

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.03.002

龙熙, 蓝静, 涂志, 等. 盆周山地猪肌肉脂肪沉积关键 mRNA 和 lncRNA 的筛选 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(3): 11-22.

盆周山地猪肌肉脂肪沉积关键 mRNA 和 lncRNA 的筛选

龙熙¹, 蓝静¹, 涂志¹, 张利娟¹,
王可甜¹, 陈四清^{1,2}, 郭宗义^{1,2}

1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 重庆市种猪场有限公司, 重庆 402460

摘要: 盆周山地猪是我国西南地区的优良地方猪种之一, 其开发利用对西南地区优质猪肉的供给意义重大。为了筛选盆周山地猪肌肉脂肪(IMF)沉积关键 mRNA 和 lncRNA, 利用转录组测序技术对其高、低 IMF 含量组的背最长肌进行分析。结果发现, 相对于高 IMF 组, 低 IMF 组中有 56 个 mRNA 显著上调, 27 个 mRNA 显著下调, 主要涉及的相关基因有 *MYH3*、*MYH13*、*PDK4*、*MSTN*、*FABP3* 等。GO 功能富集分析发现这些差异基因主要参与肌肉系统过程、脂肪酸氧化调控、肌肉器官发育等生物学过程。相对于高 IMF 组, 低 IMF 组有 144 个 lncRNA 显著下调, 93 个 lncRNA 显著上调。差异 lncRNA 靶向调控 413 个编码基因, GO 富集分析发现这些靶基因主要参与骨骼肌系统发育、脂肪细胞分化的正向调控等过程。此外, 还发现 2 个差异显著的 lncRNA 与 3 个差异显著的肉质编码基因(*FABP3*、*CTSD*、*PDK4*)存在潜在的靶向调控关系。

关键词: 盆周山地猪; IMF 沉积; 候选基因

中图分类号: S823.2

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2026)03-0011-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification and Characterization of Key mRNA and lncRNA Associated with Intramuscular Fat Deposition in Penzhou Mountain Pigs

LONG Xi¹, LAN Jing¹, TU Zhi¹, ZHANG Lijuan¹,
WANG Ketian¹, CHEN Siqing^{1,2}, GUO Zongyi^{1,2}

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

2. Chongqing Municipal Breeding Pig Farm Co., Ltd., Chongqing 402460, China

收稿日期: 2025-06-25

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1301105); 重庆现代农业产业技术体系项目(CQMAITS202312)。

作者简介: 龙熙, 硕士, 副研究员, 主要从事猪遗传育种与繁殖研究。

通信作者: 郭宗义, 硕士, 研究员。

Abstract: The Penzhou mountain pig is one of the superior indigenous pig breeds in Southwest China, and its development and utilization are of great importance for the supply of high-quality pork in the region. To identify key mRNA and long non-coding RNAs (lncRNA) involved in intramuscular fat (IMF) deposition, this study performed transcriptome sequencing on the longissimus dorsi muscle of pigs with high and low IMF content. Compared to the high-IMF group, 56 mRNA were significantly upregulated and 27 were significantly down regulated in the low-IMF group. These differentially expressed genes (DEGs) included *MYH3*, *MYH13*, *PDK4*, *MSTN*, and *FABP3*. Gene ontology (GO) enrichment analysis indicated that these DEGs were mainly involved in biological processes such as muscle system processes, regulation of fatty acid oxidation, and muscle organ development. Furthermore, compared to the high-IMF group, 144 lncRNA were significantly downregulated and 93 were significantly upregulated in the low-IMF group. These differentially expressed lncRNA targeted 413 protein-coding genes, and GO enrichment analysis indicated that these target genes were mainly associated with skeletal muscle system development and positive regulation of adipocyte differentiation. Notably, two differentially expressed lncRNA were found to have potential regulatory relationships with three meat quality-related genes (*FABP3*, *CTSD*, and *PDK4*).

Key words: Penzhou mountain pig; IMF deposition; candidate genes

随着生活水平的不断提高,人们对猪肉品质的追求也越来越高。猪肉品质性状的遗传改良已成为当前的主要研究方向。中国拥有丰富的地方猪资源,这些猪种普遍具有优良的肉质特性,是肉质性状遗传改良的重要遗传素材。深入研究地方猪肉品质性状的分子调控机制,挖掘和鉴定与肉质性状相关的调控基因,对于加速肉质性状的遗传改良具有重要意义,也是我国打赢“种业翻身仗”的基础。

猪肉的肌内脂肪(IMF)含量与风味、嫩度和多汁性呈正相关关系,是衡量猪肉品质的关键指标^[1-2]。因此,揭示 IMF 形成和沉积的分子机制对改善猪肉品质至关重要。近年来,关于中国地方猪 IMF 沉积的遗传机制已有一些研究。例如,对宁乡猪不同发育阶段的肌肉组织进行转录组、miRNA 和蛋白组联合分析,发现 571 对负向互作的 miRNA-mRNA 以及 2 对负向互作的 miRNA-mRNA-蛋白^[3];对调控莱芜猪肌内和皮下脂肪的 miRNA 和 circRNA 进行分析,发现 circRNA_06 424 通过与 ssc-miR-339-5p、ssc-miR-744 和 ssc-miR-328 等 miRNA 竞争性结合,影响 *PPARD*、*MMP9*、*UBA7* 等靶基因表达,并参与 PPAR 信号通路、Wnt 信号通路、不饱和脂肪酸等信号通路,从而影响莱芜猪 IMF 和皮下脂肪沉积的差异^[4];通过比较淮猪和杜洛克猪不同部位肌肉组织的基因表达差异,分别在背最长肌、腰大肌和肱二头肌中筛选出了 175、110 和 86 个差异表达基因^[5];利用全基因组关联分析的方法,对 453 头鲁莱黑猪基因组中与 IMF 沉积相关的 SNP 位点进行挖掘,共鉴定出 43 个 IMF 沉积相关的 SNP 位点,注释到 42 个基因^[6];此外,对贵州香猪和大白猪背最长肌之间的转录组差异进行比较分析,鉴定出 227 个肉质性状相关的候选基因,其中 *MYOD1*、*ACTB*、*ASNS*、*FOXO1*、*ARG2*、*SLC2A4*、*PLIN2* 和 *SCD* 等 29 个为贵州香猪肉品质性状的关键基因(hub-gene)^[7];对快速沉脂阶段(120 和 240 日龄)的皖南花猪背最长肌进行蛋白组学分析,鉴定出 106 种差异蛋白,并结合转录组数据筛选出 7 个脂肪沉积候选基因^[8];对圩猪和杜洛克猪肌肉组织中的转录组差异进行比较,鉴定出 717 个差异表达基因,这些差异表达基因与骨骼肌细胞分化、磷脂分解过程和细胞外基质结构成分显著相关^[9]。然而,当前对品种内不同个体 IMF 沉积差异的遗传调控机制还鲜有报道。

盆周山地猪是我国优良地方猪种之一,原产于大巴山、巫山、大娄山、武陵山一带。重庆市主要分布于其辖区的酉阳县(24.6%)、黔江区(22.7%)、彭水县(13.3%)、秀山县(11.4%)、城口县(9.5%)、巫山县

(7.5%)及其他相邻区县(11.0%)。四川省主要分布于泸州市(3.4%)、广元市(4.5%)、广安市(4.2%)、达州市(13.4%)、巴中市(21.8%)、宜宾市(17.4%)和南充市(35.3%)等地。2008年起,重庆海林生猪发展有限公司从重庆市酉阳县引入盆周山地猪开展保种和开发利用工作。2014年,依托该公司正式建立盆周山地猪市级保种场,场内采用闭锁繁育方式进行保种,保护群体遗传多样性并维持其遗传结构稳定。盆周山地猪具有沉脂力强、肌纤维细嫩、肉质好、肌肉系水力强等优点^[10]。但前期研究发现,盆周山地猪肌肉中 IMF 含量在群体内的一致性较差,这可能影响其在优质猪肉生产中的进一步应用。因此,揭示盆周山地猪 IMF 沉积差异的分子调控机制对其肉质改良至关重要。然而,目前尚未有针对盆周山地猪 IMF 沉积差异分子机制的研究。本研究以高、低 IMF 含量的盆周山地猪为研究对象,利用高通量测序技术对两者背最长肌进行转录组测序分析,筛选两者差异表达的 mRNA 和 lncRNA,并对这些差异 mRNA 和 lncRNA 进行生物信息学分析,筛选出影响盆周山地猪 IMF 含量的关键候选 mRNA 和 lncRNA。研究结果加深了对盆周山地猪 IMF 沉积的理解,也为盆周山地猪肌肉品质的选育提供了分子依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用相同日龄的 26 头盆周山地猪个体选自盆周山地猪市级保种场,并在保种场内统一条件下饲养、自由采食和饮水。达 90 ± 5 kg 体重时在重庆市涪陵区南沱镇屠宰场屠宰,统一采集 2~3 腰椎处的背最长肌,用于后续 IMF 含量测定、RNA 提取、油红 O 染色。其中, RNA 提取样本迅速置于液氮中,运回实验室后于 -80 °C 冰箱保存;油红 O 染色样本用 4% 多聚甲醛固定;剩余样本于低温环境运送至农业农村部种猪质量监督检验测试中心(重庆),打碎、称重后 -20 °C 保存,用于 IMF 测定。

1.2 IMF 含量测定

根据中华人民共和国农业行业标准《猪肉品质测定技术规程》(NY/T 821—2019)的要求,采用索氏浸提法进行 IMF 含量的测定。依据每个样品 IMF 含量的测定值,2.5% 为极低 IMF 含量组的筛选阈值,5.0% 为极高 IMF 含量组的筛选阈值筛选出盆周山地猪群体内极低 IMF 含量组个体 3 头、极高 IMF 含量组个体 5 头。

1.3 油红 O 染色

通过油红 O 对目标组织进行染色,可以确定目标组织中脂类物质沉积的情况。具体步骤如下:将采集的背最长肌修剪成 2 mm 左右的长度后放入 OCT 包埋胶中,于恒温冰冻切片机中进行包埋。待 OCT 胶凝固后,于恒温冰冻切片机中连续切片,制成厚度为 $6 \mu\text{m}$ 的切片。将切片于甲醛中固定 10 min 后用蒸馏水清洗,再用 60% 的异丙醇浸洗。随后,将切片浸泡在油红 O 染液中 10 min 后,再将切片浸入 60% 异丙醇分色至背景无色。然后,用蒸馏水清洗切片后用苏木精复染 1 min。最后,用蒸馏水清洗切片,待切片晾干后用甘油封片。

1.4 总 RNA 提取及建库

利用 Trizol 试剂提取每个背最长肌样本的总 RNA,用 Nanodrop 2000 检测 RNA 的浓度和纯度,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,Agilent 2100 检测样本的 RIN 值。对检测合格的样品利用 Illumina PE150 测序平台进行建库和测序,相关工作在北京百迈客生物科技有限公司完成。

1.5 数据的质控、比对及组装

利用 FastQC 软件,采用如下质控标准对原始数据进行质量控制:① 去除含接头的 reads;② 去除质量低的 reads(质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整条 reads 的 50% 以上);③ 去除片段长度小于 50 bp 的 reads;④ 去除含 N 比例大于 10% 的 reads。利用 STAR 软件将质控后的高质量数据比对到猪的参考基因组(Sscrofa 11.1)上。利用 Cufflinks(2.2.1)软件对比对到基因组的数据进行组装。随后,用

Assemblyline 软件对转录本进行单外显子的过滤,并通过 TACO 对所有转录本进行合并,筛选去除含有 clipped exon(exon 长度小于 15 个碱基)、FPKM(每百万映射读取的每千碱基片段数, Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)低于 0.1 以及长度小于 250 个碱基的转录本。再通过与基因组对比,判断是否有已注释基因或转录本的存在。对于不能被基因组注释的转录本,通过 CPC2 软件判断其蛋白编码潜能(编码或非编码)。接着,用 Pfamscan 软件分别对所有编码和非编码的转录本进行蛋白数据库(Pfam31)的比对,分别统计每个蛋白域比对上的转录本(编码或非编码)数量,并通过 fisher 方法检验编码与非编码转录本都比对上的蛋白域的相似性(当 $p > 0.05$ 或 $OR < 10$ 时,认为非编码对应的蛋白域更趋向于编码,其中 OR 为优势比),没有被基因组注释的编码转录本即为 TUCP(Transcripts with Unknown Coding Potential),其余为 lncRNA。最后通过 kallisto 软件对 mRNA 和 lncRNA 进行定量和 count 数目的统计。

1.6 mRNA 及 lncRNA 的差异表达分析

利用 edgeR 软件包进行 mRNA 及 lncRNA 的差异表达分析,以 $|\log_2 FC| > 0.75$ 、 $FDR < 0.05$ 为标准筛选差异表达基因,其中 FC (Fold Change)为差异倍数, FDR 为(False Discovery Rate)阳性错误率。利用 Metascape 网站(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)对差异表达基因进行 GO(Gene Ontology, 基因本体论)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 京都基因与基因组百科全书)功能富集分析,以 $p < 0.01$ 为显著富集条目和通路。

1.7 差异表达 lncRNA 的靶基因的预测

将 lncRNA 基因组位置上下游 100 kB 的基因认为是 lncRNA 的顺式作用靶基因。反式作用靶基因预测的基本原理认为 lncRNA 的功能跟编码基因的位置没有关系,而与其共表达的蛋白编码基因相关。可以通过样本间 lncRNA 与蛋白编码基因的表达量相关性分析来预测其靶基因。将 lncRNA-mRNA 之间的 Pearson 相关系数大于 0.9 或小于 -0.9 但 $p < 0.05$ 的基因判定为 lncRNA 的反式作用靶基因。

1.8 测序结果可靠性分析

为了验证测序结果的可靠性,分别挑选 10 个差异表达的 mRNA 和 lncRNA(上调、下调各 5 个)进行 RT-PCR 验证。使用 β -actin 基因作为内参基因,所有引物信息见表 1,所有引物均在苏州金唯智生物科技有限公司合成。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的表达量。

表 1 引物信息统计表

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>KRT71</i>	ATGCCAATAAGGTGGAGCTG	TGATGCTGTCCAAGTTCAGG
<i>TDRD1</i>	GTGTGTGCTGGCAGGAGTAA	CTTGGGTGACACTGATGTGG
<i>ATP8A2</i>	GCCTCTCAAGAGATCCAACG	TGTCTGAGCTCGTGTCCATC
<i>MYH3</i>	CCAAGTCAGAGGCAAAGAGG	TCCAGCTGAAACTTGGCTTT
<i>MSTN</i>	CGATCATTACCATGCCTACAGAGTC	CACAGTTGGGCCTTTACTACTTTATT
<i>CTSD</i>	GTGTCCGGTGCCCTGTAATTC	TACCACGTTGTTACACGGAGA
<i>PDK4</i>	TTCCCTGAGGATCATTGAC	GAGACGAGAAATTGGCAAGC
<i>FABP3</i>	CACTGGATGGAGGCAAACCTT	TCGTAAGTGCAGTGCAAAC
<i>CYP4B1</i>	AGCCTGTCAGCTTTGTGGAT	TCCAGCCATATTCTCCAAGG
<i>HBE1</i>	CCCAGAGTTCTTTGACAGC	CCCTTGAGGTTGTCCATGTT
ENSSSCG00000033387	AACAAAACACATGACCCCGAGTA	ATCTTGGTGGAAGGTGGAACAA
ENSSSCG00000046503	TCCCCAGGAAGGCAGTTTTTC	GTCTGACTGTGACTTCCCCG
ENSSSCG00000047059	CTTCTCCCCAGGCTCCAGT	GCCCAACCAAGTGGGTTTTTC
ENSSSCG00000042429	CTGACGACTCAACGAGCAGA	ATCACCAGAAATCCCCGAGC

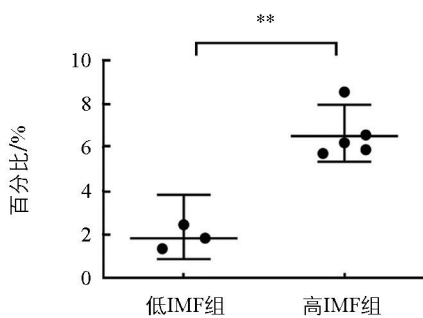
续表 1

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
ENSSSCG00000045292	CGCGATGTGCATTCTGTCTG	GGATGAGGTGTCCCTAGAACAA
ENSSSCG00000044824	GAGGGAGGCTGCAATTCACT	ATCCTGGATCCCTGGGGTTA
ENSSSCG00000042514	TATGATGCAAGCTCTTTCATGGC	ATGCGACATCTCCAGATCAC
ENSSSCG00000050868	TGTGTAGTTTGGAGGCCATT	GTGAACGAGGTGAGACGGTA
ENSSSCG00000036144	TCCTGGAGACTGGACCTGAG	ACTGTTCTGCTGATGACCC
ENSSSCG00000042862	TGTTAGGCTCAGTGGGGACT	ACTCAGATGGAACCTCCGGT
β -actin	AATCCTGCGGCATCCACGAAAC	CAGCACCGTGTGGCGTAGAG

2 结果与分析

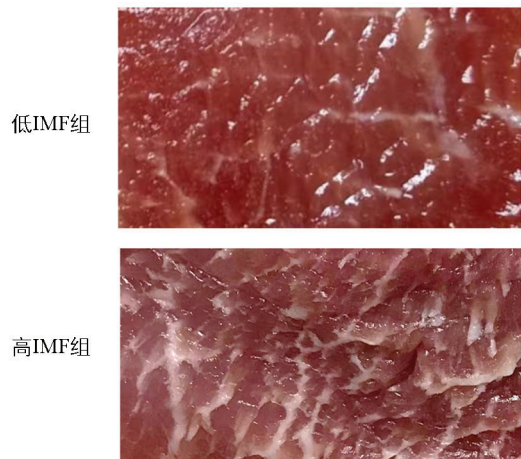
2.1 盆周山地猪 IMF 含量测定及形态学分析

利用索氏抽提法进行 IMF 测定, 依据 IMF 脂肪含量测定结果, 分别命名为高 IMF 组和低 IMF 组, 其中高 IMF 组平均 IMF 含量为 $6.58 \pm 1.14\%$, 低 IMF 组平均 IMF 含量为 $1.87 \pm 0.55\%$ (图 1a)。高、低 IMF 组肌肉横切面及油红 O 染色结果如图 1b、1c 所示, 表明高 IMF 组肌肉组织内 IMF 分布比低 IMF 组更广。

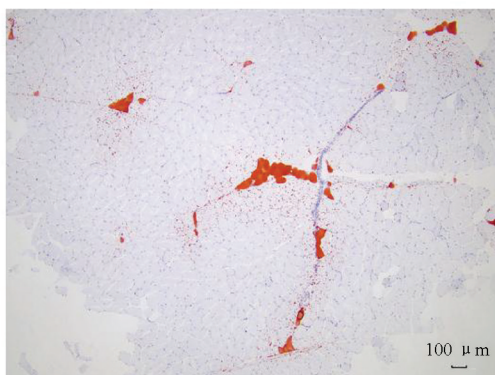


**代表差异极显著。

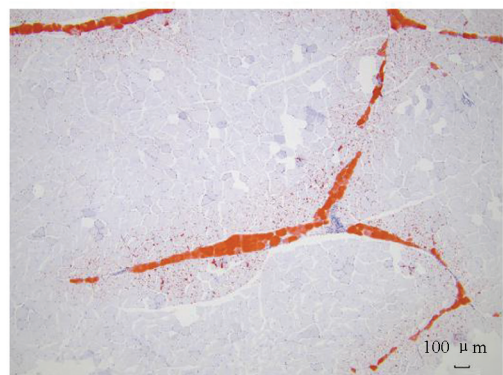
a. 高、低IMF组IMF含量统计



b. 高、低IMF组肌肉横切面



低IMF组



高IMF组

c. 高、低IMF组肌肉油红O染色

图 1 高、低 IMF 组 IMF 含量、横切面及油红 O 染色

2.2 测序结果的比对分析

对测序结果进行质控,共获得 8 个样本总计 157.78 GB 的 clean reads,每个样本至少获得 17.48 GB 的 clean reads。将 clean reads 比对到猪参考基因组(Scrofa 11.1)发现,样本的总比对序列数占比为 96.82%~97.83%,唯一比对序列数占比为 78.92%~89.91%,多重比对序列数占比为 7.55%~17.90%(表 2),测序数据质量整体较好,可以进行后续分析。

表 2 测序数据基因组比对统计

样品名称	数据量/GB	干净序列数	总比对序列数	唯一比对数	多重比对序列数
L1	20.04	67 035 015	65 465 592(97.66%)	59 283 986(88.44%)	6 181 606(9.22%)
L2	17.76	59 385 219	58 019 521(97.70%)	52 682 223(88.71%)	5 337 298(8.99%)
L3	18.28	61 124 282	59 330 518(97.07%)	53 318 700(87.23%)	6 011 818(9.84%)
H5	19.84	66 345 393	64 906 400(97.83%)	58 821 609(88.66%)	6 084 791(9.17%)
H4	19.60	65 552 204	63 881 852(97.46%)	58 934 822(89.91%)	4 947 030(7.55%)
H3	20.11	67 250 633	65 585 059(97.53%)	56 628 591(84.21%)	8 956 468(13.32%)
H2	24.68	82 531 463	80 250 263(97.24%)	67 833 217(82.19%)	12 417 046(15.05%)
H1	17.48	58 470 301	56 607 788(96.82%)	46 144 951(78.92%)	10 462 837(17.90%)

2.3 基因差异表达及功能分析

利用 edgeR 软件包进行 mRNA 筛选,以 $|\log_2 FC| > 0.75$ 、 $FDR < 0.05$ 为显著表达差异条件。结果表明高、低 IMF 组之间共有 83 个差异显著 mRNA,相对于高 IMF 组,低 IMF 组中有 56 个 mRNA 显著上调,27 个 mRNA 显著下调(图 2),主要涉及的相关基因有 *MYH3*、*MYH13*、*PDK4*、*MSTN*、*FABP3* 等(图 3)。对差异表达基因进行 GO 条目分析发现,共有 111 个条目显著富集($p < 0.05$),主要参与肌肉系统过程、脂肪酸氧化调控、肌肉器官发育等生物学过程(图 4)。这些显著富集的 GO 条目中,14 个与肌肉和脂肪相关,主要参与肌肉发育、脂肪酸氧化、脂肪酸代谢、葡萄糖代谢、脂质转运等过程(图 5)。KEGG 功能富集分析结果表明,这些差异基因显著富集的信号通路有 4 个,即:甲状腺激素的合成、分泌和作用,胃酸分泌,糖尿病性心肌病以及胰液的分泌。

2.4 差异 lncRNA 表达分析

以 $|\log_2 FC| > 0.75$ 、 $p < 0.05$ 为显著表达差异条件筛选差异 lncRNA。结果表明,两组之间共有 237 个已知的差异 lncRNA。相较于高 IMF 组,低 IMF 组中有 144 个 lncRNA 显著下调,93 个 lncRNA 显著上调(图 6)。

2.5 lncRNA 的靶基因预测

基于 lncRNA 在染色体上的位置,在差异显著 lncRNA 的上下游 100 kB 范围内共找到 *KIF5A*、

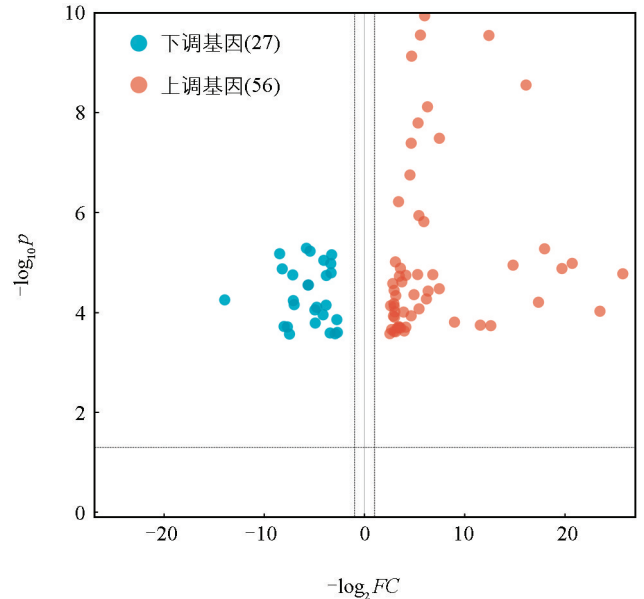


图 2 差异 mRNA 分析

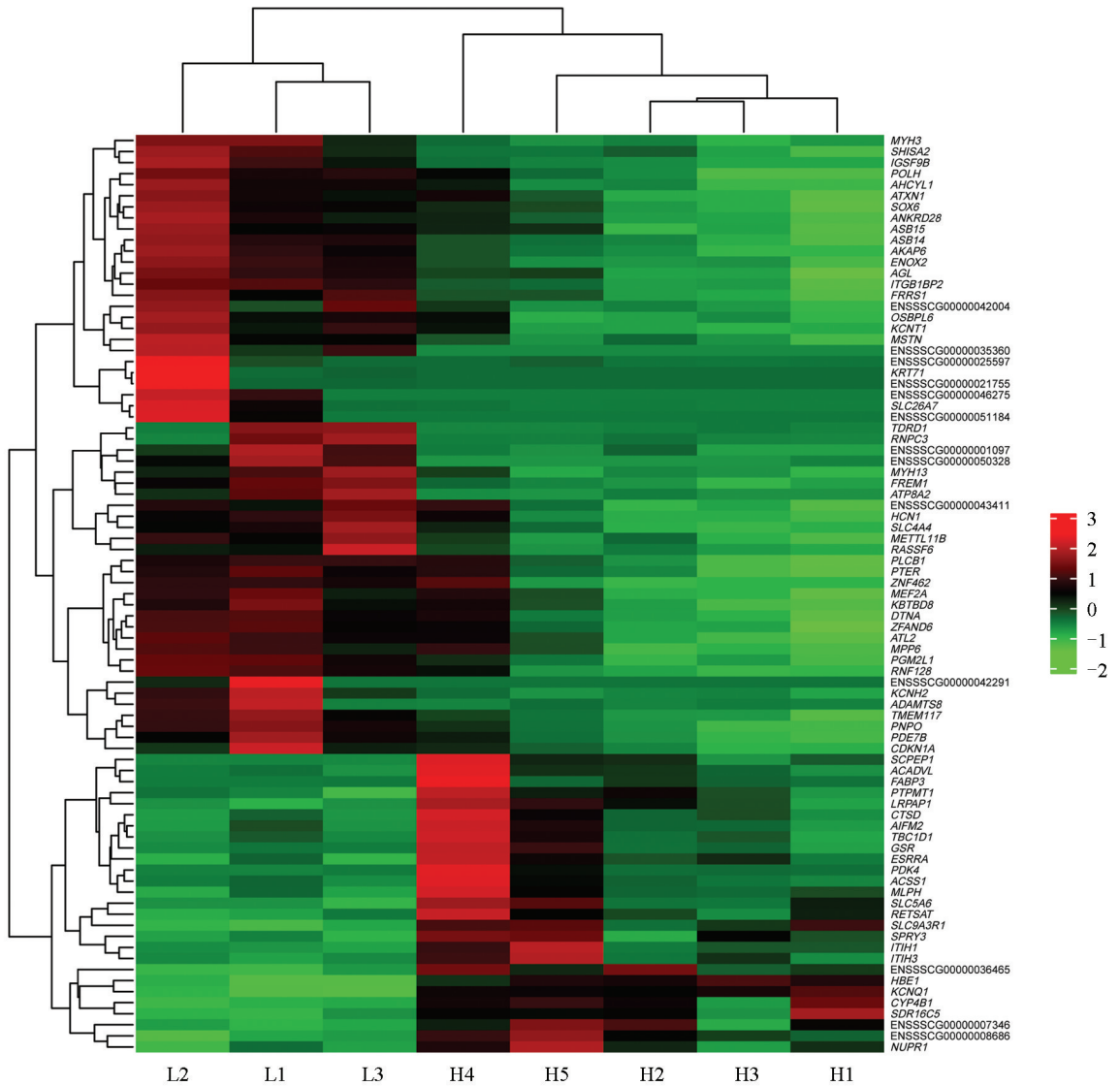


图 3 差异 mRNA 热图

ACO3、*PDK4*、*KLF12*、*KLF3*、*LEP* 等 413 个编码基因(顺式作用靶基因)。GO 富集分析发现, 这些基因在 405 个 GO 条目中显著富集, 包括骨骼肌系统发育、瘦素介导的信号通路、脂肪细胞分化的正向调控等生物学过程(图 7)。KEGG 信号通路分析结果表明, 这些基因富集在细胞周期、细胞衰老、脂质和动脉粥样硬化及非酒精性脂肪肝等信号通路(图 8)。基于 lncRNA-mRNA 之间的 Pearson 相关系数, 在这些差异显著的 lncRNA 中, 共鉴定得到 11 个 lncRNA 与 515 个编码基因存在相关关系。其中有 6 个差异显著的 lncRNA 与 11 个差异显著的编码基因之间存在相关关系。此外, 有 2 个差异显著的 lncRNA 与 3 个差异显著的肉质相关编码基因存在潜在的靶向调控关系(表 3)。

表 3 差异表达 mRNA、lncRNA 的互作分析

lncRNA ID	lncRNA 表达	基因名称	mRNA 表达	Pearson 相关系数	<i>p</i>
ENSSSCG00000044255	下调	<i>FABP3</i>	下调	0.925 092	0.000 126
ENSSSCG00000044255	下调	<i>CTSD</i>	下调	0.917 318	0.000 185
ENSSSCG00000048256	下调	<i>PDK4</i>	下调	0.913 965	0.000 216

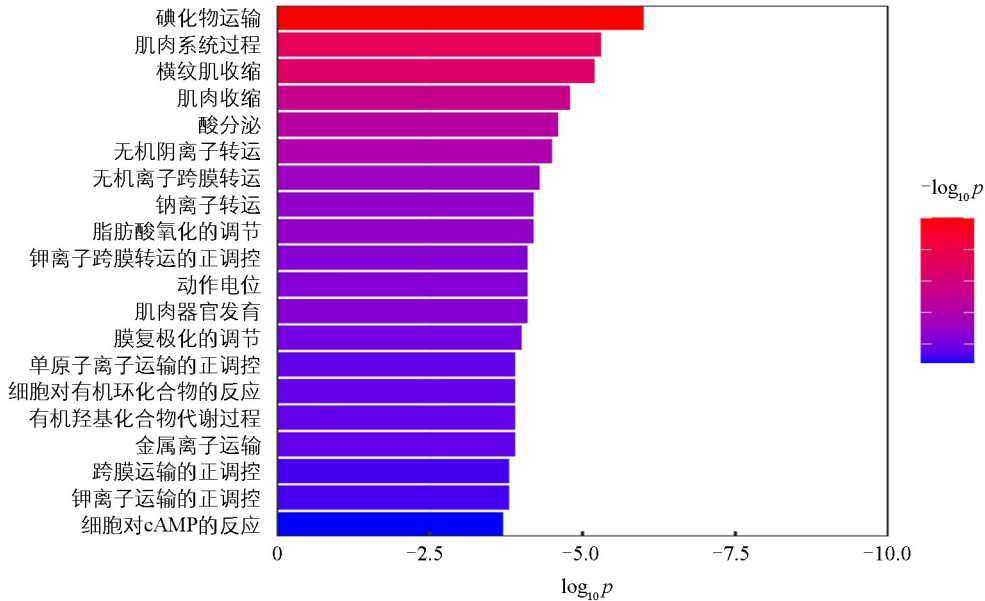


图 4 差异表达基因显著富集的前 20 条 GO 条目

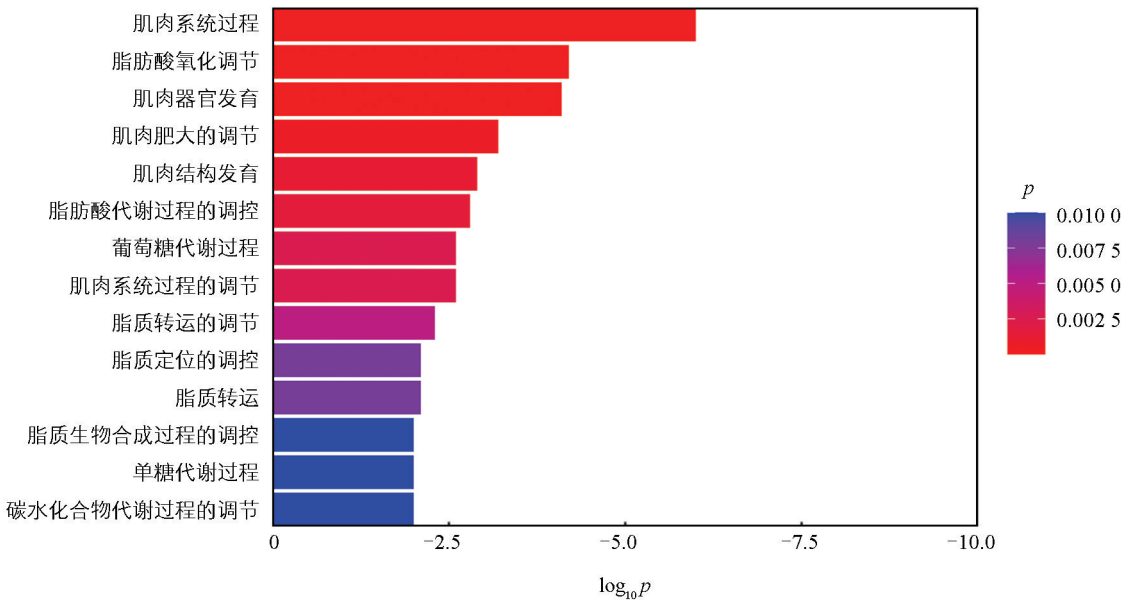


图 5 差异表达基因显著富集的肌肉、脂肪相关 GO 条目

2.6 测序结果的实时荧光定量 PCR 验证

为了验证转录组测序结果的准确性,随机选取 10 个 mRNA 和 lncRNA 进行实时荧光定量 PCR 验证。结果发现,所验证的 mRNA 和 lncRNA(低 IMF 组 vs 高 IMF 组)表达趋势与转录组测序的表达趋势(低 IMF 组 vs 高 IMF 组)一致(图 9),表明此次转录组测序结果可靠性高,可以用于后续研究。

3 讨论与结论

3.1 讨论

盆周山地猪是我国优良地方猪种之一,平均 IMF 含量与肌肉的理想 IMF 含量 3%~5% 相符,是优良的育种素材,但是其 IMF 含量在群体内的一致性较差,这将对后期的利用产生影响。本研究以这一问题为出发点,通过比较高、低 IMF 含量猪只背最长肌的 mRNA 和 lncRNA 表达差异,筛选盆周山地猪

IMF 沉积差异的候选 mRNA 和 lncRNA, 以期 为盆周山地猪肉质的选育提供分子依据。本 研究首先通过索氏抽提法结合油红 O 染色在 盆周山地猪群体中筛选出了高 IMF 组和低 IMF 组, 高 IMF 组平均 IMF 含量 ($6.58 \pm 1.14\%$) 是低 IMF 组 ($1.87 \pm 0.55\%$) 的 3.5 倍(图 1a), 说明在盆周山地猪群体中个体之 间 IMF 的含量有很大差异, 有必要进一步挖 掘调控盆周山地猪 IMF 沉积的关键基因。

随后对高 IMF 组和低 IMF 组肌肉组织进 行了转录组测序, 测序结果发现高 IMF 组和 低 IMF 组之间共有 83 个差异表达的 mRNA, 推测这些差异表达基因可能与两组猪 IMF 含 量差异相关, 为了探究这些基因的生物学功

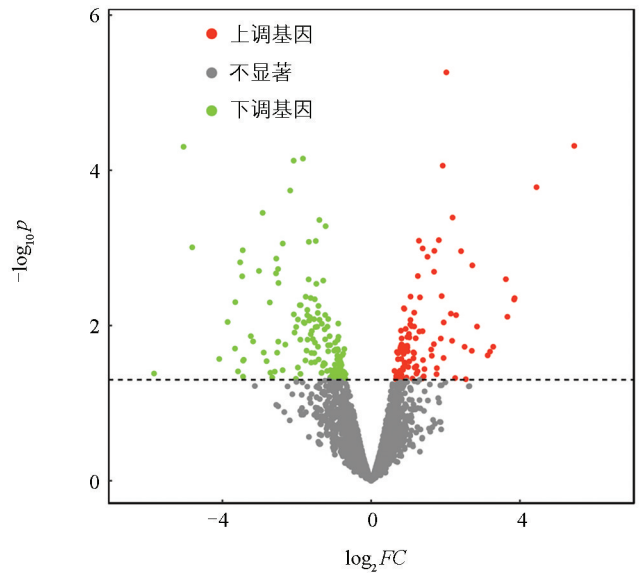


图 6 差异 lncRNA 表达分析

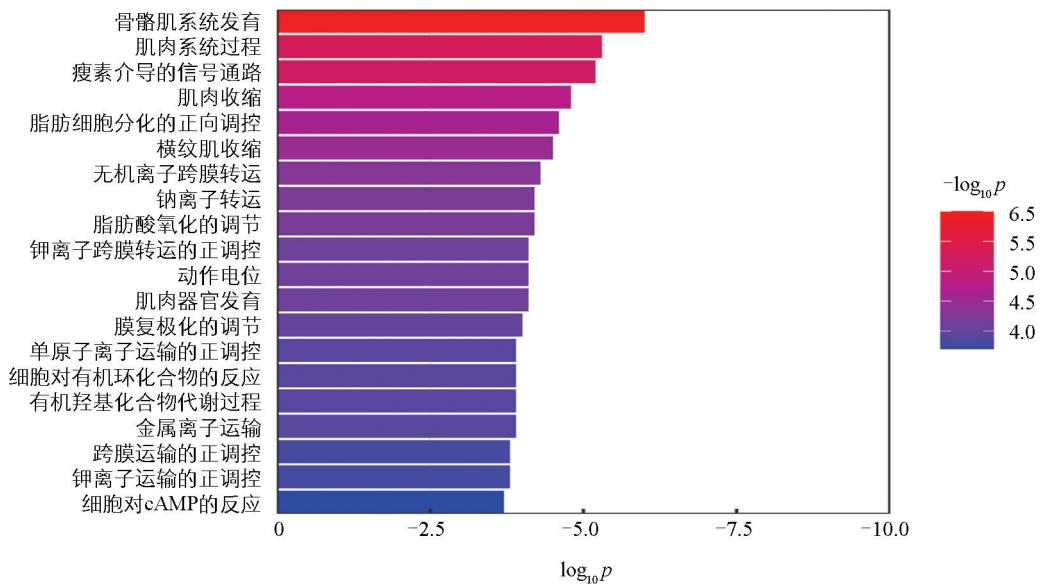


图 7 差异 lncRNA 靶基因显著富集的前 20 条 GO 条目

能, 对这些基因进行了 GO 功能富集分析, 分析结果中值得注意的有脂肪酸氧化调节、脂肪酸代谢过程、葡萄糖代谢过程、脂质转运、脂质生物合成过程、单糖代谢过程、碳水化合物代谢过程等与能量代谢相关的过程, 推测高 IMF 组和低 IMF 组猪 IMF 沉积能力的差异是由脂质、能量代谢相关基因的差异表达造成的。转录组测序结果还发现高 IMF 组和低 IMF 组之间有 237 个差异表达的 lncRNA, 为了明确差异表达 lncRNA 的潜在功能, 对这些差异表达 lncRNA 进行了顺式作用靶基因的预测, 共预测出 413 个基因, 并对这些靶基因进行了 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。GO 分析结果显示这些靶基因主要富集在骨骼肌系统发育、瘦素介导的信号通路、脂肪细胞分化的正向调控等生物学过程。KEGG 发现这些靶基因主要富集在细胞周期、细胞衰老、脂质和动脉粥样硬化及非酒精性脂肪肝等信号通路。基于 lncRNA-mRNA 之间的 Pearson 相关系数, 筛选出有 2 个差异显著的 lncRNA 与 3 个差异显著的肉质相关编码基因存在潜在的靶向调控关系, 这 3 个基因分别为 *FABP3*、*PDK4* 和 *CTSD*。因此推测, lncRNA 通过

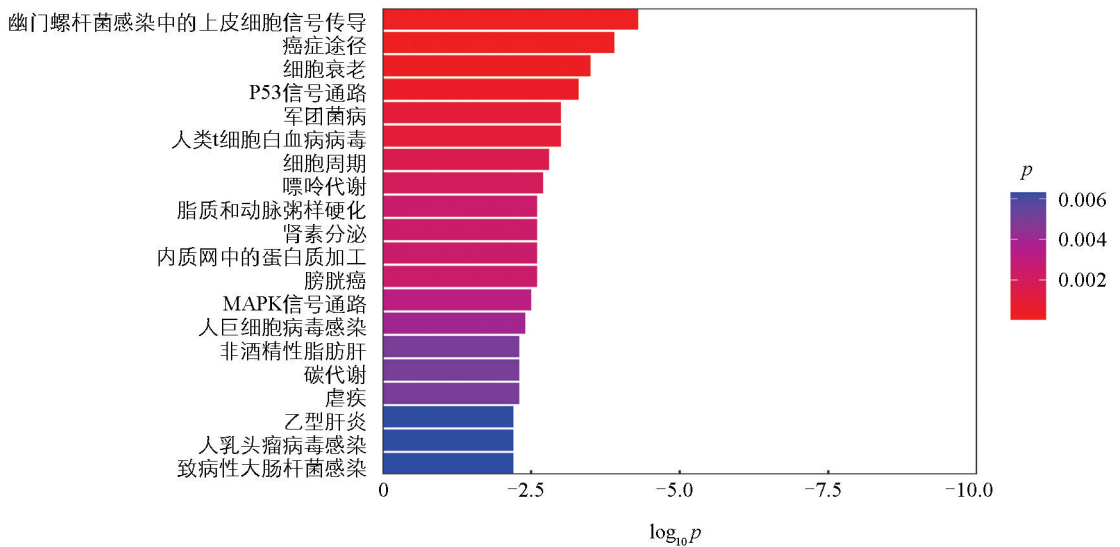
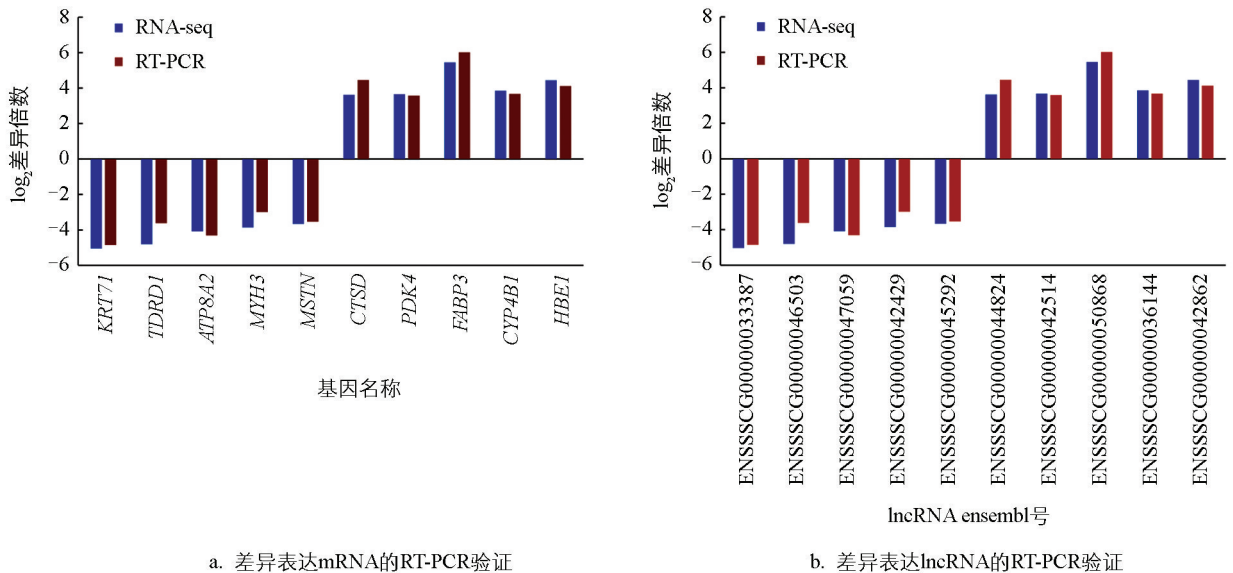


图 8 差异 lncRNA 靶基因显著富集的前 20 条 KEGG 信号通路



a. 差异表达mRNA的RT-PCR验证

b. 差异表达lncRNA的RT-PCR验证

图 9 差异表达 mRNA 和 lncRNA 的 RT-PCR 验证

调控这些基因的表达影响盆周山地猪 IMF 的沉积过程。

腺苷三磷酸酶家族中有 4 种丙酮酸脱氢酶激酶(Pyruvate Dehydrogenase Kinase, PDKs)同工酶,分别为 *PDK1*、*PDK2*、*PDK3* 和 *PDK4*^[11]。*PDK4* 参与动物体内三羧酸循环、脂肪代谢、糖酵解、ATP 的形成等多个新陈代谢过程^[12],在人和小鼠的心脏、肝脏、骨骼肌和脂肪组织中有较高表达量^[11]。在家畜各组织中,*PDK4* 基因在肌肉和脂肪组织中表达量较高,在屯昌猪背最长肌中表达量最高^[13],在陆川猪和大白猪的皮下脂肪表达量最高^[14-15],在巴马香猪和杜长大猪的腹脂中高表达^[16],提示 *PDK4* 在家畜肌肉和脂肪生长过程中具有重要作用。已有研究发现,*PDK4* 的表达量与鸡的脂肪沉积速度相关^[17],*PDK4* 的过表达能够增加猪的脂肪代谢效率^[15],且 *PDK4* 基因的 SNP 位点与 IMF、肌肉系水力等肉质性状具有相关性^[18-19]。*PDK4* 可以抑制丙酮酸向乙酰 CoA 转化^[20],乙酰 CoA 减少后会引引起脂肪酸氧化抑制剂丙二酰辅酶 A 的减少,说明 *PDK4* 的上调表达可以促进脂肪酸氧化^[21]。*PDK4* 敲基因小鼠禁食后,随着血糖降低,脂肪酸氧化速率降低,葡萄糖和丙酮酸氧化速率增加,且增加速率一致^[22]。结合以上的研究结果和本研究的结果,推测 *PDK4* 基因可能是影响盆周山地猪 IMF 沉积的关键候选基因。

脂肪酸结合蛋白(Fatty Acid Binding Protein, FABPs)作为脂质结合蛋白超家族的成员,广泛参与动物体脂质代谢和脂肪沉积等过程^[23],对脂肪酸具有很强的亲和性^[24],其中 *FABP3* 基因目前广泛被认为是调控 IMF 沉积的候选基因,主要通过参与细胞中长链脂肪酸的摄取、转运和利用实现脂肪代谢调节^[25],目前有大量研究证实 *FABP3* 基因多态性与猪 IMF 之间存在显著相关性^[26-28]。本研究的转录组测序结果发现,盆周山地猪高 IMF 组和低 IMF 组的背最长肌 *FABP3* 基因 mRNA 的表达差异显著,推测 *FABP3* 基因是调控盆周山地猪 IMF 沉积的重要基因。

3.2 结论

本研究通过转录组测序在盆周山地猪高 IMF 组和低 IMF 组的背最长肌中共鉴定出了 83 个差异表达 mRNA 和 237 个差异表达的 lncRNA。差异表达 lncRNA 和 mRNA 主要在脂质、能量代谢相关的信号通路中富集。lncRNA-mRNA 互作分析筛选出了 2 个差异显著的 lncRNA (ENSSSCG00000044255、ENSSSCG00000048256)与 3 个差异显著的肉质相关编码基因(*FABP3*、*PDK4* 和 *CTSD*)存在潜在的靶向调控关系,因此推测这些 lncRNA 和 mRNA 是影响盆周山地猪 IMF 沉积的重要候选基因。

参考文献:

- [1] TAN L L, CHEN Z J, TENG M D, et al. Genome-Wide Analysis of mRNAs, lncRNAs, and circRNAs during Intramuscular Adipogenesis in Chinese Guizhou Congjiang Pigs [J]. PLoS One, 2022, 17(1): e0261293.
- [2] WANG L X, XIE Y H, CHEN W, et al. Identification and Functional Prediction of Long Noncoding RNAs Related to Intramuscular Fat Content in Laiwu Pigs [J]. Animal Bioscience, 2022, 35(1): 115-125.
- [3] CHEN W W, XIAO Y, YANG F, et al. Integrated Analysis of Muscle Transcriptome, miRNA, and Proteome of Chinese Indigenous Breed Ningxiang Pig in Three Developmental Stages [J]. Frontiers in Genetics, 2024, 15: 1393834.
- [4] FENG H, YOUSUF S, LIU T Y, et al. The Comprehensive Detection of miRNA and circRNA in the Regulation of Intramuscular and Subcutaneous Adipose Tissue of Laiwu Pig [J]. Scientific Reports, 2022, 12: 16542.
- [5] LI X J, LU L Y, TONG X W, et al. Transcriptomic Profiling of Meat Quality Traits of Skeletal Muscles of the Chinese Indigenous Huai Pig and Duroc Pig [J]. Genes, 2023, 14(8): 1548.
- [6] WANG Y P, NING C, WANG C, et al. Genome-Wide Association Study for Intramuscular Fat Content in Chinese Lulai Black Pigs [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2019, 32(5): 607-613.
- [7] WANG W, WANG D, ZHANG X Y, et al. Comparative Transcriptome Analysis of Longissimus Dorsi Muscle Reveal Potential Genes Affecting Meat Trait in Chinese Indigenous Xiang Pig [J]. Scientific Reports, 2024, 14: 8486.
- [8] LI X J, XIE F, LI R D, et al. Integrated 4D Analysis of Intramuscular Fat Deposition: Quantitative Proteomic and Transcriptomic Studies in Wannanhua Pig Longissimus Dorsi Muscle [J]. Animals, 2024, 14(1): 167.
- [9] XU J G, WANG C L, JIN E H, et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Longissimus Dorsi Muscle between Wei and Yorkshire Pigs Using RNA Sequencing [J]. Genes & Genomics, 2018, 40(4): 413-421.
- [10] 龙熙,柴捷,陈力,等. 基于 SNP 芯片的盆周山地猪保种群体保种效果评估 [J]. 华北农学报, 2022, 37(S1): 358-365.
- [11] HOLNESS M J, SUGDEN M C. Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity by Reversible Phosphorylation [J]. Biochemical Society Transactions, 2003, 31(6): 1143-1151.
- [12] MICHELAKIS E D, GURTU V, WEBSTER L, et al. Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Improves Pulmonary Arterial Hypertension in Genetically Susceptible Patients [J]. Science Translational Medicine, 2017, 9(413): eaao4583.
- [13] 孙瑞萍,王峰,晁哲,等. 屯昌猪 *PDK4* 基因克隆及其组织表达分析 [J]. 浙江农业学报, 2020, 32(6): 978-985.

- [14] 潘鹏丞, 温斌华, 谢婉, 等. 陆川猪 *PDK4* 基因序列分析、真核表达载体构建及组织表达分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(8): 2337-2347.
- [15] 杨洋, 许厚强, 陈伟, 等. 贵州从江香猪 *PDK4*、*FGF10* 基因的克隆及组织表达分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(12): 3401-3409.
- [16] 瞿秋红, 夏琴, 崔悦悦, 等. 巴马香猪和杜长大猪的 *PDK4* 基因的克隆及组织表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(3): 1013-1019.
- [17] 奚子英, 何小梅, 陈刚, 等. 鸡 *PDKPDK4* 基因的克隆及组织差异表达研究 [J]. 中国家禽, 2015, 37(15): 6-10.
- [18] LAN J, LEI M G, ZHANG Y B, et al. Characterization of the Porcine Differentially Expressed *PDK4* Gene and Association with Meat Quality [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(7): 2003-2010.
- [19] NII M, HAYASHI T, TANI F, et al. Quantitative Trait Loci Mapping for Fatty Acid Composition Traits in Perirenal and back Fat Using a Japanese Wild boar \times Large White Intercross [J]. Animal Genetics, 2006, 37(4): 342-347.
- [20] ZHANG S, HULVER M W, MCMILLAN R P, et al. The Pivotal Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinases in Metabolic Flexibility [J]. Nutrition & Metabolism, 2014, 11(1): 10.
- [21] SUGDEN M C, KRAUS A, HARRIS R A, et al. Fibre-Type Specific Modification of the Activity and Regulation of Skeletal Muscle Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK) by Prolonged Starvation and Refeeding Is Associated with Targeted Regulation of PDK Isoenzyme 4 Expression [J]. Biochemical Journal, 2000, 346(3): 651-657.
- [22] JEOUNG N H, WU P F, JOSHI M A, et al. Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoenzyme 4 (PDHK4) in Glucose Homeostasis during Starvation [J]. The Biochemical Journal, 2006, 397(3): 417-425.
- [23] 艾锦新, 龙安炬, 罗卫星, 等. 黔北麻羊不同组织中 *FABP1*、*FABP3* 基因表达水平的研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(11): 63-67, 73.
- [24] 农伟伦, 毕英杰, 李宏旭, 等. 甘肃黑猪 *H-FABP* 基因克隆、SNPs 筛查及生物信息学分析 [J]. 浙江农业学报, 2018, 30(3): 378-385.
- [25] 赵仕全, 董雅娟, 柏学进, 等. 布莱凯特黑牛心脏型脂肪酸结合蛋白基因的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(4): 145-148.
- [26] 周春宝, 朱淑斌, 赵旭庭, 等. 苏姜猪 *H-FABP* 基因多态性及其与肉质性状的相关性 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30(6): 1369-1374.
- [27] 李平, 燕志宏, 陈伟, 等. 宗地花猪 *H-FABP* 基因 mRNA 的表达与肉质性状的相关研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(3): 644-649.
- [28] GERBENS F, VERBURGF J, VAN MOERKERK H T, et al. Associations of Heart and Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Gene Expression with Intramuscular Fat Content in Pigs [J]. Journal of Animal Science, 2001, 79(2): 347.

责任编辑 张枸

柳剑