

非编码 RNA 调节羊绒细度候选基因的研究进展

郑圆媛¹, 惠太宇¹, 郭丹², 郭素玲³, 王意如¹, 刘宇浩¹, 王梓橙¹, 王英轩¹,
黄丽飞¹, 白文林¹, 王泽英^{1*}

(1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110866; 2. 辽宁省畜牧科学研究院, 辽阳 111000;

3. 内蒙古乌兰察布市化德县长顺镇繁荣社区, 化德 013350)

摘要: 羊绒细度是评价羊绒品质和衡量羊绒价格的关键数量性状, 近年来, 随着羊绒细度功能标记基因的深入研究, 通过高通量数据解析及全基因组关联分析, 逐步筛选出羊绒细度性状的候选基因, 但是羊绒细度关键调控基因、表达量及分子调节机制尚未明了。基因表达受多种调节因子调控, 其中非编码 RNA 的调节作用比较活跃, 主要包括 microRNA、lncRNA 和 circRNA 等。经高通量测序和生物信息分析发现, 非编码 RNA 在绒山羊品种间和品种内的不同羊绒细度个体皮肤、次级毛囊及次级毛囊周期性生长发育中差异表达并调节羊绒细度相关靶基因, 但多种非编码 RNA 共同调节同一靶基因的信号通路甚少。目前通过对羊绒细度差异基因进行 SNP 标记辅助选择、转录组筛选、高通量解析非编码 RNA 调节及全基因组关联分析等相关研究发现, 两条通路聚焦相同的羊绒细度靶基因较多, 两条通路以上共同聚焦到某个或某几个羊绒细度的关键靶基因较少。作者主要讨论了羊绒细度候选基因及转录水平上 microRNA、lncRNA 和 circRNA 对羊绒细度相关靶基因分子调控机制的研究进展。

关键词: 羊绒细度; 靶基因; microRNA; lncRNA; circRNA

中图分类号: S813.2

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2018)11-3176-09

Research Progress on Cashmere Fineness Candidate Genes Regulating by Non-coding RNA

ZHENG Yuanyuan¹, HUI Taiyu¹, GUO Dan², GUO Suling³, WANG Yiru¹, LIU Yuhao¹,
WANG Zicheng¹, WANG Yingxuan¹, HUANG Lifei¹, BAI Wenlin¹, WANG Zeying^{1*}

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Animal Science Research Institute of Liaoning Province, Liaoyang 111000, China; 3. Prosperous Community, Changshun Town, Huade County, Ulangab City, Inner Mongolia, Huade 013350, China)

Abstract: Cashmere fineness is the key quantitative trait to evaluate cashmere quality and cashmere price. In recent years, with the intensive study of cashmere fineness functional marker genes and through the genome-wide association analysis, the candidate genes of fineness traits of cashmere were gradually screened out. But the key regulated genes, their expression levels and molecular regulation mechanisms of cashmere fineness have not been resolved. Gene expression is regulated by a variety of regulatory factors. The regulation of non-coding RNA is more active, it mainly includes microRNA, lncRNA and circRNA. High throughput sequencing and biological information analysis discovered that non-coding RNA is differential expressed and regulated of related target genes of skin, secondary hair follicle and the development of secondary hair follicle in peri-

收稿日期: 2018-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31802038, 31872325, 31672388); 辽宁省自然科学基金项目(2015020758); 辽宁省教育厅重点项目(LSNZD201606); 辽宁绒山羊“绒肉兼用”新品系选育项目(2017202005); 沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(RC170447)

作者简介: 郑圆媛(1992-), 女, 辽宁辽阳人, 硕士生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖, E-mail: zhengyuanyuan07@163.com

* 通信作者: 王泽英(1983-), 男, 内蒙古和林格尔人, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 动物分子遗传育种, E-mail: wangzeying-2008@163.com

odic growth in different cashmere fineness of individual in cashmere goat breeds and varieties. At present, the related researches of using SNP marker, transcriptional screening, high throughput analytical non-coding RNA and genome-wide association analysis to selected differential genes of cashmere fineness have found that the same cashmere fineness target genes focus on two pathways were more, but it was very rare to cover two or more passages. In this paper, the authors mainly discussed the research progress on molecular regulation mechanism of cashmere fineness candidate genes, and microRNA, lncRNA and circRNA on cashmere fineness related target genes at transcriptional level.

Key words: cashmere fineness; target gene; microRNA; lncRNA; circRNA

羊绒细度差异变化原因多而复杂,如遗传因素、营养水平、饲养环境、生理疾病及品种、年龄、性别、部位等都会导致羊绒细度发生一定差异^[1]。国际羊绒市场对羊绒的定价首先看绒的色泽,以白绒为贵,且在同色系羊绒中又以细为贵,而羊绒长度又是影响绒产量的主要因素。目前,很多国家制定羊绒品质标准的主要衡量指标就是羊绒细度。国际市场对高级羊绒的细度要求在13~16 μm;细度<15 μm为一级绒;细度<14 μm为羊绒珍品;细度<12 μm为纺织极品。中国划分山羊绒的标准是:细度<14.5 μm为超细型;14.5~15.5 μm为特细型;15.5~16.0 μm为细型;16.0~18.5 μm为粗型(GB18267—2013)。根据田文亮^[2]对山羊绒公证检验近十年的数据显示,各个地区及品种的山羊绒羊绒细度逐年变粗,十年间变粗了约1 μm,目前的山羊绒细度已接近特细绵羊毛的细度(表1),导致山羊绒制品的质量明显降低。

基因既是机体遗传物质的基础,也是数量性状表达的本质,机体内基因是否表达及表达水平高低

决定了生产性状的优劣,在自然选择和人工选择下导致性状变异,其本质是基因或基因组学的变化。在基因变异过程中,有许多调节因子参与并发挥作用,作者重点从遗传原因阐述转录水平非编码 RNA 对羊绒细度的分子调控机制。非编码 RNA 是指不编码蛋白质的 RNA,包括 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA、microRNA、lncRNA 和 circRNA 等多种已知功能的 RNA,还有未知功能的 RNA。这些 RNA 的共同特点是从基因组上转录而来,但是不翻译成蛋白,在 RNA 水平上就能行使各自的生物学功能。非编码 RNA 根据长度可划分为 3 类:<50 nt,包括 microRNA、siRNA 和 piRNA 等;50~500 nt,包括 rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA、SLRNA 和 SRPRNA 等;>500 nt,包括 lncRNA、长的 mRNA-like 的非编码 RNA、长的不带 PolyA 尾巴的非编码 RNA 等。目前,该领域研究热点主要集中在 microRNA、lncRNA 和 circRNA 等起调控作用的非编码 RNA 的功能及其对靶基因的调节作用上。

表 1 绒山羊羊绒细度指标参数^[2]

Table 1 Cashmere fineness index parameters^[2]

山羊绒种类 Cashmere variety	羊绒细度 Cashmere fineness	最粗值 Coarsest	最细值 Finest	μm
内蒙古白绒山羊(阿拉善型)山羊绒 Cashmere of Inner Mongolia White cashmere goat (Alxa type)	14.60	18.70	10.30	
内蒙古白绒山羊(二狼山型)山羊绒 Cashmere of Inner Mongolia White cashmere goat (Erlang Mountain type)	14.42	17.80	10.40	
内蒙古白绒山羊(阿尔巴斯型)山羊绒 Cashmere of Inner Mongolia White cashmere goat (Arbace type)	16.04	21.20	10.80	
乌珠穆沁绒山羊山羊绒 Cashmere of Wuzhumuqin cashmere goat	16.20	19.60	11.40	
罕山绒山羊山羊绒 Cashmere of Hanshan cashmere goat	16.71	20.50	12.70	
新疆绒山羊山羊绒 Cashmere of Xinjiang cashmere goat	16.10	22.70	10.20	
辽宁绒山羊山羊绒 Cashmere of Liaoning cashmere goat	15.21	20.40	9.00	
青海绒山羊山羊绒 Cashmere of Qinghai cashmere goat	14.94	20.20	10.80	

1 羊绒细度候选基因

山羊绒细度性状是一个综合的数量性状,由微效多基因调控。近十年,在分子育种研究中,诸多试验证明了 *KAP*、*RPL*、*FGF*、*KPT*、*PROP*、*PRLP*、*MAF70* 和 *KIFI* 等基因的 SNP 与羊绒细度存在相关性^[3-10]。2012 年,山羊基因组测序完成,为提高绒品质和中国特有资源绒山羊的选育提供了参考基因资源,促进了绒山羊分子遗传育种的发展。田月珍^[11]研究发现了与羊毛细度相关的上调基因有 *KRT*、*TXNP*、*TFDP* 和 *FAIM*,下调基因有 *PIK3CA*、*ADAM9* 和 *FZD3*,这些都可以作为羊绒细度的参考标记基因。2014 年,于永生等^[12]通过转录组测序分析了辽宁绒山羊羊绒细度差显个体间差异基因的表达,发现上调基因有 33 个,分别是 *ADIG*、*CCL24*、*CES4A*、*COCH*、*CREG1*、*DPH3*、*DPT*、*ELOVL4*、*FA2H*、*FAR2*、*FGFBP1*、*S100A7*、*SOAT1*、*THBS2*、*NPPC*、*PDE8B*、*PLIN2*、*FKBP5*、*FOS*、*KRT79*、*LGALS7B*、*TWIST2*、*ZBTB16* 等基因,下调基因有 29 个,分别是 *C3*、*CASP14*、*CYP2A6*、*GLYATL2*、*HSPB7*、*K38*、*MT2A*、*MT3*、*RPL36*、*TUSC2* 及 19 个新基因。2015 年,张丽丽^[13]研究发现,*MP1* 基因具有降低绒毛细度的潜力。2017 年,Qiao 等^[14]对内蒙古绒山羊羊绒细度性状进行全基因组关联分析发现,*AKT1*、*ALX4*、*HK1*、*NT-3*、*POLD2*、*PSMA2*、*MAPK8*、*RYR3*、*VPS39* 和 *STARD9* 基因与羊绒细度密切相关,而 *KRT2*、*CD4* 和 *TNFR1/Troy* 基因与毛发或皮肤生长发育相关,也可作为羊绒细度性状的候选基因,具有进一步深入研究的价值。

随着人们对羊绒细度功能基因关注度的增加,发现的与羊绒细度相关的基因也越来越多,但不同研究方法检测到的羊绒细度相关基因都不相同,并没有汇聚到某个或某几个关键的基因,这就更加需要从不同角度来验证这些基因对羊绒细度的调控作用。

2 miRNA 对羊绒细度相关靶基因的调控

miRNA 是一类长度约为 22 nt 的小分子非编码 RNA,广泛存在于哺乳动物中,部分 miRNA 的表达具有时空和组织特异性。哺乳动物中 miRNA 主要通过与靶基因 3'UTR 区结合来抑制其翻译,调控机体生物学功能,它主要通过下调其靶基因的表达来参与细胞增殖、细胞分化、脂肪代谢、激素分

泌等许多生物学活动。研究发现,miRNA 能够影响皮肤毛囊细胞的分化和增殖,其相关靶基因在调控毛囊周期性生长的过程中充当重要角色。但有关 miRNA 对羊绒细度相关基因转录水平的调控研究起步较晚。2007 年,Zhang 等^[15]开启了山羊皮肤中 miRNA 表达的研究,证明 miR-720 和 miR-199b 在山羊皮肤中特异表达。2014 年,樊凯军等^[16]应用 Exiqon miRNA 8.1 表达谱芯片分析了 70 d 绒山羊胎儿和出生 2 周羊羔体侧部皮肤中 miRNA 的表达,发现 68 个表达差异的 miRNA。2012 年,Liu 等^[17]在绒山羊皮肤检测到 316 个 miRNA,获得与 NCBI 和山羊 miRBase 数据库中相同的 5 个 miRNA,新发现了 22 个绒山羊皮肤特异表达的 miRNA。2012 年,Dong 等^[18]研究发现,与羊绒毛囊和绒囊生长发育密切相关的 miRNA 和基因分别是 miRNA-131984、miRNA-153813、miRNA-216169、miRNA-236893、miRNA-299491、miRNA-330682 及 *VIL*、*INHA*、*INHBB*、*PRNP*、*LEP*、*SLC26A2*、*FHIT*、*SOD1*、*HSD3B1*、*INHBA*、*RASA1*、*IGF2R*、*CYP19*、*RB1*、*IL2RA*、*TG*、*FSHB*、*PIGR*、*FGG*、*GH1*、*MAP1B*、*LTF*、*ELN*、*TNFRSF6*、*CGN1*、*IGF2*、*PGK1* 和 *ZFY* 基因。2013 年,作者所在研究团队对辽宁绒山羊(LCG)皮肤 miRNA 进行了高通量测序,共发现 237 个与内蒙古绒山羊(MCG)差异共表达的 miRNA 及其靶基因,极大地丰富了关于 miRNA 调控羊绒细度靶基因的素材(表 2,其中内蒙古绒山羊 miRNAs 的表达量数据引自文献^[6],辽宁绒山羊 miRNAs 的表达量数据来自本研究团队)。2014 年,袁超^[19]证明,miR-125b 抑制次级毛囊在生长过程中 *FGF5* 基因的表达。付绍印^[20]试验获得次级毛囊生长发育的 miRNA 及靶基因,分别是 miR-203 及靶基因 *D0ST*; *let-7a* 及靶基因 *LYPLA1* 和 *ND4*; miR-183 及靶基因 *GLG1*; miR-199a 及靶基因 *KRTAP5*、*KRTAP6*、*RPL30*、*MYH9* 和 *MYL6*。2016 年,刘洋^[21]试验证明,ora-*let-7* 和 oar-miR-200 调控靶基因 *GLDC*、*GPM6A* 和 *LRP* 在胎儿皮肤毛囊中发挥作用。虽然大多数 miRNA 的作用都集中在绒山羊皮肤毛囊发育上,但不排除其对羊绒细度具有调控作用。

作者对比分析了辽宁绒山羊和内蒙古绒山羊皮肤组织差显高表达 miRNA 及其靶基因,发现在 miRNA 的 KEGG 通路中活跃的基因是 *FGF*、*FOS*、*PIK3CA* 和 *FZD3*。对这 4 个靶基因调控的 miRNA 出现频次较高且在 LCG 和 MCG 中差显高

表达的是 miR-10a 和 miR-194。对比获得的关于 miRNA 及其靶基因调控羊绒细度的生物信息非常鲜明,亟待试验确证。目前更多的信息来源于高通

量数据分析,需要在绒山羊次级毛囊细胞中研究 miRNA 对羊绒细度靶基因的表达调控作用。

表 2 辽宁绒山羊和内蒙古绒山羊皮肤中 miRNA 差异表达及靶基因

Table 2 Differential expression miRNA and target genes in skin of LCG and MCG

miRNAs	辽宁绒山羊	内蒙古绒山羊	靶基因 Target genes
	LCG	MCG	
let-7b	73 407	1 193 996	BHMT, OR52L1, ATF6B, DNAJA2, RDH16, RPL6, XPOT, VTI1B
let-7g	121 663	38 013	GPC4
miR-103	23 441	44 327	RPA3, HPRT1, RPL23, RPL28, RPL1, RPS3, RPS8, EIF4A2, ATP6V1F
miR-10a	61 567	13 225	PPAT, RPS2, RPL18A
miR-10b	198 902	57 917	PPAT, SETMAR, MAGOH, RPS2, RPL18A
miR-143	437 242	1 344 689	ATP5G2, FDPS, KPNA2, AADAT, CYP4F2, NCBP2, GALNT7, PRPS1, TUBA1C, RPL23, WDR61
miR-146b	157 985	62 327	FDPS, OR4K5
miR-148a	241 396	125 764	HMMR, TUBA1C, RPL11
miR-181a	26 451	14 076	COX7A2, NLGN1, AHCYL2, GCSH, PRDX1, ANGPT1, SPCS2, MOCS2, SS18
miR-182	21 916	38 075	GRIA1, PSMB6, TUBB, BMI1, SKP2
miR-183	10 450	11 520	SERPINA5, PSMA2
miR-200c	14 063	76 101	VIM, HPRT1
miR-23a	31 075	10 730	NLGN1, OR52B4, PRPS1, YWHAQ, BRK1, HNRNPC, SS18
miR-23b-3p	25 001	12 525	NLGN1, OR52B4, PRPS1, YWHAQ, BRK1, SS18
miR-24-3p	37 928	76 282	ATP5G2, NDUFS8, CAPN1, DGKZ, ST8SIA5, GTSE1, RBX1, RPLP2, RPL36
miR-26a	540 976	42 483	RPS6KB1, NUDT9, CAMK2D
miR-27a-3p	21 735	14 101	GUSB, AP3B1, RPA3, ATOX1, STRADA, BECN1, VTI1B, EYA1
miR-30a-5p	102 751	68 298	RPL23, EIF4A2
miR-30e-5p	37 727	28 485	EIF4A2
miR-378	13 005	155 553	EPHA3, RPS6, CDK2, SLC15A1, BMI1
miR-199a-3p	112 700	12 895	WDR61, EIF4A2, BCAS2

3 lncRNA 对羊绒细度相关靶基因的调控

lncRNA 在许多生物过程中发挥独特的作用,多数来自于基因间隔区和内含子。lncRNA 是一类本身不编码蛋白、转录本长度 >200 nt 的 RNA,具有组织特异性,表达水平低于编码蛋白基因。虽然 lncRNA 不编码蛋白质,但却参与了 DNA 甲基化、X 染色体沉默、基因组印迹、染色质修饰、转录调控、转录激活、转录干扰、核仁显性、核内运输等主要调控过程^[22-24]。最近研究发现, lncRNA 参与了生命

发育周期几乎所有阶段相关基因的调控,并且对 mRNA 转录及转录后存在调控作用,主要包括可变剪切、RNA 编辑、蛋白翻译及转运等过程,并且能够与 DNA 和蛋白质互作,它们是调节细胞增殖、分化和保持生物体内部各项功能稳定进行的重要参与者^[25]。lncRNA 不仅影响编码基因的转录和翻译,也调控其他非编码 RNA 的表达,同时还可以与 miRNA 竞争性结合 mRNA,并发挥相应的作用^[26]。2015 年,郭杨等^[27]通过 RNA-Seq 方法从生长期和休止期羊绒中鉴定出 6 127 个 lncRNAs,只有

54个lncRNAs差异表达,其中上调的为32个,下调的为22个。数据分析表明,这些差异表达的lncRNAs与毛囊发育相关的基因有*Hox*、*KAPs*、*Wnt2*、*FGF5*及*BMPs*等,可能参与调控羊绒的周期性生长过程。用RNAplex预测靶基因,大多数表达量不同的lncRNA的靶基因与角蛋白相关,共筛选了10个和皮肤或毛囊生长发育相关且表达差异显著的lncRNAs,其中lncRNA15025和lncRNA15479与羊绒生长期毛囊生长发育相关,其余的8个lncRNAs与羊绒休止期毛囊发育相关。2017年,Wang等^[28]研究发现,在绒山羊次级毛囊中LNC-000181和chi-miR-34a、chi-miR-199a-5p、chi-miR-34c-5p共同作用于GATA3基因,LNC-000344、LNC-000421、LNC-000395、LNC-000367和miR-21-3p、miR-214-3p共同作用于SMA03基因。2018年,

Bai等^[29]研究发现6个lncRNAs和20个miRNAs共同作用于72个靶基因,在次级毛囊中发挥重要作用。同年,Zhou等^[30]研究发现84个lncRNAs和miRNAs共同作用的靶基因参与次级毛囊的生长发育。

目前,关于绒山羊皮肤毛囊lncRNA的研究大多集中在毛囊生长发育上,关于羊绒细度调控的相关lncRNAs及靶基因的研究较少。2014年,作者所在研究团队对辽宁绒山羊和内蒙古绒山羊皮肤lncRNA进行了高通量测序,共发现93个差异表达lncRNAs及其靶基因,其中关于羊绒细度的10个lncRNAs及其靶基因在辽宁绒山羊和内蒙古绒山羊皮肤中差异表达显著(表3),但尚需进一步试验验证,期望能通过试验获得可能调节羊绒细度功能基因的lncRNA。

表3 辽宁绒山羊和内蒙古绒山羊皮肤中lncRNA差异表达及靶基因

Table 3 Differential expression lncRNA and target genes in skin of LCG and MCG

lncRNAs	辽宁绒山羊		靶基因 Target genes
	LCG	MCG	
XLOC_010430	188.553	73.0454	TRNAU1AP、RCC1、TAF12、RAB42、PHACTR4
XLOC_001980	19.1252	3.50528	PYGL、ABHD12B、TRIM9
XLOC_016109	17.2188	70.6548	LOC102184770、KPRP、SMCP、IVL
XLOC_016115	6.23184	55.5671	LOC102186542、CRNN、LOC102176090
XLOC_014015	4.62281	1.91617	SORBS1、PDLIM1
XLOC_001070	4.32437	1.78312	ZNF148
XLOC_010456	1.61732	8.71312	CRYBG2、LOC102171110
XLOC_011319	1.15849	2.77598	PSMA6、NFKBIA、KIAA0391
XLOC_015057	0.302532	1.37111	CTSC
XLOC_001617	0.263952	1.61725	CCNL1、LEKR1

4 circRNA对羊绒细度相关靶基因的调控

circRNA是一类具有稳定闭环结构的内源性非编码RNA。由于其特殊的环状结构,没有3'端PolyA尾和5'端帽子结构,不容易被核酸外切酶RNaseR降解,相比其他非编码RNA更稳定。circRNA通常是由外显子形成的,一般含有1~5个外显子,有的还包含1~2个内含子,同时也可以含有基因间区或非编码区成分^[31-34]。circRNA是基因可变剪接的产物,根据其包含内含子和外显子的来源,一般将真核生物的circRNA分为只含有内含子的ciRNA、只含有外显子的ecRNA及既有外显子

又有内含子的EIciRNA,以上3种是由前体mRNA经过反向剪接形成的;此外,还有由前体tRNA经过剪接产生的tRNA内含子tricRNA^[35-39]。大多数circRNA存在于细胞质中,少数定位于细胞核内,具有序列保守、分布广泛、性能稳定和表达时空特异性等特征^[40]。大部分circRNA可以在转录或转录后水平发挥调控作用,少数只能在转录水平发挥作用^[41]。circRNA能充当miRNA分子海绵,和miRNA相互共同作用^[42],还参与竞争性调控RNA剪接,与snRNA或RNA合成酶Ⅱ相互作用等^[43-44],从而影响基因表达调控。2017年,Tao等^[45]从山羊卵巢中鉴定出总计13 950个circRNAs,广泛

分布于所有染色体上,其中 37 个 circRNAs 差异表达,24 个 circRNAs 上调和 13 个 circRNAs 下调。在这些 circRNAs 中,麻城山羊的 chi_circ_0007167 和 chi_circ_0005189 的表达水平分别上调了 8.07 和 6.10 倍。另外,chi_circ_0003472 和 chi_circ_0003645 分别下调了 5.76 和 5.09 倍。chi_circ_0008219 与 69 个 miRNAs 形成巨大的 circRNA-miRNA 共调控靶基因表达网络。2017 年,Li

等^[46-47]在绵羊肌肉中发现 6 113 个 circRNAs 调节 286 956 个 miRNAs 对肌肉生长发育相关靶基因发挥作用,同时在绵羊脑垂体发现 circ_0000059 调控 9 个 miRNAs 的 58 个潜在结合位点对靶基因起调节作用。关于绒山羊 circRNA 方面的研究报道较少,2018 年,作者所在团队通过对辽宁绒山羊和内蒙古绒山羊羊绒细度相关 circRNA 的研究,发现了 32 个差异表达 circRNAs 及靶基因(表 4)。

表 4 辽宁绒山羊和内蒙古绒山羊皮肤中 circRNA 差异表达及亲本基因

Table 4 Differential expression circRNA and host genes in skin of LCG and MCG

circRNAs	辽宁绒山羊 内蒙古绒山羊		miRNA	亲本基因 Host genes
	LCG	MCG		
circRNA128	36.95	7.14	chi-miR-331-5p、chi-miR-877-3p	TCHH
circRNA4154	5.05	2.04	chi-miR-145-3p、chi-miR-30b-3p、chi-miR-30f-3p、chi-miR-346-5p chi-miR-34a、chi-miR-34b-5p、chi-miR-34c-5p	HOMER3
circRNA3620	2.86	1.02	chi-miR-125a-5p、chi-miR-125b-5p、chi-miR-15a-3p、chi-miR-188-5p chi-miR-2331、chi-miR-485-5p、chi-miR-708-5p	CAMSAP1
circRNA6854	0.79	3.17	chi-miR-106a-5p、chi-miR-106b-5p、chi-miR-17-5p、chi-miR-20a-5p chi-miR-20b、chi-miR-338-3p、chi-miR-378-5p、chi-miR-93-5p	KCTD9
circRNA2245	0.51	2.90	chi-miR-140-3p、chi-miR-155-5p、chi-miR-2284e、chi-miR-26a-3p chi-miR-532-3p	HEBP1

目前,关于绒山羊 circRNA 的文献报道较少,作者发现一些对羊绒细度比较有意义的 circRNA 信息,其与 miRNA 相互作用共同调节的靶基因 TCHH 在其他转录调控网络中出现的频次也较高。接下来的研究重点可针对 TCHH 基因,在绒山羊次级毛囊细胞中研究 circRNA 和 miRNA 对羊绒细度靶基因的表达共调控作用。

通过分析、对比前人对 SNP 标记辅助选择羊绒细度差异基因、转录组筛选羊绒细度差异基因、高通

量解析非编码 RNA 调节羊绒细度差异基因及全基因组关联分析羊绒细度差异基因的相关研究结果,发现两两通路聚焦到相同羊绒细度靶基因较多,两条通路以上共同聚焦到某个或某几个羊绒细度关键的靶基因较少(表 5),且 RPL、KRT 和 PSMA 基因在不同转录组高通量数据分析中出现频次较高,表达量差异显著,可能与羊绒细度性状特征密切,但仍需要更进一步的试验验证。

表 5 羊绒细度相关靶基因在不同研究通路中出现频次

Table 5 The frequency of cashmere fineness related target genes in different research pathways

出现频次 Frequency	基因名称 Gene name	参考文献 ^[3,11-12,14,18,20] References ^[3,11-12,14,18,20]
2	ATP5G2、BMI1、BRK1、FDPS、IGF2、INHBA、PPAT、 RPA3、SLC、VTI1B、WDR61、YWHAQ、OR52B4	Dong 等(2013)
3	CYP、PRPS1、SS18、TUBA1C	于永生,等(2014)
4	FGF、PSMA、EIF4A2、	刘海英,等(2009); Qiao 等(2017)
5	KRT	田月珍(2012); 于永生,等(2014); Qiao 等(2017)
6	RPS	作者未发表数据
14	RPL	于永生,等(2014); 付绍印(2014)

5 小结

羊绒细度在不同绒山羊品种间和品种内都存在一定的差异,虽然辽宁绒山羊是全球单体产绒量最高的品种,但羊绒细度群体均值偏粗,有待改良。辽宁绒山羊群体中虽然也有羊绒特细的个体,但数量有限。目前,各地区、各品种绒山羊羊绒细度正在逐年变粗,挖掘调控羊绒细度的关键分子及调控机制迫在眉捷。作者结合了前期及其他研究结果,对比分析了内蒙古绒山羊和辽宁绒山羊羊绒细度,发现RPL、RPS、KRT、PSMA和TCHH基因可能对羊绒细度的调节作用比较重要,可进一步试验验证。目前获得羊绒细度关键基因的方法主要是通过高通量数据筛选得到羊绒细度潜在候选基因,其次要在绒山羊皮肤本体进行原位杂交和免疫组化及相关非编码RNA调节因子的本体表达验证,然后构建不同调节因子的表达载体和靶基因的表达载体,在次级毛囊细胞中验证miRNA、lncRNA和circRNA对靶基因沉默和过表达情况的调控作用。希望通过后续深入的研究、验证能够获得调控羊绒细度基因及非编码RNA调节因子,为今后深入研究调控绒山羊羊绒细度的基因奠定基础。

参考文献(References):

- [1] 田文亮. 中国山羊绒品质分析(一)[J]. 中国纤检, 2015, 1: 27-31.
TIAN W L. Quality analysis of Chinese cashmere(1)[J]. *China Fiber Inspection*, 2015, 1: 27-31. (in Chinese)
- [2] 田文亮. 中国山羊绒品质分析(二)[J]. 中国纤检, 2015, 3: 22-25.
TIAN W L. Quality analysis of Chinese cashmere(2)[J]. *China Fiber Inspection*, 2015, 3: 22-25. (in Chinese)
- [3] 刘海英, 杨桂芹, 张微, 等. FGF5基因对内蒙古绒山羊绒毛性状的影响[J]. 遗传, 2009, 31(2): 175-179.
LIU H Y, YANG G Q, ZHANG W, et al. Effect of FGF5 gene on fibre traits on Inner Mongolia cashmere goats[J]. *Hereditas*, 2009, 31(2): 175-179. (in Chinese)
- [4] JIN M, WANG L, LI S, et al. Characterization and expression analysis of KAP7.1, KAP8.2 gene in Liaoning new-breeding cashmere goat hair follicle[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(5): 3023-3028.
- [5] ZHAO M, CHEN H, WANG X, et al. A PCR-SSCP and DNA sequencing detecting two silent SNPs at KAP8.1 gene in the cashmere goat[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(6): 1387-1391.
- [6] ZENG X C, CHEN H Y, JIA B, et al. Identification of SNPs within the sheep PROP1 gene and their effects on wool traits[J]. *Molecular Biology Reports*, 2011, 38(4): 2723-2728.
- [7] ZHOU J P, ZHU X P, ZHANG W, et al. A novel single-nucleotide polymorphism in the 5' upstream region of the prolactin receptor gene is associated with fiber traits in Liaoning cashmere goats[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2011, 10(4): 2511-2516.
- [8] 刘斌. 绒山羊绒毛生长相关基因的筛选、鉴定和多态性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
LIU B. Selection, identification and SNP analysis of correlation genes with cashmere growth on cashmere goats[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [9] 狄冉. 中国产绒山羊微卫星和单核苷酸多态性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
DI R. The microsatellite and SNPs study of Chinese cashmere goats[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008. (in Chinese)
- [10] 李丽娟, 张利平, 刘武军. 三个绒山羊品种KIFI基因多态性与绒用性状相关性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
LI L J, ZHANG L P, LIU W J. Polymorphism of KIFI gene associated with cashmere traits in three cashmere goat breeds[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2009. (in Chinese)
- [11] 田月珍. 中国美利奴羊(新疆型)羊毛细度相关候选基因的筛选及其关联分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2012.
TIAN Y Z. Study on selection and relation of candidate gene and associated with wool fineness in Merino sheep[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [12] 于永生, 曹阳, 朴庆林, 等. 辽宁绒山羊绒直径相关基因的筛选[J]. 中国草食动物科学, 2014, S1: 147-149.
YU Y S, CAO Y, PU Q L, et al. Screening of cashmere diameter related genes in Liaoning cashmere goats[J]. *China Herbivore Science*, 2014, S1: 147-149. (in Chinese)
- [13] 张丽丽. MP1基因在辽宁绒山羊皮肤的表达研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2015.
ZHANG L L. Study on the expression of MP1 in Liaoning cashmere goat skin[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2015. (in Chinese)
- [14] QIAO X, SU R, WANG Y, et al. Genome-wide target enrichment-aided chip design: A 66 K SNP chip for cashmere goat[J]. *Scientific Report*, 2017, 7(1): 8621.

- [15] ZHANG W, GUANG W, JIANG H, et al. A subset of skin-expressed microRNAs with possible roles in goat and sheep hair growth based on expression profiling of mammalian microRNAs[J]. *A Journal of Integrative Biology*, 2007, 4(11): 385-396.
- [16] 樊凯军, 尹俊. 绒山羊 70 d 胚胎皮肤小分子 RNA 文库构建及 miRNA 鉴定[J]. 生物技术, 2014, 24(1): 32-36.
- FAN K J, YIN J. Construction of a small RNA library and identify of miRNAs from 70 days cashmere goat fetal skin[J]. *Journal of Biology*, 2014, 24(1): 32-36. (in Chinese)
- [17] LIU Z H, XIAO H M, LI H P, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in cashmere goat skin by deep sequencing[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e50001.
- [18] DONG Y, XIE M, JIANG Y, et al. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*) [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(2): 135-141.
- [19] 袁超. 绒山羊次级毛囊周期性变化相关 microRNA 的鉴定及 miR-125b 在毛乳头细胞中的功能研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- YUAN C. Identification of micro RNAs in secondary hair follicle cycling and functional analysis of miR-125b in dermal papilla cells of cashmere goats[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2014. (in Chinese)
- [20] 付绍印. 绒山羊绒毛周期性相关 microRNA 及其靶基因的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2014.
- FU S Y. The Research of microRNA and targets related to cashmere cycle in cashmere goat [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [21] 刘洋. 绒山羊胎儿期毛囊发育相关 microRNA 的筛选与鉴定[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2016.
- LIU Y. Screening and identification of hair follicle development related microRNA in cashmere goat [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [22] DINGER M E, AMARAL P P, MERCER T R, et al. Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation[J]. *Genome Research*, 2008, 18: 1433-1445.
- [23] MAO Y S, ZHANG B, SPECTOR D L. Biogenesis and function of nuclear bodies[J]. *Trends Genet*, 2011, 27: 295-306.
- [24] GUETG C, LIENEMANN P, SIRRI V, et al. The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29: 2135-2146.
- [25] 路畅, 黄银花. 动物长链非编码 RNA 研究进展[J]. 遗传, 2017, 39(11): 1054-1065.
- LU C, HUANG Y H. Progress in long non-coding RNAs in animals[J]. *Hereditas*, 2017, 39(11): 1054-1065. (in Chinese)
- [26] ROTHER S, MEISTER G. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs [J]. *Biochimie*, 2011, 93: 1905-1915.
- [27] 郭杨. 羊绒周期性生长特异性 lncRNAs 的筛选[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2015.
- GUO Y. Screening of specific long non-coding RNAs regulating periodic growth of cashmere[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2015. (in Chinese)
- [28] WANG S, GE W, LUO Z, et al. Integrated analysis of coding genes and non-coding RNAs during hair follicle cycle of cashmere goat (*Capra hircus*) [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 767.
- [29] BAI W L, ZHAO S J, WANG Z Y, et al. lncRNAs in secondary hair follicle of cashmere goat: Identification, expression, and their regulatory network in wnt signaling pathway[J]. *Animal Biotechnology*, 2018, 29(3): 199-211.
- [30] ZHOU G, KANG D, MA S, et al. Integrative analysis reveals ncRNA-mediated molecular regulatory network driving secondary hair follicle regression in cashmere goats[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 222.
- [31] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P L, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30733.
- [32] ZHENG Q, BAO C, GUO W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11215.
- [33] PANDA A C, GRAMMATIKAKIS I, KIM K M, et al. Identification of senescence-associated circular RNAs (SAC-RNAs) reveals senescence suppressor CircPVT1[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(7): 4021-4035.
- [34] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats[J]. *RNA*, 2013, 19(2): 141-157.
- [35] ZHANG X O, WANG H B, ZHANG Y, et al. Complementary sequence-mediated exon circularization[J]. *Cell*,

- 2014,159(1):134-147.
- [36] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(3): 256-264.
- [37] LU Z, FILONOV G S, NOTO J J, et al. Metazoan tRNA introns generate stable circular RNAs *in vivo*[J]. *RNA*, 2015, 21(9):1554-1565.
- [38] ENGLERT M, SHEPPARD K, ASLANIAN A, et al. Archaeal 3' phosphate RNA splicing ligase characterization identifies the missing component in tRNA maturation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(4):1290-1295.
- [39] GAO Y, WANG J, ZHENG Y, et al. Comprehensive identification of internal structure and alternative splicing events in circular RNAs[J]. *Nature Communications*, 2016, 7:12060.
- [40] 杨 平, 倪 超, 陈 思, 等. 环状 RNA 及其在胃癌中作用的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(12):1633-1641.
YANG P, NI C, CHEN S, et al. Advances in circular RNAs and their role in gastric cancer [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2017, 39(12): 1633-1641. (in Chinese)
- [41] YAO T, CHEN Q, FU L, et al. Circular RNAs: Bio- genesis, properties, roles and their relationships with liver diseases [J]. *Hepatol Research*, 2017, 47(6): 497-504.
- [42] MEMCZAK S, JENS M, ELEFSINOTI A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 333-338.
- [43] CONN S J, PILLMAN K A, TOUBIA J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNA[J]. *Cell*, 2015, 160(6):1125-1134.
- [44] ASHWAL-FLUSS R, MEYER M, PAMUDURTI N R, et al. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing[J]. *Molecular Cell*, 2014, 56(1):55-66.
- [45] TAO H, XIONG Q, ZHANG F, et al. Circular RNA profiling reveals chi_circ_0008219 function as microRNA sponges in pre-ovulatory ovarian follicles of goats (*Capra hircus*) [J]. *Genomics*, 2017, 17: 30129-30133.
- [46] LI C Y, LI X Y, MA Q M, et al. Genome-wide analysis of circular RNAs in prenatal and postnatal pituitary glands of sheep[J]. *Scientific Report*, 2017, 7(1):16143.
- [47] LI C Y, LI X Y, MA Q M, et al. Genome-wide analysis of circular RNAs in prenatal and postnatal muscle of sheep[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(57):97165-97177.

(责任编辑 卢庆萍)