

任巧玲, 张家庆, 马 强, 等. 初产母猪囊肿卵巢与发情卵巢转录组比较分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(3): 741-752.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.03.015

初产母猪囊肿卵巢与发情卵巢转录组比较分析

任巧玲¹, 张家庆¹, 马 强¹, 陈俊峰¹, 王 璟¹, 王献伟², 高彬文¹, 郭红霞¹,
刘付玖¹, 邢宝松¹

(1. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所/河南省畜禽繁育与营养调控重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南省畜牧总站, 河南 郑州 450008)

摘要: 旨在系统比较初产母猪囊肿卵巢与发情卵巢的转录组水平表达的变化, 探索母猪卵巢囊肿发生的遗传机制。以初产母猪的囊肿卵巢和发情卵巢为研究对象, 用 Illumina NovaSeq 6000 测序系统进行转录组测序及生物信息学分析。结果表明, 构建的 6 个 cDNA 文库中共得到 46.68 Gb 原始序列(Raw reads), 质控处理后获得 42.02 Gb 纯净序列(Clean reads), 各样品的 Clean reads 大小均达到 6.74 Gb 以上, 与参考基因组(*Sus scrofa* 11.1) 的比对率为 97.33%~97.79%。与发情卵巢相比, 从囊肿卵巢中共筛选到 335 个差异表达基因, 其中上调表达的基因有 121 个, 下调表达的基因有 214 个。另外, 有 4 559 个新转录本被发掘, 与发情卵巢相比, 有 53 个新转录本在相对表达量上存在显著差异, 其中上调表达的有 18 个, 下调表达的有 35 个。GO 及 KEGG 通路分析结果显示, 差异表达基因在多个与发生卵巢囊肿相关的通路中富集, 如胆固醇代谢通路、I 型糖尿病通路、II 型糖尿病通路、糖尿病并发症中晚期糖基化终产物及其受体(AGE-RAGE) 信号通路等。利用 CytoHubba 插件从差异表达基因的蛋白质-蛋白质互作(PPI) 网络中筛选到 10 个核心节点基因, 这些基因主要参与癌症通路、细胞凋亡通路、趋化因子活性通路、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路, 并在肿瘤发生、多囊卵巢综合征(PCOS) 并发症、卵泡闭锁、卵巢老化等方面发挥作用。通路及核心基因的功能分析结果表明, 糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路、*CXCL12* 基因与卵巢囊肿高度相关, 机体炎症和胰岛素功能异常可能是导致初产母猪卵巢囊肿病变的主要因素。研究结果可为揭示母猪卵巢囊肿的分子遗传机制提供重要理论依据, 同时可为解析人类卵巢囊肿的遗传机制提供参考。

关键词: 初产母猪; 囊肿; 发情; 卵巢; 转录组

中图分类号: S828.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)03-0741-11

Comparison and analysis of transcriptomes in cystic ovary and estrous ovary of primiparous sows

REN Qiao-ling¹, ZHANG Jia-qing¹, MA Qiang¹, CHEN Jun-feng¹, WANG Jing¹, WANG Xian-wei²,
GAO Bin-wen¹, GUO Hong-xia¹, LIU Fu-jiu¹, XING Bao-song¹

(1. Henan Key Laboratory of Farm Animal Breeding and Nutritional Regulation, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Provincial Animal Husbandry General Station, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: The aim of the study was to systematically compare transcriptome expression changes of cystic ovary and estrous ovary of primiparous sows, and to explore the genetic mechanism of sow ovarian cyst. In this study, cystic ovary and estrous ovary of

收稿日期: 2022-06-30

基金项目: 河南省科技攻关项目(222102110096, 222102110467); 河南省农业科学院杰出青年科技基金项目(2021JQ07); 国家重点研发计划项目(2021YFD1301200)

作者简介: 任巧玲(1976-), 女, 河南驻马店人, 硕士, 副研究员, 主要从事猪的育种与营养研究。(E-mail) renql76@163.com

通讯作者: 张家庆, (E-mail) zjq8650612@163.com; 邢宝松, (E-mail) baosong@126.com

primiparous sows were used as the research objects, and transcriptome sequencing and bioinformatics analysis were performed using Illumina NovaSeq 6000 platform. The results showed that a total of 46.68 Gb raw reads were obtained from the six sequencing libraries, and 42.02 Gb clean reads were obtained after quality control processing. The clean reads of each sample reached more than 6.74 Gb, and their comparison rate with the reference genome (*Sus scrofa* 11.1) was between

97.33% and 97.79%. Compared with estrous ovaries, there were 335 differentially expressed genes in cystic ovaries, including 121 up-regulated genes and 214 down-regulated genes. In addition, a total of 4 559 new transcripts were explored in this study. Compared with estrous ovaries, 53 new transcripts were significantly different in cystic ovaries, of which 18 were up-regulated and 35 were down-regulated. The final analysis of GO and KEGG pathway indicated that the differentially expressed genes were significantly enriched in some signaling pathways associated with ovarian cyst, such as cholesterol metabolism pathway, type I diabetes mellitus pathway, type II diabetes mellitus pathway, advanced glycation end products and their receptors (AGE-RAGE) signaling pathway in diabetic complications, etc. Ten hub genes were screened out from differentially expressed gene protein-protein interaction (PPI) network using CytoHubba plugin. These genes were mainly involved in cancer pathway, apoptosis pathway, chemokine activity pathway, and AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications, and played roles in tumorigenesis, polycystic ovary syndrome (PCOS) complications, follicular atresia, ovary aging, etc. Pathway and hub gene function analysis showed that AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications and *CXCL12* gene were highly correlated with ovarian cysts, and body inflammation and abnormal insulin function were likely to be the main factors leading to ovarian cyst in primiparous sows. The results of this study provided an important theoretical basis for revealing the molecular genetic mechanism of sow ovarian cysts, and also provided a reference for the analysis of the genetic mechanism of human ovarian cysts.

Key words: primiparous sow; cyst; estrus; ovary; transcriptome

卵巢囊肿是常见的猪生殖系统疾病之一,分为卵泡囊肿、黄体囊肿 2 种,在生产中以卵泡囊肿最为常见^[1]。卵巢囊肿属于多基因遗传病,具有病因复杂、分子机制不明、受到遗传和环境因素共同作用、治疗后易复发等特点^[2]。据报道,2.4%~40.0%的母猪存在卵巢囊肿,由此造成的淘汰比例可达2.0%~10.0%,严重影响了母猪的繁殖性能^[3]。虽然初产母猪具有较高的生产价值,但是生殖障碍性疾病造成的母猪淘汰率普遍较高,卵巢囊肿是其中一个重要原因。目前生产上多用生殖激素诱导的方法治疗卵巢囊肿,治疗周期较长且愈后母猪的受胎率、产仔数均受影响^[4]。因此,研究猪卵巢囊肿病变的分子调控机制,探索分子育种的新方法,开发提高繁殖力的新技术,对于改善母猪的繁殖效率具有重要意义。

尽管卵巢囊肿的发病机制较为复杂,目前人们尚未完全了解,但是遗传因素依然被认为是其主要发病机制之一。Kahsar-Miller 等^[5]对 93 例患多囊卵巢综合征 (Polycystic ovarian syndrome, PCOS) 的妇女进行追踪调查发现,其母亲及姐妹的 PCOS 患病率分别为 24%、32%,显著高于一般人群。对 55 位 PCOS 患者卵巢颗粒细胞中 *CYP19A1* 基因的表达分析发现,与健康女性相比,PCOS 患者 *CYP19A1* 基因的相对表达量显著降低 ($P \leq 0.005$),PCOS 患者卵巢颗粒细胞发育出现紊乱,不能对促卵泡素 (FSH) 的刺激作出反应,因此造成芳香化酶活性在芳香化过程中降低,相关基因的相对表达量降低^[6]。Dakshinamoorthy 等^[7]研究了胰岛素受体 (Insulin receptor, INSR) 单核苷酸多态性 (SNPs) 位点 *rs2059807* 和 *rs1799817* 与印度妇女 PCOS 发生的相关性,发现

rs2059807 纯合突变 (CC) 个体更易患 PCOS ($P \leq 0.001$), *rs1799817* 通过显性方式使个体易患 PCOS,当该位点的 1 个等位基因出现显性突变时,个体患 PCOS 的风险显著升高 ($P \leq 0.001$),且 *rs2059807*、*rs1799817* 处于连锁平衡状态,独立对 PCOS 的发生起作用。基因多态性与猪卵泡囊肿发生的相关性研究发现,抑制素- α (Inhibin- α) 基因多态性与大白猪卵泡囊肿的形成和持续存在密切相关,该基因 c.-42G>A [表示与参考序列相比,5'端非编码区 (UTR) 第 42 位的 G 被 A 取代,其他表述依此类推] 和 c.3222G>A 多态性与猪卵泡囊肿的发生高度相关,且携带 c.-42GG 和 c.3222GG 基因型的大白猪患卵泡囊肿的风险较小^[8]。随后又有研究发现,视黄醇结合蛋白-4 (Retinol-binding protein 4, RBP-4) 编码基因和雌激素受体 (Estrogen receptor, ESR) 基因多态性也可导致猪卵泡囊肿的发生,ESR/*PvuII* 基因型的母猪患卵泡囊肿的概率较低 (概率为 0.021),RBP-4 基因的 +249-63G>C 多态性与猪卵泡囊肿的形成显著相关,且 CC 基因型患卵泡囊肿的风险较高,另外还发现,患卵泡囊肿的母猪卵泡液中 RBP-4 的表达量与健康卵泡相比显著升高^[9-10]。综上所述,基因表达及基因形态的改变均与卵巢囊肿病变的发生密切相关,具体遗传机制有待进一步挖掘。

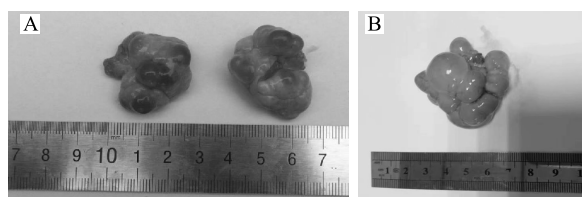
卵巢囊肿的发病率在成年淘汰母猪中占 10%,该病的发生大大降低了母猪的繁殖性能,给养猪生产造成了很大的经济损失。在中国育龄妇女中,PCOS 的发病率为 5%~10%,占不排卵不孕人数的 75%,占不孕患者人数的 30%~40%^[11]。由于临床上人类 PCOS 的发病率较高,因此迫切需要对该病进行系统研究,从而有效控制其发

生,但是在对人类卵巢囊肿自身遗传变化的研究中,受到取样困难(尤其是获取正常发情卵巢组织较困难)和伦理道德的约束而难以进行。由于猪和人在遗传学、生理学和解剖学等方面具有一定的相似性,因此猪可以作为研究人类卵巢囊肿等相关疾病的生物模型。本研究拟利用 RNA-seq 技术对初产母猪的囊肿卵巢和发情卵巢进行转录组测序,对 2 种生理状态下猪卵巢组织的转录组表达变化进行系统比较分析,筛选差异表达基因,并对其进行基因本体论(GO)、京都基因和基因组百科全书(KEGG)、蛋白质-蛋白质互作(PPI)分析,综合探究猪卵巢基因表达情况对其生理状态调控的影响,以期揭示母猪卵巢囊肿分子遗传机制提供理论依据,同时为解析人类卵巢囊肿的遗传机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物和样品的采集

选取年龄和身体状况基本相同的初产大长二元母猪作为试验猪,断奶后在大致相同的条件下饲养,用同 1 头公猪每天早晚各试情 1 次,以断奶后 7 d 有明显发情特征的 3 头母猪作为正常发情母猪(编号为 E_O_1、E_O_2、E_O_3,记作发情组),屠宰后取卵巢,用生理盐水冲洗后置于液氮中冻存^[12]。至断奶后 21 d,选取同一批次无任何发情表现的若干头母猪,用 Aloka500 B 超仪(Aloka 公司产品)测定并初步筛选出有卵巢囊肿的 5 头母猪,屠宰后选择卵巢明显肿大的 3 头母猪作为卵巢囊肿母猪(编号为 C_O_1、C_O_2、C_O_3,记作囊肿组),囊肿卵巢组织的处理方法与正常发情母猪相同。本研究采集的囊肿卵巢均为卵泡囊肿(图 1)。将卵巢冻存于液氮中时均未戳破卵泡。提取 RNA 时,发情组所用卵巢组织为带有正常发情卵泡的卵巢组织,囊肿组所用卵巢组织为卵泡明显肿大的卵巢组织。



A: 正常发情卵巢;B: 囊肿卵巢。

图 1 初产母猪的发情卵巢和囊肿卵巢

Fig.1 The normal estrous and cystic ovaries of primiparous sows

1.2 总 RNA 的提取与质检

卵巢组织总 RNA 的提取用 TRIzol 试剂盒(购

自 Thermo Fisher 公司)完成,分别用 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nano-Drop ND-2000 紫外分光光度计(购自 Thermo Scientific 公司)检测 RNA 样品的完整性和质量浓度,用 Agilent BioAnalyzer 2100 仪器(购自 Agilent Technologies 公司)进行质量检测,6 个卵巢组织的总 RNA 样品均要求达到如下条件: $OD_{260}/OD_{280}>2.1$,RNA 完整值(RIN) >8.0 。

1.3 cDNA 文库的构建与转录组测序

文库构建和 RNA 测序由上海欧易生物医学科技有限公司完成。每个样品取 3 μ g 总 RNA 构建 cDNA 文库。按照 Illumina NovaSeq 6000 测序系统的要求,对 6 个 cDNA 文库进行末端修复、3'末端加 A、接头连接后纯化、PCR 扩增富集、质检、定量等操作,符合 Illumina NovaSeq 6000 测序系统的要求后,进行测序,读长为 PE150(表示高通量双端测序,每端各测 150 bp)。

1.4 测序数据的质量控制及比对分析

对得到的原始序列(Raw reads)进行严格质控处理,得到纯净序列(Clean reads)后计算 Clean reads 的碱基质量 Q30 值、GC 含量及序列重复情况,Clean reads 转录本的组装用 String Tie 软件完成,并用 Gff Compare 软件与已知猪参考基因组(Susscrofa 11.1)序列进行比对后注释^[13]。

1.5 可变剪切事件分析及新转录本的预测

基于 Clean reads 的组装结果,用 ASprofile 软件对 6 个文库中存在的可变剪切事件进行统计和分析;在比对组装转录本与猪参考基因组注释信息时,将未被猪参考基因组注释的、基因间隔区长度在 180 bp 以上的、距离已有注释基因 200 bp 以上的转录本看作新转录本。

1.6 差异表达基因分析

用 FPKM 法计算基因的表达水平。各样品基因比对到该基因的总数目(Counts)用 DESeq R 软件包进行标准化处理,计算差异表达倍数,用 NB 软件对测序读数(Reads)进行差异显著性分析,根据差异显著性分析结果和差异表达倍数双重指标筛选差异表达基因,条件为 $P<0.05$ 且 $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 1$ 。

1.7 差异表达基因的 GO、KEGG 分析

为了进一步分析初产母猪囊肿卵巢和发情卵巢差异表达基因的功能,用 DAVID 在线数据库对筛选到的所有差异表达基因进行 GO 注释分析、KEGG 通路分析,用超几何分布检验法计算 GO 条目和 KEGG 通路的富集显著性,以显著性阈值 0.05 对表

现出显著差异的 GO 条目、KEGG 通路进行筛选。

1.8 差异表达基因的蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 网络的构建及关键基因的筛选

将差异表达基因上传到 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>) 构建 PPI 网络, 置信评分 > 0.4。用 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行可视化处理, 用 Cytoscape 内置的 CytoHubba 插件筛选排名前 10 的基因。

1.9 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

选取 10 个差异表达基因, 以猪 *GAPDH* 为内参基因进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 试验。根

据美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站上 10 个差异表达基因对应的 cDNA 序列, 用软件 Primer 6.0 设计引物, 引物序列信息见表 1, 引物委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。用 RevertAid Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (购自 Thermo Scientific 公司) 将测序时预留的 6 个样品的总 RNA (每个样品设置 3 个重复) 合成 cDNA, 根据 SYBR Premix *Ex Taq*TM 试剂盒 (购自 TaKaRa 公司) 的说明书进行实时荧光定量 PCR 试验^[13]。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量, 并将每个基因的相对表达量以 2 为底数取对数进行展示^[14]。

表 1 引物序列信息

Table 1 Sequence information of primers

基因	表达量变化	$\log_2 FC$	引物序列 (5'→3')	扩增长度 (bp)	登录号
<i>WNT4</i>	上调	2.20	F: AGGCGAAAGGGTAATTTCA R: AGTTCACGGAGGAGCAGCA	279	XM_005656037.3
<i>NR5A2</i>	上调	3.48	F: CATTATGGTGGAGTGGACGGA R: GGTGGCGCTACTAGTGGGTG	330	XM_021064001.1
<i>WNT7B</i>	上调	3.31	F: GCTTCTGAACCCCATCCTA R: CCGTCCGTACACCACCCTTT	518	XM_021091384.1
<i>IGFALS</i>	上调	1.35	F: CGCTCAATGACAACCAGATCCAG R: TCGGAGACGTCCAGCCAGAA	442	XM_013987754.2
<i>MMP15</i>	上调	1.15	F: CCCCGTCTCCCTGTTTATTT R: CCCTTTGGCTACTCTTCCGA	244	XM_013998213.2
<i>CXCL12</i>	下调	-1.41	F: GTCAGCCTGAGCTACAGATGC R: TGTTTAAAGCTTTCTCCAGGTATTC	196	XM_005671243.3
<i>VEGFD</i>	下调	-1.50	F: ACCTGTACGAACGGAACCA R: GGCGACTATGCAAATTACCTCA	438	XM_001928382.5
<i>VCAM1</i>	下调	-1.24	F: AAAAGCAGAGACAGGCGACAC R: GGATGCACAATAGAGCAGGAGA	208	NM_213891.1
<i>IRS2</i>	下调	-1.20	F: TACCACAGTCTACCTCAGTGCC R: CCCAATACAGTTGATGATTTTCCA	312	XM_021065907.1
<i>ABCA1</i>	下调	-1.01	F: GCCATCAAGCAAATGAAGAAAC R: AATGTGGGAAGATCAAGAACACAG	778	NM_001317080.1
<i>GAPDH</i>			F: CCTTCCGTGTCCCTACTGCCAAC R: GACGCCTGCTTACCACCTTCT	103	XM_021091114.1

F: 正向引物; R: 反向引物。FC: 差异表达倍数。

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据质控及初步分析

在 Illumina NovaSeq 6000 测序系统对构建的 6 个 cDNA 文库进行测序, 共获得 46.68 Gb 的 Raw reads, 经一系列质控处理后, 共获得 42.02 Gb Clean reads, 各样品的 Clean reads 大小均在 6.74 Gb 以上。测序数据的碱基质量值达 Q30 水平 (表示测序时碱基识别的错误率为 0.1% 或正确率为 99.9%) 的比例为 93.41%~94.28%, GC 含量为 50.59%~51.54%, 各 Clean reads 的碱基质量稳定在 Q20~Q30 水平 (其中

Q20 代表测序时碱基识别的错误率为 1% 或正确率为 99%), 碱基测序错误率低, 表明 6 个样品的文库构建和测序工作质量较高, 测序数据的可信度较高^[15]。

2.2 转录组测序结果的比对分析

将 Clean reads 与猪的参考基因组 (*Sus scrofa* 11.1) 进行注释比对, 各样品 Clean reads 的比对率为 97.33%~97.79%, 比对到唯一位置的比例为 95.24%~95.52%, 比对到多处位置的比例为 2.09%~2.50%, 表明 6 个样品的总 RNA 质量高, 不存在污染。比对到正链和负链的比例为 47.61%~47.77%, 整段比对到外显子上的序列占比为

38.39%~56.41%,分段比对到2个外显子上的序列 占比为35.41%~60.81%,详见表2。

表2 测序数据与参考基因组的比对结果

Table 2 Alignment results of sequencing data and reference genome

项目	C_O_1	C_O_2	C_O_3	E_O_1	E_O_2	E_O_3
总 reads	50 149 722	48 514 088	47 745 278	49 683 586	50 366 422	46 983 968
比对上的 reads	49 018 686 (97.74%)	47 442 585 (97.79%)	46 470 165 (97.33%)	48 477 513 (97.57%)	49 183 402 (97.65%)	45 877 160 (97.64%)
唯一定位 reads	47 763 747 (95.24%)	46 341 103 (95.52%)	45 474 545 (95.24%)	47 327 781 (95.26%)	48 058 048 (95.42%)	44 836 824 (95.43%)
多点定位 reads	1 254 939 (2.50%)	1 101 482 (2.27%)	995 620 (2.09%)	1 149 732 (2.31%)	1 125 354 (2.23%)	1 040 336 (2.21%)
比对到正链的 reads	23 876 084 (47.61%)	23 165 214 (47.75%)	22 731 200 (47.61%)	23 654 979 (47.61%)	24 022 598 (47.70%)	22 412 578 (47.70%)
比对到负链的 reads	23 887 663 (47.63%)	23 175 889 (47.77%)	22 743 345 (47.63%)	23 672 802 (47.65%)	24 035 450 (47.72%)	22 424 246 (47.73%)
比对到2个外显子的 reads	20 706 618 (41.29%)	19 019 699 (39.20%)	16 905 684 (35.41%)	27 057 129 (54.46%)	27 321 404 (54.25%)	28 568 861 (60.81%)
整段比对到外显子的 reads	19 810 518 (39.50%)	19 837 252 (40.89%)	18 331 242 (38.39%)	27 517 263 (55.39%)	28 220 796 (56.03%)	26 505 400 (56.41%)

C_O_1~C_O_3 为囊肿卵巢;E_O_1~E_O_3 为发情卵巢。

2.3 囊肿卵巢和发情卵巢基因的可变剪切情况

本试验所测的6个样本中均存在大量可变剪切事件,涉及的类型、数量等详细信息见表3,可以看出,猪卵巢基因组中的可变剪切事件以最后1个外显子可变剪切(TTS)、第1个外显子可变剪切

(TSS)、单外显子跳跃(SKIP)和单内含子滞留(IR)4种类型为主,在囊肿组上述4种剪切事件的平均占比分别为28.89%、34.19%、10.83%和10.06%,在发情组上述4种剪切事件的平均占比分别为28.60%、33.61%、10.84%和10.64%。

表3 囊肿卵巢和发情卵巢基因可变剪切事件的类型与数量

Table 3 Types and numbers of alternative splicing events in cystic ovary and estrous ovary

可变剪切事件类型	C_O_1	C_O_2	C_O_3	E_O_1	E_O_2	E_O_3
涉及的基因数目	18 345	18 571	19 985	20 491	17 984	19 251
可变剪切数目	64 475	67 558	93 655	72 523	75 831	75 330
模糊边界单外显子跳跃	828 (1.28%)	869 (1.29%)	1 499 (1.60%)	1 023 (1.41%)	1 190 (1.57%)	1 009 (1.34%)
模糊边界多外显子跳跃	159 (0.25%)	139 (0.21%)	324 (0.35%)	192 (0.26%)	222 (0.29%)	270 (0.36%)
模糊边界多内含子滞留	152 (0.24%)	152 (0.22%)	602 (0.64%)	171 (0.24%)	368 (0.49%)	278 (0.37%)
模糊边界单内含子滞留	905 (1.40%)	1 070 (1.58%)	3 223 (3.44%)	1 135 (1.57%)	1 913 (2.52%)	1 754 (2.33%)
最后1个外显子可变剪切	20 243 (31.40%)	20 625 (30.53%)	23 159 (24.73%)	22 650 (31.23%)	20 537 (27.08%)	20 713 (27.50%)
第1个外显子可变剪切	23 280 (36.11%)	24 164 (35.77%)	28 739 (30.69%)	26 352 (36.34%)	24 207 (31.92%)	24 532 (32.57%)
单外显子跳跃	7 122 (11.05%)	7 579 (11.22%)	9 576 (10.22%)	7 794 (10.75%)	8 379 (11.05%)	8 074 (10.72%)
多外显子跳跃	1 047 (1.62%)	1 077 (1.59%)	1 392 (1.49%)	1 105 (1.52%)	1 210 (1.60%)	1 098 (1.46%)
多内含子滞留	919 (1.43%)	1 020 (1.51%)	2 731 (2.92%)	970 (1.34%)	1 970 (2.60%)	1 984 (2.63%)
单内含子滞留	5 048 (7.83%)	5 525 (8.18%)	13 257 (14.16%)	5 336 (7.36%)	9 264 (12.22%)	9 295 (12.34%)
可变5'或3'端剪切	3 995 (6.20%)	4 447 (6.58%)	6 927 (7.40%)	4 808 (6.63%)	5 150 (6.79%)	5 073 (6.73%)
模糊边界可变5'或3'端剪切	777 (1.21%)	891 (1.32%)	2 228 (2.38%)	987 (1.36%)	1 421 (1.87%)	1 250 (1.66%)

C_O_1~C_O_3 为囊肿卵巢;E_O_1~E_O_3 为发情卵巢。

2.4 囊肿卵巢和发情卵巢新转录本发掘

为了更全面地认识猪转录组的组成,进一步完善猪基因组注释,将 6 个样本的高通量测序数据与猪已知参考基因组注释信息进行比较,共发掘出 4 559 个新转录本,其中 554 个在 GO 数据库中得到注释,315 个在 KO 数据库中得到注释。新转录本在 2 组中的相对表达量符合 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ (FC 为差异表达倍数),表明存在显著差异。经筛选,共有 53 个新转录本在相对表达量上存在显著差异,其中上调表达的有 18 个,下调表达的有 35 个。

2.5 囊肿卵巢和发情卵巢中差异表达基因的分析

用 $FPKM$ 来衡量基因或转录本的表达水平,结果显示,6 个样品中共有 16 774 个基因得到表达,囊肿组中特有表达的基因有 520 个,其中表达量排名前 5 的分别为 *FAM183A*、*ALS2CR12*、*DYDC2*、*LOC11025995* 和 *TFF3*;发情组特有表达的基因有 346 个,其中表达量排名前 5 的分别为 *LOC110258732*、*LOC110255823*、*KCNJ13*、*IGSF5* 和 *LYPD5*。由图 2 可知,6 个样品中表达基因的 $FPKM$ 绝大多数大于 1,表明有效表达的基因占比较高。

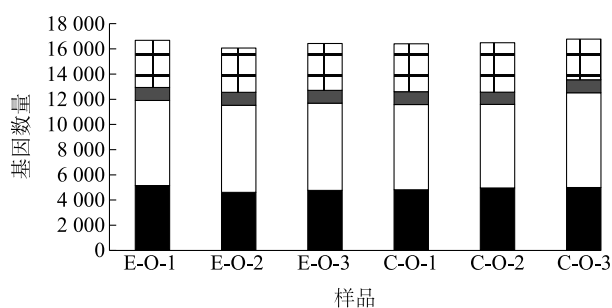


图 2 6 个样品表达基因的 $FPKM$ 分布
 C_O_1~C_O_3 为囊肿卵巢;E_O_1~E_O_3 为发情卵巢。

图 2 6 个样品表达基因的 $FPKM$ 分布

Fig.2 Distribution of $FPKM$ of expression genes in six samples

同一个基因在 2 组中的表达量符合 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FoldChange| \geq 1$,即为差异表达基因,与发情卵巢相比,从囊肿卵巢中共筛选到 335 个差异表达基因,其中上调表达的基因有 121 个,下调表达的基因有 214 个。

对所有差异表达基因进行聚类层次分析。由图 3 可知,发情组的 3 个生物学重复聚在一起,囊肿组的 3 个生物学重复聚在一起,说明同种生理状态卵巢的生物学重复样品间具有较高的相关性;纵向差

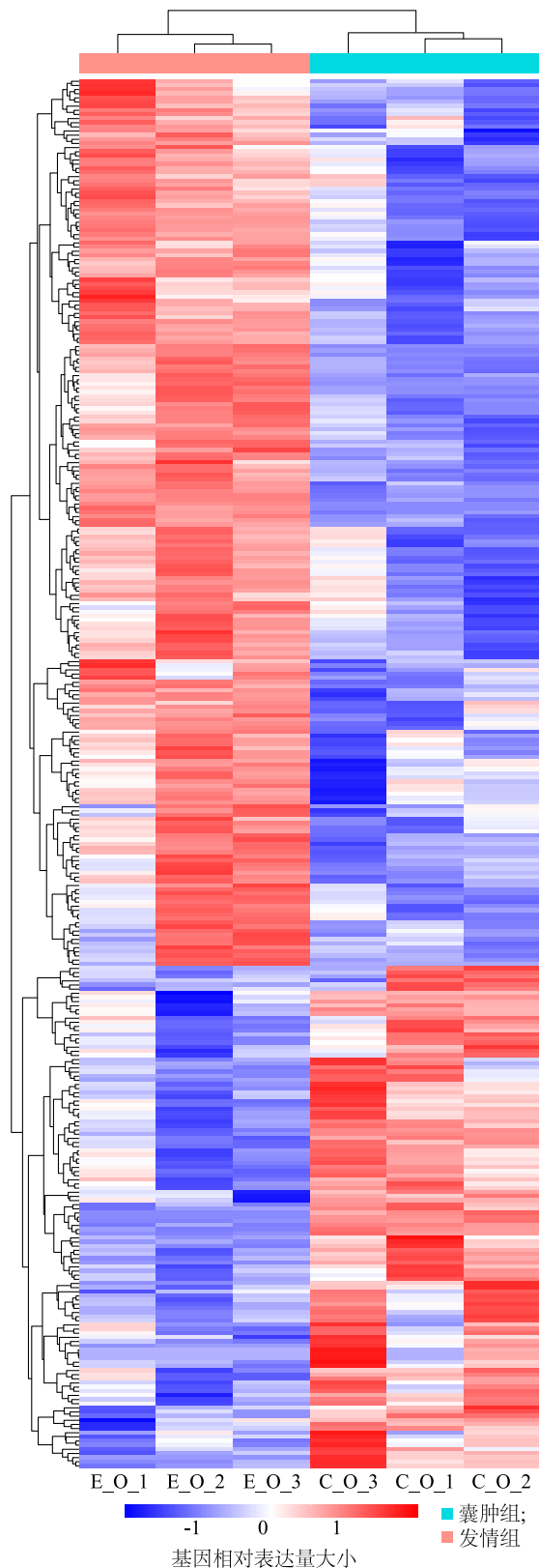
异表达基因分为上调、下调 2 个基因簇,在上调和下调基因簇内都具有较好的相关性。上述结果表明,本研究所用样品的生物学重复性较好,样品分组合理可靠。

2.6 差异表达基因 KEGG 通路的富集分析

通过对差异表达基因进行 KEGG 通路分析可知,差异表达基因被注释到 KEGG Pathway 数据库的 6 个一级分类 (Classification 1),36 个二级分类 (Classification 2) 和 225 个三级分类 (Classification 3) 上。此外,为了深入挖掘差异表达基因的功能,本研究对 225 个三级分类的通路进行分析,发现有 52 个通路显著富集 ($P < 0.05$),18 个通路极显著富集 ($P < 0.01$)。取显著富集排名前 20 的通路进行展示。由图 4 可以看出,差异表达基因富集在流体剪切力和动脉粥样硬化通路 (ssc05418)、胆固醇代谢通路 (ssc04979)、I 型糖尿病通路 (ssc04940)、糖尿病并发症中晚期糖基化终产物及其受体 (AGE-RAGE) 信号通路 (ssc04933)、II 型糖尿病通路 (ssc04930) 等多个与卵巢囊肿发生高度相关的通路上^[16-17]。

2.7 差异表达基因的 GO 功能注释

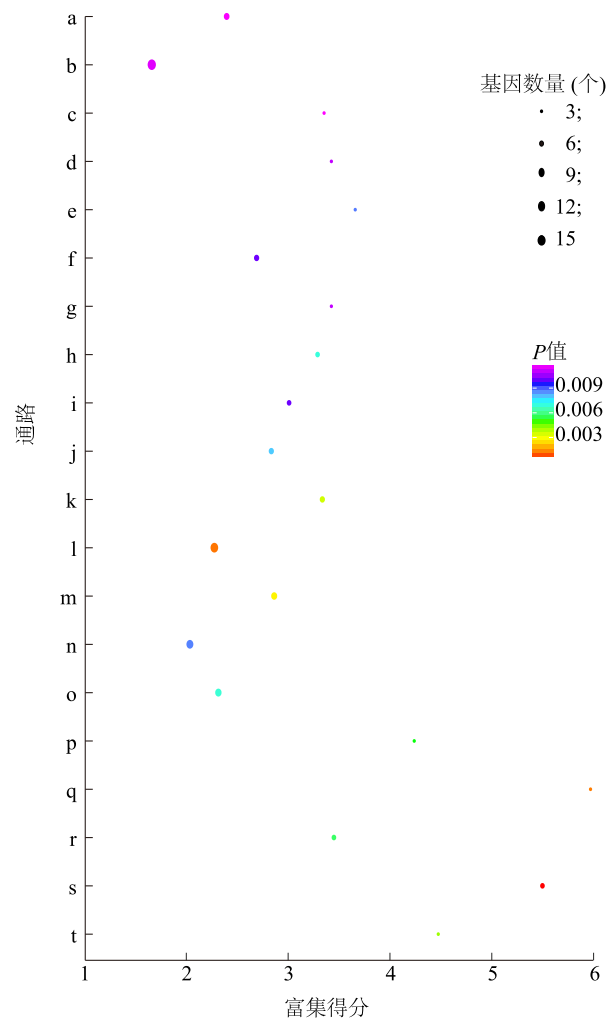
为了进一步分析差异表达基因的功能,对筛选到的 335 个差异表达基因进行 GO 功能注释,发现有 256 个基因能被 GO 数据库注释,注释到的上调表达基因有 90 个,下调表达基因有 166 个。被注释到的差异表达基因分别参与生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC) 及分子功能 (MF) 三大类,分别有 23 个、20 个、21 个功能亚分类 (level2)。为了深入挖掘差异表达基因的功能,本研究分析了差异表达基因在 GO 数据库三级节点 (level 3) 的注释情况,发现 256 个差异表达基因被注释到 1 784 个 GO 三级节点 (level 3) 上,其中极显著差异表达的基因有 795 个 ($P < 0.01$),分别取 BP、CC、MF 分类下富集的显著性排名前 10 的节点进行展示,详见图 5。在 BP 分类中,G 蛋白偶联谷氨酸受体信号通路 (GO:0007216)、对细菌的反应 (GO:0009617)、自噬的正向调控 (GO:0010508) 等与炎症、免疫、癌症等相关^[18-19];在 MF 分类中,肽类激素结合 (GO:0017046)、趋化因子活性 (GO:0008009)、细胞因子受体活性 (GO:0004896)、G 蛋白偶联受体活性 (GO:0004930) 等也与多种疾病的发生、发展相关^[20-22]。



C_O_1~C_O_3 为囊肿卵巢;E_O_1~E_O_3 为发情卵巢。

图3 差异表达基因的聚类热图

Fig.3 Heatmap of differentially expressed genes



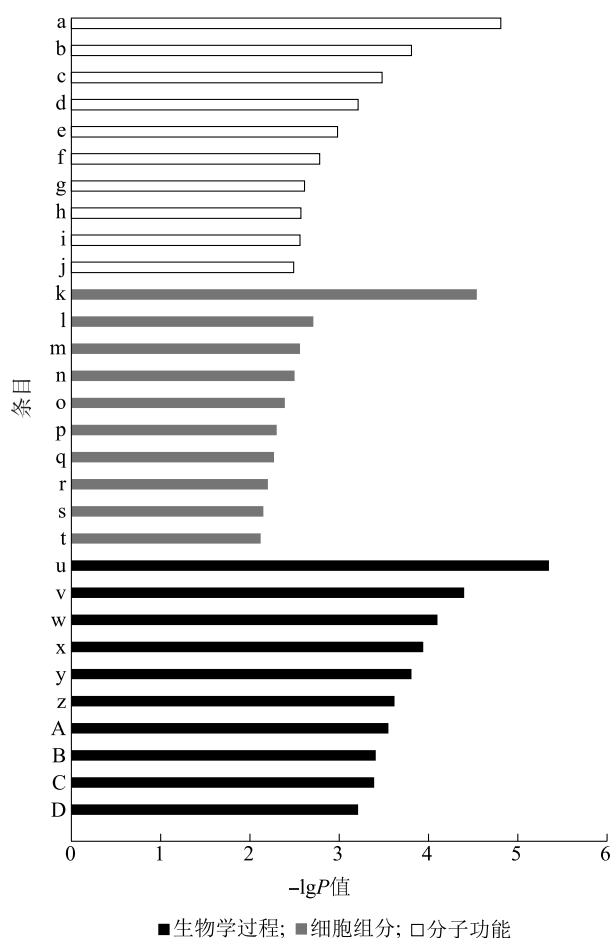
a:流体剪切力和动脉粥样硬化通路(ssc05418);b:癌症通路(ssc05200);c:疟疾通路(ssc05144);d:胆固醇代谢通路(ssc04979);e:I型糖尿病通路(ssc04940);f:糖尿病并发症中晚期糖基化终产物及其受体(AGE-RAGE)信号通路(ssc04933);g:II型糖尿病通路(ssc04930);h:肾素分泌通路(ssc04924);i:脂肪细胞因子信号通路(ssc04920);j:昼夜节律通路(ssc04713);k:补体和凝血级联通路(ssc04610);l:神经活性配体-受体相互作用通路(ssc04080);m:FoxO信号通路(ssc04068);n:细胞因子-细胞因子受体相互作用通路(ssc04060);o:钙信号通路(ssc04020);p:丙酮酸代谢通路(ssc00620);q:糖鞘脂生物合成-乳酸和新乳酸系列通路(ssc00601);r:花生四烯酸代谢通路(ssc00590);s:甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路(ssc00260);t:丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路(ssc00250)。括号内编号代表通路在KEGG数据库中的编号。

图4 差异表达基因 KEGG 分析三级分类前 20 的气泡图

Fig.4 Top 20 pathway bubble chart from KEGG classification three of differentially expressed genes

2.8 差异表达基因的 PPI 网络构建及核心基因的筛选

基于 STRING 数据库建立了差异表达基因之间



a: 转录抑制活性/RNA 聚合酶 II 远端增强子序列特异性结合 (GO:0001206); b: 谷氨酸受体活性 (GO:0008066); c: 半乳糖基转移酶活性 (GO:0008378); d: 肽结合 (GO:0042277); e: 肽类激素结合 (GO:0017046); f: 趋化因子活性 (GO:0008009); g: 细胞因子受体活性 (GO:0004896); h: G 蛋白偶联受体活性 (GO:0004930); i: 启动子特异性染色质结合 (GO:1990841); j: 转移酶活性/转移糖基 (GO:0016757); k: Z 盘 (GO:0030018); l: 细胞外区 (GO:0005576); m: 突触小泡膜 (GO:0030672); n: 蛋白质-DNA 复合物 (GO:0032993); o: 晚期内体 (GO:0005770); p: 质膜外侧 (GO:0009897); q: 突触前膜 (GO:0042734); r: 膜的组成部分 (GO:0016021); s: 质膜的组成部分 (GO:0005887); t: 突触小泡 (GO:0008021); u: 腺苷酸环化酶抑制 G 蛋白偶联谷氨酸受体信号通路 (GO:0007196); v: 淋巴管发育 (GO:0001945); w: 眼睛发育 (GO:0001654); x: G 蛋白偶联谷氨酸受体信号通路 (GO:0007216); y: 血管内皮生长因子受体信号通路 (GO:0048010); z: 自噬的正向调控 (GO:0010508); A: 对细菌的反应 (GO:0009617); B: 细胞增殖 (GO:0008283); C: 神经嵴细胞发育 (GO:0014032); D: 心室心肌组织形态发生 (GO:0055010)。括号内编号代表功能条目在 GO 数据库中的编号。

图 5 差异表达基因 GO 三级节点排名前 10 的注释分类

Fig.5 Top 10 annotation classification chart from GO level three of differentially expressed genes

的 PPI 网络,该网络具有 186 个节点和 227 个边缘。由图 6 可知,差异表达基因之间具有联系,用 CytoHubba 插件从 PPI 网络中筛选到 10 个核心节点基因,这些核心节点基因包括 *CXCL12*、*EGR1*、*MMP15*、*FOS*、*JUN*、*GPT2*、*F3*、*ETV1*、*VCAM1*、*VWF* (图 7)。核心节点基因的表达情况、参与的通路及功能见表 4,可以看出,这 10 个核心节点基因主要存在于癌症通路、细胞凋亡通路、趋化因子活性通路、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路等,在肿瘤发生、PCOS 并发症、卵泡闭锁、卵巢老化等方面发挥作用。

2.9 qRT-PCR 方法验证差异表达基因

共挑选 10 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。图 8 结果表明,10 个基因的表达趋势与测序结果一致,说明测序结果可靠。

3 讨论

卵巢囊肿的病因迄今尚不清楚,目前普遍认为该病是一种复杂的多基因遗传性疾病,因此相关遗传学研究对解析该病的发病机制十分重要。对卵巢囊肿发病机制的研究涉及生殖和代谢的多个方面,如内分泌紊乱、机体慢性炎症、糖脂代谢异常等^[23-24]。

卵巢囊肿与机体的炎症改变密切相关,慢性低度炎症很可能是卵巢囊肿发病的基础^[25]。有研究发现,患 PCOS 的女性机体长期处于慢性炎症状态,在颗粒细胞、卵巢组织、卵泡液、子宫内膜细胞、外周血和脂肪细胞中均发现炎症因子表达量增高或炎症水平升高^[26-27]。本研究发现,差异表达基因富集到多个与机体的炎症改变高度相关的通路中,表明母猪卵巢囊肿病变与自身炎症水平存在紧密联系。趋化因子是一种细胞因子,可以控制细胞的定向迁移,已有研究发现,趋化因子系统在炎症反应、肿瘤的形成和转移、病原体的感染和清除等过程中发挥重要作用^[28-29]。在本研究中,表达量下调的关键基因 *CXCL12* 参与趋化因子活性通路,已有研究发现, *CXCL12* 是一种炎症趋化因子,通过与其受体 *CXCR4* 或 *CXCR7* 相互作用调节白细胞的定向迁移,并且 *CXCL12* 与许多疾病发生、发展相关,如慢性炎症、多囊卵巢综合征、癌症等^[30]。刘月华等^[31]发现,与对照组、空白组相比, *CXCL12*、*IL-8* 在卵巢囊肿大鼠的颗粒细胞、间质细胞、卵泡膜细胞中的表达量均显著降低 ($P < 0.05$),并证实 *CXCL12*、

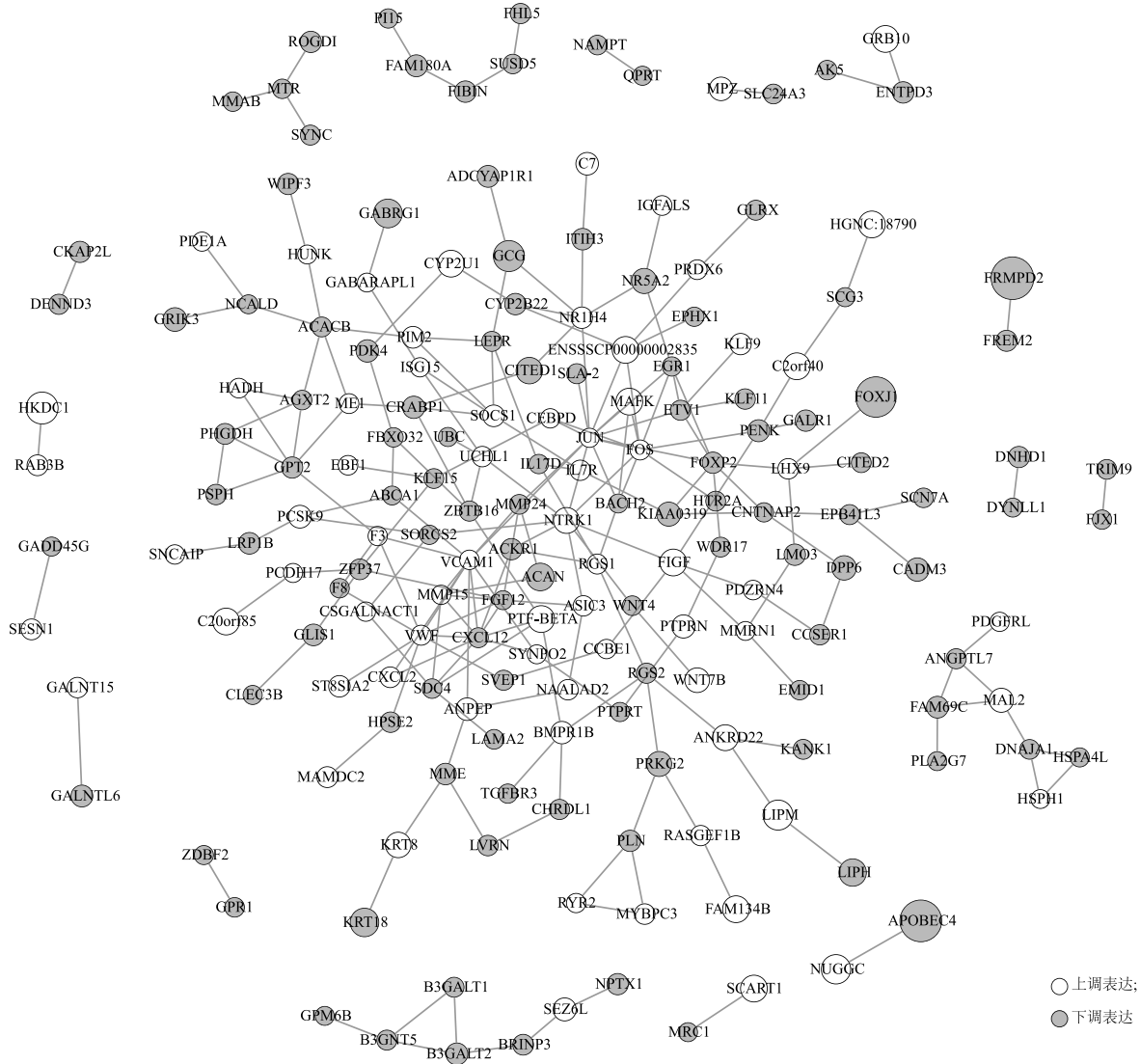


图6 差异表达基因的 PPI 网络

Fig.6 Protein-protein interaction (PPI) network of differentially expressed genes

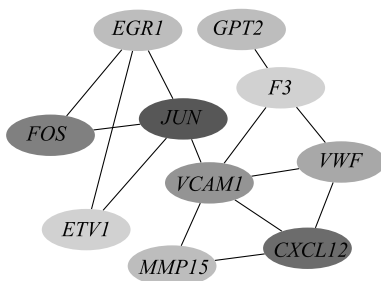


图7 PPI 网络核心节点基因的筛选

Fig.7 Hub genes screening from the PPI network

程。Jin 等^[21]发现,在多囊卵巢综合征大鼠卵巢中, *CXCL12*、*CXCR4*、*CXCR7* 基因的相对表达量均降低,颗粒细胞的凋亡数增加,用人重组 *CXCL12* 处理卵巢颗粒细胞瘤细胞(KGN 细胞),可以用浓度依赖性方式阻止颗粒细胞凋亡。以上结果均说明, *CXCL12* 表达水平降低是卵巢囊肿发生的重要因素。本研究也发现,在初产母猪囊肿卵巢中 *CXCL12* 基因的表达量低于发情卵巢,并且 *CXCL12* 是关键节点基因,推测极有可能由于卵巢中 *CXCL12* 基因表达受损,导致机体发生炎症及颗粒细胞凋亡的可能性增加,进而引起母猪卵巢囊肿的发生,具体机制有待深入研究。

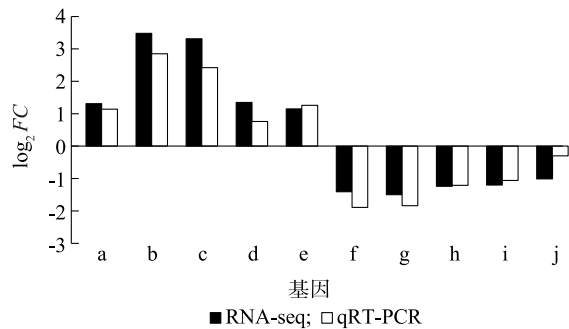
IL-8 参与了多囊卵巢综合征大鼠排卵障碍的发生过

表 4 核心基因参与的通路及功能

Table 4 Pathway and function of key genes

基因	中文名称	$\log_2 FC$	相对表达量变化	通路	疾病/功能
<i>GPT2</i>	谷丙转氨酶 2 基因	1.93	上调	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路	抑制肿瘤细胞增殖,促进凋亡 ^[32]
<i>MMP15</i>	基质金属蛋白酶 15 基因	1.15	上调	甲状旁腺激素合成、分泌和作用通路	癌细胞迁移、侵袭 ^[33-34]
<i>ETV1</i>	ETS 变异体 1 基因	-1.47	下调	癌症中的转录失调通路	肿瘤细胞增殖、分化、迁移 ^[35]
<i>VWF</i>	血管性血友病因子基因	-1.46	下调	PI3K-Akt 信号通路	多囊卵巢综合征妊娠高血压 ^[36]
<i>FOS</i>	原癌基因 <i>FOS</i> 基因	-1.45	下调	癌症通路、细胞凋亡通路	多囊卵巢综合征雄激素分泌 ^[37]
<i>CXCL12</i>	趋化因子 <i>CXCL12</i> 基因	-1.41	下调	癌症通路、趋化因子活性通路	卵巢囊肿、卵巢癌 ^[21,38]
<i>VCAM1</i>	血管细胞黏附蛋白 1 基因	-1.24	下调	NF- κ B 信号通路、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路	黄体发育过程中血管生成 ^[39]
<i>F3</i>	组织因子基因	-1.17	下调	补体和凝血级联通路、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路	启动凝血、调控细胞内信号传导 ^[40]
<i>EGR1</i>	早期生长反应因子基因	-1.13	下调	糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路	卵泡闭锁、卵巢老化 ^[41]
<i>JUN</i>	原癌基因 <i>JUN</i>	-1.12	下调	癌症通路、细胞凋亡通路	肿瘤发生、细胞凋亡 ^[42]

FC: 差异表达倍数。



a: *WNT4*; b: *NR5A2*; c: *WNT7B*; d: *IGFALS*; e: *MMP15*; f: *CXCL12*; g: *VEGFD*; h: *VCAM1*; i: *IRS2*; j: *ABCA1*. FC: 差异表达倍数。

图 8 qRT-PCR 验证差异表达基因的结果

Fig.8 Verification of differentially expressed genes by qRT-PCR

目前的研究结果显示,人类 PCOS 的主要发病机制是由胰岛素抵抗或高胰岛素血症引起的高雄激素血症,其中胰岛素抵抗在 PCOS 的发病机制中起着重要作用^[43]。本研究发现,差异表达基因在 I 型糖尿病通路、II 型糖尿病通路、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路富集,这些通路均与体内胰岛素功能异常相关,因此推测胰岛素功能异常与猪卵巢囊肿之间存在密切联系。更为有趣的是,筛选的 10 个核心基因中有 3 个(*VCAM1*、*F3*、*EGR1*)参与糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路。晚期糖基化终产物(AGE)与晚期糖基化终产物受体(RAGE)结合,激活了 NF- κ B 信号传导途径,刺激产生细胞因子和生长因子,触发细胞内发生氧化应激和炎症,与 PCOS、衰老、糖尿病、女性不孕不育及肿瘤等多种疾病相关^[44]。患有 PCOS 的女性全身处于慢性炎症状态,卵巢中也是如此,表现为血清或卵巢中 AGE

水平的升高及促炎物质 RAGE 在卵巢组织中表达量的增加,AGE、RAGE 在卵巢中累积不仅可诱发炎症,还可导致卵巢类固醇激素合成和卵泡发育异常,说明 AGE-RAGE 信号通路通过炎症、类固醇激素合成和卵泡发育等途径诱发卵巢囊肿的发生^[45-46]。有研究发现,AGE-RAGE 信号通路还可通过诱发形成胰岛素抵抗来促使发生卵巢囊肿,胰岛素糖化使胰岛素的生物活性及其与胰岛受体结合的亲和力下降,但糖化胰岛素可作为配体与 RAGE 结合,进而激活导致发生胰岛素抵抗的氧化应激和促炎途径^[47]。在研究药物治疗 PCOS 的分子机制时发现,糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路是治疗药物关键靶点与 PCOS 疾病靶点共同涉及的关键通路之一^[48-49]。在本研究中,糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路是差异表达基因显著富集的主要通路之一,并且筛选的 10 个核心基因中有 3 个参与了该通路,说明该通路在母猪卵巢囊肿的发病机制中起着至关重要的作用,很有可能是导致母猪卵巢囊肿病变的关键通路,后续研究尤为值得关注。

另外,胆固醇代谢通路也是差异表达基因显著富集的主要通路,该通路与患有卵巢囊肿的人或动物出现的肥胖、脂代谢异常高度相关。在该通路上的差异表达基因 *ABCA1* 作为上游因子调控胆固醇逆向转运的发生,在脂质沉积过程中起到重要作用。Huang 等^[50]研究发现,抑制小鼠体内 *ABCA1* 蛋白的降解可有效促进高密度脂蛋白(HDL)胆固醇的流出和胆固醇的逆向转运,从而减少动脉粥样硬化的形成。Bart 等^[51]研究发现,与野生小鼠相比,*ABCA1* 基因敲除的小鼠不仅在

动脉粥样硬化斑块中有更严重的脂肪蓄积,还存在更多炎症细胞浸润。由此可见,ABCA1 不仅影响机体脂肪代谢,还与机体炎症相关。本研究发现,ABCA1 在猪囊肿卵巢中的相对表达量明显下调,可能由于该基因下调表达,导致卵巢中发生脂肪代谢障碍及炎症,因此该基因与卵巢囊肿病变相关,但是该基因并不属于 10 个核心基因之一,可能是因为脂代谢异常不是母猪卵巢发生囊肿病变的主导因素。

综上所述,与初产母猪发情卵巢相比,初产母猪囊肿卵巢的转录组谱发生了一系列变化,筛选到 335 个差异表达基因,其中上调表达的基因有 121 个,下调表达的基因有 214 个。同时,本研究还发掘出 4 559 个新转录本,其中 53 个存在差异表达,上调表达的转录本有 18 个,下调表达的转录本有 35 个。GO、KEGG 通路分析结果显示,差异表达基因富集到多个与卵巢囊肿发生相关的通路中。用 CytoHubba 插件从差异表达基因的 PPI 网络中筛选到 10 个核心节点基因,这些基因主要存在于癌症通路、细胞凋亡通路、趋化因子活性通路、糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路,在肿瘤发生、PCOS 并发症、卵泡闭锁、卵巢老化等方面发挥作用。通路和核心基因功能分析发现,糖尿病并发症中 AGE-RAGE 信号通路、CXCL12 基因与卵巢囊肿高度相关,机体炎症和胰岛素功能异常可能是导致初产母猪发生卵巢囊肿病变的主要因素。

参考文献:

- [1] 周 豪. 江苏某种猪场母猪繁殖性能及其影响因素的调查与分析[D]. 南京:南京农业大学,2018.
- [2] 赵世刚,陈子江. 重大生殖疾病的分子机制研究[J]. 生命科学,2017,29(1):43-51.
- [3] 王春强,马 巍,李立山. 卵泡囊肿对母猪发情的影响及其治疗[J]. 畜牧与兽医,2013,45(5):81-83.
- [4] 刘广振,严树芬,邓本华,等. 猪卵巢囊肿的发生与防治[J]. 中国猪业,2008(1):36-37.
- [5] KAHSAR-MILLER M D, NIXON C, BOOTS L R, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS[J]. Fertility and Sterility, 2001, 75(1):53-58.
- [6] PANGHIYANGANI R, SOEHARSO P, ANDRIJONO A, et al. CYP19A1 gene expression in patients with polycystic ovarian syndrome[J]. Journal of Human Reproductive Sciences, 2020, 13(2):100-103.
- [7] DAKSHINAMOORTHY J, JAIN P R, RAMAMOORTHY T, et al. Association of GWAS identified INSR variants (rs2059807 & rs1799817) with polycystic ovarian syndrome in Indian women[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 144:663-670.
- [8] LI W H, SUN L N, CHEN S X, et al. Association of inhibin- α gene polymorphisms with follicular cysts in large white sows[J]. Theriogenology, 2015, 86(6):839-845.
- [9] WANG H T, CHEN L, JIANG Y W, et al. Association of gene polymorphisms of estrogen receptor, follicle-stimulating hormone β and leptin with follicular cyst in large white sows[J]. Theriogenology, 2017, 103:143-148.
- [10] WANG F G, CHEN L, CHEN S X, et al. Association of RBP-4 gene polymorphisms with follicular cysts in large white sows[J]. Reprod Domest Anim, 2019, 54(7):972-978.
- [11] 李兴艳,鲁 晴,陈林兴. 多囊卵巢综合征研究进展[J]. 实用中医杂志,2015,31(3):255-267.
- [12] 任巧玲,张家庆,陆东锋,等. 乏情和发情初产母猪下丘脑-垂体-卵巢轴中 lincRNAs 表达谱比较分析[J]. 遗传,2020,42(4):388-402.
- [13] 任巧玲,张家庆,郭红霞,等. 发情和乏情初产母猪下丘脑-垂体-卵巢轴差异表达基因筛选及分析[J]. 中国畜牧兽医,2021,48(8):2864-2877.
- [14] 谢光杰,王 永,许 晴,等. 简州大耳羊肌肉脂肪细胞脂分化差异表达基因的筛选与鉴定[J]. 畜牧兽医学报,2020,51(7):1525-1536.
- [15] 刘 远,李文杨,吴贤锋,等. 福清山羊与努比亚黑山羊背最长肌比较转录组分析[J]. 中国农业科学,2019,52(14):2525-2537.
- [16] PRASANNA D, SARITHA D G, SHOBHA D G. Study of prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes mellitus in PCOS women (15 to 25)[J]. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, 2017, 16(6):26-42.
- [17] CHANTRAPANICHKUL P, INDHAVIVADHANA S, WONGWANANURUK T, et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus compared between lean and overweight/obese patients with polycystic ovarian syndrome: a 5-year follow-up study[J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2020, 301(1):809-816.
- [18] ZHANG J Q, HOEDT E C, LIU Q, et al. Elucidation of proteus mirabilis as a key bacterium in crohn's disease inflammation[J]. Gastroenterology, 2021, 160(1):317-330.
- [19] DUAN Y L, TIAN X Q, LIU Q, et al. Role of autophagy on cancer immune escape[J]. Cell Communication and Signaling, 2021, 19(1):91.
- [20] BERGAMASCHI C, PANDIT H, NAGY B A, et al. Heterodimeric IL-15 delays tumor growth and promotes intratumoral CTL and dendritic cell accumulation by a cytokine network involving CXCL1, IFN- γ , CXCL9 and CXCL10[J]. Journal for Immuno Therapy of Cancer, 2020, 8(1):e000599.
- [21] JIN L, REN L, LU J, et al. CXCL12 and its receptors regulate granulosa cell apoptosis in PCOS rats and human KGN tumor cells[J]. Reproduction, 2021, 161(2):145-157.
- [22] ALTHUMAIRY D, ZHANG X P, BAEZ N, et al. Glycoprotein G-protein coupled receptors in disease: luteinizing hormone receptors

- and follicle stimulation hormone receptors[J]. *Diseases*, 2020, 8(3):8030035.
- [23] AJMAL N, KHAN S Z, SHAIKH R. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and genetic predisposition: a review article[J]. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology*; X, 2019, 3:100060.
- [24] ZHAO H, LYU Y, LI L, et al. Genetic studies on polycystic ovary syndrome[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016, 37: 56-65.
- [25] ESCOBAR-MORREALE H F, LUQUE-RAMÍREZ M, GONZALEZ F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis[J]. *Fertility & Sterility*, 2011, 95(3):1048-1058.
- [26] 刘心兰,周承亮,杨倩,等. 炎症因子在多囊卵巢综合征中作用的研究进展[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(3):328-332.
- [27] HE S Q, MAO X D, LEI H F, et al. Peripheral blood inflammatory-immune cells as a predictor of infertility in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Journal of Inflammation Research*, 2020, 13:441-450.
- [28] 李帅全. CCR7在成人急性白血病中的表达及临床意义[D]. 郑州:郑州大学,2016.
- [29] DEMIR S, GULER A, ALARSLAN P, et al. Fractalkine: an inflammatory chemokine elevated in subjects with polycystic ovary syndrome[J]. *Endocrine*, 2019, 65(1):175-183.
- [30] BRITTON C, POZNANSKY M C, REEVES S P. Polyfunctionality of the CXCR4/CXCL12 axis in health and disease: implications for therapeutic interventions in cancer and immune-mediated diseases[J]. *The FASEB Journal*, 2021, 35(4):e21260.
- [31] 刘月华,张展,贾莉婷,等. IL-8和CXCL12在来曲唑诱导的PCOS大鼠卵巢中的表达及意义[J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(11):1547-1550.
- [32] 向昕蓉,李清,余艳,等. 谷丙转氨酶GPT2对急性髓系白血病细胞HL60生长特性的影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 2021, 29(2):408-415.
- [33] WU M H, WU P R, HSIEH Y H, et al. Silencing PROK2 inhibits invasion of human cervical cancer cells by targeting MMP15 expression[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):6391.
- [34] ZHANG S, WU H T, WANG F, et al. The oncoprotein HBXIP facilitates metastasis of hepatocellular carcinoma cells by activation of MMP15 expression[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:4529-4540.
- [35] HEEG S, DAS K K, REICHERT M, et al. ETS-transcription factor ETV1 regulates stromal expansion and metastasis in pancreatic cancer[J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(3):540-553.
- [36] 李欠娇,郭金强. 多囊卵巢综合征患者血管内皮功能变化与妊娠高血压的相关性研究[J]. *临床医学*, 2016, 36(11):111-113.
- [37] 桑敏,李晶,张跃辉,等. c-fos和CYP17对多囊卵巢综合征(PCOS)患者颗粒细胞雄激素分泌过多的影响及机制[J]. *科技导报*, 2015, 33(22):89-92.
- [38] 张馨怡. CXCL12在多囊卵巢综合征卵泡液及卵巢颗粒细胞中的表达与调控研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2020.
- [39] LI H, CHANG H M, LIN Y M, et al. TGF- β 1 inhibits microvascular-like formation by decreasing VCAM1 and ICAM1 via the up-regulation of SNAIL in human granulosa cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2021, 535:111395.
- [40] RYAN T A J, PRESTON R J S, LUKE A J. Immunothrombosis and the molecular control of tissue factor by pyroptosis: prospects for new anticoagulants[J]. *Biochemical Journal*, 2022, 479(6):731-750.
- [41] 袁素珍. EGR1调控的颗粒细胞凋亡在卵巢衰老中的作用及其机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2017.
- [42] XIE X, KAOUD T S, EDUPUGANTI R, et al. c-Jun N-terminal kinase promotes stem cell phenotype in triple-negative breast cancer through upregulation of Notch1 via activation of c-Jun[J]. *Oncogene*, 2017, 36(18):2599-2608.
- [43] BANNIGIDA D M, SHIVANANDA B, VIJAYARAGHAVAN R, et al. Insulin resistance and oxidative marker in women with PCOS[J]. *Archives of Physiology & Biochemistry*, 2020, 126(1/2/3/4/5):183-186.
- [44] PERRONE A, GIOVINO A, BENNY J, et al. Advanced glycation and products (AGEs): biochemistry, signaling, analytical methods and epigenetic effects[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(3):1-18.
- [45] ERTYNSKA-MARCZEWSKA M, DIAMANTI-KANDARAKIS E, ZHANG J, et al. Advanced glycation end products: a link between metabolic and endothelial dysfunction in polycystic ovary syndrome? [J]. *Metabolism*, 2015, 64(11):1564-1573.
- [46] GARG D, MERHI Z. Relationship between advanced glycation end products and steroidogenesis in PCOS[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2016, 14(1):71.
- [47] WALKE P B, BANSODE S B, MORE N P, et al. Molecular investigation of glycated insulin-induced insulin resistance via insulin signaling and AGE-RAEG axis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(2):166029.
- [48] 肖卫琼,袁仁智,康开彪. 半夏-苍术-香附组药干预痰湿型多囊卵巢综合征的生物机制[J]. *中医药导报*, 2020, 26(13):144-150.
- [49] 龙泳伶,杨芳,张瑶,等. 加减苍附导痰汤治疗多囊卵巢综合征的网络药理学机制[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(7):1432-1439.
- [50] HUANG L Z, FAN B Y, MA A, et al. Inhibition of ABCA1 protein degradation promotes HDL cholesterol efflux capacity and RCT and reduces atherosclerosis in mice[J]. *Journal of Lipid Research*, 2015, 56(5):986-997.
- [51] BART L, YING Z, FOKS A C, et al. Leukocyte ABCA1 remains atheroprotective in splenectomized LDL receptor knockout mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e48080.

(责任编辑:徐艳)