

# LncRNA 调控骨骼肌发育的分子机制及其在家养动物中的研究进展

周瑞, 王以鑫, 龙科任, 蒋岸岸, 金龙

四川农业大学, 畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室, 成都 611130

**摘要:** 骨骼肌是维持机体功能必不可少的组织, 与家养动物的产肉率等重要经济性状密切相关。近年来, 高通量测序鉴定了大量与骨骼肌生成相关的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA), 它们可作为调节因子在表观调控、转录调控以及转录后调控等多个层面调控基因表达。lncRNA 通过靶向关键因子参与调控骨骼肌发育的各个环节, 包括骨骼肌干细胞增殖、迁移、分化, 成肌细胞增殖、分化、肌管融合, 肌纤维肥大和纤维类型转换等过程。本文重点归纳了 lncRNA 在人和小鼠骨骼肌发育中的分子调控机制, 介绍了 lncRNA 的研究方法, 综述了 lncRNA 在家养动物骨骼肌发育中的研究进展, 分析了目前家养动物 lncRNA 研究所面临的困难和挑战, 最后展望了未来家养动物 lncRNA 研究的方向, 以期为进一步阐明骨骼肌生长发育的分子调控机制提供参考。

**关键词:** 长链非编码 RNA; 骨骼肌; 作用机制; 发育; 家养动物

## Regulatory mechanism for lncRNAs in skeletal muscle development and progress on its research in domestic animals

Rui Zhou, Yixin Wang, Keren Long, Anan Jiang, Long Jin

*Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China*

**Abstract:** Skeletal muscle is an essential tissue to maintain the normal functions of an organism. It is also closely associated with important economic performance, such as carcass weight, of domestic animals. In recent years, studies using high-throughput sequencing techniques have identified numerous long non-coding RNAs (lncRNAs) with myogenic functions involved in regulation of gene expression at multiple levels, including epigenetic, transcriptional and post-transcriptional.

收稿日期: 2017-12-18; 修回日期: 2018-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31601919, 31772576, 31522055), 四川省教育厅项目(编号: 16ZB0037), 四川省省院省校科技合作研发项目(编号: 2017JZ0025)和四川省青年科技创新研究团队(编号: 2015TD0012)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31601919, 31772576, 31522055), the Project of Sichuan Education Department (No. 16ZB0037), the Project of Sichuan Provincial and Municipal Science and Technology Cooperation in Research and Development (No. 2017JZ0025) and Sichuan Youth Science and Technology Innovation Research Team (No. 2015TD0012)]

作者简介: 周瑞, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 948417369@qq.com

通讯作者: 金龙, 博士, 助理研究员, 研究方向: 猪分子遗传育种。E-mail: longjin@sicau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.17-358

网络出版时间: 2018/3/19 11:19:53

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180319.1119.001.html>

tional regulation. These lncRNAs target myogenic factors, which participate in all processes of skeletal muscle development, including proliferation, migration and differentiation of skeletal muscle stem cells, proliferation, differentiation and fusion of myocytes, muscle hypertrophy and conversion of muscle fiber types. In this review, we summarize the functional roles of lncRNAs in regulation of myogenesis in humans and mice, describe the methods for the analysis of lncRNA function, discuss the progress of lncRNA research in domestic animals, and highlight the current problems and challenges in lncRNA research on livestock production. We hope to provide a useful reference for research on lncRNA in domestic animals, thereby further identifying the molecular regulatory mechanisms in skeletal muscle growth and development.

**Keywords:** long non-coding RNAs; skeletal muscle; acting mechanism; development; domestic animals

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200 nt 的转录本, 主要由 RNA 聚合酶 II 转录, 具有 5' 端帽子结构和 3' 端 polyA 尾巴, 能发生可变剪接。过去认为 lncRNA 因缺乏典型的开放阅读框 (open reading frames, ORF) 而无法翻译产生蛋白质<sup>[1]</sup>, 但是近年来的研究发现 lncRNA 具有一类能编码小肽的短开放阅读框 (small open reading frames, sORF) 并且 sORF 编码的小肽具有重要生物学功能<sup>[2-4]</sup>。这些研究拓展了人们对基因组遗传编码潜力的传统认知, 并丰富了 lncRNA 的种类和功能的多样性。

lncRNA 广泛存在于哺乳动物中, 其表达具有时空和组织特异性, 在表观调控、转录调控及转录后调控等多个层面发挥重要作用<sup>[5]</sup>。lncRNA 在不同生物学过程中扮演重要角色, 包括机体抗病免疫、胚胎发育、脂肪代谢以及肿瘤发生等生理和病理过程。同时也在骨骼肌增殖和分化的过程中扮演重要角色 (图 1)<sup>[6]</sup>。近年来, 高通量测序技术以及新兴分子生物学技术的不断发展极大地促进了骨骼肌 lncRNA 的研究, 尤其是在人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 (*Mus musculus*) 等模式动物上。在农业动物研究领域, 虽然已有相当数量的研究对不同家养动物骨骼肌 lncRNA 进行了鉴定, 但目前已明确具有重要功能的 lncRNA 仍然相对较少。因此, 加速家养动物重要经济性状相关主效 lncRNA 的鉴定及其分子调控机制的解析将为畜禽重要经济性状的遗传改良提供必要的理论基础。本文综述了 lncRNA 在人和小鼠骨骼肌发育中的作用机制, lncRNA 的研究方法以及 lncRNA 在家养动物骨骼肌发育中的相关研究, 并对未来研究方向进行了展望, 以期为进一步理解和挖掘

lncRNA 在家养动物骨骼肌发育中的作用提供参考。

## 1 lncRNA 在骨骼肌发育中的分子调控机制

转录组测序分析 (RNA-seq) 已在多个物种中鉴定出大量与骨骼肌生成相关的 lncRNAs。研究发现, 这些 lncRNAs 可以通过影响表观遗传修饰, 作为分子海绵以及编码功能性小肽等多种方式调控基因的表达 (表 1)。

### 1.1 lncRNA 作为分子海绵调节骨骼肌分化

细胞质中的 lncRNAs 可以作为 microRNA (miRNA) 海绵 (miRNA sponges) 和蛋白海绵 (protein sponges)<sup>[6]</sup> 发挥功能。作为 miRNA 海绵的 lncRNA 通常被称为内源竞争性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA), 其通过竞争性结合 miRNA, 降低 miRNA 对目标 mRNA 的影响从而正向调控靶基因的表达<sup>[7]</sup>; 而 lncRNA 作为蛋白海绵是通过与靶基因的 mRNA 竞争性结合某一类蛋白, 从而反向调节靶基因的表达<sup>[8]</sup>。

lncRNA Malat1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) 在成肌细胞分化过程中上调表达, 沉默 Malat1 会抑制成肌细胞增殖和分化<sup>[9]</sup>。众所周知, 血清应答因子 SRF (serum response factor) 是肌肉增殖和分化的重要转录因子<sup>[10]</sup>。Han 等<sup>[11]</sup> 研究发现, Malat1 和 SRF 具有同一 miRNA 靶位点, Malat1 作为 ceRNA 竞争性结合 miR-133, 促进 SRF 的表达和肌细胞的分化。同样, linc-MD1 (long intergenic noncoding RNA muscle differentiation 1) 也通



过 ceRNA 机制调控骨骼肌分化。在小鼠和人的成肌细胞中, linc-MD1 竞争性结合 miR-133 和 miR-135, 从而分别激活靶基因 *MAML1* 和 *MEF2C*, 加速肌肉过渡到分化后期<sup>[12]</sup>(图 2A)。同时, linc-MD1 对 miR-133 的海绵作用也能上调 RNA 结合蛋白 HuR 的表达, HuR 与 linc-MD1 结合可以阻碍 Drosha 酶对 linc-MD1 的分解。因此, HuR 与 linc-MD1 可形成一个正反馈通路促进成肌细胞的早期分化。伴随着分化的进行, miR-133 的合成增多并抑制 HuR 的表达, 结束这一正反馈通路, 成肌细胞进入下一步的分化<sup>[13]</sup>。H19 是研究较早的 lncRNA 之一, 在动物机体内发挥着广泛的作用, 可以通过顺式和反式

作用于靶基因参与哺乳动物胚胎各组织生长发育的调控<sup>[14]</sup>。lncRNA H19 有多种作用机制, 其中一种就是作为 let-7 miRNA 的分子海绵, 阻碍 let-7 对靶基因 *Hmga2* 和 *Dicer* 的抑制作用, 进而阻止肌肉分化的过早发育<sup>[15]</sup>(图 2A)。暨南大学王晓刚课题组新发现了一个可以促进骨骼肌干细胞分化和肌肉再生的 lncRNA 并命名为 lnc-mg (myogenesis-associated lncRNA), 其作为 ceRNA 竞争性结合 miR-125b, 提高胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, IGF2) 的蛋白水平, 激活骨骼肌干细胞分化和再生的下游信号通路, 从而促进肌肉生成。以上研究证明 lncRNA 作为内源竞争性 RNA 在肌肉发育中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。

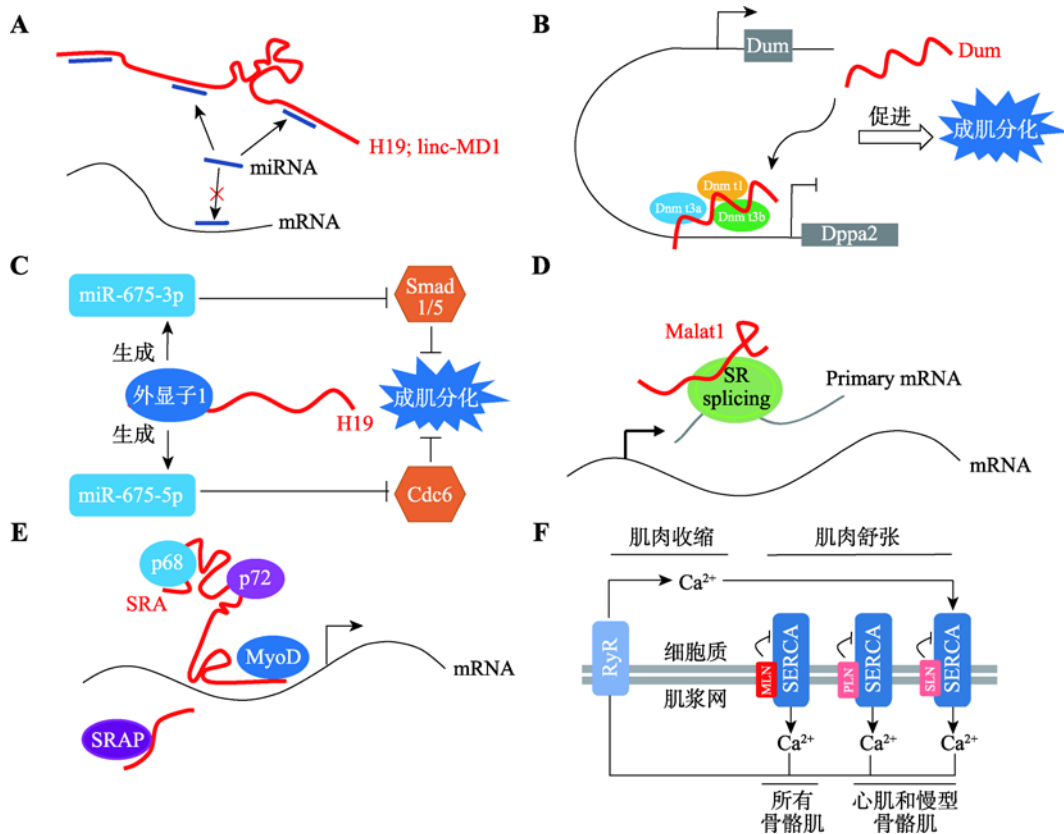


图2 lncRNA 调控基因表达的不同分子机制

Fig. 2 lncRNAs regulate gene expression through diverse modes of action

A: lncRNA 作为分子海绵调控基因表达。以 lncRNA H19 和 linc-MD1 为例, 其作为 miRNA 海绵, 阻碍 miRNA 对 mRNA 表达的抑制作用; B: lncRNA 通过影响 DNA 甲基化调控基因表达。以 lncRNA Dum 为例, 其通过招募多种 DNA 甲基化转移酶到 *Dppa2* 基因启动子上导致 *Dppa2* 基因沉默; C: lncRNA 作为印记基因调控基因表达。以 lncRNA H19 为例, *H19* 基因第一外显子产生的 miR-675-3p 和 miR-675-5p 可分别抑制 *Smad* 和 *Cdc6* 基因的表达; D: lncRNA 通过调节靶 mRNA 的剪切、稳定性和丰度调控基因表达, 以 lncRNA Malat1 为例, 其通过招募 SR 剪接因子影响可变剪接体的形成; E: lncRNA 通过影响染色质修饰和转录因子活性调控基因表达。以 lncRNA SRA 为例, 其可作为 p68/p72 和 MyoD 的分子支架介导 MyoD 对靶基因的转录激活; F: lncRNA 通过编码小肽调控基因表达。以小肽 MLN 为例, 其通过直接作用于肌浆网上的 SERCA, 阻止  $\text{Ca}^{2+}$  进入肌浆网。参考文献<sup>[3,17,37,38]</sup>绘制。

lncRNA 以这种海绵吸附机制发挥调控作用还体现在 lncRNA 竞争性结合 RNA 结合蛋白上。例如, Gong 等<sup>[8]</sup>研究发现 LncMyoD 是一条由 *MyoD* 临近基因编码的 lncRNA, 在成肌细胞分化过程中 *MyoD* 基因直接介导 LncMyoD 转录激活从而影响 LncMyoD 的表达水平。LncMyoD 竞争性结合 IGF2 mRNA 结合蛋白 2 (IGF2-mRNA-binding protein 2, IMP2) 使得 IMP2 介导的 *N-Ras* 和 *c-Myc* 两种增殖基因的翻译受阻。敲除 LncMyoD 将导致细胞周期循环无法结束, 进而强有力地抑制成肌细胞终末分化的发生。

### 1.2 lncRNA 通过影响 DNA 甲基化和组蛋白修饰调控肌肉发育

lncRNA 可以通过介导 DNA 甲基化和组蛋白修饰进而调控染色质状态, 实现对基因转录的调控, 最终导致表型的变化。

在小鼠成肌细胞中, *Dppa2* 基因上游的转录产物 lncRNA Dum (developmental pluripotency-associated 2 (Dppa2) upstream binding muscle lncRNA) 通过招募多种 DNA 甲基化转移酶—Dnmts (Dnmt1、Dnmt3a 和 Dnmt3b) 到 *Dppa2* 基因启动子区域, 导致 *Dppa2* 基因沉默, 进而促进成肌细胞的分化和肌肉再生(图 2B)<sup>[17]</sup>。此外, DBE-T (DBE-transcript) 也是一种在面肩胛肌营养不良症(facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD)患者中异常表达的 lncRNA。DBE-T 通过招募 Trithorax 家族的 Ash1L 蛋白到第 4 号染色体第 35 区(4q35), 使组蛋白 H3K36 甲基化及染色质重塑从而激活 4q35 区域基因的转录并诱发 FSHD<sup>[18]</sup>。

### 1.3 lncRNA 作为印记基因在骨骼肌生长发育中的作用

印记基因在机体生长和发育中起着关键的调节作用。大部分基因印记区域可编码至少一种 lncRNAs, 这些 lncRNAs 通过顺式或反式作用改变染色质状态<sup>[19]</sup>。lncRNA H19 转录自 *H19/IGF2* 基因座母体等位基因, 在发育的胚胎和成年机体的肌肉中高表达。H19 通过结合 PRC2 (polycomb repressive complex 2) 复合物, 抑制 *IGF2* 的转录。此外, *H19* 基因第 1 外显子产生的 miR-675-3p 和 miR-675-5p, 可分别抑

制 *Smad* 和 *Cdc6* 基因的表达, 表明 H19 能通过自身编码的 miRNAs 介导的反式调节作用影响骨骼肌的分化和再生活动(图 2C)<sup>[20]</sup>。Gtl2 是 *Dlk1-Dio3* 印记区域内一个母源性表达的 lncRNA, Meg3 是 Gtl2 在人上的同源异型基因。Gtl2/Meg3 lncRNA 通过招募 PRC2 复合物到 *Dlk1-Dio3* 区域, 直接沉默来自 *Dlk1-Dio3* 区域的许多基因, 如 *Dlk1*<sup>[21]</sup>。此外, 敲除 Gtl2/Meg3 将导致小鼠围产期的死亡以及骨骼肌发育的缺陷<sup>[22]</sup>。在小鼠和绵羊(*Ovis aries*)中, *Dlk1-Dio3* 印记簇的异常激活是双肌臀形成的原因<sup>[23]</sup>。

### 1.4 lncRNA 通过调节靶 mRNA 的剪切、稳定性和丰度影响骨骼肌的生长发育

RNA 结合蛋白 STAU1 与 mRNA 的 3'UTR 中的 Staufen1 蛋白结合位点相互作用可以介导 SMD (Staufen1(STAU1)-mediated mRNA decay)降解途径。含 SINE (short interspersed element)序列的 lncRNA 通过与 mRNA 的 3'UTR 中的 Alu 元件结合, 招募 STAU1 蛋白来启动 SMD 降解途径。例如, 1/2-sbsRNA lncRNA 通过结合 *Cdc6* mRNA 和 *Traf6* mRNA 3'UTR 区域, 导致 *Cdc6* mRNA 和 *Traf6* mRNA 降解, 从而降低 C2C12 细胞中 *Cdc6* 和 *Traf6* 蛋白水平<sup>[24]</sup>。在前体 mRNA (pre-mRNA) 的加工过程中, 核内核斑(nuclear speckles)的 SR (serine/arginine-rich)蛋白家族具有重要作用。Malat1 通过与 SR 蛋白特异性结合, 影响剪接因子的分布。敲除 Malat1 或者过表达 SR 蛋白都会改变 pre-mRNA 的可变剪接, 并且发现 Malat1 还能调节 SR 蛋白的磷酸化水平, 从而调控其活性(图 2D)<sup>[25]</sup>。有研究报道, 过表达 *Msx1* 会阻碍成肌细胞的分化甚至使肌管逆转成增殖的成肌细胞<sup>[26]</sup>。这说明 *Msx1* 基因在肌肉发育中发挥重要的调控作用。lncRNA—*Msx1* AS 转录自 *Msx1* 基因的反义链。Wakkach 等<sup>[27]</sup>研究发现 *Msx1* AS 通过与 *Msx1* 基因转录的 pre-mRNA 配对结合, 干扰 pre-mRNA 的剪接过程, 阻碍 *Msx1* 蛋白的表达。已知 Sirt1 是一种依赖 NAD 的去乙酰酶, 参与平衡成肌细胞的增殖和分化<sup>[28]</sup>。Wang 等<sup>[29]</sup>研究发现, *Sirt1* AS 通过与 miR-34a 竞争性结合 *Sirt1* mRNA 3'UTR 区域来促进 *Sirt1* 的表达并提高 *Sirt1* mRNA 稳定性, 进而促进 C2C12 细胞增殖、抑制其分化。



### 1.5 lncRNA 通过调控染色质修饰和转录因子活性调节肌肉发育

研究表明,部分核内 lncRNAs 具有类似增强子的作用,称为增强子相关 RNA (enhancer-associated RNA, eRNA),它们可以激活邻近蛋白编码基因的表达。例如, *MyoD* 基因的远端调控区域(distal regulatory regions, DRR)和核心增强子区域(core enhancer, CE)产生两种 eRNA—<sup>CE</sup>eRNA 和 <sup>DRR</sup>eRNA(也称为 MUNC)<sup>[30]</sup>, <sup>CE</sup>eRNA 通过增加染色质的“粘性”使 RNA 聚合酶 II (RNAP II)容易结合,以顺式作用方式促进 *MyoD* 的表达;而 <sup>DRR</sup>eRNA 通过反式作用促进 *MyoG* 的表达和肌肉的分化<sup>[31]</sup>。此外,有些核内 lncRNAs 还可以通过影响序列特异性转录因子的活性控制基因表达,lncRNA SRA (steroid receptor RNA activator)就是其中一种。在肌肉分化时,SRA lncRNA 作为 p68/p72 和 *MyoD* 的分子支架介导 *MyoD* 对靶基因的转录激活<sup>[32]</sup>。SRA 转录本的可变剪接体还能编码一种 SRAP 蛋白,SRAP 富集在成肌细胞中,会阻碍 SRA 介导的 *MyoD* 的转录活性和肌肉的分化(图 2E)<sup>[33]</sup>。因此,适当的 SRA lncRNA 与 SARP 蛋白水平对于维持肌肉的正常分化是非常重要的。Lu 等<sup>[34]</sup>发现一种受转录因子 YY1 正向调控的 lncRNA—Yam-1,Yam-1 通过激活 miR-715、抑制 Wnt7b 的表达从而发挥肌细胞抑制因子的功能。Yu 等<sup>[35]</sup>发现在小鼠肌细胞分化过程中,*MyoD* 会激活 linc-RAM (linc-RNA activator of myogenesis)的表达,随后 linc-RAM 与调控因子 *MyoD* 结合,促进表观遗传复合物 *MyoD*-Baf60c-Brg1 的装配,改变 *MyoD* 靶基因染色体的构象,进而影响下游肌源性分化基因的表达。并且 linc-RAM 的这种功能独立于 linc-RAM 编码的小肽—myoregulin(MLN)。

### 1.6 lncRNA 通过编码小肽调节肌肉性能

过去对 lncRNA 的定义是不编码蛋白的 RNA,但随着研究的深入,研究人员发现部分 lncRNAs 不但能翻译小肽,还能利用其编码的小肽行使生物学功能。MLN 是 lncRNA linc-RAM (LINC00948 in humans and 2310015B20Rik in mice)编码的小肽<sup>[3,35]</sup>。MLN 的功能类似于受磷蛋白(PLN)、肌脂蛋白(SLN),通过直接作用于肌浆网上的肌浆网钙泵(SERCA)并

阻止  $\text{Ca}^{2+}$  进入肌浆网。MLN 几乎在所有骨骼肌中表达,敲除 MLN 将增强  $\text{Ca}^{2+}$  的传递效率并提升骨骼肌运动能力(图 2F)<sup>[3]</sup>。最近,Matsumoto 等<sup>[36]</sup>发现,lncRNA LINC00961 可以翻译一个由 90 个氨基酸组成的小肽,并命名为 SPAR。SPAR 定位于晚期核内体和溶酶体中,负调控 mTORC1 的活性。在骨骼肌急性损伤后,LINC00961 表达下调,激活 mTORC1 并促进肌肉再生。

## 2 lncRNA 功能研究方法

lncRNA 通过多种作用方式调控基因表达,而 lncRNA 分子作用机制的揭示需要依赖于多种分子生物学研究方法。目前,探索 lncRNA 功能的方法主要包括:(1) lncRNA 的亚细胞定位;(2) lncRNA 靶基因预测;(3) lncRNA 与蛋白质的相互作用;(4) lncRNA 基因敲除、RNAi(RNA interference)和基因过表达。

### 2.1 亚细胞定位

亚细胞定位是指某一种表达产物在细胞内的具体存在位置,例如在核内、胞质内或者细胞膜上存在。lncRNA 的功能很大程度上决定于其亚细胞定位的特异性。细胞质中 lncRNAs 的主要作用包括:作为 ceRNA 竞争性结合 miRNA;影响 mRNA 的稳定性;部分 lncRNAs 通过编码小肽行使功能等。细胞核内 lncRNAs 的主要功能有:作为 eRNA 招募 RNAPII;影响转录因子活性;影响 RNA 的可变剪接等<sup>[39]</sup>。RNA-FISH 技术能对 lncRNA 进行检测和定位。Tripathi 等<sup>[25]</sup>利用该技术确定了 Malat1 主要位于细胞分裂间期的核斑结构中。此外,RNA-FISH 与 DNA-FISH 结合可以验证转录本与染色质序列的共定位<sup>[40]</sup>。FISSEQ (fluorescent *in situ* sequencing)是一种 FISH 和 RNA-seq 相结合的新测序方案,能在完整的细胞和组织中获得全基因组范围内的基因表达图谱,具有更高的分辨率,并且比 RNA-FISH 鉴定更多的靶标<sup>[40,41]</sup>。除此之外,利用 RNA 亚细胞定位检索工具 RNALocate (<http://www.rna-society.org/rnalocate>),有助于预测 lncRNA 在细胞中的位置,为进一步的研究提供重要参考<sup>[42]</sup>。

## 2.2 lncRNA 的靶标预测

通过整合 lncRNA 序列和功能的信息,国内外的研究机构建立了多个集查阅、共享、注释和分析等功能为一体的 lncRNA 数据库,为 lncRNA 的研究提供了有效工具。lncRNA 数据库大致可分为: lncRNA 原始资源整合数据库; lncRNA 筛选及鉴定数据库; lncRNA 功能分析数据库等几大类。在对 lncRNA 的靶标基因进行研究时,利用相关数据库预测 lncRNA 的靶标,将大大减少工作量和花费。常见的 lncRNA 靶标预测数据库详细信息见表 2。

## 2.3 lncRNA 与蛋白质的相互作用

lncRNA 在基因表达调控中的作用已经毋庸置疑,其通过 RNA-蛋白复合物的形式行使功能,如染色质修饰复合物,转录因子和 RNP 复合物。因此,研究人员开发了多种鉴定 lncRNA-蛋白质相互作用的技术,用于揭示 lncRNA 在生物学过程中的调控机理。RNA-pulldown 实验是在体外初步对 RNA 和蛋白质的相互作用进行鉴定的方法。通常用于发现与已知 RNA 结合的未知蛋白质分子<sup>[50]</sup>。RIP (RNA immunoprecipitation)技术的基本原理类似于 ChIP 技术,可用于检测单个的目的蛋白质与特定非编码

RNA 分子之间的相互作用。RIP 下游结合微阵列和高通量测序技术被称为 RIP-Chip<sup>[51]</sup>和 RIP-seq<sup>[21]</sup>。RIP-Chip 技术的缺点是识别特异性较差,分辨率较低,因此应用范围有限。ChIRP (chromatin isolation by RNA purification)和 CHART (capture hybridization analysis of RNA targets)都是基于同样的理念<sup>[52]</sup>。但两者主要的不同在于 lncRNA 靶标探针的设计,ChIRP 采用 lncRNA 序列全长覆盖探针设计,靶向所有潜在位点,探针的设计是简单的 RNA 序列,无需事先的 RNA 的结构或功能域的知识<sup>[53]</sup>;而 CHART 通过 RNase H 试验寻找合适的靶标位点设计探针<sup>[54]</sup>。CLIP (UV-crosslinking and immunoprecipitation)技术能揭示 RNA 结合蛋白质在体内的 RNA 结合位点。CLIP 技术的优势在于能捕获体内原位蛋白质和 RNA 的相互作用,紫外交联的复合物能通过严格的纯化,因此实验结果更为真实可靠。但 CLIP 实验因紫外交联的效率低(1%~5%)、易受非特异 RNA 污染、实验步骤复杂和 RNA 容易降解等因素的影响,使用受到限制。针对以上不足研究人员开发了提高紫外交联效率的 PAR-CLIP (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced CLIP)技术<sup>[55]</sup>。传统方法的新发展拓展了其应用范围,上述方法的联合应用更有利于揭示 lncRNA 的生物学功能(表 3)。

表 2 常见预测 lncRNA 靶标的数据库信息

Table 2 A summary of common lncRNA databases for predicting targets of lncRNA

数据库名称	网址	说明	参考文献
ChIPBase	<a href="http://rna.sysu.edu.cn/chipbase/">http://rna.sysu.edu.cn/chipbase/</a>	利用 ChIP-seq 数据分析 miRNA-lncRNA 的转录调节关系。	[43]
DIANA-LncBase	<a href="http://www.microrna.gr/LncBase">www.microrna.gr/LncBase</a>	CLIP-seq 实验验证的和计算机预测的 miRNA-lncRNA 相互作用信息。	[44]
lncRNA2Target	<a href="http://mlg.hit.edu.cn/lncrna2target/">http://mlg.hit.edu.cn/lncrna2target/</a>	lncRNA 靶基因数据库,提供 lncRNA 敲除或过表达后引起表达差异的基因。	[45]
lncRNASNP	<a href="http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP/">http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP/</a>	预测 lncRNA 上的 SNP 位点,对 miRNA-lncRNA 互作结合位点处的 SNP 进行排序,预测 miRNA-lncRNA 相互作用。	[46]
NPInter	<a href="http://www.bioinfo.org/NPInter/">http://www.bioinfo.org/NPInter/</a>	预测 ncRNA 与其他生物分子(蛋白质、DNA 和 RNA)之间的相互作用。	[47]
Predicted RNA-RNA interactions	<a href="http://rtools.cbrc.jp/cgi-bin/RNARNA/index.pl">http://rtools.cbrc.jp/cgi-bin/RNARNA/index.pl</a>	预测 lncRNA 和 mRNA 的相互作用。	[48]
starBase v2.0	<a href="http://starbase.sysu.edu.cn/">http://starbase.sysu.edu.cn/</a>	利用 CLIP-seq 数据中分析 miRNA-ceRNA、miRNA-ncRNA 和蛋白质-RNA 相互作用网络。	[49]

表 3 研究 lncRNA 与蛋白质相互作用的技术方法  
Table 3 The technologies to study lncRNA-protein interaction

方法	研究内容	特点	应用	参考文献
RNA pulldown	研究与目的 RNA 互作的蛋白质	(1)体外转录合成单链 RNA 探针 (2)标记的 RNA 捕获 RBPs (3)富集内源、过表达和体外翻译的蛋白	在 C2C12 细胞中,利用体外生成的生物素标记的 Dum 转录本证实 Dum 与大量 Dnmts 蛋白结合 <sup>[17]</sup>	[16]
RIP 和 RIP-Chip/seq	研究与目的蛋白互作的 RNA	(1)检测单个蛋白于特定 RNA 的相互作用 (2)利用微阵列或者高通量测序发现 RNA 的种类 (3)通过 qRT-PCR 检测 RNA	全基因组范围内筛选与 polycomb 相关的 RNA,如 Dlk1 <sup>[21]</sup> 。RIP 实验证明 LncMyoD 直接与 IMPs 结合 <sup>[8]</sup>	[8]
ChIRP 和 CHART	研究与目的 RNA 互作的蛋白质和 DNA	(1)短 DNA 寡核苷酸探针靶向 RNA (2)高通量筛选 RNA 结合的蛋白和 DNA	运用改良的 ChIRP 技术(dChIRP),揭示了 lncRNA Dum 直接与 <i>Dpp2a</i> 基因的启动子结合 <sup>[17]</sup>	[16]
CLIP	研究与目的蛋白互作的 RNA	(1)通过光反应或者化学反应交联 RNA 和蛋白质 (2)体内捕获 RNA-蛋白质的相互作用 (3)高通量筛选与蛋白质结合的 RNA	利用改良的 CLIP 技术(PAR-CLIP),筛选与 AUF1 蛋白互作的 RNA,如 lncRNA NEAT1 <sup>[56]</sup>	[56]

## 2.4 基因敲除和过表达实验

在探究新鉴定的 lncRNAs 功能时,通过对候选 lncRNAs 进行过表达或敲除进而直接观察表型变化以推测其生物学功能是一种常用的手段。近年来,利用病毒(慢病毒、腺病毒等)为载体介导的外源性 shRNA (short hairpin RNA)或者 lncRNA 在受体细胞中表达的方法因其转染效率高、目的基因可稳定表达等优势被广泛应用。值得注意的是, RNAi 主要在细胞质中起作用,细胞核内 lncRNAs 具有高度二级结构而且常常与 DNA、蛋白质相互结合形成复合体,影响 RNAi 与 lncRNA 的结合效率,因此采用反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASO)实现对细胞核内 lncRNAs 的敲除和干扰将更为有效。例如, Cui 等<sup>[57]</sup>证明利用过表达质粒上调 lncRNA HULC 加速了 HepG2 和 Huh7 细胞中脂肪的生成,而 HULC siRNA (small interfering RNA)降低了 HepG2.2.15 细胞中脂肪的生成。此外,基因编辑技术如 CRISPR/Cas9 系统能以更精确、有效的手段对基因进行删除、插入,实现基因表达的上调、敲降。该技术的出现有望快速提高家养动物生产性能,例如,中国科学院动物研究所赵建国课题组利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *UCP1* 基因定点敲入的猪(*Sus scrofa*),实现了 *UCP1* 基因在猪白色脂肪组织的特异表达,敲入该基因的猪脂肪率和背膘厚显著降低,瘦肉率和抗

寒能力显著增加<sup>[58]</sup>。基因敲除和过表达的技术多种多样,因此在实验中需根据实验目的、实验材料等内容选用合适的方法。

## 3 家养动物骨骼肌 lncRNA 研究进展

借助于高通量二代测序技术的迅猛发展,目前在家养动物的研究中已经鉴定出相当数量的 lncRNAs。以下对家养动物骨骼肌生长相关的潜在调控 lncRNAs 以及家养动物骨骼肌中 lncRNAs 的筛选相关研究进行简要综述。

### 3.1 家养动物中骨骼肌生长相关 lncRNA 的鉴定及功能

有研究报道<sup>[59]</sup>,在猪胎儿滋养层中发现的 lncRNA—TncRNA 在猪胚胎骨骼肌中表达上调,在通城猪和长白猪妊娠第 90 天胎儿的骨骼肌中差异表达,说明其可能影响猪骨骼肌的胚胎发育。Sun 等<sup>[60]</sup>揭示了牛(*Bos taurus*) lncRNA—lncMD 的作用机制。lncMD 作为 miR-125b 海绵,减少 miR-125b 对 *IGF2* 基因的抑制作用,进而促进骨骼肌分化。Cai 等<sup>[61]</sup>在隐性白洛克鸡(*Gallus gallus*)和杏花鸡差异表达的 lncRNAs 中发现了 lncRNA-Six1。该基因在鸡胸肉组织中高表达。同时, lncRNA-Six1 可生成一个约 7.26 kDa 的小肽,该小肽在 lncRNA-Six1



顺式激活 *Six1* 基因的过程中起作用,但具体的机制尚不清晰。Yue 等<sup>[62]</sup>对牛背最长肌、肩胛、肋间和臀肌四种肌肉组织进行转录组测序分析,发现 lncYYW 正向调节牛成肌细胞中 *GHI* (growth hormone 1) 基因及其下游基因 *AKT1* 和 *PIK3CD* 的表达。lncYYW 在成肌细胞分化过程中上调表达,过表达 lncYYW 能增加细胞周期中 S 期的细胞数目。

### 3.2 家养动物中骨骼肌生长相关 lncRNA 的高通量筛选

Zhao 等<sup>[63]</sup>对猪胎儿骨骼肌进行转录组测序分析,鉴定了 570 种包含多个外显子的基因间长链非编码 RNA (long intergenic non-coding RNA, lincRNA)。Xing 等<sup>[64]</sup>首次检测了阉割对猪肌肉中 lncRNA 的影响,构建了阉割和非阉割的淮南公猪背最长肌的转录组图谱,鉴定了 8946 种 lncRNAs,其中有 385 个在非阉割组和去势组之间差异表达,这些差异表达的 lncRNAs 及其靶基因可能参与雌激素受体信号通路(ESR signaling)以及骨骼和肌肉发育过程。Li 等<sup>[65]</sup>利用 RNA-seq 技术在鸡不同胚胎时期的骨骼肌中鉴定了 281 个新的 lincRNAs。Ouyang 等<sup>[66]</sup>通过 iTRAQ 技术获得了杏花鸡 11 日龄、16 日龄和孵化后 1 日龄腿肌的蛋白质表达图谱。通过整合这三个阶段蛋白质组学数据和 lncRNA 数据<sup>[67]</sup>,发现差异表达 lncRNAs 的一些靶基因(*DMD*、*MYL3*、*TNNI2*、*TNNT3*)与肌肉收缩功能相关,并推测 lnc00068445, lnc00037615, lnc00037619 的靶标分别是 *TNNI2*、*TNNT3*, *DMD* 以及 *MYL3*。该研究为鸡胚胎期肌肉发育的分子机制研究提供了大量候选基因。Zhan 等<sup>[68]</sup>对山羊(*Capra hircus*)45 日龄、60 日龄和 105 日龄胎儿和 3 日龄羔羊背最长肌组织进行转录组测序,鉴定出 3981 个在四个阶段都高度保守的 lncRNAs,通过两两时间点比较发现了 577 个差异表达的 lncRNAs,这些 lncRNAs 可能在山羊早期肌肉发育中具有特定的生物学作用。Ren 等<sup>[69]</sup>利用 strand-specific Ribo-Zero RNA 技术对湖羊 3 个重要发育阶段(胎儿、羊羔、成年)的背最长肌进行测序,共获得 6924 个 lncRNAs。其中差异表达的 lncRNAs 可能与胚胎期器官形态发生、骨骼系统发育和肌肉发生等生物学过程相关。该研究首次对湖羊肌肉中的 lncRNAs 进行系统分析并为绵羊的

肌肉发育研究提供宝贵资源。Billerey 等<sup>[70]</sup>使用 paired-end RNA-seq 对 9 头利木赞牛犊的胸最长肌组织进行转录组测序,发现 418 个高置信度的 lincRNAs,其中一些 lincRNAs 位于肉质量性状相关的 QTL 位点。上述研究为探究 lncRNA 在家养动物骨骼肌中发挥的功能提供了重要参考。

## 4 结语与展望

对模式动物骨骼肌 lncRNA 进行的研究使人们认识到 lncRNA 在调控骨骼肌生长发育过程中调控作用的重要性以及调控方式的复杂性。在此基础上,近年来畜禽研究者在家养动物上开展了大量 lncRNA 的研究工作,尤其是对重要经济性状—骨骼肌生长的研究最为广泛。通过鉴定骨骼肌相关主效 lncRNA,揭示其分子作用机理,有助于农业动物产肉性状的改良。但目前研究工作还停留在 lncRNA 鉴定上,对作用机制缺乏进一步的研究,其主要原因有:(1) lncRNA 在物种间的序列保守性不高,导致物种之间 lncRNA 作用机制的相互借鉴的意义不大;(2) 农业动物少有稳定的细胞系,因此很难对鉴定出的 lncRNA 进行深入的功能研究;(3) lncRNA 的表达具有极强的时空特异性,其表达动态变化过程不易捕获,对相关研究造成困难;(4) lncRNA 高级结构(二级结构、三级结构和四级结构)影响着 lncRNA 的作用方式,但目前鲜有研究报道 lncRNA 的高级结构,这也加大了 lncRNA 功能研究的难度;(5) 农业动物缺乏完整准确的 lncRNA 数据库。因此,整合不同家养动物 lncRNA 信息的可靠集合,构建数据库迫在眉睫,同时将不断更新的相关生物医学研究技术应用到家养动物 lncRNA 的挖掘上有助于促进家养动物重要经济性状相关 lncRNA 功能的研究。特别是基因组编辑技术的出现给农业动物的遗传改良带来了全新的契机,将可能大大缩短农业动物改良的周期,为农业动物的分子育种提供了崭新的思路。

## 参考文献(References):

- [1] Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C,

- Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest ARR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasaki Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SPT, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Madan Babu M, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schonbach C, Sekiguchi K, Semple CAM, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusic V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y, FANTOM Consortium, RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 2005, 309(5740): 1559–1563. [DOI]
- [2] Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, Winders BR, Troupes CD, Wu FF, Reese AL, McAnally JR, Chen XW, Kavalali ET, Cannon SC, Houser SR, Bassel-Duby R, Olson EN. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science*, 2016, 351(6270): 271–275. [DOI]
- [3] Anderson DM, Anderson KM, Chang CL, Makarewich CA, Nelson BR, McAnally JR, Kasaragod P, Shelton JM, Liou J, Bassel-Duby R, Olson EN. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*, 2015, 160(4): 595–606. [DOI]
- [4] Anderson DM, Makarewich CA, Anderson KM, Shelton JM, Bezprozvannaya S, Bassel-Duby R, Olson EN. Widespread control of calcium signaling by a family of SERCA-inhibiting micropeptides. *Sci Signal*, 2016, 9(457): ra119. [DOI]
- [5] Quan MY, Chen JH, Zhang DQ. Exploring the secrets of long noncoding RNAs. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 5467–5496. [DOI]
- [6] Li YY, Chen XN, Sun H, Wang HT. Long non-coding RNAs in the regulation of skeletal myogenesis and muscle diseases. *Cancer Lett*, 2018, 417: 58–64. [DOI]
- [7] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A *ceRNA* hypothesis: the Rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell*, 2011, 146(3): 353–358. [DOI]
- [8] Gong CG, Li ZZ, Ramanujan K, Clay I, Zhang YY, Lemire-Brachat S, Glass DJ. A long non-coding RNA, *LncMyoD*, regulates skeletal muscle differentiation by blocking IMP2-mediated mRNA translation. *Dev Cell*, 2015, 34(2): 181–191. [DOI]
- [9] Watts R, Johnsen VL, Shearer J, Hittel DS. Myostatin-induced inhibition of the long noncoding RNA *Malat1* is associated with decreased myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 304(10): C995–C1001. [DOI]
- [10] Li SJ, Czubryt MP, McAnally J, Bassel-Duby R, Richardson JA, Wiebel FF, Nordheim A, Olson EN. Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(4): 1082–1087. [DOI]
- [11] Han XR, Yang F, Cao HQ, Liang ZC. *Malat1* regulates serum response factor through miR-133 as a competing endogenous RNA in myogenesis. *FASEB J*, 2015, 29(7): 3054–3064. [DOI]
- [12] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, Tramontano A, Bozzoni I. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 2011, 147(2): 358–369. [DOI]
- [13] Legnini I, Morlando M, Mangiavacchi A, Fatica A,

- Bozzoni I. A feedforward regulatory loop between HuR and the long noncoding RNA linc-MD1 controls early phases of myogenesis. *Mol Cell*, 2014, 53(3): 506–514. [DOI]
- [14] Qin CY, Cai H, Qing HR, Li L, Zhang HP. Recent advances on the role of long non-coding RNA H19 in regulating mammalian muscle growth and development. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(12): 1150–1157. 秦辰雨, 蔡禾, 卿涵睿, 李利, 张红平. 长链非编码 RNA H19 对哺乳动物肌肉生长发育的调控. *遗传*, 2017, 39(12): 1150–1157. [DOI]
- [15] Kallen AN, Zhou XB, Xu J, Qiao C, Ma J, Yan L, Lu LG, Liu CC, Yi JS, Zhang HF, Min W, Bennett AM, Gregory RI, Ding Y, Huang YQ. The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Mol Cell*, 2013, 52(1): 101–112. [DOI]
- [16] Zhu M, Liu JF, Xiao J, Yang L, Cai MX, Shen HY, Chen XJ, Ma Y, Hu SM, Wang ZL, Hong A, Li YX, Sun Y, Wang XG. Lnc-mg is a long non-coding RNA that promotes myogenesis. *Nat Commun*, 2017, 8: 14718. [DOI]
- [17] Wang LJ, Zhao Y, Bao XC, Zhu XH, Kwok YKY, Sun K, Chen XN, Huang YH, Jauch R, Esteban MA, Sun H, Wang HT. LncRNA *Dum* interacts with Dnmts to regulate *Dppa2* expression during myogenic differentiation and muscle regeneration. *Cell Res*, 2015, 25(3): 335–350. [DOI]
- [18] Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y, Gabellini D. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell*, 2012, 149(4): 819–831. [DOI]
- [19] Lee JT, Bartolomei MS. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell*, 2013, 152(6): 1308–1323. [DOI]
- [20] Dey BK, Pfeifer K, Dutta A. The *H19* long noncoding RNA gives rise to microRNAs miR-675–3p and miR-675–5p to promote skeletal muscle differentiation and regeneration. *Genes Dev*, 2014, 28(5): 491–501. [DOI]
- [21] Zhao J, Ohsumi TK, Kung JT, Ogawa Y, Grau DJ, Sarma K, Song JJ, Kingston RE, Borowsky M, Lee JT. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell*, 2010, 40(6): 939–953. [DOI]
- [22] Zhou YL, Cheunsuchon P, Nakayama Y, Lawlor MW, Zhong Y, Rice KA, Zhang L, Zhang X, Gordon FE, Lidov HGW, Bronson RT, Klibanski A. Activation of paternally expressed genes and perinatal death caused by deletion of the *Gtl2* gene. *Development*, 2010, 137(16): 2643–2652. [DOI]
- [23] Davis E, Jensen CH, Schroder HD, Farnir F, Shay-Hadfield T, Kliem A, Cockett N, Georges M, Charlier C. Ectopic expression of DLK1 protein in skeletal muscle of padumnal heterozygotes causes the callipyge phenotype. *Curr Biol*, 2004, 14(20): 1858–1862. [DOI]
- [24] Wang JS, Gong CG, Maquat LE. Control of myogenesis by rodent SINE-containing lncRNAs. *Genes Dev*, 2013, 27(7): 793–804. [DOI]
- [25] Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA, Blencowe BJ, Prasanth SG, Prasanth KV. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 2010, 39(6): 925–938. [DOI]
- [26] Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell*, 2000, 103(7): 1099–1109. [DOI]
- [27] Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Monteiro S, Teillaud C, Pibouin L, Orestes-Cardoso S, Papagerakis P, Macdougall M, Robert B, Berdal A. Endogenous *Msx1* antisense transcript: *in vivo* and *in vitro* evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(13): 7336–7341. [DOI]
- [28] Pardo PS, Boriek AM. The physiological roles of *Sirt1* in skeletal muscle. *Aging*, 2011, 3(4): 430–437. [DOI]
- [29] Wang GQ, Wang Y, Xiong Y, Chen XC, Ma ML, Cai R, Gao Y, Sun YM, Yang GS, Pang WJ. *Sirt1* AS lncRNA interacts with its mRNA to inhibit muscle formation by attenuating function of miR-34a. *Sci Rep*, 2016, 6: 21865. [DOI]
- [30] Mueller AC, Cichewicz MA, Dey BK, Layer R, Reon BJ, Gagan JR, Dutta A. MUNC, a long noncoding RNA that facilitates the function of MyoD in skeletal myogenesis. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(3): 498–513. [DOI]
- [31] Mousavi K, Zare H, Dell'orso S, Grontved L, Gutierrez-Cruz G, Derfoul A, Hager GL, Sartorelli V. eRNAs promote transcription by establishing chromatin accessibility at defined genomic loci. *Mol Cell*, 2013, 51(5): 606–617. [DOI]
- [32] Caretti G, Schiltz RL, Dilworth FJ, Di Padova M, Zhao P, Ogryzko V, Fuller-Pace FV, Hoffman EP, Tapscott SJ, Sartorelli V. The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev Cell*, 2006, 11(4): 547–560. [DOI]
- [33] Hubé F, Velasco G, Rollin J, Furling D, Francastel C.

- Steroid receptor RNA activator protein binds to and counteracts SRA RNA-mediated activation of MyoD and muscle differentiation. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(2): 513–525. [DOI]
- [34] Lu LN, Sun K, Chen XN, Zhao Y, Wang LJ, Zhou L, Sun H, Wang HT. Genome-wide survey by ChIP-seq reveals YY1 regulation of lincRNAs in skeletal myogenesis. *EMBO J*, 2013, 32(19): 2575–2588. [DOI]
- [35] Yu XH, Zhang Y, Li TT, Ma Z, Jia HX, Chen Q, Zhao YX, Zhai LL, Zhong R, Li CY, Zou XT, Meng J, Chen AK, Puri PL, Chen MH, Zhu DH. Long non-coding RNA Linc-RAM enhances myogenic differentiation by interacting with MyoD. *Nat Commun*, 2017, 8: 14016. [DOI]
- [36] Matsumoto A, Pasut A, Matsumoto M, Yamashita R, Fung J, Monteleone E, Saghatelian A, Nakayama KI, Clohessy JG, Pandolfi PP. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. *Nature*, 2017, 541(7636): 228–232. [DOI]
- [37] Neguembor MV, Jothi M, Gabellini D. Long noncoding RNAs, emerging players in muscle differentiation and disease. *Skelet Muscle*, 2014, 4(1): 8. [DOI]
- [38] Dey BK, Mueller AC, Dutta A. Long non-coding RNAs as emerging regulators of differentiation, development, and disease. *Transcription*, 2014, 5(4): e944014. [DOI]
- [39] Lopez-Pajares V. Long non-coding RNA regulation of gene expression during differentiation. *Pflügers Arch-Eur J Physiol*, 2016, 468(6): 971–981. [DOI]
- [40] Kashi K, Henderson L, Bonetti A, Carninci P. Discovery and functional analysis of lncRNAs: methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Regul Mech*, 2016, 1859(1): 3–15. [DOI]
- [41] Lee JH, Daugharthy ER, Scheiman J, Kalhor R, Ferrante TC, Terry R, Turczyk BM, Yang JL, Lee HS, Aach J, Zhang K, Church GM. Fluorescent *in situ* sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat Protoc*, 2015, 10(3): 442–458. [DOI]
- [42] Zhang T, Tan PW, Wang LQ, Jin NN, Li YN, Zhang L, Yang H, Hu ZY, Zhang LN, Hu CY, Li CH, Qian K, Zhang CJ, Huang Y, Li KN, Lin H, Wang D. RNALocate: a resource for RNA subcellular localizations. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D135–D138. [DOI]
- [43] Yang JH, Li JH, Jiang S, Zhou H, Qu LH. ChIPBase: a database for decoding the transcriptional regulation of long non-coding RNA and microRNA genes from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D): D177–D187. [DOI]
- [44] Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Reczko M, Maragkakis M, Dalamagas TM, Hatzigeorgiou AG. DIANA-LncBase: experimentally verified and computationally predicted microRNA targets on long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D): D239–D245. [DOI]
- [45] Jiang QH, Ma R, Wang JX, Wu XL, Jin SL, Peng JJ, Tan RJ, Zhang TJ, Li Y, Wang YD. LncRNA2Function: a comprehensive resource for functional investigation of human lncRNAs based on RNA-seq data. *BMC Genomics*, 2015, 16 Suppl 3: S2. [DOI]
- [46] Gong J, Liu W, Zhang JY, Miao XP, Guo AY. lncRNASNP: a database of SNPs in lncRNAs and their potential functions in human and mouse. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(D): D181–D186. [DOI]
- [47] Hao YJ, Wu W, Li H, Yuan J, Luo JJ, Zhao Y, Chen RS. NPInter v3.0: an upgraded database of noncoding RNA-associated interactions. *Database (Oxford)*, 2016, 2016: baw057. [DOI]
- [48] Terai G, Iwakiri J, Kameda T, Hamada M, Asai K. Comprehensive prediction of lncRNA-RNA interactions in human transcriptome. *BMC Genomics*, 2016, 17 Suppl 1: 12. [DOI]
- [49] Li JH, Liu S, Zhou H, Qu LH, Yang JH. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(D): D92–D97. [DOI]
- [50] Marín-Béjar O, Huarte M. RNA pulldown protocol for *in vitro* detection and identification of RNA-associated proteins. *Methods Mol Biol*, 2015, 1206: 87–95. [DOI]
- [51] Dahm GM, Gubin MM, Magee JD, Techasintana P, Calaluce R, Atasoy U. Method for the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts using RIP-Chip. *J Vis Exp*, 2012, (67): 3851. [DOI]
- [52] Simon MD, Wang CI, Kharchenko PV, West JA, Chapman BA, Alekseyenko AA, Borowsky ML, Kuroda MI, Kingston RE. The genomic binding sites of a noncoding RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(51): 20497–20502. [DOI]
- [53] Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang HY. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol Cell*, 2011, 44(4): 667–678. [DOI]
- [54] Vance KW. Mapping long noncoding RNA chromatin occupancy using capture hybridization analysis of RNA targets (CHART). In: Ørom U, ed. Enhancer RNAs. New



- York, NY: Humana Press, 2017: 39–50. [DOI]
- [55] Danan C, Manickavel S, Hafner M. PAR-CLIP: A method for transcriptome-wide identification of RNA binding protein interaction sites. In: Dassi E, ed. *Post-Transcriptional Gene Regulation*. New York, NY: Humana Press, 2016: 153–173. [DOI]
- [56] Yoon JH, De S, Srikantan S, Abdelmohsen K, Grammatikakis I, Kim J, Kim KM, Noh JH, White EJF, Martindale JL, Yang XL, Kang MJ, Wood III WH, Noren Hooten N, Evans MK, Becker KG, Tripathi V, Prasanth KV, Wilson GM, Tuschl T, Ingolia NT, Hafner M, Gorospe M. PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity. *Nat Commun*, 2014, 5: 5248. [DOI]
- [57] Cui M, Xiao ZL, Wang Y, Zheng MY, Song TQ, Cai XL, Sun BD, Ye LH, Zhang XD. Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in hepatoma cells through an miR-9-mediated RXRA signaling pathway. *Cancer Res*, 2015, 75(5): 846–857. [DOI]
- [58] Zheng QT, Lin J, Huang JJ, Zhang HY, Zhang R, Zhang XY, Cao CW, Hambly C, Qin GS, Yao J, Song RG, Jia QT, Wang X, Li Y, S Zhang N, Piao ZY, Ye RC, Speakman JR, Wang HM, Zhou Q, Wang YF, Jin WZ, Zhao JG. Reconstitution of *UCP1* using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(45): E9474–E9482. [DOI]
- [59] Ren H, Li Y, Tang Z, Yang S, Mu Y, Cui W, Ao H, Du L, Wang L, Li K. Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a porcine long non-coding RNA isolated from long SAGE libraries. *Anim Genet*, 2009, 40(4): 499–508. [DOI]
- [60] Sun XM, Li MX, Sun YJ, Cai HF, Lan XY, Huang YZ, Bai YY, Qi XL, Chen H. The developmental transcriptome sequencing of bovine skeletal muscle reveals a long noncoding RNA, lncMD, promotes muscle differentiation by sponging miR-125b. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res*, 2016, 1863(11): 2835–2845. [DOI]
- [61] Cai BL, Li ZH, Ma MT, Wang ZJ, Han PG, Abdalla BA, Nie QH, Zhang XQ. LncRNA-Six1 encodes a micropeptide to activate *Six1* in *Cis* and is involved in cell proliferation and muscle growth. *Front Physiol*, 2017, 8: 230. [DOI]
- [62] Yue YW, Jin CF, Chen MM, Zhang LL, Liu XF, Ma WZ, Guo H. A lncRNA promotes myoblast proliferation by up-regulating GH1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2017, 53(8): 699–705. [DOI]
- [63] Zhao WM, Mu YL, Ma L, Wang C, Tang ZL, Yang SL, Zhou R, Hu XJ, Li MH, Li K. Systematic identification and characterization of long intergenic non-coding RNAs in fetal porcine skeletal muscle development. *Sci Rep*, 2015, 5: 8957. [DOI]
- [64] Xing BS, Bai XX, Guo HX, Chen JF, Hua LS, Zhang JQ, Ma Q, Ren QL, Wang HS, Wang J. Long non-coding RNA analysis of muscular responses to testosterone deficiency in Huainan male pigs. *Anim Sci J*, 2017, 88(9): 1451–1456. [DOI]
- [65] Li TT, Wang SY, Wu RM, Zhou XY, Zhu DH, Zhang Y. Identification of long non-protein coding RNAs in chicken skeletal muscle using next generation sequencing. *Genomics*, 2012, 99(5): 292–298. [DOI]
- [66] Ouyang HJ, Wang ZJ, Chen XL, Yu J, Li ZH, Nie QH. Proteomic analysis of chicken skeletal muscle during embryonic development. *Front Physiol*, 2017, 8: 281. [DOI]
- [67] Li ZH, Ouyang HJ, Zheng M, Cai BL, Han PG, Abdalla BA, Nie QH, Zhang XQ. Integrated analysis of long non-coding RNAs (lncRNAs) and mRNA expression profiles reveals the potential role of lncRNAs in skeletal muscle development of the chicken. *Front Physiol*, 2016, 7: 687. [DOI]
- [68] Zhan SY, Dong Y, Zhao W, Guo JZ, Zhong T, Wang LJ, Li L, Zhang HP. Genome-wide identification and characterization of long non-coding RNAs in developmental skeletal muscle of fetal goat. *BMC Genomics*, 2016, 17: 666. [DOI]
- [69] Ren CF, Deng MT, Fan YX, Yang H, Zhang GM, Feng X, Li FZ, Wang D, Wang F, Zhang YL. Genome-wide analysis reveals extensive changes in lncRNAs during skeletal muscle development in Hu sheep. *Genes (Basel)*, 2017, 8(8): E191. [DOI]
- [70] Billerey C, Boussaha M, Esquerre D, Rebours E, Djari A, Meersseman C, Klopp C, Gautheret D, Rocha D. Identification of large intergenic non-coding RNAs in bovine muscle using next-generation transcriptomic sequencing. *BMC Genomics*, 2014, 15: 499. [DOI]