网络出版时间:2026-04-08 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.10.003

新吉细毛羊血浆外泌体促小尾寒羊毛囊发育的转录组学分析及差异miRNA筛选

刘文晴[1],张彩红[1],张新玉[2],付佳棋[1],袁敏[1],孙福亮[1,3]
(1 延边大学 农学院,吉林 延吉 133002;2 中国农业科学院特产研究所,吉林 长春 130112;3 延边大学 实验动物中心,吉林 延吉 133002)

[摘 要] 【目的】探讨新吉细毛羊血浆外泌体(PLA-Exos)对小尾寒羊毛囊发育的影响,并通过转录组测序分析筛出皮肤组织中影响毛囊发育的关键 miRNA,为miRNA对毛囊发育的调控机制研究提供理论依据。【方法】采用双相沉淀法提取新吉细毛羊PLA-Exos,对其进行鉴定。构建小尾寒羊脱毛模型,在其左侧背部皮肤脱毛区域五点皮内注射新吉细毛羊PLA-Exos,每日一次,连续注射5 d,右侧对应脱毛区域皮内注射相同体积的PBS作为对照,注射结束后第21天采集皮肤组织,HE染色观察皮肤组织学变化。对皮肤样本进行转录组测序分析,使用DESeq2软件,以$|\log_2 \text{Fold Change}| \geqslant 1$和错误发现率(FDR)≤0.05为标准筛选差异表达miRNA,利用miRanda和RNAhybrid预测其靶基因,并对靶基因进行GO功能注释和KEGG通路富集分析,进而构建差异miRNA-mRNA调控网络。利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)对转录组测序结果进行验证。【结果】成功分离出新吉细毛羊PLA-Exos,其粒径主要集中在30~150 nm,在 106 nm 处出现浓度峰值,表达表面标志蛋白TSG101和CD9。皮肤组织切片观察发现,PLA-Exos组毛囊数目较对照组明显增加。从皮肤组织中共鉴定出1 474个miRNA(已知miRNA 146个,新预测1 328个),共筛选出18个差异表达miRNA,其中14个上调表达(novel-mir-335、novel-mir-957、novel-mir-855、novel-mir-561、novel-mir-797、novel-mir-1158、novel-mir-917、novel-mir-816、novel-mir-1119、novel-mir-616、novel-mir-1192、novel-mir-528、novel-mir-451 和 novel-mir-478),4个下调表达(novel-mir-1170、novel-mir-965、novel-mir-1352 和 novel-mir-156)。18个差异表达miRNA共预测到493个靶基因,GO功能注释分析显示,差异表达miRNA的靶基因主要涉及生物学过程中的细胞过程、单一生物过程等条目及细胞组分和分子功能中的细胞、细胞部分、结合与催化活性等条目;KEGG通路分析显示共富集在273个通路中,有6个miRNA及其靶基因富集于与毛囊调控密切相关的MAPK和Wnt信号通路。通过RT-qPCR对10个差异表达miRNA进行验证,结果与转录组测序数据一致。【结论】novel-mir-1192、novel-mir-1158、novel-mir-156、novel-mir-917、novel-mir-797和novel-mir-451及其靶基因是调控毛囊发育的候选基因,可能对绵羊毛发生长有重要影响。

[关键词] 毛囊发育;miRNAs;血浆外泌体;新吉细毛羊;小尾寒羊
[中图分类号] S826.8+9 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)10-0021-10

Transcriptomic analysis and differential miRNA screening of the effect of plasma-derived exosomes in Xinji fine-wool sheep on promoting hair follicle development in Small-tailed Han sheep

LIU Wenqing[1],ZHANG Caihong[1],ZHANG Xinyu[2],FU Jiaqi[1],
YUAN Min[1],SUN Fuliang[1,3]
(1 *College of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin* 133002, *China*; 2 *Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese*

[收稿日期] 2025-08-21 [修回日期] 2025-11-12
[基金项目] 国家自然科学基金项目(32060781)
[作者简介] 刘文晴(2001-),女,山东淄博人,在读硕士,主要从事动物毛囊发育调控研究。E-mail:lwq1371116202@163.com
[通信作者] 孙福亮(1978-),男,吉林农安人,副教授,博士,主要从事动物毛囊发育调控研究。E-mail:flsun@ybu.edu.cn

Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130112, *China*;
3 *Laboratory Animal Center, Yanbian University, Yanji, Jilin* 133002, *China*)

Abstract:【Objective】This study aims to investigate the effect of plasma-derived exosomes (PLA-Exos) from Xinji fine-wool sheep on hair follicle development in Small-tailed Han sheep. Through transcriptome sequencing analysis, key miRNAs influencing hair follicle development in skin tissues were screened, to provide a theoretical basis for research on the regulatory mechanisms of miRNAs in hair follicle development.【Method】PLA-Exos were extracted from Xinji fine-wool sheep using a two-step precipitation method, and were subsequently characterized. A depilation model was established for Small-tailed Han sheep. On the depilated area of the left dorsal skin, PLA-Exos were intradermally injected at five points once daily for five consecutive days. On the corresponding depilated area of the right dorsal skin, the same volume of PBS was intradermally injected as the control. Skin tissue samples were collected on day 21 post-injection, and their histological changes were observed via hematoxylin and eosin (HE) staining. Transcriptome sequencing analysis was performed on the skin samples. Differentially expressed miRNAs (DEmiRNAs) were screened using DESeq2 software with the criteria of $|\log_2 \text{Fold Change}| \geqslant 1$ and false discovery rate (FDR) $\leqslant 0.05$. Their target genes were predicted by using miRanda and RNAhybrid. Gene ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were conducted on the predicted target genes, and a regulatory network of DEmiRNA-mRNA was constructed subsequently. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to validate the transcriptome sequencing results.【Result】PLA-Exos were successfully isolated from Xinji fine-wool sheep. Their particle size primarily ranged from 30 to 150 nm, with a concentration peak observed at 106 nm, and the surface marker proteins TSG101 and CD9 expressed. Histological observation of skin tissue sections revealed a significantly higher number of hair follicles in the PLA-Exos group compared to the control group ($P<0.05$). A total of 1 474 miRNAs were identified in the skin tissues (146 known miRNAs and 1 328 novel predicted miRNAs). Eighteen DEmiRNAs were identified, including 14 upregulated DEmiRNAs (novel-mir-335, novel-mir-957, novel-mir-855, novel-mir-561, novel-mir-797, novel-mir-1158, novel-mir-917, novel-mir-816, novel-mir-1119, novel-mir-616, novel-mir-1192, novel-mir-528, novel-mir-451, and novel-mir-478) and 4 downregulated DEmiRNAs (novel-mir-1170, novel-mir-965, novel-mir-1352, and novel-mir-156). A total of 493 target genes were predicted for these 18 DEmiRNAs. GO functional annotation analysis revealed that the target genes of the DEmiRNAs were primarily associated with the biological process such as cellular process and single-organism process. The enriched cellular component and molecular function terms were predominantly associated with cells, cell parts, as well as binding and catalytic activities. KEGG pathway enrichment analysis revealed 273 pathways, among which 6 miRNAs and their target genes were notably enriched in the MAPK and Wnt signaling pathways, which were closely associated with hair follicle regulation. Validation of 10 DEmiRNAs by RT-qPCR yielded results consistent with the transcriptome sequencing data.【Conclusion】Six DEmiRNAs (novel-mir-1192, novel-mir-1158, novel-mir-156, novel-mir-917, novel-mir-797, and novel-mir-451), along with their target genes, are identified as candidate genes regulating hair follicle development, which may significantly influence hair growth in sheep.

Key words: hair follicle develepment; miRNAs; plasma exosomes; Xinji fine-wool sheep; Small-tailed Han sheep

毛发是动物皮肤重要的附属器官,不仅具有保温、机械保护和感受外界刺激的功能,其生长特性更是直接影响毛发的产量和品质,是重要的经济性状[1]。毛发的生长依赖于毛囊(hair follicle, HF)的周期性再生,涉及毛囊干细胞的活化、毛乳头细胞的信号调控以及多种生长因子的协同作用[2]。外泌体(exosomes, Exos)是细胞间通讯的重要介质,在组织再生领域备受关注[3]。在毛囊生物学中,毛乳

头细胞来源的外泌体（DPC-Exos）已被证实能激活毛囊组织中的β-catenin和SHH表达，调控毛囊周期变化[4]。脂肪干细胞外泌体（ADSC-Exos）通过调控miR-22表达，激活Wnt/β-catenin信号通路，促进毛乳头细胞的增殖、迁移并抑制其凋亡[5]。这些研究为外泌体在毛囊再生中的应用提供了理论依据。

血浆外泌体（plasma-derived exosomes，PLA-Exos）是血液中的天然纳米载体，具有来源广泛、生物相容性高、易于规模化制备等优势[6]。血浆中含有丰富的调控性miRNA[7]，其可被递送至靶细胞，发挥促增殖、抗凋亡和血管生成等作用。研究表明，PLA-Exos能诱导毛乳头细胞增殖并促进毛发生长[8]。富血小板血浆可治疗人雄性激素过多导致的脱发[9]，表明其中所含的PLA-Exos在毛发生长中具有潜在的应用价值[10]。

小尾寒羊是我国优良的绵羊品种，具有繁殖力高、适应性强等特性，在我国养殖业中占据重要地位。新吉细毛羊是遗传性能稳定的细毛羊品种，羊毛细度为19～21.5 μm。小尾寒羊在产毛量和毛细度等关键毛用性状指标上均显著劣于新吉细毛羊[11]。本课题组前期研究证实，新吉细毛羊PLA-Exos具有促进小鼠毛囊发育的作用[12]。本研究采用新吉细毛羊PLA-Exos皮内注射小尾寒羊，探究PLA-Exos对小尾寒羊毛囊发育的影响，在此基础上通过转录组测序分析筛选PLA-Exos处理后小尾寒羊皮肤组织差异表达的miRNA，并对其靶基因进行预测与功能分析，筛选与毛囊发育调控相关的关键miRNA，为深入解析miRNA分子机制及后续应用研究提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材　料

选用体质量、体型和外貌相似且饲养条件相同的6月龄雌性小尾寒羊和新吉细毛羊为试验动物，试验羊均饲养于龙井市上洞浦生态养殖场，试验羊群在相同饲喂条件下进行舍饲，基础日粮由玉米秸秆、羊草、混合精料补充料（玉米-豆粕-麦麸型）及矿物质添加剂构成。动物试验经延边大学动物伦理委员会批准，批准号为YD20220608002。

miRcute miRNA提取分离试剂盒（DP501）、miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒（KR211）、miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒（SYBR Green，FP411）、*U*6基因上游引物（10 μL），均购自生工生物工程（上海）股份有限公司；TRIzol试剂，中国生工生物科技公司。NanoDrop 2000超微量分光光度计，美国ThermoFisher Scientific公司；Agilent 2100，美国Agilent公司。

1.2　新吉细毛羊PLA-Exos的提取与鉴定

采集10只新吉细毛羊颈静脉血液（12 mL/只），将血样混合采用梯度离心法提取血浆。将血样于4 ℃下300 *g*离心15 min，取上清液；将所得上清液再次于4 ℃下800 *g*离心15 min，收集上清液即为血浆样本（70～80 mL）。采用PEG双相沉淀法提取PLA-Exos。取血浆样品，按照1∶1的体积比例与外泌体分离液充分混合，4 ℃静置12 h后，4 ℃、12 000 r/min离心60 min，弃去上清液，使用无菌PBS吹打沉淀，使沉淀充分溶解，所得溶液即为PLA-Exos样本溶液。

用透射电子显微镜观察PLA-Exos形态，用纳米颗粒追踪分析仪检测PLA-Exos的直径和数量，用蛋白质印迹法（Western blot）检测PLA-Exos表面标志蛋白TSG101和CD9。

1.3　脱毛模型建立及PLA-Exos注射

建立小尾寒羊脱毛模型，将脱毛膏均匀涂抹于6只小尾寒羊背部区域，静置15 min后用纱布擦洗干净，酒精消毒并自然晾干皮肤。用BCA法测定外泌体浓度，使用PBS将外泌体质量浓度调至10 g/L。将小尾寒羊左侧背部脱毛皮肤划分为3个面积为4 cm^2（2 cm×2 cm）的区域，在每个区域内分五点皮内注射新吉细毛羊PLA-Exos，单点注射量为0.4 mL（每区域总注射量为2 mL），每日一次，连续注射5 d。右侧对应区域皮内注射相同体积的PBS作为对照。注射结束后第21天，使用皮肤采样器采集小尾寒羊背部皮肤，－80 ℃冰箱保存。

1.4　PLA-Exos对小尾寒羊皮肤毛囊数量的影响

背部试验区皮肤组织经40 g/L多聚甲醛固定24 h后，依次进行脱水、石蜡包埋及切片处理，切片经HE染色后以中性树胶封片，观察相同皮肤横切面的毛囊数量变化，每张切片随机选取3个视野进行毛囊计数分析。

1.5　小尾寒羊皮肤组织小RNA测序文库构建和转录组测序

从－80 ℃冰箱中随机取3只小尾寒羊的皮肤样本，置于液氮中，在研钵中研磨。用TRIzol试剂提取皮肤总RNA，使用Bowtie软用NanoDrop 2000超微量分光光度计检测RNA纯度和浓度，用Agilent

2100测试RNA完整性。将RNA样本送至北京百迈客生物科技有限公司,经质量控制合格后构建小RNA测序文库,使用Illumina测序平台进行高通量测序。

对测序得到的原始序列(raw reads)进行质量控制,去除不包含3′接头的序列,排除非目标片段,保留真正的目的片段,然后去除3′接头,仅保留长度在18~30个核苷酸的序列;由于碱基质量值越高碱基识别越准确,识别错误率越低,因此进一步将碱基质量值(Q-score)低的序列去掉,过滤掉N含量≥10%的序列(即含有太多未定碱基的读段一律剔除),获得有效序列(clean reads),计算Q30碱基占比。

1.6 小尾寒羊皮肤组织miRNA鉴定

利用Bowtie将有效序列分别与Silva、GtRNAdb、Rfam以及Repbase数据库进行序列比对,过滤掉核糖体RNA(rRNA)、转运RNA(tRNA)、核内小RNA(snRNA)、核仁小RNA(snoRNA)等非编码RNA(ncRNA)以及重复序列,得到包含miRNAs的未注释序列。以绵羊参考基因组(Ovis_aries.Oar_v3.1.75)为参照,对过滤后获得的未注释序列进行比对与分析。将成功比对到参考基因组的序列与miRBase(v22)数据库中的已知miRNA成熟体序列进行比对,鉴定样本中的已知miRNA;其余未匹配到已知miRNA的有效序列,采用miRDeep2软件进行新miRNA的预测分析。

1.7 差异表达miRNA鉴定、靶基因预测及生物信息学分析

对各样本中miRNA进行表达量统计,用TPM对miRNA表达量进行归一化处理。以$|\log_2 FC|\geqslant 1$(FC代表差异倍数)、$P\leqslant 0.05$作为筛选标准,采用edgeR进行差异表达分析,获得差异表达miRNA。通过Targetscan和miRanda预测差异表达miRNA的靶基因。利用BLAST对差异表达miRNA的靶基因进行GO、KEGG富集分析。利用Cytoscape可视化差异miRNAs-mRNAs互作网络。

1.8 差异表达miRNA实时荧光定量PCR(RT-qPCR)验证

随机挑选novel-mir-917、novel-mir-797、novel-mir-855、novel-mir-561、novel-mir-816、novel-mir-1192、novel-mir-1119、novel-mir-528、novel-mir-1158、novel-mir-156等10个差异表达miRNA,以*U6*为内参基因,采用RT-qPCR法检测其表达水平。使用加尾法设计各miRNA和*U6*上游引物,下游引物由miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒(SYBR Green,FP411)提供,上游引物序列见表1。PCR反应体系20 μL:miRute Plus miRNA PreMix 10 μL,上游引物与下游引物各0.4 μL,cDNA 1 μL,ddH_2O 8.2 μL。PCR反应程序:95 ℃ 15 min;94 ℃ 20 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 34 s,循环5次;94 ℃ 20 s,60 ℃ 34 s,循环45次。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算miRNA的相对表达量。

表1 差异表达miRNA RT-qPCR验证试验引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR validation of DEmiRNAs

miRNA及内参基因miRNA and reference gene	引物序列(5′→3′) Primer sequences(5′→3′)	miRNA及内参基因miRNA and reference gene	引物序列(5′→3′) Primer sequences(5′→3′)
novel-mir-917	GCGAAGCTGTAGGGTCTTGCCATGC	novel-mir-1119	GCCGCCGAAAAAGTTCAGTTGGGTTCATC
novel-mir-797	CGCCGGCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGA	novel-mir-528	GCGCCAGCTATGGTTCAGAGGAATGAGA
novel-mir-855	GCGCGGCAAAAGTTTGCTCAGGTTTTTCT	novel-mir-1158	CGCCGGCTTGGCCAAAAAGTTCATTTGA
novel-mir-561	GCGCCCGGCGCAAGATTTAAAATAAGATGC	novel-mir-156	GCCGGCTGGTTTCAGGACAGATCTCT
novel-mir-816	GCGCCGAATCTGCAGATGACTTCCATG	*U6*	GTTGAGAGGCGGAGACA
novel-mir-1192	CGTGAGAACCGGGACATCTGGGC		

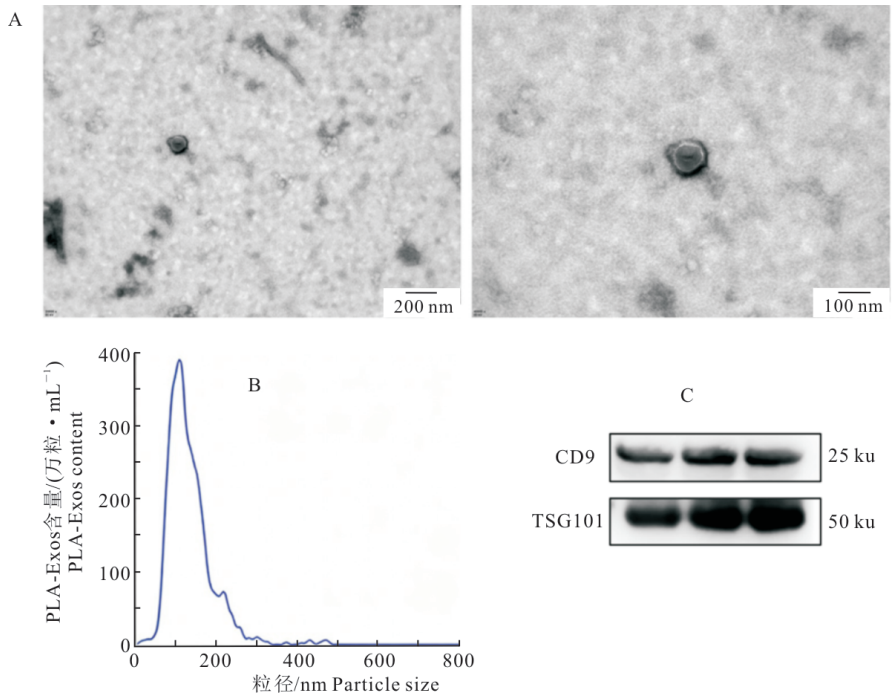
2 结果与分析

2.1 新吉细毛羊PLA-Exos的鉴定

电镜观察显示,样本中存在具有明显膜边界的30~90 nm圆形内凹茶托状结构(图1-A);粒径主要集中在30~150 nm,在106 nm处出现含量峰值(图1-B);Western blot检测结果证实,样本中存在TSG101和CD9蛋白(图1-C)。结果表明,新吉细毛羊PLA-Exos分离成功。

2.2 PLA-Exos处理小尾寒羊背部皮肤组织学观察

PLA-Exos处理后第21天,取试验区域皮肤组织进行HE染色观察,结果如图2所示。由图2可知,在相同视野面积下,与对照组相比,PLA-Exos处理组的次级毛囊数目明显增多。

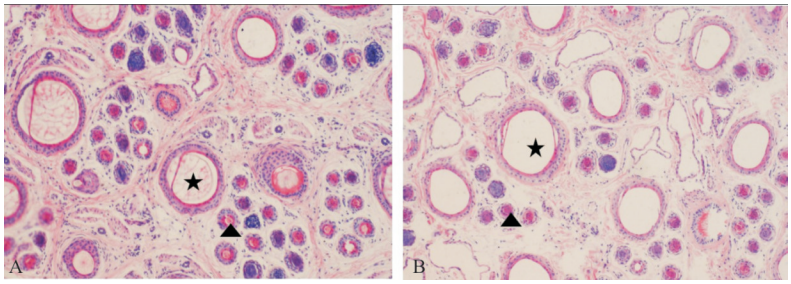


A. PLA-Exos透射电镜观察；B. PLA-Exos颗粒粒径分布；C. PLA-Exos表面标志蛋白 Western blot 检测。

A. Observation of PLA-Exos by transmission electron microscopy (TEM); B. Particle size distribution of PLA-Exos; C. Western blot analysis of surface marker proteins of PLA-Exos

图 1　新吉细毛羊 PLA-Exos 的鉴定结果

Fig. 1　Identification results of PLA-Exos from Xinji fine-wool sheep



A. PLA-Exos组；B. 对照组。★. 初级毛囊；▲. 次级毛囊。

A. PLA-Exos group; B. Control group. ★. Primary hair follicle; ▲. Secondary hair follicle.

图 2　新吉细毛羊 PLA-Exos 对小尾寒羊皮肤组织毛囊的影响(HE，×100)

Fig. 2　Effects of PLA-Exos from Xinji fine-wool sheep on the hair follicles of Small-tailed Han sheep skin tissue(HE，×100)

2.3　PLA-Exos 处理小尾寒羊皮肤转录组测序

由表 2 可知，PLA-Exos 组和对照组 3 个样本样品文库分别获得了 71 443 166 和 87 160 401 原始序列，经质控后分别得到 71 437 074 和 87 153 786 有效序列，Q30 碱基占比的平均值为 97.70% 和 97.34%。

表 2　新吉细毛羊 PLA-Exos 处理小尾寒羊皮肤转录组测序结果

Table 2　Results of transcriptome sequencing analysis of Small-tailed Han sheep skin treated with Xinji fine-wool sheep PLA-Exos

样本 Sample	处理 Treatment	原始序列 Raw reads	有效序列 Clean reads	Q30碱基占比/% Percentage of Q30 bases
样本 1 Sample 1	血浆外泌体 PLA-Exos	29 033 660	29 031 206	97.80
	对照 Control	36 975 333	36 972 892	97.87
样本 2 Sample 2	血浆外泌体 PLA-Exos	20 736 875	20 735 026	97.58
	对照 Control	22 636 658	22 634 947	97.66
样本 3 Sample 3	血浆外泌体 PLA-Exos	21 672 631	21 670 842	97.73
	对照 Control	27 548 410	27 545 947	96.50

2.4 PLA-Exos处理小尾寒羊皮肤组织差异表达miRNA的筛选

从皮肤组织中共鉴定出1 474个miRNA,其中已知miRNA 146个,新预测miRNA 1 328个;PLA-Exos组较对照组共筛选出18个差异表达miRNA,其中novel-mir-335、novel-mir-957、novel-mir-855、novel-mir-561、novel-mir-797、novel-mir-1158、novel-mir-917、novel-mir-816、novel-mir-1119、novel-mir-616、novel-mir-1192、novel-mir-528、novel-mir-451和novel-mir-478上调表达,novel-mir-1170、novel-mir-965、novel-mir-1352和novel-mir-156下调表达。

2.5 差异表达miRNA靶基因预测与分析

对18个差异表达miRNA进行靶基因预测,共获得493个靶基因(mRNAs)。对差异miRNA靶基因进行GO功能注释分析,结果(图3)显示,在生物学过程中,差异表达miRNA的靶基因主要涉及细胞过程、单一生物过程、生物调控、代谢过程、对刺激的反应等条目;在细胞组分中,差异表达miRNA的靶基因主要涉及细胞、细胞部分、细胞器等条目;在分子功能中,差异表达miRNA的靶基因主要涉及结合、催化活性、分子转导活性等条目。

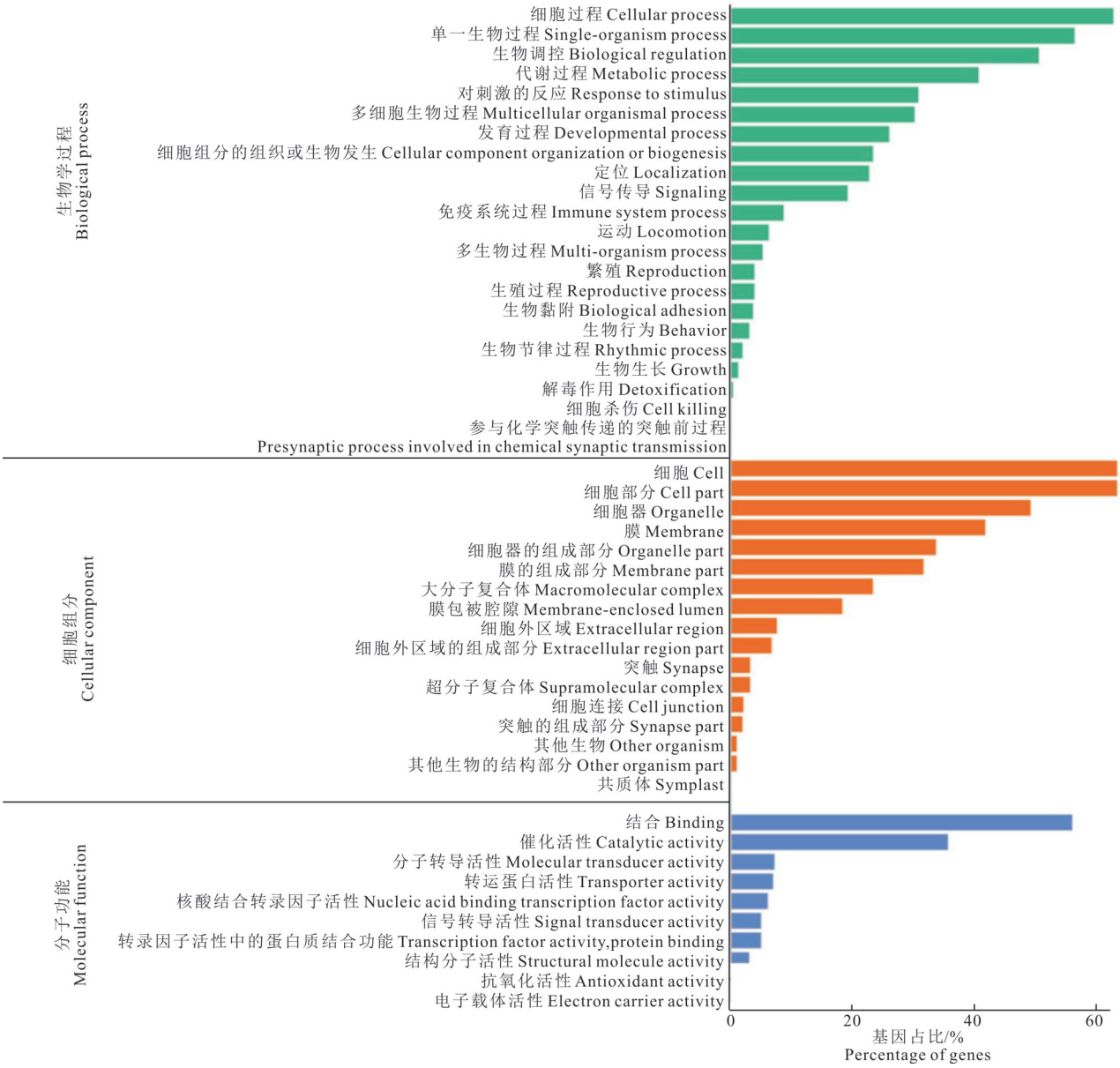
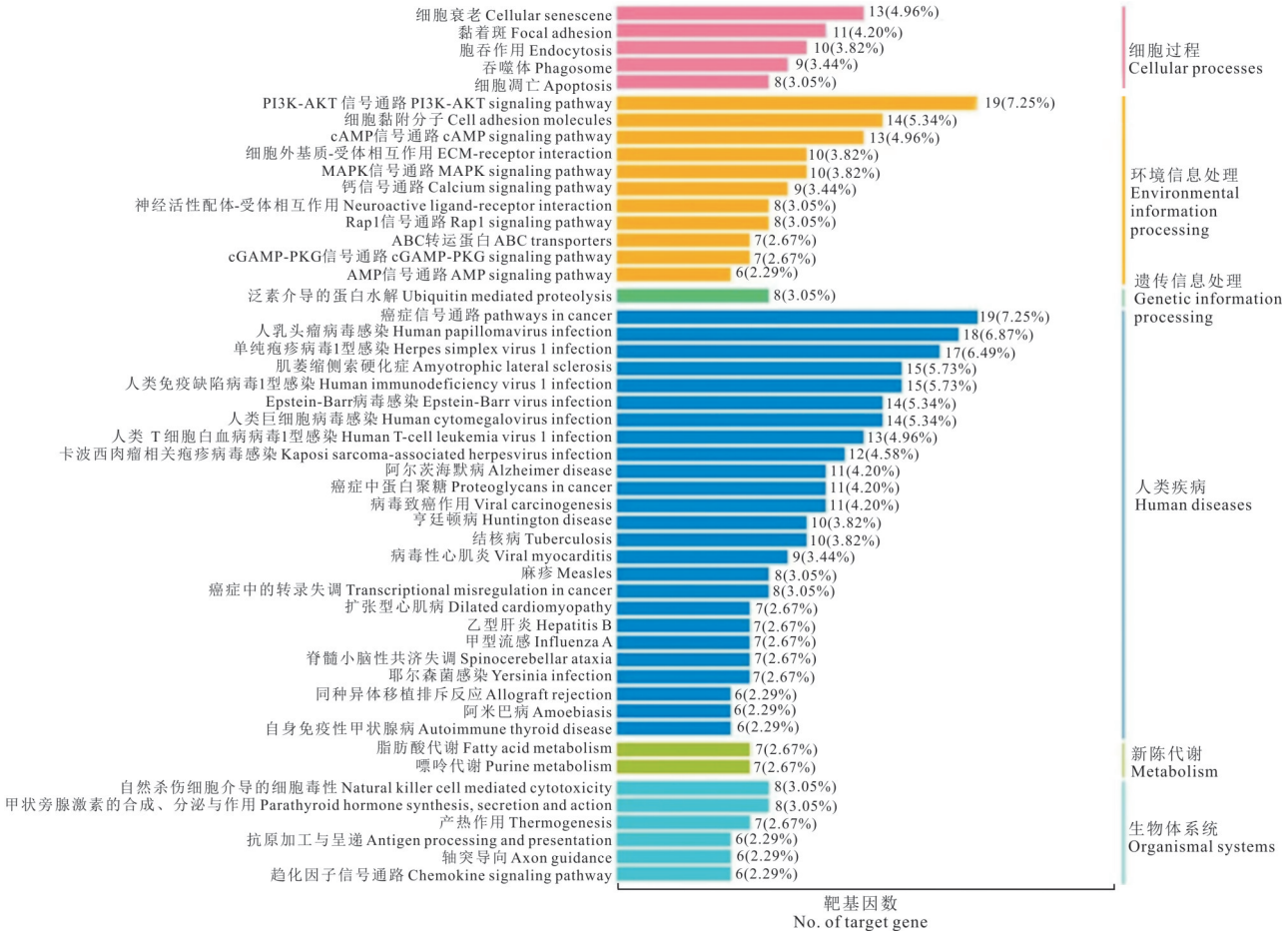


图3 新吉细毛羊PLA-Exos处理小尾寒羊皮肤差异表达miRNA靶基因GO注释分类统计图

Fig. 3 GO annotation classification statistics of target genes for DEmiRNAs in Small-tailed Han sheep skin treated with Xinji fine-wool sheep PLA-Exos

对 18 个差异表达 miRNA 的靶基因进行 KEGG 分析，结果（图 4）显示，相关通路主要分属细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、新陈代谢和生物体系统等 6 类，与毛囊发育相关的 MAPK 信号通路显著富集（$P<0.05$）。本研究 KEGG 富集分析中，差异 miRNAs 靶基因富集到 Wnt 信号通路，但未达到显著富集（$P>0.05$），考虑到 Wnt 信号通路在毛囊发育和周期中具有重要调控作用[13]，因此对 18 个差异表达 miRNA 富集在毛囊发育经典通路 MAPK 和 Wnt 信号通路的靶基因作蛋白互作分析，结果见图 5。图 5 中 NF1、MAP3K2 参与调控 MAPK 信号通路，在细胞生长、分化和增殖中起重要作用。Wnt 信号通路中 EP300 参与染色质重塑和基因转录调控，在细胞周期、分化和凋亡中起作用。DUSP10 可通过去磷酸化作用调控 MAPK 信号通路成员，影响细胞增殖、分化和应激反应。



括号中数据为靶基因占比。

Data in the braket indicate the percentage of target gene.

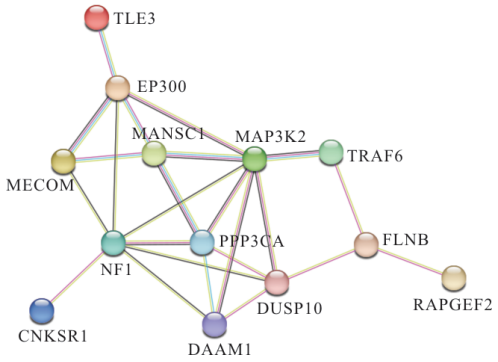
图 4　新吉细毛羊 PLA-Exos 处理小尾寒羊皮肤差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 分析

Fig. 4　KEGG analysis of target genes for DEmiRNAs in Small-tailed Han sheep skin treated with Xinji fine-wool sheep PLA-Exos

使用 Cytoscape 软件绘制富集在毛囊发育经典信号通路的 miRNA 与靶基因（mRNAs）互作图，结果（图 6）表明，novel-mir-957、novel-mir-335、novel-mir-1192、novel-mir-797、novel-mir-917、novel-mir-156 和 novel-mir-451 相关靶基因分别为 1，1，2，2，2，3 和 3 个。

2.6　差异表达 miRNA 的 RT-qPCR 验证

新吉细毛羊 PLA-Exos 处理小尾寒羊皮肤差异表达 miRNA 的 RT-qPCR 验证结果见图 7。图 7 结果显示，PLA-Exos 组 novel-mir-917、novel-mir-797、novel-mir-855、novel-mir-561、novel-mir-816、novel-mir-1192、novel-mir-1119、novel-mir-528、novel-mir-1158 相对表达量较对照组显著或极显著上调，而 novel-mir-156 极显著下调，与转录组测序（RNA-seq）结果趋势一致，说明转录组测序结果是准确可靠的。



TLE3. 转录因子样增强子3;EP300. 组蛋白乙酰转移酶p300;MECOM. MDS1和EVI1复合基因座;MANSC1. 含有MANS结构域的蛋白1;MAP3K2. 丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶2;TRAF6. 肿瘤坏死因子受体相关因子6;NF1. 神经纤维瘤蛋白1;PPP3CA. 蛋白磷酸酶3催化亚基α;CNKSR1. 激酶抑制因子Ras信号的连接器增强子1;DAAM1. 解体蛋白相关形态发生蛋白1;DUSP10. 双特异性磷酸酶10;FLNB. 细丝蛋白B;RAPGEF2. Rap鸟嘌呤核苷酸交换因子2。

TLE3. Transducin-like enhancer protein 3;EP300. Histone acetyltransferase p300;MECOM. MDS1 and EVI1 complex locus;MANSC1. MANS domain-containing protein 1;MAP3K2. Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2;TRAF6. TNF receptor-associated factor 6;NF1. Neurofibromin 1;PPP3CA. Protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha;CNKSR1. Connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1;DAAM1. Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1;DUSP10. Dual specificity phosphatase 10;FLNB. Filamin B;RAPGEF2. Rap guanine nucleotide exchange factor 2.

图5 新吉细毛羊PLA-Exos处理小尾寒羊皮肤差异表达miRNA靶基因蛋白互作分析

Fig. 5 Protein interaction analysis diagram of target genes for DEmiRNAs in Small-tailed Han sheep skin treated with Xinji fine-wool sheep PLA-Exos

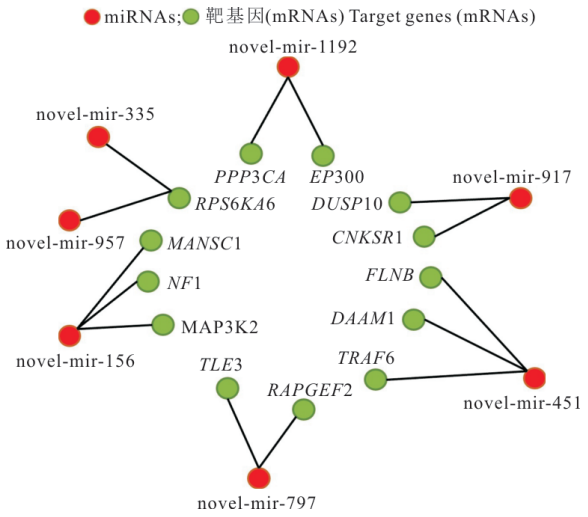
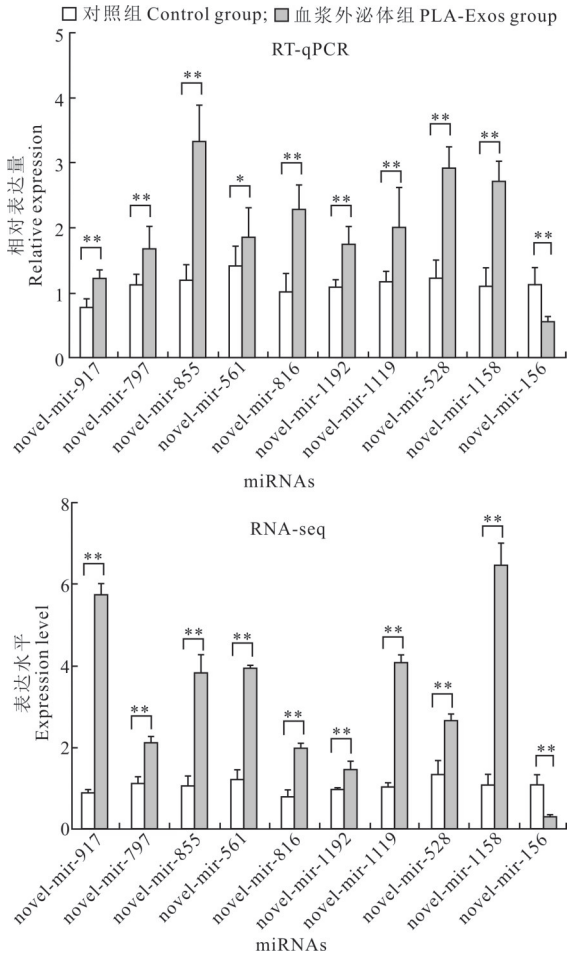


图6 新吉细毛羊PLA-Exos处理小尾寒羊毛囊发育相关miRNA与其靶基因互作图

Fig. 6 Interaction network of miRNA related to hair follicle development and its target genes of Small-tailed Han sheep treated with Xinji fine-wool sheep PLA-Exos



*. 表示差异显著($P<0.05$);**. 表示差异极显著($P<0.01$)。

*. Indicates significant difference($P<0.05$);**. Indicates extremely significant difference($P<0.01$).

图7 新吉细毛羊PLA-Exos处理小尾寒羊皮肤差异表达miRNA的RT-qPCR验证

Fig. 7 RT-qPCR validation of DEmiRNAs in Small-tailed Han sheep skin treated with Xinji fine-wool sheep PLA-Exos

3 讨 论

毛囊是皮肤的附属结构,具有周期性再生特性,其形态发生过程和周期循环受到毛乳头细胞、毛囊干细胞及其微环境的精密调控[14]。外泌体作为毛囊细胞群间通讯的关键载体,通过传递蛋白质、核酸和脂质等生物活性分子在毛囊发育、周期调控和再生过程中发挥重要作用[15]。研究表明,毛乳头细胞来源的外泌体通过递送特定miRNAs激活Wnt/β-catenin、BMP等信号通路,促进毛囊干细胞增殖与分化,并使毛囊从休止期向生长期转换[16]。这说明外泌体通过调节毛囊周围细胞生成和免疫微环境间接影响毛囊的生理状态[17]。

XUN等[18]研究发现,年轻大鼠的血清外泌体能

够逆转老年个体骨髓间充质干细胞成骨能力的衰退。本研究发现，新吉细毛羊PLA-Exos能显著促进小尾寒羊皮肤毛囊数量增加（$P<0.05$），这提示新吉细毛羊PLA-Exos具有物种特异性miRNAs，这些miRNAs在跨种外泌体调控时使受体表现出供体的表型特征，试验结果不仅印证本课题组前期研究成果[12]，更是将XUN等[17]的研究从个体层面拓展至物种层面。由于miRNAs在不同物种间具有高度保守性[19]，因此本研究的意义不仅仅局限于绵羊毛用性状育种方面，还可基于本研究结果进一步挖掘新吉细毛羊参与调控毛囊发育的特异miRNAs，为开发新型的毛囊再生策略奠定理论基础。WANG等[20]研究表明，miR-199a-3p可通过PTPRF/β-catenin轴调控羔羊和小鼠毛发的发育，这为斑秃疾病提供了跨物种miRNAs治疗靶点。

本研究通过转录组测序共鉴定出146个已知miRNA和1 328个新miRNA，并成功预测到novel-mir-1192、novel-mir-1158、novel-mir-156、novel-mir-917、novel-mir-797和novel-mir-451及其潜在的靶基因可参与调控毛囊发育。miRNA在毛囊周期调控中的作用已有较多报道[21-22]，如miR-22通过下调Wnt/β-catenin通路抑制毛发再生[23]。本研究中，差异表达miRNA预测到的*NF*1、*MAP*3*K*2等靶基因富集在与毛囊调控有关的MAPK通路。MAPK通路在毛囊发育的多个阶段具有调控功能，ERK1/2亚通路的激活可促进毛囊干细胞增殖[24]，通过调节SIRT1/JNK/p38 MAPK通路能够改善雄激素过高导致的脱发[25]。多个新miRNA可能通过解除MAPK通路抑制而促进毛囊发育，例如，novel-mir-156的潜在靶基因为*NF*1，该基因是Ras-MAPK通路的关键负调控因子，其表达抑制可解除Ras的负向调控作用，进而诱导下游MAPK信号级联反应的持续活化[26]，提示novel-mir-156可能是该通路激活的总开关。novel-mir-1158可能靶向*MAP*3*K*2基因，该基因编码产物可激活MAPK通路，提高ERK1/2等关键信号分子的磷酸化水平[27]，从而促进毛囊干细胞增殖。此外，novel-mir-917的潜在靶基因为*DUSP*10，DUSP10可特异性使p38和JNK去磷酸化而失活，抑制DUSP10后novel-mir-917可能增强p38/JNK MAPK信号的强度与持续时间[28]。综上，这些miRNA共同构成一个多层次去抑制调控网络：novel-mir-156解除基础抑制状态，novel-mir-1158直接激活上游信号，而novel-mir-917则通过削弱负反馈机制增强并维持信号输出，最终协同促进ERK1/2等亚通路活化，从而有效驱动毛乳头细胞、毛囊干细胞的增殖与分化。

有研究证实，Wnt信号通路是毛囊发育的核心通路[13]。脂肪来源的干细胞外泌体[29-30]通过激活Wnt/β-catenin通路来拮抗二氢睾酮对毛囊生长的抑制作用；视黄酸通过Wnt/β-catenin信号传导驱动毛囊干细胞活化来治疗雄激素过高性脱发[31]；毛囊真皮细胞的外泌体miRNA-181a-5p可通过Wnt/β-catenin信号通路促进毛囊生长和发育[32]。本研究发现，差异miRNAs靶基因富集到Wnt信号通路，novel-mir-1192靶基因*EP*300参与染色质重塑和基因转录调控[33]，其可能通过修饰β-catenin或其靶基因的染色质状态，间接调控Wnt通路的转录活性。结果提示，PLA-Exos可能通过miRNAs影响染色质结构和基因转录，以间接方式参与Wnt信号通路的调控。

新发现的miRNA不仅具有独特的序列特征和表达模式，其进化保守性与组织特异性更为解析绵羊毛囊发育的物种特异性调控机制提供了重要线索[34]。差异表达的新miRNA，如novel-mir-1158等，其靶基因显著富集于毛囊周期调控相关通路，表明这些miRNA可能作为关键的调控因子参与毛囊发育过程。这一发现不仅丰富了毛囊发育的分子调控网络，也为绵羊毛用性状的遗传改良及毛囊再生研究提供了新的候选靶点与理论依据。

4　结　论

新吉细毛羊PLA-Exos具有促进小尾寒羊毛囊发育的生物学功能。转录组测序分析共鉴定出18个差异表达miRNA，其中novel-mir-1192、novel-mir-1158、novel-mir-156、novel-mir-917、novel-mir-797和novel-mir-451被确定为调控毛囊发育的关键miRNA，这些miRNA可能通过MAPK和Wnt等信号通路调控靶基因表达，进而影响毛囊细胞的增殖与分化过程，对绵羊毛发生长有重要影响。

[参考文献]

[1] PETERSON A，NAIR L S. Hair follicle stem cells for tissue regeneration[J]. Tissue Engineering Part B：Reviews，2022，28(4)：695-706.

[2] 马海叶. 中国美利奴羊毛密度性状相关基因的筛选[D]. 乌鲁木齐：新疆农业大学，2024.
MA H Y. Screening of genes associated with wool density traits in Chinese Merino[D]. Urumqi：Xinjiang Agricultural Univer-

sity,2024.

[3] ZHANG J,LI S,LI L,et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function [J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics,2015,13(1):17-24.

[4] ZHOU L,WANG H,JING J,et al. Regulation of hair follicle development by exosomes derived from dermal papilla cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2018,500(2):325-332.

[5] 李燕巧. 脂肪干细胞外泌体(ADSC-Exos)促进毛发再生的作用及机制研究[D]. 上海:同济大学, 2022.
LI Y Q. The effect and mechanism study of exosomes from adipose-derived stem cell on hair regeneration [D]. Shanghai: Tongji University,2022.

[6] YANG C,HAN J,LIU H,et al. Storage of plasma-derived exosomes: evaluation of anticoagulant use and preserving temperatures [J]. Platelets,2024,35(1):2337255.

[7] ABDIN R,ZHANG Y,JIMENEZ J J. Treatment of androgenetic alopecia using PRP to target dysregulated mechanisms and pathways [J]. Frontiers in Medicine,2022,9:843127.

[8] NILFOROUSHZADEH M A,AGHDAMI N,TAGHIABADI E. Effects of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma exosomes on the inductivity of hair dermal papilla cells[J]. Cell Journal,2021,23(5):576-583.

[9] LU C,DING Y,ZHANG R,et al. Platelet-rich plasma-derived exosomes stimulate hair follicle growth through activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Regenerative Therapy,2025,29:435-446.

[10] PANCHAPRATEEP R. Medical treatment for androgenetic alopecia [J]. Facial Plastic Surgery,2024,40(2):252-266.

[11] 张立春,孙福亮,金海国,等. 小尾寒羊与新吉细毛羊羊毛及毛囊性状比较研究[J]. 中国畜牧杂志,2017,53(9):52-56.
ZHANG L C,SUN F L,JIN H G,et al. Comparative study on wool and hair follicle traits of Small-tailed Han sheep and Xinji fine-wool sheep[J]. Chinese Journal of Animal Science,2017,53(9):52-56.

[12] 张新玉. 新吉细毛羊和小尾寒羊血浆外泌体差异oar-miR-218促进毛发生长作用研究[D]. 吉林延吉:延边大学,2024.
ZHANG X Y. Plasma exosome differences between Xinji fine-wool sheep and Small-tailed Han sheep on the role of oar-miR-218 in promoting hair growth[D]. Yanji,Jilin:Yanbian University,2024.

[13] YU A,ZHANG Y,ZHONG S,et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes enhance follicular regeneration in androgenetic alopecia via activation of Wnt/β-catenin pathway[J]. Stem Cell Research & Therapy,2025,16(1):418.

[14] PARK A M,KHAN S,RAWNSLEY J. Hair biology: growth and pigmentation[J]. Facial Plastic Surgery Clinics of North America,2018,26(4):415-424.

[15] LI Y,WANG G,WANG Q,et al. Exosomes secreted from adipose-derived stem cells are a potential treatment agent for immune-mediated alopecia [J]. Journal of Immunology Research,2022,2022:7471246.

[16] HU S,LI Z,LUTZ H,et al. Dermal exosomes containing miR-218-5p promote hair regeneration by regulating β-catenin signaling [J]. Science Advances,2020,6(30):eaba1685.

[17] SHANG Y,LI M,ZHANG L,et al. Exosomes derived from mouse vibrissa dermal papilla cells promote hair follicle regeneration during wound healing by activating Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2024, 22(1):425.

[18] XUN J,LI C,LIU M,et al. Serum exosomes from young rats improve the reduced osteogenic differentiation of BMSCs in aged rats with osteoporosis after fatigue loading *in vivo*[J]. Stem Cell Research & Therapy,2021,12(1):424.

[19] ZHANG X, WANG W, FAN W, et al. Alteration of hair growth in mice by circulating exosomes from Xinji fine-wool and Small-tailed Han sheep[J]. Frontiers in Animal Science, 2025,6:1562392.

[20] WANG J K,MA Y H,LI T,et al. MiR-199a-3p regulates the PTPRF/β-Catenin axis in hair follicle development: insights into the pathogenic mechanism of alopecia areata [J/OL]. International Journal of Molecular Sciences, (2023-12-18)[2025-07-15]. https://www.x-mol.com/paper/1736983657726054400.

[21] CUI H,FU L Q,TENG Y,et al. Human hair follicle mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate UVB-induced photoaging via the miR-125b-5p/TGF-β1/Smad axis[J]. Biomaterials Research,2025,29:0121.

[22] SHI R, CHIANG V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR [J]. BioTechniques, 2005,39(4):519-525.

[23] YUAN S,ZHANG P,WEN L,et al. miR-22 promotes stem cell traits via activating Wnt/β-catenin signaling in cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Oncogene,2021,40(39):5799-5813.

[24] XIAO L,ZHANG X,CHEN Z,et al. ERK1/2 pathway is involved in the enhancement of fatty acids from Phaeodactylum tricornutum extract (PTE) on hair follicle cell proliferation [J]. BioMed Research International,2020,2020:2916104.

[25] HUANG Z,LI Y,XIE Y,et al. Jiawei Erzhiwan ameliorates androgenetic alopecia by regulating the SIRT1/JNK/p38 MAPK pathway [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2025,19:2393-2409.

[26] PHILPOTT C, TOVELL H, FRAYLING I M, et al. The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers [J]. Human Genomics,2017,11(1):13.

[27] ZHANG B,WANG D,WANG Y,et al. miRNA-338-3p inhibits the migration, invasion and proliferation of human lung adenocarcinoma cells by targeting MAP3K2 [J]. Aging,2022,14(15):6094-6110.

(下转第57页)