中国农业大学学报 2024,29(7):23-33
Journal of China Agricultural University http://zgnydxxb.ijournals.cn

杨苗苗,向海,李瑞瑞,赵振华,王钱保,黄正洋,李春苗,梁忠,吴兆林,黄华云.gga-miR-17-5p在鸡骨骼肌和脂肪沉积相关组织及细胞中的表达差异及其关键靶基因的筛选[J].中国农业大学学报,2024,29(07):23-33.

YANG Miaomiao, XIANG Hai, LI Ruirui, ZHAO Zhenhua, WANG Qianbao, HUANG ZhengYang, LI Chunmiao, LIANG Zhong, WU Zhaolin, HUANG Huayun. Differential expression of gga-miR-17-5p in chicken adipose and skeletal muscle tissues and cells and screening of its key target genes[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(07): 23-33.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.07.03

gga-miR-17-5p在鸡骨骼肌和脂肪沉积相关组织及细胞中的表达差异及其关键靶基因的筛选

杨苗苗[1,2] 向 海[2] 李瑞瑞[1,2] 赵振华[1] 王钱保[1] 黄正洋[1] 李春苗[1]
梁 忠[1] 吴兆林[1] 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 生命科学与工程学院/广东省动物分子设计与精准育种重点实验室,广东 佛山 528225)

摘 要 为探究gga-miR-17-5p在鸡脂肪沉积和肌肉发育中的作用,本研究以矮小品系S3(DW)和隐性白羽鸡(RR)为试验素材,分析gga-miR-17-5p在不同时期腿肌、肝脏、腹脂组织及细胞中的表达差异,并通过KEGG及蛋白互作分析筛选关键靶基因。结果表明:1)gga-miR-17-5p在腹脂、肝脏和腿肌组织中均可表达。在腹脂中,gga-miR-17-5p在0周表达有品种差异($P<0.05$),且2个品种在0周时显著高于其他周龄($P<0.05$);在肝脏中,gga-miR-17-5p在16周有品种差异($P<0.05$),S3系在16周显著高于其他周龄($P<0.05$),隐性白羽肉鸡在16周显著高于0周和8周($P<0.05$);在腿肌中,gga-miR-17-5p在0周有品种差异($P<0.05$),S3系在0周和2周显著于其它周龄($P<0.05$),隐性白羽肉鸡在0周显著高于其他周龄($P<0.05$)。2)在脂肪细胞中,gga-miR-17-5p在肌内脂肪细胞诱导分化6 d后的表达显著高于增殖期和分化1 d($P<0.05$);腹脂细胞分化1 d的表达最低,显著低于增殖期、分化4 d和分化6 d($P<0.05$)。3)在成肌细胞中,gga-miR-17-5p的表达量随分化时间的延长而升高,且分化6 d的表达显著高于增殖期($P<0.05$)。4)KEGG及蛋白互作分析表明,*PTEN*、*MAPK3*、*PIK3R1*、*BECN1*和*PLCB4*是gga-miR-17-5p重要的靶基因。RT-qPCR结果表明,*PTEN*和*PIK3R1*在成肌细胞增殖期的表达显著高于分化期($P<0.05$)。综上,gga-miR-17-5p的表达存在显著的品种和组织差异性,miR-17-5p很可能通过*PTEN*、*MAPK3*、*PIK3R1*、*BECN1*和*PLCB4*来影响肌肉发育和脂肪沉积,其中*PTEN*和*PIK3R1*尤为关键。本研究为深入研究gga-miR-17-5p的功能和机制提供了坚实的理论基础和数据支撑。

关键词 鸡;gga-miR-17-5p;脂肪沉积;肌肉发育

中图分类号 S831 **文章编号** 1007-4333(2024)07-0023-11 **文献标志码** A

Differential expression of gga-miR-17-5p in chicken adipose and skeletal muscle tissues and cells and screening of its key target genes

YANG Miaomiao[1,2], XIANG Hai[2], LI Ruirui[1,2], ZHAO Zhenhua[1], WANG Qianbao[1], HUANG ZhengYang[1], LI Chunmiao[1], LIANG Zhong[1], WU Zhaolin[1], HUANG Huayun[1*]

(1. Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China;
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Molecular Design and Precise Breeding/ School of Life Science and Engineering, FOSHAN University, Foshan 528225, China)

收稿日期:2023-12-15

基金项目:国家重点研发计划"农业生物种质资源挖掘与创新利用"重点专项资助(2021YFD1200803);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-41-Z05);江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS(2021)109;JBGS[2021]029);国家自然科学基金项目(32102538);广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515012014);扬州市现代农业项目(YZ2023054)

第一作者:杨苗苗(ORCID:0009-0001-9275-3207),硕士研究生,E-mail:1079278298@qq.com

通讯作者:黄华云(ORCID:0000-0002-1192-3674),研究员,主要从事家禽遗传育种研究,E-mail:huanghuayun520@163.com

Abstract To investigate the role of gga-miR-17-5p in chicken fat deposition and muscle development, the study used dwarf strain S3 (DW) and recessive white feathered chickens (RR) as test materials to analyze the expression differences of gga-miR-17-5p in bone and adipose tissues and cells at different periods of time , and to screen the key target genes by KEGG and protein interactions analysis. The results showed that: 1) gga-miR-17-5p was expressed in abdominal fat, liver and leg muscle tissues. In abdominal fat, there was a variety difference in the expression of gga-miR-17-5p at 0 week ($P<0.05$), and the two varieties were significantly higher in two breeds at week 0 than other weekly ages ($P<0.05$). In liver, gga-miR-17-5p was expressed with breed differences at week 16 ($P<0.05$), and was significantly higher in S3 line at week 16 than other weekly ages ($P<0.05$), and was significantly higher in cryptic white-feathered broilers at 16 weeks was significantly higher than at 0 and 8 weeks ($P<0.05$). In the leg muscle, there was a breed difference in gga-miR-17-5p at 0 weeks ($P<0.05$), and the S3 line was significantly higher than other weeks at 0 and 2 weeks ($P<0.05$), The recessive white feathered chickens were significantly higher than other weeks of age at 0 weeks ($P<0.05$). 2) In adipocytes, the expression of gga-miR-17-5p in intramuscular adipocytes after 6 days of induction of differentiation was significantly higher than that in the proliferation phase and 1 day of differentiation. ($P<0.05$) The lowest expression was found in abdominal adipocytes at 1 d of differentiation, which was significantly lower than that in the proliferative stage, at 4 d of differentiation, and at 6 d of differentiation ($P<0.05$). 3) In myoblasts, the expression of gga-miR-17-5p was elevated with the prolongation of the time of differentiation, and it was significantly higher in 6 d of differentiation than that in the proliferative stage ($P<0.05$). 4) KEGG and protein interactions analysis showed that *PTEN*, *MAPK3*, *PIK3R1*, *BECN1* and *PLCB4* were important target genes of gga-miR-17-5p. The RT-qPCR results showed that the expression of PTEN and PIK3R1 was significantly higher in the proliferative stage of myoblasts than that in the differentiation stage ($P<0.05$). Taken together, the expression of gga-miR-17-5p exhibits significant species and tissue variability and miR-17-5p is likely to affect muscle development and fat deposition through *PTEN*, *MAPK*3, *PIK3R1*, *BECN1* and *PLCB4*, of which *PTEN* and *PIK3R1* are particularly critical. This study provides a solid theoretical foundation for the in-depth study of gga-miR-17-5p function and mechanism.

Keywords Chicken; gga-miR-17-5p; fat deposition; muscle development

近年来,中国家禽业发展迅速,据国家统计局数据显示,2022年中国禽肉产量2 443万t,增长2.6%,禽蛋产量3 456万t,已连续多年保持家禽饲养量、禽蛋产量世界第一和禽肉产量世界第二的水平[1]。然而,近年来随着人们生活水平的提高,消费者对禽肉的质量和风味要求也越来越高。肌肉是畜禽提供的主要产品,而肌内脂肪是影响肉品质的重要因素,其含量与动物肉产品的风味、嫩度和多汁性密切相关[2]。肌肉发育和脂肪积累是家禽的2个重要经济特征,探索/挖掘影响这两类性状的候选基因/miRNA具有重要的理论和实践意义。

MicroRNAs(miRNAs)是真核生物中的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA,其大小长约20~25个核苷酸,它在脂肪沉积和肌肉发育等众多生理过程中均发挥着重要作用。在猪上,circSETBP1通过调节miR-3-3p/CRTCs轴来控制猪肌内(IM)前脂肪细胞的增殖和分化[3];Myomaker在猪成肌细胞融合和骨骼肌再生过程中发挥作用,而miR-205通过靶向调控Myomaker的表达来抑制成肌细胞融合[4]。在牛上,miR-195通过靶向甲状腺激素反应蛋白(THRSP)的3′非翻译末端区域降低其表达,表明miR-195可能通过调节*THRSP*抑制脂肪细胞中的脂质积累[5];miR-183/96/182簇通过抑制*FoxO1*的表达,在牛成肌细胞的增殖和分化中起到正调节作用[6]。在绵羊上,oar-miR-432通过*DDI1*的过表达抑制绵羊前脂肪细胞的分化[7];miR-192通过下调*RB1*影响绵羊卫星细胞(SC)的增殖和肌源性分化[8]。在鸡上,gga-miR-140-5p通过靶向视黄醇X受体γ促进了肌肉内脂肪细胞的分化[9];miR-21-5p通过靶向*KLF3*促进骨骼肌卫星细胞(SMSC)的增殖和分化[10];miR-15a可以通过靶向*ACAA1*、*ACOX1*和*SCP2*来减少脂肪酸氧化,从而间接促进鸡肌内前脂肪细胞的分化[11]。miR-214和TRMT61A通过在CPM诱导的

不同分化时间点的表达模式，表明miR-214抑制了鸡原代成肌细胞（CPMs）的增殖，促进了鸡原代成肌细胞（CPMs）的分化[12]。miR-17家族，亦可称为miR-106b家族，是由6个序列相似，结构相仿，物种间高度保守的成熟体miRNA组成，其成员包括miR-17-5p、miR-20a、miR-106b、miR-93、miR-106a和miR-20b。研究表明，miR-148a与miR-17-5p协同作用，通过抑制山羊乳腺上皮细胞（GMEC）中的PPARGC1A和*PPARA*来调节脂肪酸代谢[13]。miR-20a-5p、miR-20b-5p和E2F1通过E2F1和miR-20a-5p/20b-5p之间的自动调节参与成肌细胞的增殖和分化[14]。miR-106b是卫星细胞静止的重要调节剂，miR-106b可能是开发促进肌肉再生的治疗策略的新靶点，从而提高受损营养不良肌肉的再生能力[15]。miR-93是脂肪生成的负调节因子，也是肥胖和代谢综合征的潜在治疗选择[16]。miR-106a通过靶向*p21*和*BAMBI*促进猪前脂肪细胞增殖和分化[17]。

miR-17-5p在家禽肌肉发育和脂肪沉积研究中未见报道，因此，本研究拟通过研究gga-miR-17-5p在性连锁矮小品系S3系和隐性白羽鸡脂肪、肝脏、肌肉组织、脂肪细胞和成肌细胞中的表达变化，初步阐明gga-miR-17-5p在鸡脂肪沉积和肌肉发育中的调控作用，进一步通过生物信息学分析筛选出gga-miR-17-5p作用的关键靶基因，为深入研究gga-miR-17-5p在脂肪沉积和骨骼肌发育过程中的作用及机制提供理论和数据支撑。

1　材料与方法

1.1　试验动物

以江苏省家禽科学研究所培育的S3系（性连锁矮小品系，具有黄羽、矮小、肉质佳等特点）和隐性白羽肉鸡（RR）为研究对象，分别在0、2、8、14和16周龄时解剖取其腿肌、腹脂和肝脏组织，每个周龄取6只鸡的组织样，然后将其放入液氮中迅速冷冻，并保存在－80 ℃，以便后续提取总RNA。

1.2　细胞的提取和培养

1.2.1　肌内脂肪细胞和腹脂脂肪细胞的提取和培养

选取7～14日龄的雏鸡用于提取腹脂脂肪和肌内脂肪细胞。胸大肌中肌内脂肪细胞、腹脂脂肪细胞提取和培养参照文献[18]进行。

1.2.2　成肌细胞的提取和培养

将孵化13 d的胚蛋，用酒精喷洒后用镊子敲碎气室，取出鸡胚后剪下胸肌组织。然后使用D-HANKS清洗胸肌组织2～3次，将清洗好的组织剔除筋膜和软骨，充分剪碎后转移到15 mL离心管中。加入D-HANKS至10 mL体积后静置3～5 min，去除上清液并留下沉淀，然后加入2～3倍的Ⅰ型胶原酶，在37 ℃ CO_2培养箱中消化15 min。每隔3 min取出离心管充分摇晃，消化结束后加入完全培养基终止消化。然后将内容物按顺序导入100目、400目和600目过滤筛中进行过滤，收集滤液到15 mL离心管中。以1 000 g的速度离心10 min，去除上清液留下沉淀，加入15 mL完全培养基后混匀，倒入10 cm培养皿中。将培养皿放入37 ℃含5%CO_2培养箱中进行培养。采用差速贴壁法对细胞进行纯化，将培养40 min后的细胞取出上清液至新的培养皿中，继续培养。重复上述步骤2～3次。24 h后进行换液，用PBS清洗2次，换入新的完全培养基，得到原代的成肌细胞。待细胞融合至70%后，进行传代铺板。

1.2.3　诱导分化

肌内脂肪细胞和腹脂脂肪细胞融合至70%左右，用0.1%油酸诱导其分化，诱导分化当天定义为分化0 d，未加油酸组定义为增殖期细胞；成肌细胞融合至70%左右，用2%的马血清诱导其分化，全培养基组定义为增殖期细胞，诱导分化当天定义为分化0 d。

1.3　总RNA提取和miRNA反转录

总RNA提取参照RNAsimple Total RNA Kit说明书进行。RNA浓度和纯度采用紫外分光光度计检测，OD_{260}/OD_{280}在1.8～2.1，RNA样本保存在－80 ℃。cDNA反转录根据Fast Kingg DNA Dispelling RT Super Mix试剂盒说明书进行，反应程序为42 ℃（15 min），95 ℃（3 min），－20 ℃保存备用。

1.4　荧光实时定量PCR

根据miRcute Plus miRNA qPCR（SYBR Green）试剂盒的说明，进行实时荧光定量PCR（Real-timefluorescentquantitativePCR，RT-qPCR）。试验采用20 μL体系，其中包括2×Super Real PreMix Plus 10 μL、正向引物0.6 μL、反向引物0.6 μL、ddH_2O 7.3 μL和cDNA 1.5 μL。反应程序为：95 ℃预变性15 min，然后40个循环（95 ℃：10 s；60 ℃：25 s）。

1.5 靶基因的预测及功能富集分析

利用Targetscan数据库(https://www.targetscan.org/vert_80/)和miRDB数据库(https://mirdb.org/)分别预测miR-17-5p的靶基因,并对这2个在线软件的结果进行了交叉验证以排除假阳性。随后,利用DAVID(https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp)对靶基因进行了GO功能分析;利用KOBAS3.0在线数据平台(http://kobas.cbi.pku.edu.cn/)对靶基因进行了KEGG通路分析,然后应用微生信(https://www.bioinformatics.com.cn/)对结果进行了可视化处理。

1.6 蛋白相互作用分析

本研究利用STRING数据库(https://cn.string-db.org/)进行靶基因编码蛋白之间的相互作用分析,设定了最低作用分数为0.4。随后,利用cytoscape软件生成了蛋白相互作用的PPI图。为了筛选出稳定的蛋白互作网络图中的关键基因,使用了cytoscape插件中的degree算法。

1.7 统计分析

基因表达量数据均使用Excel整理完成,所有数据以平均值±标准误表示,并应用SPSS软件进行单因素方差分析和多重比较(Duncan法),定义$P>0.05$表示差异不显著,$P<0.05$表示差异显著。

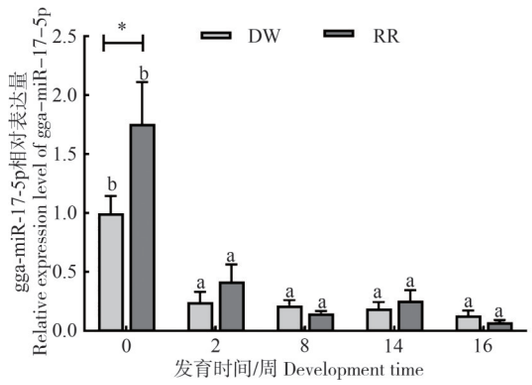
2 结果与分析

2.1 gga-miR-17-5p在腹脂组织中的表达情况

通过对腹脂组织的表达量进行分析,研究发现gga-miR-17-5p的表达具有明显的品种特异性。在0周腹脂组织中,gga-miR-17-5p在RR品种的表达水平显著高于DW($P<0.05$)。与其他周龄组相比,2个品种中0周时的gga-miR-17-5p表达水平显著较高($P<0.05$)。在DW品种中,随着发育周龄的增长,gga-miR-17-5p的表达量逐渐减少;而在RR品种中,gga-miR-17-5p的表达量在0~8周期间下降,在14周时上升,然后在14~16周期间再次下降(图1)。

2.2 gga-miR-17-5p在肝脏组织的中表达

通过对肝脏组织的表达量进行分析,研究发现gga-miR-17-5p的表达受到品种的影响。在16周肝脏组织中,相对于RR品种,gga-miR-17-5p的表达水平显著较高($P<0.05$)。与其他周龄组相比,2个品种中16周时的gga-miR-17-5p表达水平均高于其它周龄($P<0.05$)。在2个品种中,gga-miR-17-5p的表达量在0~2周期间呈上升趋势,随后在8周时下降,然后在8和16周再次上升(图2)。



同一品种在不同时期的表达差异不显著可以用相同的字母来进行表示($P>0.05$),同一品种在不同时期的表达差异显著可以用不同的字母来进行表示($P<0.05$);不同品种在同一发育时期的差异显著使用*来表示($P<0.05$);下同。

Non-significant differences in the expression of the same variety at different periods can be indicated by the same letter ($P>0.05$), and significant differences in the expression of the same variety at different periods can be indicated by different letters ($P<0.05$); Significant differences in the expression of different varieties at the same developmental period are indicated using * ($P<0.05$). The same below.

图1 gga-miR-17-5p在腹脂组织中的表达

Fig. 1 Expression of gga-miR-17-5p in ventral fat tissue

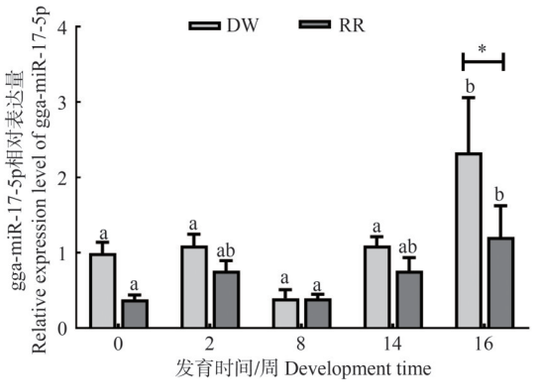


图2 gga-miR-17-5p在肝脏组织中的表达

Fig. 2 Expression of gga-miR-17-5p in liver tissue

2.3 gga-miR-17-5p在腿肌组织中的表达

研究发现腿肌组织中gga-miR-17-5p的表达受到品种的影响。在0周腿肌组织中,与RR品种相比,gga-miR-17-5p的表达水平显著较高($P<0.05$)。在2个品种中,与其他周龄组相比,0周时的gga-miR-17-5p表达水平显著较高($P<0.05$)。在

DW 品种中，随着年龄的增长，gga-miR-17-5p 的表达量逐渐减少；而在 RR 品种中，0～8 周期间 gga-miR-17-5p 的表达量下降，在 14 周时上升，然后在 14～16 周期间再次下降（图 3）。

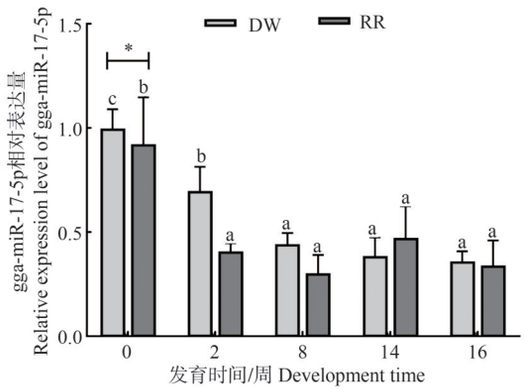


图 3　gga-miR-17-5p 在腿肌组织中的表达

Fig. 3　Expression of gga-miR-17-5p in leg muscle tissue

2.4　gga-miR-17-5p 在细胞中的表达

2.4.1　gga-miR-17-5p 在肌内脂肪细胞中的表达

利用 RT-qPCR 技术检测 gga-miR-17-5p 在肌内脂肪细胞增殖期和分化期的表达，根据图 4 的结果显示，肌内细胞中，在诱导分化 1 d 后，gga-miR-17-5p 的表达量有短暂地下降，在分化 4 d 后上升，并在分化 6 d 达到最高水平，且分化 6 d 的表达量显著高于增殖期和分化 1 d（$P<0.05$）。

2.4.2　gga-miR-17-5p 在腹脂脂肪细胞中的表达

在腹脂脂肪细胞中，gga-miR-17-5p 在诱导分化 1 d 后表达显著下降（$P<0.05$），在分化 4 d 显著上升（$P<0.05$），而在分化 6 d 又下降（图 5）。

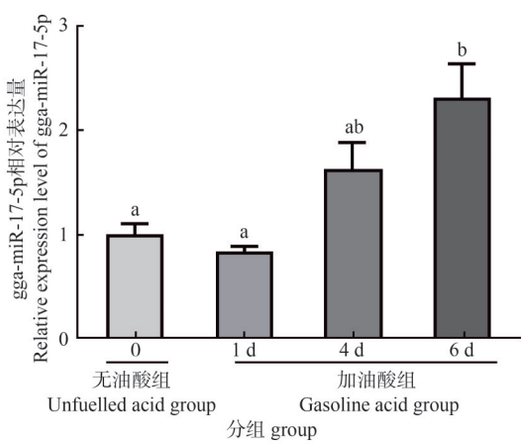


图 4　gga-miR-17-5p 在鸡肌内脂肪细胞中的表达

Fig. 4　Expression of chicken gga-miR-17-5p in intramuscular adipocytes

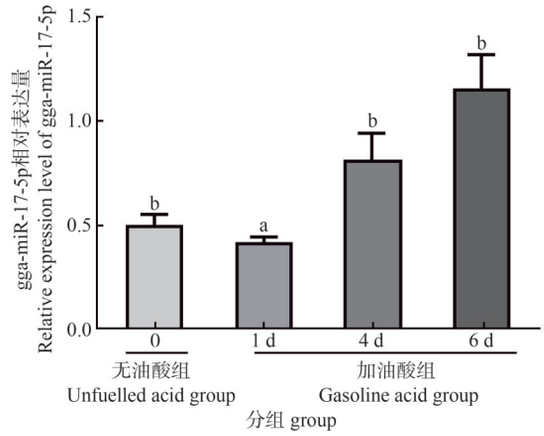


图 5　gga-miR-17-5p 在鸡腹脂脂肪细胞中的表达

Fig. 5　The expression of chicken gga-miR-17-5p in abdominal fat cells

2.4.3　gga-miR-17-5p 在成肌细胞中的表达

在成肌细胞中，gga-miR-17-5p 的表达量在增殖期最低，并随着分化时间的延长逐渐升高，在分化第 7 天达最高，且分化 5 d 的表达量显著高于增殖期、分化 1 和 3 d（$P<0.05$），显著低于分化 7 d（$P<0.05$）；分化 7 d 的表达量显著高于其他增殖期及分化 1、3 和 5 d 的表达量（$P<0.05$）（图 6）。

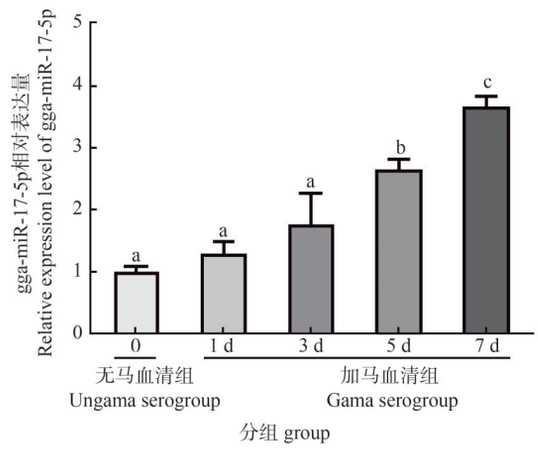


图 6　gga-miR-17-5p 在鸡成肌细胞中的表达

Fig. 6　The expression of chicken gga-miR-17-5p in myoblast

2.5　gga-miR-17-5p 的保守性分析

通过比较鸡、人和其他物种的 gga-miR-17-5p 序列发现，gga-miR-17-5p 在进化过程中相对保守，成熟体的序列基本相同（表 1）。

表1 不同物种的miR-17-5p序列

Table 1 miR-17-5p sequences of different species

物种 Species	登录号 Accession number	序列 Sequence
鸡 *Gallus gallus*	MIMAT0001114	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU
人 *Homo sapiens*	MIMAT0000070	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
山羊 *Capra hircus*	MIMAT0035998	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU
小鼠 *Mus musculus*	MIMAT0000649	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
大鼠 *Rattus norvegicus*	MIMAT0000786	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
家兔 *Oryctolagus cuniculus*	MIMAT0048109	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
野猪 *Sus scrofa*	MIMAT0007755	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG

2.6 gga-miR-17-5p靶基因预测及功能分析

Targetscan数据库预测了598个gga-miR-17-5的靶基因，miRDB数据库预测了1 077个的gga-miR-17-5p靶基因。为减少假阳性，取两者的交集，共得到379个交集靶基因（图7）。

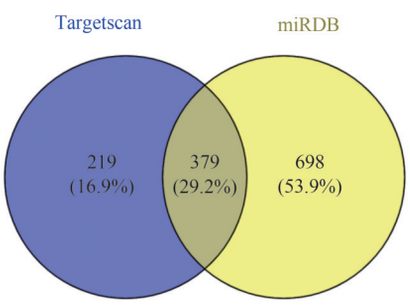


图7 不同在线软件预测的gga-miR-17-5p靶基因Venn图

Fig. 7 Venn diagram of gga-miR-17-5p target genes predicted by different online software

利用David数据库对gga-miR-17-5p靶基因进行了GO富集分析。在生物过程（BPs）方面，靶基因主要参与调控生物合成和代谢等相关条目，如细胞大小的正向调节和泛素依赖蛋白分解代谢等过程。在细胞组分（CCs）方面，靶基因在核、细胞内解剖结构和细胞内细胞器等方面显著富集。在分子功能（MFs）方面，靶基因最丰富的富集术语是结合，包括蛋白质结合和序列特异性DNA结合等（图8）。

对靶基因进行KEGG通路富集（表2），极显著富集包括20条通路。其中与肌肉发育、脂肪沉积和细胞周期等密切相关的通路被富集到，如细胞衰老、胰岛素信号通路、肌动蛋白细胞骨架调节、ErbB信号通路、mTOR信号通路、磷脂酰肌醇信号系统和FoxO等信号通路。

2.7 gga-miR-17-5p靶基因的蛋白相互作用

为进一步筛选到gga-miR-17-5p关键靶基因，将富集到KEGG的靶基因，提交到STRING数据库，分析靶基因编码蛋白质的相互作用，构建蛋白互作图。从图9可以看出，*PTEN*、*MAPK3*和*PIK3R1*等基因在整个蛋白互作中起关键的作用，*PTEN*不但在靶基因的蛋白互作中起核心的作用，且在KEGG富集的6条通路中都富集到了该基因。结合相关文献报道，*PTEN*和*PIK3R1*可能是gga-miR-17-5p发挥作用的关键靶基因。

2.8 *PIK3R1*和*PTEN*在成肌细胞中的表达分析

利用RT-qPCR技术对*PIK3R1*和*PTEN*基因在成肌细胞上的表达进行分析，*PIK3R1*在成肌细胞的表达量随分化时间呈下降趋势，且增殖期显著高于其他分化期（$P<0.05$）；分化1 d显著高于分化3、5和7 d（$P<0.05$）；分化3 d显著高于分化5和7 d（$P<0.05$）（图10(a)）。而*PTEN*在成肌细胞的表达量也是随分化时间一直下降，其中，增殖期显著高于分化的其他时期（$P<0.05$）（图10(b)）。

3 讨论与分析

S3系鸡是江苏省家禽科学研究所经导入性连锁矮小基因，并经15个世代的持续选育而成的性连矮小品系（SLD）。性连锁矮小鸡与正常鸡相比体

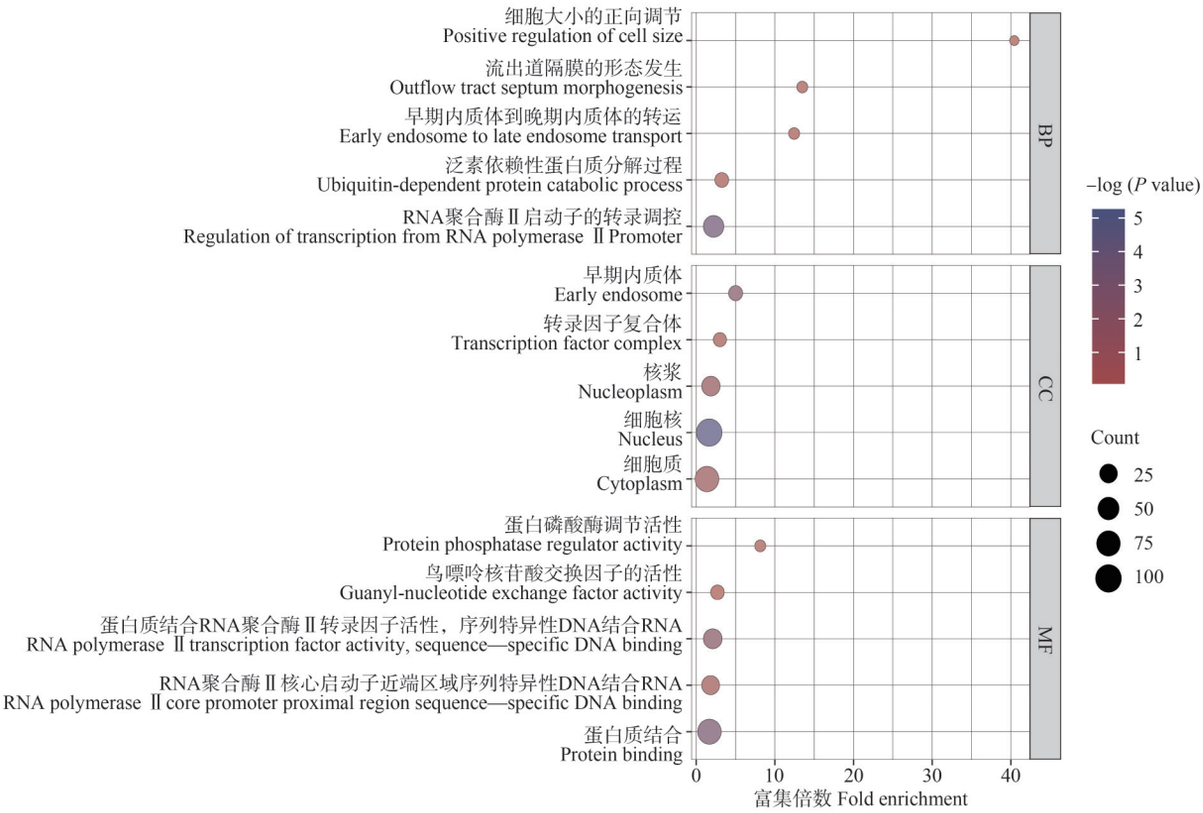


图 8　gga-miR-17-5p 靶基因基因 GO 富集气泡图

Fig. 8　GO-enriched bubble map of gga-miR-17-5p target gene genes

重降低了 40% 左右，胸大肌的重量降低了约 40.6%[19-20]，SLD 鸡是公认地研究肌肉发育和脂肪沉积的一个理想模型。隐性白羽肉鸡生长速度快，与 S3 系鸡在体重、胸肌率和腿肌率等都具有显著差异。因此，本研究以 S3 系鸡和隐性白羽鸡为试验素材，探讨 miR-17-5p 在脂肪沉积和肌肉发育的作用，在试验素材选择上是具有代表性的。

本研究发现，miR-17-5p 在 2 个鸡种不同发育阶段的肝脏、腹部脂肪和腿部肌肉组织中均有表达，进一步地研究表明，miR-17-5p 在不同组织类型和不同发育阶段的表达存在显著差异。在肝脏组织中，miR-17-5p 在 16 周时表现出显著的品种差异性，S3 品系的表达量明显高于隐性白羽鸡。在腹部脂肪和腿部肌肉组织中，miR-17-5p 的表达在 0 周的 2 个鸡种之间也存在显著差异，S3 品系在腹部脂肪组织中的表达明显低于隐性白羽鸡，而腿部肌肉相反，本结果提示 miR-17-5p 在鸡的脂肪沉积或肌肉发育的不同时期发挥了的作用有所不同，且在不同品种中的贡献有差异。miR-17-5p 在肌内脂肪细胞分化 6 d 的表达显著高于增殖期，提示 miR-17-5p 可能促进鸡肌内脂肪细胞脂滴生成，本结果与前期报道的肌内前脂肪细胞中 miR-17-5p 的过表达抑制了 NCOA3 的表达，降低了猪前脂肪细胞的分化呈相反趋势[21]，miR-17-5p 对鸡脂肪生成是抑制还是促进作用，本研究后期利用基因功能验证方法将进一步验证；成肌细胞中 gga-miR-17-5p 的表达随着分化时间的延长而增加，提示 gga-miR-17-5p 也可能在促进成肌细胞分化方面发挥作用。

本研究通过 TargetScan 和 miRDB 在线软件预测 gga-miR-17-5p 的靶基并对 2 个软件得到的靶基因进行交集分析，得到了 379 个交集靶基因，进一步对交集靶基因进行 GO、KEGG 及蛋白互作分析发现，*PTEN*、*MAPK3*、*PIK3R1*、*BECN1* 和 *PLCB*4 可能是 gga-miR-17-5p 发挥作用的重要靶基因。结合相关文献报告，MiR-26b 在啮齿动物模型、人类肥胖受试者和胰岛素抵抗性脂肪细胞中通过抑制其靶基因 *PTEN* 来调节胰岛素刺激的 AKT 激活，并通过 PTEN/PI3K/AKT 通路显著增加胰岛素敏感

表2 预测靶基因极显著富集的通路及基因

Table 2 Pathways predicted to be highly significantly enriched in target genes

通路 Pathway	*P* value	富集基因 Enriched genes
自噬-动物 Autophagy - animal	0.000	*RRAGD*、*BECN1*、*RAB33B*、*ATG16L1*、*AKT3*、*PTEN*、*MAPK1*、*ATG7*、*PIK3R1*、*RB1CC1*、*MTMR3*
MAPK信号通路 MAPK signaling pathway	0.000	*NFATC1*、*RPS6KA2*、*RASGRF2*、*PPP3R1*、*TGFBR2*、*MAP3K2*、*RPS6KA6*、*MAP3K5*、*MKNK2*、*AKT3*、*SOS1*、*RAPGEF2*、*MAPK1*、*RASA1*、*RASA2*、*RPS6KA5*
细胞衰老 Cellular senescence	0.000	*NFATC1*、*E2F5*、*FBXW11*、*PPP3R1*、*TGFBR2*、*CCND2*、*PTEN*、*AKT3*、*PIK3R1*、*MAPK1*
孕酮介导的卵母细胞成熟 Progesterone-mediated oocyte maturation	0.000	*RPS6KA2*、*RPS6KA6*、*ADCY2*、*PDE3B*、*AKT3*、*MAPK1*、*PIK3R1*
TGF-beta信号通路 TGF-beta signaling pathway	0.001	*TGFBR2*、*E2F5*、*SMAD6*、*ZFYVE9*、*MAPK1*、*BMPR2*、*RGMB*
糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0.001	*NFATC1*、*PLCB4*、*PIK3R1*、*TGFBR2*、*AKT3*、*COL4A1*、*MAPK1*
胰岛素信号通路 Insulin signaling pathway	0.001	*SHC4*、*PPP1R3B*、*SOS1*、*MKNK2*、*PDE3B*、*AKT3*、*PIK3R1*、*MAPK1*
病灶粘附 Focal adhesion	0.001	*SHC4*、*PIK3R1*、*SOS1*、*ITGB8*、*CCND2*、*ROCK2*、*AKT3*、*PTEN*、*MAPK1*、*COL4A1*
肌动蛋白细胞骨架调节 Regulation of actin cytoskeleton	0.001	*WASF1*、*SOS1*、*ITGB8*、*CHRM2*、*ROCK2*、*TIAM1*、*MAPK1*、*CFL2*、*PIK3R1*、*SSH1*
ErbB信号通路 ErbB signaling pathway	0.002	*SHC4*、*SOS1*、*GAB1*、*AKT3*、*MAPK1*、*PIK3R1*
mTOR信号通路 mTOR signaling pathway	0.002	*RRAGD*、*RPS6KA2*、*RPS6KA6*、*SOS1*、*AKT3*、*PTEN*、*MAPK1*、*PIK3R1*
Wnt信号通路 Wnt signaling pathway	0.002	*NFATC1*、*FBXW11*、*PLCB4*、*PPP3R1*、*CCND2*、*ROCK2*、*VANGL1*、*TBL1X*
间隙连接 Gap junction	0.003	*PLCB4*、*ADCY2*、*SOS1*、*MAP3K2*、*DRD1*、*MAPK1*
凋亡素信号途径 Apelin signaling pathway	0.004	*PLCB4*、*ADCY2*、*PDE3B*、*AKT3*、*MAPK1*、*BECN1*、*JAG1*
磷脂酰肌醇信号系统 Phosphatidylinositol signaling system	0.004	*PLCB4*、*CDS1*、*PTEN*、*DGKH*、*PIK3R1*、*MTMR3*
FoxO信号途径 FoxO signaling pathway	0.004	*TGFBR2*、*SOS1*、*CCND2*、*AKT3*、*PTEN*、*MAPK1*、*PIK3R1*
内吞 Endocytosis	0.004	*TSG101*、*TGFBR2*、*RAB11FIP4*、*RAB5B*、*AP2B1*、*NEDD4L*、*RAB22A*、*ZFYVE9*、*IQSEC1*、*LDLRAP1*
刺猬信号通路 Hedgehog signaling pathway	0.005	*CSNK1G1*、*FBXW11*、*SPOPL*、*CCND2*
心肌细胞中的肾上腺素能信号传导 Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.005	*PLCB4*、*RPS6KA5*、*ADCY2*、*PPP2R2A*、*CREB1*、*AKT3*、*MAPK1*
卵母细胞减数分裂 Oocyte meiosis	0.006	*RPS6KA2*、*FBXW11*、*PPP3R1*、*RPS6KA6*、*MAPK1*、*ADCY2*

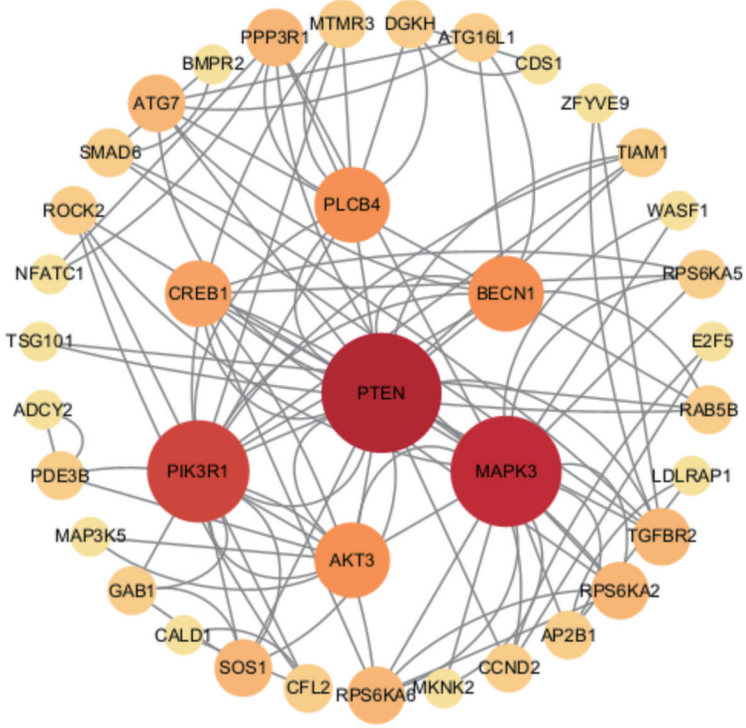


图 9　gga-miR-17-5p 的靶基因互作图

Fig. 9　Interaction map of target genes of gga-miR-17-5p

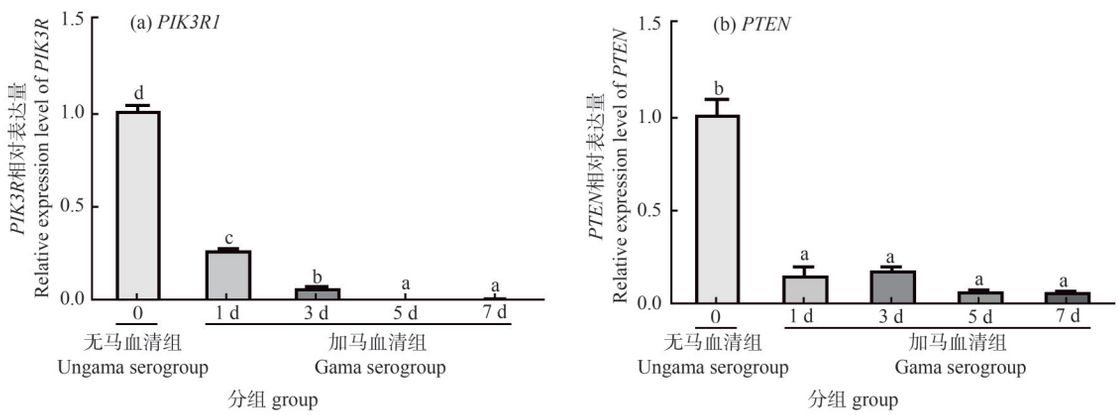


图 10　*PIK3R1*(a)和 *PTEN*(b)在鸡成肌细胞中的表达

Fig. 10　Expression of *PIK3R1* and *PTEN* in chicken myoblasts

性[22]。肌肉中 *PTEN* 基因的差异表达在调节骨骼肌衰老和寿命中起着重要作用，并且由于它决定了肌肉 Pten/Akt 通路和 Pten/Sirt1/PGC-1α 通路的活性，因此也影响了衰老骨骼肌对体育锻炼的适应性[23]。miR-17-5p 降低并通过靶向 *PTEN* 抑制甲状腺癌的增殖、自噬和促进细胞凋亡[24]。本研究利用 RT-qPCR 检测了 *PTEN* 在成肌细胞中的表达，结果发现 *PTEN* 在增殖期的表达显著高于分化期，并呈现出随着分化时间的延长逐渐下降的趋势，而 miR-17-5p 在成肌细胞中的表达表现为随着分化时间的延长逐渐升高，miR-17-5p 和预测靶基因 *PTEN* 的表达呈相反趋势，符合 miRNA 和其靶基因的作用规律。结合文献和本研究结果提示 *PTEN* 可能是 miR-17-5p 的靶基因。miR-F4-C12 通过靶向 *PIK3R1* 调节猪的皮下脂肪组织的积累[25]；上调 *PIK3R1* 可增强成骨细胞的分化，相反，*PIK3R1* 的下调降低了成骨细胞相关基因的水平，增加了破骨细胞相关基因水平[26]。本研究结果表明 *PIK3R1* 在成肌

细胞增殖期的表达显著高于分化期，也呈现出随着分化时间的延长逐渐下降的趋势，与miR-17-5p在成肌细胞中的表达也呈相反趋势，同样符合miRNA和其靶基因的作用规律。结合文献和本试验结果提示*PIK3R1*也有可能是miR-17-5p的关键靶基因。

4 结 论

在鸡的肝脏、腹脂、腿肌组织、脂肪细胞和成肌细胞中都有gga-miR-17-5p的表达，且存在品种差异性和组织差异性。gga-miR-17-5p可能是通过*PTEN*、*MAPK3*、*PIK3R1*、*BECN1*和*PLCB4*来影响肌肉发育和脂肪沉积，其中*PTEN*和*PIK3R1*尤为关键。

参考文献 References

[1] 李彦军. 我国家禽业发展的趋势与探析[J]. 农家参谋, 2019(10): 153-154
Li Y J. The development trend and analysis of domestic poultry industry in China[J]. *The Farmers Consultant*, 2019(10): 153-154(in Chinese)

[2] 鲁明鹤, 高淑红, 杨静, 邵旭文, 鲁馨檀. 动物肌内脂肪沉积的影响因素[J]. 吉林畜牧兽医, 2023, 44(11): 135-136
Lu M H, Gao S H, Yang J, Shao X W, Lu X T. Influencing factors of intramuscular fat deposition in animals[J]. *Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2023, 44(11): 135-136 (in Chinese)

[3] Liu Y K, Dou Y Q, Qi K L, Li C L, Song C L, Li X J, Li X L, Qiao R M, Wang K J, Han X L. CircSETBP1 acts as a miR-149-5p sponge to promote intramuscular fat deposition by regulating CRTCs[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(40): 12841-12851

[4] Ma J D, Zhu Y, Zhou X K, Zhang J W, Sun J, Li Z J, Jin L, Long K R, Lu L, Ge L P. MiR-205 regulates the fusion of porcine myoblast by targeting the myomaker gene[J]. *Cells*, 2023, 12(8): 1107

[5] Wang S Z, Pan C L, Ma X J, Yang C Y, Tang L, Huang J P, Wei X F, Li H, Ma Y. Identification and functional verification reveals that miR-195 inhibiting *THRSP* to affect fat deposition in Xinyang buffalo [J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 736441

[6] Ru W X, Liu K P, Yang J M, Liu J Y, Qi X L, Huang B Z, Chen H. MiR-183/96/182 cluster regulates the development of bovine myoblasts through targeting *FoxO1*[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2022, 12(20): 2799

[7] Jin M L, Yuan Z H, Li T T, Wang H H, Wei C H. The effects of *DDI1* on inducing differentiation in ovine preadipocytes via oar-miR-432 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14): 11567

[8] Zhao Q, Kang Y, Wang H Y, Guan W J, Li X C, Jiang L, He X H, Pu Y B, Han J L, Ma Y H, Zhao Q J. Expression profiling and functional characterization of miR-192 throughout sheep skeletal muscle development [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30281

[9] Zhang M, Li D H, Li F, Sun J W, Jiang R R, Li Z J, Han R L, Li G X, Liu X J, Kang X T, Sun G R. Integrated analysis of MiRNA and genes associated with meat quality reveals that gga-MiR-140-5p affects intramuscular fat deposition in chickens [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 46(6): 2421-2433

[10] Zhang D H, Ran J S, Li J J, Yu C L, Cui Z F, Amevor F K, Wang Y, Jiang X S, Qiu M H, Du H R, Zhu Q, Yang C W, Liu Y P. MiR-21-5p regulates the proliferation and differentiation of skeletal muscle satellite cells by targeting *KLF3* in chicken[J]. *Genes*, 2021, 12(6): 814

[11] Li G X, Fu S Y, Chen Y, Jin W J, Zhai B, Li Y F, Sun G R, Han R L, Wang Y B, Tian Y D, Li H, Kang X T. MicroRNA-15a regulates the differentiation of intramuscular preadipocytes by targeting *ACAA1*, *ACOX1* and *SCP2* in chickens [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(16): 4063

[12] Duan Y J, Wu Y L, Yin X M, Li T T, Chen F X, Wu P F, Zhang S S, Wang J Y, Zhang G X. MicroRNA-214 inhibits chicken myoblasts proliferation, promotes their differentiation, and targets the *TRMT61A* gene[J]. *Genes*, 2020, 11(12): 1400

[13] Chen L, Luo J, Sun S, Cao D Y, Shi H P, Loor J J. MiR-148a and miR-17-5p synergistically regulate milk TAG synthesis via PRARGC1A and PPARA in goat mammary epithelial cell[J]. *RNA Biology*, 2017, 14(3): 326-338

[14] Luo W, Li G H, Yi Z H, Nie Q H, Zhang X Q. E2F1-miR-20a-5p/20b-5p auto-regulatory feedback loop involved in myoblast proliferation and differentiation[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27904

[15] Rodriguez-Outeiriño L, Hernandez-Torres F, Ramirez de Acuña F, Rastrojo A, Creus C, Carvajal A, Salmeron L, Montolio M, Soblechero-Martin P, Arechavala-Gomeza V, Franco D, Aranega A E. miR－106b is a novel target to promote muscle regeneration and restore satellite stem cell function in injured Duchenne dystrophic muscle [J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2022, 29: 769-786

[16] Cioffi M, Vallespinos-Serrano M, Trabulo S M, Fernandez-Marcos P J, Firment A N, Vazquez B N, Vieira C R, Mulero F, Camara J A, Cronin U P, Perez M, Soriano J, Galvez B G, Castells-Garcia A, Haage V, Raj D, Megias D, Hahn S, Serrano L, Moon A, Aicher A, Heeschen C. MiR-93 controls adiposity via inhibition of Sirt7 and Tbx3 [J]. *Cell Reports*, 2015, 12(10): 1594-1605

[17] Huang K L, Shi X E, Wang J, Yao Y, Peng Y, Chen X C, Li X, Yang G S. Upregulated microRNA-106a promotes porcine preadipocyte proliferation and differentiation by targeting different genes [J]. *Genes*, 2019, 10(10): 805

[18] 刘龙洲. C-型利钠肽通过NPRB/NPRC-cGMP依赖通路调控鸡脂肪细胞的脂肪沉积和分解[D]. 荆州: 长江大学, 2018
Liu L Z. C-type natriuretic peptide regulates fat deposition and decomposition in chicken adipocytes through NPRB/NPRC-cGMP dependent pathway [D]. *Jingzhou: Yangtze University*, 2018 (in Chinese)

[19] Burnside J, Liou S S, Zhong C, Cogburn L A. Abnormal growth hormone receptor gene expression in the sex-linked dwarf chicken [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1992, 88(1): 20-28

[20] Dodgson J B, Romanov M N. Use of chicken models for the analysis of human disease[J]. *Current Protocols in Human Genetics*, 2004, Chapter 15: Unit15.5

[21] Han H Y, Gu S H, Chu W W, Sun W X, Wei W, Dang X Y, Tian Y, Liu K Q, Chen J. MiR-17-5p regulates differential expression of NCOA3 in pig intramuscular and subcutaneous adipose tissue[J]. *Lipids*, 2017, 52(11): 939-949

[22] Xu G, Ji C, Song G, Zhao C, Shi C, Song L, Chen L, Yang L, Huang F, Pang L, Zhang N, Zhao Y, Guo X. MiR-26b modulates insulin sensitivity in adipocytes by interrupting the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. *International Journal of Obesity* (2005), 2015, 39(10): 1523-1530

[23] Hou W Q, Wen D T, Zhong Q, Mo L, Wang S, Yin X Y, Ma X F.

Physical exercise ameliorates age-related deterioration of skeletal muscle and mortality by activating Pten-related pathways in Drosophila on a high-salt diet[J]. *The FASEB Journal*, 2023, 37(12): e23304

[24] Shi Y P, Liu G L, Li S, Liu X L. MiR-17-5p knockdown inhibits proliferation, autophagy and promotes apoptosis in thyroid cancer via targeting *PTEN*[J]. *Neoplasma*, 2020, 67(2): 249-258

[25] Xu Q, Chen J, Liu X M, Luo Y B, Wang T Z, Fang M Y. MiR-F4-C12 functions on the regulation of adipose accumulation by targeting *PIK3R1* in castrated male pigs[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2021, 11(11): 3053

[26] Zhu H T, Chen H, Ding D G, Wang S, Dai X F, Zhu Y L. Overexpression of *PIK3R1* promotes bone formation by regulating osteoblast differentiation and osteoclast formation[J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2021, 2021: 2909454

责任编辑：秦梅

第一作者简介：杨苗苗，佛山科学技术学院在读硕士研究生，现于江苏省家禽研究所联合培养，主要从事动物遗传育种工作。2022—2023年两年获得二等、三等学业奖学金。

通讯作者简介：黄华云，博士，研究员，江苏省家禽科学研究所肉鸡育种与生产科室副主任。主要从事家禽遗传育种与生产技术研究。中国畜牧兽医学会家禽学分会理事、江苏省第五期、第六期“333高层次人才培养工程”第三层次培养对象。主持农业生物育种重大项目子课题、江苏省自然科学基金面上基金、江苏省农业自主创新、扬州市现代农业等项目7项；荣获江苏省科学技术奖二等奖、全国农牧渔业丰收奖二等奖、江苏省科学技术奖三等奖；在JIA等期刊发表SCI论文7篇，中文核心期刊十余篇；参与授权发明专利20余项。