



朱师良,陈家磊,彭涵,熊霞,胡陈明,杨礼,宋小燕,夏波,余春林,邱莫寒,张增荣,杜龙环,汪江先,熊柱翔,杨朝武. 鸡肌肉发育相关 miR-133c-3p 靶基因筛选与鉴定[J]. 中国农业大学学报,2025,30(08):120-131.

ZHU Shiliang, CHEN Jialei, PENG Han, XIONG Xia, HU Chenming, YANG Li, SONG Xiaoyan, XIA Bo, YU Chunlin, QIU Mohan, ZHANG Zengrong, DU Longhuan, WANG Jiangxian, XIONG Zhuxiang, YANG Chaowu. Screening and identification of miR-133c-3p target genes related to chicken muscle development[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(08): 120-131.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.08.11

鸡肌肉发育相关 miR-133c-3p 靶基因筛选与鉴定

朱师良 陈家磊 彭涵 熊霞 胡陈明 杨礼 宋小燕 夏波 余春林
邱莫寒 张增荣 杜龙环 汪江先 熊柱翔 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 旨在研究鸡不同组织及骨骼肌卫星细胞中 miR-133c-3p 的表达情况, 并利用生物信息学分析筛选其在胸肌中影响肌肉生长发育的关键靶基因。本研究利用在线网站预测鸡 miR-133c-3p 靶基因, 进行 GO 和 KEGG 富集分析并构建蛋白-蛋白互作网络; 利用在线公共数据库, 分析胸肌相对于其他组织的 miR-133c-3p 表达量及筛选潜在靶基因, 并通过双荧光素酶报告基因试验进行靶标验证。结果表明: 1) 预测获得 103 个靶基因; 功能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; 并显著富集到肌动蛋白细胞骨架调控、mTOR 等多条肌肉生长发育相关信号通路。2) PPI 网络共筛选到 5 个 Hub 基因。3) miR-133c-3p 仅在胸肌和心脏中表达, 在胸肌中的表达量极显著高于心脏 ($P < 0.01$), 且在卫星细胞增殖分化期间其表达水平呈先下降后上升的规律。4) 共筛选到 *SGK1*、*MYH9*、*KLF7* 和 *NFAT5* 4 个靶基因。5) 双荧光素酶报告基因检测发现 miR-133c-3p 与 *NFAT5* 存在靶标关系。综上, 鸡 miR-133c-3p 在胸肌中可通过靶向 *NFAT5* 间接调控肌肉生长发育。本研究为解析鸡 miR-133c-3p 的功能及其分子机制提供了参考和依据。

关键词 鸡; miR-133c-3p; 生物信息学; 基因表达量; 肌肉生长发育; 靶标验证

中图分类号 S831.2

文章编号 1007-4333(2025)08-0120-12

文献标志码 A

Screening and identification of miR-133c-3p target genes related to chicken muscle development

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

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

Abstract The aim is to investigate the expression of miR-133c-3p in different tissues and satellite cells of chickens, and to screen key target genes affecting muscle growth and development in pectoralis through bioinformatics analysis. In this study, an online website to predict chicken miR-133c-3p target genes was used, GO and KEGG enrichment analysis were performed and protein-protein interactions networks was constructed. Using an online public database, the expression of miR-133c-3p in pectoral muscle relative to other tissues was

收稿日期: 2024-12-04

基金项目: 四川省苗子工程培育项目(MZGC20240106); 国家肉鸡产业技术体系项目(CARS-41-G07); 国家现代农业产业技术体系四川肉鸡创新团队项目(SCCXTD-2024-24); 四川省省级科研院所基本科研项目(SASA202503)

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

constructed and potential target genes were screened, and target validation by a dual luciferase reporter gene assay was performed. The results showed that: 1) 103 target genes were predicted; Functional enrichment analysis shows that target genes are involved in the synthesis and transport of various polymer compounds; And significantly enriched in multiple signaling pathways related to muscle growth and development, such as actin cytoskeleton regulation, mTOR, etc. 2) Five Hub genes were identified through PPI network screening. 3) MiR-133c-3p is only expressed in pectoralis and heart, and its expression decreases during satellite cell proliferation and increases during differentiation($P<0.01$). 4) Four target genes, *SGK1*, *MYH9*, *KLF7* and *NFAT5*, were identified through screening. 5) Dual luciferase reporter gene detection revealed a target relationship between miR-133c-3p and *NFAT5*. In summary, chicken miR-133c-3p can indirectly regulate muscle growth and development by targeting *NFAT5* in the pectoral muscle. This study provides a reference and basis for analyzing the function and molecular mechanism of miR-133c-3p in chickens.

Keywords chicken; miR-133c-3p; bioinformatics; gene expression level; muscle growth and development; target validation

骨骼肌是鸡肉的主要组成部分,在肉鸡养殖生产中,骨骼肌占肉鸡体重的40%以上,其生长发育与鸡的产肉量密切相关^[1]。肌肉的生长速率和肌肉率是非常重要的生长性状兼经济性状,也是育种科研旨在提高的指标之一。miRNAs在调控基因表达中扮演着关键角色,尤其是在肌肉生长发育过程中,miR-133家族成员在多种物种中被证实与肌肉发育密切相关^[2]。miR-133家族是众多肌源性miRNA家族中的一员,包括miR-133a、miR-133b以及新发现的miR-133c 3个成员,它们在骨骼肌和心肌中特异性表达或高度富集,在成肌细胞增殖、凋亡、分化,肌肉损伤修复和肌肉再生等生物学过程中发挥重要作用,但其具体功能和调控机制各有不同^[1-2]。miR-133a可靶向包括*Dnm2*、*Pfn2*和*Calml1*在内的多个肌肉发育相关基因参与骨骼肌生长代谢过程,敲除miR-133a的小鼠表现出中央核肌病、线粒体功能障碍和肌纤维形态受损^[3]。研究证实,C2C12细胞中过表达miR-133a能显著增强肌管的形成^[4]。miR-133b可靶向*RUNX2*、*TRPS1*抑制成骨细胞和软骨细胞的分化来介导间充质谱系分化,还可靶向Myosin基因家族成员,调控肌肉生长发育^[1];肌肉损伤前注射miR-133b,可以增强成肌分化标志蛋白Myog、Myod1和Pax7的表达,促进肌肉再生^[5]。miR-133c是近年来新发现的miR-133家族成员,包括miR-133c-5p和miR-133c-3p。目前的研究主要集中在人和猪和梅花鹿上。在人上,miR-133c/MAPK1轴可通过调控成纤维细胞样滑膜细胞(FLS)的增殖和迁移影响类风湿关节炎^[6];在猪上,猪流行性腹泻病毒(PEDV)感染的细胞模型中,miR-133c-3p通过靶向*BCL2L2*基因参与调

控细胞凋亡^[7]。在近期关于梅花鹿的一项研究中发现,在青春期后梅花鹿腿肌中的miR-133c-3p表达量显著上调,并伴随着其潜在靶基因的表达水平的下降,这说明miR-133c-3p和miR-133家族其他成员一样,均在肌肉发育方面发挥重要作用^[8]。miR-133c-3p作为miR-133家族的一员,在前期对鸡的研究中,通过RNA-seq发现miR-133c-3p在快大型肉鸡的骨骼肌中的表达量远高于慢速型肉鸡^[9],进一步说明它参与调控鸡的肌肉生长发育,但是在家禽(鸡)各组织中的表达规律、具体功能和分子调控机制尚不清楚。因此,本研究利用生物信息学分析,预测鸡miR-133c-3p的靶基因进行GO、KEGG和PPI分析,并结合公共数据库中的RNA-seq数据对miR-133c-3p的组织表达谱进行表征,筛选出它在胸肌中的关键靶基因并利用双荧光素酶报告基因试验进行靶标验证,以期对miR-133c-3p在鸡上的功能及分子调控机制进行解析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞培养

参照Bai等^[10]的方法利用差速贴壁法从3日龄的AA肉鸡胸肌中分离鸡卫星细胞(SMSCs),先使用生长培养基(DMEM+10%胎牛血清+0.2%青霉素/链霉素)培养细胞,当细胞生长密度达到70%~80%时,改用分化培养基(DMEM+2%马血清)诱导分化。分别于增殖24、48和72 h、分化24、和48 h这5个时间点收集细胞样品,进行后续qPCR检测。

1.1.2 主要试剂

PrimeScript™ RT reagent Kit、miRNA First Strand cDNA Synthesis Tailing Reaction Kit 购自 Takara 公司;QuantiNova™ SYBR® Green PCR 试剂盒、DNase/RNase-free 去离子水和 LipoPlus™ Reagent 购自 Sigma-Aldrich 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒、TRIzol™ Plus RNA 纯化试剂盒、胎牛血清 FBS、马血清、DMEM 高糖细胞培养基和 0.2% 青霉素/链霉素购自赛默飞世尔科技公司。

qPCR 引物、miR-133c-3p mimic、mimic NC、NFAT5-3'UTR 野生型双荧光素酶报告基因载体 (pGL-NFAT5-Wt) 和突变型载体 (pGL-NFAT5-Mut) 均由生工生物(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 数据材料

利用 miBase (<https://mirbase.org/>) 下载鸡

(*Gallus gallus*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、锦龟 (*Chrysemys picta*)、原鸽 (*Columba livia*)、猕猴 (*Macaca mulatta*)、缅甸蟒 (*Python bivittatus*)、似野结鱼 (*Tor tambroides*)、非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)、家犬 (*Canis familiaris*)、鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*)、小鼠 (*Mus musculus*)、猩猩 (*Pongo pygmaeus*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 和牛 (*Bos taurus*) 等 14 个物种的 miR-133c-3p 成熟体序列。其 GenBank 号和序列信息见表 1。

在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中下载数据包 GSE124418^[11]和 GSE93855^[12],分别获取清远麻鸡在胸肌、心脏、肾脏、肝脏、肺脏和脾脏 6 个组织中 gga-miR-133c-3p 测序读数 (Counts) 以及转录组 Counts。

表 1 各物种 miR-133c-3p 的成熟体序列
Table1 Mature sequence of miR-133c-3p in each species

名称 Name	登录号 Accession	序列 (5'-3') Sequences (5'-3')
gga-miR-133c-3p	MIMAT0001176	UUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUGC
dre-miR-133c-3p	MIMAT0001832	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUA
cpi-miR-133c-3p	MIMAT0037753	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUG
cli-miR-133c-3p	MIMAT0038513	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUGC
mml-miR-133c-3p	MIMAT0006777	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUG
pbv-miR-133c-3p	MIMAT0038940	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUGG
tta-miR-133c-3p	URS000075AA59_329116	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUA
xtr-miR-133c-3p	MIMAT0003595	UUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUGC
cfa-miR-133c-3p	MIMAT0003595	UUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUG
oan-miR-133c-3p	MIMAT0007150	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCGGCUG
mmu-miR-133c-3p	MIMAT0025078	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAAGGAGUCAG
ppy-miR-133c-3p	MIMAT0016973	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCUG
ipu-miR-133c-3p	MIMAT0029409	UUUGGU <u>CCCCU</u> UCAACCAGCU
bta-miR-133c-3p	MIMAT0029949	AUUUGGU <u>UCCA</u> UUUUACCAGC

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.

1.2 方法

1.2.1 miR-133c-3p 的物种保守性分析

利用 MEGA 7.0 软件的 Alignment 程序对已获取 14 个物种的 miR-133c-3p 进行不同物种间的序列对比。

1.2.2 gga-miR-133c-3p 靶基因预测及功能分析

利用 miRDB(<https://mirdb.org/index.html>)和

TargetsCan(https://www.targetsCan.org/vert_80/)预测 gga-miR-133c-3p 的靶基因,对结果取交集并绘制 Venn 图。利用 omicstudio 平台 (<https://www.omicstudio.cn/home>)的 clusterProfiler(3.8.1)软件包对靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析设定 $P<0.05$ 为显著富集, $P<0.01$ 为极显著富集;利用在线数据库

STRING(<http://string-db.org/>), 分析 gga-miR-133c-3p 靶基因编码蛋白的相互作用关系, 将 STRING 评分 >0.75 的互作蛋白对导入 cytoscape_v3.9.0 软件, 并利用 Cytoscape 中的 CytoHubba 应用程序, 通过 4 种分析算法 (MCC、DMNC、MNC、Degree) 计算网络中的 hub 基因, 绘制其 PPI 互作网络图。

1.2.3 gga-miR-133c-3p 的组织表达分析

从 GSE124418 数据集中导出清远麻鸡心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸肌中的 miRNA 高通量测序数据。挑选并整理 gga-miR-133c-3p 在这 6 个组织中的测序读数 (count), 并将其进行 TPM (Transcripts per million) 归一化处理, 所用公式如下:

$$\text{TPM} = T/N \times 10^6 \quad (1)$$

式中: T 为 miRNA count 读数; N 为样本总 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。

1.2.4 gga-miR-133c-3p 关键靶基因的筛选及表达

从 GSE93855 数据集 (GSE93855-upload-chicken.txt) 中导出清远麻鸡各组织中的转录组测序读数, 采用 FPKM 值对基因表达水平进行定量。

利用 R 包 (Limma) 进行转录组差异表达分析, $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准, 筛选胸肌相对于心脏、肝脏、肾脏、脾脏、肺脏表达下调的基因, 并取交集, 得到胸肌相对各组织均下调表达的基因集。将该基因集与 gga-miR-133c-3p 的靶基因集再次取交集, 初步筛选得到 gga-miR-133c-3p 在胸肌中的关键靶基因, 结果以韦恩图 (Venn) 的形式呈现。利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 的聚类热图模块对靶基因的表达值进行热图的绘制; 同时将其在各组织中的表达值数据导入 Graphpad Prim 9.0, 进行 gga-miR-133c-3p 关键靶基因的组织表达谱绘制。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

采用 TRIzol™ Plus RNA 纯化试剂盒提取卫星细胞的总 RNA, 按照反转录试剂盒操作步骤合成 cDNA, 通过实时荧光定量 PCR 方法检测基因相对表达量。分别以 $U6$ 和 β -actin 为内参, 每个样品设 3 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 gga-miR-133c-3p 及其靶基因的相对表达量, 引物信息见表 2。扩增体系 (总体积为 10 μL): 上下游引物各 0.5 μL , SYBR Green 5 μL , cDNA 1 μL , ddH₂O 3 μL ; 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 退火温度退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 39 个循环。

表 2 引物信息

Table 2 Primer information

名称 Name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
gga-miR-133c-3p	F: TTTGGTCCCCTTCAACCAGCTG R: AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	58
$U6$	F: CTCGCTTCGGCAGCACATATACT R: ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC	57.5
$NFAT5$	F: GACGATCGCATGATGTGCAG R: ACTGGTGGTTTCGCATTGCTT	58.5
$KLF7$	F: TTAATGGGTGCCGAAGGTT R: AATGCCTTGTGAGCTCGTCG	60
$MYH9$	F: GCCCTTTGTTGTACACGTC R: CTTGCCGTCCACTTCCTCAT	57.5
$SGK1$	F: GGTGGCCATTCTCATCGCTT R: TAAGTTCAGGCTCTTGGGGC	56
β -actin	F: CAGCCAGCCATGGATGATG R: ACCAACCATCACACCCTGAT	60

1.2.6 双荧光素酶报告基因检测

由生工生物工程(上海)股份有限公司构建野生型(pGL-NFAT5-Wt)和突变型载体(pGL-NFAT5-Mut)。将293T细胞系接种在48孔板,用DMEM+10%胎牛血清培养,当细胞密度达到约70%~80%时,用miR-133c-3p mimics(5'-UUG-GUCCCCUUCAACCAGCUGU-3')或NC(5'-UUGUACUACACAAAAGUACUG-3')和pGL-NFAT5-Wt或pGL-NFAT5-Mut质粒共转染,每次处理3个重复。转染48 h后,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书测定荧光素酶活性。

1.3 数据分析

gga-miR-133c-3p 和靶基因的表达式数据及双荧光素酶活性值均导入 Excel 进行整理,结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。使用 Graphpad Prim 9.0 进行独立样本 t 检验或单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著, $P>0.05$ 为差异不显

著,并绘制柱状图或折线图。

2 结果与分析

2.1 miR-133c-3p在鸡基因组上的定位与结构

gga-miR-133c-3p 位于鸡 23 号染色体上, 位于 *IFI27L2* 基因内; 前体序列 gga-mir-133c(4704445—4704523) 全长 79 bp, 其 5'UTR 和 3'UTR 分别加工生产 2 个成熟的 miRNA, 分别为 gga-miR-133c-5p (4704457—4704478) 和 gga-miR-133c-3p (4704493—4704514), 并构成发夹结构(图 1)。

2.2 miR-133c-3p 保守性分析

对 14 个物种的 miR-133c-3p 序列进行多序列比对分析(图 2)。除牛(bta-miR-133c-3p)以外的其他 13 个物种的 miR-133c-3p 序列保守性较高,仅有个别碱基发生突变,且种子区序列(UGGUCCC)完全相同。而牛的序列与其他物种保守性较差,且种子区序列(UGGUUCC)发生 C<U 突变。

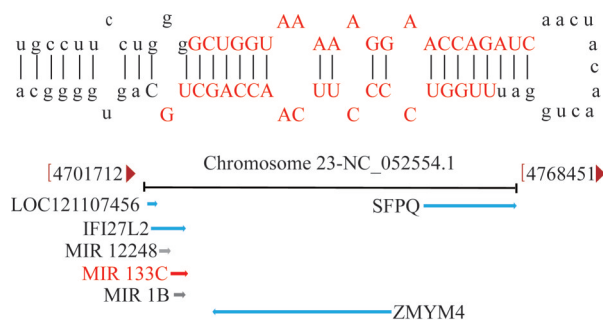
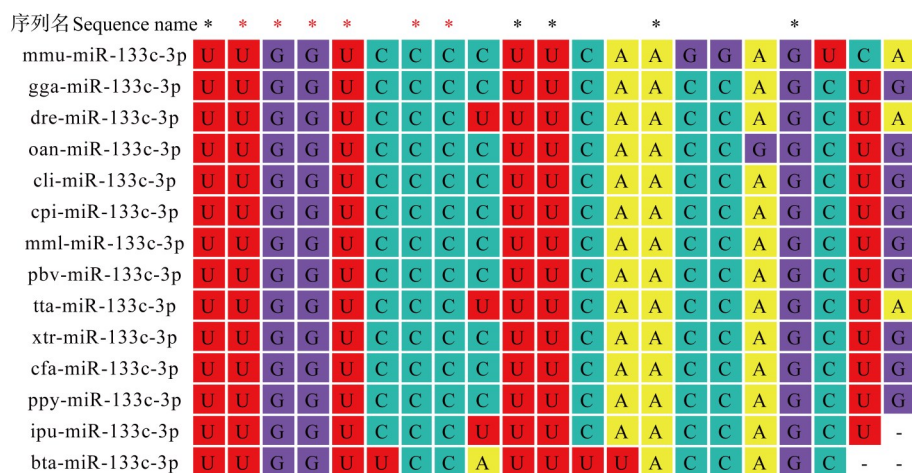


图1 gga-miR-133c-3p 的结构与定位

Fig. 1 Structure and localization of gga-miR-133c-3p



* 表示碱基相同;-表示碱基缺失。

* represents highly conserved base; - indicates base deletion.

图2 不同物种间 miR-133c-3p 序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of miR-133c-3p between different species

2.3 gga-miR-133c-3p 靶基因预测

由图 3 可知,利用 miRDB 和 TargetScan 分别预测出 351 和 184 个 gga-miR-133c-3p 的靶基因;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 103 个靶基因。

2.4 gga-miR-133c-3p 靶基因功能富集及 PPI 网络构建

GO 富集结果如图 4 所示。在 BP 中,靶基因主要富集于 mRNA 剪切、水解酶活性负调控、细胞成分形态发生、胚胎发育、分子功能负调控、骨骼系统发育等条目;在 CC 中,靶基因主要与内质网系统、高尔基体、囊泡等细胞器膜的形成有关;对于 MF,靶基因主要具有与肌球蛋白结合、DNA 结合转录因子活性和磷酸转移酶等多种酶活性激活等分子功能。

对 gga-miR-133c-3p 的靶基因进行 KEGG 通路

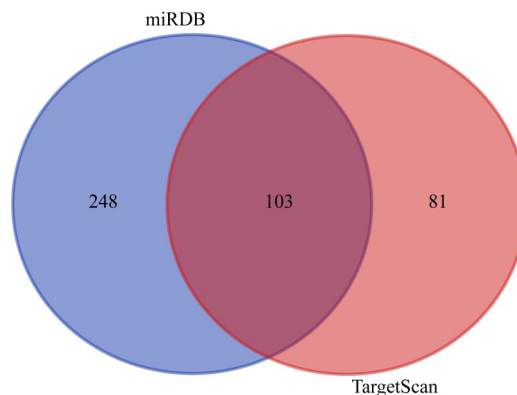


图 3 gga-miR-133c-3p 的靶基因预测

Fig. 3 The predicted target gene of gga-miR-133c-3p

富集分析,结果如图 5 所示。靶基因主要参与自噬、磷酸酰肌醇信号系统、赖氨酸退化、肌动蛋白细胞骨架调控、细胞吞吐、粘附连接、mTOR 信号通路、FoxO、上皮细胞连接、p53 等信号通路。

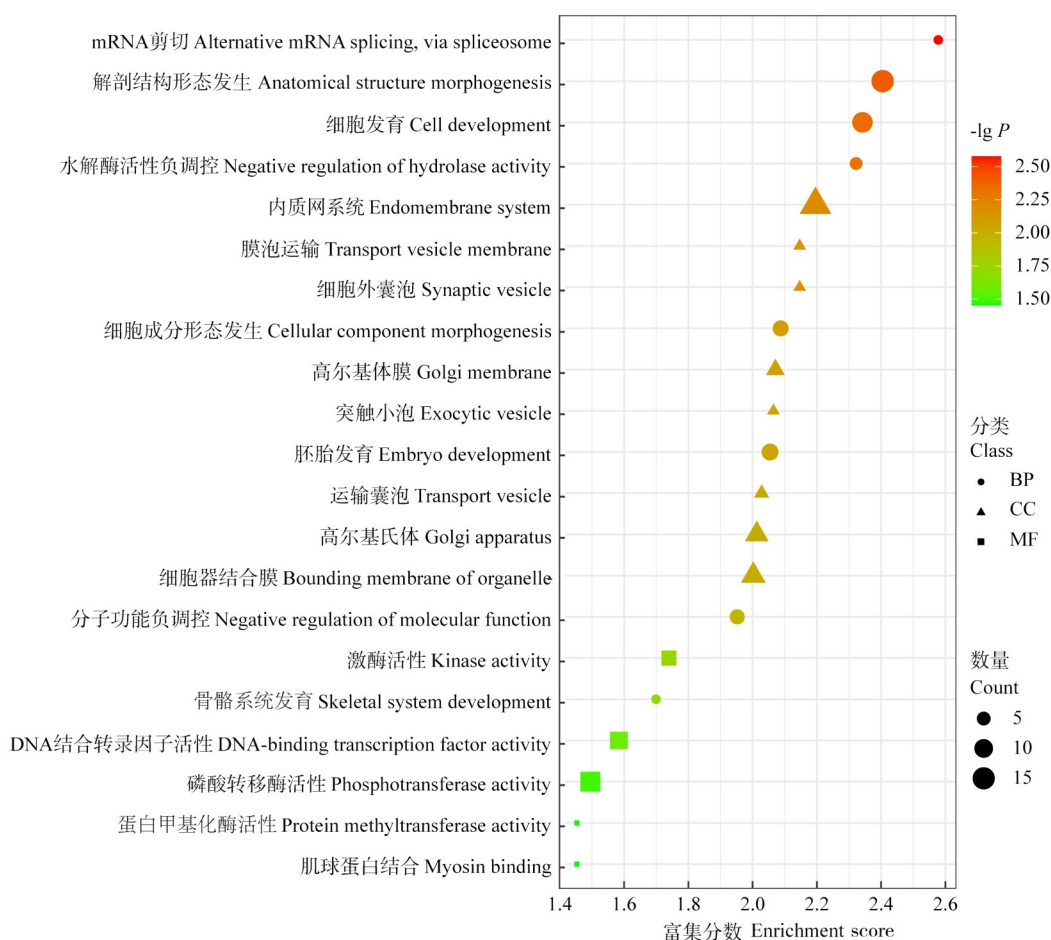


图 4 gga-miR-133c-3p 的靶基因 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of gga-miR-133c-3p target genes

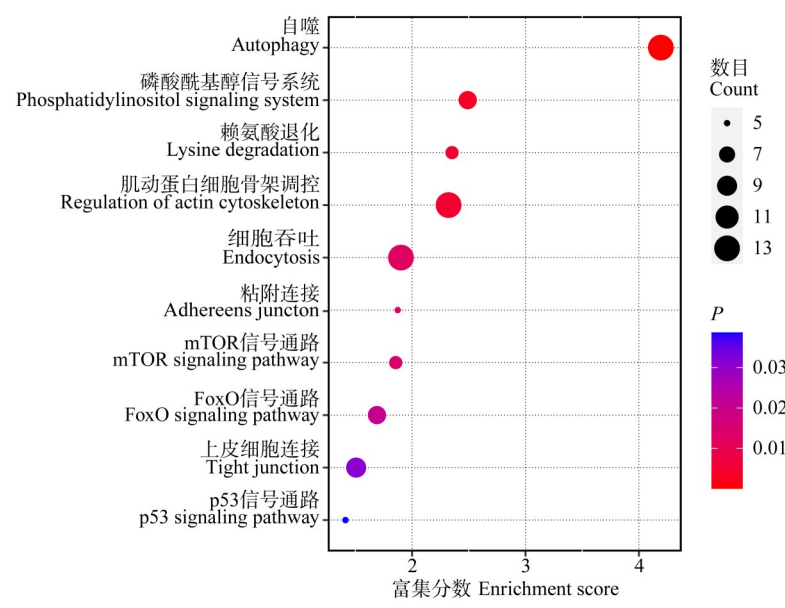


图5 gga-miR-133c-3p的靶基因KEGG通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis of target genes of gga-miR-133c-3p

靶基因PPI网络见图6,该网络图包括5个Hub基因,分别为PAPSS1、CTBP2、GDI1、RBMXL1和SYT1,并且MYH9和SGK1也在这一网络中。

表达,仅在胸肌和心脏中表达,且在胸肌中的表达量极显著高于心脏($P<0.01$)。

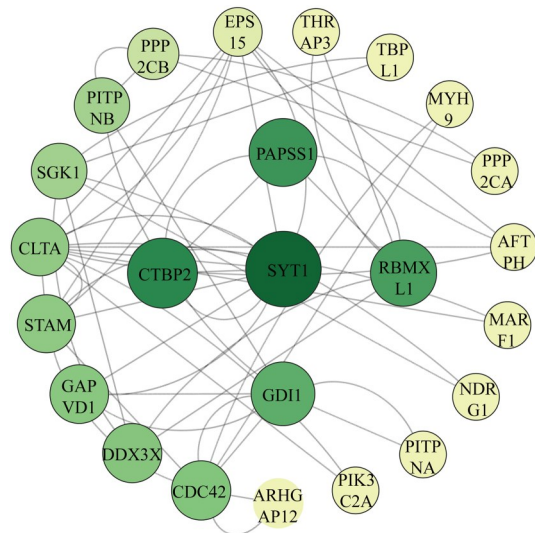
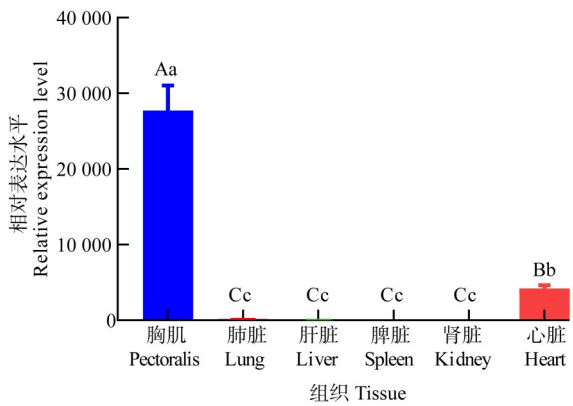


图6 gga-miR-133c-3p靶基因的PPI网络

Fig. 6 PPI network of gga-miR-133c-3p target genes

2.5 gga-miR-133c-3p在鸡各组织中的表达

在GEO数据库中下载GSE124418数据包,并从中整理清远麻鸡miR-133c-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-133c-3p的组织表达谱,结果如图7所示,miR-133c-3p在肝脏、肺脏、脾脏、肾脏中未检测到



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。

Date 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 ($P>0.05$). Same as below.

图7 miR-133c-3p在鸡各组织中的表达量

Fig. 7 miR-133c-3p expression level in various tissues of chickens

2.6 胸肌相对各组织的差异下调基因及关键靶基因的筛选

如图8(a)所示,胸肌相对于肺脏、肝脏、肾脏、脾

脏和心脏的下调基因数目分别为 4 725、1 727、3 624、5 055 和 1 528, 胸肌相对各组织下调的公共基因为 146 个。将此所得公共基因集再次与 gga-miR-133c-3p 的靶基因取交集, 得到 4 个关键靶基因, 分别为 *MYH9*、*NFAT5*、*KLF7* 和 *SGK1* (图 8(b))。

2.7 关键靶基因的聚类热图以及组织表达谱

如图 9(a) 所示, gga-miR-133c-3p 的 4 个关键靶

基因在各组织中不同样本间重复性好, 胸肌与各组织差异显著 ($P < 0.05$); 聚类显示, *SGK1* 和 *KLF7* 首先聚成一束, 其次分别与 *NFAT5*、*MYH9* 依次聚类成束。关键靶基因在各组织中的表达谱如图 9(b) 所示, 5 个基因在脾脏、肌肉、肺脏、肝脏、心脏、肾脏都有表达, 且均在肾脏中表达量最高, 胸肌中表达量最低。

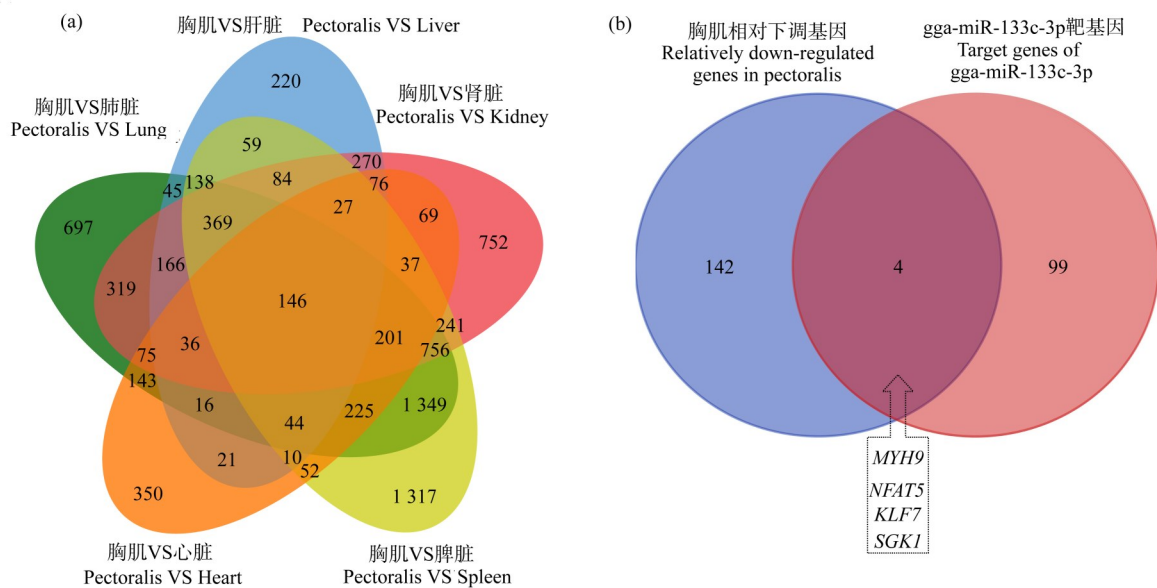


图 8 胸肌相对其他组织下调表达基因 (a) 及关键靶基因筛选 Venn 图 (b)

Fig. 8 Venn diagram of down-regulated expression genes in pectoralis relative to other tissues (a) and Venn of miR-133c-3p key target genes screening (b)

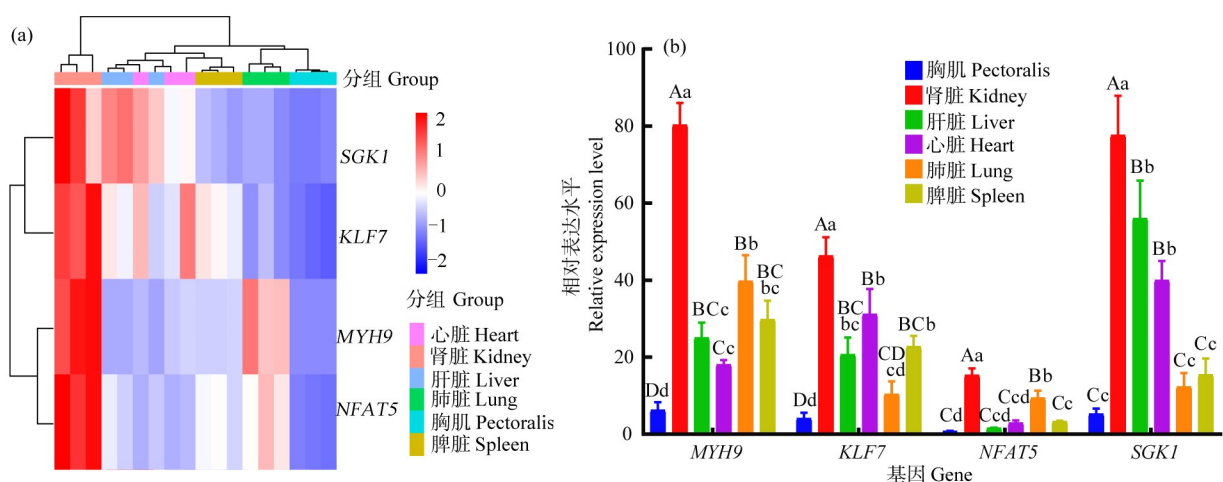


图 9 gga-miR-133c-3p 关键靶基因的聚类热图 (a) 和组织表达谱 (b)

Fig. 9 Heat maps (a) and tissue expression (b) of gga-miR-133c-3p key target genes

2.8 靶基因鉴定

qPCR 结果显示, miR-133c-3p 在鸡卫星细胞增

殖期 (GM1-GM3) 表达量下降, 在分化期 (DM1-DM2) 表达水平上升; 候选靶基因 *KLF7*、*SGK1* 表

达与 miR-133c-3p 表达不相关; *MYH9* 与 miR-133c-3p 的表达规律相同;而 *NFAT5* 在细胞增殖分化过程中表达量先逐渐上升后逐渐下降,与 miR-133c-3p 的表达呈负相关规律(图 10)。因此,确定 *NFAT5* 作为 miR-133c-3p 的靶基因并进行靶标验证。

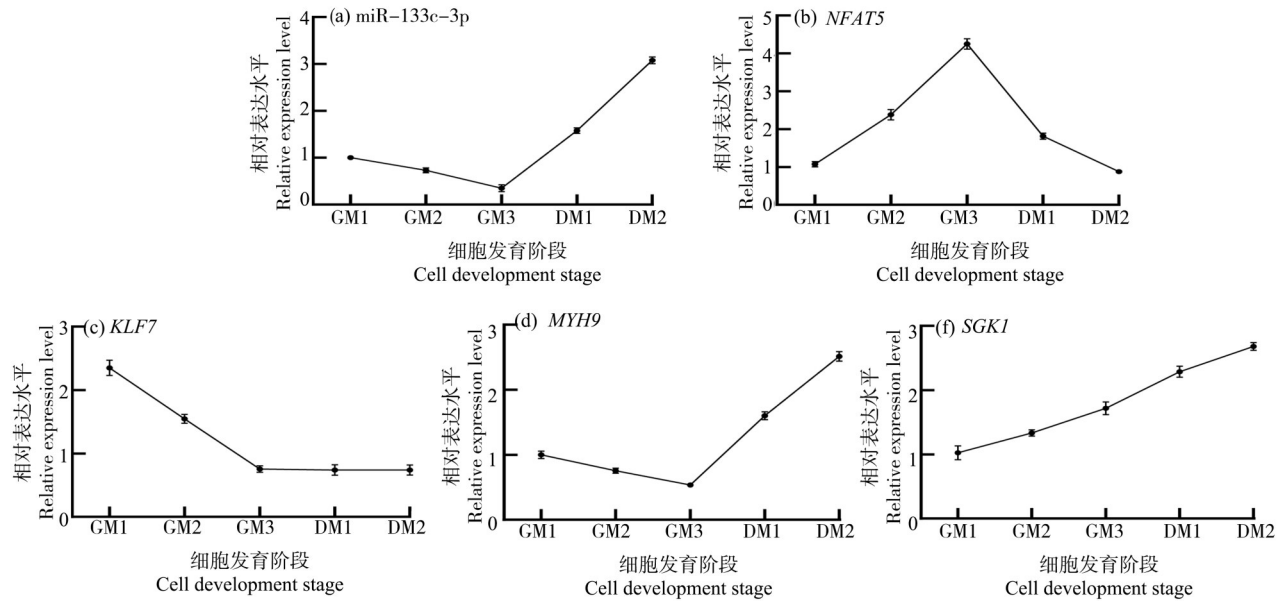


图 10 miR-133c-3p 及其候选靶基因 qPCR 检测

Fig. 10 qPCR detection of miR-133c-3p and candidate target gene

2.9 miR-133c-3p 与 NFAT5 靶标关系验证

miR-133c-3p 与 *NFAT5* 3'-UTR 结合的靶序列为 CCCUGGU, 构建 *NFAT5* 3'-UTR 的野生型双荧光素酶报告基因载体(*NFAT5*-3'-UTR-Wt)和突变型载体(*NFAT5*-3'-UTR-Mut)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, miR-133c-3p 与 *NFAT5* 3'-UTR 的野生型双荧光素酶报告基因载体的共转染极显著降低了酶活性($P<0.01$), 证实 *NFAT5* 与 miR-133c-3p 存在靶标关系(图 11)。

3 讨论

骨骼肌的生长发育受众多基因表达的调控, 本研究从 miRNA 角度进行探索。miR-133 家族是众多肌源性 miRNA 的一员, 通过影响肌肉细胞增殖分化、肌肉损伤修复、肌肉再生、线粒体稳态等生物学过程调控肌肉生长和发育^[1-3]。在人^[13]上, miR-133a/b 促进人肌管形成; 在山羊^[14]和鸡^[15]上的研究也发现 miR-133a-3p 分别靶向 *FGFR1* 或 *PRRX1* 抑制骨骼肌卫星细胞增殖并促进其分化。而 miR-133c-3p 是 miR-133 家族的新成员, 本研究发现它在肌肉组织中特异性表达, 并且在鸡骨骼肌卫星细胞

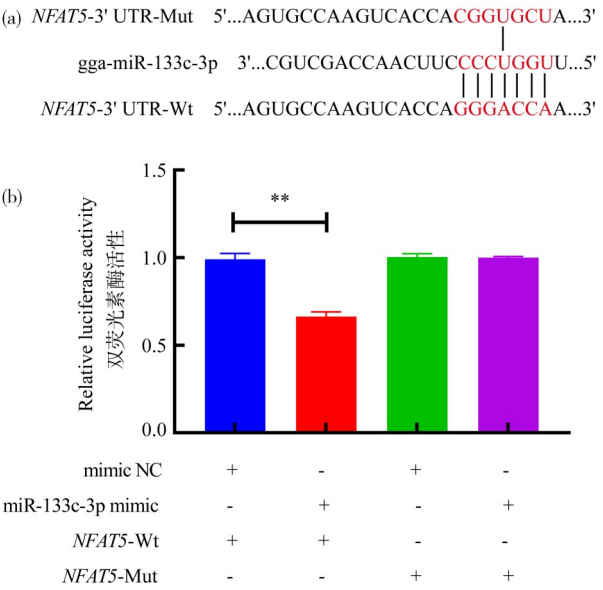


图 11 miR-133c-3p 与 NFAT5 的靶位点信息 (a) 及靶标关系验证 (b)

Fig. 11 miR-133c-3p and *NFAT5* the target site information (a) and target relationship validation (b)

增殖和分化过程中呈现出表达水平先降低后升高的规律, 意味着 miR-133c-3p 可能抑制卫星细胞增

殖而促进其分化。这与 miR-133a 和 miR-133b 的功能相同。

种子区序列(UGGUCCC)是 miR-133c-3p 与靶基因特异性识别并结合的关键。本研究通过多序列比对分析发现 13 个物种 miR-133c-3p 序列高度保守且种子区序列完全一致,但牛的种子区序列为 UGGUCC,发生 C<U 突变,这意味着牛 miR-133c-3p 参与调控不同的靶基因表达,可能发挥不同于其它物种 miR-133c-3p 的独特功能,这也需要进一步探索。

本研究预测到 103 个 miR-133c-3p 的靶基因,功能富集分析发现它们多显著富集于骨骼系统发育、肌球蛋白结合等生物学过程以及肌动蛋白细胞骨架调控、磷酸酰基醇、p53、mTOR 等肌肉发育相关信号通路,这也证实 miR-133c-3p 与肌肉发育直接相关。磷酸酰基醇信号通路可通过调节细胞增殖、存活、蛋白质合成、细胞骨架变化和肌动蛋白重构等过程,影响肌肉的生长、肥大和萎缩^[16]。在骨骼肌中,p53 的表达变化与肌肉萎缩和肥大有关,且在肌肉损伤后的修复过程中发挥作用^[17]。mTOR 信号通路可通过调控 *MEF2C* 和 *MyoD1* 的转录活性,进一步调控山羊骨骼肌卫星细胞(SCs)增殖和分化,对于维持肌肉健康和功能至关重要^[18]。肌动蛋白细胞骨架调控信号通路在骨骼肌中参与细胞形态维持、细胞增殖、细胞迁移、信号传导以及肌肉再生和修复等生物学过程^[19]。这些通路可能是 miR-133c-3p 调控肌肉生长发育的桥梁。

结合清远麻鸡 RNA-seq 数据,研究初步筛选出了 *SGK1*、*NFAT5*、*KLF7*、*MYH9* 4 个靶基因。Wang 等^[20]发现 *KLF7* 在骨骼肌和肌干卫星细胞(SC)的静止期高度表达,*KLF7* 的沉默促进了骨骼肌卫星细胞的活化和成肌细胞的增殖,而在成肌细胞向肌管的过渡过程中,*KLF7* 的 mRNA 表达下调,其肌源性分化中的作用有限;*SGK1* 在骨骼肌生长发育中扮演着多重角色,包括调节肌肉细胞的生长、代谢、保护肌肉免受萎缩,以及维持肌肉卫星细胞的稳态^[21-23];同时 *SGK1* 被富集到 mTOR 信号通路中,可介导 Akt-mTOR 信号通路下调蛋白质降解和自噬以及在冬眠期间增加蛋白质合成来调节小鼠肌肉质量的维持^[24]。*MYH9* 在快速生长型肉鸡和慢速生长型肉鸡的骨骼肌中差异表达,并且 *MYH9* 基因敲除的细胞中其肌动蛋白细胞骨架结

构也会发生改变,表明它在调节骨骼肌的生长和发育中发挥重要作用,但对其作用机制的认识仍十分有限,有待进一步探索^[25-26]。

本研究中,卫星细胞增殖和分化期间 miR-133c-3p 与候选靶基因(*SGK1*、*NFAT5*、*KLF7*、*MYH9*)的表达并不呈负相关规律,但并不能排除 *KLF7*、*MYH9*、*SGK1* 是 miR-133c-3p 的靶基因的可能性,有可能 miR-133c-3p 的表达以及与靶基因的结合受细胞内环境、时空的影响,还需多层面的验证。而 *NFAT5* 与 miR-133c-3p 的表达总体上呈相反趋势,这意味着 *NFAT5* 很可能是 miR-133c-3p 的靶基因。大量研究表明,*NFAT5* 在动物肌肉生长发育中不可或缺,这一点在多个物种中均已得到证实。在人上,*NFAT5* 的异常缺失可能诱导杜氏肌营养不良的发生^[27];在小鼠上,*NFAT5* 敲除小鼠显示出肌肉再生缺陷,受伤后早期形成的肌纤维较少^[28]。而对其机制研究也发现 miR-10b-5p 靶向 *NFAT5* 调控小鼠成肌细胞的增殖分化^[29];此外 *NFAT5* 可响应上游肌源性 miR-1 和 miR-206 的表达量变化调控成肌细胞的分化^[30],这说明 *NFAT5* 作为枢纽基因在肌肉损伤修复、成肌细胞分化以及肌纤维形成等过程传递重要的生物信息,这与本研究结果吻合。而双荧光素酶报告基因结果进一步证实了 *NFAT5* 与 miR-133c-3p 存在靶标关系,本研究为解析 miR-133c-3p 调控肌肉生长发育的分子机制提供了一个新的靶点和研究方向。

4 结 论

研究预测出 103 个 gga-miR-133c-3p 的靶基因,显著富集于骨骼系统发育、肌球蛋白结合等条目及磷酸酰基醇信号系统、肌动蛋白细胞骨架调控、mTOR 信号通路、FoxO、p53 等肌肉相关通路。组织表达分析发现 gga-miR-133c-3p 在胸肌和腿肌中高表达,并在卫星细胞增殖分化期间呈先下降后上升的规律;候选靶基因 *NFAT5* 的表达与其负相关,双荧光素酶报告基因系统检测进一步证实 *NFAT5* 与 miR-133c-3p 存在靶标关系。因此鸡 miR-133c-3p 在胸肌中很可能通过靶向 *NFAT5* 发挥肌肉生长发育等相关生物学功能。

参考文献 References

- [1] Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development[J]. *Developmental Biology*, 2016, 410(1): 1-13

- [2] Yu H, Lu Y H, Li Z F, Wang Q Z. microRNA-133: Expression, function and therapeutic potential in muscle diseases and cancer [J]. *Current Drug Targets*, 2014, 15(9): 817-828
- [3] Liu N, Bezprozvannaya S, Shelton J M, Frisard M I, Hulver M W, McMillan R P, Wu Y R, Voelker K A, Grange R W, Richardson J A, Bassel-Duby R, Olson E N. Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(8): 3258-3268
- [4] Luo Y Q, Wu X X, Ling Z X, Yuan L, Cheng Y W, Chen J Y, Xiang C. microRNA133a targets Foxl2 and promotes differentiation of C2C12 into myogenic progenitor cells[J]. *DNA and Cell Biology*, 2015, 34(1): 29-36
- [5] Nakasa T, Ishikawa M, Shi M, Shibuya H, Adachi N, Ochi M. Acceleration of musculeregeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010, 14(10): 2495-2505
- [6] Zhang N W, Zheng N N, Luo D X, Lin D D, Que W Z, Wang H, Huang Q P, Yang J H, Ye J, Chen X L. Long non-coding RNA NR-133666 promotes the proliferation and migration of fibroblast-like synoviocytes through regulating the miR-133c/MAPK1 axis [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 887330
- [7] 郑红青, 吴旭锦, 朱小甫, 尹宝英, 高军花, 李艳芝, 植婵萍. 猪流行性腹泻病毒通过 miR-133c-3p/BCL2L2轴调控细胞凋亡[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(8): 2233-2243
Zheng H Q, Wu X J, Zhu X F, Yin B Y, Gao J H, Li Y Z, Zhi C P. Porcine epidemic diarrhea virus regulates cell apoptosis by miR-133c-3p/BCL2L2 axis[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(8): 2233-2243 (in Chinese)
- [8] Jia B Y, Liu Y, Li Q N, Zhang J L, Ge C X, Wang G W, Chen G, Liu D D, Yang F H. Altered miRNA and mRNA expression in Sika deer skeletal muscle with age[J]. *Genes*, 2020, 11(2): 172
- [9] Pan Z G, Yang C W, Zhao R P, Jiang X S, Yu C L, Li Z X. Characterization of lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA network to reveal potential functional ceRNAs in the skeletal muscle of chicken [J]. *Frontiers Physiology*, 2022, 13: 969854
- [10] Bai C Y, Hou L L, Li F H, He X H, Zhang M H, Guan W J. Isolation and biological characteristics of Beijing Fatty chicken skeletal muscle satellite cells[J]. *Cell Communication & Adhesion*, 2012, 19(5-6): 69-77
- [11] 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[J]. *Scientific Data*, 2019, 6(1): 192
- [12] Tang Q Z, Gu Y R, Zhou X M, Jin L, Guan J Q, 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): 1-9
- [13] Koutsoulidou A, Mastroiannopoulos N P, Furling D, Uney J B, Phylactou L A. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle [J]. *BMC Developmental Biology*, 2011, 11: 34
- [14] Zhan S Y, Zhang Y, Yang C T, Li D D, Zhong T, Wang L J, Li L, Zhang H P. LncR-133a suppresses myoblast differentiation by sponging miR-133a-3p to activate the FGFR1/ERK1/2 signaling pathway in goats [J]. *Genes*, 2022, 13(5): 818
- [15] Guo L J, Huang W L, Chen B, Jebessa Bekele E, Chen X L, Cai B L, Nie Q H. Gga-mir-133a-3p regulates myoblasts proliferation and differentiation by targeting PRRX1[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 577
- [16] Balla T, Szentpetery Z, Kim Y J. Phosphoinositide signaling: New tools and insights[J]. *Physiology*, 2009, 24: 231-244
- [17] Beyfuss K, Hood D A. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle[J]. *Redox Report*, 2018, 23(1): 100-117
- [18] 吴海青. mTOR信号通路对山羊骨骼肌卫星细胞增殖及分化的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015
Wu H Q. The effect of the mTOR signalling pathway on proliferation and differentiation of goat skeletal muscle satellite cells [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2015 (in Chinese)
- [19] Wu Y H, Ren X Y, Shi P, Wu C Y. Regulation of mitochondrial structure by the actin cytoskeleton[J]. *Cytoskeleton*, 2024, 81(4/5): 206-214
- [20] Wang X B, Shen Q W, Wang J, Zhang Z G, Feng F, Chen T, Zhang Y Y, Wei H, Li Z W, Wang X X, Wang Y Z. KLF7 regulates satellite cell quiescence in response to extracellular signaling[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(5): 1310-1320
- [21] Steinberger M, Föller M, Vogelgesang S, Krautwald M, Landsberger M, Winkler C K, Kasch J, Füchtbauer E M, Kuhl D, Voelkl J, Lang F, Brinkmeier H. Lack of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 improves muscle force characteristics and attenuates fibrosis in dystrophic mdx mouse muscle[J]. *Pflugers Archiv*, 2015, 467(9): 1965-1974
- [22] Ivakine E A, Cohn R D. Maintaining skeletal muscle mass: Lessons learned from hibernation[J]. *Experimental Physiology*, 2014, 99(4): 632-637
- [23] Liu Y, Ye Q P, Dai Y, Hu J H, Chen J M, Dong J T, Li H, Dou Z L. Integrating analysis of mRNA expression profiles indicates Sgk1 as a key mediator in muscle-brain crosstalk during resistance exercise[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2024, 719: 150075
- [24] Andres-Mateos E, Brinkmeier H, Burks T N, Mejias R, Files D C, Steinberger M, Soleimani A, Marx R, Simmers J L, Lin B, Hedderick E F, Marr T G, Lin B M, Hourd C, Leinwand L A, Kuhl D, Föller M, Vogelgesang S, Hernandez-Diaz I, Vaughan D K, de la Rosa D A, Lang F, Cohn R D. Activation of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) is important to maintain skeletal muscle homeostasis and prevent atrophy [J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2013, 5(1): 80-91
- [25] Wu P F, Zhou K Z, Zhang J, Ling X Z, Zhang X C, Zhang L, Li P F, Wei Q Y, Zhang T, Wang X L, Zhang G X. Identification of crucial circRNAs in skeletal muscle during chicken embryonic development[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 330
- [26] Li Y, Friedmann D R, Mhatre A N, Lalwani A K. MYH9-siRNA and MYH9 mutant alleles: Expression in cultured cell lines and their effects upon cell structure and function [J]. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 2008, 65(5): 393-405
- [27] Herbelet S, De Paepe B, De Bleecker J L. Abnormal NFAT5 physiology in duchenne muscular dystrophy fibroblasts as a putative explanation for the permanent fibrosis formation in duchenne muscular dystrophy [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7888
- [28] O' Connor R S, Mills S T, Jones K A, Ho S N, Pavlath G K. A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis [J]. *Journal of Cell*

Science, 2007, 120(Pt 1): 149-159

- [29] Ge G H, Yang D L, Tan Y, Chen Y, Jiang D M, Jiang A N, Li Q, Liu Y H, Zhong Z J, Li X W, Zhang S H, Zhu L. miR-10b-5p regulates C2C12 myoblasts proliferation and differentiation [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(2): 291-299

- [30] Goljanek-Whysall K, Pais H, Rathjen T, Sweetman D, Dalmay T, Münsterberg A. Regulation of multiple target genes by miR-1 and miR-206 is pivotal for C2C12 myoblast differentiation [J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(Pt 15): 3590-3600

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。主持四川省苗子工程培育项目(MZGC20240106)、四川省重点实验室开放课题项目,参与国家肉鸡产业技术体系项目(CARS-41-G07)、国家现代农业产业技术体系四川肉鸡创新团队项目(SCCXTD-2024-24)、“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。获授权的发明专利 15 项、实用新型专利 14 项。



通讯作者简介:杨朝武,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分会理事、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。