

去势和非去势公猪背最长肌 circRNA 差异表达分析

邢宝松¹, 王璟¹, 陈俊峰¹, 马强¹, 任巧玲¹, 张家庆¹, 张华¹, 滑留帅¹,
孙加节², 曹海³

1. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河南省畜禽繁育与营养调控重点实验室, 郑州 450002
2. 华南农业大学动物科学学院, 广东省动物营养调控重点实验室/国家生猪种业工程技术中心, 广州 510642
3. 河南兴锐农牧科技有限公司, 信阳 465550

摘要: 公猪去势可减少异味和打斗, 但去势后产肉量和肌肉脂肪沉积发生变化, 其分子机制的解析对生产具有重要意义。近年来研究表明, 环状 RNA (circRNA) 在肌肉发育中具有重要调控作用。为探究去势后 circRNAs 对背最长肌发育的调控, 本研究选择 6 头淮南公猪, 随机选择 3 头去势, 当体重达 130 kg 左右屠宰, 采集背最长肌样品, 利用高通量测序筛选差异表达 circRNAs (differentially expressed circRNAs, DECs) 并进行 KEGG 功能富集分析。结合前期筛选的公猪去势相关 miRNAs, 构建 DECs-miRNAs 调控网络, 最后使用猪骨骼肌卫星细胞验证候选 circRNA 表达谱及其与 miRNA 互作关系。结果表明, 去势和非去势组背最长肌样品共获得 5866 个 circRNAs, 两组之间共有 370 个 DECs ($|\log_2\text{Foldchange}| > 1, p_{adj} < 0.8$), KEGG 富集分析表明, DECs 来源母基因主要富集于肌肉发育、肌纤维类型转化、能量代谢等相关通路。构建的 DECs-miRNA 调控网络共包括 69 个 circRNAs 和 8 个 miRNAs。选择 circRNA_2241 和 circRNA_4237 进行验证, 结果发现这两个 circRNAs 真实存在且表达趋势与测序结果一致。进一步在猪骨骼肌卫星细胞初步验证 circRNA_2241 与 miR-1 互作关系, 结果表明睾酮显著促进 circRNA_2241 表达, 同时抑制 miR-1 表达。本研究结果提示 circRNAs 可能通过与 miRNAs 互作调控猪去势后背最长肌发育, 从而为解析去势对肌肉发育调控的分子机制提供参考。

关键词: 环状 RNA; 去势; 公猪; 背最长肌

收稿日期: 2021-04-27; 修回日期: 2021-07-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 31601927), 河南省农业科学院科技创新创意项目(编号: 2020CX18)和河南省重点研发与推广专项(编号: 212102110010)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31601927), Technological Innovation and Creative Project from the Henan Academy of Agricultural Sciences (No. 2020CX18) and Financial Budget Project of Henan Province (No. 212102110010)]

作者简介: 邢宝松, 博士, 副研究员, 研究方向: 猪的育种与管理。E-mail: bsxing@126.com

通讯作者: 王璟, 博士, 副研究员, 研究方向: 遗传育种。E-mail: wangjing_0407@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.21-162

网络出版时间: 2021/8/27 12:31:16

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20210825.1518.002.html>

Analysis of differentially expressed circRNAs in longissimus muscle between castrated and intact male pigs

Baosong Xing¹, Jing Wang¹, Junfeng Chen¹, Qiang Ma¹, Qiaoling Ren¹, Jiaqing Zhang¹, Hua Zhang¹, Liushuai Hua¹, Jiajie Sun², Hai Cao³

1. Henan Key Laboratory of Farm Animal Breeding and Nutritional Regulation, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

2. Guangdong Provincial Key Laboratory Of Animal Nutrition Control/National Engineering Research Center For Breeding Swine Industry, College Of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

3. Henan Xing Rui agricultural and animal husbandry technology Co., LTD, Xinyang 465550, China

Abstract: Castration can reduce odor and fights in boars, but the carcass yield is reduced, and the intramuscular fat content is increased. Understanding its molecular mechanism is of great significance for production. Recent studies have shown that circular RNAs (circRNAs) play an important role(s) in the regulation of muscle development. To explore the effects of circRNAs on the development of longissimus dorsi (LD) muscle after castration, six Huainan male pigs were selected and three of which were randomly castrated. Six pigs were slaughtered when their body weight reached around 130 kg, and the LD muscle samples were collected. The differentially expressed circRNAs (DECs) were screened by high-throughput sequencing and functionally analyzed using the KEGG databases. DECs-miRNAs network was constructed, and the expression profiles of candidate circRNAs and their interactions with miRNAs were verified in porcine skeletal muscle satellite cells. The results showed that a total of 5866 circRNAs were obtained, and 370 DECs were identified in LD muscle between the castrated and intact groups ($|\log_2\text{Foldchange}| > 1$, $p_{adj} < 0.8$). KEGG enrichment indicated that the parental genes for the DECs were mainly enriched in the pathways associated with muscle development, muscle fiber type transformation, and energy metabolism. There were 8 miRNAs and 69 circRNAs enriched in the DECs-miRNA network. circRNA_2241 and circRNA_4237 were selected for verification, which showed that these two circRNAs really existed and their expression profiles were consistent with the sequencing results. Further, preliminary analysis showed that circRNA_2241 interacted with miR-1, and testosterone promoted circRNA_2241 but inhibited miR-1 expression. These results confirmed that circRNAs might participate in the regulation of LD muscle development after castration by interacting with miRNAs, thereby providing new materials and references for analyses on the molecular mechanisms of castration on the regulation of muscle development.

Keywords: circRNAs; castration; male pigs; longissimus muscle

在猪生产中, 去势不仅减少公猪异味, 还可减少打斗造成的经济损失。但去势后, 公猪产肉量和肌肉脂肪(intramuscular fat, IMF)含量与未去势公猪差异很大, 去势公猪产肉量降低, 脂肪沉积增加^[1]。类似的, 公牛去势后肉质性状例如 IMF 含量、大理石花纹、脂肪酸组成等都显著提高, 但产肉量降低^[2~4]。近年来, 有研究比较了去势后背最长肌(longissimus dorsi, LD)和皮下脂肪 mRNA、miRNA 和 lncRNA 的表达变化。王璟等^[5]比较了去势和非去势淮南公猪背最长肌转录组, 共筛选到 935 个差异表达基因,

KEGG 富集到肌肉发育和脂质代谢相关通路。其中硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1 (stearoyl-CoA desaturase-1, SCD-1)、激素敏感酯酶 (hormone-sensitive lipase, HSL)、葡萄糖转运体 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 等基因能同时或部分参与激素分泌、脂肪沉积和肌肉发育调控。Bai 等^[6]对比 23 周龄去势和非去势猪皮下脂肪组织 miRNA 表达谱, 发现 177 个差异表达 miRNAs, KEGG 富集分析发现这些 miRNAs 参与肌细胞增殖、分化和凋亡和脂肪组织发育。Cai 等^[7,8]通过测序比较去势和非去势公猪皮下脂肪和背最长

肌 miRNAs 表达差异,分别筛选到 18 个和 7 个差异表达 miRNAs,其靶基因主要参与脂肪代谢和骨骼肌收缩。Wang 等^[9]在去势和非去势猪皮下脂肪组织筛选到 18 个差异表达 lncRNAs,其靶基因与脂肪酸、胰岛素和脂肪细胞因子有关。Xing 等^[10]研究表明,去势和非去势猪背最长肌有 385 个差异表达 lncRNAs,主要与雌激素受体的信号传导以及骨骼肌发育相关。虽然上述研究筛选了去势后背最长肌和皮下脂肪组织全转录组差异表达谱,但去势调控肌肉发育和脂质代谢的分子机制尚不清楚。

近期研究表明,环状 RNA (circular RNA, circRNAs)参与肌肉发育和脂肪沉积调控,例如成肌细胞分化过程中 circ-ZNF609 表达量上调,可特异性抑制成肌细胞增殖^[11]。线粒体分裂和凋亡相关 circRNA (mitochondrial fission and apoptosis-related circRNA, MFACR)可通过抑制 MTP18 翻译减少心肌细胞死亡^[12]。来源于鸡 Supervillin 基因的 circSVIL 通过竞争性吸附 miR-203 促进成肌细胞增殖和分化^[13]。牛 circFGF3 可吸附 miR-107,释放其对 Wnt3a 的抑制作用,进而促进成肌细胞分化^[14]。circFUT10-miR-133a 通路抑制成肌细胞增殖,并促进分化^[15]。牛 circHUWE1 通过 miR-29b-AKT3-AKT 信号通路,促进成肌细胞增殖,抑制凋亡和分化^[16]。circINSR 通过海绵吸附 miR-34a,减轻 miR-34a 对 Bcl-2 和 CyclinE2 的抑制,促进成肌细胞增殖减少细胞凋亡^[17]。环状 RNA SAMD4A 通过 miR-138-5p-EZH2 促进前脂肪细胞分化^[18]。CDR1as 促进源自人脐带的间充质干细胞增殖和分化^[19]。circFUT10 通过 let-7c-PPARGC1B 促进牛脂肪细胞增殖抑制分化^[20]。基于这些结果,为探究 circRNAs 在去势后猪肌肉发育中的调控机制,本研究利用高通量测序比较了去势公猪和未去势公猪背最长肌 circRNA 的表达差异,为进一步解析去势对肌肉发育调控机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

在河南兴锐农牧科技有限公司选择 6 头出生体重相近的半同胞淮南猪公猪,每 2 头来源于同一窝。于 7 日龄每窝随机选择 1 头去势,另 1 头相同部位

进行伪手术处理,保证去势组和非去势组猪只所受手术应激一致。按照标准饲养流程饲喂,猪只体重达到 130 kg 左右(大约 300~315 日龄)屠宰,屠宰 30 min 内采集背最长肌样品(体右侧,第 6~7 肋骨),液氮保存。

1.2 RNA 提取和测序建库

使用 TRIzol (美国 Invitrogen 公司)分别提取 6 个背最长肌样品总 RNA。利用琼脂糖凝胶电泳、Agilent 2100 生物分析仪(美国安捷伦科技公司)和 NanoDrop 分光光度计(美国 Nano-Drop 科技公司)分析所提 RNA 的纯度、质量和完整性。RNA 完整性数(RIN)大于 8 的样品用于构建文库。使用 DNase I (美国 QIAGEN 公司)消化所提 RNA,去除残留基因组 DNA。使用 Ribo-ZeroTMrRNA 试剂盒(美国 Epicentre 公司)去除核糖体 RNA。去势猪 RNA 样品和非去势猪 RNA 样品分别混合后测序。使用 Illumina TruSeqTMrRNA 样品制备试剂盒生成测序文库,在 Illumina Hiseq 2500 平台进行测序。

1.3 circRNA 鉴定

原始数据(Raw data)去除接头和低质量数据得到有效数据(clean data),用 TopHat2 软件将有效数据与猪参考基因组(*Sus scrofa* 11.1)比对分析。通过 find_circ 软件鉴定 circRNAs,其基本原理是:提取与基因组未比对上序列两端 20 nt 的 anchor 序列,反向拼接 anchor 序列获得短序列读段,将短序列读段再次与基因组进行比对,选取序列吻合且有 GT-AG 剪接位点的作为候选 circRNA。将 read count 小于 2 的 circRNA 留作鉴定的 circRNAs。与 circBase 数据库比对区分已知 circRNAs 和新发现 circRNAs。进一步根据 circRNAs 在染色体的位置,分为反义,有义重叠,外显子,内含子和基因间五类。

1.4 circRNA 表达分析

使用 TPM(transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads,每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本数)对 circRNAs 进行归一化处理,计算每个 circRNA 在每个样品的表达量^[21]。使用 DESeq 软件分析 circRNAs 在不同样品中的表达差异,差异表达 circRNA (differently expressed circRNA,

DEC)筛选条件为 $|\log_2\text{Foldchange}| \geq 1$ 且 $P_{adj} \leq 0.8^{[22]}$ 。利用 Bowtie2 软件鉴定 circRNA 的母源基因,对 DEC 母源基因进行 GO 和 KEGG 分析, $P < 0.05$ 视为有统计意义。

1.5 circRNA-miRNA 网络图的构建

为进一步分析 DEC 的生物学功能,结合前期研究筛选的公猪背最长肌去势相关 miRNAs^[23],使用 miRanda 软件分析 DEC 与这些 miRNAs 之间的关系,保留种子区域没有错配,且能量 < -18 kcal / 摩尔的 miRNAs。使用 Cytoscape 软件对 DEC-miRNA 互作网络进行绘图。

1.6 circRNA 验证和定量分析

根据长度和表达量,选择 circRNA_2241 和 circRNA_4237 鉴定所筛选 circRNA 真实性和表达趋势。用 RNase R (3 U/ μg , 美国 Epicenter Biotechnologies 公司)处理背最长肌提取的总 RNA, 1 μg RNA 使用 3 U 的 RNase R 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。根据 circRNA_2241 和 circRNA_4237 的剪切位点,设计特异性反向扩增剪切位点的引物,引物信息见表 1,引物由上海生工生物工程有限公司设计合成。扩增后通过 Sanger 测序鉴定 circRNA 的真实性(上海生工生物工程有限公司)。

使用 qRT-PCR 检测 circRNA_2241 和 circRNA_4237 在去势和非去势猪背最长肌的表达水平,所用 RNA 与测序所用 RNA 相同。使用 SYBR Green PCR 试剂盒,扩增体系包括 20 ng cDNA、10 μL 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物。qPCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 复性 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 40 个循环。所有反应重复 3 次,并通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 circRNAs 相对表达量。

表 1 circRNA 引物序列信息

Table 1 Sequence information of the primers used for circRNAs

位点	引物序列(5'-3')		扩增长度(bp)
	上游引物	下游引物	
circRNA_2241	CAATCCTTCAGCCCAGAGAG	TGTCCAGAATGAACATCATAG	134
circRNA_4237	CTCCTAAAACCACAGGTGTG	TTGTGGATAAGGTGGGTACG	101
GAPDH	ACCAGGTTGTGTCCTGTGAC	AGCTTGACGAAGTGGTCGTT	94

1.7 猪骨骼肌卫星细胞培养

circRNA_2241 包含在 DEC-miRNA 互作网络中,所以选择 circRNA_2241-miR-1 做进一步验证。按文献^[24]的方法分离猪骨骼肌卫星细胞。为验证去势对肌肉 circRNA 表达的影响,在猪骨骼肌卫星细胞中,通过添加不同浓度睾酮和不添加睾酮,分别模拟非去势组和去势组。当细胞达到 70%~80% 融合时,在培养基中添加不同浓度睾酮,对照组不添加睾酮,实验组睾酮添加量分别为 10^{-9} mol/L 和 10^{-10} mol/L。添加睾酮 48 h 后收获细胞,检测睾酮对 circRNA_2241 和 miR-1 表达的影响。

1.8 统计分析

使用 SPSS 统计软件进行方差分析和显著性检验,所有数据均以 $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ 表示。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 circRNA 特征分析

去势和非去势公猪背最长肌共获得 5866 个 circRNAs, 两组共有 circRNAs 为 5205 个(图 1A)。这些 circRNAs 长度范围 150 bp~99,406 bp, 平均长度 5494 bp (图 1B)。这些 circRNAs 在全部染色体均有分布,6 号染色体分布的 circRNAs 最多,占 10.54%。X 染色体和 Y 染色体分别有 143 个和 9 个,线粒体上仅有 4 个(图 1C)。根据在基因组的位置,这些 circRNAs 中有义重叠最多(77%),其次是基因间区(14%),反义 circRNAs 和位于外显子区的 circRNAs 均为 4%,内含子区最少,仅有 1% (图 1D)。

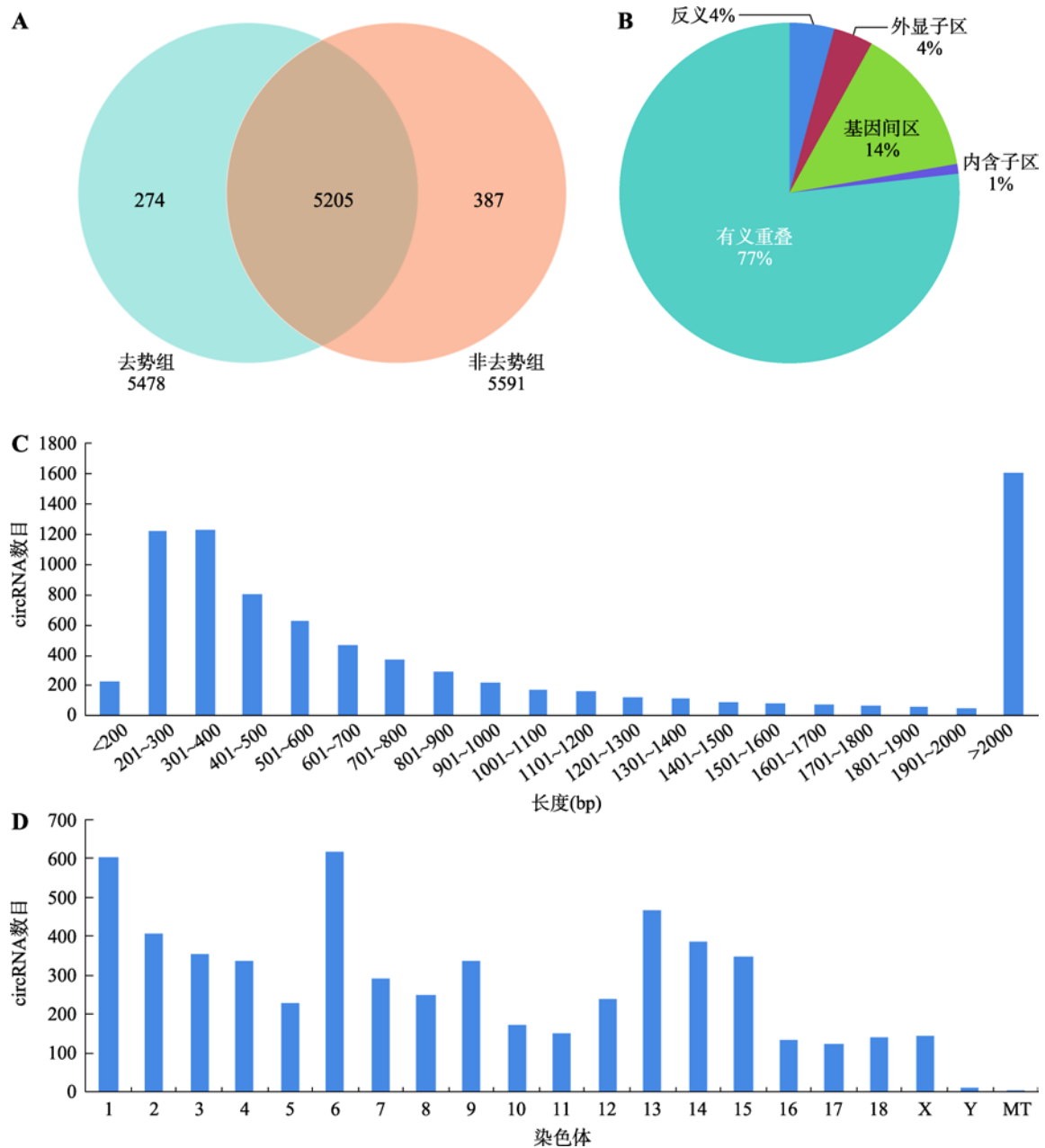


图 1 去势和非去势组背最长肌鉴定 circRNAs 的特征

Fig. 1 The features of identified circRNAs in LD muscle from castrated and intact group

A: 去势组和非去势组 circRNAs 差异; B: circRNAs 分类; C: circRNAs 长度; D: 染色体分布情况。MT: 线粒体。

2.2 circRNAs 差异表达和功能分析

去势组和非去势组相比,共筛选到 370 个 DECs,其中有 217 个上调,153 个下调($|\log_2\text{Foldchange}| > 1$, $p_{adj} < 0.8$) (图 2)。对这些 DECs 来源基因进行功能分析,GO 分析主要富集的细胞组分为细胞器,生物学过程主要是各种代谢过程,分子功能主要富集于酶、

蛋白质、核苷酸的结合(表 2)。KEGG 分析主要富集于肌肉发育、肌纤维类型转化和能量代谢相关通路,例如 Wnt、泛素介导的蛋白水解、甲状腺激素、淀粉和蔗糖代谢、AMPK 等信号通路(图 3)。

2.3 circRNAs-miRNAs 互作网络的构建和分析

为进一步解析这些 DECs 的功能,基于内源竞

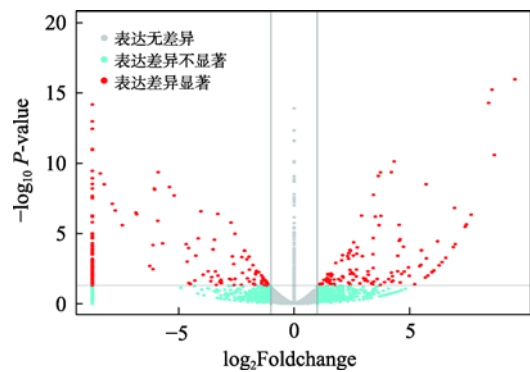


图 2 去势和非去势组差异表达 circRNAs 火山图

Fig. 2 The volcano plot of differentially expressed circRNAs between castrated and intact groups

图中一个点代表一个 circRNA，每个点的横坐标值是该 circRNA 的 $\log_2\text{Foldchange}$ ($\text{Foldchange}=\text{去势组 TPM}/\text{非去势组 TPM}$)，每个点的纵坐标为该 circRNA 在两组的 $-\log_{10} P\text{-value}$ 。

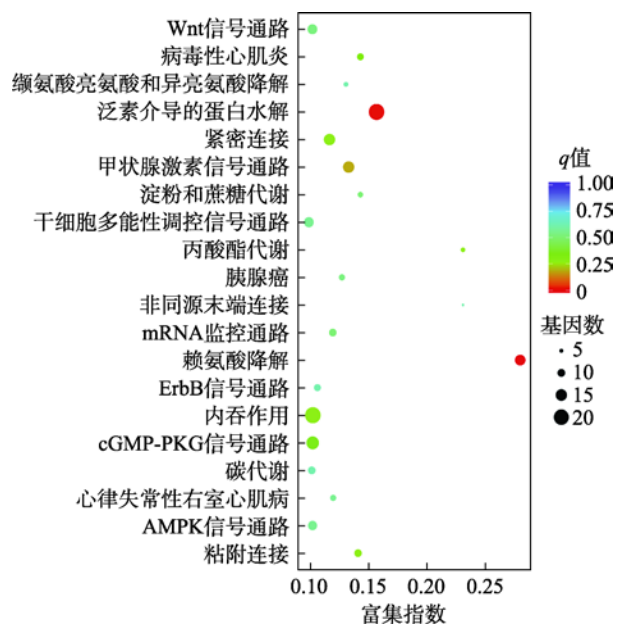


图 3 去势和非去势组 DECs 来源基因 KEGG 富集分析

Fig. 3 The KEGG analysis of the DECs' parent genes between castrated and intact groups

争 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 机制，结合前期获得的去势和非去势猪背最长肌差异表达的 miRNAs，构建 DECs-miRNA 互作网络。如图 4 所示，网络图共富集 69 个 circRNAs，8 个 miRNA，共 234 个 edges，每个 circRNAs 最少有 2 个以上 miRNA 结合位点。其中 miR-1 靶 circRNA 最多，共 38 个，miR-133a-3p 靶 circRNA 最少，共 20 个。其中 circ_1060、circ_5230、circ_6457、circ_7356

表 2 去势和非去势组 DECs 来源基因 GO 富集分析

Table 2 GO enriched analysis of DECs' parent genes between castrated and intact groups

类型	GO 通路	GO 编号	富集基因数
细胞组分	细胞内部分	GO:0044424	1732
	细胞内	GO:0005622	1813
	细胞内膜结合细胞器	GO:0043231	1369
	细胞内细胞器	GO:0043229	1492
	膜结合细胞器	GO:0043227	1498
	细胞器	GO:0043226	1605
	核部分	GO:0044428	615
	细胞内细胞器部分	GO:0044446	983
	细胞器部分	GO:0044422	993
	核	GO:0005634	882
生物过程	细胞大分子代谢过程	GO:0044260	1097
	细胞代谢过程	GO:0044237	1374
	大分子代谢过程	GO:0043170	1184
	细胞器组织	GO:0006996	503
	初级代谢过程	GO:0044238	1380
	有机物代谢过程	GO:0071704	1414
	细胞蛋白质代谢过程	GO:0044267	660
	代谢过程	GO:0008152	1600
	细胞成分的组织或生物发生	GO:0071840	769
	细胞成分组织	GO:0016043	744
分子功能	蛋白质结合	GO:0005515	1709
	杂环化合物结合	GO:1901363	801
	有机环状化合物结合	GO:0097159	804
	核酸结合	GO:0003676	466
	酶结合	GO:0019899	263
	结合	GO:0003723	143
	核苷酸结合	GO:0000166	442
	磷酸核苷结合	GO:1901265	442
	小分子结合	GO:0036094	461
	催化活性	GO:0003824	949

和 circ_7733 的 miRNA 结合位点最多，都有 8 个。

互作网络图中富集到的 69 个 circRNAs 中，有 9 个位于基因间区，剩下 60 个 circRNAs 来源于 42 个编码基因。为了解这些 circRNAs 的功能，本研究对其来源 mRNA 进行了 KEGG 富集分析，结果发现这些 mRNA 显著富集于蛋白、脂质和糖类代谢通路 (图 5)。

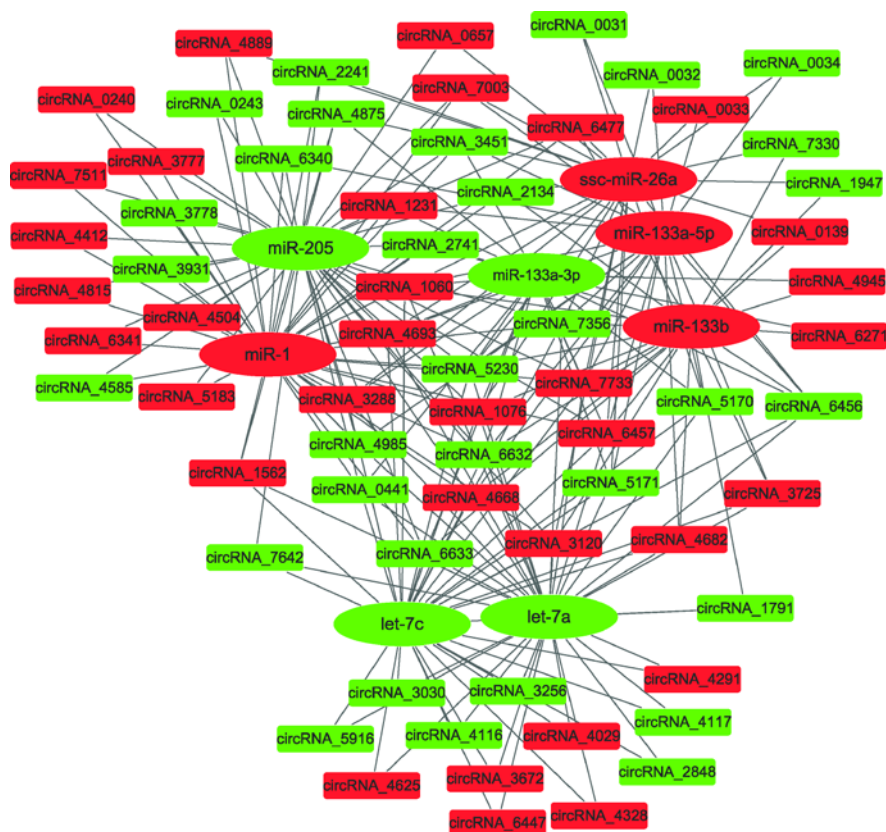


图 4 去势相关 miRNA 与 DECs 互作分析

Fig. 4 The interaction analysis between castration-related miRNA and DECs

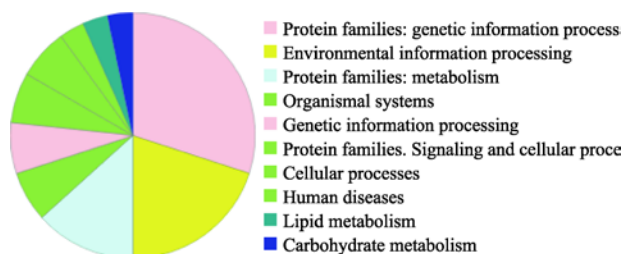


图5 miRNA-DECs网络富集circRNAs的KEGG分析
Fig. 5 KEGG analysis of circRNAs from miRNA-circRNA network

2.4 circRNAs 的验证

为验证所筛选 circRNAs 真实性,综合考虑转录本长度和表达量水平,本研究选择 circRNA_2241 和 circRNA_4237 进行验证,二者分别位于 14 号染色体和 2 号染色体。结果如图 6 所示, RNase R 消化前后 circRNA_2241 和 circRNA_4237 扩增量略有差异,而线性的 GAPDH 在 RNase R 消化后没有扩增产物。进一步将扩增产物进行测序,证实这两

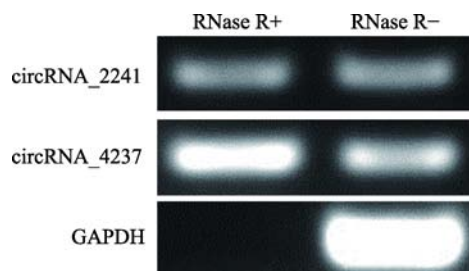


图6 RNase R 消化法验证 circRNA_2241 和 circRNA_4237

Fig. 6 RNase R detected the presence of circRNA_2241 and circRNA 4237

RNase R+: 添加 RNase R 组, RNase R-: 不添加 RNase R 组。

个 circRNA 反向剪切位点真实存在(图 7)。定量 PCR 分析表明, 与非去势组相比, circRNA_2241 在去势组表达量下调, circRNA_4237 在去势组表达量上调, 表达变化趋势和测序结果一致(图 8)。

为验证预测的 DEC_s-miRNAs 互作关系, 进一步选取 circRNA_2241 和 miR-1 进行验证。在猪骨骼肌卫星细胞添加不同剂量睾酮, qRT-PCR 发现睾酮

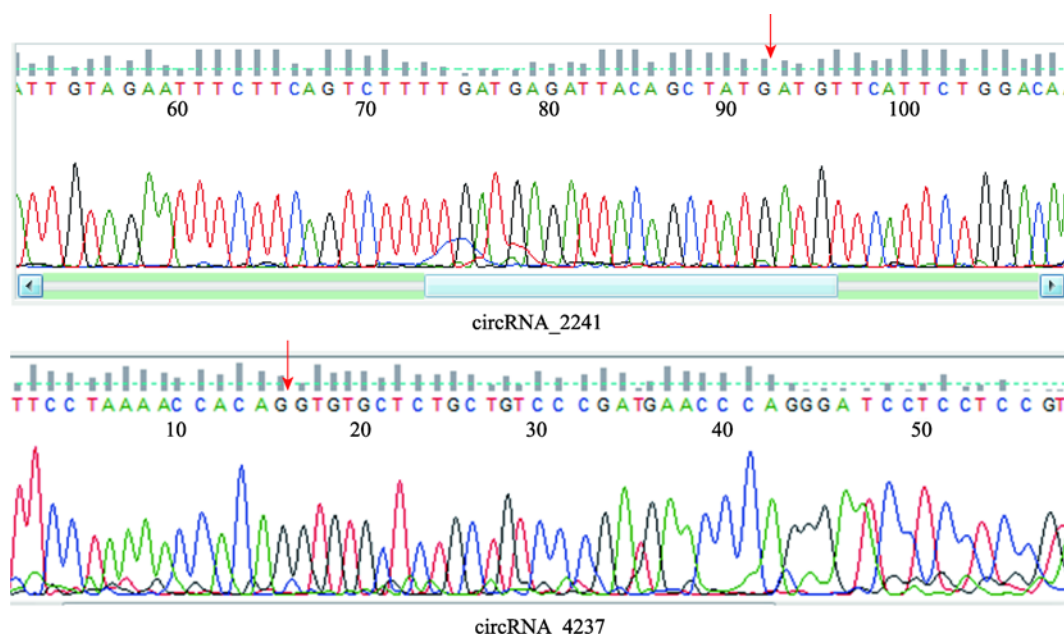


图 7 circRNA_2241 和 circRNA_4237 剪切位点测序结果

Fig. 7 Sanger sequencing results of circRNA_2241 and circRNA_4237 junction site

红色箭头表示反向剪切位点。

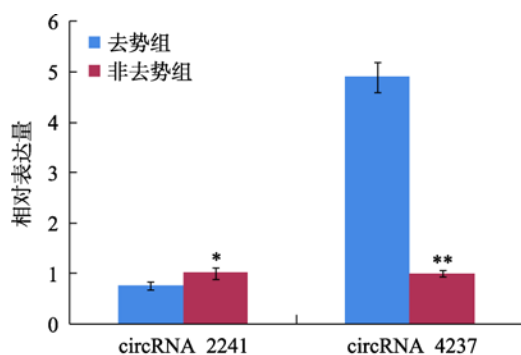


图 8 circRNA_2241 和 circRNA_4237 在去势组和非去势组背最长肌的表达

Fig. 8 The expression of circRNA_2241 and circRNA_4237 in LD muscle of castrated and intact groups

* $P < 0.05$ 表示差异显著, ** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

抑制 miR-1 表达, 促进 circRNA_2241 表达(图 10), 睾酮对二者表达调控作用是相反的, 提示 circRNA_2241 可能是 miR-1 靶基因。

3 讨论

以往的研究从 mRNA、miRNA 以及 lncRNA 等角度探讨了去势后肌肉发育变化的分子机制。近年

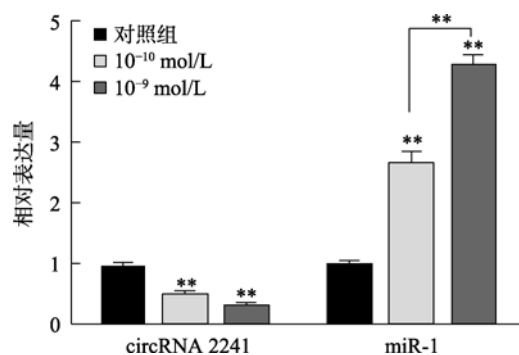


图 9 睾酮对 circRNA_2241 和 miR-1 表达量的影响

Fig. 9 The effect of testosterone on circRNA_2241 and miR-1 expression

** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

来研究表明 circRNAs 也参与肌肉发育调控, 所以本研究首次通过高通量测序比较去势和非去势淮南猪背最长肌 circRNAs 表达谱。测序共鉴定 5866 个 circRNAs, 主要为同义重叠类型, 位于内含子区的最少, 这与之前研究结果类似^[25,26]。这些 circRNAs 大于 2000 bp 的最多, 小于 2000 bp 中, 200~400 bp 最多。这些 circRNAs 分布于所有染色体, 其中 Y 染色体和线粒体最少。

肌肉生长受细胞数量和蛋白合成降解两个方面的调控, 其中肌细胞数量在胚胎期已固定, 与成肌

细胞增殖分化相关, 需要肌源性蛋白适时合成和降解。出生后肌肉肥大主要是蛋白质分解代谢和合成代谢动态平衡的过程^[27]。之前研究表明, 家畜去势后产肉量降低, 即肌肉量减少。本研究中, KEGG 富集分析结果提示, DEC 可能通过泛素系统、甲状腺激素、Wnt、AMPK 等信号通路参与去势后肌肉发育、肌纤维类型转化以及能量代谢的调控。

DECs 来源基因最主要富集到的是泛素介导的蛋白水解信号通路, 其中泛素蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasomesystem, UPS)参与调控肌肉蛋白降解, 泛素蛋白连接酶肌肉降解因子(muscle atrophy F-box, MAFbx)泛素化并降解分化蛋白, 抑制肌肉蛋白合成^[28]。肌肉环指蛋白 1 (muscle RING finger 1, MuRF-1)通过泛素化导致集钙蛋白 1 (calsequestrin 1, CASQ1)和肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MYH)降解^[29,30]。快慢肌是影响肉品质的重要因素^[31], 而 MAFbx 和 MuRF-1 降解快慢肌速度不同^[32,33]。所以 UPS 系统一方面调控肌肉分化相关蛋白降解, 调控肌肉分化, 另一方面通过对快慢肌降解速度不同, 间接调控肉品质。KEGG 分析还富集到甲状腺激素信号通路, 低水平甲状腺激素促进骨骼肌生长, 高水平抑制骨骼肌生长^[34]。甲状腺激素可促进糖和脂肪氧化, 增加脂肪分解^[35]。

Wnt 信号通路中 Wnt5a 促进生肌性定向分化^[36], Wnt10b 抑制成肌细胞的成脂分化^[37], Wnt5a 促进慢肌纤维增多而 Wnt11 促进快肌纤维增加^[38], myostatin 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调控慢肌纤维发育^[39]。AMPK 在肌肉能量代谢中起重要调控作用, AMPK 活化促进 GLUT4 表达, 促进其转运到细胞膜, 提高酵解型肌纤维的葡萄糖吸收^[40]。当肌肉中葡萄糖过量时, AMPK 可降低磷酸化糖原合成酶(glycogen synthase, GS)活性抑制糖原合成^[41]。此外, AMPK 也参与调控骨骼肌的生长、肥大和再生^[42]。

为进一步分析这些 circRNAs 的调控机制, 基于 ceRNA 机制, 结合前期获得的去势相关 miRNAs, 绘制了 DEC-miRNA 互作网络。该网络共富集 69 个 DEC (占差异 circRNAs 的 18.65%)和 8 个 miRNAs, 平均每个 miRNAs 靶向 29 个 circRNAs。富集到的 miR-1 和 miR-133 都是肌肉特异性 miRNAs, 也是重要的非肌性基因表达的抑制因子。转录因子如成肌

分化抗原(myogenic differentiation, MyoD)、肌细胞生成素(myogenin, MyoG)、血清应答因子(serum response factor, SRF)、肌肉增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2, AMEF2)都是 miR-1 和 miR-133a 的调节因子。miR-1 靶基因有组蛋白脱乙酰基酶 4 (histone deacetylase 4, HDAC4), 转录因子 YY1 (ying-yang 1)和调宁蛋白 3 (calponin 3, CNN3), 其中 HDAC4 是肌肉表达基因的转录抑制因子^[43,44], YY1 在肌肉基因转录中起负调控作用^[45], CNN3 调控肌动蛋白和肌球蛋白的重组和分解^[46]。Hong 等^[47]发现猪 miR-1 的 2 个 SNPs 位点与 I 型和 II 型肌纤维面积和组成相关。miR-133 靶向 SRF 促进成肌细胞增殖^[43], 调控骨骼肌分化过程中的主脑样蛋白 1 (mastermind like transcriptional coactivator 1, MAML1)、胰岛素样生长因子 1 (insulin like growth factor 1, IGF-1)和神经多嘧啶束结合蛋白(polypyrimidine tract binding protein 1, PTBPI)^[48]。此外 miR-133 通过细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)促进成肌细胞分化^[49]。谷氨酰胺酶(alpha glucosidase, GAA)通过 miR-133a-3p 和 miR-1a-3p 激活 AKT/mTOR/S6K 信号通路, 促进成肌细胞分化和骨骼肌生长^[50]。Wnt/ β -catenin 信号通路通过诱导 miR-133b 和 miR-206 抑制 Pax7 表达, 诱导肌源性分化^[51]。由此可见, 这 69 个 DEC 可能通过竞争性吸附 miR-1、miR-133 等参与肌细胞增殖、分化、肌纤维发育等过程, 进而参与肌肉发育和肉质性状的调控。为进一步验证这 69 个 DEC, 对其来源基因进行 KEGG 分析, 主要富集于碳水化合物、脂类和蛋白代谢相关通路, 提示这些 DEC 参与去势后肌肉能量代谢的调控。

为验证高通量测序结果的准确性, 根据 circRNAs 的长度和表达量, 选择 circRNA_2241 和 circRNA_4237 进行验证。结果发现使用 RNase R 处理对 circRNA_2241 和 circRNA_4237 的表达量影响不显著, 但 RNase R 处理后, GAPDH 无扩增产物。同时使用反向引物扩增测序证实 circRNA_2241 和 circRNA_4237 确实以环状存在。RT-qPCR 结果提示 circRNA_2241 和 circRNA_4237 在两组表达变化趋势和测序一致。同时在猪骨骼肌卫星细胞中, 添加睾酮促进 circRNA_2241 表达, 抑制 miR-1 表达。这

与本研究, 非去势组 circRNA_2241 表达量高于去势组相一致。至于 circRNA_2241 是否能竞争性吸附 miR-1 还需要进一步构建载体, 通过双荧光素酶系统进行验证。同时 circRNA_2241 通过吸附 miR-1 间接影响哪个靶基因参与肉质性状的调控, 也需进一步的细胞试验验证。

综上所述, 本研究通过高通量测序筛选了猪去势后背最长肌的 DECs, 构建了 DECs-miRNAs 互作网络, 使用反向引物和 RT-PCR 证实筛选 circRNAs 的真实性, 并通过细胞试验证实睾酮对 circRNA_2241 和 miR-1 的表达调控。这些结果提示 circRNAs 可能通过与 miRNAs 互作, 参与去势后肌肉发育、肌纤维类型和能量代谢的调控, 为解析去势后肌肉发育的分子调控机制提供了新思路。

参考文献(References):

- [1] Trefan L, Doeschl-Wilson A, Rooke JA, Terlouw C, Bünger L. Meta-analysis of effects of gender in combination with carcass weight and breed on pork quality. *J Anim Sci*, 2013, 91(3): 1480–1492. [DOI]
- [2] Li Y, Wang MM, Li QF, Gao YX, Li Q, Li JG, Cao YF. Transcriptome profiling of longissimus lumborum in Holstein bulls and steers with different beef qualities. *PLoS One*, 2020, 15(6): e0235218. [DOI]
- [3] Zhou ZK, Gao X, Li JY, Chen JB, Xu SZ. Effect of castration on carcass quality and differential gene expression of longissimus muscle between steer and bull. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(8):5307–5312. [DOI]
- [4] Zhang YY, Wang HB, Wang YN, Wang HC, Zhang S, Hong JY, Guo HF, Chen D, Yang Y, Zan LS. Transcriptome analysis of mRNA and microRNAs in intramuscular fat tissues of castrated and intact male Chinese Qinchuan cattle. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0185961. [DOI]
- [5] Wang J, Hua LS, Chen JF, Zhang JQ, Ren QL, Bai HJ, Guo HX, Xu ZX, Xing BS, Bai XX, Cao H. Effect of castration on gene expression in Longissimus dorsi muscle of Huainan male pig by transcriptome analysis. *Acta Vet Et Zootech Sin*, 2019, 50(9): 1746–1758. 王璟, 滑留帅, 陈俊峰, 张家庆, 任巧玲, 白红杰, 郭红霞, 徐照学, 邢宝松, 白献晓, 曹海. 去势对淮南公猪背最长肌转录组的影响. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(9): 1746–1758. [DOI]
- [6] Bai Y, Huang JM, Liu G, Zhang JB, Wang JY, Liu CK, Fang MY. A comprehensive microRNA expression profile of the backfat tissue from castrated and intact full-sib pair male pigs. *BMC Genomics*, 2014, 15: 47. [DOI]
- [7] Cai ZW, Zhang LF, Chen ML, Jiang XL, Xu NY. Castration-induced changes in microRNA expression profiles in subcutaneous adipose tissue of male pigs. *J Appl Genet*, 2014, 55(2): 259–266. [DOI]
- [8] Cai ZW, Zhang LF, Jiang XL, Sheng YF, Xu NY. Differential miRNA expression profiles in the longissimus dorsi muscle between intact and castrated male pigs. *Res Veter Sci*, 2015, 99: 99–104. [DOI]
- [9] Wang J, Hua LS, Chen JF, Zhang JQ, Bai XX, Gao BW, Li CJ, Shi ZH, Sheng WD, Gao Y, Xing BS. Identification and characterization of long non-coding RNAs in subcutaneous adipose tissue from castrated and intact full-sib pair Huainan male pigs. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 542. [DOI]
- [10] 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]
- [11] Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, Laneve P, Rajewsky N, Bozzoni I. Circ-ZNF609 is a circular rna that can be translated and functions in myogenesis. *Mol Cell*, 2017, 66(1): 22–37.e29. [DOI]
- [12] Wang K, Gan TY, Li N, Liu CY, Zhou LY, Gao JN, Chen C, Yan KW, Ponnusamy M, Zhang YH, Li PF. Circular RNA mediates cardiomyocyte death via miRNA-dependent upregulation of MTP18 expression. *Cell Death Differ*, 2017, 24(6): 1111–1120. [DOI]
- [13] Ouyang HJ, Chen XL, Li WM, Li ZH, Nie QH, Zhang XQ. Circular RNA circSVIL promotes myoblast proliferation and differentiation by sponging miR-203 in chicken. *Fron Genet*, 2018, 9: 172. [DOI]
- [14] Li H, Wei XF, Yang JM, Dong D, Hao D, Huang YZ, Lan XY, Plath M, Lei CZ, Ma Y, Lin FP, Bai YY, Chen H. circFGFR4 promotes differentiation of myoblasts via binding miR-107 to relieve its inhibition of Wnt3a. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 11: 272–283. [DOI]
- [15] Li H, Yang JM, Wei XF, Song CC, Dong D, Huang YZ, Lan XY, Plath M, Lei CZ, Ma Y, Qi XL, Bai YY, Chen H. CircFUT10 reduces proliferation and facilitates differentiation of myoblasts by sponging miR-133a. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4643–4651. [DOI]

- [16] Yue BL, Wang J, Ru WX, Wu JY, Cao XK, Yang HY, Huang YZ, Lan XY, Lei CZ, Huang BZ, Chen H. The circular RNA circHUWE1 sponges the miR-29b-AKT3 axis to regulate myoblast development. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19:1086–1097. [DOI]
- [17] Shen XM, Zhang XY, Ru WX, Huang YZ, Lan XY, Lei CZ, Chen H. circINSR promotes proliferation and reduces apoptosis of embryonic myoblasts by sponging miR-34a. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19: 986–999. [DOI]
- [18] Liu YJ, Liu HT, Li Y, Mao R, Yang HW, Zhang YC, Zhang Y, Guo PS, Zhan DF, Zhang TT. circular RNA SAMD4A controls adipogenesis in obesity through the miR-138-5p/EZH2 axis. *Theranostics*, 2020, 10(10): 4705–4719. [DOI]
- [19] Yang LY, Bin Z, Hui S, Rong L, You BS, Wu PP, Han XY, Qian H, Xu WR. The role of CDR1as in proliferation and differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Int*, 2019, 2019: 2316834. [DOI]
- [20] Jiang R, Li H, Yang JM, Shen XM, Song CC, Yang ZX, Wang XG, Huang YZ, Lan XY, Lei CZ, Chen H. circRNA profiling reveals an abundant circFUT10 that promotes adipocyte proliferation and inhibits adipocyte differentiation via sponging let-7. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 20: 491–501. [DOI]
- [21] Zhou L, Chen JH, Li ZZ, Li XX, Hu XD, Huang Y, Zhao XK, Liang CZ, Wang Y, Sun L, Shi M, Xu XH, Shen F, Chen MS, Han ZJ, Peng ZY, Zhai QN, Chen J, Zhang ZF, Yang RL, Ye JX, Guan ZC, Yang HM, Gui YT, Wang J, Cai ZM, Zhang XQ. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15224. [DOI]
- [22] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550. [DOI]
- [23] Cai ZW, Zhang LF, Chen ML, Jiang XL, Xu NY. Castration-induced changes in microRNA expression profiles in subcutaneous adipose tissue of male pigs. *J Appl Genet*, 2014, 55(2): 259–266. [DOI]
- [24] Li JX, Su T, Zou C, Luo WZ, Shi GL, Chen L, Fang CC, Li CC. Long non-coding RNA *H19* regulates porcine satellite cell differentiation through *miR-140-5p/SOX4* and *DBN1*. *Fron Cell Dev Biol*, 2020, 8: 518724. [DOI]
- [25] Sun WX, Sun XC, Chu WW, Yu SG, Dong FL, Xu GF. circRNA expression profiles in human visceral preadipocytes and adipocytes. *Mol Med Rep*, 2020, 21(2): 815–821. [DOI]
- [26] Xu TY, Wu J, Han P, Zhao ZM, Song XF. circular RNA expression profiles and features in human tissues: a study using RNA-seq data. *BMC Genomics*, 2017, 18(Suppl 6): 680. [DOI]
- [27] Mohammadabadi M, Bordbar F, Jensen J, Du M, Guo W. Key genes regulating skeletal muscle development and growth in farm animals. *Animals (Basel)*, 2021, 11(3): 835. [DOI]
- [28] Chen K, Cheng HH, Zhou RJ. Molecular mechanisms and functions of autophagy and the ubiquitin-proteasome pathway. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(1): 5–18. 陈科, 程汉华, 周荣家. 自噬与泛素化蛋白降解途径的分子机制及其功能. *遗传*, 2012, 34(1): 5–18. [DOI]
- [29] Gregorio CC, Perry CN, McElhinny AS. Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 2005, 26(6–8): 389–400. [DOI]
- [30] Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(52): 18135–18140. [DOI]
- [31] Shen LY, Zhang SH, Wu ZH, Zheng MY, Li XW, Zhu L. The influence of satellite cells on meat quality and its differential regulation. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(9): 1081–1086. 沈林园, 张顺华, 吴泽辉, 郑梦月, 李学伟, 朱砾. 骨骼肌卫星细胞对肉品质的影响及其分化调控. *遗传*, 2013, 35(9): 1081–1086. [DOI]
- [32] Phillips SM, Glover EI, Rennie MJ. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2009, 107(3): 645–654. [DOI]
- [33] Salanova M, Schiffl G, Püttmann B, Schoser BG, Blottnner D. Molecular biomarkers monitoring human skeletal muscle fibres and microvasculature following long-term bed rest with and without countermeasures. *J Anat*, 2008, 212(3): 306–318. [DOI]
- [34] Millward DJ. Interactions between growth of muscle and stature: mechanisms involved and their nutritional sensitivity to dietary protein: the protein-stat revisited. *Nutrients*, 2021, 13(3): 729. [DOI]
- [35] Volke L, Krause K. Effect of thyroid hormones on adipose tissue flexibility. *Eur Thyroid J*, 2021, 10(1): 1–9. [DOI]
- [36] Reggio A, Rosina M, Palma A, Cerquone Perpetuini A, Petrilli LL, Gargioli C, Fuoco C, Micarelli E, Giuliani G, Cerretani M, Bresciani A, Sacco F, Castagnoli L, Cesareni G. Adipogenesis of skeletal muscle fibro/adipogenic

- progenitors is affected by the WNT5a/GSK3/β-catenin axis. *Cell Death Differ*, 2020, 27(10): 2921–2941. [DOI]
- [37] Park YK, Park B, Lee S, Choi K, Moon Y, Park H. Hypoxia-inducible factor-2α-dependent hypoxic induction of Wnt10b expression in adipogenic cells. *J Biol Chem*, 2013, 288(36): 26311–26322. [DOI]
- [38] Anakwe K, Robson L, Hadley J, Buxton P, Church V, Allen S, Hartmann C, Harfe B, Nohno T, Brown AMC, Evans DJR, Francis-West P. Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development*, 2003, 130(15): 3503–3514. [DOI]
- [39] Jiang YL, Lian ZX, Li N, Wu CX. Myostatin: a negative regulator of skeletal muscle mass. *Hereditas (Beijing)*, 2000, 22(2): 119–121.
姜运良, 连正兴, 李宁, 吴常信. 肌肉生长抑制素基因的研究进展. *遗传*, 2000, 22(2): 119–121. [DOI]
- [40] Kido K, Egawa T, Fujiyoshi H, Suzuki H, Kawanaka K, Hayashi T. AMPK is indispensable for overload-induced muscle glucose uptake and glycogenesis but dispensable for inducing hypertrophy in mice. *FASEB J*, 2021, 35(4): e21459. [DOI]
- [41] Liu XH, Bauman WA, Cardozo CP. Myostatin inhibits glucose uptake via suppression of insulin-dependent and -independent signaling pathways in myoblasts. *Physiol Rep*, 2018, 6(17): e13837. [DOI]
- [42] Thomson DM. The role of AMPK in the regulation of skeletal muscle size, hypertrophy, and regeneration. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3125. [DOI]
- [43] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu QL, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*, 2006, 38(2): 228–233. [DOI]
- [44] Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreusser MM, Sun Q, Chen L, Heft C, Katus HA, Olson EN. Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. *J Cell Biol*, 2011, 195(3): 403–415. [DOI]
- [45] Lu LN, Zhou L, Chen EZ, Sun K, Jiang PY, Wang LJ, Su XX, Sun H, Wang HT. A novel YY1-miR-1 regulatory circuit in skeletal myogenesis revealed by genome-wide prediction of YY1-miRNA network. *PLoS One*, 2012, 7(2): e27596. [DOI]
- [46] Tang ZL, Liang RY, Zhao SP, Wang RQ, Huang RH, Li K. CNN3 is regulated by microRNA-1 during muscle development in pigs. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(4): 377–385. [DOI]
- [47] Hong JS, Noh SH, Lee JS, Kim JM, Hong KC, Lee YS. Effects of polymorphisms in the porcine microRNA miR-1 locus on muscle fiber type composition and miR-1 expression. *Gene*, 2012, 506(1): 211–216. [DOI]
- [48] Iqbal A, Ping J, Ali S, Zhen G, Juan L, Kang JZ, Ziyi P, Huixian L, Zhihui Z. Role of microRNAs in myogenesis and their effects on meat quality in pig - A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2020, 33(12): 1873–1884. [DOI]
- [49] Feng Y, Niu LL, Wei W, Zhang WY, Li XY, Cao JH, Zhao SH. A feedback circuit between miR-133 and the ERK1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation. *Cell Death Dis*, 2013, 4(11): e934. [DOI]
- [50] Wang YJ, Ma JD, Qiu WL, Zhang JW, Feng SY, Zhou XK, Wang X, Jin L, Long K, Liu LY, Xiao WH, Tang QZ, Zhu L, Jiang YZ, Li XW, Li MZ. Guanidinoacetic acid regulates myogenic differentiation and muscle growth through miR-133a-3p and miR-1a-3p co-mediated Akt/mTOR/S6K signaling pathway. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2837. [DOI]
- [51] Cui S, Li L, Mubarakah SN, Meech R. Wnt/β-catenin signaling induces the myomiRs miR-133b and miR-206 to suppress Pax7 and induce the myogenic differentiation program. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 12740–12751. [DOI]

(责任编辑: 李明洲)