

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*) miRNA 研究进展

朱艳, 魏明, 周晓, 邓林华, 仇剑, 李果, 周世强, 谢浩, 李德生, 王承东

中国大熊猫保护研究中心, 大熊猫国家公园珍稀动物保护生物学国家林业和草原局重点实验室, 成都 611830

摘要: MicroRNA (miRNA) 是一类广泛存在于真核生物、长约 22 nt 的内源性非编码 RNA。miRNA 通过与靶基因 mRNA 特异性结合影响基因的表达, 进而参与调控多种生物学过程。大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是我国特有的珍稀动物, 备受全世界的关注。近年来, 随着二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)的普及, 大熊猫 miRNA 陆续被发现和鉴定。本文综述了 miRNA 在大熊猫免疫反应、乳腺发育、精子冷冻耐受及其他生物学过程的研究进展, 并探讨了大熊猫 miRNA 的研究前景, 以期为深入研究大熊猫 miRNA 的调控机制和促进大熊猫繁育与保护工作提供科学参考和新思路。

关键词: 大熊猫; miRNA; 免疫反应; 乳腺发育; 精子冷冻耐受

Progress on miRNA in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)

Yan Zhu, Ming Wei, Xiao Zhou, Linhua Deng, Jian Qiu, Guo Li, Shiqiang Zhou, Hao Xie, Desheng Li, Chengdong Wang

State Forestry and Grassland Administration Key Laboratory of Conservation Biology for Rare Animals of the Giant Panda State Park, China Conservation and Research Center for the Giant Panda, Chengdu 611830, China

Abstract: MicroRNAs (miRNAs), a family of endogenous non-coding RNAs with a length of about 22 nucleotides, are widely found in eukaryotes. miRNAs can affect gene expression through specific bindings with mRNAs of target genes and participate in the regulation of a variety of biological processes. Giant panda is not only a unique rare animal in China, but also the focus of attention on wildlife preservation worldwide. In recent years, with the popularization of next-generation sequencing (NGS) technology, miRNAs in giant panda have been discovered and identified one after another. In this review, we focus on the research progress on miRNAs in giant panda, involved in immune response, mammary gland development, sperm freezing tolerance and other biological processes, and then discuss future research directions of miRNAs in giant panda, and thus providing the scientific references and new ideas for studying the regulatory mechanisms of miRNAs and promoting the breeding and protection of giant panda.

Keywords: giant panda; miRNA; immune response; mammary gland development; sperm freezing tolerance

收稿日期: 2021-06-11; 修回日期: 2021-07-28

基金项目: 大熊猫国际合作基金项目(编号: GH201710)资助[Supported by Giant Panda International Cooperation Fund Project (No. GH201710)]

作者简介: 朱艳, 硕士, 研究方向: 大熊猫遗传与生态。E-mail: zhuyan_494062079@163.com

通讯作者: 王承东, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 大熊猫疾病防控及繁育研究。E-mail: wolongpanda@qq.com

DOI: 10.16288/j.ycz.21-209

网络出版时间: 2021/8/24 11:39:39

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210823.1347.002.html>

大熊猫是全球生物多样性保护的旗舰物种,我国特有的珍稀野生动物,有“国宝”之称。一直以来,关于大熊猫进化和保护方面的研究从未间断^[1-8]。近年来,随着二代测序技术和生物信息学的发展,挖掘大熊猫基因组与转录组信息成为研究热点,为进一步揭示大熊猫潜在分子机制提供了有效手段。microRNA (miRNA) 是一类内源性非编码小 RNA,通过靶向抑制基因表达调控生物学过程。20 世纪 90 年代, Lee 等^[9]首次发现 *lin-4* 参与调控秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的时序性发育,从此揭开了 miRNA 的研究序幕。目前,已有 38,589 条 miRNA 序列被发现并收录于 miRBase.22 数据库中(<http://www.mirbase.org/>)^[10],并且 miRNA 相关研究仍在不断推进。small RNA-seq 技术通过对高通量测序数据进行过滤筛选和比对,不仅能鉴定已知 miRNA (known miRNA) 和新 miRNA (novel miRNA),也能挖掘低丰度表达的 miRNA,同时结合生物信息学分析研究 miRNA 的表达模式及生物学调控功能^[11]。由于大熊猫物种的珍稀性,大熊猫 miRNA 的研究报道相对较少,但近几年发展较为迅速,研究证明 miRNA 对大熊猫的生物学功能具有调控作用。本文总结了近年来 miRNA 参与调控大熊猫免疫反应、乳腺发育、精子冷冻耐受和其他生物学过程的研究进展,并在此基础上探讨大熊猫 miRNA 的研究前景,为进一步揭示大熊猫的转录调控机制和促进大熊猫繁育保护工作提供参考和新思路。

1 miRNA 概述

1.1 miRNA 的发现

随着全基因组测序技术(whole genome sequencing, WGS)的发展,人们发现全基因组中仅有 1% 的序列能够编码蛋白,而约 99% 的非编码序列是“无用的”^[12]。但随着技术的进步和完善,研究表明这些所谓的“无用”序列实际发挥着重要作用,它们转录生成的非编码小 RNA (如 miRNA、lncRNA 和 circRNA)参与调控基因的表达进而影响生物学功能,其中 miRNA 是最早被发现也是目前的研究热点。1993 年 Lee 等^[9]在秀丽隐杆线虫中首次发现 *lin-4* 通过与 *lin-14* mRNA 的 3' UTR 特异性结合,进而抑制

lin-14 基因的表达,最终负调控 LIN-14 蛋白合成。Reinhart 等^[13]发现了另一个 miRNA—*let-7*,调控秀丽隐杆线虫生长发育相关基因的表达且具有较高的物种保守性,从此揭开了 miRNA 的研究序幕。

1.2 miRNA 的调控机制

miRNA 调控靶基因表达的作用机制十分复杂,miRNA 的种子序列(5'端第 2~8 个碱基)与靶基因 mRNA 3' UTR 互补配对,促使 mRNA 降解或抑制其翻译^[14-16]。植物细胞中,miRNA 与靶基因 mRNA 3' UTR 完全互补配对从而直接降解靶基因^[17],而在动物细胞中,识别位点大多不能完全互补配对,形成的凸泡结构(bulges)使 miRNA 只能在转录后调控翻译过程^[18]。通常,一个 miRNA 可以调控多个靶基因表达,而一个靶基因也可以同时受到多个 miRNA 调控,这就形成了一个复杂的调控网络体系。研究预测 miRNA 能调控超过 1/3 的基因表达^[19,20],但目前只有小部分 miRNA 进行了功能验证^[21-25]。

2 大熊猫 miRNA 相关研究

随着 miRNA 研究的不断深入,一些常见物种包括鱼类^[26-29]、鸟类^[30,31]和农业动物^[32-35]均进行了转录组测序分析,并对 miRNA 的表达模式及调控功能进行了验证。近年来利用 RNA-seq 技术对大熊猫 miRNA 的研究也发展迅速^[36-42](图 1),miRNA 在大熊猫免疫反应^[36,38,42]、乳腺发育^[37,38]、精子冷冻耐受^[40]及其他生物过程^[39,41]等方面发挥着重要的调控作用(表 1)。

2.1 miRNA 调控免疫反应

血液是免疫系统的主要组成部分,许多疾病都可以通过血液鉴定^[43],因此对血液组织进行转录组测序分析具有重要意义。2015 年, Yang 等^[36]利用 Illumina 二代测序技术分析了 4 只大熊猫血液中 miRNA 的表达模式,共检测到 276 个保守 miRNA 和 51 个新 miRNA,差异表达分析发现 7 个 miRNA 的表达量在幼年大熊猫中明显高于成年大熊猫。此外,雌性大熊猫中有 2 个 miRNA 表达量上调,雄性个体中有 1 个 miRNA 表达量上调。靶基因预测表明大熊猫 miRNA 可能与 4602 个下游基因的表达有关,

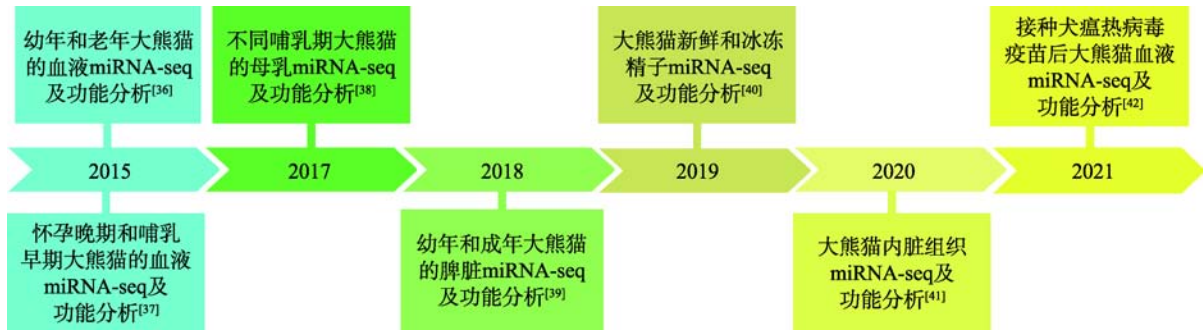


图1 大熊猫 miRNA 研究进展

Fig. 1 Research progress of miRNA in giant panda

表1 大熊猫 miRNA 调控作用

Table 1 Regulatory effects of miRNA in giant panda

生物学功能	组织	研究策略	参考文献
调控免疫反应, 包括血液免疫、母乳免疫	血液、乳汁	对不同年龄大熊猫的血液进行 miRNA-seq; 对接种犬瘟热病毒疫苗后的大熊猫血液进行 miRNA-seq; 对不同哺乳期的大熊猫母乳外泌体进行 miRNA-seq	[36,38,42]
调控乳腺发育及新生幼崽生长发育	血液、乳汁	对怀孕后期和哺乳早期大熊猫血液进行 miRNA-seq; 对不同哺乳期母乳外泌体进行 miRNA-seq	[37,38]
调控精子冷冻耐受	精子	对大熊猫新鲜和冷冻的精子外泌体进行 miRNA-seq	[40]
调控其他多种生物学过程	内脏(心、肝、脾、肺、肾)	对不同内脏组织进行 miRNA-seq; 对新生和成年大熊猫的脾脏进行 miRNA-seq	[39,41]

随后对预测的靶基因进行 KEGG 通路分析, 发现这些基因主要参与宿主免疫应答, 包括 Ras 信号通路、PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路。同年, Du 等^[44]利用 Illumina HiSeq 2000 测序技术对 3 只大熊猫的血液转录组进行鉴定, 共注释 38,522 条转录本 (41.6%), 其中有 25,142 条和 8272 条转录本分别被富集到 GO (gene ontology) 和 COG (clusters of orthologous group)。KEGG (Kyoto Encyclopedia of genes and genomes) 富集分析显示, 9098 (9.83%) 条转录本富集于 324 条 KEGG 通路, 其中信号转导和免疫系统功能最具代表性。后来, Du 等^[45]利用 RNA-seq 技术研究了大熊猫血液组织中随着年龄的增长而出现的差异表达基因和通路。结果共获得 210 个差异表达基因, 包括 146 个表达上调基因和 64 个表达下调基因, 其中 *ISG15*、*STAT1*、*IRF7* 和 *DDX58* 是蛋白互作网络中的中枢基因, 它们的表达量随大熊猫年龄增长而上调, 并在应对病原菌入侵中发挥重要作用。功能富集分析表明这些表达量上调的基因主要参与先天免疫应答, 而表达量下调的基因主要与 B 细胞激活有关。综上所述, 大熊猫血液中的 miRNA

主要参与调控免疫反应, 但具体的调控机制需进一步研究。

Sun 等^[42]为了研究 miRNA 在犬瘟热病毒 (canine distemper virus, CDV) 疫苗免疫应答中的作用, 对 5 只已接种两次疫苗 (间隔 21 天) 的大熊猫幼仔血液进行 miRNA-seq。结果共鉴定出 187 个保守 miRNA 和 96 个新 miRNA, 并发现 29 个差异表达 miRNA, 其中 miR-16、miR-182、miR-30b 和 miR-101 的表达量上调, 表明先天免疫力可能增强, 而 miR-155 和 miR-181a 的表达量下调, 表明大熊猫产生抗体和 B 细胞的能力可能减弱。研究还发现 20 对 miRNA-mRNA 存在负调控关系, 其中 miR-204 表达量的下调增加了 *TLR6* 基因的表达进而增强大熊猫幼崽先天免疫力, miR-330 表达量的下调可能通过增加 *TMEM106A* 的表达激活巨噬细胞并调节免疫应答。综上所述, miRNA 参与调控大熊猫的免疫应答反应, 但具体的分子调控机制仍有待进一步研究。

2.2 miRNA 调控乳腺发育及新生幼崽生长发育

母乳是哺乳动物婴儿理想的营养来源, 它含有

丰富且平衡的营养物质,满足婴儿大脑发育和生长需要,与配方奶相比,具有显著的健康益处^[46]。研究发现,人(*Homo sapiens*)^[47]、牛(*Bos taurus*)^[48]和猪(*Sus scrofa*)^[49]的乳汁中都存在 miRNA 表达且高丰度表达的 miRNA 大多参与免疫应答和神经系统相关的组织发育^[50]。2015 年, Wang 等^[37]通过 RNA-seq 技术从大熊猫外周血液中鉴定出 202 个成熟的 miRNA 以及 27 个 miRNA 家族和 29 个 miRNA 簇,在大熊猫怀孕后期和哺乳期早期阶段,通过 PCR 检测到 12 个与哺乳相关的 miRNA 表达。功能富集分析表明,这些 miRNA 在乳腺发育和代谢变化中发挥着重要调控作用。2017 年, Ma 等^[38]对大熊猫乳汁外泌体中的 miRNA 进行了高通量测序,阐述了不同哺乳期大熊猫乳汁外泌体中 miRNA 的表达特征,并发现在初乳和成熟乳中富集与免疫和发育相关的内源性 miRNA,这些 miRNA 在胞外囊泡的保护作用下稳定存在,以应对某些苛刻的环境条件。研究还发现母乳可能会促进大熊猫幼崽从饮食中摄入母亲的 miRNA,以调节产后发育。此外,在大熊猫母乳外泌体中检测来自大熊猫主要食物来源(竹子)的外源性植物 miRNA,这些 miRNA 与基础代谢和神经元发育的调节作用相关,提示外源性植物 miRNA 被宿主细胞吸收,随后作为潜在的跨界调节因子被分泌到体液中。因此,大熊猫母乳外泌体中的 miRNA 是至关重要的母性调节因子,有助于促进新生幼崽的生长发育。

2.3 miRNA 调控精子冷冻耐受

精子生成是一个复杂的过程,原始生殖细胞增殖分化形成精原细胞,精原细胞有丝分裂形成初级精母细胞,接着减数分裂形成精子细胞,最后形成成熟精子^[51,52]。研究发现许多 miRNA 参与调控小鼠(*Mus. musculus*)^[53-55]和人^[56,57]的精子生成过程。但目前关于 miRNA 调控大熊猫精子生成的研究还未见报道。精子低温保存和人工授精是大熊猫繁育和保存现有遗传多样性的重要手段,但对精子低温损伤的分子机制及抗冻性等影响因素尚不清楚。Ran 等^[40]分析了 miRNA 对大熊猫精子冷冻耐受能力的调控作用,通过高通量测序技术比较了大熊猫新鲜精子和冷冻精子外泌体 miRNA 表达图谱,共鉴定出

899 个成熟 miRNA,其中显著差异表达的 miRNA 有 284 个,包括 195 个表达量上调和 89 个表达量下调。GO 富集分析发现这些差异表达 miRNA 的靶点主要分布在膜信号转导通路中,涉及能量代谢、嗅觉传导通路、炎症反应和细胞因子相互作用的差异 miRNA 可能参与调控精子的冷冻耐受机制,但具体的调控功能有待进一步验证。

2.4 miRNA 调控多种生物学过程

目前利用高通量测序技术对大熊猫内脏组织的研究报道还很少。Wang 等^[41]利用 RNA-seq 技术对 4 只大熊猫的 5 种内脏组织(心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏) miRNA 进行测序分析,结果共鉴定出 1256 个已知 miRNA 和 12 个新的 miRNA。在心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏中分别筛选出 215、131、185、83 和 126 个组织特异性差异 miRNA,分别包括 miR-1b-5p、miR-122-5p、miR-143、miR-126-5p 和 miR-10b-5p,预测的靶基因(包括 *MYL2*、*LRP5*、*MIF*、*CFD* 和 *PEBP1*) 分别与组织特异性生物学功能密切相关。Peng 等^[39]通过转录组测序技术分别对新生和成年大熊猫脾脏 miRNA 进行测序分析,结果共鉴定出 737 个 miRNA,且新生和成年脾脏 miRNA 的表达水平高度一致。此外,共筛选出 503 个差异表达 miRNA,且大多数差异表达 miRNA (81.1%)在新生脾脏中表达量上调,而成年脾脏中只有 95 个 miRNA (18.9%)高表达。通过对预测的靶基因进行 GO 富集分析,结果发现靶基因主要富集在生物过程,其次是细胞成分和分子功能。KEGG 富集分析显示差异表达 miRNA 的靶基因共涉及 11 条通路,包括细胞外基质受体相互作用(ECM-receptor interaction)、轴突导向(axon guidance)、T 细胞受体信号通路(T cell receptor signaling pathway)、TGF- β 信号通路(TGF- β signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)、弓形虫病(*Toxoplasmosis*)、基底细胞癌(basal cell carcinoma)、小细胞肺癌(small cell lung cancer)、细胞周期(cell cycle)、急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia)和破骨细胞分化(osteoclast differentiation),其中只有 T 细胞受体信号通路(T cell receptor signaling pathway)与免疫相关,说明 miRNA 不仅调控免疫应答,还可能参与

调节其他生物过程,但具体的调控机制有待进一步研究。

3 结语与展望

随着高通量测序技术的成熟,对非编码 RNA 进行转录组测序已成为当前研究热点。miRNA 作为真核生物转录后基因调控因子,在哺乳动物各组织中广泛表达,并通过特异性结合靶基因调控生物学功能^[58,59]。大熊猫作为珍稀保护物种,近年来关于其 miRNA 的研究发展迅速。miRNA 在大熊猫血液、乳汁、精子和内脏组织中广泛表达且功能富集分析发现这些 miRNA 在大熊猫免疫反应、乳腺发育、精子冷冻耐受及其他生物学过程等方面发挥着重要调控作用。

然而这些研究仅停留在鉴定和筛选层面,对预测的靶基因未做进一步生物学功能验证,因此今后应着重关注大熊猫功能性 miRNA 的验证和调控机制探究,以及如何应用于大熊猫繁育和保护工作。具体如下:

3.1 建立成熟的大熊猫原代细胞分离培养体系

由于大熊猫物种的珍稀性,目前关于分离培养大熊猫原代细胞的研究十分有限。2005 年, Zhang 等^[60,61]利用酶消化法分离出大熊猫皮肤成纤维细胞,并利用表皮生长因子和胰岛素筛选出具有较好生物学特性的皮肤成纤维细胞。2015 年, Yu 等^[62]利用组织块法和差速贴壁法成功分离出大熊猫骨骼肌来源的原代细胞。然而,这些研究涉及到的组织种类比较单一,且这些原代细胞在数次传代后,是否依然能保持较好的细胞活性?这些细胞活性如何变化?传代次数的极限是多少?如何保持传代后细胞的稳定性?这些问题都需要人们进一步探究。因此,针对不同组织来源的原代细胞(例如来源于脂肪的成脂细胞、来源于心脏的心肌细胞和来源于胚胎的胚胎干细胞等)分别建立起一套成熟的原代细胞分离培养体系,并且在多次传代后仍然保持较好的细胞活性。

培养出稳定的大熊猫细胞系有利于后续的功能验证或克隆,也可为其他研究者提供珍稀和丰富的研究材料,同时建立起的大熊猫细胞库也将成为世

界上珍贵的遗传资源保护系统。

3.2 验证免疫等生物学等功能,完善调控网络

为了进一步验证 miRNA 及其靶基因免疫等生物学功能,通过合成 miRNA 过表达和抑制剂、构建靶基因过表达和抑制载体分别在细胞和分子水平进行功能验证。将 miRNA 过表达和抑制剂分别转染至大熊猫原代细胞,验证 miRNA 对免疫等生物学功能的影响,同样的方法也用于验证靶基因功能。结合 PCR 技术分别定量 miRNA、靶基因及其关联基因的表达情况,同时利用双荧光素酶报告系统(dual-luciferase reporter system)再次验证 miRNA 与靶基因的靶标关系,进一步说明 miRNA 对大熊猫相关生物学功能的调控作用。此外,合成大熊猫相关抗体,利用免疫印迹(Western blot, WB)技术检验其蛋白表达水平。

通过分子和蛋白水平的功能验证,明确 miRNA 对大熊猫免疫等生物学功能的调控机制,进一步完善调控互作网络,探讨如何利用 miRNA 抵抗病原菌入侵,提高大熊猫免疫能力,减少免疫相关的疾病发生,降低大熊猫在野外放归和重引入过程中因免疫疾病带来的死亡率。

3.3 构建大熊猫精子冷冻模型

Ran 等^[40]研究表明 miRNA 可能参与调控精子细胞的冷冻耐受机制,但未做进一步的功能验证。对此,建立一套大熊猫精子细胞冷冻模型,在不同冷冻温度或不同冷冻时间条件下,研究 miRNA 的表达情况及调控机制。同时,构建不同发育阶段的精子细胞冷冻模型,研究 miRNA 在大熊猫精子发育过程中对精子冷冻耐受的作用,深入挖掘 miRNA 对大熊猫精子冷冻耐受的调控机制,为进一步提高精液冷冻耐受和质量,完善精液保存技术,提高圈养大熊猫的繁殖率提供新思路。

3.4 探究 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术

基因编辑技术是对目标基因组进行定点修饰的一种基因工程技术,其中 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术在设计和构建上相对简单,应用最广泛。目前,研究表明该技术已成功应用于人^[63]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[64]、小鼠^[65]、猪^[66]、绵羊(*Ovis arise*)^[67]

等物种。研究发现, 利用 CRISPR/Cas9 技术引入绵羊等大型家畜所需的 SNP, 可以促进肌肉生长, 也能缩短育种年限^[68,69]。Wu 等^[65]通过 CRISPR/Cas9 技术使引起小鼠白内障的一个单碱基发生突变, 结果部分突变体受精卵发育成无白内障疾病的正常小鼠。因此, CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术是否也能应用于大熊猫这一珍稀物种? 该技术在大熊猫基因功能探究和基因疾病治疗方面是否能有新发现? 这些都需要人们进一步探究。

综上所述, 建立大熊猫原代细胞分离培养体系, 利用大熊猫精子冷冻模型及 CRISPR/Cas9 技术, 验证大熊猫 miRNA 功能及作用机制, 完善调控互作网络, 探索其生物学功能对大熊猫繁育和保护工作具有重要意义。

参考文献(References):

- [1] Li Y, Viña A, Yang W, Chen XD, Zhang JD, Ouyang ZY, Liang Z, Liu JG. Effects of conservation policies on forest cover change in giant panda habitat regions, China. *Land Use Policy*, 2013, 33: 42–53. [DOI]
- [2] Huang GP, Wang X, Hu YB, Wu Q, Nie RG, Dong JH, Ding Y, Yan L, Wei FW. Diet drives convergent evolution of gut microbiomes in bamboo-eating species. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(1): 88–95. [DOI]
- [3] Heiderer M, Westenberg C, Li DS, Zhang HM, Preininger D, Dungl E. Giant panda twin rearing without assistance requires more interactions and less rest of the mother-A case study at Vienna Zoo. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0207433. [DOI]
- [4] Wei W, Swaisgood RR, Owen MA, Pilfold NW, Han H, Hong MS, Zhou H, Wei FW, Nie YG, Zhang ZJ. The role of den quality in giant panda conservation. *Biol Conserv*, 2019, 231: 189–196. [DOI]
- [5] Li T, Luo P, Luo C, Yang H, Li YJ, Zuo DD, Xiong QL, Mo L, Mu CX, Gu XD, Zhou SQ, Huang JY, Li HL, Wu SJ, Cao WQ, Zhang YB, Wang MJ, Li JL, Liu Y, Gou PJ, Zhu ZF, Wang DY, Liang Y, Bai S, Zou Y. Long-term empirical monitoring indicates the tolerance of the giant panda habitat to climate change under contemporary conservation policies. *Ecol Indic*, 2020, 110: 105886. [DOI]
- [6] Han H, Wei W, Hu YB, Nie YG, Ji XP, Yan L, Zhang ZJ, Shi XX, Zhu LF, Luo YB, Chen WC, Wei FW. Diet evolution and habitat contraction of giant pandas via stable isotope analysis. *Curr Biol*, 2019, 29(4): 664–669. [DOI]
- [7] Figueirido B, Palmqvist P, Pérez-Claros JA, Wei D. Cranial shape transformation in the evolution of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Naturwissenschaften*, 2011, 98(2): 107–116. [DOI]
- [8] Hu YD, Pang HZ, Li DS, Ling SS, Lan D, Wang Y, Zhu Y, Li DY, Wei RP, Zhang HM, Wang CD. Analysis of the cytochrome c oxidase subunit 1 (*COXI*) gene reveals the unique evolution of the giant panda. *Gene*, 2016, 592(2): 303–307. [DOI]
- [9] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843. [DOI]
- [10] Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D155–D162. [DOI]
- [11] Gupta V, Markmann K, Pedersen CNS, Stougaard J, Andersen SU. Shortran: a pipeline for small RNA-seq data analysis. *Bioinformatics*, 2012, 28(20): 2698–2700. [DOI]
- [12] Yang F, Yi F, Cao HQ, Du Q, Liang ZC. The emerging landscape of long non-coding RNAs. *Hereditas(Beijing)*, 2014, 36(5): 456–468.
杨峰, 易凡, 曹慧青, 杜权, 梁子才. 长链非编码 RNA 研究进展. 遗传, 2014, 36(5): 456–468. [DOI]
- [13] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901–906. [DOI]
- [14] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79(1): 351–379. [DOI]
- [15] Nahvi A, Shoemaker CJ, Green R. An expanded seed sequence definition accounts for full regulation of the hid 3' UTR by bantam miRNA. *RNA*, 2009, 15(5): 814–822. [DOI]
- [16] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215–233. [DOI]
- [17] Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 2004, 14(6): 787–799. [DOI]
- [18] Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 2005, 3(3): e85. [DOI]
- [19] Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein

- EJ, Macmenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 2005, 37(5): 495–500. [DOI]
- [20] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120(1): 15–20. [DOI]
- [21] Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian DL, Diehn M, Liu HP, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Reijo Pera RA, Lao KQ, Clarke MF. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*, 2009, 138(3): 592–603. [DOI]
- [22] Zhao Y, Ransom JF, Li AK, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007, 129(2): 303–317. [DOI]
- [23] Zhang QH, Chang B, Zheng GZ, Du SX, Li XD. Quercetin stimulates osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through miRNA-206/connexin 43 pathway. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 2062–2070. [DOI]
- [24] Ma T, Li JY, Li JP, Wu SF, Ba X, Jiang HZ, Zhang QL. Expression of miRNA-203 and its target gene in hair follicle cycle development of cashmere goat. *Cell Cycle*, 2021, 20(2): 1–7. [DOI]
- [25] Gong ZD, Niu YH, Yuan ZF, Yang J, Wei SC. MiRNA-let-7b decreases proliferation activities and development of follicular cells via targeting *MAP3K1* gene. *Vet Arhiv*, 2021, 91(2): 149–158. [DOI]
- [26] Zhao Y, Cao XY, Zhou HT, Song LY, Tu HQ, Huang SY, Zhao JL. Analysis of miRNA transcriptome in early developmental stage and identification of growth-related miRNA of *siniperca chuatsi*. *Biotechnol Bull*, 2018, 34(8): 181–189.
赵岩, 曹晓颖, 周昊天, 宋凌云, 涂翰卿, 黄思颖, 赵金良. 鳊不同孵化时期 miRNA 转录组分析及生长相关 miRNA 鉴定. *生物技术通报*, 2018, 34(8): 181–189. [DOI]
- [27] Wang LM, Zhu WB, Dong ZJ, Song FB, Dong JJ, Fu JJ. Comparative microRNA-seq analysis depicts candidate miRNAs involved in skin color differentiation in red tilapia. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1209. [DOI]
- [28] Zhou J, Zhao H, Zhang L, Liu C, Feng SY, Ma JD, Li Q, Ke HY, Wang XY, Liu LY, Liu C, Su XT, Liu YK, Yang S. Integrated analysis of RNA-seq and microRNA-seq depicts miRNA-mRNA networks involved in stripe patterns of *Botia supercilialis* skin. *Funct Integr Genomics*, 2019, 19(5): 827–838. [DOI]
- [29] Wang N, Wang RK, Wang RQ, Chen SL. RNA-seq and microRNA-seq analysis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae treated by thyroid hormones. *Fish Physiol Biochem*, 2019, 45(4): 1233–1244. [DOI]
- [30] Ma Y. Transcriptome sequencing and analysis of milk exosomal miRNA of *columba livia* [Dissertation]. Sichuan Agricultural University, 2018.
马瑶. 鸽乳 exosomal miRNA 转录组测序与分析[学位论文]. 四川农业大学, 2018. [DOI]
- [31] Yuan M, Jiang FM, Xu YO, Lin YQ, Jiang XS, Yang CW, Yu CL, Li ZX. Analysis of transcriptome and microRNA in leg muscle of tibetan chicken at different developmental stages. *Acta Vet Et Zootech Sin*, 2019, 50(12): 2400–2412.
袁茂, 江明锋, 徐亚欧, 林亚秋, 蒋小松, 杨朝武, 余春林, 李志雄. 藏鸡不同发育阶段腿部肌肉组织转录组及 microRNA 联合分析. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(12): 2400–2412. [DOI]
- [32] Long KR. The miRNA transcriptome level reveals the mechanism of multi-species adaptation to high altitude [Dissertation]. Sichuan Agricultural University, 2018.
龙科任. 从 miRNA 转录组层面揭示多物种的高海拔适应性机制[学位论文]. 四川农业大学, 2018. [DOI]
- [33] Zhang SF. Identification and characterization of miRNA transcriptome in sheep [Dissertation]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
张世芳. 绵羊 miRNA 转录组的鉴定与特征分析[学位论文]. 中国农业科学院, 2013. [DOI]
- [34] Xie LL, Li Y, Huang WL, Zhang XX, Miao XY. Identification and analysis of miRNA in ovary of sheep at different developmental stages. *Acta Vet Et Zootech Sin*, 2019, 50(7): 1396–1404.
解领丽, 李媛, 黄万龙, 张秀秀, 苗向阳. 湖羊卵巢不同发育阶段的 miRNA 鉴定与分析. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(7): 1396–1404. [DOI]
- [35] Bao LY, Cao BY, Liu YH, Ma Y, An XP, Zhang Y, Zhang M, Wang JG, Du B, Li G. Regulation of miR-92a on proliferation and apoptosis of mammary epithelial cells of dairy goats. *Acta Vet Et Zootech Sin*, 2020, 51(1): 137–149.
包黎娟, 曹斌云, 刘育含, 马毅, 安小鹏, 张月, 张梦, 王建刚, 堵斌, 李广. miR-92a 对奶山羊乳腺上皮细胞增殖及凋亡的调控分析. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(1): 137–149. [DOI]
- [36] Yang MY, Du LM, Li WJ, Shen FJ, Fan ZX, Jian ZY, Hou R, Shen YM, Yue BS, Zhang XY. Profile of microRNA in giant panda blood: a resource for immune-related and

- novel microRNAs. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143242. [DOI]
- [37] Wang CD, Long K, Jin L, Huang S, Li DH, Ma XP, Wei M, Gu Y, Ma JD, Zhang H. Identification of conserved microRNAs in peripheral blood from giant panda: expression of mammary gland-related microRNAs during late pregnancy and early lactation. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4):14216–14228. [DOI]
- [38] Ma JD, Wang CD, Long KR, Zhang HM, Zhang JW, Jin L, Tang QZ, Jiang AA, Wang X, Tian SL, Chen L, He DF, Li DS, Huang S, Jiang Z, Li MZ. Exosomal microRNAs in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) breast milk: potential maternal regulators for the development of newborn cubs. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3507. [DOI]
- [39] Peng R, Liu YL, Cai ZG, Shen FJ, Chen JS, Hou R, Zou FD. Characterization and analysis of whole transcriptome of giant panda spleens: implying critical roles of long non-coding RNAs in immunity. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(3): 1065–1077. [DOI]
- [40] Ran MX, Zhou YM, Liang K, Wang WC, Zhang Y, Zhang M, Yang JD, Zhou GB, Wu K, Wang CD, Huang Y, Luo B, Qazi IH, Zhang HM, Zeng CJ. Comparative analysis of microRNA and mRNA profiles of sperm with different freeze tolerance capacities in boar (*Sus scrofa*) and giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Biomolecules*, 2019, 9(9): 432. [DOI]
- [41] Wang CD, Li F, Deng LH, Li MZ, Wei M, Zeng B, Wu K, Xu ZX, Wei RP, Wei LM, Liu WP, Zhang SY, Xu L, Huang Y, Li DS, Li Y, Zhang HM. Identification and characterization of miRNA expression profiles across five tissues in giant panda. *Gene*, 2020, 769(5):145206. [DOI]
- [42] Sun J, Shen FJ, Zhang L, Luo L, Fan ZX, Hou R, Yue BS, Zhang XY. Changes in the microRNA profile of the giant panda after canine distemper vaccination and the integrated analysis of microRNA-messenger RNA. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(4): 595–605. [DOI]
- [43] Sonkoly E, Ståhle M, Pivarsci A. MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol*, 2008, 18(2): 131–140. [DOI]
- [44] Du LM, Li WJ, Fan ZX, Shen FJ, Yang MY, Wang ZL, Jian ZY, Hou R, Yue BS, Zhang XY. First insights into the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) blood transcriptome: a resource for novel gene loci and immunogenetics. *Mol Ecol Resour*, 2015, 15(4): 1001–1013. [DOI]
- [45] Du LM, Liu Q, Shen FJ, Fan ZX, Hou R, Yue BS, Zhang XY. Transcriptome analysis reveals immune-related gene expression changes with age in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) blood. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(1): 249–262. [DOI]
- [46] Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, Eidelman AI. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 2005, 129(3): 496–506. [DOI]
- [47] Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 2010, 1(1): 7. [DOI]
- [48] Izumi H, Kosaka N, Shimizu T, Sekine K, Ochiya T, Takase M. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J Dairy Sci*, 2012, 95(9): 4831–4841. [DOI]
- [49] Gu YR, Liang Y, Gong JJ, Zeng K, Li ZQ, Lei YF, He ZP, Lv XB. Suitable internal control microRNA genes for measuring miRNA abundance in pig milk during different lactation periods. *Genet Mol Res*, 2012, 11(3): 2506–2512. [DOI]
- [50] Jin XL, Yang JX, Li Z, Liu YH, Liu JX. Progress on the miRNA related with mammary gland development and lactation. *Hereditas(Beijing)*, 2013, 35(6): 695–702. 金晓露, 杨建香, 李真, 刘红云, 刘建新. 乳腺发育及泌乳相关 miRNA 研究进展. *遗传*, 2013, 35(6): 695–702. [DOI]
- [51] Oatley JM, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol*, 2006, 419: 259–282. [DOI]
- [52] Ran ML, Chen B, Yang QA, Jiang M, Yin J. Advances in miRNA research related to testis development and spermatogenesis. *Hereditas(Beijing)*, 2014, 36(7): 646–654. 冉茂良, 陈斌, 杨岸奇, 蒋明, 尹杰. 睾丸发育和精子生成相关 miRNA 研究进展. *遗传*, 2014, 36(7): 646–654. [DOI]
- [53] Tong MH, Mitchell D, Evanoff R, Griswold MD. Expression of Mirlet7 family microRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod*, 2011, 85(1): 189–197. [DOI]
- [54] Tong MH, Mitchell DA, McGowan SD, Evanoff R, Griswold MD. Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mircl1) and Mir-106b-25 (Mircl3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod*, 2012, 86(3): 72. [DOI]
- [55] Lichner Z, Páll E, Kerekes A, Pállinger E, Maraghechi P, Bosze Z, Góczy E. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. *Differentiation*, 2011, 81(1): 11–24. [DOI]
- [56] Rosa A, Brivanlou AH. A regulatory circuitry comprised

- of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation. *EMBO J*, 2011, 30(2): 237–248. [DOI]
- [57] Jung YH, Gupta MK, Shin JY, Uhm SJ, Lee HT. MicroRNA signature in testes-derived male germ-line stem cells. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(11): 804–810. [DOI]
- [58] Ucar A, Eriki E, Ucar O, Chowdhury K. miR-212 and miR-132 are dispensable for mouse mammary gland development. *Nat Genet*, 2014, 46(8): 802–804. [DOI]
- [59] Phua YW, Nguyen A, Roden DL, Elsworth B, Deng NT, Nikolic I, Yang J, Mcfarland A, Russell R, Kaplan W, Cowley MJ, Nair R, Zotenko E, O'Toole S, Tan SX, James DE, Clark SJ, Kouros-Mehr H, Swarbrick A. MicroRNA profiling of the pubertal mouse mammary gland identifies miR-184 as a candidate breast tumour suppressor gene. *Breast Cancer Res*, 2015, 17(1): 83. [DOI]
- [60] Zhang M, Hou R, Liu YL, Zheng HP, Zhu Q, Zhang ZH, Xian H. Effects of epidermal growth factor and insulin on biological characteristics of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) cutaneous fibroblast *in vitro*. *Zoolog Res*, 2005, 26(5): 499–505.
张明, 侯蓉, 刘玉良, 郑鸿培, 朱庆, 张志和, 鲜红. 表皮生长因子和胰岛素对大熊猫体外培养皮肤成纤维细胞生物学特性的影响. *动物学研究*, 2005, 26(5): 499–505. [DOI]
- [61] Zhang M, Hou R, Zheng HP, Zhu Q, Xian H, Li J. Studies on biological characteristic of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) skin fibroblasts in the different media. *J Yangzhou Univ (Agric Life Sci Ed)*, 2006, 27(3): 35–39.
张明, 侯蓉, 郑鸿培, 朱庆, 鲜红, 李俊. 大熊猫皮肤成纤维细胞在不同培养液中的生物学特性研究. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2006, 27(3): 35–39. [DOI]
- [62] Yu FJ, Zeng CJ, Zhang Y, Wang CD, Xiong TY, Fang SG, Zhang HM. Establishment and cryopreservation of a giant panda skeletal muscle-derived cell line. *Biopreserv Biobank*, 2015, 13(3): 195–199. [DOI]
- [63] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, Dicarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [64] Chang NN, Sun CH, Gao L, Zhu D, Xu XF, Zhu XJ, Xiong JW, Xi JJ. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465–472. [DOI]
- [65] Wu YX, Liang D, Wang YH, Bai MZ, Tang W, Bao SM, Yan ZQ, Li DS, Li JS. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 653–658. [DOI]
- [66] Hai T, Teng F, Guo RF, Li W, Zhou Q. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2014, 24(3): 327–375. [DOI]
- [67] Han HB, Ma YH, Wang T, Lian L, Tian XZ, Hu R, Deng SL, Li KP, Wang F, Li N. One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Front Agr Sci Eng*, 2014, 1(1): 2–5. [DOI]
- [68] Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813–818. [DOI]
- [69] Li C, Cao GW. Advances in CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Chin J Biotechnol*, 2015, 31(11): 1531–1542.
李聪, 曹文广. CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术研究进展. *生物工程学报*, 2015, 31(11): 1531–1542. [DOI]

(责任编辑: 于黎)