 基因,分别为 PLCE1、PLCB1、STAM 和 CASK,并绘制 PPI 互作网络图(图 5)。

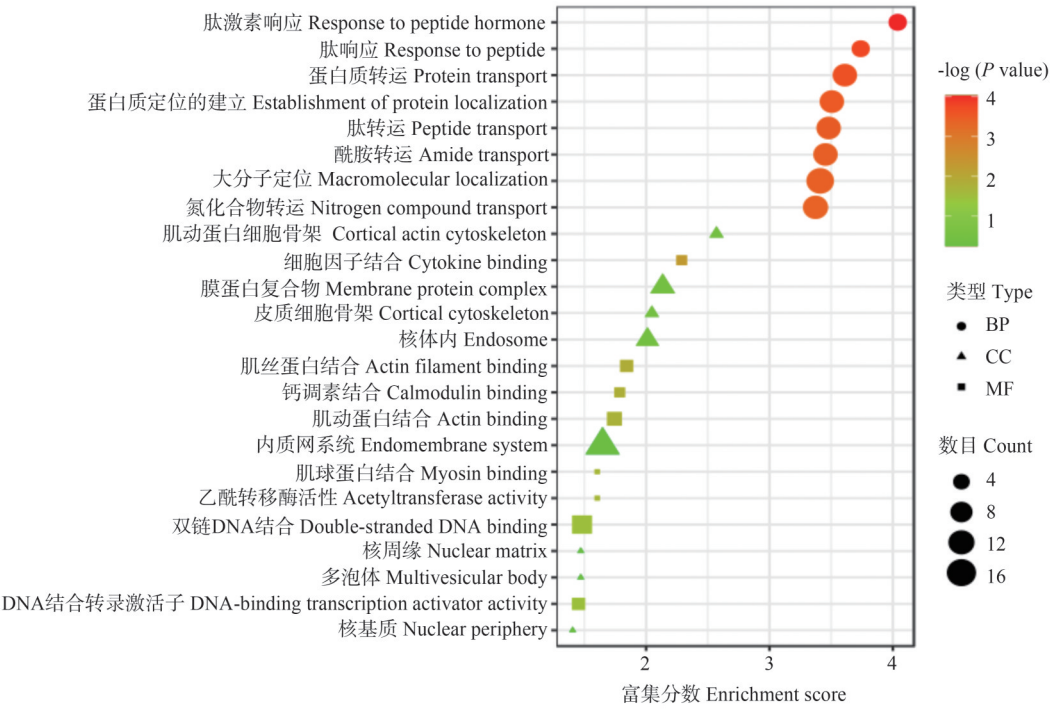


图3 gga-miR-142-3p的靶基因GO富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of chicken miR-142-3p target genes

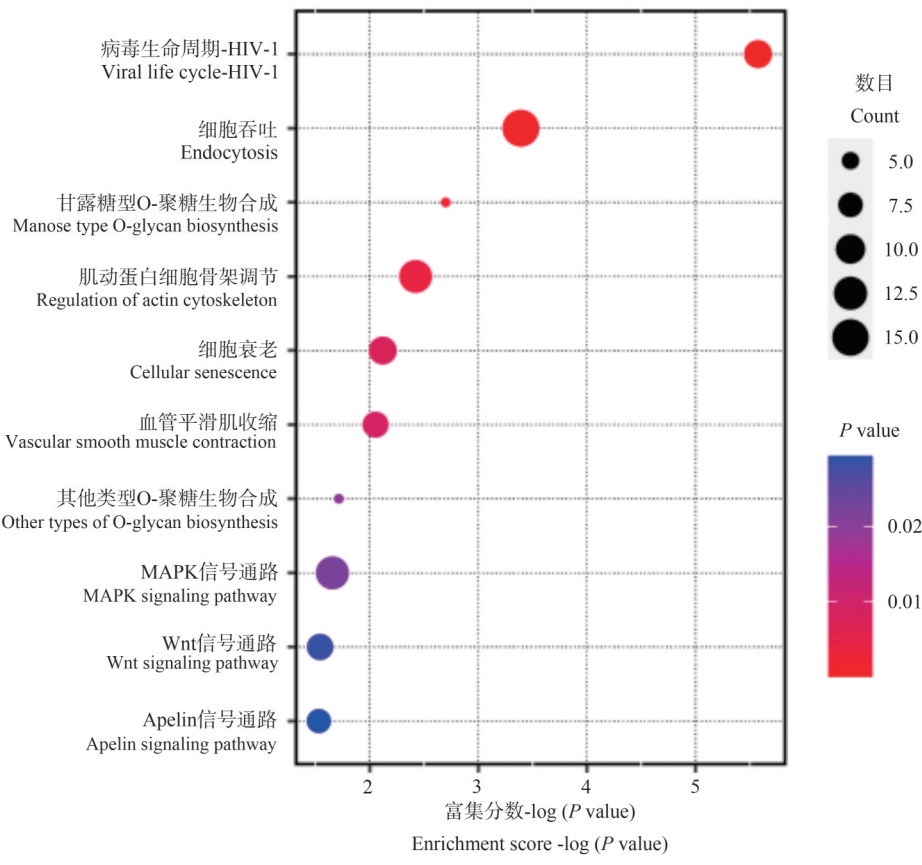


图4 gga-miR-142-3p的靶基因KEGG通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis of target genes of gga-miR-142-3p

表 2 gga-miR-142-3p 靶基因 KEGG 通路富集基因分布统计

Table 2 KEGG pathway enrichment distribution statistics of gga-miR-142-3p target gene

信号通路 Pathway	数目 Count	基因 Gene
细胞吞吐 Endocytosis	15	<i>RAB11FIP4/PDCD6IP/CHMP2B/RAB11FIP1/STAM/EHD4</i>
肌动蛋白细胞骨架调节 Regulation of actin cytoskeleton	12	<i>SNX4/CHMP2A/TGFB1/ASAP2/KIF5B/CLTA/SMURF2/HGS/WASL</i>
MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	12	<i>EZR/BDKRB1/NCKAP1/ABI2/MYH9/ROCK2</i>
病毒生命周期 HIV-1 Viral life cycle - HIV-1	9	<i>MYH10/RAC1/CFL2/GNA12/WASL/ITGA8</i>
细胞衰老 Cellular senescence	9	<i>MAP3K4/TNFRSF1A/RPS6KA6/TGFB1/MEF2C/TAB2</i>
血管平滑肌收缩 Vascular smooth muscle contraction	8	<i>RAC1/TAOK1/TGFB2/GNA12/PPP3CA/PPP3R1</i>
Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	8	<i>CCNT2/PDCD6IP/ELL2/MAP1B</i>
O-聚糖生物合成 O-glycan biosynthesis	8	<i>AFF4/MLLT3/XPO1/KAT2B/HGS</i>
Apelin 信号通路 Apelin signaling pathway	7	<i>TSC2/TGFB1/HIPK1/ZFP36L2/RHEB</i>
Notch 信号通路 Notch signaling pathway	4	<i>TGFB2/PPP3CA/PPP3R1/FOXO1</i>
	8	<i>CALD1/AGTR1/PLCB1/MYH9</i>
	8	<i>ROCK2/GNAQ/MYH10/GNA12</i>
	8	<i>WNT5A/TBL1X/PLCB1/TBL1XR1</i>
	8	<i>ROCK2/RAC1/PPP3CA/PPP3R1</i>
	8	<i>ISPD/ST3GAL3/POMT1/POMGNT1</i>
	8	<i>GALNT15/GALNT11/ST3GAL3/POMT1</i>
	7	<i>MEF2A/AGTR1/PIK3R6/TGFB1/PLCB1/MEF2C/GNAQ</i>
	4	<i>NUMB/JAG2/RBPJ/KAT2B</i>

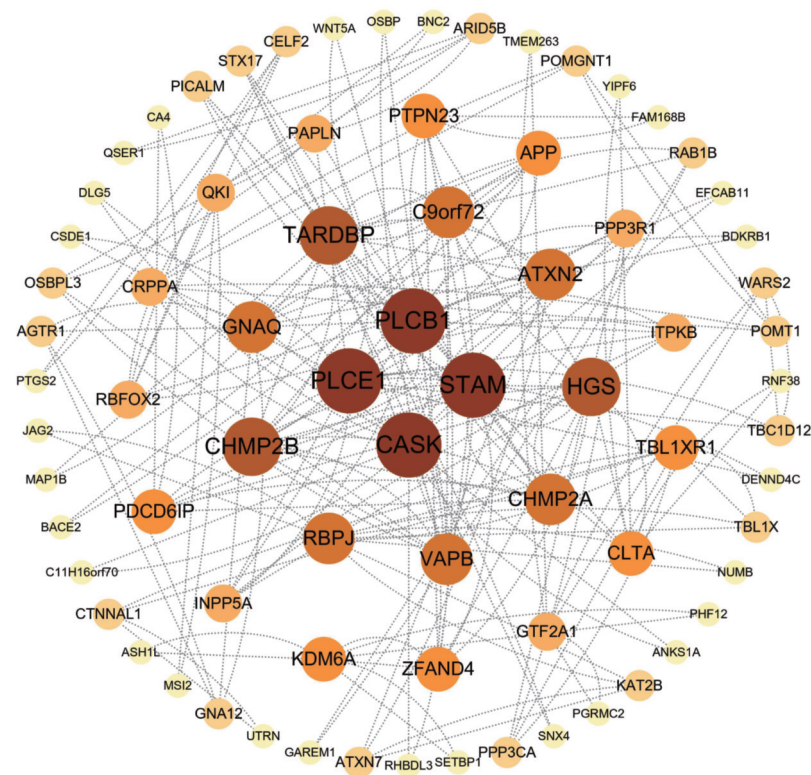


图 5 gga-miR-142-3p 靶基因的 PPI 网络

Fig. 5 PPI network of gga-miR-142-3p target genes

2.7 gga-miR-142-3p在鸡各组织中的表达

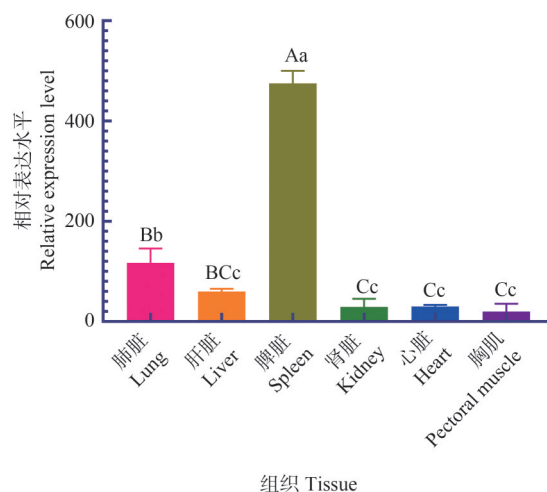
在GEO数据库中下载GSE124418数据包,从中获取并整理清远麻鸡miR-142-3p在各组织中的Row count值,并进行TPM归一化处理,进而分析得到miR-142-3p的组织表达谱,如图6所示,miR-142-3p在脾脏表达量最高,远远高于其在肝脏、心脏、肺脏、肾脏和胸肌中表达量($P<0.01$)。

2.8 脾脏相对各组织的差异下调基因及关键靶基因的筛选

如图7(a)所示,脾脏相对于胸肌、肺脏、肝脏、肾脏、心脏的下调基因数目分别为1 964、1 416、1 880、2 216和1 812,脾脏相对下调的公共基因为74个。将此所得公共基因集再次与miR-142-3p的靶基因取交集,得到5个关键靶基因,分别为*TWF1*、*MYH10*、*NFIB*、*FBNP1L*和*FERMT2*(图7(b))。

2.9 关键靶基因的聚类热图以及组织表达谱

如图8(a)所示,gga-miR-142-3p的5个关键靶基因在各组织中不同样本间重复性好,脾脏与各组织差异显著($P<0.05$)。聚类热图显示,*TWF1*和*FERMT2*首先聚成一束,其次分别与*MYH10*、



数据表示为3份样品的平均值±标准差。不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),相同小写字母表示差异不显著($P>0.05$)。下同。

Data are expressed as the Mean±SD of triplicate samples. Different capital letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$), different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$), and the same lowercase letter indicated that the difference was not significant ($P>0.05$). The same below.

图6 miR-142-3p在清远麻鸡各组织中的表达量分析

Fig. 6 miR-142-3p expression level in various tissues of chickens

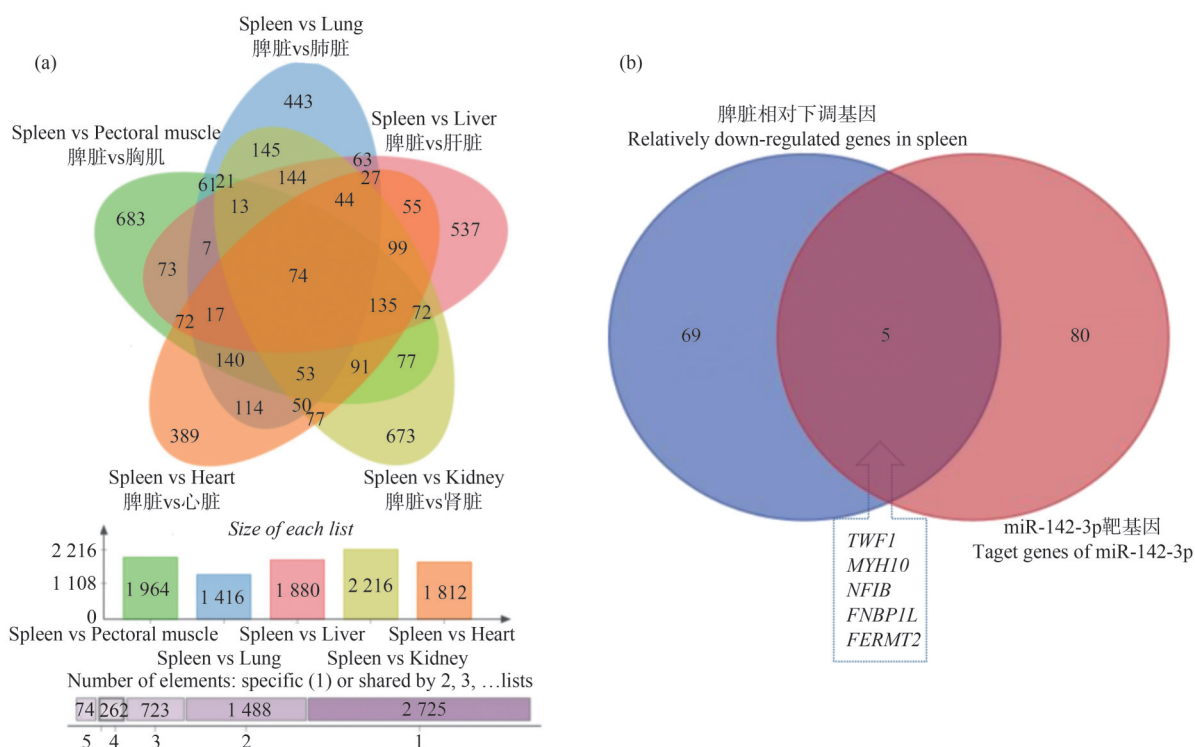


图7 脾脏相对其他组织下调表达基因(a)及关键靶基因筛选 Venn图(b)

Fig. 7 Venn diagram of down-regulated expression genes in spleen relative to other tissues (a) and Venn diagram of miR-142-3p key target genes screening (b)

NFIB、*FBNPIL* 依次聚类成束。关键靶基因在各组织中的表达谱如下图 8(b) 所示, 5 个基因在脾脏、胸肌、肺脏、肝脏、心脏和肾脏都有表达, 且均在脾脏中表达量最低 ($P < 0.05$)。其中 *MYH10* 在肺脏中

表达量最高 ($P < 0.05$), *NFIB* 在心脏和肾脏中表达量最高 ($P < 0.05$), *FBNPIL* 在肾脏中表达量最高, *TWF1* 和 *FERMT2* 在胸肌、肺脏、心脏、肾脏中表达量均较高。

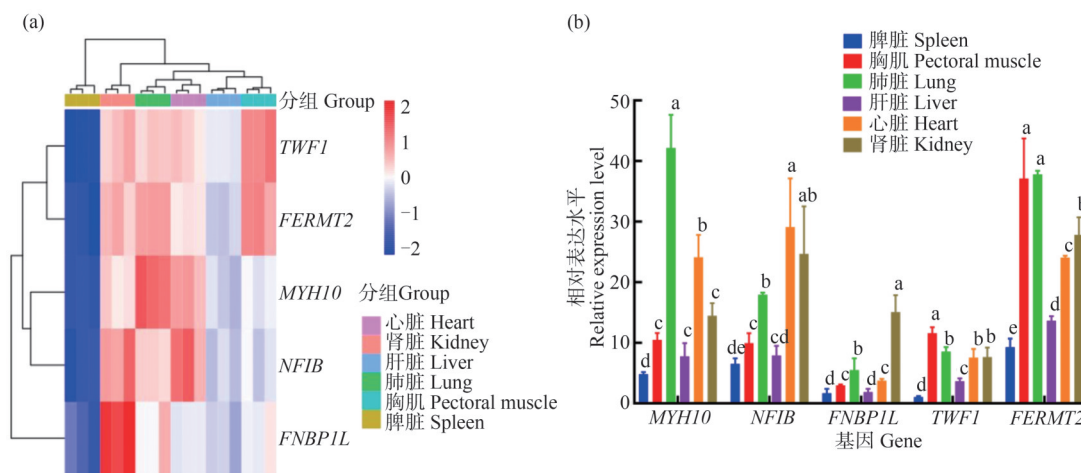


图 8 gga-miR-142-3p 关键靶基因的聚类表达热图 (a) 和组织表达谱 (b)

Fig 8 Cluster expression heat map (a) and tissue expression profile (b) of key target genes of gga-miR-142-3p

3 讨论

真核生物基因表达受到多层次性的调控, 包括染色质水平, 转录水平, 转录后水平, 翻译水平, 翻译后水平^[1]。miRNA 通过种子区序列与靶基因 mRNA 的 3' UTR 的互补配对碱基特异性识别结合, 抑制 mRNA 的转录后翻译, 从而达到抑制基因表达的目的^[2]。本研究比对了鸡、人、小鼠、野猪、珍珠鸟、马、猩猩、野鸽等 12 个物种的 miR-142-3p 序列, 发现它们的序列高度保守, 且种子区序列完全相同, 意味着不同物种的 miR-142-3p 都有相同的靶基因位点, 这与刘芳君等^[9]的研究结论“miRNA 在不同物种中相对保守, 具有相似的功能和调控机制”相吻合。

目前, 有关 miR-142a-3p 的研究主要集中在其对肿瘤发生、发展及预后等方面^[10-17], 而脾脏作为机体的一大免疫器官, 与肿瘤的发生密切相关^[9]。本研究通过组织表达谱分析, 发现鸡 miR-142-3p 在胸肌、心脏、脾脏、肺脏、肾脏和肝脏中均有表达, 这表明它在多个组织的生物学过程中均发挥了调控功能。而在脾脏中的表达量显著高于其他组织, 这符合鸡 miR-142-3p 在脾脏中参与抗肿瘤免疫生物学过程的预期。

识别筛选出 gga-miR-142-3p 的靶基因是探索其功能的关键, 当下预测 miRNA 靶基因的平台较多, 适用不同物种, 包括 miRDB、TargetScan、PicTar、miRanda、microT、miRmapDIANA 等, 为了降低预测靶基因的假阳性, 本研究使用了 miRDB 和 TargetScan 这 2 种在线预测平台, 通过取其交集得到了 85 个靶基因。GO 富集分析显示 gga-miR-142-3p 主要富集在蛋白质、多肽、酰胺等高分子化合物的转运、细胞大分子化合物表达负调控、乙酰转移酶活性、钙调素结合、双链 DNA 结合、DNA 结合转录激活子活性等条目。在 KEGG 分析中富集到包括 MAPK、Notch、Wnt 等多条已被证实与抗肿瘤免疫相关的信号通路。尤婷婷等^[24]研究表明荷瘤小鼠脾脏中 *TLR4* 的过表达会影响下游 MAPK 信号通路的活性, 激发免疫调节抗肿瘤活性并激活巨噬细胞, 从而抑制体内瘤的生长; Notch 通路参与到病毒感染、炎症反应、超敏反应及自身免疫类疾病等免疫相关疾病的发生, 此外它同时具有促癌基因和抑癌基因的作用, 杨子科等^[25]研究发现抑制荷瘤小鼠脾脏中 Notch 通路活性可以降低肿瘤组织中免疫抑制细胞比例并提高免疫效应细胞比例, 从而增强小鼠机体的抗肿瘤免疫功能; Wnt 信号通路能够使 β -catenin 蛋白激活特定的靶基因并且与肿瘤

发生有着更为密切的关系,突变的 β -catenin所导致Wnt信号通路失调使得机体免疫抗肿瘤活性降低,从而诱发机体肿瘤发生和发展^[26]。这些从侧面佐证了miR-142-3p影响鸡的抗肿瘤免疫。而Yang等^[27]研究表明鸡miR-142-3p通过MAPK信号通路负性调节鸡毒支原体(HS菌株)诱导的炎症细胞因子的产生,张兆波等^[21]发现卡介苗刺激小鼠巨噬细胞后,miR-142-3p表达量显著下降,并通过调控免疫相关基因在巨噬细胞抗结核分枝杆菌的免疫应答中发挥着重要的作用,Liu等^[12]研究证实miR-142-3p通过靶向 β -catenin抑制Wnt信号通路的激活抑制结直肠癌的发生,这些研究直接证实了这一点。

本研究根据“miRNA负调控靶基因表达”这一思路,对鸡各组织中的转录组数据进行差异分析,筛选出脾脏相对于各组织差异下调的基因交集,再通过与miR-142-3p靶基因取交集从而得到miR-142-3p在脾脏中的关键靶基因,包括*TWF1*、*MYH10*、*NFIB*、*FBNP1L*和*FERMT2*。推测这些基因可能是gga-miR-142-3p在脾脏中发挥生物学功能的潜在桥梁。

Zhai等^[28]研究发现*TWF1*通过MMP1信号通路调控肺腺癌细胞的增殖、分化和凋亡,和癌症的预后相关;Wang等^[29]也发现*TWF1*通过抑制cAMP信号通路诱导肺腺癌自噬,加速恶性表型。*NFIB*基因在绵羊^[30]和小鼠^[31]的肺脏、肝脏、心脏等多种组织中都能高度表达,但在脾脏中的表达量很低,这与我们的研究结果相似;同时Yang等^[32]研究表明*NFIB*通过上调circMAP7D1来稳定*HER2* mRNA,从而促进胃癌的进展。林洁等^[33]研究表明*FERMT2*通过调控细胞周期调节蛋白及抗凋亡蛋白的表达影响肝癌细胞的活力、细胞周期及凋亡,进而在肝癌形成及发展过程中发挥促癌作用;Lin等^[34]研究也发现miR-338-5p通过靶向*FERMT2*抑制食管鳞癌细胞增殖、集落形成、迁移和顺铂耐药。关于*MYH10*和*FBNP1L*的研究大多集中在它们对肌肉生长发育的调控,但也有研究表明*MYH10*联合*MYH9*通过去泛素化Snail募集*USP45*,促进浆液性卵巢癌的发生、发展和顺铂耐药性^[35];而*FBNP1L*与免疫和肿瘤相关的研究有待进一步探究。

在后面的靶基因表达与热图分析结果中发现

这4个靶基因在鸡的胸肌、肝脏、肾脏、脾脏、心脏和肺脏中都有表达,且均在脾脏中表达量最低,这可能是脾脏中高度表达的miR-142-3p抑制了他们的表达。因此本研究推测miR-142-3p在脾脏中通过靶向*TWF1*、*MYH10*、*NFIB*、*FBNP1L*和*FERMT2*发挥生物学功能,尚需进一步的靶标验证和功能探究。

4 结 论

鸡miR-142-3p在肝脏、心脏、肺脏、胸肌、肾脏和脾脏中均有表达,在脾脏中表达量显著高于其他组织。其在脾脏中可能通过调节靶基因*TWF1*、*MYH10*、*NFIB*、*FBNP1L*和*FERMT2*表达来发挥生物学功能。

参考文献 References

- [1] Lu T X, Rothenberg M E. MicroRNA [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, 141(4): 1202-1207
- [2] Bushati N, Cohen S M. MicroRNA functions [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2007, 23: 175-205
- [3] 黄正洋, 黄华云, 穆春宇, 李春苗, 王钱保, 黎寿丰, 赵振华. MiR-18a-5p在鸡不同生长时期的表达及其生物信息学分析与靶基因预测[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(12): 4361-4371
Huang Z Y, Huang H Y, Mu C Y, Li C M, Wang Q B, Li S F, Zhao Z H. Gene expression of miR-18a-5p at different growth stages and its bioinformatics analysis and target gene prediction in chicken [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 48(12): 4361-4371 (in Chinese)
- [4] 黄正洋, 赵振华, 黄华云, 李春苗, 王钱保, 穆春宇, 黎寿丰. 鸡miR-10b-5p生物信息学及组织表达分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(4): 1262-1270
Huang Z Y, Zhao Z H, Huang H Y, Li C M, Wang Q B, Mu C Y, Li S F. Bioinformatics and gene expression analysis of miR-10b-5p in different tissues of chickens [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(4): 1262-1270 (in Chinese)
- [5] 黄华云. 鸡脂肪沉积相关基因和miRNA筛选及BNP基因的功能鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014
Huang H Y. Screen of the genes and microRNAs related to chicken abdominal fat deposition and the functional verification of brain natriuretic peptide gene [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014 (in Chinese)
- [6] 吴官县. 不同品系鸡Arih2基因及其相关miRNA的克隆、表达与功能鉴定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2020
Wu G X. Cloning, expression and functional identification of Arih2 gene and its related miRNA in different breeds of chicken [D]. Harbin: Harbin Normal University, 2020 (in Chinese)
- [7] 郭其新. MiR-202-5p和miR-301a-5p在鸡精子发生中表达及功能研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019
Guo Q X. Study on the expression of miR-202-5p and miR-301a-5p in chicken spermatogenesis [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2019 (in Chinese)

- Chinese)
- [8] 吴海珍. MiR-26a-5p 在鸡卵泡细胞中的表达、作用及其调控分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018
 - Wu H Z. Expression, function and regulation of miR-26a-5p in chicken follicle cells [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese)
 - [9] 刘芳君, 蓝吴涛, 马悦悦, 李鹏飞, 张磊, 朱芷葳. miRNA-148a-3p 的生物信息学分析及其在小鼠不同组织中的表达水平检测[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(2): 414-422
 - Liu F J, Lan W T, Ma Y Y, Li P F, Zhang L, Zhu Z W. Bioinformatics analysis of miRNA-148a-3p and detection of its expression level in different tissues of mice [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(2): 414-422 (in Chinese)
 - [10] Troschel F M, Böhlly N, Borrmann K, Braun T, Schwickert A, Kiesel L, Eich H T, Götte M, Greve B. miR-142-3p attenuates breast cancer stem cell characteristics and decreases radioresistance in vitro[J]. *Tumor Biology*, 2018, 40(8): 1010428318791887
 - [11] Mansoori B, Duijf P H G, Mohammadi A, Safarzadeh E, Ditzel H J, Gjerstorff M F, Cho W C, Baradaran B. MiR-142-3p targets HMGA2 and suppresses breast cancer malignancy[J]. *Life Sciences*, 2021, 276: 119431
 - [12] Liu P, Cao F A, Sui J K, Hong Y G, Liu Q Z, Gao X H, Gong H F, Hao L Q, Lou Z, Zhang W. MicroRNA-142-3p inhibits tumorigenesis of colorectal cancer via suppressing the activation of Wnt signaling by directly targeting to β -catenin [J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 10: 552944
 - [13] Wang Y, Cao Z D, Wang L L, Liu S Q, Cai J Q. Downregulation of microRNA-142-3p and its tumor suppressor role in gastric cancer[J]. *Oncology Letters*, 2018, 15: 8172-8180
 - [14] Chai S, Tong M, Ng K Y, Kwan P S, Chan Y P, Fung T M, Lee T K, Wong N, Xie D, Yuan Y F, Guan X Y, Ma S. Regulatory role of miR-142-3p on the functional hepatic cancer stem cell marker CD133 [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14): 5725-5735
 - [15] Lv M, Zhang X, Jia H, Li D, Zhang B, Zhang H, Hong M, Jiang T, Jiang Q, Lu J, Huang X, Huang B. An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor- α and cAMP/PKA pathways. *Leukemia*, 2012, 26(4): 769-777
 - [16] Li Y F, Chen D Q, Jin L, Liu J J, Li Y C, Su Z M, Qi Z Y, Shi M, Jiang Z M, Yang S Q, Gui Y T, Mao X M, Wu X H, Lai Y Q. Oncogenic microRNA-142-3p is associated with cellular migration, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma[J]. *Oncology Letters*, 2016, 11(2): 1235-1241
 - [17] Wang F, Wang X S, Yang G H, Zhai P F, Xiao Z, Xia L Y, Chen L R, Wang Y, Wang X Z, Bi L X, Liu N, Yu Y, Gao D, Huang B T, Wang J, Zhou D B, Gong J N, Zhao H L, Bi X H, Yu J, Zhang J W. MiR-29a and miR-142-3p downregulation and diagnostic implication in human acute myeloid leukemia [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(3): 2713-2722
 - [18] Morikane K, Tempero R M, Sivinski C L, Kitajima S, Gendler S J, Hollingsworth M A. Influence of organ site and tumor cell type on MUC1-specific tumor immunity [J]. *International Immunology*, 2001, 13(2): 233-240
 - [19] 李慧铭. MiR-142-3p 对小鼠乳腺发育和泌乳重要功能基因 Prlr 的表达调控[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013
 - Li H M. Regulation of miR-142-3p to gene Prlr expression in mouse mammary gland development and lactation [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese)
 - [20] 张蕊蕊. 猪 ROCK1 和 ROCK2 基因转录调控机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016
 - Zhang R R. Transcriptional regulation analysis of ROCK1 and ROCK2 genes of pig [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016
 - [21] 张兆波, 魏军, 汤建中, 赵志军, 张一琳, 张瑞芹, 徐广贤. BCG 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 miR-203、miR-142-3p、miR-21 表达的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(2): 125-129
 - Zhang Z B, Wei J, Tang J Z, Zhao Z J, Zhang Y L, Zhang R Q, Xu G X. Effect of BCG on expression of miR-203, miR-142-3p and miR-21 in mouse RAW264.7 macrophages [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2013, 29(2): 125-129 (in Chinese)
 - [22] Long K R, Feng S Y, Ma J D, Zhang J W, Jin L, Tang Q Z, Wang X, Mai M M, Xiao W H, Liu L Y, Li X W, Li M Z. Small non-coding RNA transcriptome of four high-altitude vertebrates and their low-altitude relatives. *Scientific Data*, 2019, 6(1): 192
 - [23] Tang Q Z, Gu Y R, Zhou X M, Jin L, Guan J, Liu R, Li J, Long K R, Tian S L, Che T D, Hu S L, Liang Y, Yang X M, Tao X, Zhong Z J, Wang G S, Chen X H, Li D Y, Ma J D, Wang X, Mai M M, Jiang A A, Luo X L, Lv X B, Gladyshev V N, Li X W, Li M Z. Comparative transcriptomics of 5 high-altitude vertebrates and their low-altitude relatives [J]. *GigaScience*, 2017, 6(12): gix105
 - [24] 龙婷婷. 基于 TLR4-MAPK/NF- κ B 信号通路探讨黄精多糖免疫调节抗肿瘤作用机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018
 - Long T T. The study to explore rhizoma polygonati polysaccharide on cancer by immune regulation based on TLR4-MAPK/NF- κ B signaling pathways [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2018 (in Chinese)
 - [25] 杨子科. RNAi 干扰黑色素瘤细胞 Notch1 基因表达对小鼠机体抗肿瘤免疫的影响[D]. 广州: 南方医科大学, 2015
 - Yang Z K. RNAi-mediated knockdown of notch1 enhance immune responses against tumor *in vivo* [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2015 (in Chinese)
 - [26] Mazieres J, He B, You L, Xu Z D, Lee A Y, Mikami I, Reguart N, Rosell R, McCormick F, Jablons D M. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(14): 4717-4720
 - [27] Yang Y P, Wang Y J, Zou M Y, Deng G Z, Peng X L. Gga-miR-142-3p negatively regulates Mycoplasma gallisepticum (HS strain)-induced inflammatory cytokine production via the NF- κ B and MAPK signaling by targeting TAB2 [J]. *Inflammation Research*, 2021, 70(10): 1217-1231
 - [28] Zhai K, Jiang N, Wen J F, Zhang X, Liu T, Long K J, Ke X X, Xu G, Chen C. Overexpression of TWF1 promotes lung adenocarcinoma progression and is associated with poor prognosis in cancer patients through the MMP1 signaling pathway [J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2023, 15(5): 2644-2658
 - [29] Wang Y, Zuo R, Huo G W, Han Z Q, He Y C, Luo Y, Chen L W, Li G T, Cui J F, Zhu F Y, Yue P, Yuan D Q, Sun Y, Li Z Y, Chen P, Guo H. TWF1 induces autophagy and accelerates malignant phenotype in lung adenocarcinoma via inhibiting the cAMP signaling pathway [J]. *The FASEB Journal*, 2023, 37(7): e23051
 - [30] 荣恩光, 于磊, 杨华, 张永胜, 马春萍, 李辉, 王宁. 中国美利奴羊(新疆军垦型)核因子 I/B 基因的克隆及表达[J]. 中国农业科学, 2012, 45(21): 4475-4483
 - Rong E G, Yu L, Yang H, Zhang Y S, Ma C P, Li H, Wang N.

- Characterization of tissue expression and cloning of nuclear factor I/B gene in Chinese merino(Xinjiang Junken Type)[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(21): 4475-4483 (in Chinese)
- [31] Chaudhry A Z, Lyons G E, Gronostajski R M. Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development [J]. *Developmental Dynamics*, 1997, 208(3): 313-325
- [32] Yang H, Wu Z, Liu X, Chen M, Zhang X, Jiang Y. NFIB promotes the progression of gastric cancer by upregulating circMAP7D1 to stabilize HER2 mRNA[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2021, 23(4): 269
- [33] 林洁, 陈小岩, 李洁羽, 王丽萍, 陈惠玉, 林万松. FERMT2在肝癌组织中的表达及其对肝癌细胞生长的调控[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(12): 2157-2164
- Lin J, Chen X Y, Li J Y, Wang L P, Chen H Y, Lin W S. FERMT2 expression in hepatocellular carcinoma and its effect on cell growth [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2017, 33(12): 2157-2164 (in Chinese)
- [34] Lin W C, Chen L H, Hsieh Y C, Yang P W, Lai L C, Chuang E Y, Lee J M, Tsai M H. MiR-338-5p inhibits cell proliferation, colony formation, migration and cisplatin resistance in esophageal squamous cancer cells by targeting FERMT2[J]. *Carcinogenesis*, 2019, 40(7): 883-892
- [35] Liu L Y, Chen C L, Liu P, Li J, Pang Z J, Zhu J Y, Lin Z Q, Zhou H X, Xie Y Y, Lan T C, Chen Z S, Zeng Z Y, Fang W Y. MYH10 combines with MYH9 to recruit USP45 by deubiquitinating snail and promotes serous ovarian cancer carcinogenesis, progression, and cisplatin resistance[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(14): e2203423

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 朱师良,男,四川成都人,硕士研究生,现任职于四川省畜牧科学研究院家禽科学研究所助理研究员。主要研究方向为家禽遗传育种。参与四川农业大学硕士生导师团队项目、四川省重点实验室开放课题项目、国家肉鸡产业技术体系项目(CARS-41-G07)、“十四五”四川省畜禽育种攻关项目(2021YFYZ0031)、四川省区域创新合作项目(2023YFQ0035)等。获发明专利15项、实用新型专利14项。



通讯作者简介: 杨朝武,男,博士,研究员,博士生导师,国家肉鸡产业技术体系岗位科学家,四川省学术和技术带头人。现任四川省畜牧科学研究院党委委员、副院长,兼四川省优质鸡工程技术研究中心主任、中国畜牧兽医学会及家禽学会理事、四川省畜牧兽医学会副理事长。主要从事家禽遗传育种与健康养殖技术研究,先后承担国家科技支撑计划、国家重点研发、国家自然科学基金及四川省重点研发等科技项目20余项,主研育成通过国家审定的畜禽新品种(配套系)2个;制定省级地方标准14项;发表论文200余篇,其中SCI论文100余篇;主编/副主编图书6本;授权国家发明专利22件,软著15件。获国家科技进步二等奖1项、部省级科技一等奖2项、二等奖2项;个人获农业农村部神农青年英才(首批)、四川省天府科技菁英(首批)、四川省青年科技奖(第十三届)、四川省科普工作先进个人等荣誉称号。