

# 利用数字基因表达谱对鸡卵泡发育相关基因的筛选

朱桂玉

(泰山学院 生物与酿酒工程学院, 山东 泰安 271021)

**摘要:** 为筛选禽类卵泡募集、等级化维持及排卵过程中的关键基因,通过数字基因表达谱检测鸡卵巢内等级前小白卵泡(SWF)和发育到最大期的等级卵泡(F1)中的差异表达基因。结果显示,随着卵泡的成熟,显著上调表达的基因有 784 个,显著下调的基因有 1 526 个。基因表达差异倍数达到 5 倍以上的上调基因包括 *PTGS1*、*TEK*、*VEGF-A*、*MMP-3*、*CDK1* 等;下调基因包括 *β-catenin*、*ZO-1*、*Nectin-3*、*PTPX15*、*Gadd45* 等。对差异表达基因进行基因本体(GO)生物学分析和信号通路显著富集分析发现,差异表达的基因所编码的蛋白主要参与生物学催化反应、分子连接、转移酶活性、水解等生物学过程;主要与细胞黏合通路、p53 信号通路、蛋白合成通路及细胞周期通路等信号通路有关。对卵泡发育过程中的基质金属蛋白酶家族(MMPs)的 *MMP-3* 与 *MMP-9* 基因表达变化进行测定发现,*MMP-3* 基因表达量在卵泡发育过程中显著升高,排卵后的卵泡中显著下降;*MMP-9* 基因表达量则持续显著升高,在排卵后第 2 天的卵泡中下降,但下降不明显。

**关键词:** 鸡; 卵泡; 数字基因表达谱; 差异表达基因; 基质金属蛋白酶

**中图分类号:** S831.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2014)10-0117-06

## Screening of Genes Related to Follicles Development Using Digital Gene Expression Profiling in Chicken

ZHU Gui-yu

(Department of Biology Science and Technology, Taishan University, Tai'an 271021, China)

**Abstract:** To identify the key genes involved in follicular recruitment, hierarchies and ovulation, the differently expressed genes profile in pre-hierarchical follicles (small white follicles, SWF) and the pre-ovulatory follicles (the first largest follicle, F1) were obtained by using Solexa/Illumina RNA-seq. In this study, 784 up-regulated and 1 526 down-regulated genes in F1 follicles were identified compared to SWF follicles. The genes up-regulated more than five folds included *PTGS1*, *TEK*, *VEGF-A*, *MMP-3* and *CDK1*. As the same down-regulated genes included *β-catenin*, *ZO-1*, *Nectin-3*, *PTPX15* and *Gadd45*. GO analysis indicated that the protein encoded by the differently expressed genes mainly involved in biological processes including activation of different transferases, molecular connectivity enzymatic hydrolysis and proteolysis. The pathway analysis suggested that the differently expressed genes mainly took part in cell adherence junction, p53 pathway, protein synthesis, and cell cycle pathways during follicle development. Furthermore, the expression patterns of *MMP-3* and *MMP-9* genes in chicken hierarchy follicles showed that the two genes expression levels increased during follicular maturation, *MMP-3* expression level reached maximum in the first largest follicle (F1), while *MMP-9* expression level continued to rise in POF1 and POF2 after ovulation.

**Key words:** chicken; follicle; digital gene expression profiling; differential expression genes; MMP

收稿日期: 2014-05-12

基金项目: 国家青年自然科学基金项目(31301974); 泰山学院引进人才项目(Y-01-2014015)

作者简介: 朱桂玉(1976-), 女, 山东泰安人, 讲师, 博士, 主要从事动物繁殖育种工作。E-mail: zgy0706@163.com

网络出版时间: 2014-10-11 10:58:00

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/41.1092.S.20141011.1058.001.html>

近年来,随着人们对蛋类食品消费量的增加以及劳动力成本的升高,家禽生产企业在蛋禽育种时,尽量选育高繁殖性能的个体,以提高产蛋效率 and 经济效益<sup>[1]</sup>。而母禽的繁殖性能特别是产蛋率的高低,主要取决于卵巢内卵泡的正常发育和排卵。禽类卵巢,只有一侧发育,无发情周期和妊娠期,在一定时间内卵巢上有卵泡连续发育并排卵。性成熟后,卵巢含有不同发育阶段的许多卵泡,包括 4~6 个伸向腹腔的体积依次递减的大型等级卵泡(分别用 F1、F2、F3...表示)和无数等级前小卵泡,前者最大直径可达 40 mm,呈黄色;后者直径约为 1~2 mm,呈珠白色,称为小白卵泡<sup>[2-3]</sup>。在这些直径大小不等的卵泡中,6~8 mm 发育状态的卵泡群,是选择进入优先等级卵泡的关键点<sup>[4]</sup>。等级选择后,一部分卵泡将逐渐走向闭锁,另一部分则进入排卵前优势化等级卵泡,并依次发育成熟并排卵<sup>[5]</sup>。由此可以推测,在同一个卵巢内要持续的排卵,必须有精细的机制对各种卵泡的选择和发育过程进行准确调控。

目前,国内外学者对鸡卵泡募集、选择和发育的作用机制进行了初步研究,并找到了一些与鸡繁殖性能关联的分子标记<sup>[6-7]</sup>和表达序列标签(EST)<sup>[8]</sup>,但至今仍未能准确探明控制鸡卵泡发育及等级化维持的重要功能基因。数字基因表达谱是新一代高通量测序技术,通过高效酶切获取每条 mRNA 的特定标签,对样本中数以百万计的 mRNA 标签进行序列测定,从而对基因表达情况进行全面、经济、快速地数字化分析<sup>[9]</sup>。如今,随着科技的不断创新,Solexa 测序的数字基因表达谱技术已被广泛应用于生命科学研究等领域<sup>[10-11]</sup>。本研究采用 Solexa/Illumina 测序方法对鸡等级前小白卵泡(small white follicles,SWF)和发育最大的等级卵泡 F1(the first largest follicles,F1)的差异表达基因进行了研究,筛选随卵泡发育而差异表达的基因和信号通路,并对参与卵泡发育过程中胞外基质水解的基质金属蛋白酶(MMPs)家族的 MMP-3 与 MMP-9 基因进行表达变化研究,旨在为今后研究鸡卵泡等级化维持和排卵功能奠定基础,为改善鸡的繁殖性能和提高持续产蛋能力等提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试动物及卵泡采集

5 只规律产蛋 2 周后的海兰褐鸡(23 周龄)购自

泰安市赵家庄养鸡厂,宰杀后取卵巢的各级卵泡组织,包括 SWF、等级卵泡(ovulatory follicles,F1—F4)及排卵后卵泡(post-ovulatory follicles,POF1—POF2),迅速投入液氮,-70℃保存。其中 SWF 和 F1 卵泡组织用于表达谱测序,SWF、F1—F4 及 POF1—POF2 卵泡组织用于 MMP-3 与 MMP-9 基因的定量表达分析。

### 1.2 主要试剂及仪器

TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;RNA 提取试剂盒、Oligo(dT)磁珠和 Nla III 均购自美国 Qiagen 公司;SYBR Premix Ex Taq 定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;逆转录试剂盒购自美国 Roche 公司;其他试剂均为国产分析纯。

PCR 扩增仪、分光光度计购自德国 Eppendorf 公司;荧光定量 PCR 仪购自德国 Stratagene 公司。

### 1.3 鸡卵泡的 Solexa/Illumina 测序

1.3.1 RNA 的提取与纯化 根据 TRIzol 试剂盒的具体说明提取 SWF 和 F1 卵泡组织总 RNA,纯化后使用分光光度计检测总 RNA 的浓度和纯度。

1.3.2 测序文库的构建及测序 提取后的总 RNA,利用 Oligo(dT)磁珠吸附纯化 mRNA,并以 Oligo(dT)引导反转录合成双链 cDNA。标签 5'末端可用内切酶 Nla III 实现,它识别并切断 cDNA 上的 CATG 位点,利用磁珠纯化带有 cDNA 3'端的片段,将其 5'末端连接 Illumina 接头 1。通过磁珠去除 3'片段后,在标签 3'末端连接 Illumina 接头 2,从而获得两端连有不同接头序列的 21 bp 标签文库。PCR 扩增后,通过 6% TBE 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化碱基条带,解链后,单链分子被加到 Solexa 测序芯片上并固定,每条分子经过原位扩增成为一个单分子簇测序模板,加入 4 色荧光标记的 4 种核苷酸,采用边合成边测序法。测序由深圳华大基因研究所完成。

1.3.3 表达谱数据分析 测序所得的原始数据经去接头、去低质量序列处理后得到高纯度序列。将高纯度短序列与参考基因序列比对,参考序列为鸡基因组序列,参照 Mortazavi 等<sup>[12]</sup>差异基因检测方法筛选两样本间的差异表达基因,即选取错误发现率(FDR)≤0.001 且试验组基因表达量/对照组基因表达量≥1(倍数差异不低于 2 倍)的基因;然后进行后续生物学过程基因本体(GO)分析,并利用 MAS 系统进行 Pathway 显著性富集分析。

#### 1.4 MMP-3 和 MMP-9 基因在不同发育时期卵泡中的表达量分析

1.4.1 引物序列设计及合成 根据 GenBank 中鸡 MMP-3 的 mRNA 序列(XM\_417175.2)、MMP-9 的 mRNA 序列(NM\_204667.1)和持家基因 GAPDH 的 mRNA 序列(NM\_204305.1),在各自的跨外显子区设计特异的实时荧光定量 PCR 引物(表 1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 MMP-3、MMP-9 和 GAPDH 基因的  
荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	扩增长度/bp	退火温度/℃
MMP-3	ATCAGGCTCTACAGTGGTG	275	59
	ATGGGATACATCAAGGCAC		
MMP-9	ATGAAGTACTCCCCGACCTG	258	59
	AGTCCAGAACTCATCATCATCG		
GAPDH	GAGAAACCAGCCAAGTATGATG	106	56
	CACAGGAGACAACCTGGTCC		

1.4.2 RNA 提取及 cDNA 合成 根据 Qiagen 公司的 RNA 提取试剂盒说明提取 SWF、F1—F4 及 POF1—POF2 等卵泡组织的 RNA。根据 Roche 反转录试剂盒的说明,取 1  $\mu$ g 总 RNA,以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物,按试剂盒说明进行反转录生成 cDNA,放于 -20℃ 保存。

1.4.3 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 按照 SYBR Premix Ex Taq 定量试剂盒说明进行,反应体系为:cDNA 2  $\mu$ L、上下游引物各 0.1  $\mu$ L、Rox 0.3  $\mu$ L,用水补充至 15  $\mu$ L。反应程序为:95℃ 10 min; 95℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 30 s,40 个循环;72℃ 10 min。以 GAPDH 做为内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  的方法计算基因的相对表达量。

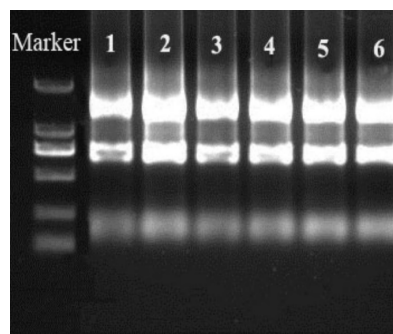
#### 1.5 数据分析

利用 SPSS 13.0 软件进行数据统计分析,各组数据用平均数±标准误表示,不同组之间利用单因素方差 ANOVA 和邓肯氏检验进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

#### 2.1 SWF 和 F1 卵泡 RNA 的提取质量检测

用紫外分光光度计检测提取的 SWF 及 F1 卵泡 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值,其比值在 1.8 左右。表明提取的 RNA 无 DNA 及蛋白质污染。总 RNA 的凝胶电泳结果显示清晰的 28S 与 18S 条带,同时还可以看到较弱的 5S 条带,说明 RNA 质量良好,符合 RNA 测序要求。



1—3. SWF; 4—6. F1

图 1 SWF 和 F1 卵泡中提取的总 RNA

#### 2.2 鸡卵泡发育过程中的差异表达基因数量

测序结果显示,以 SWF 中基因表达量为对照,在 F1 中共筛选出随卵泡发育上调表达基因 784 个,下调表达基因 1 526 个。上调表达基因中,表达量差异倍数在 5 倍以上的基因为 634 个,在 2~5 倍的基因为 150 个。下调表达基因中,表达量差异倍数在 5 倍以上的基因为 820 个,在 2~5 倍的基因为 706 个。图 2 为差异表达基因的标签分布。

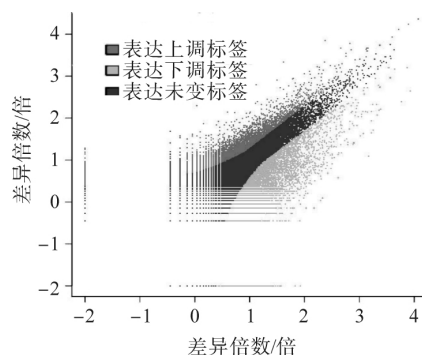


图 2 SWF 和 F1 卵泡中差异表达基因标签分布

#### 2.3 鸡卵泡发育过程中与繁殖相关的差异表达基因

以 SWF 中的基因表达量为对照,选取随卵泡发育差异表达倍数较大( $\geq 5$  倍)且与繁殖功能相关的代表性基因 10 个(表 2)。其中,在上调表达基因中,激素合成的酶基因 PTGS1 表达量差异倍数最大为 9.1 倍,血管生成的一些受体因子 TEK 和 VEGF-A 基因表达量差异倍数分别为 6.1 倍和 5.7 倍,MMP-3 和 CDK1 基因随卵泡发育表达量分别上调 5.1 倍和 5.0 倍,说明这些基因可能在鸡卵泡发育和成熟过程中起重要的促进作用。在下调表达基因中,包括细胞黏合连接通路中的  $\beta$ -catenin、ZO-1 与 Nectin-3 基因,分别下调 6.2、5.7、5.3 倍,PTPN5 下调倍数为 5.2,p53 通路中的 Gadd45 基因表达下调 5.1 倍,说明这些基因有可能在鸡卵泡的成熟和发育过程中起抑制作用。

表 2 鸡卵泡发育过程中与繁殖相关的差异表达基因

基因	上/下调	倍数/倍	基因注释
<i>PTGS1</i>	上调	9.1	前列腺素内过氧化物合酶 1
<i>TEK</i>	上调	6.1	血管生成素受体
<i>VEGF-A</i>	上调	5.7	血管内皮生长因子
<i>MMP-3</i>	上调	5.1	基质金属蛋白酶 3
<i>CDK1</i>	上调	5.0	细胞周期依赖性激酶 1
<i><math>\beta</math>-catenin</i>	下调	6.2	$\beta$ -连接蛋白
<i>ZO-1</i>	下调	5.7	紧密连接蛋白
<i>Nectin-3</i>	下调	5.3	基质黏附蛋白 3
<i>PTPN5</i>	下调	5.2	酪氨酸蛋白激酶受体
<i>Gadd45</i>	下调	5.1	生长抑制及 DNA 损伤诱导基因

## 2.4 鸡卵泡发育相关差异表达基因的 GO 功能富集分析

由图 3 可知,在卵泡发育过程中,69.2% 的差异表达基因编码的蛋白具有催化活性;53.4% 参与分子连接,包括蛋白质、核苷酸、脂质等之间的结合;28.0% 具有转移酶活性,包括氧化还原酶、甲基转移酶、肽酶、磷酸酶等;21.0% 参与水解等生物学功能过程。

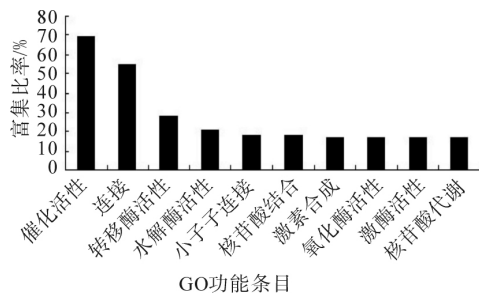


图 3 鸡卵泡发育相关差异表达基因 GO 功能富集分析

## 2.5 鸡卵泡发育相关差异表达基因的 Pathway 显著富集分析

Pathway 分析结果显示,以  $P \leq 0.05$  为筛选条件获得了 4 条差异表达基因中显著性富集的信号通路,分别是细胞黏合通路、p53 信号通路、蛋白质合成通路和细胞周期通路(表 3)。其中,细胞黏合通路中 26 个基因在 F1 卵泡中表达量显著上调,10 个基因表达量下调;蛋白质合成通路中在 F1 卵泡中显著性上调表达基因有 4 个,下调表达基因 16 个;细胞周期调控通路中在 F1 卵泡中显著上调表达基因有 6 个,下调表达基因 21 个;p53 信号通路中有 5 个基因在 F1 卵泡中表达量显著上调,16 个基因表达量下调。p53 信号通路有促凋亡和抑增殖作用,基因表达量下调者较多,说明在鸡卵泡发育过程中

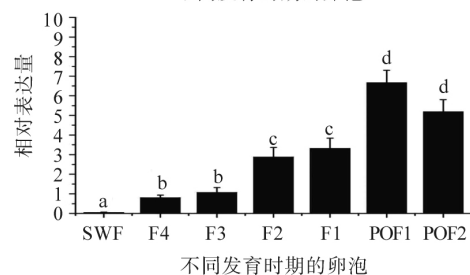
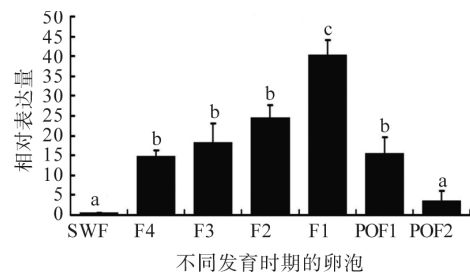
细胞发生凋亡少而出现大量增殖。细胞黏合连接过程中上调表达基因数最多,表明在鸡卵泡发育中细胞发生了重要的细胞黏合过程。

表 3 鸡卵泡发育相关差异表达基因的 Pathway 显著富集分析

信号通路	基因总数/个	上调基因数/个	下调基因数/个	P
细胞黏合	36	26	10	0.000 30
p53	21	5	16	0.000 16
蛋白质合成	20	4	16	0.000 90
细胞周期	27	6	21	0.005 00

## 2.6 MMP-3 和 MMP-9 基因在鸡卵泡发育中的表达变化

表达谱分析发现,在 MMP 家族中 *MMP-3* (差异倍数 5.1 倍)与 *MMP-9* (差异倍数 3 倍)基因在鸡卵泡发育过程中出现差异表达。进一步检测 *MMP-3* 与 *MMP-9* 基因在不同卵泡中的表达量(图 4)发现,*MMP-3*、*MMP-9* 基因在 SWF 中的表达量最低,均随卵泡增大表达量逐渐升高。二者不同的是,*MMP-3* 基因在 F1 中表达量最高,在 POF1 中的表达量显著下调,在 POF2 中的表达量持续显著降低;*MMP-9* 基因在 POF1 中的表达量最高,显著高于 SWF—F1 中的表达量,在 POF2 中的表达量降低,但差异不显著。以上结果表明,*MMP-3* 蛋白酶主要在卵泡成熟排卵过程中发挥作用,*MMP-9* 蛋白酶不仅参与了排卵过程,还有可能在排卵后卵泡的降解吸收过程中起重要作用。



不同字母表示差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )

图 4 *MMP-3* 与 *MMP-9* 基因在卵泡中的表达情况

### 3 结论与讨论

禽类卵巢中的卵泡存在着严格的等级性,其特有的卵泡发育和等级建立是一个由多因素调控的复杂的生物学过程<sup>[13]</sup>。本研究采用 Solexa 表达谱分析技术分析了鸡卵泡发育过程中的 mRNA 表达谱,研究发现在卵泡发育中上调表达基因有 784 个,下调表达基因有 1 526 个。

分析这些差异表达基因的功能发现,它们主要参与催化、酶活性和水解等与细胞生长增殖密切相关的生物学过程。Wyburn 等<sup>[14]</sup>曾指出鸟类卵泡应该是所有高等脊椎动物中生长速度最快的细胞,小白卵泡在短短几天内可增长 150~200 倍发育成熟并排卵。因此,从小白卵泡发育到最大卵泡,卵泡组织发生了明显的细胞生长与组织更新,要求细胞外基质不断降解和重建,这就需要大量催化酶、转移酶与水解酶的参与。这些酶类中,最重要的就是参与胞外基质水解的 MMPs。MMPs 是一类依赖于锌离子、有降解胞外基质能力的内肽酶家族。本研究发现在 MMPs 家族中,只有 MMP-3 和 MMP-9 基因随鸡卵泡发育表达量发生显著变化。进一步研究发现,MMP-3 基因在 F1 卵泡中表达量达到最高,在排卵后的卵泡中表达显著下调;MMP-9 基因也随卵泡发育成熟表达量升高,且在排卵后卵泡中表达量持续升高。表明即使是同一家族的基因,在同一生理过程中也可能发挥不同的作用。在人和兔中研究发现,添加人绒毛膜促性腺激素(hCG)对卵泡颗粒细胞中的 MMP-3 基因表达量无任何影响<sup>[15]</sup>;小鼠中,MMP-3 基因在排卵前卵泡中并不表达<sup>[16]</sup>。MMP-9 基因作用广泛,在不同物种卵巢中的作用研究较多。在鱼<sup>[17]</sup>、大鼠<sup>[18-19]</sup>、牛<sup>[20]</sup>、马<sup>[21]</sup>、猕猴<sup>[22]</sup>和人<sup>[23]</sup>等物种中,MMP-9 表达量也随卵泡发育升高,此种时空表达模式与本研究中的禽类表达规律类似。

禽类卵泡不同于哺乳动物,随卵泡发育出现大量卵黄沉积,而卵黄的沉积需要血管的运输。因此,在禽类中新血管的形成对促进卵泡发育具有重要作用。本试验发现,参与血管发育的 VEGF-A 和 TEK 基因,在 F1 中显著升高。在马中,通过免疫组化试验发现 VEGF-A 和 TEK 基因在卵泡发育和黄体形成阶段表达上调,缺少这 2 种基因会导致卵泡发育闭缩和黄体退化<sup>[24]</sup>,与本研究结果基本一致。然而,在牛中研究发现,TEK 虽在各级卵泡中

都表达,但表达量未随卵泡发育增大而发生变化<sup>[25]</sup>;在鼠和人中,TEK 主要在卵巢上皮细胞中表达,在颗粒细胞中未检测到表达<sup>[26]</sup>。以上研究结果说明,不同物种中卵泡的血管生成因子的表达规律不尽相同,其原因有待于进一步研究。

MAS 系统整合了来源于 KEGG、BioCarta 和 GenMAPP 3 个公共 Pathway 数据库的信息,可分析差异基因所在信号通路,以及某个信号通路中基因富集度的显著性水平。通过信号通路分析,差异表达基因主要参与了细胞黏合、p53、细胞周期及蛋白质合成等与促进卵泡发育成熟有关的信号通路。直到最近几年,研究人员才开始研究细胞黏合连接在小鼠卵泡发育过程中的作用,发现颗粒细胞的极性分化受到细胞黏合连接的调控<sup>[27]</sup>。而在禽类卵巢中还没有细胞黏合连接的研究报道,本试验结果显示,细胞黏合通路中 Vinculin 和 NECAB1 等 26 个基因随卵泡发育表达量显著上调, $\beta$ -catenin、ZO-1 和 Nectin-3 等 10 个基因表达量显著下调,表明细胞黏合通路可能在鸡卵泡发育过程中具有重要作用。

卵泡发育过程中细胞的增殖与分化使卵泡的体积在短时间内迅速增大,推测卵泡需要准确调控细胞周期来达到细胞迅速大量增殖的过程<sup>[28]</sup>。本研究发现,在鸡卵泡发育成熟过程中细胞周期的调控基因 CDK1 表达量都显著升高。在真核生物中,CDK 对于细胞周期的控制具有至关重要的作用,比如遗传稳定性的维持、细胞周期调控、检验点调控以及对损伤 DNA 的修复等,都需要 CDK 家族基因对相关基因进行磷酸化修饰<sup>[29]</sup>。在卵泡细胞迅速增殖和分化过程中,一旦发生 DNA 突变或细胞异常,就需要有效的机制来控制 and 消灭突变的细胞。p53 通路调控着大量凋亡基因的表达,从而引起细胞周期停滞、细胞凋亡、衰老等一系列生物学效应<sup>[30]</sup>。本研究发现,p53 通路中的 Gadd45 基因表达量随卵泡增大显著下降,对该基因的深入研究将为阐明禽类卵泡发育与凋亡机制提供新的依据。

综上所述,本研究利用 Solexa 技术分析了鸡卵泡发育中的差异表达基因,为进一步在分子水平上研究卵泡发育和排卵过程,揭示家禽等级前优势卵泡的筛选机制提供参考,为提高家禽繁殖性能奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 朱志明.影响家禽繁殖性状相关基因的研究进展[J].

- 福建畜牧兽医, 2007(S1):18-20.
- [2] Akdemir F, Sahin K. Genistein supplementation to the quail: Effects on egg production and egg yolk genistein, daidzein, and lipid peroxidation levels[J]. Poult Sci, 2009, 88(10):2125-2131.
  - [3] Gilbert A B, Evans A J, Perry M M, *et al.* A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) [J]. J Reprod Fertil, 1977, 50(1):179-181.
  - [4] Lovell T M, Gladwell R T, Groome N P, *et al.* Ovarian follicle development in the laying hen is accompanied by divergent changes in inhibin A, inhibin B, activin A and follistatin production in granulosa and theca layers [J]. J Endocrinol, 2003, 177(1):45-55.
  - [5] Onagbesan O, Bruggeman V, Decuypere E. Intra ovarian growth factors regulating ovarian function in avian species[J]. Anim Re Prod Sci, 2009, 111(2-4):121-140.
  - [6] Cui J X, Du H L, Liang Y, *et al.* Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production[J]. Poult Sci, 2005, 85(1):26-31.
  - [7] Ding S T, Ko Y H, Ou B R, *et al.* The expression of genes related to egg production in the liver of Taiwan country chickens[J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2008, 21(1):19-24.
  - [8] Froman D P, Kirby J D, Rhoads D D. An expressed sequence tag analysis of the chicken reproductive tract transcriptome[J]. Poult Sci, 2006, 85(8):1438-1441.
  - [9] 罗庆苗, 秦晓玉, 苗向阳. 利用数字基因表达谱对小尾寒羊高繁性状相关基因的筛选研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(23):18-25.
  - [10] Alagna F, Torchia L, Servili M, *et al.* Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development[J]. BMC Genomics, 2009, 10:399.
  - [11] Severin A J, Woody J L, Bolon Y T, *et al.* RNA-Seq Atlas of Glycine max: A guide to the soybean transcriptome[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10:160-165.
  - [12] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nature Methods, 2008, 5(7):621-628.
  - [13] Mccord L A, Li F, Rosewell K L, *et al.* Ovarian expression and regulation of the stromelysins during the periovulatory period in the human and the rat [J]. Biol Reprod, 2008, 86(3):78.
  - [14] Wyburn G M, Aitken R N, Johnston H S. The ultra-structure of the zona radiata of the ovarian follicle of the domestic fowl[J]. J Anat, 1965, 99(3):469-484.
  - [15] Mccord L A, F Li, K L Rosewell, *et al.* Ovarian expression and regulation of the stromelysins during the periovulatory period in the human and the rat [J]. Biol Reprod, 2012, 86(3):78.
  - [16] Hagglund A C, Ny A, Leonardsson G, *et al.* Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation[J]. Endocrinology, 1999, 140(9):4351-4358.
  - [17] Thome R, dos Santos H B, Sato Y, *et al.* Distribution of laminin beta2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish[J]. J Mol Histol, 2010, 41(4/5):215-224.
  - [18] Nothnick W B, Keeble S C, Curry T E. Collagenase, gelatinase, and proteoglycanase messenger ribonucleic acid expression and activity during luteal development, maintenance, and regression in the pseudopregnant rat ovary[J]. Biol Reprod, 1996, 54(3):616-624.
  - [19] Curry T E Jr, Osteen K G. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus [J]. Biol Reprod, 2001, 64(5):1285-1296.
  - [20] Imai K, Khandoker M A, Yonai M, *et al.* Matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in bovine follicular fluid of different-sized follicles: Relationship to intra-follicular inhibin and steroid concentrations[J]. Domest Anim Endocrinol, 2003, 24(2):171-183.
  - [21] Riley S C, Gibson A H, Leask R, *et al.* Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries[J]. Reproduction, 2001, 121(4):553-560.
  - [22] Chaffin C L, Stouffer R L. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor messenger ribonucleic acids in macaque periovulatory granulosa cells: Time course and steroid regulation[J]. Biol Reprod, 1999, 61(1):14-21.
  - [23] Oksjoki S, Rahkonen O, Haarala M, *et al.* Differences in connective tissue gene expression between normally functioning, polycystic and post-menopausal ovaries [J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10(1):7-14.
  - [24] Muller K, Ellenberger C, Schoon H A. Histomorphological and immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare [J]. Res Vet Sci, 2009, 87(3):421-431.
  - [25] Hayashi K G, Berisha B, Matsui M, *et al.* Expression of mRNA for the angiotensinogen system in granulosa cells during follicular development in cows[J]. J Reprod Dev, 2004, 50(4):477-480.
  - [26] Teilmann S C, Christensen S T. Localization of the angiotensin receptors Tie-1 and Tie-2 on the primary cilia in the female reproductive organs[J]. Cell Biol Int, 2005, 29(5):340-346.
  - [27] Mora J M, Fenwick M A, Castle L, *et al.* Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles[J]. Biol Reprod, 86(5):153, 151-114.
  - [28] Johnson A L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles [J]. Anim Reprod Sci, 2003, 78(3/4):185-201.
  - [29] Hsu S L, Yin S C, Liu M C, *et al.* Involvement of cyclin-dependent kinase activities in CD437-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 1999, 252(2):332-341.
  - [30] Brown C J, Lain S, Verma C S, *et al.* Awakening guardian angels: Drugging the p53 pathway[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(12):862-873.