

MiR-143 在羊卵巢组织中的表达及功能分析

张晓东, 凌英会, 李运生, 张运海, 张子军, 丁建平*, 章孝荣*

(安徽地方畜禽遗传资源保护和生物育种省级实验室, 安徽省羊繁育工程技术研究中心, 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 旨在分析 miR-143 在妊娠与非妊娠羊卵巢组织中的表达情况, 并探讨其在羊卵巢功能发挥以及其他生物学过程中所起的作用。采用 Solexa 测序及荧光定量 PCR 技术在妊娠和非妊娠羊卵巢组织中检测 miR-143 的表达水平, 并对其进行靶基因预测和 GO 富集分析。Solexa 测序在羊卵巢中检测到 miR-143 的表达, 共发现 miR-143 及其异构体 1 074 个, 总拷贝数为 109 523, 平均拷贝数为 102; 定量结果显示 miR-143 在妊娠羊卵巢中的表达量是非妊娠山羊的 12 倍且差异显著 ($P < 0.05$); GO 分析表明 miR-143 广泛参与机体生殖发育、细胞增殖分化等多个生物学过程。miR-143 在妊娠羊卵巢中的表达水平显著高于非妊娠山羊, 而且其可能在卵巢激素分泌与作用应答、妊娠维持等生殖生物学过程中发挥潜在作用。

关键词: miR-143; Solexa 测序; 定量 PCR; GO 分析; 羊卵巢

中图分类号: S827.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)03-0411-07

Expression and biological function of MiR-143 in goat ovaries

ZHANG Xiao-dong, LING Ying-hui, LI Yun-sheng, ZHANG Yun-hai,
ZHANG Zi-jun, DING Jian-ping, ZHANG Xiao-rong

(Anhui Provincial Laboratory for Local Livestock & Poultry Genetic Resource Conservation and Bio-Breeding, Anhui Provincial Engineering Research Centre of Reproduction and Breeding in Sheep, School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: With the purpose of determining biological role of miR-143 in goat ovaries and many other biological processes, the differential expression of miR-143 between pregnant and non-pregnant goat ovaries was studied by Illumina Solexa sequencing and q-PCR technology, followed by target gene prediction and GO analysis. Solexa sequencing indicated that a total of 1 074 miR-143 isomiRs were identified in goat ovaries with 109 523 total read counts, and average expression level was 102. Q-PCR analysis showed that expression level of miR-143 in pregnant goat ovaries was 12 times more than that in non-pregnant goat ovaries, and the difference was significant ($P < 0.05$). The GO analysis showed that miR-143 played important roles in animal reproduction, cell proliferation and differentiation. MiR-143 may play potential roles in animal reproductive biological processes such as ovarian hormone secretion and pregnancy maintenance.

Key words: miR-143; Solexa sequencing; q-PCR; GO analysis; goat ovary

MicroRNA(miRNA)为一类长约 21~24 nt 的非编码小 RNA, 其通过对靶基因的转录后调控广泛参与真核生物的生殖、发育、病毒防御、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等多种生命活动^[1-4]。MiR-143 为一种广泛性表达的 miRNA, 可在不同物种的许多组织

器官以及特定细胞中检测到它的表达。研究表明其在细胞分化、增值、凋亡以及某些肿瘤发生过程中发挥重要作用^[2, 5-7], 然而对于山羊组织、细胞中 miR-143 表达水平及功能的研究鲜有报道。

妊娠是一个复杂的生殖过程, 需要机体各方面

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA100307-4), 安徽省技术创新工程试点省专项(11Z0101095)和安徽省科技计划项目(11010302108)共同资助。。

作者简介: 张晓东, 男, 博士研究生。E-mail: xdzhang1983@163.com

* 通信作者: 章孝荣, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: zxr@ahau.edu.cn 丁建平, 男, 副教授。E-mail: hfbdmj@163.com

的协同配合, 卵巢在妊娠过程中发挥及其重要的作用, 而且妊娠前后卵巢活动及内分泌特征存在较大差异^[8-10]。配种妊娠前, 卵巢能正常排卵且主要分泌雌激素, 妊娠后伴随着黄体的形成卵巢将不再排卵, 且孕酮的分泌逐渐增加以维持妊娠。基于这方面的差异以及 miRNA 与卵巢功能的密切关系考虑, 作者采用 Solexa 测序及荧光定量 PCR 技术在妊娠和非妊娠山羊卵巢组织中检测 miR-143 的表达水平, 并对其靶基因预测和 GO 富集分析, 探讨 miR-143 在妊娠和非妊娠山羊卵巢中的表达差异及其可能参与的机体生物学过程。

1 材料与方法

1.1 试验材料

24 月龄健康安徽白山羊 2 只, 屠宰取双侧卵巢, -80°C 保存, 用作 Illumina Solexa 测序的原始样本; 24 月龄空怀安徽白山羊 3 只, 24 月龄妊娠安徽白山羊 3 只, 屠宰取卵巢, -80°C 保存, 用作定量 PCR 的原始样本。

1.2 总 RNA 提取

使用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen) 提取卵巢总 RNA, 操作严格按照说明书进行; 利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 系统 (Santa Clara) 检测总 RNA 质量, 所有样品 -80°C 保存备用。

1.3 Illumina Solexa 测序及数据分析

将上述 2 只 24 月龄安徽白山羊的卵巢的 4 份总 RNA 各取 10 μg , 混合成总量为 40 μg 的 RNA 混合池作为制备小 RNA 测序文库的原始材料, 然后送深圳华大基因科技有限公司进行 Solexa 测序。

由于 miRBase 18.0 数据库中尚未收录山羊的 miRNA 信息, 所以我们将测序获得的序列去接头、污染后与其他哺乳动物已知的 miRNA 或 pre-miRNA 序列进行比对(比对过程允许 1~2 个碱基错配), 鉴定物种间保守的 miRNA。

1.4 定量 PCR

1.4.1 引物设计与合成 根据测序获得的山羊 miR-143 成熟序列设计特异性引物 (5'-3'): TGAGATGAAGCACTGTAGCTCT, 根据内参基因 U6 snRNA 序列设计特异性引物 (5'-3'): CAAGGATGACACGCAAATTCG。引物用 Primer 5.0 设计, 并由上海英俊生物公司合成, 通用引物为 Qiagen 试剂盒自带。

1.4.2 cDNA 合成及定量 PCR 将上述 6 只山羊 (空怀和妊娠各 3 只) 卵巢的 12 份总 RNA 进行反转录 cDNA 合成, 20 μL 反应体系包含: 总 RNA 样本 (0.5

$\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1 μg , 5 \times miScript RT Buffer 4 μL , miScript Reverse Transcriptase Mix 1 μL , RNase 水补至 20 μL ; 反应条件为 37°C 60 min, 95°C 5 min 终止反应; 反转录产物加入 80 μL RNase 水稀释至 100 μL , -20°C 储存备用。

以上述反转录产物 (RT 产物) 为模板进行定量 PCR 反应。20 μL 反应体系包含: RT 产物 1 μL , 通用引物和 miR-143 特异性引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , 2 \times SuperReal PreMix (SYBR Green) 10 μL , RNase 水 8.2 μL 。反应条件为: 95°C 15 min; 95°C 10 s, 60°C 30 s, 40 个循环。同时记录 PCR 产物扩增曲线和溶解曲线, 检验产物扩增效率和特异性。Ct 值通过 SDS 2.0 软件 (Applied Biosystems) 获得, 根据公式 $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{Ct}_{\text{miR-143}} - \text{Ct}_{\text{U6}})}$ 计算相对表达量值, 其中 ΔCt 为目的基因 Ct 值与内参基因 U6 snRNA Ct 值之差。采用 SPSS 10.0 软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 定义为差异显著。反应体系置于 Roche LC 480 II Real-Time PCR 检测系统 (Roche) 进行, 每个样品设 3 个技术重复。

1.5 miR-143 的靶基因及其功能预测

为了更好地理解 miR-143 在山羊卵巢及生殖发育过程中所发挥的作用, 采用 PicTar^[11] 和 TargetScan^[12] 2 种算法预测山羊 miR-143 潜在调控的靶基因。由于目前还没有完整的山羊基因组信息, 加之 miRNA 在物种间高度保守, 所以以人的基因组为背景进行 miR-143 靶基因的预测, 然后对 2 种算法的预测结果取交集, 并对交集基因进行 Gene Ontology^[13] 富集分析。

2 结果与分析

2.1 miR-143 Solexa 测序结果

miR-143 Solexa 测序结果见图 1。相对于 miRBase 数据库, miR-143 测序获得的序列呈现很多异构体 (isomiRs), 表现在序列 5' 和 (或) 3' 端不同程度的变异。本次测序共获得符合比对规则的 miR-143 异构体 1 074 个, 总拷贝数为 109 523, 平均拷贝数为 102, 图 1 列出拷贝数 ≥ 102 的 13 个异构体序列与人、小鼠、大鼠、狗、牛、马、猪等 7 个物种的 miR-143 前体序列的比对结果。可见, miR-143 成熟序列在 8 个物种间高度保守, 部分异构体存在 3' 端 1~2 个碱基的变异; 拷贝数最高 (35 765) 的异构体序列为: 5'-UGAGAUGAAGCACU GUAGCUC-3', 其与人、小鼠、狗、马、猪的 miR-143 的成熟序列完全一致; 另外, 拷贝数分别为 10 966、5 843、1 256 的异构体序列均存在 3' 端 1~2 个碱基

```

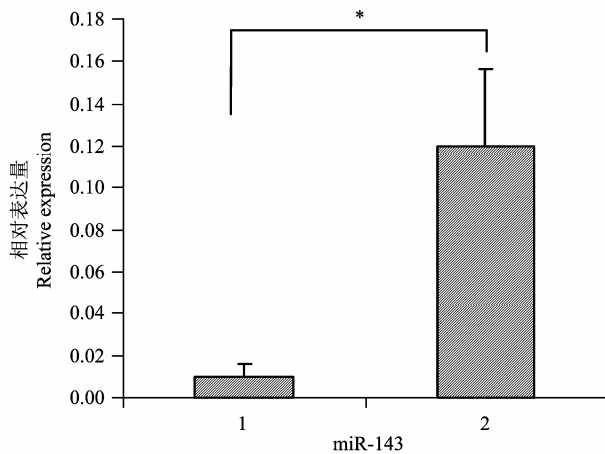
Human  GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGGAAGAGAGAAGUUGUUCUGCAGC
Mouse  GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGG-----
Rat    GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGGAAGGAGAAGAUUUCUGCAGC
Dog    GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUC-----
Cattle GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCGGGAAGGAGAAGUUGUUCUGCAGC
Horse  GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGG-----
Pig    GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGCUGGGAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCGGGAAGGGAGA-----
35765  -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC-----
10966  -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCU-----
698    -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA-----
677    -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCG-----
5843   -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA-----
1256   -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCAA-----
815    -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCAU-----
674    -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCU-----
629    -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCAA-----
224    -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCAU-----
140    -----UGAGAUGAAGCACUUUAGCUC-----
119    -----UGAGAUGAAGCAUUGUAGCUC-----
102    -----UGAGAUGAAGCACUGUAGCUU-----
*****
miR-143
    
```

前 5 行分别是人、小鼠、大鼠、狗、牛、马、猪 7 种生物的 miR-143 前体序列(部分); 后 13 行是测序获得的 miR-143 的异构体, 粗体加下划线的碱基是变异碱基, 左边标注的是测序拷贝数

The first 5 rows are the pre-miR-143 sequences of human, mouse, rat, dog, bovine, horse and pig, respectively. The last 13 rows are the isomiRs of miR-143. The bold underlined bases are variation, and the left number are reading counts

图 1 miR-143 高通量测序序列比对

Figure 1 miR-143 Solexa sequences alignment



1. 非妊娠山羊卵巢; 2. 妊娠山羊卵巢

1. Non-pregnant goat ovaries; 2. Pregnant goat ovaries

图 2 miR-143 在妊娠和非妊娠山羊卵巢组织的表达

Figure 2 Expression of miR-143 in pregnant and non-pregnant goat ovaries

的变异, 这种现象说明在山羊卵巢组织中, miR-143 及其部分异构体均有较高表达, 而且可能同时在卵巢功能发挥中起到重要的调控作用。

2.2 miR-143 在妊娠和非妊娠山羊卵巢中的表达

miR-143 在山羊卵巢组织中的表达结果见图 2。可见, miR-143 在妊娠和非妊娠山羊的卵巢组织中

均有表达, 在妊娠山羊卵巢组织的表达水平是非妊娠山羊的 12 倍且差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

2.3 miR-143 的靶基因及其功能预测

TargetsCan 和 Pictar 算法分别预测出 miR-143 潜在调控的靶基因 279 和 216 个, 二者的交集基因 53 个, 具体信息见表 1。为了探寻 miR-143 的功能, 对这 53 个基因进行 Gene Ontology 富集分析。

GO 分析结果显示, miR-143 靶基因显著富集的 GO term 主要包括: 骨骼生长发育、激素(类固醇、雌激素、皮质等)作用应答、呼吸道(肺)发育、生殖调控等生物学过程, 而且这些过程均与卵巢功能、妊娠发生及维持、胎儿发育等生殖活动密切相关(见表 2)。

3 讨论

3.1 miR-143 组织表达差异

miR-143 为一广泛性表达的 miRNA, 可在人、小鼠、牛、鸡等不同物种的许多组织器官以及特定细胞中检测到它的表达^[14-17]。Lagos-Quintana 等 2002 年在小鼠的心、肝、脾等组织中发现了 34 个组织特异性 miRNA, 其中 miR-143 在脾中高度表达, 约占检测到的所有 miRNA 总丰度的 30%, 故认为 miR-143 为小鼠脾脏特异表达 miRNA, 可能在

脾脏组织分化过程中起重要作用^[18]。Trakooljul 等检测了鸡胚和雏鸡 miR-143 及其潜在靶基因的差异表达,发现 14 d 雏鸡脾脏中 miR-143 水平显著升高;另外,在 miR-143 反义抑制物转染的鸡脾脏细胞中,共有 124 个基因出现差异表达,其中包括某些受 miR-143 调控的、与细胞增值、凋亡以及癌变有关的基因^[17]。Huang 等 2011 年对荷斯坦奶牛的卵巢和睾丸组织进行小 RNA 测序,发现 miR-143 在卵巢和睾丸中均高表达,而且其潜在调控的 10 个靶基因可能参与与生殖内分泌密切相关的 GnRH 细胞信号

通路^[16]。目前有关 miR-143 在山羊卵巢中的研究鲜有报道。本试验高通量测序发现 miR-143 在山羊卵巢组织中高度表达(总拷贝数为 109 523),而且成熟序列在人和其他几种哺乳动物中高度保守。定量分析发现,miR-143 在妊娠山羊的卵巢中的表达量显著高于空怀山羊,说明其可能在哺乳动物性腺内分泌以及妊娠维持等生殖活动中发挥一定的作用。以上研究结果提示,miR-143 在不同物种间的表达存在较大差异,可能在不同物种中发挥不同的调控作用。

表 1 两种算法预测的 miR-143 靶基因的交集基因信息

Table 1 Target genes of miR-143 predicted by both Targetscan and PicTar algorithms

靶基因 Target gene	序列登录号 Representative transcript ID	基因名称 Gene name	Targetscan 得分 Aggregate PCT	PicTar 得分 PicTar score
PGK1	NM_000291	磷酸甘油酸酯激酶 1 Phosphoglycerate kinase 1	0.26	2.68
IGFBP5	NM_000599	胰岛素样生长因子结合蛋白 5 Insulin-like growth factor binding protein 5	0.79	2.27
BCL2	NM_000633	B 细胞淋巴瘤 2 B-cell CLL/lymphoma 2	0.29	3.86
CACNA1E	NM_000721	电压依从性钙通道, R 型, α 亚基 Calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit	0.26	1.61
FGF1	NM_000800	成纤维细胞生长因子 1 Fibroblast growth factor 1 (acidic)	0.39	2.19
HTR2C	NM_000868	5 羟色胺受体 2C 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C	0.24	1.63
PC	NM_000920	丙酮酸羧化酶 Pyruvate carboxylase	0.36	3.60
PTGS2	NM_000963	前列腺素内过氧化物合酶 2 Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	0.26	2.18
CTGF	NM_001901	结缔组织生长因子 Connective tissue growth factor	0.26	2.88
MARCKS	NM_002356	十四烷基丙氨酸富集蛋白激酶 2 底物 Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	0.26	2.46
TNP1	NM_003284	过度蛋白 1 (组蛋白转换成精蛋白过程) Transition protein 1 (during histone to protamine replacement)	0.26	4.46
DGKB	NM_004080	二酰甘油激酶 Diacylglycerol kinase, beta 90 kDa	0.26	2.19
AKAP6	NM_004274	激酶(PRKA)锚定蛋白 6 A kinase (PRKA) anchor protein 6	0.76	2.48
MLLT3	NM_004529	骨髓/淋巴或混合型白血病 3 Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	0.11	2.00
KRAS	NM_004985	大鼠肉瘤癌基因同源物 v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	0.82	5.10
GFPT2	NM_005110	谷氨酰胺-果糖-6-磷酸转氨酶 2 Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2	< 0.10	2.24
PRKCE	NM_005400	蛋白激酶 C, ϵ protein kinase C, epsilon	0.79	1.43
ST8SIA4	NM_005668	ST8 α -N-乙酰基-神经氨酸- α -2, 8-唾液酸转移酶 4 ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4	0.79	2.72
LASP1	NM_006148	LIM 和 SH3 蛋白 1 LIM and SH3 protein 1	0.36	2.35
PDGFRA	NM_006206	血小板衍生的生长因子受体 α Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	0.26	3.68
UBE2E3	NM_006357	泛素结合酶 E2E 3 Ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3	0.11	3.41
SLC16A2	NM_006517	溶质载体家族 16, 成员 2 (monocarboxylic acid transporter 8)	0.73	6.47
LMO4	NM_006769	LIM 结构域 4 LIM domain only 4	0.71	3.04
TARDBP	NM_007375	TAR DNA 结合蛋白 TAR DNA binding protein	0.44	3.06
TRPS1	NM_014112	毛发-鼻-指(趾)综合征 I Trichorhinophalangeal syndrome I	0.47	4.56

续表 1 Continued table 1

HSPB7	NM_014424	热休克 27 kDa 蛋白家族成员 7 Heat shock 27 kDa protein family, member 7 (cardiovascular)	0.26	2.28
PSME4	NM_014614	蛋白酶激活剂亚基 4 Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	< 0.1	2.53
SCAF8	NM_014892	SR-related CTD 结合因子 8 SR-related CTD-associated factor 8	0.11	3.36
NECAP1	NM_015509	NECAP 细胞吞噬联合 1 NECAP endocytosis associated 1 富含亮氨酸的蛋白多糖同源物	0.54	3.32
TSKU	NM_015516	Tsukushi small leucine rich proteoglycan homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	0.26	3.36
COL5A3	NM_015719	V 型胶原蛋白 α 3 Collagen, type V, alpha 3	0.26	2.59
MEX3C	NM_016626	mex-3 同源物 C Mex-3 homolog C (<i>C. elegans</i>)	0.11	2.76
SIDT1	NM_017699	SID1 跨膜家族成员 1 SID1 transmembrane family, member 1	< 0.1	3.35
C20orf11	NM_017896	20 号染色体开放阅读框 11 Chromosome 20 open reading frame 11	0.49	3.39
SOBP	NM_018013	Sine oculis 结合蛋白同源物 Sine oculis binding protein homolog (<i>Drosophila</i>)	0.24	4.23
ATG2B	NM_018036	ATG2 自噬相关的同源物 B ATG2 autophagy related 2 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	0.27	3.15
SLC38A2	NM_018976	溶质载体家族 38 成员 2 Solute carrier family 38, member 2	0.42	1.64
ARL15	NM_019087	ADP 核糖基化样因子 15 ADP-ribosylation factor-like 15	0.11	1.86
DTNB	NM_021907	β 小肌营养蛋白 Dystrobrevin, beta	0.11	4.69
EGLN1	NM_022051	Egl 9 同源物 1 Egl nine homolog 1 (<i>C. elegans</i>)	0.11	2.72
RMND5A	NM_022780	细胞核减数分裂同源物 5 Required for meiotic nuclear division 5 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	0.11	2.24
RSRC2	NM_023012	精氨酸/丝氨酸丰富卷曲螺旋 2 Arginine/serine-rich coiled-coil 2	0.11	3.15
GRHL2	NM_024915	Grainyhead 样 2 (果蝇属) Grainyhead-like 2 (<i>Drosophila</i>)	0.56	4.17
NDFIP1	NM_030571	NEDD4 家族相互作用蛋白 1 Nedd4 family interacting protein 1	0.26	2.43
FAM117A	NM_030802	117 序列类似家族成员 A Family with sequence similarity 117, member A	0.11	2.38
NUAK2	NM_030952	NUAK 家族, SNF1 样激酶 2 NUAK family, SNF1-like kinase, 2	0.78	3.84
GABARAPL1	NM_031412	γ -氨基酪氨酸受体相关蛋白 1 GABA(A) receptor-associated protein like 1	0.11	2.57
SSH2	NM_033389	Slingshot 同源物 2 (果蝇属) Slingshot homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	0.24	6.92
SCAMP4	NM_079834	分泌物载体膜蛋白 4 Secretory carrier membrane protein 4	0.11	3.21
MBOAT2	NM_138799	膜结合的 O-酰基转移酶结构域 2 Membrane bound O-acyltransferase domain containing 2	0.26	2.32
PUS10	NM_144709	假尿苷酸合酶 10 Pseudouridylylate synthase 10	0.26	3.35
3-Mar	NM_178450	膜相关环指(C3HC4) 3 Membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	0.15	2.80
ENSA	NM_207043	α 内磺肽 Endosulfine alpha	0.11	1.86

3.2 miR-143 的靶基因及其功能

妊娠是机体复杂的生殖活动, 受到机体内分泌及各方面因素的共同调控。非妊娠阶段卵巢正常排卵且主要分泌雌激素, 配种妊娠后, 伴随着黄体的形成卵巢将不再排卵, 且孕酮的分泌逐渐增加以维持妊娠。研究表明大量基因和 miRNA 在动物妊娠前后的表达水平存在较大差异^[19-24]。本研究检测到 miR-143 在妊娠山羊卵巢中的表达量是非妊娠山羊卵巢表达量的 12 倍, 说明其可能在妊娠相关的机体内分泌及基因表达调控过程中发挥作用, 这与我

们对 miR-143 的靶基因预测和 GO 富集分析结果高度一致。本试验中, miR-143 的靶基因在类固醇激素、雌激素、糖皮质激素作用应答、外胚层发育等生殖过程相关的 GO term 中显著富集。此外, 有研究表明 miR-143 在细胞增值、分化、凋亡以及癌变过程中起重要作用。Esau 等 2004 年发现 miR-143 通过靶向作用于细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK5) 基因, 实现对脂肪细胞分化的调控^[2]; 同样, Wang 等 2011 年在猪脂肪细胞中的研究也表明 miR-143 具有促进脂肪形

成的作用^[5]。本试验 GO 分析显示 miR-143 的靶基因亦在细胞增值调控、肌动蛋白细胞骨架形成、平

滑肌细胞迁移调控以及上皮组织发育等生物学过程中显著富集。

表 2 靶基因显著富集的 GO 条目

Table 2 The enriched GO terms of target genes

GO 条目 GO term	计数 Count	P 值 P value
骨骼系统发育 Skeletal system development	6	0.002 36
管道发育 Tube development	5	0.003 93
成骨作用 Ossification	4	0.004 70
骨骼发育 Bone development	4	0.005 67
运动负调节 Negative regulation of locomotion	3	0.013 98
上皮组织发育 Epidermis development	4	0.016 91
运动调节 Regulation of locomotion	4	0.018 92
类固醇激素作用应答 Response to steroid hormone stimulus	4	0.018 92
营养水平应答 Response to nutrient levels	4	0.020 24
外胚层发育 Ectoderm development	4	0.020 78
糖皮质激素作用应答 Response to glucocorticoid stimulus	3	0.022 22
细胞因子作用应答 Response to cytokine stimulus	3	0.022 76
皮质类固醇作用应答 Response to corticosteroid stimulus	3	0.026 08
细胞增值调控 Regulation of cell proliferation	7	0.026 89
细胞外刺激应答 Response to extracellular stimulus	4	0.026 96
生长发育 Developmental growth	3	0.027 23
细胞母体粘附 Cell-matrix adhesion	3	0.028 40
肌动蛋白组织细胞骨架形成 Actin cytoskeleton organization	4	0.028 88
RNA 转录酶 2 启动子 Transcription from RNA polymerase II promoter	4	0.031 56
耳朵发育 Ear development	3	0.032 02
细胞增值正调控 Positive regulation of cell proliferation	5	0.033 19
细胞底物粘附 Cell-substrate adhesion	3	0.033 90
肌动蛋白丝体结构形成过程 Actin filament-based process	4	0.034 01
肺发育 Lung development	3	0.034 53
钙离子转运负调控 Negative regulation of calcium ion transport	2	0.034 92
平滑肌细胞迁移调控 Regulation of smooth muscle cell migration	2	0.034 92
呼吸道发育 Respiratory tube development	3	0.036 47
雌激素作用应答 Response to estrogen stimulus	3	0.038 44
细胞骨架组织 Cytoskeleton organization	5	0.039 02
呼吸系统发育 Respiratory system development	3	0.040 46
生殖发育过程 Reproductive developmental process	4	0.041 94
行为 Behavior	5	0.048 81
尼古丁应答 Response to nicotine	2	0.049 12
机体循环物质应答 Response to organic cyclic substance	3	0.049 64
肝素粘附 Heparin binding	3	0.039 99
生长因子粘附 Growth factor binding	3	0.041 41

本试验检测了 miR-143 在妊娠和非妊娠山羊卵巢组织的表达情况，并对其进行了靶基因预测和功能分析，结果表明 miR-143 可能在山羊卵巢功能及妊娠过程中发挥重要作用。下一步将针对不同生理阶段山羊的卵巢及其他组织、细胞，广泛研究山羊 miR-143 的组织表达情况，深入解析其调控卵巢内

分泌以及卵泡发育的分子机理，为提高山羊繁殖力和实现山羊分子辅助育种提供更有力的依据。

参考文献:

- [1] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. Nature, 2004, 431(7006): 350-355.
- [2] Esau C, Kang X L, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regu-

- lates adipocyte differentiation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(50): 52361-52365.
- [3] Inoue K. MicroRNA function in animal development[J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 2007, 52(3): 197-204.
- [4] Baley J, Li J. MicroRNAs and ovarian function[J]. *J Ovarian Res*, 2012, 5: 8.
- [5] Wang T, Li M, Guan J, et al. MicroRNAs miR-27a and miR-143 regulate porcine adipocyte lipid metabolism[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(11): 7950-7959.
- [6] Yi C, Xie W D, Li F, et al. MiR-143 enhances adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through targeting the coding region of mouse pleiotrophin[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(20): 3303-3309.
- [7] Takanabe R, Ono K, Abe Y, et al. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 376(4): 728-732.
- [8] Judd H L, Judd G E, Lucas W E, et al. Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1974, 39(6): 1020-1204.
- [9] Richards J S. Hormonal control of gene expression in the ovary[J]. *Endocr Rev*, 1994, 15(6): 725-751.
- [10] Stephens S M, Moley K H. Follicular origins of modern reproductive endocrinology[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(6): E1235-1236.
- [11] Krek A, Grun D, Poy M N, et al. Combinatorial microRNA target predictions[J]. *Nat Genet*, 2005, 37(5): 495-500.
- [12] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoads M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. *Cell*, 2003, 115(7): 787-798.
- [13] Harris M A, Deega J I, Lomax J, et al. The gene ontology project in 2008[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(S1): D440-D444.
- [14] Villadsen S B, Bramsen J B, Ostensfeld M S, et al. The miR-143/-145 cluster regulates plasminogen activator inhibitor-1 in bladder cancer[J]. *Brit J Cancer*, 2012, 106(2): 366-374.
- [15] Takaoka Y, Shimizu Y, Hasegawa H, et al. Forced expression of miR-143 represses ERK5/c-Myc and p68/p72 signaling in concert with miR-145 in gut tumors of Apc(Min) mice[J]. *Plos One*, 2012, 7(8): e42137
- [16] Huang J, Ju Z, Li Q, et al. Solexa sequencing of novel and differentially expressed microRNAs in testicular and ovarian tissues in Holstein cattle[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1016-1026.
- [17] Trakooljul N, Hicks J A, Liu H C. Identification of target genes and pathways associated with chicken microRNA miR-143[J]. *Anim Genet*, 2010, 41(4): 357-364.
- [18] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 735-739.
- [19] Li M, Xia Y, Gu Y, et al. MicroRNAome of porcine pre- and postnatal development[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11541.
- [20] Miles J R, McDaniel T G, Wiedmann R T, et al. MicroRNA expression profile in bovine cumulus-oocyte complexes: possible role of let-7 and miR-106a in the development of bovine oocytes[J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 130(1/2): 16-26.
- [21] Devi J, Sarma S, Goswami J, et al. Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of serum and milk protein in pregnant and non-pregnant goat[J]. *Indian Vet J*, 2003, 80(2): 122-125.
- [22] Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, et al. Role of anti-oncomirs miR-143 and-145 in human colorectal tumors[J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(6): 398-408.
- [23] Xu B, Niu X B, Zhang X X, et al. Mir-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of kras[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 350(1/2): 207-213.
- [24] Deftereos G, Corrie S R, Feng Q H, et al. Expression of Mir-21 and Mir-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer[J]. *Plos One*, 2011, 6(12): e28423.