

H19 基因的单核苷酸多态性与猪生长性状的相关分析及其时空表达

孙浩¹, 王子帅², 徐银学^{1*}, 唐中林^{2*}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 本试验为了了解 H19 基因在猪骨骼肌生长发育过程中的作用, 首先采用实时荧光定量 PCR 的技术检测了 H19 的组织分布以及在骨骼肌生长发育中的动态表达。然后通过混合池测序检测了 H19 外显子和内含子区的单核苷酸多态位点(SNP), 利用质谱在大白猪群体中进行 SNPs 位点基因型鉴定, 并进行标记性状关联分析。H19 基因在大白猪的心、肝、脾、肺、肾、小肠、胃、腿肌、背肌中均有表达, 且在骨骼肌(腿肌、背肌)和肾中高表达。在骨骼肌发育中, H19 主要是在胚胎期和出生后 40 d 之前有较高表达量, 并且在胚胎期 105 d 达到最大值。对 7 个 SNPs 位点进行相关性分析, 结果显示, RS15 位点与达 100 kg 体重的校正日龄显著相关($P=0.0462 < 0.05$), RS20 位点与 100 kg 的校正眼肌面积显著相关($P=0.0095 < 0.01$)。RS15 与 RS16 紧密连锁, 其单倍型与校正背膘厚显著相关($P=0.0498 < 0.05$); RS17 与 RS18 单倍型与达 100 kg 的校正眼肌面积显著相关($P=0.0371 < 0.05$)。结果表明 H19 基因参与猪骨骼肌发育调控, 是猪产肉性状的候选基因。

关键词: 猪; 长链非编码 RNA; H19; 骨骼肌; 生长性状

中图分类号: S828; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)05-0870-12

The Correlation between H19 Single Nucleotide Polymorphism and Pig Growth Characters and Its Spatio-temporal Expression

SUN Hao¹, WANG Zi-shuai², XU Yin-xue^{1*}, TANG Zhong-lin^{2*}

(1. College of Animal Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: An attempt was made to reveal the function of H19 gene in skeletal muscle development in pigs in this study. The distribution of H19 in different tissues and dynamic expression at different developmental stages in skeletal muscle were determined by Quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The sites of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in its exons and introns were identified by pool DNA sequencing, and individual SNPs were genotyped using mass spectrum in Large White pig population. The trait-marker association analysis was carried out between H19 genotypes and growth performance. The expression profiles showed that H19 RNA was expressed in all tissues detected, including heart, liver, spleen, lung, kidney, intestine, stomach and skeletal muscle (leg muscle and longissimus muscle), with remarkably high expression in skeletal muscle and kidney. Meanwhile, H19 expression existed only before postnatal 40 days and reached the peak at 105 days in embryo period during the development of skeletal muscle. Correlation analysis between SNPs and traits showed the RS15 was significantly associated with corrected age of animals with body weight of 100 kg ($P=0.0462 < 0.05$), RS20 was associated with the corrected eye

收稿日期: 2015-05-28

基金项目: 转基因重大专项(2014ZX08009-001); 国家自然科学基金(31330074; 31171192)

作者简介: 孙浩(1989-), 男, 山东莱芜人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: littlesun2015@126.com

* 通信作者: 徐银学, 教授, E-mail: xuyinxue@njau.edu.cn; 唐中林, 研究员, E-mail: zhonglingy_99@sina.com

muscle area of animals with body weight of 100 kg ($P=0.0095 < 0.01$); The correlation analysis between haplotypes and traits shown that RS15 had a close linkage with RS16, and their haplotype was significantly correlated with corrected backfat thickness ($P=0.0498 < 0.05$). RS17 was closely linked to RS18, and their haplotype was also significantly correlated with corrected eye muscle area of animals with body weight of 100 kg ($P=0.0371 < 0.05$). In conclusion, *H19* gene is involved in regulation of pig skeletal muscle development and is a candidate gene for meat traits.

Key words: pig; long non-coding RNA; *H19*; skeletal muscle; growth traits

中国是养猪大国,猪肉是人们日常生活中肉类食品的主要来源。随着消费者对猪肉品质、风味的要求日益提高,相关优良产肉性状的猪种选育逐渐成为猪生产工作中的重点之一。而猪肉的品质、风味亦取决于猪骨骼肌的生长和脂肪的沉积。骨骼肌是组成胴体瘦肉的主要成分,进而是猪产肉性状的决定因素。猪产肉性状是微效多基因控制的,对猪产肉性状的相关基因研究中,最重要的两个基因是调节骨骼肌纤维跨膜转运 Ca^{2+} 的鱼尼丁受体 HAL/RYR1^[1] 和影响肌肉糖原含量的 *RN* 基因^[2]。长链非编码 RNAs (Long non-coding RNAs, lncRNAs) 是一类转录后不翻译成蛋白、仅编码长 RNA 序列的基因。近年来研究表明,在骨骼肌生长发育过程中, lncRNA 同样发挥了重要作用。*H19* 基因是依赖于 RNA 聚合酶 II 的胞质 lncRNA, 是首批发现的 lncRNAs 之一,通过转录高水平、大约 2.5 kb 的转录本发挥功能^[3-4]。转录本只有一个短的 ORF,在物种间保守性低^[5]。*H19* 基因第一内含子内部可以转录 miR-675 的序列^[6]。*H19* 的第一内含子编码 miR-675-3p 和 miR-675-5p,一方面,压力反应 RNA 结合蛋白 HuR 可以通过调控 miR-675 的表达,继而影响其下游 IGF1R 的功能^[7];另一方面,这些 miRNA 与靶基因 *Smad1*、*Smad5*、*Cdc6* 结合,进而对骨骼肌发育分化和再生产生影响。*H19* 基因在人和小鼠的成年肌肉中表达量很高^[8-9],并且在肌纤维分化和肌肉再生时它的表达都显著上调;另外,*H19* 还可以通过募集吸附 let-7,影响 *Hmga2* 和 *Igfbp2* 的功能,进而对肌纤维多核的形成产生影响^[10]。提示 *H19* 在肌肉的生长发育中起着重要作用。在实际生产中,对 QTLs 的定位并进行分子标记是一种行之有效的重要育种手段。例如:Z. L. Tang 等^[11]通过鉴定 *CNN3* 基因的 SNP 位点初步确定了该基因与仔猪断奶重、出生重等生长性状有关。

本研究通过对 *H19* 基因在组织和骨骼肌发育过程中的表达水平检测及性状关联分析,提示 *H19* 可能是猪骨骼肌生长发育过程中重要的调控基因,可作为产肉性状的一个候选标记基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 组织样品取自北京市顺义区某猪场的 15 头大白猪,分别于妊娠的 8 个时期和仔猪出生后的 7 个时期屠宰,采集背最长肌,分别表示为胚胎期 (E33、E60、E65、E70、E75、E80、E95、E105) 和出生后 (D0、D20、D40、D60、D100、D140、D160)。另外采集 3 头成年母猪 (160 d) 的心、肝、脾、肺、肾、小肠、胃、腿肌、背肌等组织。每个阶段及组织至少采集 3 份重复样品。采集后立即投入液氮中保存各个组织样品,少量于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中贮存备用。随机选取 297 个生长育肥的大白猪,进行血液样品采集。采集过程采用一次性抗凝管,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.1.2 主要试剂 $2\times$ Taq Master Mix 购自北京康为生物技术公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,血液 DNA 裂解液、苯酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇、70% 乙醇、Trizol reagent 购自 Invitrogen;动物组织总 RNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,反转录试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司;荧光定量试剂盒购自宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取和反转录 取黄豆粒大小的各个组织样品于液氮中研磨, RNA 提取按照动物组织总 RNA 提取试剂盒进行操作,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性,并用分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。cDNA 第一链的合成按照 RevertAidFirst Strand

cDNA Synthesis Kit 试剂盒步骤进行,取 1 μg RNA 做模板,加入 1 μL 随机引物 Random Primer,用双蒸水补齐至 12 μL ,在 PCR 仪中 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 后取出置于冰上,向其中分别加入 5 \times Reaction Buffer 4 μL 、RiboLockTM RNase Inhibitor (20 U \cdot μL^{-1}) 1 μL 、10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP Mix 2 μL 和 RevertAidTM M-MULV Reverse Transcriptase (200 U \cdot μL^{-1}) 1 μL ,PCR 反应条件:25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,42 $^{\circ}\text{C}$

60 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。反应产物放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 *H19* 定量引物设计 根据 GenBank 中猪 *H19* 基因序列 (AY044827.1),利用 Primer 5 跨外显子设计合成 *H19* 定量引物。根据内参照基因 *GAPDH* mRNA 序列 (NM_001206359.1),设计定量引物,引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成(表 1)。

表 1 *H19* 基因定量引物

Table 1 The primers for qRT-PCR of *H19*

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>H19</i>	H19QF	ACCTTGGAAATCTGGAGCCT
	H19QR	CGATGTTGCCCTGCCTAT
<i>GAPDH</i>	GpF	ATGGTGAAGGTCGGAGTGAAC
	GpR	CTCGCTCCTGGAAGATGGT

1.2.3 *H19* 基因组织和时空表达谱定量分析

将反转录得到的 cDNA 稀释到同一浓度,按照实时定量方法的操作说明,以 *GAPDH* 为内参,检验 *H19* 基因在 9 个组织(心、肝、脾、肺、肾、小肠、胃、腿肌、背肌)和 15 个时期(胚胎期(E33、E60、E65、E70、E75、E80、E95、E105)和出生后(D0、D20、D40、D60、D100、D140、D160))中的表达情况,每个样本做 3 次平行试验。反应体系: TaqMan[®] Real-Time PCR Master Mixes 10 μL ,上下游引物各 1 μL ,模板 2 μL ,双蒸水补齐至 20 μL 。反应条件: Stage I : 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; Stage II : 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环; Stage III : 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,

95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。

1.2.4 DNA 混合池的构建 利用酚氯仿法抽提 32 个大白猪血液 DNA,在分光光度计上测量纯度和浓度并在 1% 琼脂糖凝胶中验证 DNA 完整性后,按每一血液样本抽取 1 μg 的标准,构建 DNA 混合池,混匀后置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.5 部分 *H19* 基因序列的扩增引物设计 根据 GenBank 中猪 *H19* 基因序列 (AY044827.1),利用 Primer 5 设计合成 4 对特异引物(表 2),用来扩增基因 DNA 序列中的 33 946~37 298 bp 区域,该区域包括 6 个外显子和 5 个内含子。引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

表 2 部分 *H19* 基因序列扩增引物

Table 2 Primers used to amplify partial sequence of *H19* gene

引物名称 Primer name		引物序列(5'-3') Primer sequence
H19seq1	上游引物	TGCCAACCTGAGCCCTGAC
	下游引物	TCCCACCAGACTCGCTTGA
H19seq2	上游引物	TCCCAGGTGGAAGAGCATC
	下游引物	TCCCTCCAAGCACATCCTG
H19seq3	上游引物	CTCTGCGGGTGACAACCTGA
	下游引物	GAGGGAGGCTGGTGGTGT
H19seq4	上游引物	GTTGAGCCAAAGGAACAGACG
	下游引物	CGCAGGCTGTGCTTTGTG

1.2.6 部分 *H19* 基因序列的扩增及 SNP 位点筛选 以混合 DNA 池为模板加入 2 μL ,上下游引物(表 2)各 1 μL , 2 \times Taq Master Mix 10 μL 双蒸水

补齐至 20 μL 。PCR 条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 32 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 35 s, 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物胶回收纯化后,由

北京天一辉远生物科技有限公司测序, 测序结果用 DNASTar 软件的 SeqMan 中的 SNP 功能查找潜在的 SNP 位点, 并进行人工确定。

1.2.7 SNP 位点在大白猪群体中的遗传分析和标记性关联分析 对生长相关性状测定时, 首先对待测猪进行 24 h 空腹处理, 在记录待测猪的个体号、性别、测定日期、测定人员等信息后, 将待测猪置于电子称上称重, 待示数稳定后记录读数。然后利用 B 型超声波测定仪, 扫描测定倒数第 3~4 肋间处且距背中线左侧约 5 cm 的背膘厚同时测定眼肌面积。将记录数据根据以下公式进行校正, 即可获得 3 个产肉性状的校正值。公式:

$$100 \text{ kg 体重时校正日龄} = \text{测定日龄} - [(\text{实测体重} - 100) / \text{CF}]$$

$$100 \text{ kg 体重时校正背膘厚} = \text{实测背膘厚} \times \text{CF}$$

$$100 \text{ kg 体重时校正眼肌面积} = \text{实测眼肌面积} \times \text{CF}$$

其中, CF 为各性状的校正因子。

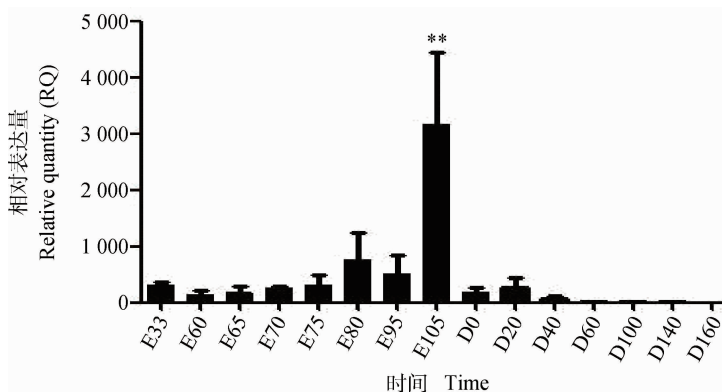
随机选取 297 个大白猪的 DNA 样品, 将 SNP 的相关信息交给北京康普森生物有限公司进行核酸质谱测序。对得到的基因型信息, 运用 Haploview、SNPStats 等软件进行基因型频率 (Genotype frequency)、等位基因频率 (Allele frequency)、Hardy-Weinberg

平衡检验、遗传纯合度 (Gene homozygosity, H_o)、杂合度 (Heterozygosity, H_e)、最小等位基因频率 (Minor allele frequency, MAF)、有效等位基因数 (Effective number of alleles, N_e)、多态信息含量 (Polymorphism information content, PIC)、单体型 (Haplotype) 的统计。运用 GraphPad 和 R 语言软件对数据进行处理, 并做 PCA 分析和相关分析。

2 结果

2.1 *H19* 基因在大白猪骨骼肌不同发育阶段的表达谱

以 *GAPDH* 作为内参, 通过使用 real-time PCR 分析 *H19* 基因在大白猪的不同发育阶段 (胚胎期 (E33、E60、E65、E70、E75、E80、E95、E105) 和出生后 (D0、D20、D40、D60、D100、D140、D160)) 的相对表达量, 其中以出生后 160 d (D160) 的 Ct 为基准, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算。结果显示, 在骨骼肌整个发育期只有在出生后 40 d (D40) 之前检测出 *H19* 的表达 (图 1), 主要集中于骨骼肌生长发育的胚胎期和仔猪初生时期。在胚胎期 105 d (E105) 达到峰值, 且极显著高于其他各个时期 ($P < 0.01$), 而在出生 40 d 之后直至成年背肌中几乎不表达, 在其他时期表达量呈低度波状表达趋势。



* *. $P < 0.01$. The same as Figure 2

图 1 *H19* 在大白猪骨骼肌不同发育阶段的相对表达

Fig. 1 The relative expression of *H19* at different development stages of Large White pigs

2.2 *H19* 在大白猪不同组织中的表达谱

以 *GAPDH* 作为内参, 通过使用 qRT-PCR 检测 *H19* 在 160 d 大白猪的不同组织 (心、肝、脾、肺、肾、小肠、胃、腿肌、背肌) 中的相对表达量, 其中以心的 Ct 值为基准, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算。结果显示, *H19* 在所有组织中均有表达, 且在骨骼肌 (腿肌、背

肌) 含量最丰富, 其次在肾中含量较高 ($P = 0.184 > 0.05$), 远远高于其他组织 ($P = 0.002 < 0.01$); 而心组织中 *H19* 表达量最低。 *H19* 在其他组织 (肺、胃、肝、脾、小肠) 中表达丰度居中 (图 2)。

2.3 骨骼肌相关生长性状的统计分析

在大白猪中, 校正背膘厚在不同性别中差异不

显著($P=0.6810>0.05$)(表 3);而达 100 kg 时的校正日龄(Corrected age of animals with body weight of 100 kg, CA100)在不同性别中差异极显著($P<0.01$),且公猪生长比母猪快了 9.29 d;达

100 kg 时的校正眼肌面积(Corrected eye muscle area of animals with body weight of 100 kg, CEMA100)在不同性别中差异显著($P=0.0364<0.05$),母猪比公猪大了 1.59 cm^2 (表 3)。

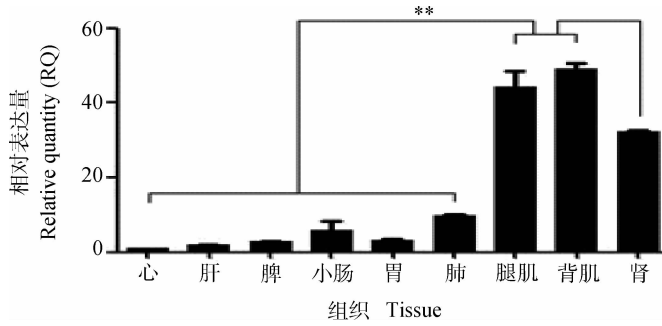


图 2 H19 在大白猪不同组织中的相对表达量

Fig. 2 The relative expression of H19 in different tissues of Large White pigs

表 3 性别对大白猪校正背膘厚、达 100 kg 校正眼肌面积和校正日龄的影响

Table 3 The impact of sex on the corrected backfat, CA100 and CEMA100 in Large White pigs

性别 Sex	样本量 Sample size	校正背膘厚/cm Corrected backfat	达 100 kg 体重时的 校正日龄/d CA100	达 100 kg 体重时的 校正眼肌面积/ cm^2 CEMA100
公猪 Boar	27	16.76 \pm 3.04	152.27 \pm 8.61 ^A	36.05 \pm 3.90 ^a
母猪 Sow	270	17.37 \pm 7.59	161.56 \pm 10.38 ^B	37.64 \pm 3.70 ^b

相同字母表示差异不显著 ($P>0.05$);不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$);不同大写字母表示极显著差异 ($P<0.01$)。表 6、7 同

The same letter indicate no significant difference ($P>0.05$); The different lower case letters indicate significant difference ($P<0.05$); The different capital letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$). The same as Table 6, 7

2.4 基因型及基因统计分析和遗传多样性分析

通过混合池测序和人工筛选,确定 7 个潜在的 SNPs 位点,分别命名为 RS15、RS16、RS17、RS18、RS20、RS21、RS22。在 297 个大白猪的 DNA 样品中,RS15、RS16、RS17、RS18、RS20、RS21、RS22 均检测到多态性。RS15 的 3 个基因型中 TT 频率最高,RS16、和 RS21 的 3 个基因型中 CC 频率最高,在 RS18、RS20 的 3 个基因型中 CT 频率最高,RS17、RS22 的两个基因型中分别是 CC 和 AA 频率最高。RS15、RS16、RS17、RS18、RS20、RS21、RS22 的优势等位基因分别是 T、C、C、G、C、C、A(表 4)。RS15、RS16、RS17、RS21 和 RS22 的 $PIC<0.25$,均属于低度多态;RS20 的 $0.25<PIC<0.5$,属中度多态,RS18 的 $PIC>0.5$,属高度多态(表 5)。在表 5 中,经过 Hardy-Weinberg 平衡检验,RS15、

RS18、RS20、RS21 严重偏离了 HW 平衡,而 RS16、RS17、RS22 符合 Hardy-Weinberg 平衡,综上所述,这 3 个 SNPs 遗传一致。

2.5 单体型分析和主成分分析

利用 Hapoview 软件,进行 D'/R^2 连锁不平衡分析,发现 RS15 和 RS16、RS17 和 RS18、RS20 和 RS21、RS22 分别形成 3 个具有连锁遗传的特性区域(图 3)。RS15 和 RS16 形成 TC、CC 和 CT 3 种单体型,RS17 和 RS18 形成 CT、CG、TT 和 TG 4 种单体型,RS20、RS21 和 RS22 形成 CCA、TCA、TTA、TTG 和 CTG 5 种单体型(图 4)。利用 R Studio 的 PCA 主成分分析程序,对 3 个生长性状的所有观测到的 SNPs 进行 PCA 分析,发现相同基因型趋于聚集在一起,说明基因型是影响生长性状的主要遗传因素(图 5、图 6 和图 7)。

表 4 基因型和等位基因频率

Table 4 Frequency of genotype and allele

SNPs	基因型(频率) Genotype(frequency)			等位基因(频率) Allele(frequency)	
RS15	CC(0.054)	TT(0.801)	CT(0.145)	C(0.126)	T(0.874)
RS16	CC(0.953)	TT(0.010)	CT(0.037)	C(0.971)	T(0.029)
RS17	CC(0.963)	TT(0.000)	CT(0.037)	C(0.981)	T(0.019)
RS18	GG(0.106)	TT(0.029)	CT(0.865)	G(0.538)	T(0.462)
RS20	CC(0.397)	TT(0.013)	CT(0.589)	C(0.692)	T(0.308)
RS21	CC(0.946)	TT(0.014)	CT(0.041)	C(0.966)	T(0.034)
RS22	AA(0.963)	GG(0.000)	AG(0.037)	A(0.981)	G(0.019)

表 5 遗传多样性分析

Table 5 Genetic diversity analysis

SNPs	杂合度观测值 H_e	杂合度预测值 H_e	H_o	N_e	PIC	Hardy-Weinberg P 值 HW- P	%Geno	MAF
RS15	0.145	0.221	0.855	1.170	0.121	7.62E-07	100.0	0.126
RS16	0.037	0.056	0.963	1.038	0.035	0.0017	100.0	0.029
RS17	0.037	0.043	0.963	1.038	0.036	0.2511	100.0	0.019
RS18	0.874	0.498	0.126	7.937	0.750	2.16E-15	34.7	0.466
RS20	0.589	0.426	0.411	2.433	0.498	1.27E-12	100.0	0.308
RS21	0.041	0.065	0.959	1.043	0.039	2.00E-04	99.7	0.034
RS22	0.037	0.036	0.963	1.038	0.036	1	36.4	0.019

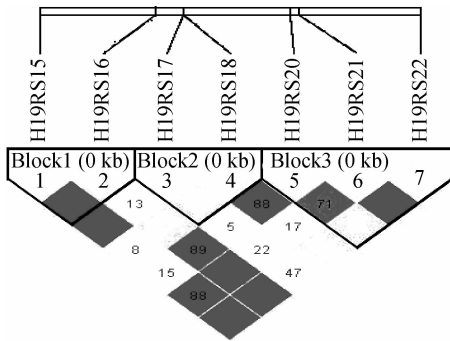


图 3 *H19* 基因 SNPs 的 D' / R^2 连锁不平衡分析
Fig. 3 The linkage disequilibrium analysis of *H19* gene

2.6 SNPs、单体型与生长性状的关联分析

利用 GraphPad 对同一性状不同 SNP 位点不同基因型之间进行 Person 检验,发现在校正背膘中,各个 SNP 位点基因型间均无显著差异。RS15 的 TT 基因型在达到 100 kg 时校正日龄要比 CT 型长 3.6 d ($P=0.0462 < 0.05$),说明 RS15 的 TT 基因型显著影响达到 100 kg 时校正日龄,即两者显著

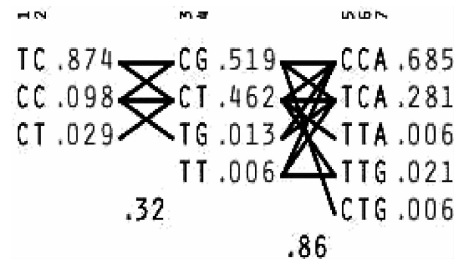


图 4 *H19* 基因的单体型
Fig. 4 The haplotype analysis of *H19* gene

相关。而在达到 100 kg 校正眼肌面积中,RS20 的 CC 基因型要比 CT 型小 0.92 cm^2 ($P=0.0374 < 0.05$),TT 比 CT 大 3.84 cm^2 ($P=0.0478 < 0.05$),RS20 的 CC 基因型要比 TT 型小 4.76 cm^2 ($P=0.0093 < 0.01$)。独立样本 t 检验表明,RS20 位点显著影响 100 kg 的校正眼肌面积 ($P=0.0095 < 0.01$),两者极为显著相关(表 6)。对单体型进行进一步关联分析,发现在 RS15 和 RS16 连锁的单体型中,TC/CT 的校正背膘平均要

比 CC/CT 少 2.95 cm ($P = 0.0498 < 0.05$); 在 RS17 和 RS18 连锁的单体型中, CT/CT 的校正眼肌面积要比 CT/TG 大 3.09 cm² ($P = 0.0371 <$

0.05)。提示 RS15 与 RS16、RS17 与 RS18 的单体型分别与校正背膘厚、达 100 kg 的校正眼肌面积显著相关(表 7)。

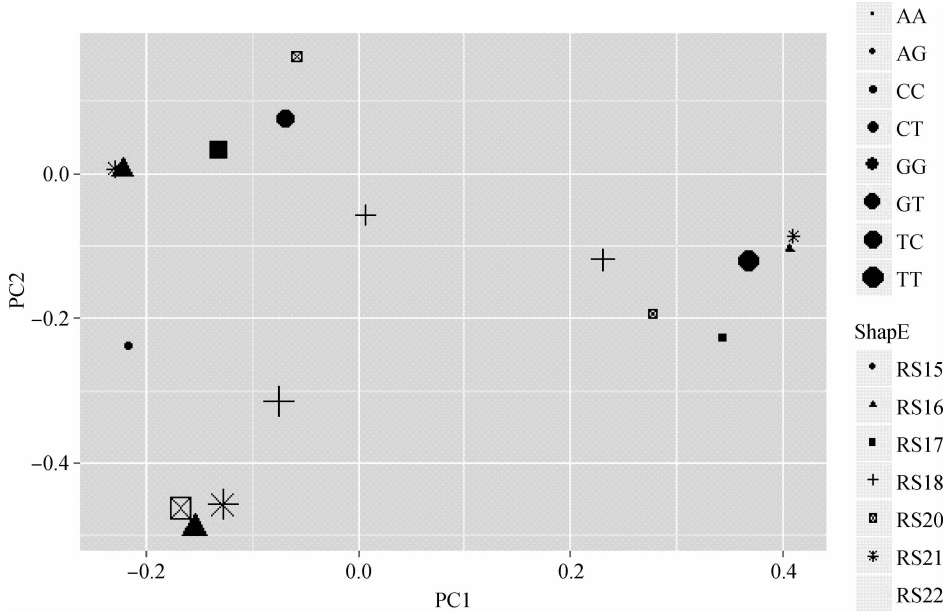


图 5 在校正背膘厚中 SNPs 的 PCA 分析
Fig. 5 The PCA analysis in corrected backfat

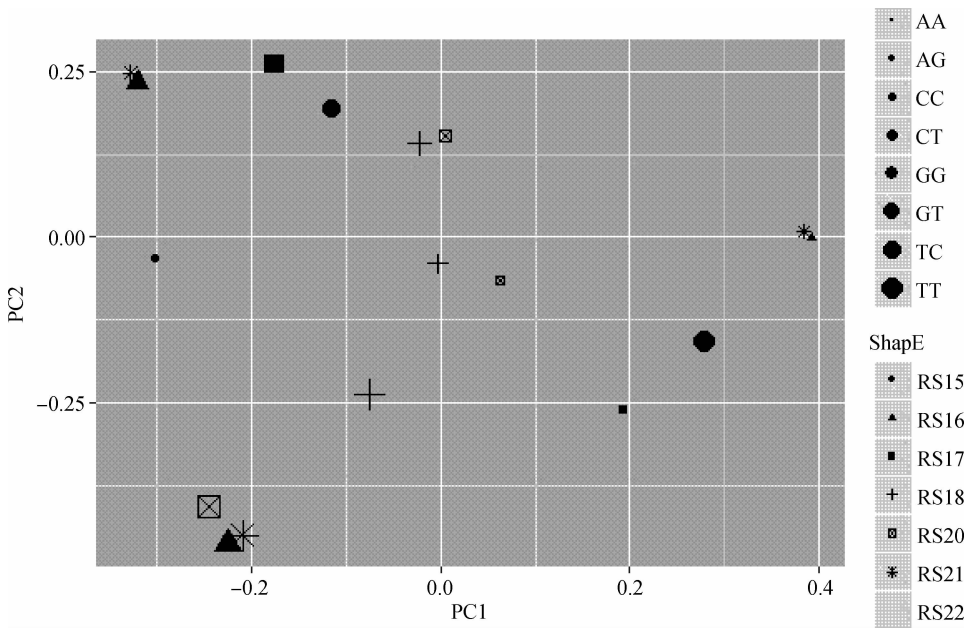


图 6 在校正日龄中 SNPs 的 PCA 分析
Fig. 6 The PCA analysis in CA100

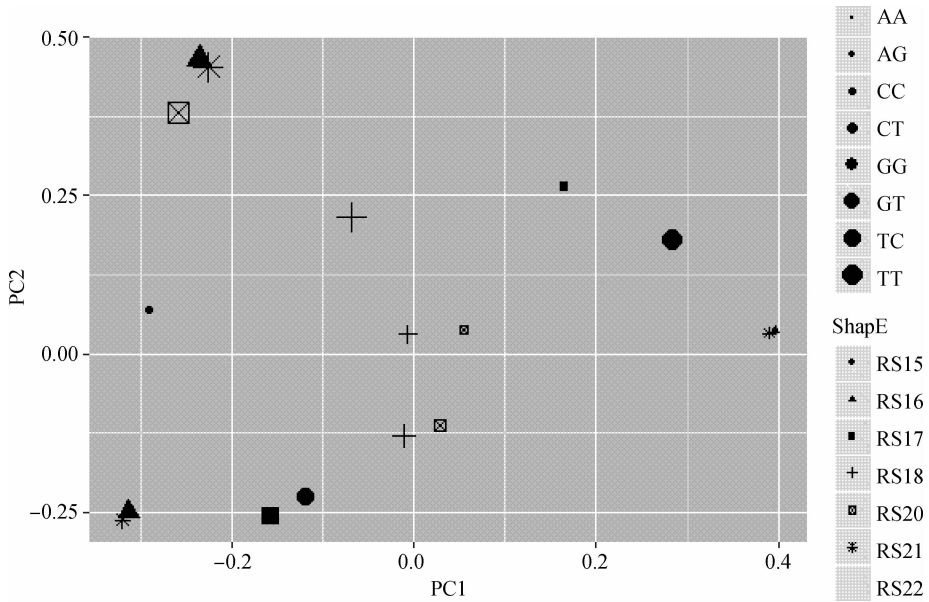


图 7 在校正眼肌面积中 SNPs 的 PCA 分析

Fig. 7 The PCA analysis in CEMA100

表 6 各个 SNPs 基因型与 3 个生长性状的相关分析

Table 6 The relative analysis between genotypes of SNPs and 3 growth traits

SNPs	基因型 Genotype	样本数 Sample size	校正背膘厚/cm Corrected backfat	达 100 kg 体重时的 校正日龄/d CA100	达 100 kg 体重时的 校正眼肌面积/cm ² CEMA100
RS15	CC	16	18.02±1.061	159.0±2.143 ^{ac}	37.38±1.048
	TT	238	16.78±0.201	161.4±0.686 ^a	37.52±0.237
	CT	43	17.41±0.503	157.8±1.645 ^{bc}	37.40±0.627
RS16	CC	283	16.92±0.191	160.9±0.634	37.46±0.222
	TT	3	17.30±3.104	158.9±6.207	39.91±1.618
RS17	CT	11	17.38±0.769	157.4±2.229	37.88±1.172
	CC	285	16.91±0.191	160.7±0.622	37.57±0.223
	CT	11	17.73±0.767	159.9±3.936	35.55±0.781
RS18	GG	10	18.86±0.824	158.6±1.432	35.44±1.241
	TT	3	19.63±2.024	161.1±6.048	37.94±0.905
RS20	GT	90	17.21±0.318	160.6±1.191	37.03±0.421
	CC	118	17.33±0.292	159.7±0.998	36.89±0.324 ^A
	TT	4	16.80±2.251	158.8±4.390	41.65±2.078 ^B
RS21	CT	175	16.68±0.241	161.4±0.786	37.81±0.287 ^c
	CC	280	16.89±0.191	160.8±0.636	37.51±0.222
	TT	4	18.70±2.604	158.9±4.389	38.53±1.797
RS22	CT	12	17.64±0.750	156.8±2.134	37.44±1.155
	AA	104	16.86±0.296	161.0±1.081	37.78±0.380
	AG	4	16.79±1.742	165.1±3.609	37.87±1.774

表 7 单体型之间的差异相关分析

Table 7 The relative analysis between the genotypes of haplotypes

单体型 Haplotype	样本数 Sample size	校正背膘厚/cm Corrected backfat	达 100 kg 体重时的 校正日龄/d CA100	达 100 kg 体重时的校正 眼肌面积/cm ² CEMA100
RS15 与 RS16 单体型				
TC/TC	238	17.25±0.516 ^{ac}	161.4±0.686	37.52±0.237
CT/CT	3	17.30±3.104 ^{ac}	158.9±6.207	39.91±1.618
CC/CC	8	17.68±1.805 ^{ac}	159.3±2.773	37.23±1.908
TC/CT	6	16.04±0.794 ^a	156.3±1.753	39.37±1.876
TC/CC	37	17.63±0.565 ^{ac}	158.1±1.895	37.09±0.658
CT/CC	5	18.99±1.063 ^{bc}	158.7±4.687	36.09±0.897
RS17 与 RS18 单体型				
CG/CG	9	18.56±0.859	158.7±1.598	35.63±1.371 ^{ac}
CT/CT	3	19.63±2.024	161.1±6.048	37.94±0.905 ^a
CG/CT	84	17.20±0.334	160.6±1.227	37.18±0.444 ^{ac}
CG/TT(CT/TG)	6	17.37±1.073	161.4±5.358	34.85±0.715 ^{bc}
RS20、RS21 与 RS22 单体型				
CCA/CCA	40	16.81±0.5050	160.9±1.731	37.02±0.585
CCA/TCA	64	16.89±0.3672	161.1±1.394	38.26±0.492
CCA/TTG(TCA/CTG)	3	18.33±1.159	164.7±5.063	36.27±1.100

3 讨论

猪骨骼肌细胞主要由肌纤维构成。在猪胚胎期 14~22 d, 体节形成并发育; 胚胎期 35 d 左右, 初级肌管(Primary myotubes)形成, 并在胚胎期 49 d 左右达到细胞增殖高峰; 在初级肌管增殖变慢的同时次级肌管(Secondary myotubes)开始形成, 到胚胎期 91 d 时, 初级肌管消失, 次级肌管完成增殖。次级肌管在出生前形成肌纤维, 在出生后的 2 个月里肌纤维完成终末发育^[12-13]。Z. L. Tang 等^[12]利用 LongSAGE 技术比较通城和长白猪在胚胎期 33、65 和 90 d 的骨骼肌中筛选了一批与产肉性状有关的基因, 并鉴定到数个与产肉性状相关的 SNPs。之后的时间里, 肌纤维数目不再变化, 因此骨骼肌的生长主要是依赖于肌纤维的生长, 或者说骨骼肌细胞的发育阶段就是从胚胎期到出生后 2 个月之间的时间。

对猪骨骼肌的相关基因研究中, MRFs 家族中的 Myf5(Myogenic factor 5)最先表达, 影响生皮肤

节的发育, 而后 MyoD(又称 MyoD1, Myogenic differentiation 1)在生肌节中表达, 参与决定成肌细胞的形成^[14]。Myog(myogenin)和 myf6(MRF4)主要参与成肌细胞分化为肌纤维的过程^[15]。MEFs 家族的 MEF2a、MEF2b、MEF2c 和 MEF2d 协同作用, 共同参与成肌细胞到肌纤维的分化过程^[16]。另外, PNAS-4 基因可能与早期胚胎发育中骨骼肌纤维数目的增加有关^[17]。CA3 基因在骨骼肌中具有很高的表达水平, 其多态性在中外猪种中有显著差异, 并与脂肪含量、瘦肉率相关^[18]。

对猪产肉性状相关基因的研究表明, 肌纤维类型特异性蛋白 *TNNI1* 和 *TNNI2* 的表达水平改变肌纤维的构成, 进而影响猪的产肉性状, 研究还发现它们的内含子上的 SNP 位点显著影响背最长肌的 pH、肉色、大理石花纹等性状^[19]。*bR10D1*、*HMGA2*、*NME1*、*PDGFRA*、*ERC1* 5 个基因对产肉性状有影响, 特别是 *bR10D1*、*HMGA2*、*NME1* 基因与肉色、pH、失水重、剪切力和电导率极显著相关, *bR10D1* 更是极显著的影响瘦肉率、眼肌面积和后

腿质量^[20]。 *HSP72*、*ANXA2* 和 *cMDH* 的表达量可能与屠宰前压力水平、肌纤维组成密切相关^[21]。

近些年来, *LncRNA* 在骨骼肌生长发育过程中的作用越来越引起人们的关注。主要包括 *eRNAs*、*Gtl2/MEG3*、*H19*、*Linc-MD1*、*Malat1*、*Neat1*、*Nctc1*、*SRA*、*Yams* 和 *SINE* 中的 *lncRNAs*。同属于 *eRNAs* (Enhancer-derived RNAs) 的 *CE RNA* 和 *DRR RNA* 却通过相反的作用机制调控骨骼肌的分化, *CE RNA* 通过顺式作用激活 *MyoD*, 而 *DRR RNA* 通过反式作用促进 *MyoG* 的转录。 *Linc-MD1* (Long intergenic noncoding RNA-muscle differentiation 1) 是一个骨骼肌特异的 *lncRNA*, 通过募集吸附 *miR-133* 和 *miRNA-135*, 促进 *MEF2C* 和 *MAML1* (Mastermind-like protein 1) 表达, 进而影响骨骼肌的分化^[18]。 *Malat1* 做为 *myostatin* 的下游靶基因, 参与骨骼肌的生长发育调控^[19]。 *SRA* (Steroid receptor RNA activator) 作为支架将介导骨骼肌发育的 *MyoD* 蛋白与其他因子结合在一起, 从而发挥生物学功能^[20]。 *Yams* (YY1-associated muscle *lncRNAs*) 可以直接通过表达影响骨骼肌基因的功能, 其中 *Yams-1* 编码的 *miR-715* 可以作用于 *Wnt7b*, 从而对骨骼肌的形成产生影响^[21]。最近, W. M. Zhao 等人得到了一系列的在猪胚胎期骨骼肌发育中起作用的候选 *LncRNAs*^[22]。

猪在胚胎期 35 d 时, 胎儿基本成形, 在 35 d 之后到出生之前组织和器官进一步分化和成熟。在胎鼠上, *H19* 基因主要在起源于胚胎期中胚层和内胚层的组织中高表达, 包括肝、心、肾周组织、间充质细胞和肌肉^[23-24]; 在出生后, 仅能在骨骼肌中检测到^[25]。这与 A. N. Kallen 等^[23] 和 B. K. Dey 等^[9] 发现的 *H19* 基因在成年人和小鼠中也有很高表达量是吻合。在本研究的图 2 中可以明显看到, *H19* 基因在成年猪的组织中也有类似的表达分布规律。为了进一步验证 *H19* 基因是在骨骼肌生长发育的特定时期被特异性转录表达的, 对骨骼肌的 15 个时期 *H19* 基因的动态表达进行检测, 由图 1 可以发现, *H19* 基因主要在胚胎期活跃转录, 出生 40 d 以后表达量相对极低。表达水平在胚胎期 105 d 达到高峰, 且极显著高于其他任何时期 ($P < 0.001$)。目前, 据报道的 *H19* 参与骨骼肌发育过程的两种途径: 一种是通过反式调控 *IGF* 的表达, 进而影响骨骼肌的生长; 另一种是通过自身转录的 *miR675* 作用于 *Smads* 通路, 然后对骨骼肌发育起到调控作

用。根据 D. E. Gerrard 等 1998 年的研究, *IGF2* 在胚胎期 59 d 表达达到峰值, 随着胚胎和胎儿的发育表达量逐步降低^[26], 这与本试验中 *H19* 的在胚胎期的表达趋势相反, 提示 *IGF2* 表达量的降低可能与 *H19* 被逐步特异性激活转录有关。 *IGF2* 主要是促进成肌细胞增殖分化为初级肌管。提示 *H19* 主要参与肌管的成熟过程。而在小鼠中, *miR675* 被证实与 *H19* 基因具有共表达关系^[9]。 *miR675* 主要通过直接作用并下调作用于 *BMP* 通路的抗分化转录因子 *Smad* 家族相关基因的表达。这种作用和这一时期次级肌管围绕初级肌管形成并不发生进一步分化成为肌纤维的过程相符合。提示 *H19* 基因很可能参与了次级肌管的发生过程。

在 Beckwith-Wiedemann 综合征 (BWS) 中, 位于 *H19* 基因第 5 外显子的 1 个 SNP 位点 rs2839703 被作为检测患有 BWS 并有病理变化的病人的标记位点使用^[27]。rs10732516 对来自于母本的染色体上的 *H19-ICR* 区域的甲基化程度具有潜在影响; 与 rs2839701、rs10732516 连锁不平衡的 rs4930103 位点与其特定的 CpG 岛甲基化显著相关^[28]。通过 GWAS 方法发现, rs11897432、rs2412488 和 rs2555155 等 3 个 SNPs 也与该区域的甲基化有关^[29]。 *H19* 基因的两个多态位点 rs2107425、rs2107425 的突变与乳腺癌相关^[30]。rs76162918 的等位基因频率在 4 个日本人群样本中为 0.068~0.088, 但在 2 个韩国人群中却只有 0~0.005; 进一步的研究显示, 该位点可以作为日本人特有的 3 个人群标记基因之一^[31]。在中国人群中, rs217727 的 T 型等位基因导致冠状动脉疾病发生率上升, 然而 rs2067051 的等位基因却会减少发病的风险^[32]。由上述研究可以看出, *H19* 基因的 SNPs 与多种疾病有关, 而对猪产肉性状, 特别是骨骼肌相关的生长性状的候选 SNP 筛选报道甚少。根据本试验研究结果, RS20 3 个基因型间的个体表型均值间差异都显著, 可以作为达 100 kg 体重时的校正眼肌面积的候选标记位点, 在猪中由于眼肌面积与瘦肉率呈正相关, 因此, 可以作为筛选高瘦肉率的候选位点, 瘦肉率在屠宰胴体中主要是指骨骼肌占胴体重的比例, 提示 *H19* 基因的点突变对骨骼肌的生长具有重要影响。骨骼肌的生长主要依赖于在猪出生后肌纤维的增肥, 如前文所提及的, *H19* 在猪出生后只在骨骼肌中特异性表达, 综上所述, *H19* 基因可能参与了肌纤维的出生后生长。

参考文献 (References):

- [1] FUJII J, OTSU K, ZORZATO F, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia[J]. *Science*, 1991, 253(5018):448-451.
- [2] MILAN D, JEON J T, LOOFT C, et al. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle[J]. *Science*, 2000, 288(5469):1248-1251.
- [3] RANNAN C I, DEES E C, INGRAM R S, et al. The product of the H19 gene may function as an RNA[J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(1):28-36.
- [4] SEIDL C I, STRICKER S H, BARLOW D P. The imprinted Air ncRNA is an atypical RNAPII transcript that evades splicing and escapes nuclear export[J]. *EMBO J*, 2006, 25(15):3565-3575.
- [5] SMITS G, MUNGALL A J, GRIFFITHS-JONES S, et al. Conservation of the H19 noncoding RNA and H19-IGF2 imprinting mechanism in therians[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(8):971-976.
- [6] CAI X, CULLEN B R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor[J]. *RNA*, 2007, 13(3):313-316.
- [7] KENIRY A, OXLEY D, MONNIER P, et al. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(7):659-665.
- [8] KALLEN A N, ZHOU X B, XU J, et al. The imprinted H19 lincRNA antagonizes let-7 microRNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 52(1):101-112.
- [9] DEY B K, 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[J]. *Genes Dev*, 2014, 28(5):491-501.
- [10] LI Z Z, GILBERT J A, ZHANG Y Y, et al. An HMGA2-IGF2BP2 axis regulates myoblast proliferation and myogenesis[J]. *Dev Cell*, 2012, 23(6):1176-1188.
- [11] TANG Z L, LIANG R Y, ZHAO S P, et al. CNN3 is regulated by microRNA-1 during muscle development in pigs[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(4):377-385.
- [12] TANG Z L, LI Y, WAN P, et al. LongSAGE analysis of skeletal muscle at three prenatal stages in Tongcheng and Landrace pigs[J]. *Genome Biol*, 2007, 8(6):R115.
- [13] ASHMORE C R, ADDIS P B, DOERR L. Development of muscle fibers in the fetal pig[J]. *J Anim Sci*, 1973, 36(6):1088-1093.
- [14] TAJBAKHSI S, BORELLO U, VIVARELLI E, et al. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5[J]. *Development*, 1998, 125(21):4155-4162.
- [15] RIDGEWAY A G, PETROPOULOS H, WILTON S, et al. Wnt signaling regulates the function of MyoD and myogenin[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(42):32398-32405.
- [16] BLACK B L, OLSON E N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14:167-196.
- [17] MO D, ZHU Z, TE PAS M F, et al. Characterization, expression profiles, intracellular distribution and association analysis of porcine PNAS-4 gene with production traits[J]. *BMC Genet*, 2008, 9:40.
- [18] WANG H L, ZHU Z M, WANG H, et al. Molecular characterization and association analysis of porcine CA3[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 115(2):129-133.
- [19] YANG H, XU Z Y, LEI M G, et al. Association of 3 polymorphisms in porcine troponin I genes (TNNI1 and TNNI2) with meat quality traits[J]. *J Appl Genet*, 2010, 51(1):51-57.
- [20] WIMMERS K, MURANI E, NGU N T, et al. Structural and functional genomics to elucidate the genetic background of microstructural and biophysical muscle properties in the pig[J]. *J Anim Breed Genet*, 2007, 124(Suppl 1):27-34.
- [21] KWASIBORSKI A, ROCHA D, TERLOUW C. Gene expression in Large White or Duroc-sired female and castrated male pigs and relationships with pork quality[J]. *Anim Genet*, 2009, 40(6):852-862.
- [22] ZHAO W M, MU Y L, MA L, et al. Systematic identification and characterization of long intergenic noncoding RNAs in fetal porcine skeletal muscle development[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8957.
- [23] KALLEN A N, ZHOU X B, XU J, et al. The imprinted H19 lincRNA antagonizes let-7 microRNAs[J]. *Mol Cell*, 2013, 52(1):101-112.
- [24] PACHNIS V, BELAYEW A, TILGHMAN S M. Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes[J]. *Proc Natl Acad Sci*

- U S A*, 1984, 81(17): 5523-5527.
- [25] POIRIER F, CHAN C T, TIMMONS P M, et al. The murine *H19* gene is activated during embryonic stem cell differentiation *in vitro* and at the time of implantation in the developing embryo [J]. *Development*, 1991, 113(4): 1105-1114.
- [26] GERRARD D E, OKAMURA C S, RANALLETTA M A, et al. Developmental expression and location of IGF-I and IGF-II mRNA and protein in skeletal muscle [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76(4): 1004-1011.
- [27] HIGASHIMOTO K, NAKABAYASHI K, YATSUKI H, et al. Aberrant methylation of *H19*-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome [J]. *Am J Med Genet A*, 2012, 158A(7): 1670-1675.
- [28] COOLEN M W, STATHAM A L, QU W, et al. Impact of the genome on the epigenome is manifested in DNA methylation patterns of imprinted regions in monozygotic and dizygotic twins [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25590.
- [29] RENTERIA M E, COOLEN M W, STATHAM A L, et al. GWAS of DNA methylation variation within imprinting control regions suggests parent-of-origin association [J]. *Twin Res Hum Genet*, 2013, 16(4): 767-781.
- [30] O'BRIEN K M, COLE S R, POOLE C, et al. Replication of breast cancer susceptibility loci in whites and African Americans using a Bayesian approach [J]. *Am J Epidemiol*, 2014, 179(3): 382-394.
- [31] YUASA I, UMETSU K, ADACHI N, et al. Investigation of Japanese-specific alleles; most are of Jomon lineage [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2015, 17(1): 52-55.
- [32] GAO W, ZHU M, WANG H, et al. Association of polymorphisms in long non-coding RNA *H19* with coronary artery disease risk in a Chinese population [J]. *Mutat Res*, 2015, 772: 15-22.

(编辑 郭云雁)