

基于 Illumina 测序筛选牛卵泡发育 相关的上调表达基因

孟金柱¹, 安清明¹, 武渊勋², 赵园园¹

(1. 铜仁学院, 贵州 铜仁 554300; 2. 山西普源泰奶牛养殖有限公司, 山西 晋中 030800)

摘要: 为研究牛卵泡发育过程中促进卵泡生长成为优势卵泡的重要调控因子及其表达模式, 采集牛卵巢上的最大卵泡(8~10 mm)与第二大卵泡(5~8 mm), 通过测定卵泡液中雌二醇(E_2)与孕激素(P)的水平, 确定优势卵泡(DF)和从属卵泡(SF)。刮取 DF 和 SF 中的颗粒细胞, 提取其总 RNA 并建立文库, 通过 Illumina 平台进行测序。用 SOAP V2.0 软件将测序获得的序列与牛参考基因组数据库进行比对, 获得 mRNA 序列; 用 DESeq 2 软件对获得的 mRNA 进行差异表达分析, 并对其中表达上调的基因进行 GO 分析及 KEGG 信号通路分析; 最后通过实时荧光定量 PCR 对筛选出的具有代表性的上调表达基因进行验证。通过测序共获得 32 346 个基因, 其中在 DF 颗粒细胞中表达显著上调的基因有 194 个。GO 分析结果显示, 这些表达上调的基因共分为 3 大类 33 组, 其中参与生物学过程(Biological process)的基因占 60.6%; 与细胞组分(Cellular component)相关基因占 21.2%, 其中 31 个基因参与了细胞质功能; 与分子功能(Molecular function)相关的基因占 18.2%, 其中 18 个基因参与金属离子结合。KEGG 信号通路分析共发现 4 条通路, 其中基因富集最为显著的是轴突导向通路。实时荧光定量 PCR 结果表明, 细胞色素 P450 19A1 基因(*CYP19A1*)在 DF 颗粒细胞中的相对表达量极显著高于 SF($P < 0.01$), 硫氧还蛋白结合蛋白(*TXNIP*)、脑表达 X2(*BEX2*)和丝氨酸蛋白酶 35(*PRSS35*)基因在 DF 颗粒细胞中的相对表达量显著高于 SF($P < 0.05$), 与 Illumina 测序表达趋势一致。综上, *PRSS35*、*CYP19A1*、*BEX2* 和 *TXNIP* 在牛卵泡的发育过程中可能会起促进作用, 最终引起卵泡排卵。

关键词: 牛; 卵泡发育; 颗粒细胞; Illumina 测序; 上调表达基因

中图分类号: S823.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2020)06-0143-07

Screening of Up Regulated Genes Related to Follicle Development Based on Illumina Sequencing in Cattle

MENG Jinzhu¹, AN Qingming¹, WU Yuanxun², ZHAO Yuanyuan¹

(1. Tongren University, Tongren 554300, China; 2. Shanxi Pu Yuan Tai Dairy Cattle Breeding Co. Ltd., Jinzhong 030800, China)

Abstract: To study the important regulatory factors promoting follicle growth into dominant follicle and their expression pattern in bovine follicular development, the largest follicle (8—10 mm) and the second largest follicle (5—8 mm) were acquired and the estrogen(E_2) and progesterone(P) concentrations in follicular fluid were determined to define the dominant follicles (DF) and subordinate follicles (SF). Granulosa cells in DF and SF were scraped, total RNA was extracted, and then libraries were constructed, and sequenced by Illumina platform. mRNA sequences were obtained by comparing the sequenced sequences with the bovine reference genome database using SOAP V2.0 software. Differential expression of

收稿日期: 2019-10-29

基金项目: 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2018]348 号); 铜仁市科技计划项目(铜市科研[2016]18 号-1, [2017]39 号); 铜仁学院博士启动基金项目(trxyDH1601)

作者简介: 孟金柱(1987-), 男, 山西朔州人, 讲师, 硕士, 主要从事动物繁殖学研究。E-mail: mjz122021@126.com

通信作者: 赵园园(1987-), 女, 河北邢台人, 副教授, 博士, 主要从事动物繁殖学研究。E-mail: 84840293@163.com

the obtained mRNA was analyzed by DESeq 2 software, and the up-regulated genes were studied by GO analysis and KEGG pathway analysis and finally real-time fluorescent quantitative PCR was used to verify the selected representative up-regulated genes. A total of 32 346 genes were obtained through sequencing, and 194 genes were significantly up-regulated in DF granulosa cells. GO analysis results showed that all the up-regulated genes were divided into 33 groups of 3 categories, and 60.6% of the genes were involved in biological process. Genes related to cellular component accounted for 21.2%, the most of which (31) were involved in cytoplasm. The genes related to molecular function accounted for 18.2%, and 18 genes were involved in metal ion binding. KEGG pathway analysis revealed a total of 4 pathways, among which the most significant gene enrichment was axon guidance pathway. Real-time fluorescent quantitative PCR results showed that the relative expression of cytochrome P450 19A1 gene (*CYP19A1*) in DF granulosa cells was significantly higher than that in SF ($P < 0.01$), and the relative expressions of thioredoxin binding protein gene (*TXNIP*), brain expression linked X2 (*BEX2*) and serine protease 35 (*PRSS35*) genes in DF granulosa cells were significantly higher than those in SF ($P < 0.05$), which was consistent with Illumina sequencing. In summary, *CYP19A1*, *TXNIP*, *BEX2*, and *PRSS35* may promote follicular development and cause follicular ovulation in cattle.

Key words: Cattle; Follicular development; Granulosa cell; Illumina sequencing; Up-regulated gene

哺乳动物的卵泡是生殖系统的重要组成部分,它在控制发情周期、发情行为,确保卵母细胞发育能力及后期胚胎存活率、排卵后黄体功能和孕酮合成等方面起着重要作用^[1]。在牛的 1 个发情周期中,卵泡生长特征呈现波的模式,常常会出现 2~3 个卵泡波^[2]。直径 4~9 mm 的有腔卵泡生长依赖于卵泡刺激素 (FSH),且在卵泡发育波出现之前,FSH 浓度会发生短暂升高^[3]。研究表明,牛卵泡内的多种生长因子,如激活素、抑制素和胰岛素样生长因子 (IGF) 及其结合蛋白等,在调控卵泡中细胞的存活、增殖或凋亡过程中发挥了很重要的作用^[4]。

牛卵泡含有卵母细胞 (CC)、颗粒细胞 (GCs) 和膜细胞 (TCs)。颗粒细胞和膜细胞合成的类固醇和肽激素分泌到细胞外基质,发出一系列信号控制卵母细胞的发育和成熟,从而创造了一个决定卵母细胞质量和成熟的微环境^[5-6]。膜细胞通过细胞色素 P450 17A1 酶 (*CYP17A1*) 合成雄激素^[7],而颗粒细胞中的细胞色素 P450 19A1 酶 (*CYP19A1*) 负责将雄激素转化为雌激素 (E)^[8]。增强雌二醇 (E₂) 产生的能力,对维持优势卵泡 (DF) 的生长和启动性行为、促性腺激素浓度的升高、减数分裂的恢复和排卵至关重要^[9]。牛卵泡发育过程中 E₂ 的产生受多种激素和生长因子调控,包括 FSH^[10]、IGF^[11]、可卡因安非他命调节转录肽 (CART)^[12] 以及骨形态发生蛋白 2 (BMP2)^[13],但具体调控机制尚不清楚。

多种动物的转录调控机制已经通过 Illumina 测序被发现,如绵羊^[14]、奶牛^[15]和猪^[16]。ROMER-EIM 等^[17]对牛卵泡中颗粒细胞、膜细胞、大黄体细胞 (LLCs) 和小黄体细胞 (SLCs) 进行转录组测序及

分析,筛选出促进黄体形成及参与卵泡发育的相关基因。鉴于此,通过 Illumina 平台对牛 DF 和从属卵泡 (SF) 中的颗粒细胞进行测序,筛选出卵泡发育相关的上调表达基因,对揭示牛特定的卵泡发育阶段多种配体、受体和同源胞内信号分子的表达差异,分析促进牛卵泡颗粒细胞增殖及调控 E₂ 分泌的关键因子具有重要意义,为进一步阐明调控优势卵泡被选择的潜在机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集

以山西省太谷县普源泰奶牛养殖有限公司的黑白花奶牛为研究对象,在相同的饲喂条件下,选取 6 头 2 岁龄健康母牛,同期发情并使用 B 超检测每头牛卵泡发育情况,送往屠宰场屠宰,然后采集每头牛卵巢上的最大卵泡 (8~10 mm) 与第二大卵泡 (5~8 mm),置于 4 ℃ 杜氏磷酸缓冲液 (DPBS) 中,带回动物繁殖生理实验室。

1.2 方法

1.2.1 DF 和 SF 的筛选 将采集到的 6 头牛的最大卵泡与第二大卵泡分别放到 6 个盛有生理盐水的培养皿中,抽取卵泡液并使用 ELISA 试剂盒 (上海蓝基生物科技有限公司) 测定 E₂ 和孕激素 (P),根据最大卵泡和第二大卵泡卵泡液中 E₂ 和 P 的比值筛选出 DF 和 SF,分别刮取其中的颗粒细胞。

1.2.2 总 RNA 提取、文库构建及测序 用 RNA 微量提取试剂盒 (QIAGEN 公司,德国) 提取 3 头牛 DF 和 SF 颗粒细胞中的总 RNA 并纯化,使用 Agilent Bioanalyzer 2100 检测总 RNA 的完整性, Qubit 2.0

Fluorometer 测量浓度后,由北京诺和致源生物信息科技有限公司进行文库构建、Illumina 测序。

1.2.3 测序数据组装及分析 将 Illumina 测序获得的原始 reads 去除质量低的、含 N 的、接头等序列后,获得干净 reads。干净序列从头组装后得到 unigenes 序列,同时使用 SOAP V2.0 软件将其比对到牛的参考基因组数据库中,此时获得 mRNA。使用 DESeq 2 对获得的 mRNA 进行差异表达分析,同时筛选出牛卵泡发育相关上调表达基因。用 DAVID 软件对获得的上调表达基因进行 GO 分析及 KEGG 信号通路分析。

1.2.4 反转录及引物合成 将 Illumina 测序剩余的总 RNA 反转录成 cDNA,反应条件:42 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s。通过 GeneCards 数据库对获得的上调表达基因进行功能分析后,筛选 6 个可能与牛卵泡发育相关的基因,使用 NCBI 设计引物(表 1),以 β -actin 作为内参基因,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 供试引物序列

Tab. 1 Primer sequences for test

基因名称 Gene name	引物(5'→3') Primer sequences	大小/bp Size
<i>CYP19A1</i>	F:GCATGGTGTCCGAAGTTGTG R:GCTGGGACCTGGTATTGAGG	110
<i>EIF4EBP1</i>	F:ACTCACCTGTGACCAAGACG R:AACTGTGACTCTTCACCGCC	151
<i>TXNIP</i>	F:CCAATGGCCAAACCAAGGTG R:TCCAACCGGTGATCTTCAGC	137
<i>BEX2</i>	F:GAGAGCCTTTGGCCCTCTCT R:ACGGAACCGTCTGCGATTTC	108
<i>PRSS35</i>	F:AAGCCAAGCAGTACCTGTCC R:CCCTCGGCCGTCTTTAACT	156
<i>CHST11</i>	F:TATTTCCAAAGTATGTTGCACCCA R:GCTCCAACCTGGGTAGGGTTG	118
β -actin	F:TGACCCAGATCATGTTTGAGA R:CAAGGTCCAGAC GCAGGAT	186

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析 采用实时荧光定量 PCR 方法对牛 DF 与 SF 颗粒细胞中差异表达上

调基因 mRNA 的相对表达情况进行验证。每个样品设 5 个重复,根据 TransStart[®] Tip Green qPCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司)使用说明书构建 20 μ L PCR 反应体系:模板 cDNA 4 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,SYBR Mix 10 μ L,H₂O 5 μ L。反应程序:94 ℃ 预变性 1 min;94 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s, 72 ℃ 10 s,45 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算,经 SPSS 17.0 软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 牛 DF 和 SF 筛选结果

参考文献[17]中筛选 DF 和 SF 的方法(最大卵泡卵泡液中 $E_2/P > 1$,第二大卵泡卵泡液 $E_2/P < 1$),对每头牛的最大卵泡和第二大卵泡卵泡液中 E_2 和 P 进行测定,筛选出 3 头牛的 DF 和 SF(表 2)。后续试验采用这 3 头牛的 DF 和 SF 颗粒细胞进行测序。

表 2 牛 DF 和 SF 卵泡液中 E_2 和 P 的测定结果

Tab. 2 Results of E_2 and P in DF and SF follicular fluid in cattle

样本名称 Sample name	雌二醇 E_2	孕激素 P	雌二醇/孕激素 E_2/P
DF1	19.192	9.760	1.967
SF1	4.510	10.342	0.436
DF2	12.710	10.821	1.174
SF2	3.142	10.560	0.298
DF3	14.255	10.794	1.321
SF3	3.340	8.102	0.412

2.2 牛卵泡颗粒细胞中差异表达基因筛选

将测序结果与牛的参考基因组数据库进行比对,获得 32 346 个基因,分别将 DF 和 SF 颗粒细胞中的 FPKM 进行标准化,其中 $FPKM \geq 0.5$ 的基因有 13 243 个。使用 DESeq 2 软件对获得的 13 243 个高表达基因进行差异表达分析,共得到 194 个上调表达基因,表 3 列出了其中差异表达倍数最高的 20 个基因及其功能。

表 3 牛 DF 和 SF 颗粒细胞中差异倍数最高的 20 个基因

Tab. 3 Top 20 genes of fold change between DF and SF GCs in cattle

基因名称 Gene name	FPKM		差异倍数 Fold change	P 值 P value	基因功能 Gene function
	SF	DF			
<i>CYP19A1</i>	656.877	1 944.887	2.961	1.1×10^{-4}	催化雌激素生物合成
<i>EIF4EBP1</i>	138.115	294.068	2.129	1.1×10^{-4}	介导激素调节蛋白翻译
<i>TXNIP</i>	98.638	231.470	2.347	1.4×10^{-4}	调节细胞代谢
<i>BEX2</i>	93.970	345.003	3.671	1.4×10^{-4}	调节细胞凋亡
<i>PRSS35</i>	58.014	151.788	2.616	1.5×10^{-4}	促进卵泡排卵
<i>CHST11</i>	57.386	154.718	2.696	1.6×10^{-4}	催化硫酸盐转移到软骨素
<i>MT1E</i>	54.107	152.156	2.812	2.5×10^{-4}	与多种重金属结合
<i>MT2A</i>	49.374	130.488	2.643	6.7×10^{-4}	影响凋亡和自噬
<i>NPR3</i>	47.549	106.352	2.237	6.7×10^{-4}	通过受体的内吞作用清除钠尿酸

续表 3 牛 DF 和 SF 颗粒细胞中差异倍数最高的 20 个基因
Tab. 3 (Continued) Top 20 genes of fold change between DF and SF GCs in cattle

基因名称 Gene name	FPKM		差异倍数 Fold change	P 值 P value	基因功能 Gene function
	SF	DF			
<i>GREB1</i>	35.172	78.197	2.223	1.3×10^{-3}	调节雌激素受体通路
<i>PPM1K</i>	34.747	108.321	3.117	2.1×10^{-3}	调节线粒体通透性
<i>MT1A</i>	26.505	150.752	5.687	2.5×10^{-3}	抗氧化、抗羟基自由基
<i>FADS1</i>	23.635	47.851	2.025	2.7×10^{-3}	重金属的解毒作用
<i>ETNK2</i>	22.353	61.963	2.772	3.3×10^{-3}	催化磷脂酰乙醇胺的生物合成
<i>LOC100295800</i>	17.313	45.024	2.601	3.8×10^{-3}	未知
<i>CITED2</i>	16.131	36.172	2.242	4.4×10^{-3}	增强雌激素依赖性反活化
<i>LOC100125916</i>	14.804	83.881	5.667	4.4×10^{-3}	未知
<i>BOLAN</i>	14.283	174.880	12.244	4.5×10^{-3}	参与铁的成熟
<i>LOC505676</i>	14.038	111.185	7.921	4.9×10^{-3}	未知
<i>PSMD8</i>	12.870	28.966	2.251	5.0×10^{-3}	I 类 MHC 肽的加工

2.3 牛卵泡颗粒细胞中表达上调基因 GO 及 KEGG 分析

通过对牛卵泡颗粒细胞中上调表达基因进行 GO 功能富集分析,从而对可能促进卵泡发育的基因进行分类。应用 DAVID 软件对获得的 194 个表达上调基因进行 GO 分析,共分为 3 大类 33 组,其中参与生物学过程 (Biological process) 的基因占 60.6%;与细胞组分 (Cellular component) 有关基因

占 21.2%,其中 31 个基因参与细胞质功能;与分子功能 (Molecular funtion) 相关的基因占 18.2%,其中 18 个基因参与金属离子结合 (表 4)。

为了进一步得到促进卵泡发育有关基因的信号通路,使用 DAVID 软件对表达上调基因进行 KEGG 信号通路分析,共发现 4 条通路 (表 5),其中基因富集最为显著的是轴突导向通路。

表 4 牛 DF 和 SF 颗粒细胞中上调表达基因 GO 分析
Tab. 4 GO analysis of up-regulated genes in DF and SF GCs in cattle

GO 的类别 Term type of GO	GO 的描述 GO description	基因数 Number of genes	P 值 P value	基因名称 Gene name
生物学过程 Biological process	角化细胞分化	4	0.04	<i>TXNIP</i> 、 <i>NOTCH1</i> 、 <i>SAV1</i> 、 <i>EPHA2</i>
	心室中隔形态发生	3	0.01	<i>NOTCH1</i> 、 <i>SAV1</i> 、 <i>CITED2</i>
	神经管发育	3	0.01	<i>NOTCH1</i> 、 <i>DACT1</i> 、 <i>EPHA2</i>
	血管紧张素成熟	2	0.03	<i>ACE2</i> 、 <i>ENPEP</i>
	腺苷酸环化酶激活 G 蛋白偶联受体信号通路	3	0.04	<i>PTHLH</i> 、 <i>NPR3</i> 、 <i>PTGFR</i>
	尿管形态发生	2	0.04	<i>EPHA4</i> 、 <i>EPHA7</i>
	心包形态发生	2	0.04	<i>NOTCH1</i> 、 <i>DLL4</i>
	成纤维细胞生长因子受体信号通路的正调控	2	0.04	<i>PRKD2</i> 、 <i>FGFBP1</i>
	子宫胚胎发育	5	0.05	<i>NOTCH1</i> 、 <i>CUL4A</i> 、 <i>B9D1</i> 、 <i>ETNK2</i> 、 <i>SEC24D</i>
	细胞对锌离子的反应	2	0.05	<i>MT1A</i> 、 <i>MT2A</i>
	蛋白质的稳定	4	0.05	<i>USP19</i> 、 <i>SAV1</i> 、 <i>IFI30</i> 、 <i>GAPDH</i>
	骨骼系统开发	3	0.02	<i>PTHLH</i> 、 <i>NPR3</i> 、 <i>EPHA2</i>
	细胞迁移的负调控参与了新生血管的生成	2	0.01	<i>NOTCH1</i> 、 <i>DLL4</i>
	微管成核	2	0.02	<i>AKAP9</i> 、 <i>TUBG1</i>
	生长负调节	2	0.02	<i>MT1A</i> 、 <i>MT2A</i>
	细胞对血管内皮生长因子刺激的反应	2	0.02	<i>NOTCH1</i> 、 <i>DLL4</i>
	左/右轴规范	2	0.02	<i>NOTCH1</i> 、 <i>CITED2</i>
	正调控白细胞介素-2 的产生	2	0.04	<i>PRKD2</i> 、 <i>MALT1</i>
	精细胞的发展	3	0.04	<i>DHH</i> 、 <i>H3F3B</i> 、 <i>SIX5</i>
	内质网介导高尔基体囊泡转运	3	0.04	<i>TRAPPC4</i> 、 <i>SEC24D</i>
细胞组分 Cellular component	高尔基堆叠	3	0.01	<i>TRAPPC4</i> 、 <i>AKAP9</i> 、 <i>TRAPP</i>
	复合体	2	0.05	<i>TRAPPC4</i>
	突触囊泡	3	0.05	<i>RAB3A</i> 、 <i>TRAPPC4</i>

续表 4 牛 DF 和 SF 颗粒细胞中上调表达基因 GO 分析
Tab. 4 (Continued) GO analysis of up-regulated genes in DF and SF GCs in cattle

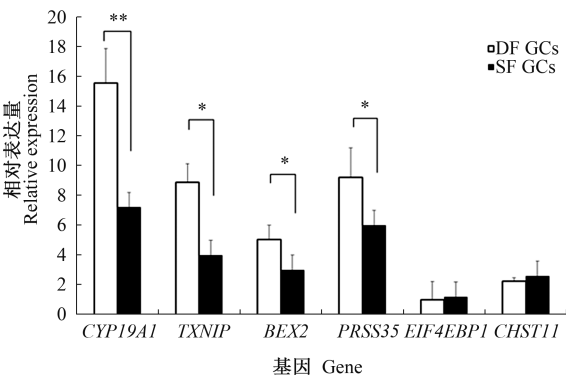
GO 的类别 Term type of GO	GO 的描述 GO description	基因数 Number of genes	P 值 P value	基因名称 Gene name
分子功能 Molecular function	细胞质	31	0.05	CNN3、SAV1、BEX2、ENPEP、BANF1、ACP1、EIF4EBP1、PACSIN1、MT1A、NDRG4、ANKRD37、TUBG1、GAPDH、PPP1R14A、TXNIP、IBTK、RNF144B、FLRT2、ZMYM4、CLMN、CDK6、PRKD2、EPAH4、BLMH、DACT1、SYDE1、BNC2、MT2A、AOX1、ACE2、SERPINB2
	细胞外囊泡	2	0.05	SYTL4、SYT9
	核内体	4	0.05	RAB3A、PACSIN1、SYTL4、VPS26B
	MHC I 类蛋白复合物	2	0.05	LOC100125916、BOLA-N
	氧化还原酶活性	5	0.01	FADS1、ADH6、OSGIN2、FADS6
	金属离子结合	18	0.01	ZBTB7B、ME3、ZNF81、FADS1、ZNF580、KLF16、ZKSCAN1、ZC3H6、ATP13A2、USP19、PRKD2、PPM1K、BNC2、MT2A、MT1E、ACE2、NT5E
	化学排斥物活性	3	0.02	SEMA6A、FLRT2、EPAH7NAD
	结合	3	0.03	ME3、AOX1、GAPDH
	GPI 连接的肝配蛋白受体活性	2	0.04	EPAH4、EPAH7
	肝配蛋白受体活动	2	0.04	EPAH4、EPAH2

表 5 上调表达基因 KEGG 信号通路分析
Tab. 5 KEGG pathway analysis of up-regulated genes

通路名称 Pathway name	基因数 Number of genes	P 值 P value	基因名称 Gene name
轴突导向 Axon guidance	5	0.01	SEMA6A、EPAH4、EPAH7、ROBO2、EPAH2
烟酸和烟酰胺代谢 Nicotinic acid and nicotinamide metabolism	3	0.02	NMNAT3、AOX1、NT5E
矿物质的吸收 Mineral absorption	3	0.02	MT1A、MT2A、MT1E
Notch 信号通路 Notch signaling pathway	3	0.04	DVL2、NOTCH1、DLL4

2.4 实时荧光定量 PCR 分析

通过对筛选出来的 6 个具有代表性的上调表达基因进行相对定量分析,结果(图 1)表明,CYP19A1



** 和 * 分别表示在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平上差异显著
** and * represent significant difference at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively

图 1 候选上调表达基因在牛 DF 和 SF 颗粒细胞中的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of candidate up-regulated genes between DF and SF GCs in cattle

在 DF 颗粒细胞中的相对表达量极显著高于 SF ($P < 0.01$),TXNIP、BEX2 和 PRSS35 在 DF 颗粒细胞中的相对表达量显著高于 SF ($P < 0.05$),与 Illumina 测序表达趋势一致。EIF4EBP1 和 CHST11 在 DF 和 SF 颗粒细胞中的表达趋势与 Illumina 测序结果相反,但差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 结论与讨论

哺乳动物在发育过程中,卵巢上最大的卵泡,即未来的优势卵泡持续生长、成熟并排出卵子^[18]。有腔卵泡的生长,表现为通过在时间和空间上的有序组织来促进对促性腺激素的响应,这首先导致卵泡募集,并伴随着卵泡波的出现,然后促进优势卵泡生长成为排卵卵泡^[19]。研究表明,FSH 和 IGF-1 等内分泌因子是有腔卵泡发育的主要驱动因素^[20]。但在每个卵泡波中,促进卵泡发育成为优势卵泡并排卵的分子调控机制尚不清楚。AUSTIN 等^[21]的研究结果表明,在牛发情周期的第 1 个卵泡波中,闭锁卵

泡分泌 E_2 的能力会减弱。ASSEY 等^[22]在研究优势卵泡和从属卵泡的结构时发现,卵泡液中雌激素在优势卵泡的生长发育过程中占主导作用;从属卵泡最终会走向闭锁,卵泡液中主要是 P 占主导作用。本研究分别测定最大卵泡与第二大卵泡中 E_2 和 P 的浓度,采取最大卵泡卵泡液中 $E_2/P > 1$ 和第二大卵泡卵泡液中 $E_2/P < 1$ 来确定优势卵泡和从属卵泡。

LI 等^[23]应用 Illumina 测序技术对水牛不同大小的卵泡(直径小于 5 mm、5~8 mm、8~12 mm 及大于 12 mm)颗粒细胞进行研究发现,卵泡的成熟和排卵可能会受到免疫控制。本研究通过对牛的优势卵泡和从属卵泡颗粒细胞进行测序,获得 194 个上调表达基因。分别对上调表达基因进行 GO 功能富集、KEGG 信号通路分析,从中筛选出 6 个基因,在牛的卵泡发育过程中可能会起促进作用。实时荧光定量 PCR 验证分析结果显示,*CYP19A1* 在 DF 颗粒细胞中的相对表达量极显著地高于 SF ($P < 0.01$),*PRSS35*、*BEX2* 和 *TXNIP* 在优势卵泡颗粒细胞中的相对表达量显著地高于从属卵泡 ($P < 0.05$),与 Illumina 测序所得到的结果基本一致。

CYP19A1 作为细胞色素 P450 超家族蛋白成员之一,在雄激素合成雌激素过程中起到了重要的催化作用。FSH 促进颗粒细胞表达 CYP19A1,将膜细胞分泌的雄激素转化为雌激素。BAO 等^[24]将小鼠 *CYP19A1* 基因敲除后发现,卵泡丧失了分泌雌激素的功能,但仍然能够对外源雌激素产生应答。敲除掉 *CYP19A1* 基因的小鼠,卵泡发育止步于腔前卵泡,从而导致小鼠不能排卵^[25]。WAHLBERG 等^[26]通过基因芯片技术研究小鼠排卵相关的蛋白酶时发现,*PRSS35* 在排卵卵泡颗粒细胞中表达量极高,对卵泡排卵以及黄体的形成和退化起了促进作用。本研究中,*PRSS35* 在牛 DF 中的表达量显著高于 SF,*PRSS35* 作为上调基因促进卵泡生长,与 WAHLBERG 等^[26]的研究结论相符。*BEX2* 是 BEX 家族中重要的成员之一。ZHOU 等^[27]研究发现,*BEX2* 可以促进 U251 细胞的增殖,敲除 *BEX2* 则会导致 U251 细胞凋亡。MENG 等^[28]研究发现,降低 *BEX2* 的表达会引起线粒体凋亡,从而使细胞周期阻滞于 G1 期,导致细胞凋亡。本研究发现,*TXNIP* 在 DF 颗粒细胞中的表达量显著高于 SF,推测其可能会促进卵泡的发育并导致排卵。

本研究在牛 DF 和 SF 颗粒细胞中共获得 194 个上调表达基因,结合功能分析,共筛选出 6 个卵泡发育相关上调的基因,并进行实时荧光定量 PCR 验

证,*CYP19A1*、*TXNIP*、*BEX2* 和 *PRSS35* 在牛 DF 颗粒细胞中表达水平平均比 SF 高,这些基因可能会促进卵泡的发育,最终引起卵泡排卵。

参考文献:

- [1] DISKIN M G, MACKEY D R, ROCHE J F, *et al.* Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle[J]. *Animal Reproduction Science*, 2003, 78(3): 345-370.
- [2] EVANS A. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2003, 38: 1-7.
- [3] EVANS A, CANTYM J. Physiology of follicle development in cattle[J]. *Proceedings of the WBC Congress*, 2004, 23: 11-16.
- [4] KANITZ W. Follicular dynamic and ovulation in cattle: A review[J]. *Archiv Fur Tierzucht*, 2003, 46(2): 187-198.
- [5] HENNET M, COMBELLES C M. Theantral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2012, 56(10): 819-831.
- [6] 赵海峰, 柯浩, 张飒, 等. 犍牛卵泡液多肽信息分析[J]. *南方农业学报*, 2013, 44(11): 1909-1913.
ZHAO H F, KE H, ZHANG F, *et al.* Polypeptide information in follicular fluids of calves[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2013, 44(11): 1909-1913.
- [7] YOUNG J M, MCNEILLY A S. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle[J]. *Reproduction*, 2010, 140(4): 489-504.
- [8] ROMEREIM S M, SUMMERS A F, POHLMEIER W E, *et al.* Transcriptomes of bovine ovarian follicular and luteal cells[J]. *Data in Brief*, 2017, 10: 335-339.
- [9] GUPTA S, FOLGER J K, RAJPUTS K, *et al.* Regulation and regulatory role of wnt signaling in potentiating FSH action during bovine dominant follicle selection[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100201.
- [10] FOLGER J K, JIMENEZ F, IRELAND J J. Regulation of granulosa cell cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) binding and effect of CART signaling inhibitor on granulosa cell estradiol production during dominant follicle selection in cattle[J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(6): 137-147.
- [11] SMITH G W, SEN A, FOLGER J K, *et al.* Putative role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CARTPT) in dominant follicle selection in cattle[J]. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2010, 67(8): 105-117.
- [12] LV L, JIMENEZ-KRASSEL F, SEN A, *et al.* Evidence supporting a role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CARTPT) in control of granulosa cell es-

- tradiol production associated with dominant follicle selection in cattle[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(3): 580-586.
- [13] SELVARAJU S, FOLGER J K, GUPTA P S, *et al.* Stage-specific expression and effect of bone morphogenetic protein 2 on bovine granulosa cell estradiol production; Regulation by cocaine and amphetamine regulated transcript [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2013, 44(3): 115-120.
- [14] JÄGER M, OTT C E, GRÜNHAGEN J, *et al.* Compositetranscriptome assembly of RNA-seq data in a sheep model for delayed bone healing[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 158-162.
- [15] SALLEH M S, MAZZONI G, HOGGLUND J K, *et al.* RNA-seq transcriptomics and pathway analyses reveal potential regulatory genes and molecular mechanisms in high- and low-residual feed intake in Nordic dairy cattle [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 258-269.
- [16] DU Z Q, EISLEY C J, ONTERUS K, *et al.* Identification of species-specific novel transcripts in pig reproductive tissues using RNA-seq [J]. *Animal Genetics*, 2014, 45(2): 198-204.
- [17] ROMEREIM S M, SUMMERS A F, POHLMEIER W E, *et al.* Gene expression profiling of bovine ovarian follicular and luteal cells provides insight into cellular identities and functions [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 439: 379-394.
- [18] BURATINI J, PRICE C A. Follicular somatic cell factors and follicle development [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2011, 23(1): 32-41.
- [19] SILVA J R, HURK R, FIGUEIREDO J R. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence; Advances and challenges for farm animals [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2016, 55: 123-135.
- [20] ARAÚJO V R, GASTAL M O, FIGUEIREDO J R, *et al.* *In vitro* culture of bovine preantral follicles; A review [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, 12(1): 78-87.
- [21] AUSTIN E J, MIHM M, EVANS A C, *et al.* Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle [J]. *Biological Reproduction*, 2001, 64(3): 839-848.
- [22] ASSEY R J, HYTTTEL P, GREVE T, *et al.* Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1994, 37: 335-344.
- [23] LI J, LI Z, LIU S, *et al.* Transcriptome studies of granulosa cells at different stages of ovarian follicular development in buffalo [J]. *Animal Reproduction Science*, 2017, 187: 181-192.
- [24] BAO B, KUMAR N, KARP R M, *et al.* Estrogen receptor-beta expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles [J]. *Biological Reproduction*, 2000, 63(6): 1747-1755.
- [25] SEN A, BETTEGOWDA A, JIMENEZ-KRASSEL F, *et al.* Cocaine- and amphetamine-regulated transcript regulation of follicle-stimulating hormone signal transduction in bovine granulosa cells [J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 4400-4410.
- [26] WAHLBERG P, NYLANDER A, AHLISKOG N, *et al.* Expression and localization of the serine proteases high-temperature requirement factor A1, serine protease 23, and serine protease 35 in the mouse ovary [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(10): 5070-5077.
- [27] ZHOU X, MENG Q, XU X, *et al.* Bex2 regulates cell proliferation and apoptosis in malignant glioma cells via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 427(3): 574-580.
- [28] MENG Q, ZHI T, CHAO Y, *et al.* Bex2 controls proliferation of human glioblastoma cells through NF- κ B signaling pathway [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2014, 53(2): 262-270.