

蒙古马高负荷运动训练前后 miRNA 差异表达分析

赵启南 芒来* 白东义 赵一萍 李蓓 乌尼尔夫 乌英嘎 苏日嘎 敖乳嘎

(内蒙古农业大学 动物科学学院/内蒙古自治区蒙古马遗传资源保护及马产业工程实验室,呼和浩特 010018)

摘要 为研究蒙古马高负荷运动训练前后 miRNA 差异表达,利用二代测序技术对 6 匹经 4 个月高负荷运动训练的蒙古马进行了调查,筛选训练前后发生差异表达的相关基因及其所参与的生物学过程。在训练前与训练后两个时期分别采集肌肉样品,建立蒙古马肌肉 miRNA 文库,对训练前后表达量发生显著变化的差异 miRNA 进行靶基因预测,并进行 GO 功能富集与 KEGG Pathway 分析。结果表明:1)在蒙古马高负荷训练前后两个文库中,分别筛选得到 366 和 346 个 miRNA,共表达 miRNA 达 248 种,分别预测得到 7 620 和 7 535 个靶基因。其中高丰度表达的 miRNA 有 miR-1、miR-378、miR-21、miR-101、miR-133a 等;2)靶基因参与调控的生物学过程包括:发育过程、解剖结构发育、蛋白质结合、酶结合等;3)KEGG Pathway 结果显示,在 210 条被注释的信号通路中与运动代谢相关的有:调节肌动蛋白细胞骨架,钙信号通路、心肌收缩等。本研究结果可为探究蒙古马强耐力的基本分子机理提供理论基础,同时也为了解蒙古马运动学特性提供新思路。

关键词 蒙古马; 高负荷运动; miRNA; 靶基因

中图分类号 S821.2

文章编号 1007-4333(2018)03-0061-08

文献标志码 A

miRNA analysis of Mongolian horses before and after high-load training

ZHAO Qinan, Manglai*, BAI Dongyi, ZHAO Yiping, LI Bei, Unerhu, Wuyingga, Suriga, Aoruga

(College of Animal Science/Inner Mongolia Mongolian Horse Genetic Resources Protection and Industrial Engineering Laboratory, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract A total of 6 Mongolian horses after 4 months high-load training were taken as study object in order to discover differentially expressed genes and related metabolic pathways. The muscle samples of these horses were respectively collected before and after the training. By using next generation sequencing technology, a miRNA library was established. Target genes were then predicted and enriched through GO analysis, and analyzed by KEGG pathway. The results showed that: 1) Before and after the high load training, 366 and 346 miRNAs were identified respectively. A total of 216 co-expressed miRNAs were identified and 7 620 and 7 535 target genes were predicted. The expression abundances of differentially expressed miRNAs were miR-1, miR-378, miR-21, miR-101 and miR-133a; 2) The GO enrichment results showed that miRNA's target genes were annotated to biology processes including developmental process, anatomical structure development, protein binding, enzyme binding, etc. The KEGG analysis results displayed that the target genes were annotated to 210 pathways including actin cytoskeleton metabolic, calcium signaling pathways, cardiac muscle contraction, etc. This study provided theoretic support for further investigation of the molecular mechanism of Mongolia horse strong stamina and offered new insights for comprehensively understanding Mongolian horse's athletic characteristics.

Keywords Mongolian horse; high load exercise; miRNA; target gene

收稿日期: 2017-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360538, 31472070); 内蒙古自治区科技厅重点实验室建设项目(20130902); 内蒙古自治区高等学校科学研究一般项目(NJZY0701); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2015BS0318)

第一作者: 赵启南, 博士研究生, E-mail: s.pippen.33@163.com

通讯作者: 芒来, 教授, 主要从事马属动物遗传学研究, E-mail: dmanglai@163.com

miRNA是存在于动植物组织中重要的小分子核糖核酸,在基因转录与后转录表达过程中发挥调控作用^[1]。与生俱来的运动资质及稳定的遗传性能使马成为了一种非常适宜进行运动学研究的模式动物。Lee S等^[2]试图使miRNA作为一个初步诊断各种疾病的标志物,利用二代测序技术对3匹纯血马的血浆miRNA进行了表达谱测定,确定了血浆中1 032种miRNA,占miRNA总数的50%。在被识别的miRNA中,272种曾在马和其他动物被报导。Zhou等^[3]将马与已知动物miRNA基因组进行对比,发现407个新miRNA,包括354个成熟的miRNA,根据种子序列特性,将75个miRNA分类到了32个家族中,其结果证明miRNA往往是以簇在某个染色体上的形式出现。

纯血马作为国际现代马业主要赛事用马,以短距离速度快、爆发力强等特点闻名于世。国际赛事规定纯血马平地赛距离通常为1 000~3 200 m,最长不超过8 000 m,赛程过长可能造成参赛马匹骨折、肺出血等无法医治的运动损伤^[4]。在第十届全国运动会速度赛马项目中,12 000 m的超长赛事造成了赛马1死11伤的惨剧。而第十一届全运会参加该项目比赛的16匹纯血马中有7匹中途退赛,1匹赛后死亡,仅有9匹勉强完成赛事。以上事例说明我国国情与马业发展存在矛盾关系,国际赛事马匹品种及规则与我国传统赛马尚有较大差异,全盘照搬西方国家赛马形式在当前我国社会环境下是不现实,也是行不通的。

蒙古马是我国分布最广、数量最多的地方品种^[5],经长期自然与人工选择形成抗寒性好、抗病力强、耐粗饲、骑乘性能优良的特性。传统蒙古族那达慕大会赛马距离通常为30~100 km,经训练,蒙古马能一气呵成,中途不休息完成比赛,且极少罹患严重运动性损伤。我国马业尚处于发展初级阶段,蒙古马数量多,引进及饲养成本低,相比纯血马而言,是更适合且有利于我国赛马行业发展的马种。然而蒙古马运动生理过程是否受到miRNA调控等分子机制的相关研究还未见开展。只有在深入了解我国地方马种优良性能的基础上,结合现代生物学技术优化种群,才能加速我国传统马业向现代马业的转变,摸索出符合我国现今国情的现代马业发展之路,并达到保护地方良种马的目的。

本研究选用6匹遗传背景相似的蒙古马为研究对象,利用二代测序技术,筛选出高负荷训练前后发

生差异表达的miRNA,旨在为蒙古马具备超强耐力性状及其运动学生理代谢提供分子生物学理论基础,为后续选育长距离赛事专用马种工作提供初步依据。

1 材料与方法

试验所用肌肉样品供体为6匹5岁成年雌性健康蒙古马,来自于内蒙古自治区达尔罕茂明安联合旗(110°43'N,41°7'E,平均海拔1 367 m)同一牧户马群,以保证样品具有相似遗传背景,减小种群差异造成的影响。

1.1 试验用马训练

试验用马遵循少量多餐,训练结束后1 h内不喂水草,饱食后2 h内不训练的原则。训练期间每日饲喂5次青干草,白天4次,夜间补饲1次,草量以0.5 h内吃完无剩余为准;每日饲喂1次精料,精料成分为玉米、燕麦与麸皮,按4:4:2加水搅拌后供给,并加入少量葵花籽和食用盐;马厩内长期挂设盐砖与糖砖;自由饮水。

在直径30 m的圆形调教圈中进行训练,为避免高负荷训练对马造成急性运动损伤,将4个月的训练期分为3个阶段,循序渐进加强训练负荷强度。当日训练内容不要求一次性不间断完成,可依据马匹体力与配合情况分段训练。后期训练负荷增大,马匹因倦怠不再奔跑快步配合完成当日的训练内容,则采用牵溜快步的形式完成当日训练计划^[6]。

第一阶段持续15 d,每五天为一周期,起始训练距离为8 km,训练距离以2 km/d递增,即10、12和14 km、休息。下一周期起始距离回到8 km,如此循环。

第二阶段持续92 d,每四天为一周期,起始训练距离为15 km,训练距离以5 km/d递增,即20和25 km、休息。下一周期起始距离回到15 km,如此循环。

第三阶段持续12 d,每六天为一周期,起始训练距离为20 km,训练距离以10 km/d递增,即30、40和50 km、休息2 d。

1.2 样本采集

分别在训练前期和训练后期马匹静止时采集肌肉样品。

训练前空腹状态下,保定后注射局部麻醉剂,从臀中肌采取试验所需肌肉样品,肌肉组织离体后,用蒸馏水反复冲洗,立即投入液氮冷冻,用于提取总

RNA 与后续分析备份。高负荷训练 4 个月后, 静养 3 d 采样, 采集方法同上。并用 TRIzol 法提取肌肉总 RNA。

1.3 miRNA 建库测序及生物信息学分析

分别取训练前后肌肉样品总 RNA 构建 miRNA 文库, 训练前 miRNA 池记作文库 BT (Before training), 训练后 miRNA 池记作文库 AT (After training)。利用 Agilent2100 精确检测文库浓度和质量^[7]。RNA 质量检测合格后在 cBot 上生成 Cluster, 通过 Illumina HiSeq™ 2000 测序平台得到 50 bp 的单端测序 reads^[8], 对这些 raw reads 进行质量处理得到纯净序列, 并将清理后的纯净序列对比到不同数据库中, 包括与基因组比对, 与已知 miRNA 比对, 与 GenBank 比对, 与 Rfam 比对等, 以去除样品中重复序列与干扰片段。统计蒙古马训练前后肌肉样品 miRNA 的 reads 数, 用 TPM 进行归一化处理, 如果 $P < 0.05$, 则可以认定为差异 miRNA, 同时使用 miRanda^[9]、targetscan、Mireap 3

个软件^[10]对差异 miRNA 进行靶基因预测, 并取其交集作为靶基因预测结果^[11]。针对差异表达 miRNA 的靶基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG pathway 分析, 以了解差异表达 miRNA 所参与调控的生物学过程。从测序结果中随机选取 10 个蒙古马在训练前后差异表达的 miRNA, 以 let-7a 作为内参绘制标准曲线, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 定量分析对蒙古马训练前后差异表达 miRNA 的相对表达量进行验证。

2 结果与分析

2.1 miRNA 测序分析结果

2.1.1 miRNA 长度分布、首位点与各位点碱基分布
测序结果显示, 在蒙古马训练前后 2 个 miRNA 文库中分别得到了 25 730 058 条和 19 128 019 条 reads, 对原始序列进行去除低质量 reads, 5' 接头及 3' 接头等处理后, 得到的 clean reads 在两文库中所占的比例分别为 98.26% 和 98.20% (表 1)。

表 1 两品种 miRNA 的测序质量

Table 1 Quality of different varieties of miRNAs sequencing

片段类型 Fragment type	训练前 Before training		训练后 After traing	
	Reads	百分比/% Percent	Reads	百分比/% Percent
总序列标签 Total reads	25 730 058	—	19 128 019	—
高质量标签 High quality	25 409 855	100.00	18 770 378	100.00
3' 接头无效序列 3' Adapter null	135 356	0.53	124 216	0.66
5' 接头污染序列 5' Adapter contaminants	7 406	0.03	5 201	0.03
小于 18 nt 片段 Smaller than 18 nt	135 819	0.53	71 693	0.38
多聚腺苷酸 Poly A	528	0.00	1 221	0.01
纯净序列标签 Clean reads	24 968 198	98.26	18 432 595	98.20

对 miRNA 数据库中纯净序列进行长度统计表明: miRNA 序列长度主要集中在 21~23 nt, 占纯净序列总量 90% 以上, 所得的 miRNA 长度以 22 nt 序列分布最多, 在 2 个 miRNA 文库中占到了 60% 以上; 其次为 21 与 23 nt (图 1)。这一结果符合 Dicer 酶切割产物的长度特点^[12]。

将 miRNA 与 miRBase 19.0 中马的 miRNA 前体进行比对, 统计文库中不同长度 miRNA 首位点碱基分布结果显示: 不同长度 miRNA 首位碱基分布具有很强的偏向性, 几乎全部为 U; 对数据库中各个碱基位点进行鉴定和分布统计结果显示,

miRNA 序列中 U 所占比例也最大, 其次为 A, 而 G 与 C 位于 miRNA 首位的比例相对较少。

2.2 训练前后差异表达 miRNA

变化倍数 ($\log_2 FC$) 是训练前与训练后样品标准化的表达量比之对数值, 将 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 设置为基因差异表达的阈值进行筛选, 在蒙古马高负荷训练前后两个肌肉 miRNA 文库中分别筛选得到 366 和 346 个 miRNA, 共表达 miRNA 248 种, 其中 70 个 miRNA 表达差异显著, 68 个表达差异极显著。表 2 列出了文库中差异显著且表达量较高的前 25 个 miRNA。

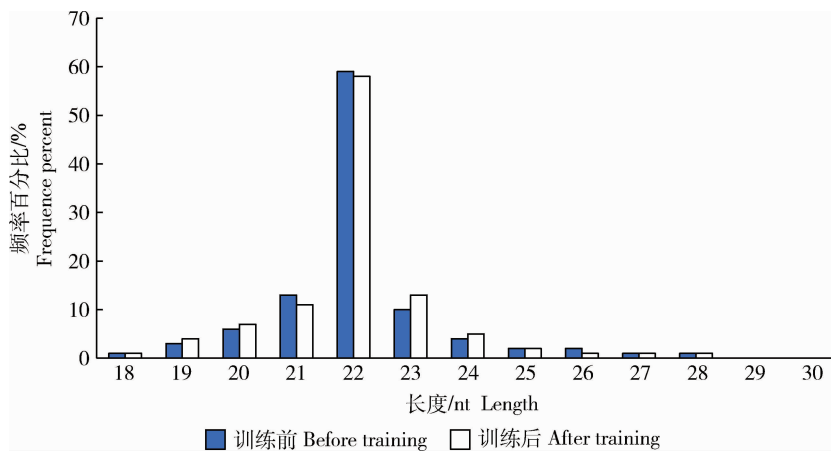


图1 miRNA数据库的纯净序列长度统计

Fig. 1 miRNA clear reads length distribution

表2 文库中表达量较高且差异显著的前25个miRNA

Table 2 Top 25 high expression and differently expressed miRNAs in library

名称 Name	训练前表达量 Before training	训练后表达量 After training	倍性变化 Fold-change (log ₂ AT/BT)	P值 P-value
miR-451	12 095.35	27 383.77	1.18	0
miR-21	18 521.08	6 386.89	-1.54	0
miR-125b-5p	8 939.09	3 931.95	-1.18	0
miR-199a-5p	6 924.37	3 069.07	-1.17	0
miR-199a-3p	5 909.48	2 493.57	-1.24	0
miR-199b-3p	5 908.24	2 493.14	-1.24	0
miR-144	2 298.28	5 164.93	1.17	0
miR-206	2 808.29	1 042.72	-1.43	0
miR-27b	2 303.21	931.72	-1.31	0
miR-499-5p	2 246.54	500.47	-2.17	0
miR-424	1 701.84	570.51	-1.58	0
miR-100	1 451.65	621.18	-1.22	0
let-7c	1 427.30	573.28	-1.32	0
miR-27a	447.21	220.64	-1.02	0
miR-497	434.11	107.58	-2.01	0
miR-127	300.90	145.39	-1.05	9.91E-253
miR-23b	294.78	106.60	-1.47	0
miR-660	243.11	115.99	-1.07	2.55E-210
miR-208b	196.09	67.60	-1.54	6.06E-296
miR-32	39.73	87.99	1.15	5.86E-90
miR-542-3p	68.33	22.41	-1.61	2.33E-111
miR-146b-5p	67.73	18.34	-1.88	6.77E-137
miR-335	53.87	24.47	-1.14	4.71E-53
miR-155	53.43	16.33	-1.71	3.59E-95
miR-338-3p	44.26	21.32	-1.05	5.86E-39

为评估差异表达 miRNA 在蒙古马训练前后两文库中的整体分布,以基因表达水平的 reads 值为基础,利用 DEGseq 软件包对训练前后两文库中的差异表达基因进行分析,同时对差异分析得到的 *P* 值进行多重检验,根据其分析结果作图(图 2)。图 2 中每 1 个点代表 1 个 miRNA, *X* 轴和 *Y* 轴分别代表 miRNA 在 2 个样品的表达量。图中红点代表 miRNA 变化倍数 > 1, miRNA 在训练后显著上调,蓝点代表变化倍数在 -1~1 之间,训练前后差异不显著,绿色代表变化倍数 < -1,训练之后显著下调。

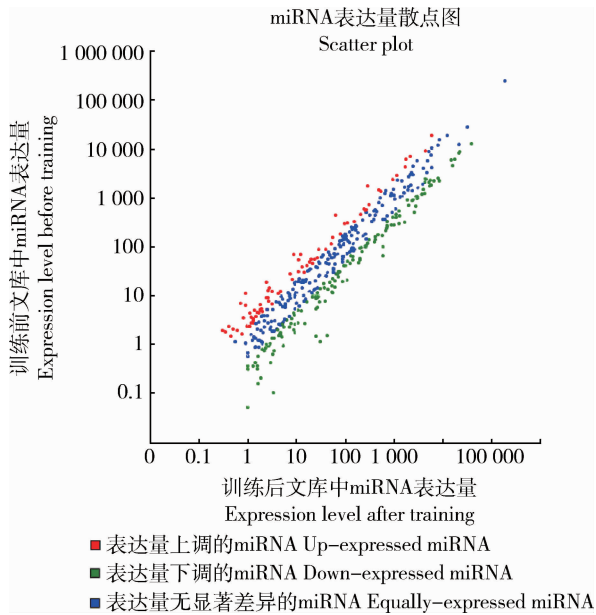


图 2 训练前后差异表达 miRNA 散点图

Fig. 2 Scatter plot of differentially expressed miRNA

在共表达的 248 种 miRNA 中 54 个训练后发生上调,194 个发生下调,表 3 列出了 miR-1, miR-378, miR-21, miR-101 等表达量最高的 10 个 miRNA。

2.3 miRNA 靶基因预测及功能富集分析

2.3.1 miRNA 靶基因预测

在蒙古马高负荷训练前后 2 个文库中分别筛选得到 366 和 346 个 miRNA, 预测到 46 894 和 44 522 个 miRNA 靶基因互作位点, 以及 7 620 和 7 535 个靶基因。选取 10 个差异表达的 miRNA, 以表达量相对恒定的 let-7a 作为内参基因制作标准曲线, 每个 miRNA 做 3 次生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 定量分析对蒙古马训练前后差异表达基因的相对表达量进行验证。实时荧光定量 PCR 检测结果

表明, 所选取的 10 个 miRNA 表达量变化与 miRNA 文库分析结果有相同的变化趋势, 验证了构建 miRNA 文库信息学分析的可靠性。

表 3 文库中表达量最高的前 10 个 miRNA

Table 3 Top 10 miRNAs with highest expression level in the library

名称 Name	训练前表达量 Before training	训练后表达量 After training
miR-1	242 717.56	168 424.96
miR-378	27 720.94	33 603.52
miR-451	12 095.35	27 383.77
miR-101	18 379.50	11 395.25
miR-21	18 521.08	6 386.89
miR-133a	14 895.55	8 493.38
miR-26a	11 723.07	6 986.59
let-7a	10 108.18	6 036.53
miR-125b-5p	8 939.09	3 931.95
miR-29	7 204.16	4 726.03

2.3.2 靶基因 Gene Ontology(GO)富集分析

将差异 miRNA 所调控的靶基因进行 GO 功能富集分析, 结果显示靶基因主要涉及的生物学过程包括: 发育过程、解剖结构的发育、组织发育等。靶基因的表达产物主要分布于胞内组分, 膜细胞器, 细胞器, 细胞膜内细胞器, 细胞内等细胞组分; 表达产物涉及的分子功能包括蛋白质结合, 结合, DNA 结合, 酶结合, 小接合蛋白连接酶活性等。

2.3.3 靶基因 KEGG 富集分析

为鉴定肌肉组织中受高丰度表达 miRNA 调控的代谢通路, 将靶基因注释到 KEGG Pathway 数据库结果显示, 靶基因共被注释到 210 条信号通路上, 显著富集的 pathway 包括: ErbB 信号通路, 内质网加工蛋白, 粘着斑, 泛素介导的蛋白水解作用, T 细胞受体的信号通路, 半乳糖代谢, MAPK 信号通路, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路, 调节肌动蛋白细胞骨架, 钙信号通路等, 推测被注释到这些通路上的靶基因可能直接参与调控与运动或肌肉生长发育相关的生物学代谢过程(表 4)。

表4 靶基因 KEGG 富集分析

Table 4 Target genes KEGG enrichment analysis

KEGG 通路 KEGG Pathway	富集到该通路上的靶 基因数目及所在比例 No. of target genes in each pathway and its proportion	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	通路编号 Pathway ID
ErbB 信号通路 ErbB signaling pathway	18(3.39%)	3.89E-05	ko04012
内质网蛋白加工处理 Protein processing in endoplasmic reticulum	28(5.27%)	4.89E-05	ko04141
轴突导向 Axon guidance	24(4.52%)	0.000 136 577	ko04360
粘着斑 Focal adhesion	34(6.4%)	0.000 181 786	ko04510
泛素介导蛋白水解作用 Ubiquitin mediated proteolysis	23(4.33%)	0.000 557 055	ko04120
T 细胞受体信号通路 T cell receptor signaling pathway	17(3.2%)	0.001 047 232	ko04660
细胞粘附分子 Cell adhesion molecules	24(4.52%)	0.001 688 057	ko04514
半乳糖代谢 Galactose metabolism	8(1.51%)	0.002 697 535	ko00052
MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway	32(6.03%)	0.003 508 052	ko04010
神经胶质瘤 Glioma	11(2.07%)	0.003 586 399	ko05214
肌萎缩性脊髓侧索硬化症 Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	11(2.07%)	0.005 535 192	ko05014
背腹轴形成 Dorso-ventral axis formation	7(1.32%)	0.005 972 75	ko04320
慢性骨髓性白血病 Chronic myeloid leukemia	11(2.07%)	0.010 540 62	ko05220
mTOR 信号通路 mTOR signaling pathway	9(1.69%)	0.010 637 95	ko04150
黑素瘤 Melanoma	10(1.88%)	0.013 803 4	ko05218
麻疹 Measles	16(3.01%)	0.018 621 28	ko05162
破骨细胞分化 Osteoclast differentiation	16(3.01%)	0.018 621 28	ko04380

表 4(续)

KEGG 通路 KEGG Pathway	富集到该通路上的靶 基因数目及所在比例 No. of target genes in each pathway and its proportion	P 值 P-value	通路编号 Pathway ID
B 细胞受体信号通路 B cell receptor signaling pathway	10(1.88%)	0.024 292 94	ko04662
癌症通路 Pathways in cancer	37(6.97%)	0.030 832 29	ko05200
TGF-beta 信号通路 TGF-beta signaling pathway	10(1.88%)	0.032 832 15	ko04350
细菌侵袭上皮细胞 Bacterial invasion of epithelial cells	11(2.07%)	0.032 949 97	ko05100
p53 信号通路 p53 signaling pathway	11(2.07%)	0.032 949 97	ko04115
急性髓系白血病 Acute myeloid leukemia	8(1.51%)	0.047 196 82	ko05221

3 结论与讨论

miRNA 是内源性非编码干扰 RNA 小分子, 被视为真核基因表达的主要调控分子。在发育阶段、细胞分化、信号和细胞凋亡通路上起作用。越来越多的研究表明 miRNA 可能参与了各生物过程。本研究在蒙古马高负荷训练前后 2 个文库中, 分别筛选得到 366 和 346 个 miRNA, 其中共表达 miRNA 248 个, 分别预测到 7 620 和 7 535 个靶基因。其中高丰度表达的 miRNA 有 miR-1、miR-378、miR-21、miR-101、miR-133a 等; miRNA-1 和 miRNA-133 已被诸多研究证实与骨骼肌发育代谢显著相关, 且二者源自相同的 miRNA 顺反子和转录本, 在机体发育阶段的特定组织中共同转录, 但分别调控不同的生物学过程。在非洲爪蟾胚胎体内 miRNA-1 通过靶向定位一种肌肉表达基因的转录抑制因子 HDAC4 (脱乙酰酶组蛋白 4) 促进肌细胞生成, 而 miRNA-133 则通过抑制 SRF (血清反应因子) 来提高成肌细胞增殖^[13]。因此推测本研究中 miRNA-1 与 miRNA-133 高表达可能是持续数周的高负荷训练使肌细胞在转录水平积累产生了适应性代偿, 致使肌细胞再次进入发育、分化的生长周期。重度心力衰竭患者 miRNA-378 表达显著下降, 随着患者心脏功能好转 miRNA-378 表达也显著增加^[14], 此结果与本试验的获得的结果一致, 推测是

由于蒙古马在训练刺激后形成良性适应性心肌增大, 心壁增厚, 心室容积增大, 并伴随毛细血管密度增加, 致使心容量增加, 每搏输出量增加^[15], 心脏储备能力提高。

差异显著的 miRNA 靶基因 GO 功能富集与 KEGG pathway 分析结果显示, 靶基因被显著富集于肌肉结构发育、肌肉组织发育、肌肉收缩、肌肉细胞分化、心血管系统发育、循环系统发育、脉管形态发育等运动代谢相关通路, 同时发现, 不少靶基因还参与调控诸多疾病的免疫应答机制; miRNA-1 和 miRNA-133 等 10 个候选 miRNA 参与调控多发性肌病(PSSM)和复发性劳累型横纹肌溶解症(RER)致病过程^[16]; miRNA-208 可能通过抑制靶基因甲状腺素受体相关蛋白 1 而调控 MHC (主要组织相容性复合体) 的表达。运动训练能促使 MHC 亚型间的转变, 但是结论并不一致^[17]; β -MHC 的表达有发挥抗心肌肥厚、纤维化和心力衰竭的作用^[18]。训练产生的力量增强是肌肉蛋白合成增加的效果所致, mTOR (哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体) 是肌肉蛋白合成过程中的一个关键调节蛋白激酶, 被富集到 mTOR 信号通路上的 9 个靶基因可能在调控细胞周期进程和细胞生长增殖过程中发挥中心枢纽的作用^[19]。长期高负荷训练是一种非常态应激^[20], 训练刺激会使肌纤维出现暂时性疲劳、损伤和物理性能下降, 并伴随着炎症和免疫反应, 当机体得到充

分的修复时间,受损的肌纤维会代偿积累更多的能量储备以迎接下1个训练周期,同时暂时性动员免疫相关代谢生理过程,增强免疫功能活性,提高安静状态下免疫因子数量,这可能也是蒙古马同时具备强耐力和强抗病性的原因。长时间的耐力运动可能在某种程度上抑制赛马的先天免疫系统功能^[21],其具体机制尚不清楚。

本研究应用 RNA-Seq 技术对蒙古马高负荷运动前后进行了 miRNA 比对分析,并对差异表达的 miRNA 靶基因进行生物学功能分析,其结果补充了蒙古马这一强耐力中国特色马种在运动前后 miRNA 水平研究的空白,为进一步揭示蒙古马超强耐力性状及其运动学生理代谢提供分子生物学理论基础,为后续选育长距离赛事专用马种工作提供初步依据。

参考文献 References

- [1] 陈伟. 莱芜猪和大白猪背最长肌 miRNA 与 mRNA 转录组测序及特征分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014
Chen W. Sequencing and characterization of the miRNA and transcriptome of *Longissimus dorsi* muscle between Laiwu and Yorkshire pigs[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014
- [2] Lee S, Hwang S, Yu H J, Oh D, Choi Y J, Kim M C, Rye D Y. Expression of microRNAs in horse plasma and their characteristic nucleotide composition[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146374
- [3] Zhou M, Wang Q, Sun J. In silico detection and characteristics of novel miRNA genes in the *Equus caballus* genome using an integrated *ab initio* and comparative genomic approach[J]. *Genomics. Volume*, 2009, 8(29): 125-131
- [4] 吴克亮, 吴常信. 马科学研究动态和马业发展[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 412-416
Wu K L, Wu C X. Horse scientific research dynamic and horse industry development [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(4): 412-416 (in Chinese)
- [5] 芒来. 蒙古马的历史与展望[J]. 马业杂志, 2002, 4(1): 14-17
Mang L. History and outlook of the Mongolian horse[J]. *Journal of Horse Industry*, 2002, 4: 14-17 (in Chinese)
- [6] Mosher D S, Quignon P, Bustamante D. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs[J]. *PLoS Genetic*, 2007, 3(6): 79-82
- [7] Mardis E R. Next-generation DNA sequencing methods[J]. *Human Genomics*, 2008, 9(11): 387-402
- [8] Huang W, Khatib H. Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 711
- [9] Gorodkin J, Hofacker I L. From structure prediction to genomic screens for novel non-coding RNAs [J]. *PLoS Computational Biology*, 2011, 7(8): 100-102
- [10] Gorodkin J, Hofacker I L, Torarinsson E, Yao Z, Havgaard J H, Ruzzo W L. *De-novo* prediction of structured RNAs from genomic sequences[J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(1): 9-19
- [11] Wang X, Bolund L. Porcine transcriptome analysis based on 97 non-normalized cDNA libraries and assembly of 1 021 891 expressed sequence tags[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2007, 8(4): R45
- [12] Derace J P, Barker M S. *De novo* characterization of the gametophyte transcriptome in bracken fern *Pteridium aquilinum*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 99
- [13] Jian F C, Elizabeth M, Mandel D. The role of miRNA-1 and miRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. *Nature Genetics*, 2005, 15(3): 228-233
- [14] Ooi J Y, Bernardo B C, Mumullen J R. The therapeutic potential of miRNAs regulated in setting of physiological cardiac hypertrophy[J]. *Future Medicinal Chemistry*, 2014, 8(6): 205-222
- [15] Manickam R, Ramona N. Mammary gland differentiation inversely correlates with GDF-8 expression [J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2008, 5(5): 1783-1788
- [16] Barry E, Bonnamy B. Muscular miRNA expressions in healthy and myopathic horses suffering from polysaccharide storage myopathy or recurrent exertional rhabdomyolysis[J]. *Equine Veterinary*, 2010, 42(38): 303-310
- [17] 孟祥阁. 抗阻、耐力及混合运动对 C57 小鼠股四头肌 MHC 各亚型基因表达的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2010
Meng X G. Exercise training on the gene expression of myosin heavy chain (MHC) isoforms in mice quadriceps muscle[D]. Shanghai: East China Normal University, 2010 (in Chinese)
- [18] 周骥. 核 CaM I /CaMK II -CaMK IV 信号通路在大鼠肥厚心肌中的意义及对 β -MHC 与 c-fos 基因转录调控作用的研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2006
Zhou Q. Investigation of β -MHC and c-fos gene transcription regulated by nuclear CaM I /CaMKII-CaMKIV signaling pathway in pressure overload rat hearts[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2006 (in Chinese)
- [19] 肖俐佳. mTOR 在 TGF- β_2 诱导的人晶状体上皮细胞间叶转化过程中的作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
Xiao L J. mTOR in TGF-p2 induced EMT in HLECs [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2012 (in Chinese)
- [20] Bryant N J, Govers R, David E, James L. Regulated transported transport of the glucose transporter GLUT4[J]. *Molecular Cell Biology*, 2002, 3(2): 267-277
- [21] Robson P J, Alston T D, Myburgh G H. Prolonged suppression of the innate immune system in the horse following an 80 km endurance race[J]. *Equine Veterinary Journal*, 2003, 5(3): 133-137