

# 长链非编码RNA基因 *NRON* 与肉鸡生长性状关联分析

杜志强<sup>1,2,3</sup>, 董翔宇<sup>1,2,3</sup>, 汪礼建<sup>1,2,3</sup>, 高卓然<sup>1,2,3</sup>, 李辉<sup>1,2,3</sup>

(1. 农业部鸡遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省高校动物遗传育种与繁殖重点实验室, 哈尔滨 150030;  
3. 东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 近年发现长链非编码RNA参与调控多种生理活动及疾病发生。长链非编码RNA基因 *NRON* 可抑制活化T细胞核因子(*NFAT*), 且与心肌发育、免疫反应等密切相关。文章检测东北农业大学肉鸡腹脂双向选择系和爱拔益加(AA)肉鸡群体中 *NRON* 基因单核苷多态性位点, 并作关联分析。结果表明, 两个群体中 *NRON* 与心脏重均极显著相关( $P<0.01$ ); *NRON* 与 AA 肉鸡 3 周龄和 5 周龄体重显著相关, 与高、低脂系肉鸡肌胃重、腺胃重、骨盆宽、胸角度和胸宽性状也显著相关( $P<0.05$ )。 *NRON* 基因表达水平在高、低脂系肉鸡心脏、胸肌、肌胃和腹部脂肪组织中均差异极显著( $P<0.01$ )。 *NRON* 和 *NFAT* 在腹部脂肪组织中表达水平随周龄增加而显著升高。研究结果为进一步探讨 *NRON* 基因影响肉鸡肌肉和脂肪组织生长发育分子机制奠定基础。

**关键词:** 肉鸡; *NRON*; *NFAT*; 心脏; 肌肉; 脂肪

中图分类号: S831.2

文献标志码: A

文章编号: 1005-9369(2018)06-0070-10

杜志强, 董翔宇, 汪礼建, 等. 长链非编码RNA基因 *NRON* 与肉鸡生长性状关联分析[J]. 东北农业大学学报, 2018, 49(6): 70-79.

Du Zhiqiang, Dong Xiangyu, Wang Lijian, et al. Association analysis on a long non-coding RNA *NRON* with growth traits in broilers[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2018, 49(6): 70-79. (in Chinese with English abstract)

Association analysis on a long non-coding RNA *NRON* with growth traits in broilers/DU Zhiqiang<sup>1,2,3</sup>, DONG Xiangyu<sup>1,2,3</sup>, WANG Lijian<sup>1,2,3</sup>, GAO Zhuoran<sup>1,2,3</sup>, LI Hui<sup>1,2,3</sup>(1. Key Laboratory of Chicken Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Harbin 150030, China; 2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Education Department of Heilongjiang Province, Harbin 150030, China; 3. School of Animal Sciences and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Recently, long non-coding RNAs are found to regulate a variety of normal physiological activities and disease development. Previous studies found that *NRON* was a long non-coding RNA inhibitor of nuclear factor of activated T cells (*NFAT*), and closely related to myocardium development and immune responses. The current study performed the association analyses of detected single nucleotide polymorphisms of *NRON* gene and association growth traits in two broiler populations, the Northeast Agricultural University High and Low Fat (NEAUHLF) chicken lines and a random Arbor Acres (AA) population. It was found that in both chicken populations, *NRON* was significantly associated with the heart weight ( $P<0.01$ ); and also significantly associated with body weights at 3 and 5 weeks of age in AA population, weights of

收稿日期: 2018-04-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472088)

作者简介: 杜志强(1975-), 男, 教授, 博士, 博士生导师, 研究方向为动物基因组学与生物信息学。E-mail: zhqdu@neau.edu.cn

proventriculus and gizzard, pelvis width, breast angle and width traits in NEAUHLF Chickens ( $P < 0.05$ ). The *NRON* gene expression levels in heart, pectoral muscle, gizzard and abdominal adipose tissue were significantly different between the fat and lean chicken lines ( $P < 0.01$ ). In addition, the expression levels of *NRON* and *NFAT* in the abdominal fat tissues tended to increase with the age. The findings laid the foundation for further investigating the molecular mechanisms of how *NRON* affected the growth and development of muscle and adipose tissues in chickens.

**Key words:** broiler; *NRON*; *NFAT*; heart; muscle; adipose

长链非编码RNA(lncRNA)是近年新发现的一类长度大于200个核苷酸, 缺乏蛋白编码功能, 由RNA聚合酶II或III转录生成的RNA<sup>[1]</sup>, 可多层面调控转录后和表观生物学等过程<sup>[2-4]</sup>。起初, lncRNA被视为转录过程中的“转录噪音”。随后研究发现, lncRNA可作为生物信号分子、miRNA吸附“海绵体”、转录因子引导者、增强子及蛋白支架等, 参与转录本可变剪接、基因组印记、染色体沉默、细胞周期调控、蛋白质合成等生物学过程<sup>[5-6]</sup>。

*NRON* 是抑制 *NFAT* (Nuclear factor of activated T cells, 活化T细胞核因子)的lncRNA<sup>[7]</sup>, 最初是在一个表达序列标签(EST)测序项目中, 通过筛选512个保守非编码RNA序列而被找到<sup>[8-9]</sup>。*NFAT* 是一类转录因子家族, 在免疫反应中对诱导基因转录起重要作用<sup>[10]</sup>。除T细胞外, 免疫细胞多可表达该类蛋白质<sup>[11]</sup>, 如B淋巴细胞<sup>[12]</sup>、肥大细胞、嗜酸性粒细胞等; *NFAT*也影响心肌、骨骼肌及神经系统发育<sup>[9]</sup>。此外, *NFAT*与脂肪细胞分化有关<sup>[13-14]</sup>。钙离子依赖的钙调蛋白磷酸酶调节 *NFAT* 活性<sup>[15-16]</sup>。随细胞内钙水平升高, 钙调磷酸酶(Cn)被激活, 直接脱磷酸以过磷酸化形式存在于 *NFAT* 蛋白, 诱导其转移至细胞核内。转移至核内 *NFAT* 蛋白结合于靶基因启动子上, 单独或与其他转录因子共同诱导基因表达。与钙调磷酸酶激活通路拮抗的 *NFAT* 激酶、糖原合成酶激酶(GSK)、酪蛋白激酶(CK), 使 *NFAT* 蛋白磷酸化, 从核内转出至细胞质<sup>[17]</sup>。*NRON* 则通过与 *NFAT* 形成RNA-蛋白复合物形式调节 *NFAT* 脱磷酸作用<sup>[18]</sup>, 参与艾滋病病毒HIV-1复制过程<sup>[19-20]</sup>。目前, 鸡 *NRON* 功能研究国内外无相关报道。

本研究以东北农业大学肉鸡腹脂双向选择系和爱拔益加(Arbor acres, AA)肉鸡群体为材料, 检测 *NRON* 单核苷多态性, 进一步分析其共同生长性状间关联, 旨在探讨 *NRON* 基因影响肉鸡肌肉和脂肪

组织生长发育分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

东北农业大学肉鸡高、低腹脂双向选择品系(NEAUHLF)经21个世代选育, 高、低脂系间腹脂重和腹脂率差异显著。本研究以NEAUHLF第19世代鸡群和AA肉鸡随机群体为试验材料, 选用高脂系公鸡114只, 低脂系公鸡121只, AA群体公鸡母鸡共240只, 收集各类生长性状: 肉鸡1~7各周龄体重, 7周龄屠宰时胴体性状。

组织表达检测样品采集过程如下: 从高、低脂系第19世代(G19)肉鸡出生后1周龄开始取组织样品, 每周采样一次, 直至7周龄。取样分为两组: 高脂系公鸡和低脂系公鸡。禁食10 h后称量体重并屠宰, 屠宰后称量腹脂重, 计算腹脂率(腹脂重/体重)。采集腹脂、大脑、肝脏、肾脏、脾脏、心脏、肌胃、肠系膜周围脂、皮下脂、肌胃周围脂共10种组织。样品于0.75%氯化钠中清洗, 液氮中速冻,  $-80^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计与合成

##### 1.2.1.1 Real-Time RT-PCR引物设计

根据Ensembl数据库中鸡 *NRON* 基因序列(ENSGALG00000025631)和 *NFAT* 基因序列(ENSGALG00000039300), 结合内含子位置信息, 选择Primer Premier 5.0设计Real-Time RT-PCR表达检测引物。内参基因TBP根据NCBI数据库信息, 使用Primer Premier 5.0设计引物。引物信息见表1。

##### 1.2.1.2 酶切引物设计

根据Ensembl数据库鸡 *NRON* 基因序列(ENSGALG00000025631), 利用在线软件WatCut(<http://watcut.uwaterloo.ca/>)及Primer Premier 5.0设计酶切引物(见表2)。

表1 Real-Time RT-PCR表达检测引物

Table 1 Primers for Real-Time RT-PCR

名称 Name	基因登录号 Gene ID	序列 Sequence(5'-3')
<i>TBP</i>	NM_205103	F: GCGTTTTGCTGCTGTTATTATGAG R: TCCTTGCTGCCAGTCTGGAC
<i>NRON</i>	ENSGALG00000025631	F: AACCCCTTTTAATGAGAAGCAAT R: GTGAGCGAGCACTGTGAAGC
<i>NFAT</i>	ENSGALG00000039300	F: ACCGGCTCGTTTTAGTGAGG R: CGCACTGGGAGTACGCTAAC

表2 酶切引物

Table 2 Primers for restriction enzyme cleavage

名称 Name	序列 Sequence(5'-3')
SNP 1	F: GTCCAAAACGGAAGATAA R: ATGGTGACAGCAGAATCA
SNP 2	F: GCAATCAACTTACTGGGT R: GTGCTGTTTCATCACCTC

### 1.2.2 RNA提取及cDNA合成

高、低脂系肉鸡(各5只),分别提取组织总RNA(TRIZOL法),通过琼脂糖凝胶电泳分析, Nano-drop检测浓度,确保DNA和RNA质量和完整性。

取1 mL TRIZOL加入研磨(液氮中)组织样品50~100 mg,充分混匀。加入0.2 mL氯仿,离心后,水相转移到新离心管。加入400 mL异丙醇沉淀水相中RNA,离心后移去上清。加入1 mL DEPC处理的75%乙醇洗涤,RNA沉淀后移去上清,DEPC水溶解RNA。 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。利用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(购自TaKaRa宝生物公司)获得去除基因组cDNA。

### 1.2.3 Real-Time RT-PCR

Real-Time RT-PCR反应体系为: SYBR® Premix Ex Taq™(2×)(购自宝生物工程(大连)有限公司)5  $\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye II (50×)0.2  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 各0.2  $\mu\text{L}$ , cDNA模板1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 3.4  $\mu\text{L}$ , 总体积10  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 s, 95  $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 复性延伸34 s, 共40个循环。溶解曲线95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 每个样品设3孔重复。使用Real-Time RT-PCR仪型号为ABI 7500。

### 1.2.4 PCR扩增

根据设计SNP1和SNP2基因作PCR扩增,PCR扩增体系为: 50 ng· $\mu\text{L}^{-1}$ 基因组1  $\mu\text{L}$ , 10×PCR Buffer 0.8  $\mu\text{L}$ , 10 mol· $\mu\text{L}^{-1}$ 上游引物0.2  $\mu\text{L}$ , 10 mol· $\mu\text{L}^{-1}$ 下游引物0.2  $\mu\text{L}$ , 10 mmol· $\mu\text{L}^{-1}$  dNTP 0.8  $\mu\text{L}$ , Taq DNA聚合酶0.1  $\mu\text{L}$ ,去离子灭菌水6.7  $\mu\text{L}$ 。

PCR扩增程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, (55.7~60.7  $^{\circ}\text{C}$ ) 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  7 min。PCR产物于琼脂糖凝胶电泳检测,以5  $\mu\text{L}$  DNA Marker DL 2000为参照。电泳结束后利用凝胶成像系统观察扩增结果。

### 1.2.5 酶切反应

*NRON*基因变异位点可被限制性内切酶切割,选用限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)分型方法。

酶切体系设计为: 内切酶10 U· $\mu\text{L}^{-1}$ 0.1  $\mu\text{L}$ , 10·Buffer 2.0  $\mu\text{L}$ , PCR产物0.3~0.5  $\mu\text{g}$ ,去离子水加至20  $\mu\text{L}$ 。

将上述反应液混匀,于适当温度(依据不同酶而定)水浴中过夜消化,将全部反应液作琼脂糖凝胶电泳,检测PCR产物酶切效果及片段多态性。酶切产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测并观察结果。

### 1.2.6 基因效应分析

根据群体特点, 构建基因型分析统计模型:

$$Y = \mu + G + L + G \times L + F(L) + D(F, L) + BW + e \quad (1)$$

$$Y = \mu + G + S + G \times S + F + D(F) + BW + e \quad (2)$$

其中,  $Y$  为性状观测值,  $\mu$  为群体均值,  $G$  为基因型固定效应,  $L$  为品系固定效应,  $G \times L$  为基因型和品系互作效应,  $F(L)$  为品系内家系随机效应,  $D(F, L)$  为家系与品系内母鸡随机效应,  $S$  为性别固定效应,  $G \times S$  为基因型和性别互作效应,  $F$  为家系随机效应,  $D(F)$  为家系内母鸡随机效应,  $BW$  (第1或第7周龄体重) 为协方差变量,  $e$  为随机效应。

模型①适于东北农业大学高、低脂系肉鸡双向选择系群体, 模型②适于AA肉鸡随机群体; 使用统计软件JMP 7.0检验基因型与性状间相关性, 估计性状最小二乘均值。 $P < 0.05$  为显著,  $P < 0.01$  为极显著。

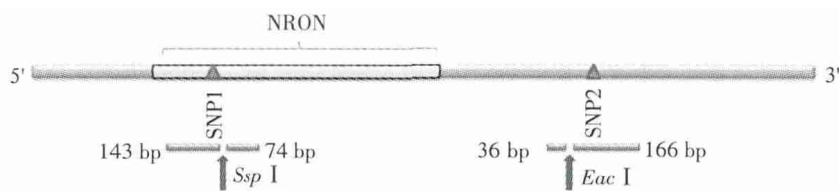


图1 *NRON* 基因 SNP 相对位置信息

Fig. 1 Relative positions of SNPs discovered in *NRON*

### 2.1.2 多态性检测及分析

采用 SNP-RFLP 技术检测 *NRON* 基因两个 SNP 位点, 高、低脂肉鸡和 AA 肉鸡群体中分别检测 3 种基因型。检测 *NRON* 基因多态性 PCR 扩增片段产物长度分别为 217 bp (SNP1) 和 202 bp (SNP2)。SNP1 片段经 *Ssp* I 限制性内切酶酶切后产生长度为 143 bp 和 74 bp 片段, 根据条带不同分别检测 3 种基因型, 分别命名为 GA 基因型 (217 bp+143 bp+74 bp)、AA 基因型 (143 bp+74 bp) 和 GG 基因型 (217 bp); SNP2 片段经 *Eae* I 限制性内切酶酶切后产生长度为 166 bp 和 36 bp 片段, 根据条带不同分别检测到 3 种基因型, 分别命名为 GG 基因型 (202 bp)、CC 基因型 (166 bp+36 bp) 和 GC 基因型 (202 bp+166 bp+36 bp) (见图 2)。

关联分析结果见表 3~4, AA 肉鸡群体中, SNP1 位点与生长性状无关联, SNP2 位点与心脏重、3 周龄和 5 周龄显著相关。高、低脂系肉鸡群体中, SNP1 位点与肌胃重、骨盆宽、胸角性状显

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡 *NRON* 基因多态性检测

#### 2.1.1 SNP 位点发现

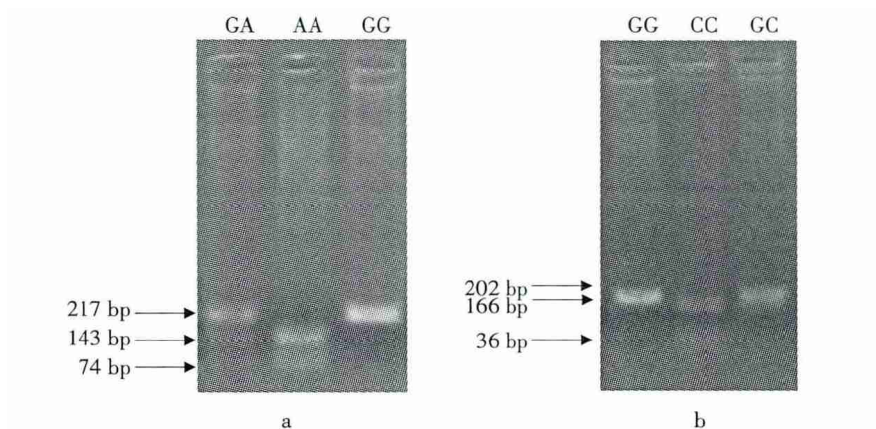
本试验根据 19 世代高、低脂系肉鸡全基因组重测序数据 (未发表结果), 发现 *NRON* 基因上下游共 10 个单核苷酸多态性 (SNP) 位点。为进一步确定 SNP 真实性, 根据 Ensemble 数据库中鸡 *NRON* 序列 (ENSGALG00000025631), 随机选取 19 世代高、低脂系肉鸡各 3 个基因组样本为模板, 设计 3 段引物及 PCR 方法扩增长度分别为 898、891 和 837 bp 序列 (覆盖 2 757 bp, 包括 *NRON* 基因和其上下游各 1 200 bp 序列)。PCR 产物测序后与鸡基因组 (Gallus 5.0) 比对分析, 验证 10 个 SNP, 后续关联分析使用其中两个 SNP 位点, 1 个位于 *NRON* 基因, 另 1 个位于 *NRON* 基因下游。具体 SNP 位置信息如图 1 所示。

著相关, SNP2 位点与心脏重、腺胃重、胸宽性状显著相关。同时, AA 肉鸡群体中, 虽然 SNP2 位点多态性与腹脂重不相关, 但显性效应值大于加性效应值, 且显性度为 1.3, 表明 SNP2 位点有超显性且影响腹脂重; 高、低脂系肉鸡群体中, SNP2 位点与胸宽性状显著相关, 且显性效应值大于加性效应值, 显性度为 12.9, 表明 SNP2 位点有超显性且影响胸宽; 但在两个群体中, 心脏重显性度均不明显。

### 2.2 连锁不平衡分析

以东北农业大学肉鸡高、低脂双向选择品系第 19 世代资源群体 ( $G_{19}$ ) 235 只公鸡和 AA 群体 240 只公鸡和母鸡为试验材料, Haploview 软件分析 SNP1 和 SNP2 在两个群体间连锁不平衡关系。结果表明, AA 肉鸡群体中, SNP1 和 SNP2 位点间连锁不平衡程度较强 ( $D' = 1.0$ ) (见图 3a); 而高、低脂系肉鸡群体中, SNP1 与 SNP2 几乎不连锁 ( $D' = 0.03$ , 见图 3b)。





a-SNP1 片段产物凝胶电泳结果; b-SNP2 片段产物凝胶电泳结果  
a,b-Gel electrophoresis results of SNP1 and SNP2

图2 NRON 基因 SNP 多态片段产物凝胶电泳结果

Fig. 2 Gel electrophoresis of NRON SNP RFLP

表3 AA 肉鸡群体 NRON 基因 SNP 多态性与生长性状关联分析

Table 3 Association of NRON polymorphisms with growth traits in AA broilers

表型 Phenotype	SNP1				SNP2			
	P 值 P value	加性效应 Additive	显性效应 Dominance	显性度 Degree of dominance	P 值 P value	加性效应 Additive	显性效应 Dominance	显性度 Degree of dominance
腹脂率 AFP	0.39	-7.00×10 <sup>-4</sup>	4.00×10 <sup>-4</sup>	-0.62	0.42	1.10×10 <sup>-3</sup>	1.40×10 <sup>-3</sup>	1.26
腹脂重 AFW	0.51	-1.63	0.63	-0.38	0.25	2.85	3.72	1.30
肝脏重 LW	0.92	-0.58	-0.41	0.71	0.37	-1.64	-1.79	1.08
肌胃重 MSW	0.53	-0.22	-0.77	3.35	0.84	-0.39	-0.51	1.29
心脏重 HW	0.95	-0.48	-0.51	1.04	9.10×10 <sup>-3</sup> **	-0.65	-0.84	1.27
脾脏重 SW	0.53	-0.42	-0.57	1.34	0.36	-0.13	-0.18	1.42
腺胃重 GSW	0.84	-0.56	-0.43	0.76	0.14	-0.38	-0.98	2.58
睾丸重 TW	0.21	-0.45	-0.54	1.21	0.25	0.06	0.12	2.03
屠体重 CW	0.50	7.59	-8.59	-1.13	0.72	0.35	-11.32	-31.72
1 周龄重 W1	0.99	-0.55	-0.40	0.80	0.36	-3.41	-2.86	0.83
3 周龄重 W2	0.60	-3.94	2.93	-0.74	0.02*	-37.11	-30.25	0.81
5 周龄重 W3	0.90	7.29	-8.19	-1.13	0.05*	-27.80	-70.45	2.53
7 周龄重 W4	0.82	-14.41	13.30	-0.93	0.42	47.51	4.84	0.10
跖骨长 MeL	0.67	-0.46	-0.53	1.13	0.18	0.05	-0.07	-1.50
跖骨围 MeC	0.37	-0.46	-0.53	1.13	0.59	0.02	-0.01	-0.57
极低密度脂蛋白浓度 VLDL	0.98	-0.50	-0.49	0.99	0.23	3.00×10 <sup>-4</sup>	7.40×10 <sup>-3</sup>	22.02
龙骨长 KeL	0.81	-0.51	-0.48	0.92	0.58	-0.03	-0.1285	4.09
胸宽 ChWi	0.88	-0.51	-0.48	0.92	0.32	-6.30×10 <sup>-3</sup>	-0.1561	24.64

注: \*表示差异显著(P<0.05), \*\*表示差异极显著(P<0.01)。下同。

Note: \* means the difference is significant (P<0.05) and \*\* means the difference is extremely significant (P<0.01). The same as below.

表4 高、低脂系肉鸡群体中 *NRON* 基因SNP多态性与生长性状关联分析

Table 4 Association of *NRON* polymorphisms with growth traits in HLF broilers

表型 Phenotype	SNP1				SNP2			
	P值 P value	加性效应 Additive	显性效应 Dominance	显性度 Degree of dominance	P值 P value	加性效应 Additive	显性效应 Dominance	显性度 Degree of dominance
腹脂率 AFP	0.66	3.00×10 <sup>-4</sup>	1.00×10 <sup>-4</sup>	0.39	0.85	-2×10 <sup>-4</sup>	-2×10 <sup>-4</sup>	1.14
腹脂重 AFW	0.53	0.68	0.00	0.00	0.38	-0.28	-0.49	1.71
心脏重 HW	0.63	0.19	0.23	1.20	0.01*	-0.63	-0.39	0.61
脾脏重 SW	0.53	-0.01	0.13	-8.29	0.18	-0.27	-0.21	0.76
腺胃重 GSW	0.17	0.71	-0.86	-1.20	0.02*	-1.01	0.20	-0.19
睾丸重 TW	0.45	0.02	0.14	5.23	0.63	-0.07	-0.08	1.11
肝脏重 LW	0.57	0.12	1.12	9.25	0.21	-1.18	0.44	-0.37
肌胃重 MSW	0.04*	1.07	-0.28	-0.26	0.92	-6×10 <sup>-4</sup>	0.28	-473.45
龙骨长 KeL	0.91	-0.02	0.08	-3.48	0.56	0.15	0.05	0.37
体斜长 Bol	0.18	-0.42	-0.14	0.34	0.38	0.18	0.42	2.24
胸宽 ChWi	0.40	-0.84	-0.84	1.00	3.00×10 <sup>-3**</sup>	-0.30	4.00	-12.96
胸深 ChD	0.70	-0.65	-0.09	0.14	0.46	1.06	0.31	0.30
骨盆宽 PeW	0.04*	-1.28	-2.02	1.58	0.08	-0.27	1.98	-7.13
胸角度 ChA	0.05*	3.39	3.85	1.13	0.65	-1.38	-1.17	0.84
跖骨长 MeL	0.85	-0.55	-0.33	0.59	0.32	0.95	0.33	0.34
跖骨围 MeC	0.40	0.10	0.05	0.54	0.14	-0.05	0.01	-0.16

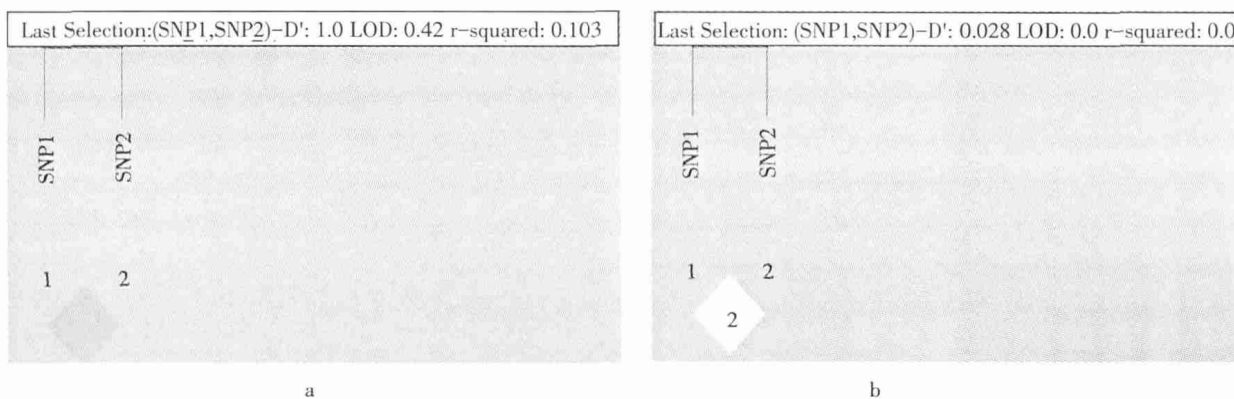


图3 AA和高、低脂系肉鸡群体中 *NRON* SNP连锁不平衡分析

Fig. 3 Linkage disequilibrium analysis of *NRON* SNPs in AA and HLF broilers

2.3 在不同组织中鸡 *NRON* 基因表达规律

Real-Time RT-PCR 检测 *NRON* 基因高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织表达情况( $n=5$ )。

由图4可知, 1、4、7周龄, *NRON* 基因在肉鸡高脂系表达水平显著高于低脂系( $P<0.05$ ); 且 *NRON* 及 *NFAT* 基因随周龄增加, 表达量呈递增趋势。

同时, 检测 *NRON* 基因在高、低脂肉鸡心脏、

腺胃、肌胃、胸肌、肝脏、睾丸、脾脏组织中表达情况( $n=3$ )。

由图5可知, *NRON* 基因在睾丸和脾脏组织中不表达; 肌胃、肝脏中表达差异不显著; 心脏、腺胃、胸肌中表达差异极显著( $P<0.01$ ), 且在心脏和腺胃中, 高脂系显著高于低脂系, 胸肌中, 高脂系显著低于低脂系。

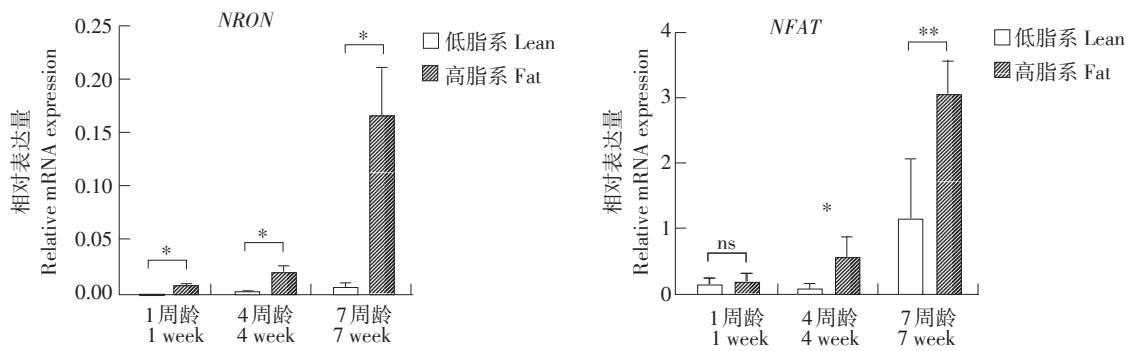


图4 鸡脂肪组织中NRON及NFAT的mRNA表达水平

Fig. 4 mRNA expression patterns of NRON and NFAT in abdominal adipose tissues

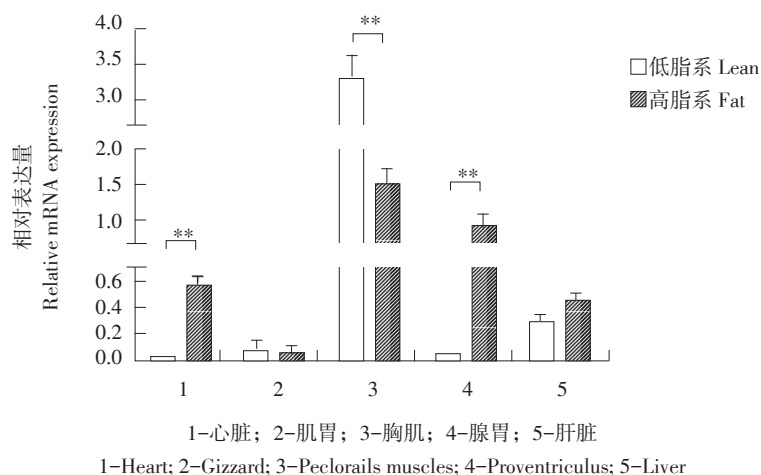


图5 鸡不同组织中NRON的mRNA表达水平

Fig. 5 mRNA expression patterns of NRON in different tissues

### 3 讨论与结论

#### 3.1 NRON和NFAT与心脏发育

本研究发现NRON与肉鸡心脏重极显著相关,高、低脂系肉鸡中,NRON基因在心脏中表达差异极显著,高脂系表达显著高于低脂系。研究表明NFAT基因为调控心房肌生长发育重要因子,其功能紊乱导致心脏疾病,在人类心脏表达基因中,13%在启动子区有NFAT结合位点,这些基因中20%~40%在心脏病发病前期发生表达修饰<sup>[21]</sup>。NFAT激活由钙调磷酸酶介导,对于肥厚心肌组织中心肌细胞基因表达有重要作用<sup>[22]</sup>,Putt等研究表明NFAT是心肌肥大反应调节元件<sup>[23]</sup>。在心肌肥大心脏中,NFAT脱磷酸化增强自身核定位和转录活性<sup>[24-25]</sup>,导致NFAT活性在患心脏病或年老患者中均明显增强<sup>[26]</sup>。同时,抑制NFAT基因活性可干扰心肌肌钙蛋白基因转录过程,导致心房肌变薄<sup>[10]</sup>。

NRON基因作为NFAT抑制物<sup>[9]</sup>,作为一种新生物标记可预测心脏病<sup>[27]</sup>。NRON可作研究肉鸡心脏生长发育过程标记基因。

#### 3.2 NRON与肌肉生长发育

除与心脏生长发育密切相关外,NRON与肉鸡其他生长性状(3周龄重、5周龄重、腺胃重、胸宽)也显著相关( $P<0.05$ )。高脂系胸肌中NRON表达水平显著低于低脂系。NRON基因表达研究表明,在人胎盘组织、胸腺、脾脏中NRON高丰度表达,在睾丸、肾脏、大脑和肾上腺组织中也检测到NRON基因较高丰度表达<sup>[9]</sup>。小鼠骨骼肌、胸腺中NRON基因高丰度表达,脾脏、淋巴组织和肺组织也可检测明显表达<sup>[9]</sup>。NRON基因Northern杂交结果同其基因表达结果吻合,且NRON转录本在不同组织中有特异性剪接形式,可能有其他未知生物学功能<sup>[9]</sup>。研究结果暗示NRON与骨骼肌和平滑肌生长发育可能相关。因此,NRON基因与肉鸡体

重等生长性状显著相关,胸肌中差异表达,因此可能被作为重要生产性状候选基因,应用于分子育种和肉鸡生产。

### 3.3 *NRON* 与脂肪组织生长发育

*NRON* 及 *NFAT* 基因在东北农业大学高、低脂系肉鸡腹部脂肪组织中表达差异显著 ( $P < 0.05$ ), 表达趋势一致, 均为肉鸡高脂系中 mRNA 表达水平高于低脂系。*NFAT* 转录因子家族源自 REL(c-Rel)-nuclear factor- $\kappa$ B (REL-NF- $\kappa$ B) 转录因子家族<sup>[28]</sup>, 被认定为活化 T 细胞中重要组成因子, 其受钙调磷酸酶调节特性决定 *NFAT* 在多种生物过程均有调节功能<sup>[29-31]</sup>, 如非免疫细胞生成<sup>[32-33]</sup>, 心肌形成<sup>[34-36]</sup> 和神经回路<sup>[36]</sup> 等。最初并未发现 *NFAT* 与脂肪生成相关<sup>[14,30]</sup>, 近期 Graef 等研究发现其在脂肪细胞分化过程中具有重要作用<sup>[37-39]</sup>。*NFAT* 可与转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白互作形成复合元件<sup>[38-39]</sup>, 调节脂肪生成重要调节因子过氧化物酶增殖体受体  $\gamma$ 2 (*PPAR $\gamma$ 2*) 基因表达<sup>[40-41]</sup>, 参与脂肪生成; 此外, *NFAT* 与脂肪酸结合蛋白 (*aP2*) 同样有关<sup>[42-43]</sup>, 在小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞中, *NFAT* 蛋白结合 *aP2* 启动子并反式调控 *aP2* 转录过程, 影响脂肪细胞分化<sup>[44]</sup>。

作为脂肪生成重要调控因子, 去乙酰化酶 *SIRT1* 不仅结合 NF- $\kappa$ B 使其去乙酰化, 抑制 NF- $\kappa$ B 转录激活活性<sup>[45]</sup>, 还抑制 *NFAT* 活性<sup>[46]</sup>, 抑制脂肪生成。*NFAT* 与脂肪分化标志基因脂联素密切相关。*NFAT* 家族成员 *NFAT3/c4* 通过结合脂联素启动子区, 激活脂联素启动子活性, 调控其在小鼠 3T3-L1 脂肪细胞中表达<sup>[47]</sup>。综上, *NFAT* 可通过多种分子机制促进脂肪细胞分化, *NRON* 则通过抑制 *NFAT* 脱磷酸化而促进脂肪分化过程。

### 3.4 *NRON* 功能性 SNP 鉴定

通过连锁不平衡分析发现 *NRON* 基因中 SNP1 和 SNP2 位点在高、低脂系肉鸡群体中连锁不平衡程度较强, 且两个位点与生产性状关联分析结果不同。通过转录因子结合位点在线预测, 发现 *NFAT* 蛋白结合 *NRON* 序列十分接近 SNP1 (未发表结果)。表明 SNP1 位点可能影响 *NRON* 与 *NFAT* 形成 RNA-蛋白复合物, 参与 *NRON* 调控 *NFAT* 功能分子生物学过程。本研究仅检测 *NRON* 基因单核苷酸多态性位点与生产性状间相关及组织中表达情况, 需进一步开展 SNP 功能性鉴定和相关作用机制分析, 揭示 *NRON* 与肌肉和脂肪性状间分子调控机制。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Lv J, Cui W, Liu H, et al. Identification and characterization of long non-coding RNAs related to mouse embryonic brain development from available transcriptomic data[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71152.
- [ 2 ] Tsoi L C, Iyer M K, Stuart P E, et al. Analysis of long non-coding RNAs highlights tissue-specific expression patterns and epigenetic profiles in normal and psoriatic skin[J]. Genome Biology, 2015, 16(1): 24.
- [ 3 ] Paralkar V R, Mishra T, Luan J, et al. Lineage and species-specific long noncoding RNAs during erythro-megakaryocytic development[J]. Blood, 2014, 123(12): 1927-1937.
- [ 4 ] 李辉, 张继扬, 杜志强. 鸡长链非编码 RNA 发掘及组织特异性表达分析[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(7): 40-47.
- [ 5 ] Guttman M, Rinn J L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs[J]. Nature, 2012, 482(7385): 339-346.
- [ 6 ] St L G, Wahlestedt C, Kapranov P. The landscape of long noncoding RNA classification[J]. Trends Genet, 2015, 31(5): 239-251.
- [ 7 ] Numata K, Kanai A, Saito R, et al. Identification of putative non-coding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection[J]. Genome Res, 2003, 13(6): 1301-1306.
- [ 8 ] Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60, 770 full-length cDNAs[J]. Nature, 2002, 420 (6915): 563-573.
- [ 9 ] Willingham A T, Orth A P, Batalov S, et al. A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds arepressor of *NFAT*[J]. Science, 2005, 309(5740): 1570-1573.
- [ 10 ] Crabtree G R, Olson E N. NFAT signaling: Choreographing the social lives of cells[J]. Cell, 2002, 109: 67-79.
- [ 11 ] Zhang J, Feng H, Zhao J, et al. I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  is an NFATc1 kinase that inhibits T cell immune response[J]. Cell Rep, 2016, 16(2): 405-418.
- [ 12 ] Teixeira L K, Carrossini N, S cca C, et al. NFAT1 transcription factor regulates cell cycle progression and cyclin E expression in B lymphocytes[J]. Cell Cycle, 2016, 15(17): 2346-2359.
- [ 13 ] Shou J, Jing J, Xie J, et al. Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment[J]. Cancer Lett, 2015, 361(2): 174-184.
- [ 14 ] Hogan P G, Chen L, Nardone J, et al. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT[J]. Genes Dev, 2003, 17(18):



- 2205–2232.
- [15] Yang T T, Suk H Y, Yang X, et al. Role of transcription factor NFAT in glucose and insulin homeostasis[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20): 7372–7387.
- [16] Ho I C, Kim J H, Rooney J W, et al. A potential role for the nuclear factor of activated T cells family of transcriptional regulatory proteins in adipogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(26): 15537–15541.
- [17] Holowachuk E W. Nuclear factor of activated T cell (NFAT) transcription proteins regulate genes involved in adipocyte metabolism and lipolysis[J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2007, 361(2): 427–432.
- [18] Sharma S, Findlay G M, Bandukwala H S, et al. Dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factor is regulated by an RNA–protein scaffold complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(28): 11381–11386.
- [19] Imam H, Bano A S, Patel P, et al. The lncRNA *NRON* modulates HIV–1 replication in a NFAT–dependent manner and is differentially regulated by early and late viral proteins[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8639.
- [20] Li J, Chen C, Ma X, et al. Long noncoding RNA *NRON* contributes to HIV–1 latency by specifically inducing tat protein degradation[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11730.
- [21] Xuan L, Sun L, Zhang Y, et al. Circulating long non–coding RNAs *NRON* and *MHRT* as novel predictive biomarkers of heart failure[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(9): 1803–1814.
- [22] Sarikhani M, Maity S, Mishra S, et al. *SIRT2* deacetylase represses *NFAT* transcription factor to maintain cardiac homeostasis[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(14): 5281–5294.
- [23] Putt M E, Hannehalli S, Lu Y, et al. Evidence for coregulation of myocardial gene expression by *MEF2* and *NFAT* in human heart failure[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2009, 2(3): 212–219.
- [24] Qi W, Song X, Li L. Long non–coding RNA–guided regulation in organisms[J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(10): 891–896.
- [25] Wei P, Han B, Chen Y. Role of long non–coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis[J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(10): 867–875.
- [26] Kapranov P, Cheng J, Dike S, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription[J]. *Science*, 2007, 316: 1484–1488.
- [27] Schubert W, Yang X Y, Yang T T, et al. Requirement of transcription factor NFAT in developing atrial myocardium[J]. *J Cell Biol*, 2003, 161(5): 861–874.
- [28] Crabtree G R, Schreiber S L. Snapshot:  $Ca^{2+}$ –calcineurin–NFAT signaling[J]. *Cell*, 2009, 138(1): 210.
- [29] Heit J J. Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic  $\beta$ –cell growth and function[J]. *Nature*, 2006, 443(7109): 345–349.
- [30] Horsley V, Aliprantis AO, Polak L, et al. NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells[J]. *Cell*, 2008, 132(2): 299–310.
- [31] Miyakawa H, Woo S K, Dahl S C, et al. Tonicity–responsive enhancer binding protein, a rel–like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(5): 2538–2542.
- [32] Negishi–Koga T, Takayanagi H.  $Ca^{2+}$ –NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation[J]. *Immunol Rev*, 2009, 231(1): 241–256.
- [33] Winslow M M. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass[J]. *Dev Cell*, 2006, 10(6): 771–782.
- [34] Chang C P, Neilson J R, Bayle J H, et al. A field of myocardial–endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis [J]. *Cell*, 2004, 118(5): 649–663.
- [35] de la Pompa J L, Timmerman L A, Takimoto H, et al. Role of the NF–ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum[J]. *Nature*, 1998, 392(6672): 182–186.
- [36] Molkentin J D, Lu J R, Antos C L, et al. A calcineurin–dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy[J]. *Cell*, 1998, 93(2): 215–228.
- [37] Graef I A, Wang F, Charron F, et al. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons[J]. *Cell*, 2003, 113(5): 657–670.
- [38] Yang T T, Chow C W. Transcription cooperation by NFAT. C/EBP composite enhancer complex[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18): 15874–15885.
- [39] Yang T T, Xiong Q, Enslin H, et al. Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen–activated protein kinases[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(11): 3892–3904.
- [40] Yang T T, Xiong Q, Graef I A, et al. Recruitment of the extracellular signal–regulated kinase/ribosomal S6 kinase signaling pathway to the NFATc4 transcription activation complex[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(3): 907–920.
- [41] Yang T T, Ung P M, Rincon M, et al. Role of the CCAAT/enhancer–binding protein NFATC2 transcription factor cascade in the induction of secretory phospholipase A2[J]. *J Biol Chem*, 2006,

- 281(17): 11541–11552.
- [42] Matarese V, Bernlohr D A. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein[J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(28): 14544–14551.
- [43] Bernlohr D A, Angus C W, Lane M D, et al. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81(17): 5468–5472.
- [44] Ho I C, Kim J H, Rooney J W, et al. A potential role for the nuclear factor of activated T cells family of transcriptional regulatory proteins in adipogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(26): 15537–15541.
- [45] Yeung F, Hoberg J E, Ramsey C S, et al. Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase[J]. *EMBOJ*, 2004, 23(12): 2369–2380.
- [46] Jia Y Y, Lu J, Huang Y, et al. The involvement of NFAT transcriptional activity suppression in SIRT1-mediated inhibition of COX-2 expression induced by PMA/Ionomycin[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): 97999.
- [47] Kim H B, Kong M, Kim T M, et al. NFATc4 and ATF3 negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Diabetes*, 2006, 55(5): 1342–1352.

## (上接第49页)

- [17] 陈羽, 张顺琦, 陈夕军, 等. 番茄早疫病生防细菌 B731 的分离、鉴定及抑菌防病作用[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(3): 361–368.
- [18] 胡青平, 徐建国, 程丽萍, 等. 枯草芽胞杆菌 QM3 防治番茄早疫病和促进幼苗生长的研究[J]. *植物保护*, 2011, 37(4): 95–100.
- [19] 何建清, 张格杰, 岳海梅, 等. 番茄早疫病菌拮抗放线菌 10-4 的鉴定[J]. *植物保护学报*, 2010, 37(4): 307–312.
- [20] 高伟, 田黎, 张久明, 等. 海洋芽胞杆菌 B-9987 菌株对番茄灰霉病和早疫病的作用机制初探[J]. *植物保护*, 2010, 36(1): 55–59.
- [21] 任璐, 韩巨才, 刘慧平, 等. 植物内生细菌 yc8 对番茄早疫病菌抑菌作用研究[J]. *山西农业大学学报: 自然科学版*, 2008, 28(1): 34–36.
- [22] 张晓琴, 张晓, 何晓锐, 等. 枯草芽胞杆菌 YA-3 对番茄早疫病的防治作用[J]. *西北大学学报: 自然科学版*, 2015, 45(3): 423–428.
- [23] 董艳, 陈永福, 张和平. 番茄早疫病微生物防治研究进展[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(17): 111–115.
- [24] 刘昆昂, 郝楠, 李海立, 等. 生防解淀粉芽胞杆菌的研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2017, 37(5): 98–102.
- [25] Patel H, Tscheka C, Edwards K, et al. All- or- none membrane permeabilization by fengycin- type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, 1808(8): 2000–2008.
- [26] 张艳菊, 王莹, 党悦嘉, 等. 黄瓜霜霉菌对啞菌酯抗药性的研究[J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(4): 23–28.