

朱淑斌, 徐 盼, 周春宝, 等. 基于 RNA-Seq 技术筛选姜曲海猪子宫和卵巢发育相关基因[J]. 江苏农业学报, 2024, 40( 1 ): 130-140.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.01.014

# 基于 RNA-Seq 技术筛选姜曲海猪子宫和卵巢发育相关基因

朱淑斌<sup>1</sup>, 徐 盼<sup>1</sup>, 周春宝<sup>1</sup>, 许琴瑟<sup>2</sup>, 吴嘉韵<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏 泰州 225300; 2. 姜曲海猪保种场, 江苏 泰州 225300)

**摘要:** 母猪的子宫和卵巢组织发育情况直接影响母猪的繁殖性能, 进而对养猪业的经济效益造成重大影响。为探究姜曲海猪子宫和卵巢发育的分子机理, 本研究选取 1 月龄和 8 月龄姜曲海猪各 3 头, 利用转录组测序技术 (RNA-Seq) 对子宫和卵巢组织进行测序, 通过生物信息学手段筛选差异表达基因并进行基因本体 (Gene ontology, GO) 和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 再与猪数量性状基因座 (Quantitative trait locus, QTL) 数据库比对后鉴定出重要的候选基因。结果显示, 1 月龄和 8 月龄姜曲海猪子宫组织中有 1 688 个差异表达基因, 表达上调和下调的基因各 844 个; 卵巢组织中存在 3 833 个差异表达基因, 其中 2 831 个表达上调, 1 002 个表达下调。富集分析结果显示这些差异表达基因主要显著富集于动物器官发育、组织发育和细胞分化等生物学过程。本研究在子宫和卵巢组织中分别筛选出 11 个和 31 个与发育性状有关的候选基因, 其中共有的候选基因有 6 个, 分别为 *LHFPL1*、*MTUS2*、*LIF*、*RBP4*、*EPHB2* 和 *TESC*。本研究结果为姜曲海猪子宫和卵巢发育分子层面的研究提供了参考, 也为今后姜曲海猪繁殖性状的分子改良提供了新的研究方向。

**关键词:** 姜曲海猪; 子宫; 卵巢; 转录组测序

**中图分类号:** S858.28 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)01-0130-11

## Screening of functional genes associated with uterus and ovary development in Jiangquhai pig based on RNA-Seq technology

ZHU Shu-bin<sup>1</sup>, XU Pan<sup>1</sup>, ZHOU Chun-bao<sup>1</sup>, XU Qin-se<sup>2</sup>, WU Jia-yun<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. Jiangquhai Pig Breed Conservation Farm, Taizhou 225300, China)

**Abstract:** The development of uterus and ovary tissues can directly affect the reproductive performance in sows, which in turn has a significant impact on the economic efficiency of the pig breeding industry. To investigate the molecular mechanism of uterus and ovary development in Jiangquhai pigs, we selected three 1-month-old and three 8-month-old pigs for RNA-seq analysis of the uterus and ovary tissues. We performed statistical screening and enrichment analysis using Gene

Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) to identify differentially expressed genes. Furthermore, we compared these genes with the pig quantitative trait locus (QTL) database to identify potential candidate genes. Our results showed that there were 1 688 differentially expressed genes between the uterine tissue of 1-month-old and 8-month-old Jiangquhai pigs, with 844 genes up-regulated and 844 genes down-regulated. There were 3 833 differentially expressed genes in ovarian tissue, of which 2 831 genes were up-regulated and

收稿日期: 2023-01-09

**基金项目:** 江苏农牧科技职业学院横向项目 (2020321201000092); 江苏农牧科技职业学院科技服务项目 (NSF2022TF02); 江苏农牧科技职业学院科技支撑项目 (NSF2021TC04); 江苏省高等学校基础科学 (自然科学) 研究面上项目 (23KJB230004); 江苏农牧科技职业学院校级科研项目 (NSF2023CB01)

**作者简介:** 朱淑斌 (1977-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 博士, 教授, 主要从事地方猪遗传资源保护与利用研究。 (E-mail) zhushubin2003@163.com

1 002 were down-regulated. These differentially expressed genes were significantly enriched in processes such as animal organ development, tissue development, and cell differentiation. In this study, 11 candidate genes associated with developmental traits were identified in the uterine tissue, and 31 candidate genes were identified in the ovarian tissue. Among these, six candidate genes were found to be overlapping in both tissues, namely *LHFPL1*, *MTUS2*, *LIF*, *RBP4*, *EPHB2*, and *TESC*. In conclusion, the results provide a theoretical basis for studying the molecular aspects of uterus and ovary development in Jiangquhai pigs. Additionally, it offers a new research direction for enhancing the reproductive traits of Jiangquhai pigs through molecular improvement.

**Key words:** Jiangquhai pig; uterus; ovary; RNA-Seq

母猪高产和健康的保持一直是养猪业面临的最大挑战之一。母猪繁殖障碍主要表现为不发情或发情异常、不孕或受孕率低、早产、流产以及产胎率低等临床症状。产仔数、产活仔数和窝质量是评估母猪繁殖性能的重要指标,母猪的繁殖能力低会直接影响生猪生产效益<sup>[1-2]</sup>。母猪的繁殖器官结构复杂,任何一个组成部分出现异常都会导致繁殖障碍,其中子宫和卵巢的发育情况备受重视,它们在母猪繁殖过程中具有重要的作用<sup>[3-4]</sup>。因此,围绕母猪子宫和卵巢发育过程中的转录变化进行深入研究,挖掘影响母猪生殖器官发育的重要功能基因,可以进一步通过分子选育对功能基因进行筛选和鉴定,有望减少母猪繁殖障碍现象的发生,进而提高母猪的繁殖性能。

RNA-Seq 是目前分子生物学研究领域使用最为广泛的组学技术之一,具有通量高、效率高和成本低的优点。RNA-Seq 可以全面提供样本基因转录本的表达信息,让研究者快速了解样本转录差异的整体规律。近十年来, RNA-Seq 技术的快速发展,使其在畜牧研究中得到广泛应用。段修军等<sup>[5]</sup>通过对黑羽番鸭胸肌、腿肌中挥发性风味物质进行测定,并利用 RNA-Seq 技术筛选得到可能通过形成肌肉挥发性风味物质进而影响肌肉风味的候选基因。安清明等<sup>[6]</sup>利用 RNA-Seq 技术筛选贵州白山羊肌肉生长发育的候选基因。苏比奴尔·艾力等<sup>[7]</sup>基于 RNA-Seq 技术对塔里木马鹿毛色相关基因进行筛选及分析,筛得 7 个候选基因可能在塔里木马鹿毛色形成过程中发挥重要作用。梁鹏等<sup>[8]</sup>利用 RNA-Seq 技术分析滩羊、杜泊羊和小尾寒羊肉品质变化和肌肉内基因的表达情况,挖掘它们肉质性状差异的相关调控基因,为其他绵羊品种选育与改良提供理论依据。此外,在猪养殖中,目前也有许多研究人员应用 RNA-Seq 技术挖掘猪种优良性状的功能基因,相关研究结果对增加猪产肉量、增强猪抗病力和提高猪

群繁殖力具有重要的参考价值<sup>[9]</sup>。Fraser 等<sup>[10]</sup>利用 RNA-Seq 技术比较不同冷冻公猪精子的转录谱,为进一步阐明精子与其低温存活相关基因的研究提供了基础,鉴定到的关键候选基因具有作为预测猪精液冷冻性标记的潜力。徐盼等<sup>[11]</sup>基于 RNA-Seq 技术鉴定 90 日龄与 180 日龄苏姜猪背最长肌之间以及 180 日龄苏姜猪背最长肌与腿肌之间的差异表达基因,为后续苏姜猪肌肉生长发育的分子改良提供了一定的研究基础。

姜曲海猪的主要产区位于泰州市姜堰区、南通市曲塘镇、南通市海安市一带,此类猪种全身被毛黑色,其中有部分猪在鼻吻处偶有白斑,外号“花鼻子”,其具有早熟易肥、繁殖性能强的优势<sup>[12-13]</sup>。母猪 1 月龄生殖系统发育还未完全,未达到性成熟,8 月龄姜曲海母猪已达到性成熟,具备完整的繁育能力。因此,本研究拟利用 RNA-Seq 技术对 1 月龄和 8 月龄的姜曲海猪子宫和卵巢组织进行研究,筛选和分析差异表达基因,挖掘发育性状相关的有效基因,以期研究姜曲海猪繁育的分子机理水平提供基础数据和理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

本次试验动物材料来源于江苏姜曲海猪猪种有限公司。随机选取 6 头同窝体质量相近[体质量( $6.87 \pm 0.21$ ) kg]的健康姜曲海母猪进行标准化饲养,在 1 月龄和 8 月龄时期各屠宰 3 头,于屠宰后 30 min 内采集子宫(子宫角部位)和卵巢组织样品置于冻存管,分别命名为:1 月龄-子宫-编号(1M-ute-1、1M-ute-2、1M-ute-3)、8 月龄-子宫-编号(8M-ute-1、8M-ute-2、8M-ute-3)、1 月龄-卵巢-编号(1M-ova-1、1M-ova-2、1M-ova-3)、8 月龄-卵巢-编号(8M-ova-1、8M-ova-2、8M-ova-3),放入液氮罐带回实验室,再转移到 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱内长期保存,用于总 RNA 的提取。

## 1.2 主要仪器及试剂

TRIzol(货号:15596018)、Oligo 磁珠(货号:B-3002)购自广东润科生物工程股份有限公司;琼脂糖(货号:C042)购自上海如吉生物科技有限公司;反转录试剂盒(货号:B300537)、实时荧光定量 PCR 试剂盒(货号:B639271)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;分光光度计(型号:K5500)购自北京凯奥科技发展有限公司;细胞分析仪(型号:2100Bio-analyzer)购自 Agilent 公司;定量 PCR 仪(型号:CG-02)购自 HealForce 公司;测序仪(型号:HiSeq™2500)购自 Illumina 公司。

## 1.3 RNA 提取及转录组测序

利用 TRIzol 法提取各子宫和卵巢组织样本的总 RNA。总 RNA 质量经检测后分离纯化 mRNA,合成 cDNA 并加测序接头后回收目的片段,进行 PCR 扩增。构建好的文库利用 PE150 测序策略进行测序,以此得到原始数据 raw read<sup>[7]</sup>。

## 1.4 RNA-Seq 数据处理及分析

通过软件 FastQC(v0.11.2)对测序的原始数据进行质量评估,通过软件 Trimmomatic(v0.36)进行质量剪切,去掉测序接头及低质量序列后,得到相对准确的高质量的有效数据(clean read)。利用 Hi-SAT2(v2.1.0)软件将样本有效数据与猪的参考基因组[Scrofa10.2(fp://ftp.ensembl.org/pub/release/87/fasta/sus\_scrofa/dna/)]进行比对,统计 Mapping 信息。将唯一比对到基因组的基因用于差异基因表达分析,使用每千个碱基转录每百万映射读取的碎片(TPM)法对每个样本中基因的表达量进行标准化。以 $|\log_2 \text{FoldChange}| > 2$ (FoldChange 表示表达量差异倍数)和 $P < 0.05$ 为标准,统计筛选差异表达基因。使用 DESeq2(v1.26.0)软件进行基因差异表达分析。利用 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析将差异表达基因注释到相应的 GO 和 KEGG 信号通路上,进一步将差异表达基因与猪 QTL 数据库进行比对,以鉴定姜曲海猪子宫和卵巢组织中与发育性状有关的候选基因。

## 1.5 qRT-PCR 检测

随机挑选 RNA-Seq 筛选的 10 个差异表达基因,使用实时荧光定量 PCR 试剂盒进行实时荧光定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测。20.0  $\mu\text{l}$  qRT-PCR 反应体系为:10.0  $\mu\text{l}$  实时荧光定量试剂盒预混液,0.4  $\mu\text{l}$  上游引物(10

$\mu\text{mol/L}$ ),0.4  $\mu\text{l}$  下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ),2.0  $\mu\text{l}$  cDNA,7.2  $\mu\text{l}$  双蒸水(RNase free ddH<sub>2</sub>O)。扩增程序为:95  $^{\circ}\text{C}$  3 min;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,45 个循环。利用 Primer 6.0 软件,跨外显子设计所筛选基因的 qRT-PCR 引物,以 GAPDH 基因作为内参基因。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物详细信息见表 1。每组 qRT-PCR 检测 3 个重复,利用 SPSS 20.0 软件进行  $t$  检验<sup>[14]</sup>,本研究对 qRT-PCR 和 RNA-esq 结果进行了 Pearson 相关性分析。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Primer information for qRT-PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
<i>EGR1</i>	F:ACGCAAGAGGCATACCAAGA R:AGGGGATGGGTAGGTCGAG	223
<i>ACKR3</i>	F:AAGACCACGGGCTACGACA R:TGCTGCCGAAGAGGTTGAT	178
<i>DUSP1</i>	F:AACCACAAGGCGGACATCA R:TGCTCCTCTCTGCTTCACA	199
<i>CCN2</i>	F:TCTCCAAGCCCGTCAAGTT R:TGTAATGGCAGGCACAAGTCT	198
<i>SAT1</i>	F:TGCCCAAGGAGCATCTAACT R:AAGCCTCTATAATCACTCATCAGC	133
<i>ASPN</i>	F:AAGAAGTTGCGAAGGCTTTATC R:ATGCCCTGGTTCAATCC	202
<i>ADGRA2</i>	F:CAGTTACCTGGCAACGACA R:CACCACGATCTCCACCTTCTT	226
<i>CCDC3</i>	F:CCATCTTTCCAGACACCCAA R:CTTCTTGATCTCCAGTCACT	117
<i>SFRP2</i>	F:CATCCTGGAGACCAAGAGCA R:GGCGCGTTGATATCGTTC	132
<i>BGN</i>	F:AGAACAGCGGCTTTGAACCT R:CCAGATGGAGTTGCTTCAGAGT	122
<i>GAPDH</i>	F:CCTGGAGAAACCTGCAAAATA R:AACCTGGTCTCAGTGTAGCC	100

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA-Seq 数据质控分析

通过对 RNA-Seq 测序数据进行质控分析发现,姜曲海猪的子宫和卵巢组织样本平均 read 数如表 2 所示,clean read 的数量和比对结果符合要求。同时,子宫和卵巢的 3D 主成分分析(PCA)结果、基因表达量密度以及组间的相关性分析结果表明,组间样本差异较小(图 1A~图 1C)。上述结果均表明测序质量较高,为下一步数据分析的可靠性奠定了基

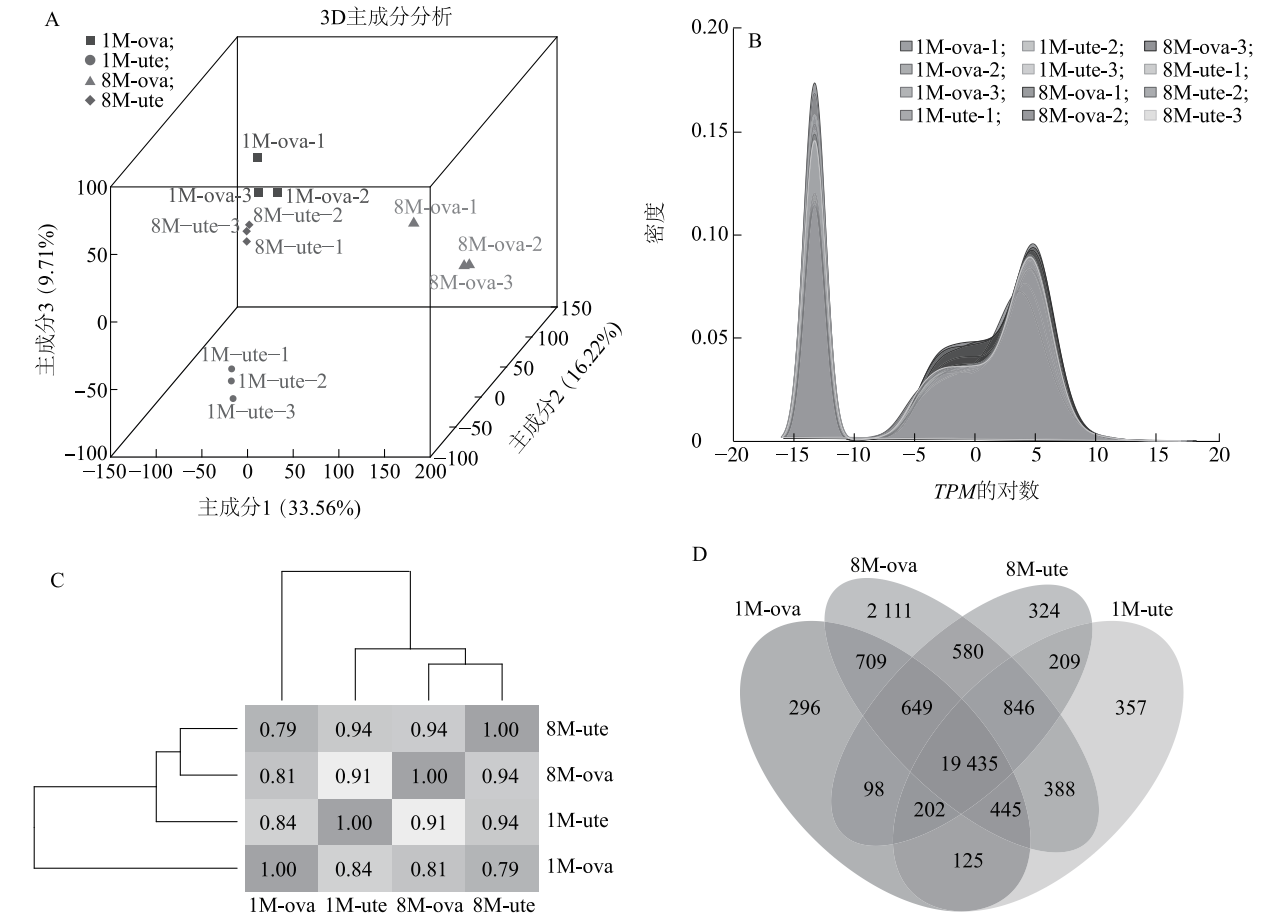
基础。此外,由图 1D 可知,1 月龄和 8 月龄的子宫和卵巢组织样本共有的基因表达数为 19 435 个,后续生物信息学分析将基于该共有表达基因开展。

表 2 子宫和卵巢组织样本比对到参考基因组结果

Table 2 The result of uterine and ovarian tissue samples after mapping to the reference genome

读段类型	组别名称											
	1M-ute-1	1M-ute-2	1M-ute-3	8M-ute-1	8M-ute-2	8M-ute-3	1M-ova-1	1M-ova-2	1M-ova-3	8M-ova-1	8M-ova-2	8M-ova-3
总读段数( $\times 10^6$ , 1 bp)	45.59	42.49	41.21	50.09	43.97	54.44	53.72	44.68	54.38	39.17	49.09	49.32
比对到基因组的总读段( $\times 10^6$ , 1 bp)	42.83	40.03	38.65	46.98	41.30	51.86	50.62	42.10	51.44	36.70	45.94	46.15
比对到基因组多个位置的总读段( $\times 10^6$ , 1 bp)	0.84	0.84	0.82	0.89	0.81	1.03	1.27	0.82	1.22	0.68	0.89	0.87
比对到基因组唯一位置的总读段( $\times 10^6$ , 1 bp)	41.99	39.18	37.83	46.09	40.49	50.82	49.35	41.29	50.22	36.02	45.05	45.28

1M-ute-1、1M-ute-2、1M-ute-3 分别表示 1 月龄子宫组织样本的 3 组重复;8M-ute-1、8M-ute-2、8M-ute-3 分别表示 8 月龄子宫组织样本的 3 组重复;1M-ova-1、1M-ova-2、1M-ova-3 分别表示 1 月龄卵巢组织样本的 3 组重复;8M-ova-1、8M-ova-2、8M-ova-3 分别表示 8 月龄卵巢组织样本的 3 组重复。



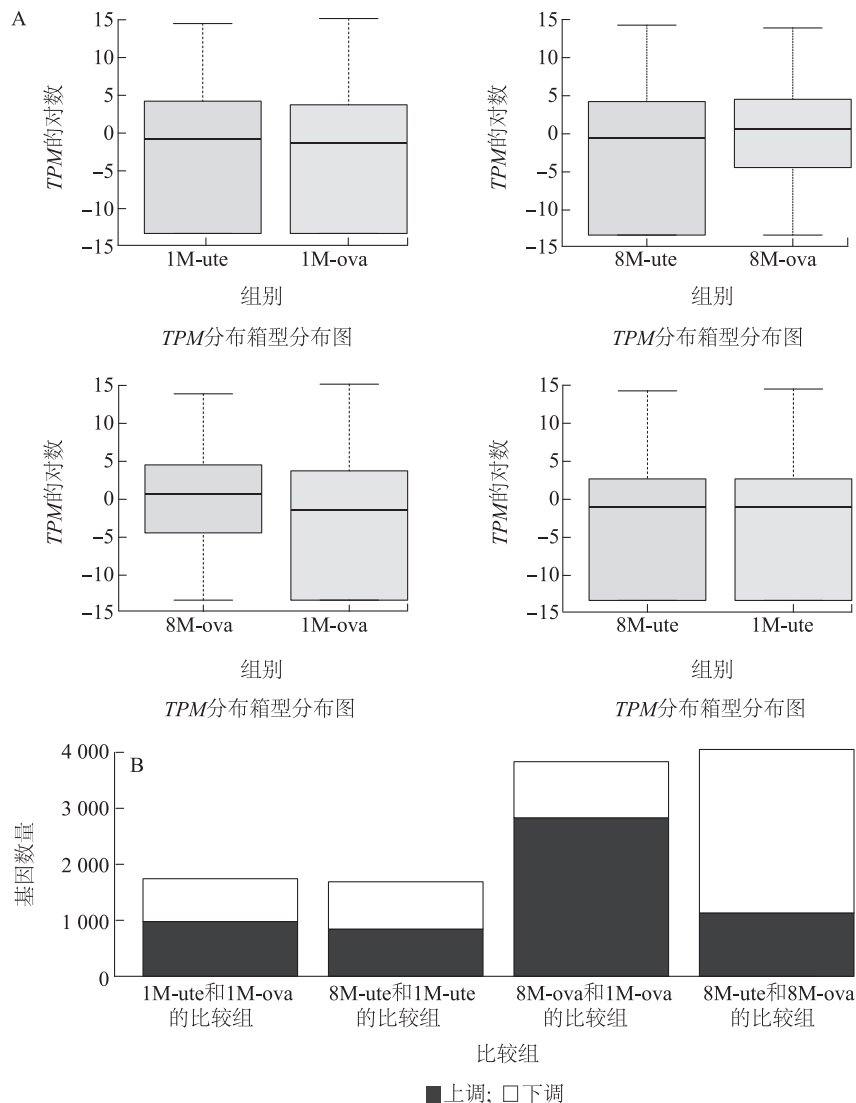
A: 子宫和卵巢的 3D 主成分分析 (PCA) 结果; B: 基因表达量密度曲线图, *TPM*: 每千个碱基转录每百万映射读取的碎片; C: 组间的相关性分析, 数值表示组间相关性; D: 组间共表达基因韦恩图。重叠区数字代表不同组共有的基因表达数, 非重叠区数字代表特异的基因表达数。1M-ute-1、1M-ute-2、1M-ute-3、8M-ute-1、8M-ute-2、8M-ute-3、1M-ova-1、1M-ova-2、1M-ova-3、8M-ova-1、8M-ova-2、8M-ova-3 见表 2 注。

图 1 转录组测序质控结果  
Fig.1 Transcriptome sequencing quality control results

## 2.2 不同分组基因分布及差异表达基因鉴定

本研究设置阈值为  $|\log_2 \text{FoldChange}| > 2$ 、 $P < 0.05$  的标准来筛选差异表达基因。结果(图 2A)显示,1 月龄姜曲海猪子宫和卵巢组织的基因表达水平相近;8 月龄姜曲海猪子宫组织的基因表达水平低于卵巢组织;姜曲海猪子宫和卵巢组织的基因表达水平都表现为 8 月龄组高于 1 月龄组。图 2B 显示,1 月龄和 8 月龄姜曲海猪卵巢组织上调差异表达基因个数明显多于下调差异表达基因个数。由图 3 可知,1 月龄和 8 月龄姜曲海猪子宫组织中有

1 688 个差异表达基因,其中表达上调的基因有 844 个,表达下调的基因有 844 个(图 3A);1 月龄和 8 月龄姜曲海猪卵巢组织中存在 3 833 个差异表达基因,有 2 831 个表达基因上调,1 002 个表达基因下调(图 3B)。此外,1 月龄姜曲海猪子宫和卵巢组织中的差异表达基因有 978 个基因表达上调,765 个基因表达下调(图 3C);8 月龄姜曲海猪子宫和卵巢组织中的差异表达基因有 1 132 个基因表达上调,2 919 个基因表达下调(图 3D)。

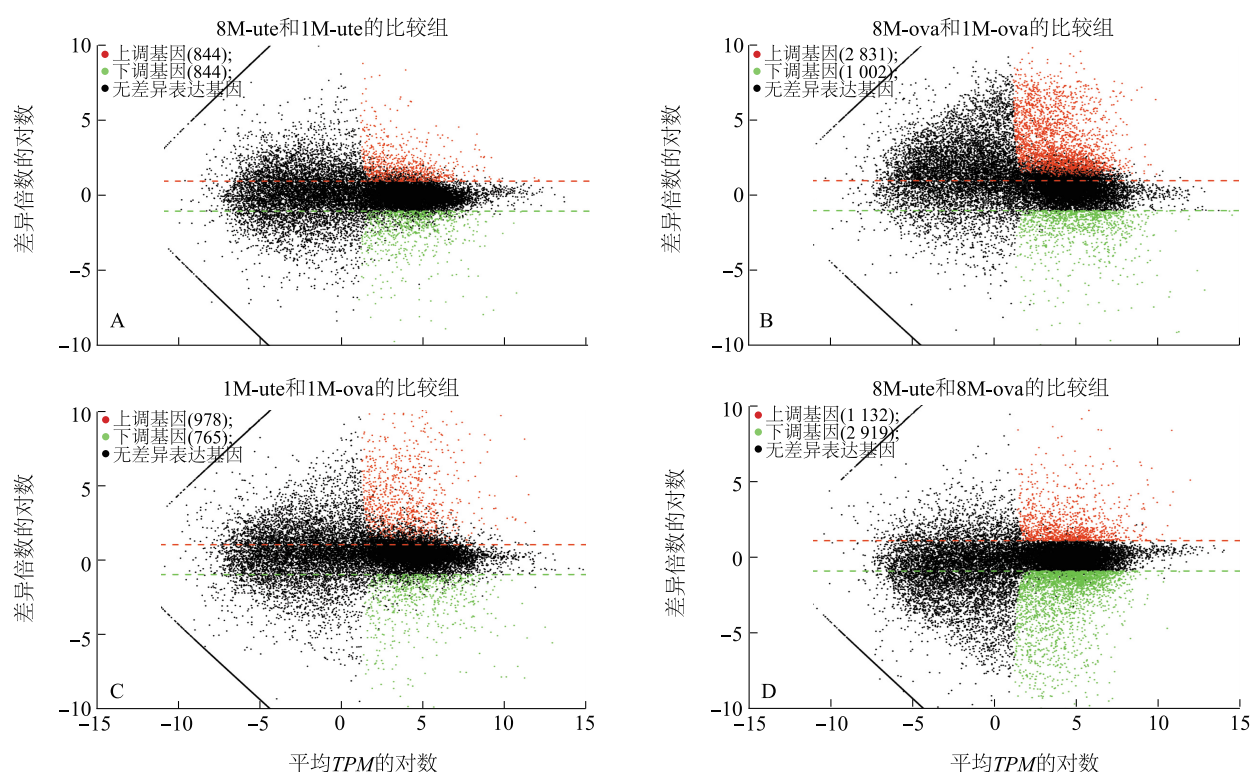


A: 比较组表达量箱型图,纵轴为每千个碱基的转录每百万映射的读数 (TPM) 的对数;B: 表达差异分析统计柱状图,纵轴为上调和下调的差异基因数量。1M-ute-1、1M-ute-2、1M-ute-3、8M-ute-1、8M-ute-2、8M-ute-3、1M-ova-1、1M-ova-2、1M-ova-3、8M-ova-1、8M-ova-2、8M-ova-3 见表 2 注。

图 2 不同分组基因的表达情况

Fig.2 Expression of genes in different groups





A: 8月龄和1月龄子宫组织样本间比较的差异表达基因数量; B: 8月龄和1月龄卵巢组织样本间比较的差异表达基因数量; C: 1月龄子宫组织样本和卵巢组织样本间比较的差异表达基因数量; D: 8月龄子宫组织样本和卵巢组织样本间比较的差异表达基因数量。图中每个点代表一个基因,不同颜色代表不同基因类型,红色、绿色和黑色分别表示上调基因、下调基因和无差异表达基因。1M-ute-1、1M-ute-2、1M-ute-3、8M-ute-1、8M-ute-2、8M-ute-3、1M-ova-1、1M-ova-2、1M-ova-3、8M-ova-1、8M-ova-2、8M-ova-3 见表2注。

图3 不同组间的差异表达基因 M-versus-A (MA) 图

Fig.3 M-versus-A maps of differentially expressed genes in different groups

### 2.3 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析

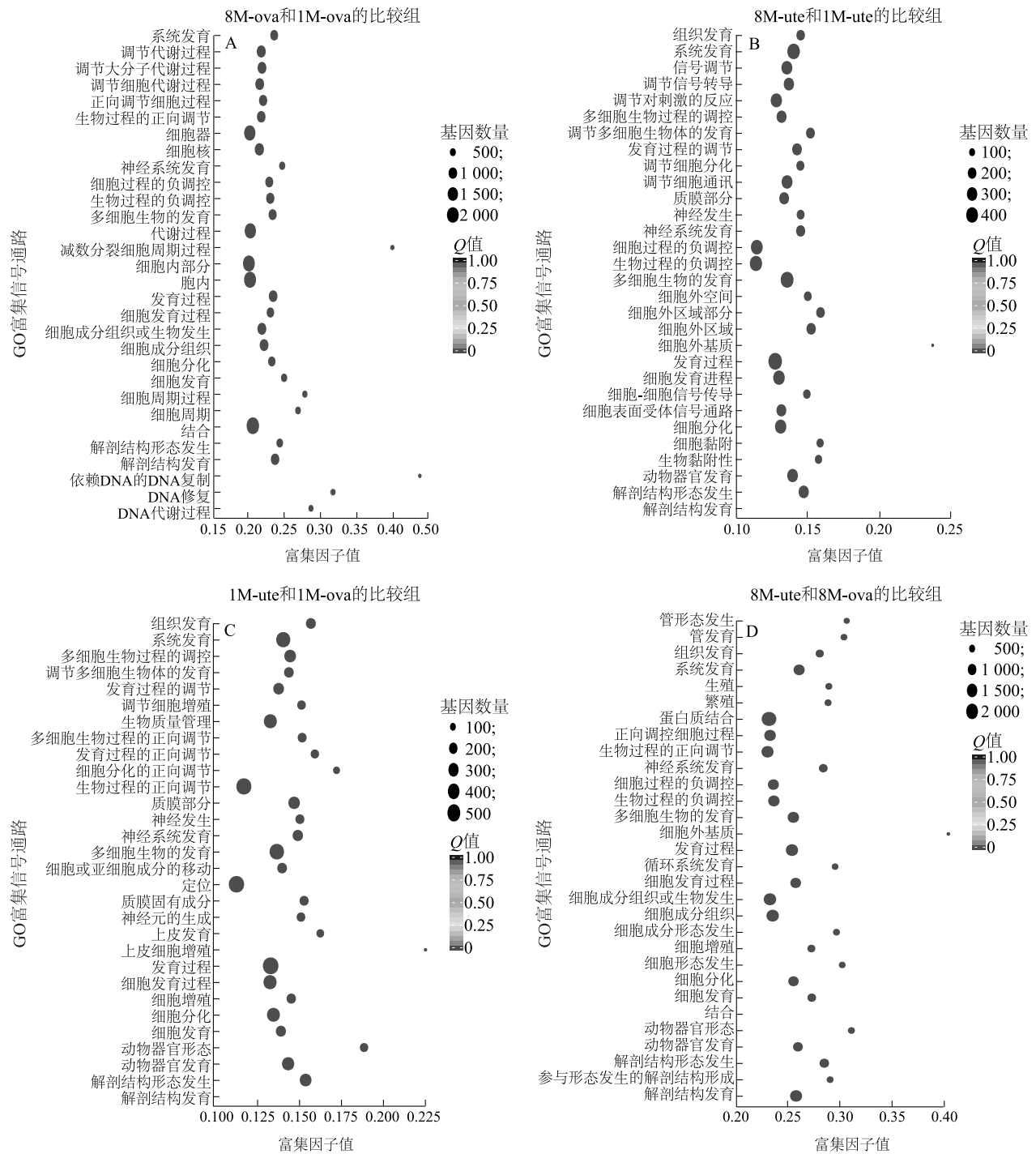
GO 功能富集分析结果显示,1月龄和8月龄卵巢组织的差异表达基因显著富集于多细胞生物的发育、系统发育和细胞发育等过程(图4A);1月龄和8月龄子宫组织的差异表达基因显著富集于动物器官发育、组织发育和细胞分化等过程(图4B);1月龄子宫和卵巢组织的差异表达基因极显著富集于动物器官发育、组织发育、多细胞生物的发育等生物学过程(图4C);8月龄子宫和卵巢组织的差异表达基因显著富集于动物器官发育、组织发育、繁殖和生殖等过程(图4D)。

通过 KEGG 信号通路数据库对不同组的差异表达基因进行通路注释发现,1月龄和8月龄卵巢组织的差异表达基因显著富集于碱基切除修复和 DNA 复制(图5A);1月龄和8月龄姜曲海猪子宫组差异表达基因无显著通路富集,主要涉及的通路为 Wnt 信号通路和细胞色素 P450 对异种生物的代谢

作用(图5B);1月龄姜曲海猪子宫和卵巢组织的差异表达基因显著富集于紧密连接信号通路(图5C);8月龄姜曲海猪子宫和卵巢组织的差异表达基因无显著通路富集,主要涉及的通路为调节干细胞多能性的信号通路和轴突导向等(图5D)。

### 2.4 筛选候选基因结果

结合 GO 功能和 KEGG 信号通路显著性富集分析结果,将差异表达基因与猪数量性状基因座(QTL)数据库(<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>)进行比对,一共筛选出11个子宫中与发育性状有关的候选基因(*ADCY2*、*DIO2*、*MAGEL2*、*LHFPL1*、*CDH13*、*ITIH3*、*MTUS2*、*LIF*、*RBP4*、*EPHB2*、*TESC*)以及31个卵巢中与发育性状有关的候选基因(*VRTN*、*FRAS1*、*LHFPL1*、*SDCCAG8*、*ITIH4*、*CPNE5*、*ARL4C*、*MTUS2*、*FGF14*、*SMTNL2*、*LIF*、*KIF5C*、*LEF1*、*PIWIL1*、*ZFYVE9*、*OSBPL10*、*RBP4*、*EPHB2*、*SPEF2*、*ESR2*、*ELOVL2*、



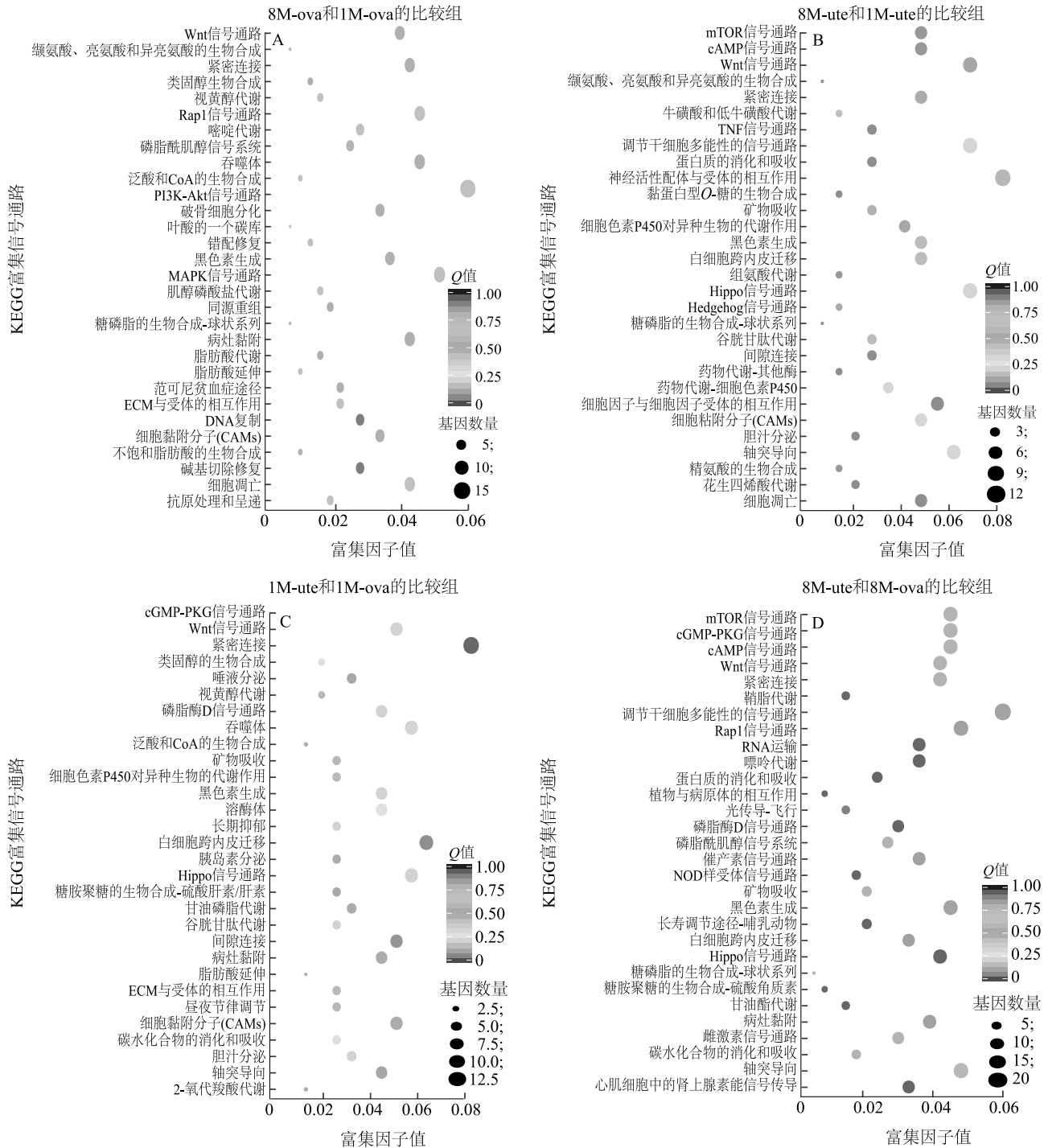
图中点的大小表示差异表达基因的数量,点越大表示包含差异表达基因越多。1M-ute-1、1M-ute-2、1M-ute-3、8M-ute-1、8M-ute-2、8M-ute-3、1M-ova-1、1M-ova-2、1M-ova-3、8M-ova-1、8M-ova-2、8M-ova-3 见表 2 注。

图 4 不同组间的差异表达基因 GO 富集分析气泡图

Fig.4 Bubble map of GO enrichment analysis of differentially expressed genes in different groups

*DCC*、*AREG*、*RIMKLA*、*WNT10B*、*HECW1*、*FUT2*、*TESC*、*WDHD1*、*DLGAP5*、*WNT3*)。其中,2 个组织中共同筛选得到的发育性状差异表达基因有 6

个,分别为 *LHFPL1* (*LHFPL* tetraspan subfamily member 1)、*MTUS2* (*Microtubule associated scaffold protein 2*)、*LIF* (*Leukemia inhibitory factor*)、*RBP4*



图中点的大小表示差异表达基因的数量,点越大表示包含差异表达基因越多。1M-ute-1、1M-ute-2、1M-ute-3、8M-ute-1、8M-ute-2、8M-ute-3、1M-ova-1、1M-ova-2、1M-ova-3、8M-ova-1、8M-ova-2、8M-ova-3 见表 2 注。

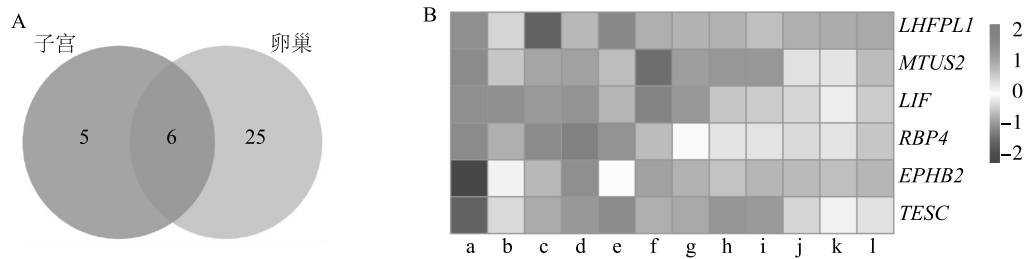
图 5 不同组间的差异表达基因 KEGG 富集分析气泡图

Fig.5 Bubble map of KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in different groups

(Retinol binding protein 4)、*EPHB2* (Erythropoietin-producing hepatocellular B2) 和 *TESC* (Tescalcin)。此外,我们将这 6 个共有的发育性状差异表达基

因在不同组间的表达绘制热图,发现除 *LIF* 和 *RBP4* 外的其他基因随着母猪月龄的增大其表达水平在 2 个组织中均呈上升趋势(图 6)。





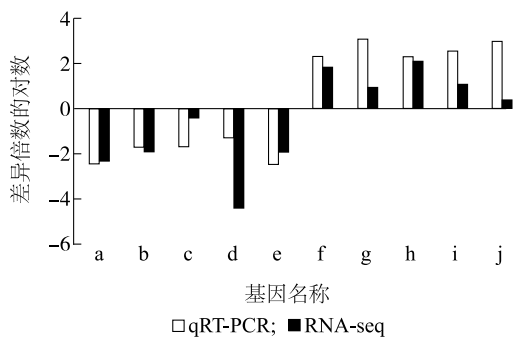
A: 卵巢和子宫共有的发育性差异表达基因 Venn 图; B: 共有的发育性差异表达基因在不同组间的表达热图。a: 1M-ova-1; b: 1M-ova-2; c: 1M-ova-3; d: 1M-ute-1; e: 1M-ute-2; f: 1M-ute-3; g: 8M-ova-1; h: 8M-ova-2; i: 8M-ova-3; j: 8M-ute-1; k: 8M-ute-2; l: 8M-ute-3。1M-ute-1、1M-ute-2、1M-ute-3、8M-ute-1、8M-ute-2、8M-ute-3、1M-ova-1、1M-ova-2、1M-ova-3、8M-ova-1、8M-ova-2、8M-ova-3 见表 2 注。

图 6 卵巢和子宫共有的发育性差异表达基因

Fig.6 Developmental differentially expressed genes shared by the ovary and uterus

## 2.5 qRT-PCR 验证结果

为进一步验证差异表达基因的表达模式, 随机选取 10 个基因 (*EGR1*、*ACKR3*、*DUSP1*、*CCN2*、*SAT1*、*ADGRA2*、*CCDC3*、*SFRP2*、*BGN*) 进行 qRT-PCR 验证, Pearson 相关性分析结果表明, qRT-PCR 和 RNA-Seq 相关系数为 0.811 ( $P < 0.01$ ), 这些基因的表达模式在 RNA-Seq 和 qRT-PCR 之间保持一致(图 7), 表明转录组数据分析的可靠性和准确性高。



a: *EGR1*; b: *ACKR3*; c: *DUSP1*; d: *CCN2*; e: *SAT1*; f: *ADGRA2*; g: *CCDC3*; h: *SFRP2*; i: *BGN*。

图 7 qRT-PCR 和 RNA-seq 结果比对

Fig.7 Comparison of qRT-PCR and RNA-seq results

## 3 讨论

RNA-Seq 能够检测物种特定组织或器官在某一状态下的转录本序列信息, 从而通过生物学分析手段筛选和鉴定该物种优良性状的关键候选基因<sup>[15-19]</sup>。因此, 目前 RNA-seq 已经广泛应用于畜禽经济性状的研究当中, 并且许多研究结果也进一步

表明 RNA-Seq 技术在畜禽重要经济性状选育中的重要作用, 基于 RNA-Seq 可以高效筛选特定性状的关键候选基因<sup>[5-11]</sup>。因此, 本研究利用 RNA-Seq 技术鉴定 1 月龄和 8 月龄姜曲海猪子宫和卵巢组织差异基因的表达谱, 结果发现姜曲海猪卵巢组织不同月龄的差异表达基因多于子宫, 表明在发育过程中卵巢组织发生了更多的转录变化, 并且 2 个组织间的差异表达基因比较结果也表明不同组织的发育存在一定的差异性。

本研究对不同月龄不同组织中的差异表达基因进行富集分析, 发现这些差异表达基因显著富集于多细胞生物的发育生物学过程, 相较于 1 月龄时期, 8 月龄的子宫和卵巢组织的差异表达基因在繁殖和生殖过程中显著富集。1 月龄和 8 月龄卵巢组的差异表达基因显著富集于碱基切除修复和 DNA 复制信号通路。值得注意的是, 在子宫和卵巢的发育过程中, 差异表达基因显著富集于 Wnt 信号通路, Wnt 信号通路在女性生殖系统的发育中起着重要的作用, 是其分化形成的关键因子, 在胚胎干细胞定向分化为子宫内膜样细胞的过程中, Wnt 信号通路同样起着关键的调控作用<sup>[20]</sup>。由此推测, 在母猪子宫和卵巢的发育过程中 Wnt 信号通路发挥着调控细胞分化的关键作用。根据上述结果, 本研究推测在姜曲海母猪子宫和卵巢的发育过程中以上信号通路发挥了潜在的调控作用, Wnt、碱基切除修复和 DNA 复制等信号通路及通路中的差异表达基因可能对姜曲海猪生殖器官的发育具有一定的调控作用, 进而影响姜曲海母猪的繁殖性能。

为了进一步筛选与姜曲海猪子宫和卵巢发育相关的关键候选基因, 本研究将差异表达基因与猪

QTL 数据库进行比对后鉴定到 6 个潜在的重要候选基因。其中, *LHFPL1* 基因位于 X 染色体上, 是脂肪瘤 HMGIC 融合伙伴 (*LHFP*) 基因家族的一个成员, *LHFPL1* 在人的大部分组织中广泛表达, 特别是在肺、胸腺、骨骼肌、结肠和卵巢中表达较高<sup>[21]</sup>, 其在卵巢中的高表达可能与其参与卵巢的发育相关。*MTUS2* 是一种蛋白质编码基因, 研究发现 *MTUS2* 与肺非鳞状非小细胞癌相关<sup>[22]</sup>。*LIF* 基因位于第 14 号染色体上, 参与造血、神经发育和内分泌调控等多种生命活动, 在母体和胎儿界面的免疫耐受性方面也可能发挥作用<sup>[23-25]</sup>。*RBP4* 基因位于第 14 号染色体上, 属于脂蛋白家族, 可将视黄醇从肝脏储存到外围组织<sup>[26]</sup>。另有研究结果表明, *RBP4* 可能通过抑制 IRS/PI3K/Akt 的磷酸化参与高尿酸血症诱导的胰岛素抵抗<sup>[27]</sup>。*EPHB2* 属于受体酪氨酸激酶跨膜糖蛋白的 Eph 受体家族, 其在结直肠癌、胃癌、肝细胞癌等多种癌症中均被证实异常表达, 导致肿瘤发生和发展<sup>[28]</sup>。*TESC* 亦称为钙调磷酸酶 B 同源蛋白 3 (CHP3), 其在细胞生长和分化中起重要作用<sup>[29]</sup>。子宫和卵巢的发育过程中细胞会不断发生分化, 而本研究筛选到的候选基因中有很多参与细胞生长和分化相关的生命活动, 因此, 本研究初步推测这些候选基因在姜曲海猪的子宫和卵巢发育过程中发挥重要作用, 今后有必要对这些候选基因进行进一步的功能验证和探究。

## 4 结 论

本研究基于姜曲海这一地方猪品种繁殖性能强的优势, 利用 RNA-Seq 技术对影响姜曲海母猪子宫和卵巢组织发育相关的功能基因进行了深入的挖掘, 揭示了姜曲海母猪发育过程中子宫和卵巢组织的基因表达图谱, 并成功鉴定到 *LHFPL1*、*MTUS2*、*LIF*、*RBP4*、*EPHB2* 和 *TESC* 等 6 个潜在的发育候选基因, 有望为姜曲海猪繁殖性状的分子改良提供良好的试验依据和理论基础, 同时也为姜曲海猪子宫和卵巢发育分子层面的研究提供了新的研究方向。

## 参考文献:

- [1] NIEMI J K, BERGMAN P, OVASKA S, et al. Modeling the costs of postpartum dysgalactia syndrome and locomotory disorders on sow productivity and replacement[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2017, 4: 181.
- [2] PELTONIEMI O, BJÖRKMAN S, OLIVIERO C. Parturition effects on reproductive health in the gilt and sow[J]. *Reprod Domest Anim*, 2016, 2: 36-47.
- [3] 仲孝栋. 母猪繁殖障碍的病因分析及防治措施[J]. *山东畜牧兽医*, 2022, 43(10): 69-70.
- [4] 程邓芳, 黄石磊, 吕元龙, 等. 母猪繁殖障碍的病因及综合防控措施[J]. *饲料博览*, 2021(10): 25-27, 45.
- [5] 段修军, 孙国波, 张 蕾, 等. 基于 RNA-Seq 鉴定黑羽番鸭肉质风味差异的候选基因[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(3): 739-747.
- [6] 安清明, 王 星, 吴震洋, 等. 基于 RNA-Seq 技术挖掘贵州白山羊公羊背最长肌生长发育下调基因[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(9): 1848-1856.
- [7] 苏比奴尔·艾力, 塔依尔江·麦麦提, 布威海丽且姆·阿巴拜科日, 等. 基于 RNA-Seq 技术的塔里木马鹿毛色相关差异表达基因筛选及初步分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(10): 2413-2424.
- [8] 梁 鹏, 张 稳, 冯登侦, 等. 基于转录组学筛选绵羊肉质性状相关候选基因[J]. *华北农学报*, 2022, 37(4): 220-231.
- [9] 甘麦邻, 沈林园, 杨东丽, 等. 转录组学技术及其在猪肉质遗传研究中的应用[J]. *猪业科学*, 2020, 37(2): 94-98.
- [10] FRASER L, BRYM P, PAREEK C S, et al. Transcriptome analysis of boar spermatozoa with different freezability using RNA-Seq[J]. *Theriogenology*, 2020, 142: 400-413.
- [11] 徐 盼, 倪黎纲, 唐子雪, 等. 基于 RNA-Seq 数据鉴定苏姜猪肉肉质性状相关基因[J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(10): 2813-2822.
- [12] 祖 宁, 李 敏, 黄晓瑜. 食欲素 A 对母猪卵巢颗粒细胞孕酮相关蛋白表达的影响[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(10): 1993-1997.
- [13] 朱淑斌, 赵旭庭, 周春宝, 等. 姜曲海猪肉营养成分组成及风味物质的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2013, 49(15): 16-19.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR[J]. *Methods*, 2002, 25(4): 402-408.
- [15] 赵娅红, 涂艳芳, 王 悦, 等. 基于高通量测序分析菊花枯萎病对根际土壤真菌群落结构的影响[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(24): 198-204.
- [16] 胡小文, 孔 冉, 刘 洋, 等. 利用转录组测序开发甘蔗 SNP 分子标记[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(9): 2527-2536.
- [17] 张 瑶, 高 弢, 马桂珍, 等. 基于转录组测序技术分析愈创木酚对禾谷镰刀菌的抑菌机制[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(2): 343-351.
- [18] 曾广娟, 冯 阳, 吴 舒, 等. 基于高通量测序的有机种植蔬菜地土壤微生物多样性分析[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(9): 2403-2414.
- [19] 方亦午, 顾建锋, 熊 武, 等. 基于 18S、28S 宏条形码高通量测序和形态学方法的土壤线虫群落多样性比较[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(6): 202-210.
- [20] 于文竹, 孙莹璞. 胚胎干细胞向子宫内膜样细胞分化中 Wnt 信号通路的调控作用[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2013, 32(6): 502-505.

- [21] HUANG C, GUO J, LIU S, et al. Isolation, tissue distribution and prokaryotic expression of a novel human X-linked gene *LHF-PLI*[J]. DNA Seq, 2004, 15(4):299-302.
- [22] KHOSRAVI A, SALIMI B, ESFAHANI-MONFARED Z, et al. A phase IV efficacy study of formeta plus carboplatin as first-line treatment of advanced non-squamous, non-small cell lung cancer in iran; an affordable price with clinical benefit[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2018, 19(10):2973-2978.
- [23] VAZIRI N, SHARIATI L, JAVANMARD S H. Leukemia inhibitory factor; a main controller of breast cancer[J]. J Biosci, 2020, 45:143.
- [24] LORIOT Y, MARABELLE A, GUÉGAN J P, et al. Plasma proteomics identifies leukemia inhibitory factor (LIF) as a novel predictive biomarker of immune-checkpoint blockade resistance[J]. Ann Oncol, 2021, 32(11):1381-1390.
- [25] WRONA E, POTEMSKI P, SCLAFANI F, et al. Leukemia inhibitory factor; a potential biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2021, 69(1):2.
- [26] STEINHOFF J S, LASS A, SCHUPP M. Biological functions of RBP4 and its relevance for human diseases[J]. Front Physiol, 2021, 12:659977.
- [27] LIU C, ZHOU X R, YE M Y, et al. RBP4 is associated with insulin resistance in hyperuricemia-induced rats and patients with hyperuricemia[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12:653819.
- [28] LIU W, YU C, LI J, et al. The roles of EphB2 in cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10:788587.
- [29] KOLOBYNINA KG, SOLOVYOVA VV, LEVAY K, et al. Emerging roles of the single EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$  sensor tescalcin in the regulation of gene expression, cell growth and differentiation[J]. J Cell Sci, 2016, 129(19):3533-3540.

(责任编辑:陈海霞)