

吴阳升, 林嘉鹏, 汪立芹, 等. 绵羊小卵泡与中卵泡转录组差异特征分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 832-842.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.019

## 绵羊小卵泡与中卵泡转录组差异特征分析

吴阳升, 林嘉鹏, 汪立芹, 陈莹, 黄俊成

(新疆畜牧科学院生物技术研究, 新疆 乌鲁木齐 830000)

**摘要:** 卵泡的选择和发育过程涉及到卵泡内多种基因表达的变化和调控。绵羊卵泡的选择和发育过程与卵泡直径变化密切相关。以绵羊健康小卵泡(1~2 mm)和中卵泡(3~4 mm)为材料,进行 RNA 测序,分析小卵泡发育至中卵泡过程转录组水平变化特征。在分子功能上显著变化的基因主要涉及酶活性的调节和离子结合;在细胞组分上显著变化的基因主要涉及细胞外基质和质膜蛋白;在生物学过程上显著变化的基因主要涉及细胞增殖的正调控、细胞通讯、免疫和刺激反应等过程。KEGG 分析差异基因富集的通路主要是补体和凝血级联反应,吞噬小体,细胞因子-细胞因子受体相互作用,TGF- $\beta$  信号通路和轴突导向等。从小卵泡到中卵泡表达上调的有脂代谢相关基因(*APOA1*、*APOD*、*APOE*),胰岛素样生长因子途径基因(*IGFBP1*、*IGFBP7*),肿瘤生长因子 beta 途径基因(*INHBA*),核心蛋白多糖基因(*DCN*),血管发生基因(*MGP*),跨膜 4 超家族成员 1 基因(*TM4SF1*),胞外基质重建基因(*MMP1*、*MMP13*),五聚素 3 基因(*PTX3*),金属蛋白酶组织抑制剂 1 基因(*TIMP1*)。从小卵泡到中卵泡表达下调的主要有转录因子 *C-FOS*、*EGR1*、*FOSB* 和线粒体编码的脱氢酶家族基因 *MT-ND1*、*MT-ND5*、*MT-ND6* 等。这些基因的表达变化表明绵羊卵泡的选择过程可能涉及到 IGF 和 TGF $\beta$  通路的抑制,脂代谢、血管生成的增强以及细胞增殖能力下降等生物过程。

**关键词:** 绵羊; 小卵泡; 中卵泡; 转录组; 卵泡选择

**中图分类号:**                      **文献标识码:** A                      **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0832-11

## Transcriptome profiling of ovine follicles during growth from small to middle antral sizes

WU Yang-sheng, LIN Jia-peng, WANG Li-qin, CHEN Ying, HUANG Jun-cheng

(Biological Technology Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China)

**Abstract:** Follicular development and selection is a dynamic process and involves many genes expression changes. The selection and development of sheep follicle is closely related to the change of the diameter of follicle. In this study, healthy ovine small (diameter 1~2 mm) and middle (diameter 3~4 mm) follicles were used for RNA sequencing and gene expression pattern identification. Gene ontology analysis revealed that ovine follicular genes differed primarily in molecular functions of enzyme activity regulation and ion binding protein, in cellular components of extracellular matrix and plasma membrane, in biological behaviors of positive regulation of cell proliferation, cell communication, and immune stimulation response.

Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) analysis showed that the differential genes pathways enrichment were dominated by pathways of complement and coagulation cascades, phagosome, cytokine-cytokine receptor interaction, TGF-beta signaling pathway, and axon guidance. From small follicle to middle follicles, genes upregulated includes lipid metabolism-related genes

收稿日期:2015-11-15

基金项目:国家自然科学基金项目(U1203381)

作者简介:吴阳升(1977-),男,河南睢县人,博士,助理研究员,主要从事家畜生殖生物学的研究。(Tel) 0991-3075297; (E-mail) victorwys@hotmail.com

通讯作者:黄俊成, (E-mail) h\_jc@sina.com

(*APOA1*, *APOD* and *APOE*), IGF pathway genes (*IGFBP1* and *IGFBP7*), TGF $\beta$  pathway genes (*DCN* and *INHBA*), angiogenesis-related genes (*MGP* and *TM4SF1*), and extracellular matrix reconstruction genes (*MMP1*, *MMP13*, *PTX3*, and *TIMP1*), etc.. Genes down-regulated includes transcription factor genes *C-FOS*, *EGRI*, and *FOSB*, mitochondrially-encoded NADH dehydrogenase family members *MT-ND1*, *MT-ND5*, and *MT-ND6*. The results suggest that follicular selection may involve IGF and TGF $\beta$  pathways inhibition, lipid metabolism and angiogenesis increase, and decline of cell proliferation.

**Key words:** ovine; small follicle; middle follicle; transcriptome; follicle selection

绵羊卵泡以卵泡波的形式发育。一个卵泡波是从一群小的卵泡(2~3 mm)中选择一至多个卵泡发育至大卵泡( $\geq 5$  mm)的过程。无论是发情期还是乏情期,绵羊每4~5 d出现一个卵泡波,卵泡波的出现与血清中促卵泡激素(FSH)浓度的短时升高有关<sup>[1-4]</sup>。卵泡波实际上是在FSH作用下卵泡选择及优势化过程的体现。被选择卵泡中雌激素(E2)和抑制素的含量逐渐升高,并通过外周血循环反馈抑制FSH的分泌而抑制从属卵泡的发育。绵羊一个发情周期平均约17 d,每个发情周期内通常有3~4个卵泡波。因此,绵羊每个情期的排卵数实际上是由最后一个卵泡波中选择卵泡的数量所决定。提高FSH的浓度可以选择募集更多的卵泡发育,从而提高排卵数。

卵泡的选择过程不仅受来自下丘脑-垂体-性腺轴的内分泌激素调控,还受卵泡自身基因表达的影响。绵羊骨形态发生蛋白受体*IB*基因发生点突变失活,可导致多个卵泡同时被选择发育至排卵前卵泡,并完成多个卵泡排卵及受精过程,从而表现出多胎表型,称该突变的基因为*FecB*基因<sup>[5-7]</sup>。另外,卵母细胞特异表达的*GDF9*和*BMP15*基因突变后杂合子表现出多胎性状,而纯合子则不育<sup>[8-9]</sup>,表明绵羊卵泡内基因的表达变化会影响卵泡的选择。敲除*Igf1*基因的小鼠,卵泡的发育停滞在腔前卵泡/有腔卵泡早期,卵巢上既没有成熟的格拉夫氏卵泡,也没有黄体化卵泡,并且卵泡内*Cyp19a1* mRNA浓度远低于正常值<sup>[10]</sup>。体外培养的牛颗粒细胞中,胰岛素样生长因子IGF1也是FSH诱导*Cyp19a1* mRNA表达的必要条件之一<sup>[11]</sup>。而且,卵泡内注射IGF1可促进从属卵泡转变为优势卵泡<sup>[12]</sup>,表明IGF系统影响着哺乳动物卵泡的选择过程。牛的小卵泡(<5 mm)到中卵泡(5~10 mm)转录组结果表明,差异表达基因均超过了200个,比如骨桥蛋白(Osteopontin)和血

管生成素(Angiogenin)等的表达显著上调<sup>[13]</sup>。说明在卵泡选择及优势化过程中,伴随着卵泡直径的增大,卵泡内的表达谱亦动态变化,影响卵泡的发育进程。与牛所不同的是,绵羊的卵泡优势化作用并不明显<sup>[14-15]</sup>,只要在血液中给以天然水平剂量的FSH,就可以诱导新一轮的卵泡波发生<sup>[16]</sup>。因此,绵羊卵泡的选择机制与牛可能并不完全相同。目前绵羊卵泡选择过程中卵泡内涉及到转录组的变化特征仍不清楚。

本试验利用绵羊健康小卵泡(1~2 mm)和中卵泡(3~4 mm)进行转录组测序,分析卵泡选择后基因表达变化特征,探索绵羊卵泡选择发育过程的分子机制,为进一步提高绵羊卵泡的发育和挖掘潜在的多胎新基因提供有价值的信息,从而提高绵羊的繁殖率奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

从乌鲁木齐市华凌畜牧基地牛羊屠宰场采集哈萨克羊卵巢,置于37℃无菌生理盐水,PBS清洗后肉眼观察卵巢表面的卵泡形态,选择表面呈膨胀的圆形且透明度好的卵泡。用锋利无菌刀片在卵泡旁划开卵巢表皮韧性组织,用尖头镊子撕开表皮,然后小心剥离卵泡。在体视镜下挑选卵泡液清澈、卵丘卵母细胞复合体清晰可见的健康卵泡用于总RNA提取。分别收集小卵泡(oSF, 1~2 mm)和中卵泡(oMF, 3~4 mm),并将其分别至于5~10倍体积的样品保护液(TaKaRa, 大连宝生物)中。4℃过夜,移至-70℃保存,待提取总RNA。

### 1.2 RNA提取

用TRIzol试剂(Invitrogen, 美国)根据说明书操作步骤提取卵泡总RNA,总RNA经1.5%凝胶电泳,用Agilent 2100检测总RNA的浓度。选择质量符合要求(*RIN*>7.0, *28S/18S*>1)的RNA样品进行

转录组测序。

### 1.3 cDNA 测序文库的构建及高通量测序

提取总 RNA 并使用 DNase I 消化 DNA 后,用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA,加入打断试剂将 mRNA 打断成短片段。以打断后的 mRNA 为模板合成一链 cDNA,然后配制二链合成反应体系合成二链 cDNA,并使用试剂盒纯化回收,黏性末端修复,将 cDNA 的 3' 末端加上碱基“A”并连接接头,然后进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增。构建好的文库经质检合格后,用 Illumina HiSeqTM 2000 测序仪进行测序。

### 1.4 转录组数据分析

对测序所得的原始读本进行质控:原始测序序列经过滤去除接头序列、空读序列以及低质量序列(Phredquality<5)后得到清洁读本(Clean reads),以确定测序数据是否适用于后续分析。质控合格后,用 SOAPaligner/SOAP2<sup>[17]</sup>将清洁读本比对到绵羊基因组([ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-76/fasta/ovis\\_aries/](ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-76/fasta/ovis_aries/))。统计读本在参考序列上的分布情况及覆盖度,判断比对结果是否通过第 2 次质控。通过 2 次质控的则进行基因表达等一系列后续分析,筛选出样品间差异表达基因,进行基因本体(Gene ontology, GO)功能显著性富集分析和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路等显著性富集分析。

基因表达量的计算使用 RPKM 法(Reads per kilobase transcriptome per million mapped reads)<sup>[18]</sup>。基因差异表达基因分析(Differentially expressed genes, DEGs):在得到差异检验的错误发现率(False discovery rate, FDR)同时,根据基因的表达式(RPKM 值)计算该基因在不同样本间的差异表达倍数。对差异检验的  $P$ -value 作多重假设检验校正,通过控制 FDR 来决定  $P$ -value 的域值。 $FDR$  值越小,差异倍数越大,差异越显著。在我们的分析中,差异表达基因定义为  $FDR \leq 0.001$  且倍数差异在 2 倍以上的基因。

GO 功能显著性富集分析首先把所有差异表达基因向 Gene Ontology 数据库(<http://www.geneontology.org/>)的各个 term 映射,计算每个 term 的基因数目,然后应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比在差异表达基因中显著富集的 GO 条目。通过 GO 功能显著性富集分析能确定差异表达基因行使

的主要生物学功能。

在生物体内,不同基因相互协调行使其生物学功能,基于通路分析有助于更进一步了解基因的生物学功能。KEGG 是有关通路的主要公共数据库(<http://wego.genomics.org.cn>),通路显著性富集分析以 KEGG 通路为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著性富集的通路。通过通路显著性富集能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

## 2 结果

### 2.1 测序数据分析及注释

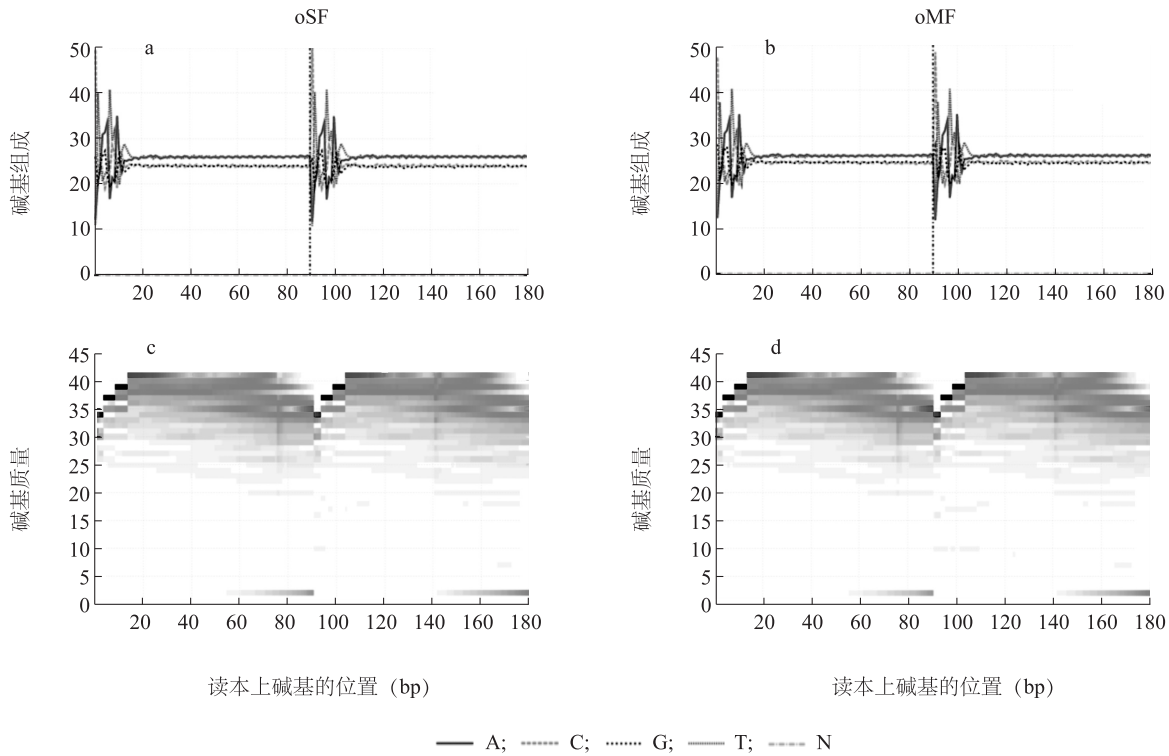
经 Illumina HiSeqTM2000 深度测序后,小卵泡及中卵泡分别得到 48 654 356 和 48 543 284 条原始测序序列。碱基组成和质量分析表明,原始测序数据中 A 与 T 含量一致, G 与 C 的含量一致, A、T 曲线基本重合, G、C 曲线基本重合,表明碱基组成情况良好(图 1a、1b);低质量碱基测序序列的比例很低(图 1c、1d),说明测序质量好。序列与绵羊基因组比对结果表明,在基因组上匹配率超过 80.00% (oSF: 80.84%, oMF: 80.39%),与参考基因比对,超过 45.00% 的序列可匹配上 (oSF: 45.62%, oMF: 47.77%),单一匹配位点的匹配率超过 40.00% (oSF: 40.84%, oMF: 41.58%)。

基因覆盖度指每个基因被读本覆盖的百分比,其值等于基因中被唯一比对的读本覆盖的碱基数与基因编码区所有碱基数的比值。基因覆盖度统计表明,基因覆盖率达 90%~100% 的超过 50% (oSF, 52%; oMF, 50%);基因覆盖率达 80%~90% 的超过 11% (oSF, 11%; oMF, 12%) (图 2)。说明,测序质量好,可用于进一步的差异表达基因分析。

### 2.2 差异表达基因分析

根据各个基因 RPKM 值进行分析,在 oSF 和 oMF 之间鉴定到 1 703 个差异转录本 ( $FDR \leq 0.001$  和  $|\log_2^{ratio}| \geq 1$ )。从 oSF 到 oMF 过程,表达上调的差异转录本有 744 个,表达下调的差异转录本有 959 个(图 3)。

在上调表达的基因中,RPKM>100 的有 47 个基因,根据变化倍数排在前 5 位的分别是基质金属蛋



横坐标上,1~90 bp 代表读本 1 的碱基位置,91~180 bp 代表读本 2 的碱基位置。

图 1 绵羊小卵泡(a,c)和中卵泡(b,d)原始读本的碱基组成及碱基质量

Fig.1 Raw reads base composition and sequence quality of ovine small follicle(oSF) (a, c) and ovine middle follicle(oMF) (b, d)

白酶组织抑制因子 1 基因(*TIMP1*)、抑制素  $\beta$ -A 基因(*INHBA*)、跨膜 4L6 家族成员 1 基因(*TM4SF1*)、载脂蛋白 D 基因(*APOD*)、基质 Gla 蛋白基因(*MGP*);根据表达量 *RPKM* 排在前 5 位的分别是类胸腺素  $\beta$ -4 基因(*TMSB4X*)、载脂蛋白 A1(*APOA1*) 基因、*MGP* 基因、核心蛋白聚糖基因(*DCN*)和线粒体编码 NADH 脱氢酶 1 基因(*MT-ND1*)(表 1)。上调基因中,差异大于 4 倍且满足 *RPKM*>10 的基因有 24 个,排在前 10 位的分别是基质金属蛋白酶 1 基因(*MMP1*)、金属蛋白酶 13 基因(*MMP13*)、胰岛素样生长因子结合蛋白 1 基因(*IGFBP1*)、*TIMP1* 基因、五聚素 3 基因(*PTX3*)、 $\alpha$ -2 巨球蛋白基因(*A2M*)、*INHBA* 基因、多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶 15 基因(*GALNT15*)、丝氨酸蛋白酶抑制剂 A1 基因(*SERPINA1*)、成骨特异性转录因子 2 基因(*RUNX2*)(表 2)。

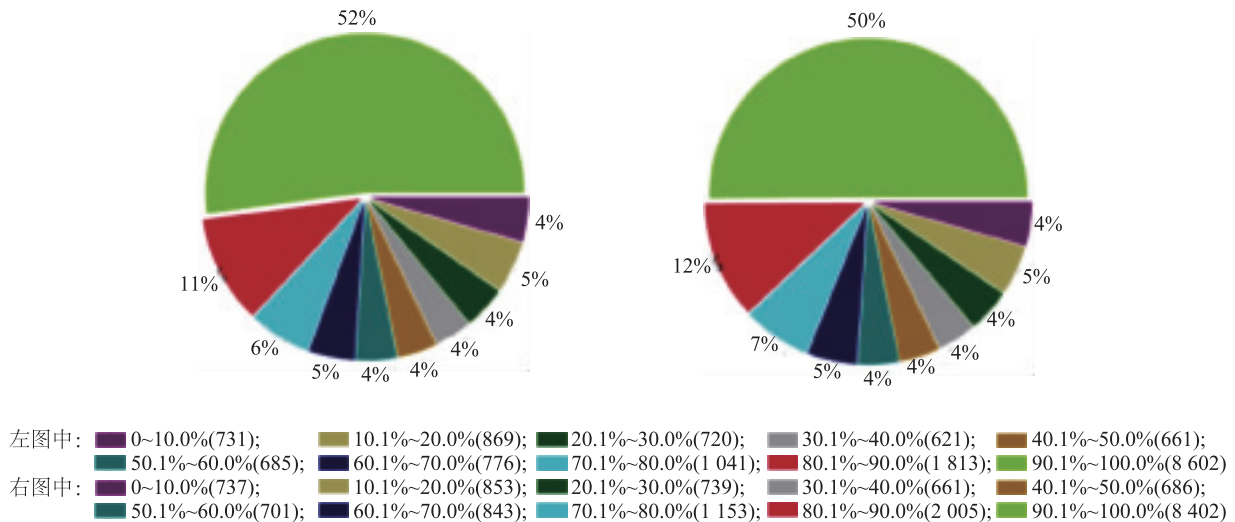
在中卵泡中有 28 个 *RPKM* >100 的基因表达下调,根据变化倍数排在前 5 位的分别是 *C-FOS*、线粒体编码 NADH 脱氢酶 5 基因(*MT-ND5*)、早期生长反应因子基因(*EGR1*)、70 000 热激蛋白-6 基

因(*HSPA6*)、线粒体编码 NADH 脱氢酶 6 基因(*MT-ND6*)基因;根据表达量排在前 5 位的是:*MT-ND1*、*MT-ND5*、*MT-ND6*、硫酸肝素 6-O-磺基转移酶 2 基因(*HS6ST2*)、*C-FOS* 基因(表 1)。下调基因中,差异大于 4 倍且满足 *RPKM* 大于 10 的基因有 21 个,排在前 10 位的分别是激活蛋白 1 基因(*FOSB*)、单磷酸腺苷脱氢酶 3 基因(*AMPD3*)、前列腺雄激素调控黏蛋白样蛋白 1 基因(*PARM1*)、*C-FOS*、耳锚蛋白基因(*OTOA*)、二酰甘油激酶 H 基因(*DGKH*)、溶质载体家族 5A3 基因(*SLC5A3*)、类 EGF 信号肽 CUB 域 3 基因(*SCUBE3*)、*MT-ND5*、*EGR1*(表 2)。

### 2.3 差异基因的本体和信号通路

将差异基因在细胞组分(Cellular components)、分子功能(Molecular functions)及生物学过程(Biological processes)进行 GO 分析。结果表明,在细胞组分上显著变化的差异表达基因涉及胞外基质、质膜、细胞外周、胞外域组分、胞外域及质膜部分;在分子功能上显著变化的基因涉及到酶活性调控、离子结合、阳离子结合及金属离子结合等功

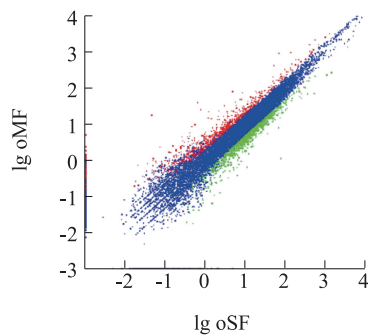




左图是小卵泡(oSF),右图是中卵泡(oMF)。饼图中不同颜色代表基因覆盖度,括号中数字为相应覆盖度对应的基因数目。

图2 基因覆盖度分布

Fig.2 Pie chart representing gene coverage distribution



横、纵坐标分别表示 2 个样品表达量的值,图中红点表示 oMF 相对于 oSF 表达量上调,绿点表示 oMF 相对于 oSF 表达量下调,蓝点为没有差异。

图3 oSF 和 oMF 差异基因表达

Fig.3 Differentially expressed genes of oSF and oMF

能;在生物学过程显著变化的基因涉及到细胞增殖正调控、生物学调控、细胞通讯、生物学进程调控等过程(表 3)。

KEGG 中的通路富集分析结果显示,这些差异表达基因共涉及到 240 个通路,显著性的通路有 5 个( $P < 0.01$ ),分别是:补体和凝血级联反应(Complement and coagulation cascades)、吞噬小体(Phagosome)、细胞因子-细胞因子受体相互作用(Cytokine-cytokine receptor interaction)、TGF- $\beta$  信号通路(TGF-beta signaling pathway)、轴突导向(Axon guidance)(表 4)。

### 3 讨论

卵泡选择受来自垂体的促性腺激素和卵泡内旁分泌-自分泌基因的双重调控。接收来自垂体的促性腺激素信号并执行其生理功能的是卵泡内相应受体(FSHR)。FSHR 的突变会影响卵泡的选择能力,导致不孕不育或者对 FSH 超敏感<sup>[19]</sup>。当卵泡被选择后,卵泡内合成抑制素(INH)和雌激素(E2)的能力逐渐增强,并通过反馈抑制垂体的 FSH 分泌,从而抑制其他卵泡的生长。雌激素的合成速率主要受芳香化酶限制,卵泡中 E2 浓度的增加与 *CYP19A1* 成正相关<sup>[20]</sup>。在马和牛优势卵泡与从属卵泡发生分离时,优势卵泡中雌激素含量持续升高,并转向对 LH 的依赖<sup>[21]</sup>。绵羊在卵泡选择时,并无 LH 显著的升高,LH 仅对卵泡的最后成熟和排卵有关。在我们的结果中,绵羊小卵泡和中卵泡之间在 *CYP19A1*、*FSHR*、*LHR* 的表达上没有显著差异,表明绵羊选择卵泡,其对 FSH 的敏感性并非是其受体的表达量变化,可能与受体的活性调节有关,从而能够在 FSH 浓度降低后继续依赖其配体生长。猫在繁殖季节和非繁殖季节 FSHR 表达也没有变化<sup>[22]</sup>。在绵羊被选择的中等大小卵泡内,受 FSH 影响的 *CYP19A1* 的表达也没有显著增加,这也可能是绵羊不如牛的卵泡具有明显优势化效应的内在原因。

表 1 小卵泡和中卵泡差异表达超过 2 倍的基因

Table 1 Differently expressed genes more than 2 folds between oSF and oMF

基因	中卵泡 RPKM	小卵泡 RPKM	$\log_2(\text{oMF/oSF})$	基因	中卵泡 RPKM	小卵泡 RPKM	$\log_2(\text{oMF/oSF})$
<i>TIMP1</i>	910.93	67.09	3.76	<i>GSN</i>	109.84	50.44	1.12
<i>INHBA</i>	417.20	49.45	3.08	<i>CLEC3B</i>	156.97	73.95	1.09
<i>TM4SF1</i>	200.90	47.85	2.07	<i>ACTB</i>	405.11	194.63	1.06
<i>APOD</i>	1 559.02	385.71	2.02	<i>SEPP1</i>	308.43	148.31	1.06
<i>MGP</i>	2 109.10	536.03	1.98	<i>IGFBP7</i>	889.85	428.55	1.05
<i>CTGF</i>	325.20	92.58	1.81	<i>ALDH1A1</i>	189.07	91.19	1.05
<i>SAT1</i>	606.14	175.96	1.78	<i>CYP11A1</i>	113.93	55.15	1.05
<i>ADFP</i>	455.85	142.28	1.68	<i>LUM</i>	633.33	311.07	1.03
<i>CEBPD</i>	151.32	47.60	1.67	<i>PTN</i>	622.15	309.46	1.01
<i>IFI27</i>	237.76	75.23	1.66	<i>C-FOS</i>	506.88	69.86	-2.86
<i>ADM</i>	608.27	204.86	1.57	<i>MT-ND5</i>	1 387.65	262.74	-2.40
<i>CITED2</i>	165.96	57.38	1.53	<i>EGR1</i>	347.36	67.81	-2.36
<i>ANXA3</i>	103.83	36.89	1.49	<i>HSPA6</i>	241.06	51.05	-2.24
<i>GADD45A</i>	361.43	129.26	1.48	<i>MT-ND6</i>	1 046.90	228.48	-2.20
<i>ERRFI1</i>	280.74	102.73	1.45	<i>PGM2</i>	107.39	27.14	-1.98
<i>OLFML3</i>	207.44	76.18	1.45	<i>SCD</i>	219.65	57.84	-1.93
<i>C10orf10</i>	135.37	50.57	1.42	<i>SLC26A2</i>	240.77	69.06	-1.80
<i>ASIP</i>	114.12	42.94	1.41	<i>PPP1R15A</i>	138.03	44.19	-1.64
<i>APOA1</i>	2 518.92	948.83	1.41	<i>RHOB</i>	103.64	33.82	-1.62
<i>S100A13</i>	188.00	71.85	1.39	<i>AMH</i>	303.47	101.10	-1.59
<i>PROM1</i>	103.61	39.86	1.38	<i>TLL2</i>	283.70	103.64	-1.45
<i>CD9</i>	162.59	63.60	1.35	<i>C-JUN</i>	214.77	79.25	-1.44
<i>ERP27</i>	441.24	173.42	1.35	<i>MT-ND1</i>	3 441.02	1 352.26	-1.35
<i>GAL-1</i>	1 017.18	401.23	1.34	<i>HS6ST2</i>	532.93	209.63	-1.35
<i>THYMB4X</i>	3 132.75	1 237.56	1.34	<i>HSPG2</i>	101.26	40.61	-1.32
<i>COL1A1</i>	333.58	132.16	1.34	<i>HIF1A</i>	371.82	155.87	-1.25
<i>GNG11</i>	160.30	64.42	1.32	<i>ISYNA1</i>	209.61	89.59	-1.23
<i>TMEM176B</i>	200.52	80.87	1.31	<i>ITGA6</i>	185.70	79.48	-1.22
<i>TIMP2</i>	276.20	111.51	1.31	<i>GREB1</i>	184.78	81.27	-1.19
<i>ANXA1</i>	165.27	68.07	1.28	<i>TOP2A</i>	112.31	49.56	-1.18
<i>DCN</i>	1 561.58	650.75	1.26	<i>C10orf54</i>	141.09	62.83	-1.17
<i>C12orf57</i>	212.77	88.82	1.26	<i>SH3D19</i>	101.70	45.78	-1.15
<i>ACTB</i>	107.66	47.27	1.19	<i>VCAN</i>	110.39	50.01	-1.14
<i>APOE</i>	530.44	236.93	1.16	<i>CKAP5</i>	156.95	72.45	-1.12
<i>S100A11</i>	177.92	79.92	1.15	<i>GYTL1B</i>	124.27	59.25	-1.07
<i>COL6A1</i>	233.02	105.58	1.14	<i>DAG1</i>	328.56	157.21	-1.06
<i>RBP1</i>	442.01	200.82	1.14	<i>PRKAR2B</i>	388.37	188.56	-1.04
<i>TAGLN</i>	154.87	71.06	1.12				

表 2 小卵泡和中卵泡差异表达超过 4 倍的基因

Table 2 Differently expressed genes more than 4 folds between oSF and oMF

基因	中卵泡 <i>RPKM</i>	小卵泡 <i>RPKM</i>	$\log_2(\text{oMF/oSF})$	基因	中卵泡 <i>RPKM</i>	小卵泡 <i>RPKM</i>	$\log_2(\text{oMF/oSF})$
<i>MMP1</i>	39.17	0.62	5.97	<i>APOD</i>	1 559.02	385.71	2.02
<i>MMP13</i>	25.15	0.74	5.08	<i>FOSB</i>	74.88	1.10	-6.09
<i>IGFBP1</i>	21.98	1.16	4.25	<i>AMPD3</i>	10.67	0.64	-4.06
<i>TIMP1</i>	910.93	67.09	3.76	<i>PARM1</i>	65.63	7.86	-3.06
<i>PTX3</i>	32.29	2.86	3.50	<i>C-FOS</i>	506.88	69.86	-2.86
<i>A2M</i>	23.07	2.10	3.46	<i>OTOA</i>	34.66	5.39	-2.68
<i>INHBA</i>	417.20	49.45	3.08	<i>DGKH</i>	14.89	2.43	-2.61
<i>GALNT15</i>	16.08	2.03	2.98	<i>SLC5A3</i>	13.77	2.34	-2.55
<i>SERPINA1</i>	40.72	5.41	2.91	<i>SCUBE3</i>	10.19	1.82	-2.48
<i>RUNX2</i>	47.70	7.79	2.61	<i>MT-ND5</i>	1 387.65	262.74	-2.40
<i>CCL2</i>	13.24	2.17	2.61	<i>KIAA0754</i>	14.56	2.83	-2.36
<i>SMIM3</i>	16.51	2.80	2.56	<i>EGR1</i>	347.36	67.81	-2.36
<i>SI00A2</i>	33.36	5.76	2.53	<i>CSRNP3</i>	10.94	2.22	-2.30
<i>KRT8</i>	19.84	3.45	2.52	<i>IHH</i>	70.91	14.64	-2.28
<i>MFAP4</i>	22.99	4.32	2.41	<i>HSPA6</i>	241.06	51.05	-2.24
<i>RGS4</i>	16.78	3.49	2.26	<i>MT-ND6</i>	1 046.90	228.48	-2.20
<i>HTRA3</i>	27.64	5.78	2.26	<i>IKZF2</i>	11.40	2.73	-2.06
<i>CPXM1</i>	82.10	17.48	2.23	<i>PPT-B</i>	14.11	3.41	-2.05
<i>C1QC</i>	22.75	4.85	2.23	<i>KMT2A</i>	14.68	3.56	-2.04
<i>SERPINA14</i>	16.25	3.73	2.12	<i>HCFC1</i>	23.51	5.78	-2.03
<i>CHI3L1</i>	14.90	3.47	2.10	<i>RNF157</i>	10.88	2.69	-2.02
<i>BCAS4</i>	11.09	2.63	2.08	<i>RAPH1</i>	13.3	3.32	-2.00
<i>TM4SF1</i>	200.90	47.85	2.07				

在本研究结果中,绵羊中等卵泡中与卵泡优势化密切相关的 *INHBA* 的表达量却显著升高。*INHBA* 亚基既是抑制素组成成分,也是激活素的组成成分。由于 *INHBA* 显著升高,而构成抑素素的 *INHA* 亚基表达差异并不显著,因此 *INHBA* 的升高可能提高激活素的浓度。推测被选择卵泡(中卵泡)可能激发了激活素含量的提高。本研究结果中一些受激活素影响的胶原蛋白基因(*COL1A1*、*COL6A1*)表达量显著升高,同时防止胶原过度降解的组织金属蛋白酶抑制剂(*TIMP-1*)表达也显著升

高。因此,绵羊卵泡被选择后,可能导致卵泡内激活素含量升高及胶原蛋白含量的升高,这为卵泡的进一步发育奠定基础。

IGF 系统也参与卵泡选择的过程。IGF 系统包括 IGF-1 和 IGF-2,IGF 受体,IGF 结合蛋白(IGFBP)和 IGF 蛋白酶家族<sup>[23]</sup>。在牛和人颗粒细胞上,IGF-1 和 IGF-2 通过旁分泌-自分泌活性,促进细胞生长,增加 E2 含量以及提高对 FSH 的敏感性。在牛的优势卵泡液中,具有较高浓度的 IGF-1<sup>[21]</sup>。颗粒细胞特异表达基因 *IGFBP-2* 和膜细胞特异表达基因 *IGFBP-4*

表3 绵羊小卵泡和中卵泡差异表达基因的GO分类富集分析

Table 3 Significantly enriched GO terms in DEGs of oSF and oMF

项目	基因本位术语	使用频率	基因组使用频率	P 值
细胞组分	胞外基质	55(4.4%)	259(1.8%)	$1.30 \times 10^{-7}$
	质膜	126(10.1%)	883(6.3%)	$6.40 \times 10^{-6}$
	细胞外周	126(10.1%)	897(6.4%)	$1.60 \times 10^{-5}$
	胞外区域部分	98(7.9%)	684(4.9%)	$1.90 \times 10^{-4}$
	胞外区域	104(8.4%)	740(5.3%)	$2.20 \times 10^{-4}$
	质膜部分	111(8.9%)	818(5.8%)	$5.40 \times 10^{-4}$
分子功能	酶调控活性	112(9.4%)	820(6.0%)	$3.30 \times 10^{-4}$
	离子结合	354(29.8%)	3 266(24.0%)	$3.60 \times 10^{-4}$
	阳离子结合	344(29.0%)	3 161(23.3%)	$3.80 \times 10^{-4}$
	金属离子结合	274(23.1%)	2 463(18.1%)	$1.36 \times 10^{-3}$
生物学过程	细胞增殖正调控	36(3.1%)	149(1.1%)	$3.66 \times 10^{-5}$
	生物学调控	596(51.3%)	5 716(43.8%)	$7.05 \times 10^{-5}$
	细胞通讯	335(28.8%)	2 943(22.5%)	$1.60 \times 10^{-4}$
	生物学进程调控	543(46.7%)	5 173(39.6%)	$2.50 \times 10^{-4}$
	有机环状化合物反应	56(4.8%)	311(2.4%)	$4.10 \times 10^{-4}$
	单组织信号转导	321(27.6%)	2 845(21.8%)	$8.70 \times 10^{-4}$
	刺激反应	473(40.7%)	4 456(34.1%)	$9.70 \times 10^{-4}$
	细胞增殖调控	50(4.3%)	272(2.1%)	$9.70 \times 10^{-4}$
	免疫系统进程调控	76(6.5%)	485(3.7%)	$1.17 \times 10^{-3}$
	甾类激素刺激反应	42(3.6%)	221(1.7%)	$3.20 \times 10^{-3}$
	刺激反应调控	146(12.6%)	1 138(8.7%)	$3.93 \times 10^{-3}$
	多细胞组织进程调控	111(9.6%)	813(6.2%)	$4.29 \times 10^{-3}$
	免疫反应	37(3.2%)	187(1.4%)	$4.90 \times 10^{-3}$
	免疫效应过程	34(2.9%)	168(1.3%)	$7.32 \times 10^{-3}$
	体液免疫应答	15(1.3%)	45(0.3%)	$7.62 \times 10^{-3}$

表4 差异表达基因经典通路的KEGG富集

Table 4 Pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

序列	通路	上调基因	下调基因	P 值
1	补体和凝血级联反应	A2M <sup>*</sup> 、AHSG、ANGPTL2、CIQA、CIQB、CIQC <sup>*</sup> 、C1R、C1RL、C1S、C4、C4BPA、CFB、CFD、PAI-1、PLAUR、SERPINA11、SERPINA14 <sup>*</sup> 、SERPINC1、SERPINF1、SVEP1、TFPI2、WFIKK2	CSMD1、F5、PROS1、SERPINA1 <sup>*</sup> 、SERPINA5、SERPING1	$1.10 \times 10^{-5}$
2	吞噬小体	ATP6AP1L、ATP6V0A4、C1R、C1RL、CLEC3B、CLEC9A、COLEC11、COLEC12、CYBA、DQA、FCGR3A、HEBP2、HLA-DMA、HLA-DRA、ITGB2、KIAA1598、MRC1、MSR1、NCF4、THBS4、TLR2、TUBA8、TUBB6	CORO2B、EEA1、HOOK1、PIKFYVE、TBC1D2B、TFRC、WDFY3、XK	$3.05 \times 10^{-3}$
3	细胞因子-细胞因子受体相互作用	ACKR3、AMHR2、BMP6、CCL2 <sup>*</sup> 、CD40、CXCL9、CXCR4、GDF5、IL10RA、IL15RA、IL17RA、IL18、IL21R、IL4R、INHBA <sup>*</sup> 、OSMR、PDGFRL、TGFB1、TGFB3、TNFRSF12A、TNFRSF13C、TNFSF13	ACVR2B、AMH、BMPR2、BMPRIA、EDA、EGFR、EPO、IFNLR1、KITLG、MFAP3L、PEG10、TGFBRI	$7.26 \times 10^{-3}$
4	TGF-β 信号通路	BMP6、DCN、EFEMP1、EFEMP2、FBLN1、FBLN7、GDF5、INHBA <sup>*</sup> 、TGFB1、TGFB3、THBS4	ACVR2B、AMH、AMHR2、BMPR2、BMPRIA、CHRDLI、PPP2R1B、RBL1、SKP1、SMAD5、TGFBRI	$8.16 \times 10^{-3}$
5	轴突导向	CXCR4、EFNA1、FES、ISLR、LRRRC4C、LRRN3、RGS2、RGS4 <sup>*</sup> 、SEMA3B、SLIT3	ARHGEF12、CIB2、FAM178A、FSTL4、GMFB、IGSF9B、KIRREL、LGI3、LRRRC19、LRRRC3B、NFAT5、PAK3、PLXNA1、PRTG、RGS16、RGS17、RGS8、SEMA4D、SEMA4G、SEMA6D、SLIT1、SLITRK4、SRGAP2、UNC5D	$8.83 \times 10^{-3}$

黑体字表示  $RPKM > 30$ , \* 表示差异倍数大于 4 倍。



在牛从属卵泡中的表达量都高于优势卵泡。*IGFBP-4*与*IGF1*结合后具有蛋白酶活性,降解*IGFBP-4*,释放*IGF-I*<sup>[21]</sup>。在我们的测序结果中鉴定到2种*IGFBP*显著变化,*IGFBP1*在小卵泡中*RPKM*值是1.16,而在中卵泡中的*RPKM*值是21.98,表达量提高了近19倍;而*IGFBP7*在中卵泡中高表达(*RPKM*=889.85),推测*IGFBP1*和*IGFBP7*参与了绵羊卵泡的生长发育过程。

TGF- $\beta$ 家族包括了TGF- $\beta$ 、BMP、GDF及激活素等众多成员,在绵羊卵泡发育过程中起着重要的作用。我们的测序鉴定到的差异基因KEGG分析中,差异基因在TGF $\beta$ 富集较为显著。在该通路中,表达较高的(*RPKM*>30)差异基因上调的有*DCN*、*EFEMP2*、*FBLN1*、*INHBA*,下调的有*AMH*、*BMPRIA*、*CHRD1*、*PPP2R1B*。*DCN*是在膜细胞中表达的一种胞外基质蛋白,在灵长类动物卵巢内能提高胞内Ca<sup>2+</sup>浓度以及活性氧的含量,经由生长因子-生长因子受体系统发挥旁分泌作用<sup>[24]</sup>,在牛的小卵泡到大卵泡阶段,*DCN*在膜细胞和颗粒细胞中的表达量也显著升高<sup>[25]</sup>。*AMH*在卵泡中随着直径的增加其表达是变化的,而在闭锁卵泡中不表达<sup>[26]</sup>。在人的3~13 mm不同直径卵泡内在优势卵泡分离之前,*AMH*基因随着卵泡直径的增加其表达逐步升高,而随着卵泡的被选择和分离之后,*AMH*的表达下降<sup>[27]</sup>。随着牛卵泡直径的增加,*AMH*在颗粒细胞和膜细胞的表达量均下降<sup>[13]</sup>。在本研究中,*AMH*的表达也呈下降趋势,推测绵羊卵泡的选择过程与*AMH*的表达下调有关。

载脂蛋白影响着卵泡的发育过程。载脂蛋白APO有5种形式,A、B、C、D、E。其中*APOE*基因敲除的小鼠可以导致肥胖,虽然不影响其繁殖效率,但会提高卵泡数目和凋亡率<sup>[28]</sup>。牛从小卵泡到大卵泡,其*APOD*发生了显著上调<sup>[25]</sup>。血液内甾类激素的含量可影响*APOA1*及促性腺激素的浓度<sup>[29]</sup>。在卵母细胞体外成熟后的卵丘细胞中,*APOA1*的含量也显著提高<sup>[30]</sup>。本研究结果中,*APOA1*、*APOD*和*APOE*在中卵泡中的表达均超过2倍,推测载脂蛋白可能也参与了卵泡的选择及发育过程。

*TM4SF1*基因是一个质膜小蛋白,调控细胞的迁移与增殖,在肿瘤细胞和血管内皮细胞中高表达<sup>[31]</sup>,在优势卵泡膜细胞层上毛细血管细胞中表达丰富<sup>[32]</sup>。胞外分泌的基质Gla蛋白(Matrix gla pro-

tein, MGP)缺乏时可导致动脉钙化和周围肺动脉狭窄等症状<sup>[33]</sup>。*TM4SF1*从牛的小卵泡到大卵泡,其表达显著升高<sup>[25]</sup>。本研究结果中,中卵泡内*TM4SF1*和*MGP*的表达均显著升高,推测这些基因表达的上调可能影响优势卵泡血管的发生过程。

基质金属蛋白酶家族(MMP)是一类依赖金属锌离子的蛋白水解酶家族,能有效地降解细胞外基质,在肿瘤的生长转移过程中起着重要作用。*MMP1*又称间质性胶原酶,属基质金属蛋白酶家族,其主要作用底物为纤维性胶原,可降解细胞外基质中的胶原纤维和明胶及改变细胞的微环境。在正常生理状态下,MMP与组织金属蛋白酶抑制剂(TIMP)共同调控细胞外基质的降解、组织重建以及细胞内多种可溶性因子,维持细胞的稳定性,在卵泡膜细胞和颗粒细胞上均有表达<sup>[34]</sup>。在灵长类动物中,*MMP1*参与到排卵和黄体化过程<sup>[35]</sup>,在卵泡的排卵过程具有重要的作用。*PTX3*在卵泡的发育过程中,随着卵泡直径的增加含量增加,推测其对卵泡的发育具有重要的作用<sup>[36]</sup>。在我们的测序结果中,*MMP1*、*MMP13*、*PTX3*在中卵泡表达均显著上调,超过了8倍以上。这些基因的表达可能与卵泡体积的快速增大有关。

*TMSB4X*属于一类高度保守的小蛋白,在免疫组织中高丰度存在,参与了各种生物学活性,包括抗炎症,伤口愈合,调亡和细胞存活。在性腺中的研究仅见于在大鼠的精巢附睾发育中有高表达,其表达受睾酮的影响<sup>[37]</sup>。目前尚未见到关于*TMSB4X*在卵泡发育过程中的作用。本研究发现,在小卵泡到中卵泡过程中,表达量最高的差异基因是*TMSB4X*,变化超过2倍,该分子可能对卵泡的选择和发育有着重要的作用。

在中卵泡阶段,有些基因表达显著下调,最为显著的是NADH脱氢酶3种亚基*MT-ND1*、*MT-ND5*、*MT-ND6*。NADH脱氢酶是一种位于线粒体内膜催化电子从NADH传递给辅酶Q的酶,由多个亚基组成,是由线粒体基因组编码的并为细胞代谢提供能量的关键酶。绵羊卵泡中颗粒细胞增殖速度最快的阶段是腔前卵泡和小的有腔卵泡,而到中卵泡和大卵泡阶段,颗粒细胞的增殖能力显著降低<sup>[38]</sup>。因此推测,*MT-ND*亚基的表达显著降低与细胞增殖所需的ATP能量减少有关。

另外,结果中还鉴定到*EGR1*和*c-FOS*表达也

显著降低。*EGR1* 和 *c-FOS* 均是重要的转录因子,与很多基因的启动表达有关。*c-FOS* 与细胞生长和增殖有关<sup>[30]</sup>。*EGR1* 涉及到不同组织多种基因的反式激活及功能调控。在小卵泡中,FSH 可诱导 *EGR1* 的表达<sup>[38]</sup>。在牛的排卵前卵泡中 *EGR1* 具有促性腺激素依赖性的诱导表达<sup>[39]</sup>。在本研究结果中,*EGR1* 在小卵泡中高表达,但在中卵泡中表达显著下降,表明 *EGR1* 可能参与到卵泡早期发育功能。其在卵泡选择过程中的生物学功能还有待于进一步的验证。

### 参考文献:

- [1] BARTLEWSKI P M, BEARD A P, COOK S J, et al. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes[J]. J Reprod Fertil, 1998, 113(2): 275-285.
- [2] BARTLEWSKI P M, BEARD A P, RAWLINGS N C. An ultrasound-aided study of temporal relationships between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicles and formation of corpora lutea in ewes[J]. Theriogenology, 2000, 54(2): 229-245.
- [3] 古丽米热·阿布都热依木,吴阳升,林嘉鹏,等. 绵羊卵丘细胞直径与卵母细胞质量的相关性[J]. 江苏农业科学,2014,42(12): 236-239.
- [4] SEEKALLU S V, TOOSI B M, DUGGAVATHI R, et al. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: comparison among oestrous cycles with three or four follicular waves[J]. Theriogenology, 2010, 73(5): 670-80.
- [5] MULSANT P, LECERF F, FABRE S, et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(9): 5104-5109.
- [6] SOUZA C J, MacDOUGALL C, CAMPELL B K, et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (BMPRI1B) gene[J]. J Endocrinol, 2001, 169(2): R1-R6.
- [7] WILSON T, WU X Y, JUENGEL J L, et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells[J]. Biol Reprod, 2001, 64(4): 1225-1235.
- [8] HANRAHAN J P, GREGAN S M, MULSANT P, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*) [J]. Biol Reprod, 2004, 70(4): 900-909.
- [9] BODIN L, DI PASQUALE E, FABRE S, et al. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep [J]. Endocrinology, 2007, 148(1): 393-400.
- [10] ZHOU J, KUMAR T R, MATZUK M M, et al. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary [J]. Mol Endocrinol, 1997, 11(13): 1924-1933.
- [11] SILVA J M, PRICE C A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro* [J]. J Endocrinol, 2002, 174(3): 499-507.
- [12] GINTHER O J, BERGFELT D R, BEG M A, et al. *In vivo* effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares[J]. Biol Reprod, 2004, 70(1): 99-105.
- [13] SKINNER M K, SCHMIDT M, SAVENKOVA M I, et al. Regulation of granulosa and theca cell transcriptomes during ovarian antral follicle development [J]. Mol Reprod Dev, 2008, 75(9): 1457-1472.
- [14] DRIANCOURT M A, WEBB R, FRY R C. Does follicular dominance occur in ewes? [J]. J Reprod Fertil, 1991, 93(1): 63-70.
- [15] DUGGAVATHI R, BARTLEWSKI P M, BARRETT D M, et al. Patterns of antral follicular wave dynamics and accompanying endocrine changes in cyclic and seasonally anestrous ewes treated with exogenous ovine follicle-stimulating hormone during the inter-wave interval[J]. Biol Reprod, 2004, 70(3): 821-827.
- [16] TOOSI B M, DAVIES K L, SEEKALLU S V, et al. Ovarian follicular dominance and the induction of daily follicular waves in the ewe[J]. Biol Reprod, 2010, 83(1): 122-129.
- [17] LI R, YU C, LI Y, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment [J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1966-1967.
- [18] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, McCUE K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nat Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [19] DESAI S S, ROY B S, MAHALE S D. Mutations and polymorphisms in FSH receptor: functional implications in human reproduction[J]. Reproduction, 2013, 146(6): R235-R248.
- [20] KNIGHT P G, SATCHELL L, GLISTER C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 359(1-2): 53-65.
- [21] GINTHER O J, BEG M A, BERGFELT D R, et al. Follicle selection in monovular species [J]. Biol Reprod, 2001, 65(3): 638-647.
- [22] HOBBS R J, HOWARD J, WILDT D E, et al. Absence of seasonal changes in *FSHR* gene expression in the cat cumulus-oocyte complex *in vivo* and *in vitro* [J]. Reproduction, 2012, 144(1): 111-122.
- [23] WEBB R, CAMPBELL B K, GARVERICK H A, et al. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection[J]. J

- Reprod Fertil Suppl, 1999, 54: 33-48.
- [24] ADAM M, SALLER S, STROBL S, et al. Decorin is a part of the ovarian extracellular matrix in primates and may act as a signaling molecule[J]. Hum Reprod, 2012, 27(11): 3249-3258.
- [25] HATZIRODOS N, HUMMITZSCH K, IRVING-RODGERS H F, et al. Transcriptome comparisons identify new cell markers for theca interna and granulosa cells from small and large antral ovarian follicles[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119800.
- [26] CAMPBELL B K, CLINTON M, WEBB R. The role of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep) [J]. Endocrinology, 2012, 153(9): 4533-4543.
- [27] JEPPESEN J V, ANDERSON R A, KELSEY T W, et al. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection[J]. Mol Hum Reprod, 2013, 19(8): 519-527.
- [28] ZHANG T, DAI P, CHENG D, et al. Obesity occurring in apolipoprotein E-knockout mice has mild effects on fertility[J]. Reproduction, 2013, 147(2): 141-151.
- [29] GAREVIK N, RANE A, BJORKHEM-BERGMAN L, et al. Effects of different doses of testosterone on gonadotropins, 25-hydroxyvitamin D3, and blood lipids in healthy men[J]. Subst Abuse Rehabil, 2014, 5: 121-127.
- [30] REGASSA A, RINGS F, HOELKER M, et al. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 57.
- [31] LIN C I, MERLEY A, SCIUTO T E, et al. TM4SF1: a new vascular therapeutic target in cancer[J]. Angiogenesis, 2014, 17(4): 897-907.
- [32] MacCHIARELLI G, JIANG J Y, NOTTOLA S A, et al. Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle capillary networks; a scanning electron microscopy study of corrosion cast [J]. Microsc Res Tech, 2006, 69(6): 459-468.
- [33] YAO Y, NOWAK S, YOCHELIS A, et al. Matrix GLA protein, an inhibitory morphogen in pulmonary vascular development[J]. J Biol Chem, 2007, 282(41): 30131-30142.
- [34] ROSEWELL K L, AL-ALEM L, ZAKERKISH F, et al. Induction of proteinases in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle by human chorionic gonadotropin[J]. Fertil Steril, 2015, 103(3): 826-833.
- [35] STOUFFER R L, XU F, DUFFY D M. Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle [J]. Front Biosci, 2007, 12: 297-307.
- [36] DONADEU F X, FAHIMINIYA S, ESTEVES C L, et al. Transcriptome profiling of granulosa and theca cells during dominant follicle development in the horse [J]. Biol Reprod, 2014, 91(5): 111.
- [37] RENGARAJ D, HWANG Y S, LIANG X H, et al. Comparative expression and regulation of TMSB4X in male reproductive tissues of rats and chickens[J]. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 2013, 319(10): 584-595.
- [38] RUSSELL D L, DOYLE K M, GONZALES-ROBAYNA I, et al. Egr-1 induction in rat granulosa cells by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: combinatorial regulation by transcription factors cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulatory element binding protein, serum response factor, sp1, and early growth response factor-1 [J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(4): 520-533.
- [39] SAYASITH K, BROWN K A, LUSSIER J G, et al. Characterization of bovine early growth response factor-1 and its gonadotropin-dependent regulation in ovarian follicles prior to ovulation [J]. J Mol Endocrinol, 2006, 37(2): 239-250.

(责任编辑:孙 宁)