

引用格式:

张维, 崔清明, 任慧波, 陈晨, 李华丽, 胡雄贵, 朱吉, 杨仕柳, 李述初, 张四阳, 彭英林, 刘莹莹. 基于转录组学研究宁乡猪肌肉的生长发育[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(2): 80–88.

ZHANG W, CUI Q M, REN H B, CHEN C, LI H L, HU X G, ZHU J, YANG S L, LI S C, ZHANG S Y, PENG Y L, LIU Y Y. Study on muscle growth and development in Ningxiang pigs based on transcriptomics[J].

Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(2): 80–88.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



基于转录组学研究宁乡猪肌肉的生长发育

张维¹, 崔清明², 任慧波², 陈晨², 李华丽², 胡雄贵², 朱吉²,
杨仕柳³, 李述初³, 张四阳³, 彭英林^{1,2}, 刘莹莹^{1,2*}

(1.湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省畜牧兽医研究所, 湖南 长沙 410131; 3.湖南省流沙河花猪生态牧业股份有限公司, 湖南 宁乡 410600)

摘要: 分别选取3头1、60、120、180、240、300、360日龄(分别记为ND1、ND60、ND120、ND180、ND240、ND300、ND360)宁乡猪的背最长肌进行转录组测序分析, 对9个比较组所筛选到的差异表达基因(DEGs)进行富集分析, 并利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)验证DEGs水平。结果表明: ND60 vs ND1、ND120 vs ND60、ND180 vs ND120、ND240 vs ND180、ND300 vs ND240、ND360 vs ND300、ND180 vs ND1、ND360 vs ND180和ND360 vs ND1这9个比较组中分别鉴定出1 982、245、131、311、26、84、2 257、1 377和2 654个DEGs。GO分析结果表明, DEGs主要参与肌肉收缩、骨骼肌组织发育和钙离子结合过程; KEGG通路分析结果表明, DEGs主要富集于糖异生/糖酵解、PI3K-Akt、MAPK等信号通路; 对DEGs进行qRT-PCR验证, qRT-PCR结果与测序结果一致; 转录组测序和试验验证结果发现, *THBS3*在ND180 vs ND1和ND360 vs ND1比较组中均下调, *THBS4*分别在ND180 vs ND1和ND360 vs ND180中显著下调和上调, 这表明*THBS3*和*THBS4*的表达方式与猪生长发育规律相反, 推测它们可能负向调控骨骼肌的生长发育。

关键词: 宁乡猪; 背最长肌; 转录组; 差异表达基因; GO分析; KEGG通路分析; 实时荧光定量PCR

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)02-0080-09

Study on muscle growth and development in Ningxiang pigs based on transcriptomics

ZHANG Wei¹, CUI Qingming², REN Huibo², CHEN Chen², LI Huali², HU Xionggui², ZHU Ji²,
YANG Shiliu³, LI Shuchu³, ZHANG Siyang³, PENG Yinglin^{1,2}, LIU Yingying^{1,2*}

(1.College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Hunan Institute of Animal and Veterinary Science, Changsha, Hunan 410131, China; 3.Hunan Liushahe Ecological Animal Husbandry Co. Ltd., Ningxiang, Hunan 410600, China)

Abstract: At the ages of 1, 60, 120, 180, 240, 300, and 360 days(recorded as ND1, ND60, ND120, ND180, ND240, ND300, and ND360 respectively), the longissimus dorsi muscle of 3 Ningxiang pigs were respectively selected for transcriptome sequencing analysis. An enrichment analysis was performed on the differentially expressed genes(DEGs) screened from 9 comparison groups. The levels of DEGs were verified using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR). The results showed that 1 982, 245, 131, 311, 26, 84, 2 257, 1 377, and 2 654 DEGs were identified in ND60 vs(short for versus) ND1, ND120 vs ND60, ND180 vs ND120, ND240 vs ND180,

收稿日期: 2024-05-13

修回日期: 2025-02-03

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30317、2021JJ30386); 湖南省创新平台与人才计划项目(2022NK4145)、湖南省科技重大专项(2021NK1009); 湖南省科技成果转化与产业化计划项目(2022GK4016)

作者简介: 张维(1999—), 女, 陕西渭南人, 硕士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, 2631705640@qq.com; *通信作者, 刘莹莹, 博士, 副研究员, 主要从事动物营养与饲料研究, hunaulyy_2006@126.com

ND300 vs ND240, ND360 vs ND300, ND180 vs ND1, ND360 vs ND180, and ND360 vs ND1 comparison groups, respectively. Gene ontology(GO) analysis indicated that the DEGs were mainly involved in muscle contraction, skeletal muscle tissue development, and calcium ion binding processes. Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) pathway analysis showed that the DEGs were mainly enriched in signaling pathways such as gluconeogenesis/glycolysis, PI3K-Akt, and MAPK. The qRT-PCR verification of the DEGs showed the expression trends were consistent with the sequencing results. Through transcriptome sequencing and experimental verification, we found that *THBS3* was downregulated in the ND180 vs ND1 and ND360 vs ND1 comparison group, and *THBS4* was significantly downregulated in ND180 vs ND1 and upregulated in ND360 vs ND180, indicating the expression patterns of *THBS3* and *THBS4* were opposite to the growth and development pattern of pigs. It is speculated that those may negatively regulate the growth and development of skeletal muscles.

Keywords: Ningxiang pig; longissimus dorsi muscle; transcriptome; differentially expressed gene(DEG); GO analysis; KEGG pathway analysis; real-time fluorescence quantitative PCR(qRT-PCR)

骨骼肌的生长与发育在动物的生命进程里极为关键,因为在畜牧生产实践中,骨骼肌系统的合成代谢效能直接关联着日增重指数与胴体品质参数,而通过改善肉质特性、提升饲料转化效率等方式可显著增加养殖场单位产品的经济回报率^[1-6]。宁乡猪因其肌肉脂肪含量高、不饱和脂肪酸含量高、肉味鲜美等特点深受消费者喜爱^[7-10]。骨骼肌生长发育的核心调控由遗传编码、营养供给、激素信号传导及环境应激因子共同构成,其中,遗传因素通过表观遗传修饰与基因表达时序控制决定肌纤维类型分化与生长潜力上限^[11]。因此,基于转录组学技术解析骨骼肌发育调控网络对优化家畜繁殖效率具有关键作用,可为产业经济效益提升提供分子靶点。转录组学通过高通量测序技术解析动物机体转录组,系统揭示基因表达调控网络及其在生长发育中的分子机制^[12],这在辅助家畜疾病诊断、解析疾病特征以及为治疗方案提供指导等方面有着关键作用^[13-15]。ZHANG等^[16]对长白猪种和地方猪种的肌纤维进行转录组分析,结果显示,染色质解旋酶DNA结合蛋白2与肌球蛋白轻链激酶等基因群组可能在猪胚胎期形态发生阶段呈现显著的表达特征。本研究中,利用转录组学对1、60、120、180、240、300、360日龄的宁乡猪背最长肌生长发育的差异表达基因(DEGs)进行探索和筛选,并通过荧光定量PCR(qRT-PCR)技术验证其表达水平,揭示肌肉生长发育的分子调控网络并解析其生长机制,以期丰富地方猪种的遗传资源库,并为种质特性解析及生猪产业经济效益提升提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与样品采集

试验选用1、60、120、180、240、300、360日龄的7个发育阶段(分别记为ND1、ND60、ND120、ND180、ND240、ND300和ND360)的21头去势宁乡猪公猪。每个发育阶段选择3头体质量相近的健康个体(样品编号分别在处理编号后加_1、_2、_3,如ND1_1、ND1_2、ND1_3)进行屠宰,采集20 g背最长肌样品,用液氮速冻,−80 °C保存,用于转录组测序和后续的qRT-PCR分析。7组猪为半同胞,每个发育阶段的3个样本为全同胞。所有试验猪均在湖南省流沙河花猪生态牧业股份有限公司标准环境条件下进行饲养。

1.2 构建文库与测序及测序数据质控和分析

采用Trizol试剂(购自宝日医生物技术(北京)有限公司)按传统步骤提取背最长肌组织总RNA。采用Bioanalyzer2100和RNA 6000 Nano LabChip Kit分析总RNA数量和纯度,RNA完整值(RIN)>7.0的高质量RNA样品用于构建文库及测序。参照文献^[17]的方法进行文库构建,并由联川生物有限公司运用Illumina NovaSeq 6000平台完成测序(RNA-seq)。

通过CutAdapt过滤掉raw reads中含有接头、PolyA和PolyG、5%以上未知核苷酸和超过20%低质量碱基的reads,获取clean reads。运用HISAT2对clean reads和猪的参考基因组进行比对。利用StringTie对各个样本的映射读数实施组装处理,之后将所有样本的转录本汇总,并运用GffCompare软件重建一个覆盖面广泛的转录组。当最终转录组生成完毕,运用

StringTie和Ballgown对全部转录本的表达丰度进行量化评估,并通过每千碱基转录物每百万个映射读取的片段值(FPKM)这一参数来计算mRNAs的表达丰度。运用DESeq2.0和Edger软件分析两组和两个样本间的差异表达基因(DEGs),以 P_{adj} (校正后的 P) <0.05 和Fold Change(FC) ≥ 2 为DEGs的筛选标准。为挖掘基因表达规律,先对原始表达数据进行均一化校准,确保数据可靠性;再运用层次聚类算法对均一化后的基因表达谱进行剖析,并将聚类结果可视化,最终绘制出聚类热图。随后对DEGs进行GO功能和KEGG通路的富集分析。

1.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)验证

参照文献[18]的方法和说明书,利用反转录试剂盒(购自宝日医生物技术(北京)有限公司)将RNA反转录为cDNA;使用Takara试剂盒(购自宝日医生物技术(北京)有限公司)和CFX96荧光定量仪进行qRT-PCR验证。运用Primer5.0软件设计编码EF-hand钙结合结构域7、钙调蛋白3、血小板反应蛋白4、血小板反应蛋白3、表皮生长因子、磷脂酶A2组IVB、Ras鸟氨酸释放蛋白3、Toll样受体4、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚基、细胞凋亡调节因子、肌球蛋白轻链6、磷脂酶C γ 1、脂肪酸脂肪酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶等蛋白的基因*EFCAB7*、*CALM3*、*THBS4*、*THBS3*、*EGF*、*PLA2G4B*、*RASGRP3*、*TLR4*、*PIK3CA*、*BCL2*、*MYL6*、*PLCG1*、*LPL*、*GAPDH*的引物,选定*GAPDH*作为内参基因,并由广州华大基因科技有限公司合成,具体信息列于表1。

1.4 数据统计及分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计分析基因相对表达量。采用SPSS 22.0软件对所得基因表达量进行 t 检验。运用GraphPad Prism 5软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 RNA质控

RNA质控结果表明,宁乡猪背最长肌样品的RNA质量合格,总量和RIN均满足项目要求,可进行后续试验。

2.2 测序数据过滤及比对统计分析

从表2可知,试验共获得 1.235×10^{11} 条的有效序列,各样本的有效数据量为 $5.57 \times 10^9 \sim 6.41 \times 10^9$ 条,

表1 差异表达基因及其引物序列

Table 1 Primer information for differential expression genes		
基因名称	登录号	引物序列(5'—3')
<i>EFCAB7</i>	XM_003127951.6	CTAGCCGGACTGTTTGGGA CAAACGAGGAAACGCAGCCA
<i>CALM3</i>	NM_001244209.1	TCTTTACCGCTTGAGGAGGC CACATCACAAAGCGGCCATC
<i>THBS4</i>	XM_021084490.1	ATGCACTGACACCAGAGACG AGGAGTCCCCAACCATCA
<i>THBS3</i>	XM_013997018.2	CTCAAGGCAGTGACATCGGT AATGGCTCAAAGTCCTCGGG
<i>EGF</i>	NM_214020.2	AGTTACTCTGAATGCCCCGC GTCTCTGTGCTGACATCGCT
<i>PLA2G4B</i>	NM_001204400.1	TGAGCCCCCTGACTGCTAT GCAAAGTCCCCACGTCAAAC
<i>RASGRP3</i>	XM_021087649.1	GAGGAAGTGTGCCTGCCATT TTTGTGCTTAGGGGTGGTCC
<i>TLR4</i>	NM_001113039.2	CGTGCAGGTGTTTCTTAACA GGTTTGCTCAACGGCAACC
<i>PIK3CA</i>	XM_021069858.1	AGGCCTGGCATAAGAAGACAAG TAGCCTACGGAGGCATTCT
<i>BCL2</i>	XM_021099599.1	CATGTGTGTGGAGAGCGTCA ACTTATGGCCAGATAGGCAC
<i>MYL6</i>	NM_001163997.1	ACCAGACCGCAGAGTTCAAG CCGACAGGATATGCCTCACA
<i>PLCG1</i>	XM_021078394.1	GAAGACGGGATACAGAGCGG GGACTGAGGTCGCTGTTCTC
<i>LPL</i>	NM_214286.1	CTCGTGCTCAGATGCCCTAC GGCAGGGTGAAAGGGATGTT
<i>GAPDH</i>	NM_001206359.1	AGGGCATCCTGGGCTACACT TCCACCACCTGTTGCTGTAG

表2 测序数据统计及比对结果

Table 2 Statistical analysis and comparison of the sequencing data				
样品	总数据量/ ($\times 10^9$ 条)	有效数据量/ ($\times 10^9$ 条)	Q30碱基 占比/%	GC含量/%
ND1_1	5.95	5.77	97.46	50.50
ND1_2	6.22	6.04	97.39	50.00
ND1_3	6.00	5.85	97.59	50.50
ND60_1	5.88	5.77	97.57	52.50
ND60_2	6.28	6.16	97.65	52.50
ND60_3	5.79	5.68	97.46	51.50
ND120_1	5.89	5.77	97.54	52.50
ND120_2	5.99	5.87	97.48	52.00
ND120_3	6.12	5.99	97.57	51.50
ND180_1	5.78	5.67	97.67	51.50
ND180_2	6.08	5.96	97.53	51.50
ND180_3	6.14	6.01	97.47	51.50
ND240_1	6.56	6.41	97.53	52.00
ND240_2	5.86	5.74	97.46	51.00
ND240_3	6.00	5.88	97.68	52.50
ND300_1	5.89	5.76	97.47	51.50
ND300_2	5.78	5.57	97.45	49.50
ND300_3	5.86	5.73	97.50	51.50
ND360_1	6.18	6.04	97.52	52.00
ND360_2	5.89	5.76	97.55	51.50
ND360_3	6.30	6.16	97.62	51.50

Q30(质量值 ≥ 30)碱基占比为97.39%~97.68%，平均GC含量为51.48%。

2.3 差异表达基因分析

以 $FC \geq 2$ 和 $P_{adj} < 0.05$ 为筛选标准，分别统计了9个比较组间的DEGs数，结果(表3)显示，ND60 vs ND1、ND120 vs ND60、ND180 vs ND120、ND240 vs ND180、ND300 vs ND240、ND360 vs ND300、ND180 vs ND1、ND360 vs ND180、ND360 vs ND1比较组分别获得1 982、245、131、311、26、84、2 257、1 377和2 654个DEGs。

将宁乡猪不同生长阶段的DEGs在样本中的表达分布进行Heatmap聚类分析，从结果(图1)可知，DEGs在组内的各样本中表现出一致的表达丰度，

组间表现出不同的表达趋势。

表3 宁乡猪不同比较组差异表达基因的结果

Table 3 The result of differentially expressed genes in different

comparison groups of Ningxiang pigs

比较组	DEGs总数	上调基因数	下调基因数
ND60 vs ND1	1 982	570	1 412
ND120 vs ND60	245	148	97
ND180 vs ND120	131	40	91
ND240 vs ND180	311	239	72
ND300 vs ND240	26	10	16
ND360 vs ND300	84	28	56
ND180 vs ND1	2 257	606	1 651
ND360 vs ND180	1 377	922	455
ND360 vs ND1	2 654	778	1 876

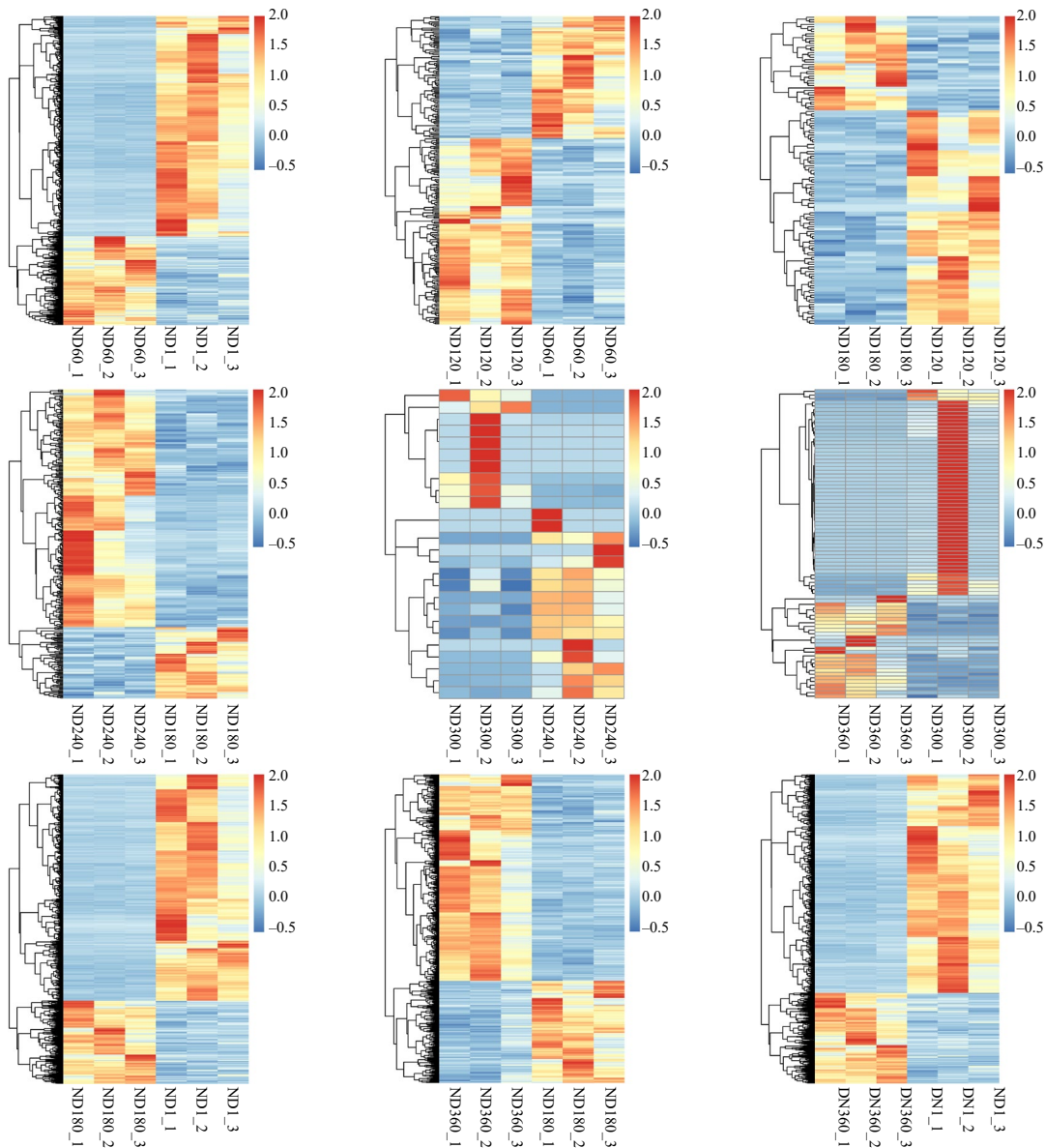


图1 不同比较组差异表达基因表达丰度的热图

Fig.1 Heatmap of expression abundance of differentially expressed genes in different comparison groups

2.4 差异表达基因GO和KEGG通路富集分析

由GO通路富集结果(表4)可知: ND60 vs ND1 比较组中, 调控肌肉生长发育的DEGs主要参与肌肉收缩、骨骼肌细胞分化、心肌收缩和钙离子结合等功能, 分别有11、9、7、66个; ND120 vs ND60 比较组中, 调控肌肉生长发育的DEGs主要参与肌肉收缩、骨骼肌组织发育和肌肉的结构成分等功能, 分别有3、3、2个; ND180 vs ND120比较组中, 调控肌肉生长发育的DEGs主要参与心肌收缩、骨骼肌组织生长、骨骼肌组织发育、钙离子结合和肌肉的结构成分等功能, 分别有3、2、2、8、3个;

ND240 vs ND180比较组中, 调控肌肉生长发育的DEGs主要参与心肌组织形态发生、肌肉器官发育和肌肉的结构成分等功能, 均有3个; ND300 vs ND240比较组中, 在生物学过程(BP)功能中, DEGs主要参与DNA模板调控转录和RNA聚合酶Ⅱ调控转录, 均有5个, 在分子功能(MF)中, DNA结合转录因子活性及RNA聚合酶Ⅱ特异性和DNA结合等功能的DEGs最多, 均为5个, 在细胞组分(CC)功能中, DEGs主要参与细胞质的功能, 有5个DEGs; ND360 vs ND300比较组中, 调控肌肉生长发育的DEGs主要参与心肌收缩的正调控过程, 含有1个。

表4 宁乡猪不同比较组DEGs的GO富集结果
Table 4 GO enrichment results for DEGs in different comparison groups of Ningxiang pigs

功能类别	基因功能	基因数/个								
		ND60 vs ND1	ND120 vs ND60	ND180 vs ND120	ND240 vs ND180	ND300 vs ND240	ND360 vs ND300	ND180 vs ND1	ND360 vs ND180	ND360 vs ND1
BP	DNA模板转录的调控	101	16		16	5	7	118	75	159
	信号转导	94		10	16				77	141
	RNA聚合酶Ⅱ对转录的调控	80	18	9		5	6	114	76	150
	RNA聚合酶Ⅱ对转录的正调控		9	8				113		
	跨膜运输				13					
	前后模式特化					4				
	脂质代谢过程						7			
	肌肉收缩	11	3					8		10
	骨骼肌细胞分化	9						10	6	13
	心肌收缩	7		3						
	骨骼肌组织发育		3	2						10
	骨骼肌组织生长			2						
	心肌组织形态发生				3					
	肌肉器官发育				3					
	心肌收缩的正调控						1			
	肌细胞分化							6		
	骨骼肌纤维发育								7	
CC	膜	548	63	34	75		19	632	374	780
	细胞质	462	46		75	5	14	490	342	570
	核	439		26	73	4			347	
	膜的组成部分		50	29			18	508		612
	核浆					5				
MF	金属离子结合	241	33	12	43		11	272	181	337
	核苷酸结合	170			29			177	114	177
	相同的蛋白质结合	168			27			164	112	
	DNA结合		22			5	7			
	ATP结合		19							168
	蛋白质同源二聚化活性			9						
	水解酶活性			9						
	DNA结合转录因子活性, RNA聚合酶Ⅱ特异性					5				
	DNA结合转录激活因子活性, RNA聚合酶Ⅱ特异性					4				
	氧化还原酶活性						7			
	钙离子结合	66		8				84	46	99
	肌肉的结构成分		2	3	3					

注: 表中只列出了每种类别功能中DEGs数排名前3的基因和与肌肉发育相关的基因的数据。

KEGG通路富集结果(表5)表明,参与宁乡猪背最长肌发育过程的通路主要包括:ND60 vs ND1比较组的糖酵解/糖异生通路和过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路;ND120 vs ND60比较组的MAPK信号通路和PI3K–Akt信号通路;ND180 vs ND120比较组的PI3K–Akt信号通路和缺氧诱导因

子1通路;ND240 vs ND180比较组的MAPK信号通路和PI3K–Akt信号通路;ND300 vs ND240比较组的上调差异基因的泛酸和辅酶A生物合成、分泌及作用通路,下调基因的生产IgA的肠道免疫网络和人类T细胞白血病病毒1型感染等通路;ND360 vs ND300比较组的AMPK信号通路。

表5 宁乡猪不同比较组DEGs的KEGG富集结果

通路	基因数/个								
	ND60 vs ND1	ND120 vs ND60	ND180 vs ND120	ND240 vs ND180	ND300 vs ND240	ND360 vs ND300	ND180 vs ND1	ND360 vs ND180	ND360 vs ND1
代谢通路	193			28		15	206		232
钙离子信号通路	37						41		
剪接体	31								
肌动蛋白细胞骨架的调节		8							
MAPK信号通路		8		10				32	
人乳头瘤病毒感染		8							
PI3K–Akt信号通路		8	6	10			58	36	61
癌症中的转录失调			4		2				
血管平滑肌收缩			4						
生产IgA的肠道免疫网络					1				
泛酸和辅酶A的生物合成、分泌及作用					1				
视黄醇的新陈代谢						6			
AMPK信号通路						4			
沙门氏菌感染								30	
黏着斑									46
糖酵解/糖异生	22						27		24
过氧化物酶体增殖物激活受体信号通路	17								
缺氧诱导因子1			4						
人类T细胞白血病病毒1型感染					1				
胰岛素信号通路									31

注:表中只列出了每组中DEGs数排名前3的通路和与肌肉发育相关的通路的数据。

以上结果表明,每个比较组所筛选到富集于肌肉生长发育的GO和KEGG数量均较少,推断这可能是相邻比较组之间的间隔时间较短所致。由此,选择1、180、360日龄的宁乡猪进行相互比较,以期获得肌肉生长关键时期发挥作用的DEGs。

由GO通路富集结果(表4)发现:ND180 vs ND1比较组,调控肌肉生长发育的DEGs主要参与骨骼肌细胞分化、肌肉收缩、肌细胞分化和钙离子结合过程,分别有10、8、6、84个;ND360 vs ND180比较组,调控肌肉生长发育的DEGs主要参与骨骼肌纤维发育、骨骼肌细胞分化和钙离子结合过程,分别有7、6、46个;ND360 vs ND1比较组,调控肌肉生长发育的DEGs主要参与骨骼肌细胞分化、肌肉收缩、骨骼肌组织发育和钙离子结合过程,分别有13、10、10、99个。

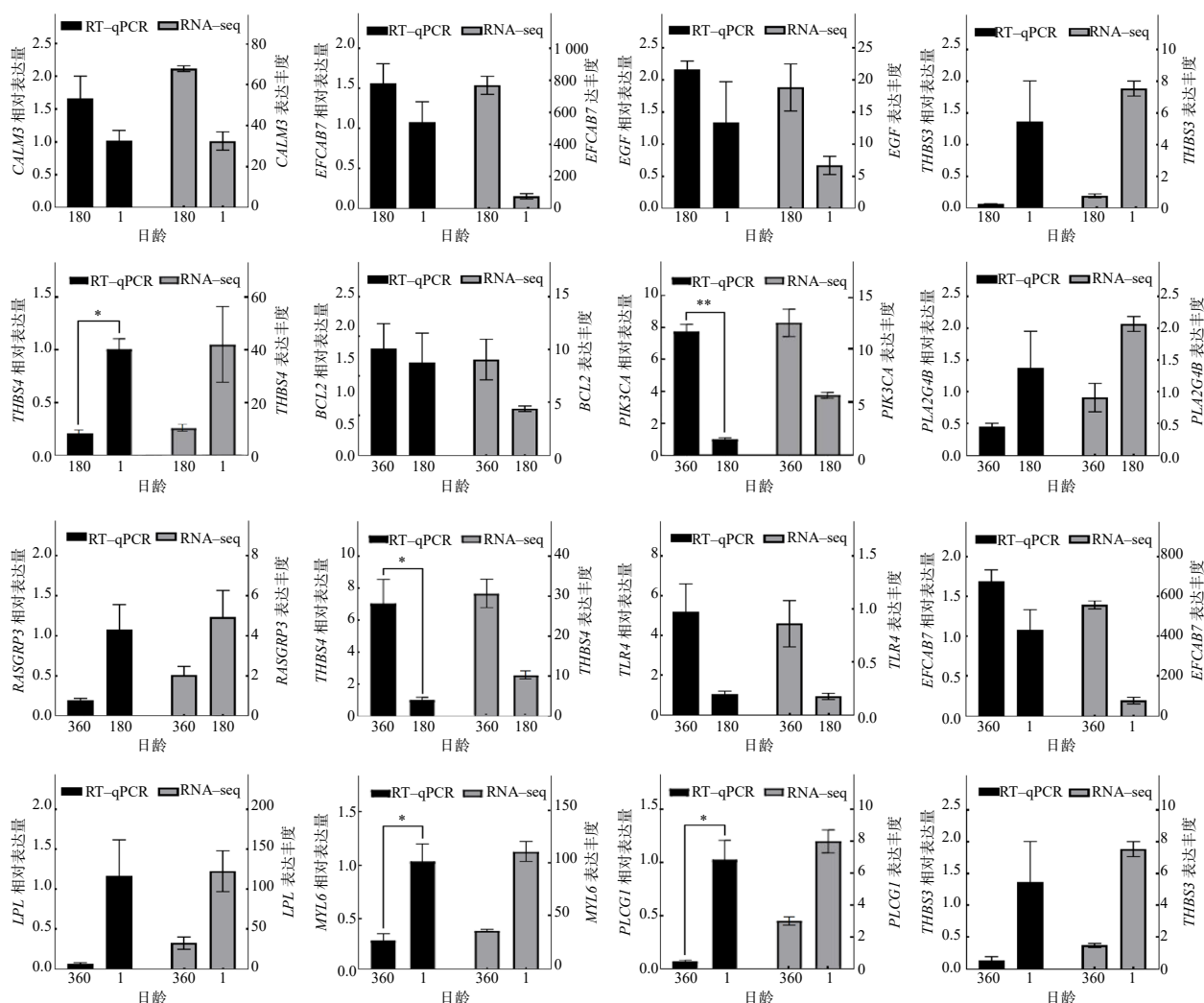
KEGG通路富集结果(表5)分析表明,参与宁乡猪背最长肌发育过程的通路主要包括:ND180 vs ND1比较组的糖酵解/糖异生和PI3K–Akt信号通路;ND360 vs ND180比较组的PI3K–Akt信号通路和MAPK信号通路;ND360 vs ND1比较组的胰岛素信号通路、糖酵解/糖异生和PI3K–Akt信号通路。

2.5 qRT–PCR验证结果

从图2可知,DEGs在qRT–PCR中的表达模式与RNA–seq中的结果均一致;ND180 vs ND1比较组中,*CALM3*、*EFCAB7*和*EGF*呈现上调的表达趋势,而*THBS3*和*THBS4*的表达下调;ND360 vs ND180比较组中,*BCL2*、*PIK3CA*、*THBS4*和*TLR4*呈现上调的表达趋势,而*PLA2G4B*和*RASGRP3*的表达下调;ND360 vs ND1比较组中,*EFCAB7*表现为上调的表达趋势,而*LPL*、*MYL6*、*PLCG1*和*THBS3*的表达下

调。基于qRT-PCR和RNA-seq结果,推测这些基因可能是影响宁乡猪肌肉生长发育的候选基因,其中,*THBS3*在ND180 vs ND1和ND360 vs ND1比较组中均下调,*THBS4*在ND180 vs ND1中显著下调,

而在ND360 vs ND180中显著上调,这表明*THBS3*和*THBS4*的表达方式与猪生长发育规律相反,推测它们可能负向调控骨骼肌的生长发育。



图柱上“**”“*”表示不同日龄间的差异有统计学意义($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

图2 不同比较组差异表达基因RNA-seq和qRT-PCR的表达水平

Fig.2 The expression levels of differentially expressed genes by RNA-seq and qRT-PCR in different comparison groups

3 结论与讨论

本研究中,ND300 vs ND240和ND360 vs ND300比较组中未筛选出与肌肉生长发育相关的通路,根据猪生长规律分析推测,这可能与宁乡猪在210 d后育肥基本完成有关。

作为THBSs家族的成员,*THBS2*、*THBS3*和*THBS4*影响着猪肌肉的生长发育。TANG等^[19]的研究表明,*THBS2*和*THBS3*在长白猪、通城猪和五指山猪胚胎期(65 d时)肌肉中的表达丰度存在显著差异,其中*THBS3*在通城猪肌肉中的表达水平较低。MA等^[20]研究发现,*THBS4*在通城猪肌肉中具有较

高的表达水平。由此可知,THBSs家族在不同猪种不同阶段骨骼肌中的表达存在差异,这种差异在猪出生后是否继续影响肌肉的生长发育尚不清楚。本研究中,*THBS3*在ND180 vs ND1比较组中下调,推测*THBS3*可能是在宁乡猪生长前期对肌肉增长发挥作用;*THBS4*分别在ND180 vs ND1和ND360 vs ND180中显著下调和上调,表明宁乡猪生长过程中*THBS4*呈现先降低后上升的表达模式。由此发现,*THBS3*和*THBS4*的表达方式与猪生长发育规律相反,推测它们可能负向调控骨骼肌的生长发育。

EGF是多功能细胞因子,主要通过调控Bax蛋

白的表达抑制细胞凋亡,从而影响胚胎发育^[21-22]。ZHANG等^[23]研究发现*BCL2*能直接调控鸡胸肌的生长发育或使其处于互作网络的中心。*LPL*的多态性与动物的生长和胴体性能密切相关,研究^[24-26]发现,在猪生长过程中,肌肉生长发育的速度与*LPL*的表达水平有关,机体内*LPL*的高表达能够增强生长期猪自身的脂肪酸代谢过程,从而影响动物的生长发育。本研究显示,肌肉中*LPL*的表达水平随猪的生长发育逐渐下降,与王刚等^[25]的结果一致;*EGF*在生长前期上调,而*BCL2*在后期上调,推断*EGF*和*BCL2*可能分别正向和负向调控骨骼肌的增长。

王利娜等^[27]研究发现,*PIK3CA*的表达对家兔骨骼肌卫星细胞的发育起正向调控的作用。*EFCAB7*和*CALM3*是一种钙结合蛋白,其中*CALM3*在细胞周期和细胞分裂中发挥作用^[28-29]。*PLA2G4B*和*PLA2G4E*是磷脂酶A2基因家族的成员,它们可能主要与炎症损伤修复、巨噬细胞吞噬等过程息息相关^[30]。YANG等^[31]通过对澳大利亚波尔山羊全基因组测序数据的分析,确定了与肌肉器官发育、肌肉细胞分化直接相关的基因,发现*PLA2G4E*、*CASQ2*等基因富集于与肌肉收缩有关的通路。TLRs是一种模式识别受体,识别病原体相关的分子模式并发出信号,其中,*TLR4*可以通过下调富含亮氨酸的胶质瘤失活1基因来抑制骨骼肌干细胞的增殖和成骨分化^[32-33]。*RasGRP3*是TLR介导炎症反应的调节因子^[34],但两者是否共同影响肌肉生长尚不清楚。据研究报道,肌球蛋白主要负责肌肉的生长和收缩,其中,功能性肌球蛋白大分子复合物是由*MYL1*、*MYL3*和*MYL6*编码的肌球蛋白轻链所构成,*MYL1*主要在快肌纤维中表达,其余基因表达于慢肌纤维^[35-38]。*PLCG1*在生长因子介导的细胞生长和增殖中至关重要^[39]。结合本试验结果与猪生长发育规律,推测*EFCAB7*、*PLA2G4B*和*RASGRP3*可能正向调控肌肉发育,*PIK3CA*、*TLR4*可能对宁乡猪肌肉生长起负向调控的作用,而*MYL6*和*PLCG1*在猪生长过程中可能正向或负向调控肌肉的生长发育。

与180日龄时相比,1日龄宁乡猪背最长肌中筛选出*EFCAB7*、*CALM3*、*THBS3*、*THBS4*和*EGF*等与肌肉生长相关的差异表达基因,推测它们可能是影响1日龄宁乡猪肌肉生长的候选基因;与360日龄

时相比,1、180日龄宁乡猪背最长肌中筛选出*EFCAB7*、*MYL6*、*PLCG1*、*PLA2G4B*、*THBS4*等影响肌肉生长发育的差异表达基因,推测其可能是影响1、180日龄宁乡猪肌肉生长的候选基因。此外,本研究还发现,这些基因主要参与骨骼肌细胞分化、钙离子结合和PI3K-Akt信号通路等过程。

参考文献:

- [1] CHEN F X, WU P F, SHEN M M, et al. Transcriptome analysis of differentially expressed genes related to the growth and development of the Jinghai Yellow chicken[J]. *Genes*, 2019, 10(7): 539.
- [2] RYU Y C, KIM B C. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle[J]. *Meat Science*, 2005, 71(2): 351-357.
- [3] RYU Y C, CHOI Y M, KIM B C. Variations in metabolite contents and protein denaturation of the longissimus dorsi muscle in various porcine quality classifications and metabolic rates[J]. *Meat Science*, 2005, 71(3): 522-529.
- [4] CHOE J H, CHOI Y M, LEE S H, et al. The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition, and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality[J]. *Meat Science*, 2008, 80(2): 355-362.
- [5] WRIGHT S A, RAMOS P, JOHNSON D D, et al. Brahman genetics influence muscle fiber properties, protein degradation, and tenderness in an Angus-Brahman multibreed herd[J]. *Meat Science*, 2018, 135: 84-93.
- [6] 赵园园, 孟金柱, 宋兴超, 等. 黔北黑猪骨骼肌中肌纤维类型转化相关circRNAs的筛选[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2024, 50(2): 71-77.
- [7] LI B, YANG J Z, GONG Y, et al. Effects of age on subcutaneous adipose tissue proteins in Chinese indigenous Ningxiang pig by TMT-labeled quantitative proteomics[J]. *Journal of Proteomics*, 2022, 265: 104650.
- [8] XING Y T, WU X, XIE C Y, et al. Meat quality and fatty acid profiles of Chinese Ningxiang pigs following supplementation with N-carbamylglutamate[J]. *Animals*, 2020, 10(1): 88.
- [9] GONG Y, HE J, LI B, et al. Integrated analysis of lncRNA and mRNA in subcutaneous adipose tissue of Ningxiang pig[J]. *Biology*, 2021, 10(8): 726.
- [10] 朱吉, 彭英林, 李述初, 等. 宁乡猪种质特性研究[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2008, 34(1): 47-51.
- [11] 胡志刚, 曹俊婷, 张建勤, 等. miRNA对畜禽肌肉生长发育调控的研究进展[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(6): 1204-1209.
- [12] 王义翠, 刘延鑫, 林华忠, 等. 四氯化碳诱导慢性肝

- 损伤模型小鼠的转录组学分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(5): 65–69.
- [13] CHAMBERS D C, CAREW A M, LUKOWSKI S W, et al. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing[J]. *Respirology*, 2019, 24(1): 29–36.
- [14] 刘伟, 郭光艳, 秘彩莉. 转录组学主要研究技术及其应用概述[J]. *生物学教学*, 2019, 44(10): 2–5.
- [15] 梁婉诗, 刘欣桐, 麦婉, 等. 组学技术在植物乳杆菌及其发酵食品中的研究进展[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(5): 376–385.
- [16] ZHANG X M, CAI S F, CHEN L X, et al. Integrated miRNA-mRNA transcriptomic analysis reveals epigenetic-mediated embryonic muscle growth differences between Wuzhishan and Landrace pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(5): 1967–1978.
- [17] 张萌萌, 刘文钦, 陈静, 等. GluN3A基因缺失影响小鼠抑郁样行为及内侧前额叶皮质与海马mRNA转录组的实验研究[J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(15): 1641–1650.
- [18] 齐波, 朱荣生, 王怀中, 等. 测定猪不同组织基因表达时RT-PCR内参基因的选择[J]. *家畜生态学报*, 2017, 38(6): 8–12.
- [19] TANG Z L, LI Y, WAN P, et al. LongSAGE analysis of skeletal muscle at three prenatal stages in Tongcheng and Landrace pigs[J]. *Genome Biology*, 2007, 8(6): R115.
- [20] MA X S, TANG Z L, WANG N, et al. Identification of extracellular matrix and cell adhesion molecule genes associated with muscle development in pigs[J]. *DNA and Cell Biology*, 2011, 30(7): 469–479.
- [21] 刘勇泽. EGF促进小鼠骨骼肌损伤再生的机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
- [22] 潘阳阳, 李秦, 崔燕, 等. EGF、EGFR在牦牛卵母细胞中的表达及对胚胎发育能力的作用[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(12): 2439–2448.
- [23] ZHANG Z R, DU H R, YANG C W, et al. Comparative transcriptome analysis reveals regulators mediating breast muscle growth and development in three chicken breeds[J]. *Animal Biotechnology*, 2019, 30(3): 233–241.
- [24] 柳杭, 韩越, 姜怀志. 脂蛋白分解酶基因(LPL)及其与家畜胴体品质的关系[J]. *畜牧与饲料科学*, 2019, 40(3): 60–65.
- [25] 王刚, 曾勇庆, 武英, 等. 猪肌肉组织LPL基因表达的发育性变化及其与肌内脂肪沉积关系的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(3): 253–257.
- [26] 颜赛娜, 陈斌. 基于Logistic和Gompertz模型拟合大白猪体重生长曲线的研究[J]. *经济动物学报*, 2023, 27(1): 21–25.
- [27] 王利娜, 陈仕毅, 贾先波, 等. 家兔PIK3CA和AKT3基因多态性及其与生长性状的关联性分析[J]. *四川农业大学学报*, 2016, 34(3): 374–380.
- [28] 崔丹, 姜月妍, 池嘉昌, 等. EFCAB7基因及其在肝细胞肝癌射频消融后局部复发中的应用: CN116286841A[P]. 2023–06–23.
- [29] 吴紫均. 基于转录组测序研究IL-27促进角质形成细胞增殖的分子机制[D]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- [30] GHOSH M, TUCKER D E, BURCHETT S A, et al. Properties of the group IV phospholipase A2 family[J]. *Progress in Lipid Research*, 2006, 45(6): 487–510.
- [31] YANG B G, YUAN Y, ZHOU D K, et al. Genome-wide selection signal analysis of Australian Boer goat reveals artificial selection imprinting on candidate genes related to muscle development[J]. *Animal Genetics*, 2021, 52(4): 550–555.
- [32] TAO H Y, TANG X Y, TAO H. TLR4 activation inhibits the proliferation and osteogenic differentiation of skeletal muscle stem cells by downregulating LGI1[J]. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2022, 78(3): 667–678.
- [33] XU J, BENABOU K, CUI X D, et al. TLR4 deters perfusion recovery and upregulates toll-like receptor 2 (TLR2) in ischemic skeletal muscle and endothelial cells[J]. *Molecular Medicine*, 2015, 21(1): 605–615.
- [34] LEE J H, KIM Y S, LEEM K H. Citri reticulatae pericarpium limits TLR-4-triggered inflammatory response in Raw264.7 macrophages by activating RasGRP3[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(18): 13777.
- [35] DESHMUKH A S, MURGIA M, NAGARAJ N, et al. Deep proteomics of mouse skeletal muscle enables quantitation of protein isoforms, metabolic pathways, and transcription factors[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015, 14(4): 841–853.
- [36] MCNAMARA J W, SADAYAPPAN S. Skeletal myosin binding protein-C: an increasingly important regulator of striated muscle physiology[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2018, 660: 121–128.
- [37] DENG Y J, XIE Q Q, ZHANG G Z, et al. Slow skeletal muscle troponin T, titin and myosin light chain 3 are candidate prognostic biomarkers for Ewing's sarcoma[J]. *Oncology Letters*, 2019, 18(6): 6431–6442.
- [38] MUNIZ M M M, FONSECA L F S, MAGALHÃES A F B, et al. Use of gene expression profile to identify potentially relevant transcripts to myofibrillar fragmentation index trait[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2020, 20(4): 609–619.
- [39] 白晓春, 罗深秋, 白洁, 等. 缺失*plcg1*基因引起成纤维细胞PI-3K信号上调[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2001, 33(6): 677–681.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 罗 维