

网络出版时间:2021-01-13 13:30 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfafu.2021.07.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20210112.1147.009.html

牛优势卵泡颗粒细胞与膜细胞中生殖激素合成相关基因的筛选与分析

赵园园,吴震洋,安清明,孟金柱

(铜仁学院,贵州 铜仁 554300)

【摘要】【目的】探究牛优势卵泡颗粒细胞(GCs)和膜细胞(TCs)中基因的表达差异,筛选并研究与生殖激素合成相关的基因。【方法】在 GEO 数据库获得 GSE83524 芯片数据,通过在线软件 GEO2R 筛选牛优势卵泡中 GCs 和 TCs 之间的差异表达基因。使用 DAVID 软件对获得的差异表达基因进行 GO 功能富集分析;使用 KOBAS 软件进行 KEGG 信号通路分析,筛选出 GCs 和 TCs 之间参与生殖激素合成相关信号通路;使用 String 结合 Cytoscape 软件构建蛋白与蛋白之间的相互作用网络(PPI)。以牛的优势卵泡为材料,采用 Real-time PCR 对筛选出的差异表达基因进行验证。【结果】经在线软件 GEO2R 分析,共获得 247 个差异表达基因,其中 43 个表达上调,204 个表达下调;247 个差异表达基因的 GO 功能分析结果共分为 3 大类 41 组,其中参与生物学过程(BP)的有 22 组,参与细胞组分(CC)的有 12 组,参与分子功能(MF)的有 7 组;KEGG 信号通路分析共发现 17 条通路,其中腺苷酸环化酶 3 基因(ADCY3)、细胞色素 P450 17A1 基因(CYP17A1)、腺苷酸环化酶 8 基因(ADCY8)、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白基因(GNAS)、骨形态发生蛋白 6 基因(BMP6)5 个差异表达基因参与了卵巢类固醇生成通路。经 PPI 网络互作分析,筛选出了前 10 位的 Hub 基因;Real-time PCR 结果显示,CYP17A1、ADCY8 在 TCs 中的表达量极显著高于 GCs ($P < 0.01$);ADCY3、BMP6 在 TCs 中的表达量显著高于 GCs ($P < 0.05$),GNAS 在 GCs 中的表达量极显著高于 TCs ($P < 0.01$),这 5 个基因在 GCs 和 TCs 中的表达趋势与 GEO 芯片数据结果一致。【结论】ADCY3、CYP17A1、ADCY8、GNAS、BMP6 在 GCs 与 TCs 之间表达量存在显著差异,其可能在牛优势卵泡 GCs 和 TCs 中对生殖激素的合成及分泌产生了重要作用。

【关键词】 牛;优势卵泡;差异表达基因;颗粒细胞;膜细胞;生殖激素

【中图分类号】 S823.3;Q78

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2021)07-0011-09

Screening and analysis of genes related to reproductive hormone synthesis in granulosa cells and theca cells of cattle dominant follicles

ZHAO Yuanyuan, WU Zhenyang, AN Qingming, MENG Jinzhu

(Tongren University, Tongren, Guizhou 554300, China)

Abstract:【Objective】This study explored differential expressions of genes in granulosa cells (GCs) and theca cells (TCs) of cattle dominant follicles and genes related to reproductive hormone synthesis were screened and studied.【Method】GSE83524 chip data were obtained from GEO database, and the differentially expressed genes between GCs and TCs of dominant follicles in cattle were screened by GEO2R. GO function enrichment was analyzed using DAVID software to the differentially express genes, and KOBAS

【收稿日期】 2020-07-13

【基金项目】 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2020]1Y138);国家自然科学基金青年基金项目(31702097);铜仁市科技计划项目(铜市科研[2020]80号);铜仁学院生态畜牧创新团队项目(CXTD[2020-19])

【作者简介】 赵园园(1987—),女,河北邢台人,博士,副教授,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:84840293@163.com

【通信作者】 孟金柱(1987—),男,山西朔州人,硕士,讲师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:mjz122021@126.com

software was used to perform KEGG signal pathway analysis. Reproductive hormones related signaling pathways were screened from GCs and TCs, and protein-protein interaction network (PPI) was constructed through String combined with Cytoscape software. Using bovine dominant follicles as materials, the selected reproductive hormones related genes were verified by real-time PCR. 【Result】 After analysis by online software GEO2R, 247 differentially expressed genes were obtained, among which 43 were up-regulated and 204 were down-regulated. GO function analysis was performed on 247 differentially expressed genes, and they were divided into 41 groups in three categories. There were 22 groups involved in biological process (BP), 12 groups involved in cellular component (CC), and 7 groups involved in molecular function (MF). KEGG signaling pathway analysis revealed a total of 17 pathways, among which 5 differentially expressed genes, including *ADCY3*, *CYP17A1*, *ADCY8*, *GNAS* and *BMP6*, were involved in the ovarian steroid production pathway. Top 10 Hub genes were screened by PPI network interaction analysis. Real-time PCR results showed that expression levels of *CYP17A1* and *ADCY8* in TCs were significantly higher than that of GCs ($P < 0.01$). Expression levels of *ADCY3* and *BMP6* in TCs were extremely significantly higher than that of GCs ($P < 0.05$) and expression level of *GNAS* in GCs was extremely significantly higher than that of TCs ($P < 0.01$). The expression trend of these five genes in GCs and TCs was consistent with the results of GEO chip data. 【Conclusion】 There were significant differences in expression levels of *ADCY3*, *CYP17A1*, *ADCY8*, *GNAS* and *BMP6* between GCs and TCs, which may play an important role in synthesis and secretion of reproductive hormones in bovine dominant follicle GCs and TCs.

Key words: cattle; dominant follicles; differentially expressed genes; granulosa cells; theca cells; reproductive hormones

雌性哺乳动物的卵泡是生殖系统的重要组成部分,它包含卵母细胞、颗粒细胞(GCs)和膜细胞(TCs)^[1]。TCs位于卵泡外部,能够接收外来信号并在细胞色素P450 17A1(*CYP17A1*)的作用下产生雄激素^[2];而GCs位于卵泡内部,通过细胞色素P450 19A1(*CYP19A1*)将雄激素转化为雌激素^[3]。GCs和TCs协同合成类固醇激素并分泌到胞外,通过信号转导控制卵母细胞的发育和成熟,进而影响卵母细胞的排出^[4]。在不同生理条件下,GCs和TCs之间存在着复杂的信号网络以调节雄激素的合成分泌^[5],关于GCs调控TCs中类固醇激素的研究比较分散,调控机制尚不清楚。

Edson等^[6]研究了牛、羊及人类卵泡中GCs和TCs的生理作用,发现不同物种之间GCs和TCs的生理作用存在差异性。Hatzirodos等^[7]通过对牛直径为3~5 mm及直径大于9 mm卵泡的GCs和TCs进行转录组测序,发现了许多细胞外基质基因,其中线粒体定位富含谷氨酸蛋白(MGARP)、甘氨酸脱羧酶(GLDC)、碳水化合物磺基转移酶8(CHST8)、谷胱甘肽过氧化物酶3(GPX3)是颗粒细胞新的潜在标记物,而腓骨蛋白5(FBLN5)、骨甘氨酸(OGN)、受体活性修饰蛋白2(RAMP2)在TCs的表达水平显著高于GCs。Bonnet等^[8]采用激光

捕获显微切割技术(LCM)和芯片,分析识别绵羊早期卵泡发育过程中卵母细胞与GCs的基因表达模式,阐明了不同类型细胞的mRNA库在原始卵泡向中间卵泡过渡的过程中受到动态调控。

目前关于牛优势卵泡GCs和TCs中生殖激素合成及分泌机制的研究尚未见报道,为此,本研究对GEO数据库GSE83524 RNA-seq表达谱中GCs和TCs之间的差异表达基因进行了筛选及生物信息学分析,并通过Real-time PCR对相关基因的表达情况进行了验证,以期为探明牛优势卵泡中GCs和TCs在生殖激素合成及分泌过程中的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品采集

从贵州省铜仁市万山区肉牛屠宰场选取10头健康的青年(1岁龄)母思南黄牛,屠宰后采集卵巢上的最大(直径8~10 mm)卵泡(每头牛1枚),迅速置于4℃灭菌杜氏磷酸缓冲液(DPBS)中并运回实验室,参考文献[9]的方法筛选优势卵泡,最终获得5个样本。

将筛选出的优势卵泡放到盛有生理盐水的培养皿上,使用眼科剪刀将卵泡剪开,分别用细胞刮刀刮

取位于卵泡壁上的 GCs 和 TCs,置于-80 ℃冰箱中保存。

1.2 差异表达基因筛选

1.2.1 芯片数据 在美国国立生物信息中心 GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)中搜索“bovine follicle development”,获得 GSE83524 RNA-seq 表达谱,其中纳入了 4 头牛优势卵泡中的 GCs 样本和 3 头牛优势卵泡中的 TCs 样本。

1.2.2 差异表达基因的筛选与 GO 和 KEGG 分析 使用在线软件 GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r1>)对牛优势卵泡中 GCs 和 TCs 之间的差异表达基因进行筛选,筛选条件为:|差异倍数 lb 值|≥1.5,每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数(FPKM)≥2,校正后的 $P < 0.01$ 。

使用 DAVID 软件对获得的差异表达基因进行 GO(gene ontology)功能富集分析;为了获得与细胞内生殖激素合成相关的信号通路,使用 KOBAS 软件进行 KEGG(kgoto encyclopedia of genes and genomes)信号通路分析,筛选出 GCs 和 TCs 之间参与生殖激素合成相关信号通路。

使用 String 软件构建蛋白与蛋白之间的相互

作用网络(PPI),并将得到的互作数据导入 Cyto-scape 软件,通过其 Cyto-Hubba 插件的 MCC 算法筛选出排名前 10 位的 *Hub* 基因。

1.3 差异表达基因验证

1.3.1 总 RNA 提取与反转录 从-80 ℃冰箱中取出 3 个样本的 GCs 和 TCs 置于冰盒上解冻,用 Trizol 法分别提取 2 种细胞的总 RNA,采用 Nano-Drop 2000 测量浓度。用北京全式金生物技术有限公司 EasyScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 将总 RNA 反转录为 cDNA,备用。

1.3.2 引物的设计与合成 以核糖体磷酸化蛋白大亚基 P0 基因(*RPLP0*)为内参基因,选取参与卵巢类固醇激素生成的腺苷酸环化酶 3 基因(*ADCY3*)、细胞色素 P450 17A1 基因(*CYP17A1*)、腺苷酸环化酶 8 基因(*ADCY8*)、鸟嘌呤核苷酸结合蛋白基因(*GNAS*)、骨形态发生蛋白 6 基因(*BMP6*)5 个差异表达基因进行验证。

用 Primer 5.0 设计 *ADCY3*、*CYP17A1*、*ADCY8*、*GNAS*、*BMP6* 及内参基因 *RPLP0* 引物,引物序列及扩增产物长度如表 1 所示,引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 试验所用引物信息
Table 1 Sequences of tested primers

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增产物长度/bp Length of amplified product
ADCY3	F:AAATCTCTGTCCGGAACCTCGG;R:TGACCACCACATAGCAGTCG	174
CYP17A1	F:ATAGGGGACATCTTCGGGGC;R:CCACAACGTCTGTGCCTTTG	295
ADCY8	F:TGGCCAGGAACGTCATCATC;R:GTACTCTGGGTAGGAGCAGA	158
GNAS	F:GAAGGACAAGCAGGTCTACCG;R:TCTACCATCGCTGTTGCTC	170
BMP6	F:CTGTACAACGCCCTGTCCG;R:CATGACCATATCGGCGTCTGT	231
RPLP0	F:CAACCCTGAAGTGCTTGACAT;R:AGGCAGATGGATCAGCCA	169

1.3.3 Real-time PCR 验证 根据北京全式金生物技术有限公司 TransStart® Tip Green qPCR SuperMix 使用说明,建立 20 μL Real-time PCR 反应体系:模板 cDNA 4 μL,上、下游引物各 0.5 μL,SYBR MIX 10 μL,ddH₂O 5 μL;PCR 反应在 Light Cycler 480 平台进行,反应程序为:94 ℃预变性 30 s;94 ℃ 5 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,40 个循环。每个样本重复 4 次。

PCR 反应结束后收集循环阈值(*C_t*),采用 2^{-ΔΔC_t}法计算 *ADCY3*、*CYP17A1*、*ADCY8*、*GNAS*、*BMP6* 基因的相对表达量,使用 SPSS 17.0 软件对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中差异表达基因的筛选

经在线软件 GEO2R 分析,共获得 247 个在牛优势卵泡 CGs 与 TCs 中差异表达基因:上调表达基因 43 个,其中差异倍数最高的 20 个基因及其功能见表 2;下调表达基因 204 个,其中差异倍数最高的 20 个基因及其功能见表 3。从表 2 和表 3 可以看出,各基因在 GCs 和 TCs 中表达水平均比较高,差异倍数较大,表明这些基因在牛卵泡优势化过程中发挥了重要作用,其中有参与细胞有丝分裂的基因,

也有参与细胞发育和内分泌激素调控的基因。例如,前列腺素 E2 受体 EP3 基因(*PTGER3*)参与了子宫收缩;干扰素诱导基因 3(*IFNT3*)促进了干扰素诱导细胞的凋亡;F-Box 蛋白 5 基因(*FBXO5*)在细胞有丝分裂过程中有重要的调控作用;细胞色素

P450 17A1 基因(*CYP17A1*)是性激素合成的关键酶,在膜细胞中参与了雄激素的合成;G 蛋白亚单位 $\gamma 11$ 基因(*GNG11*)参与了跨膜信号转导,属于卵泡负调控发育因子。

表 2 牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中差异倍数最高的 20 个上调表达基因及其功能分析
Table 2 Top 20 up-regulated genes in GCs and TCs and their functions of dominant follicles in cattle

基因名称 Gene name	FPKM		差异倍数 lb 值 lb (fold change)	校正后 <i>P</i> 值/ ($\times 10^{-5}$) Corrected <i>P</i> value	基因功能 Gene function
	GCs	TCs			
乙酰肝素酶 <i>HPSE</i>	379.71	47.36	2.99	1.60	通过重构细胞外基质使细胞运动 Permit cell movement through remodeling of the extracellular matrix
Ⅲ型纤连蛋白组件 包含蛋白 5 <i>FNDC5</i>	633.80	96.89	2.72	1.85	参与褐色脂肪的形成 Participate in the development of brown fat
NOP2/Sun RNA 甲 基转移酶家族成员 7 <i>NSUN7</i>	123.03	20.59	2.58	0.80	RNA 结合能力和甲基转移酶活性 RNA binding and methyl transferase activity
丝氨酸棕榈基转移 酶小亚基 B <i>SPTSSB</i>	49.35	8.78	2.47	2.78	催化鞘磷脂生物合成 Catalyzes sphingolipid biosynthesis
鸟嘌呤核苷酸结合 蛋白 GNAS	75.07	13.60	2.47	0.40	参与 GTP 结合和废弃的信号转导活性 Participate in GTP binding and obsolete sig- nal transducer activity
热休克蛋白 A4L <i>HSPA4L</i>	214.42	39.30	2.46	1.06	保护热休克细胞免受聚集的蛋白质的有害 影响 Protect the heat-shocked cell against the harmful effects of aggregated proteins
溶质载体家族 2 成 员 3 <i>SLC2A3</i>	235.36	46.23	2.36	3.04	与跨膜转运蛋白活性有关 Related to transmembrane transporter activ- ity
前列腺素 E2 受体 EP3 <i>PTGER3</i>	135.02	26.79	2.33	0.98	参与子宫收缩 Involved in uterine contraction activities
甘氨酸脱羧酶 <i>GLDC</i>	333.50	69.94	2.26	0.62	参与甘氨酸降解过程 Participates in the glycine degradation process
干扰素诱导基因 3 <i>IFNT3</i>	373.62	78.10	2.26	0.80	促进干扰素诱导细胞凋亡 Promote interferon induced apoptosis
正核分裂周期蛋白 80 <i>NDC80</i>	359.38	80.50	2.16	0.39	组织和稳定微管-着丝点的相互作用 Organize and stabilize microtubule-kineto- chore interactions
脊髓小脑性共济失 调蛋白 3 抗体 <i>ATXN3</i>	60.84	13.78	2.15	3.09	参与蛋白质新陈代谢 Involved in Metabolism of proteins
MYB 原癌基因样 1 <i>MYBL1</i>	317.12	73.38	2.11	3.45	雄性减数分裂的主调控因子 A master regulator of male meiosis
Rho GTPase 激活蛋 白 11A <i>ARHGAP11A</i>	457.82	107.74	2.09	0.57	参与 DNA 损伤应答 Participates in the response to DNA damage
F-Box 蛋白 5 <i>FBXO5</i>	519.35	124.79	2.05	1.46	参与有丝分裂调控 Participates in mitotic regulation
序列相似度家族 184 成员 A <i>FAM184A</i>	162.27	39.99	2.03	1.40	未知 Unknown
甲基转移酶样 22 <i>METTTL22</i>	163.17	40.34	2.01	3.28	参与 DNA 修复、复制和 mRNA 加工 involved in DNA repair and replication and mRNA processing
MIS18 结合蛋白 1 <i>MIS18BP1</i>	443.18	110.71	2.01	1.77	参与有丝分裂 Participates in mitotic
透明质酸介导的运 动受体 <i>HMMR</i>	335.32	84.27	2.00	3.28	参与细胞运动 Involved in cell motility
PARP1 结合蛋白 <i>PARBP</i>	152.22	39.50	1.96	2.17	在 DNA 修复和维持基因组稳定性方面发挥 核心作用 Play a central role DNA repair and in the maintenance of genomic stability

表 3 牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中差异倍数最高的 20 个下调表达基因及其功能分析

Table 3 Top 20 down-regulated genes in GCs and TCs and their functions of dominant follicles in cattle

基因名称 Gene name	FPKM		差异倍数 lb 值 lb (fold change)	校正后 P 值/ ($\times 10^{-7}$) Corrected P value	基因功能 Gene function
	GCs	TCs			
乙醛脱氢酶 1 家族成员 A1 <i>ALDH1A1</i>	53.15	4 083.84	−6.30	8.16	参与酒精代谢、视黄醇代谢及脂肪代谢 Involved in the metabolic responses to alcohol metabolism,retinol and fat
内耳特异表达蛋白 <i>OTOS</i>	43.30	3 337.86	−6.27	0.92	与神经感觉上皮的存活相关 Associated with the survival of neurosensory epithelium
富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白类似蛋白 1 <i>SPARCL1</i>	28.26	1 926.32	−6.03	11.50	钙离子结合 Calcium ion binding
无孢蛋白 <i>ASPN</i>	30.70	1 858.81	−5.96	7.46	调节软骨形成 Regulate chondrogenesis
基质 γ 羧基谷氨酸蛋白 <i>MGP</i>	27.73	1 740.59	−5.92	7.46	与组织钙化有关 Associated with tissue calcification
赖氨酰氧化酶 <i>LOX</i>	37.80	2 035.77	−5.76	1.65	在胶原和弹性蛋白的交联中发挥作用 Functions in the crosslinking of collagens and elastin
载脂蛋白 D <i>APOD</i>	19.58	1 106.51	−5.76	11.50	参与脂蛋白代谢 Involved in lipoprotein metabolism
视黄酸受体应答器 1 <i>RARRES1</i>	24.75	1 114.39	−5.66	219.00	调控 α -微管蛋白酪氨酸循环 Regulate the alpha-tubulin tyrosination cycle
骨调蛋白 <i>OMD</i>	18.25	865.46	−5.58	1.65	与生物矿化过程有关 Implicated in bio-mineralization processes
钙蛋白酶 6 <i>CAPN6</i>	37.04	1 693.18	−5.56	202.00	参与肿瘤的形成 Play a role in tumor formation
解聚素金属蛋白酶家族蛋白 1 <i>ADAMDEC1</i>	20.32	912.34	−5.51	97.60	在树突状细胞功能中起重要作用 Play an important role in dendritic cell function
骨甘氨酸 <i>OGN</i>	37.47	1 689.40	−5.48	16.70	诱导异位骨形成并可能调节成骨细胞分化 Induce ectopic bone formation and may regulate osteoblast differentiation
XII-1 型胶原链 <i>COL12A1</i>	50.53	1 957.98	−5.30	18.50	修饰 I 型胶原原纤维与周围基质相互作用 Modify the interactions between collagen I fibrils and the surrounding matrix
细胞色素 P450 17A1 <i>CYP17A1</i>	112.42	3 859.12	−5.21	126.00	性激素合成关键酶 Key enzymes for sex hormone synthesis
G 蛋白亚单位 γ 11 <i>GNG11</i>	15.65	570.14	−5.17	6.11	跨膜信号转导 Transmembrane signal transduction
肽酶抑制剂 15 <i>PI15</i>	19.80	715.82	−5.15	7.46	在中枢神经系统起作用 Play a role in the central nervous system
二聚糖 <i>BGN</i>	30.95	1 079.43	−5.14	8.16	调节炎症和先天免疫 Regulate inflammation and innate immunity
III-1 型胶原链 <i>COL3A1</i>	40.31	1 345.68	−5.07	5.53	与 I 型胶原蛋白相关 Associated with type I collagen
I-1 型胶原链 <i>COL1A2</i>	53.78	1 750.09	−5.03	5.53	与 I 型胶原蛋白相关 Associated with type I collagen
腓骨蛋白 <i>FBLN5</i>	54.52	1 783.60	−5.01	5.46	促进内皮细胞的黏附 Promote endothelial cell adhesion

2.2 牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中差异表达基因 GO 功能富集分析

通过 DAVID 软件对 247 个差异表达基因进行 GO 功能分析,结果(表 4)发现,差异表达基因分为 3 大类 41 组,其中参与生物学过程的有 22 组,主要包括细胞黏附、细胞迁移的正向调控及心脏发育等;参与细胞组分的有 12 组,主要富集在细胞外的外泌体、细胞外空间及蛋白质的细胞外基质;参与分子功能的有 7 组,主要在以下功能富集,即钙离子结合、

肝素结合、整合素结合及细胞外基质结构成分。

2.4 牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中差异表达基因 KEGG 信号通路分析

用 KOBAS 软件对所获得的差异表达基因进行 KEGG 信号通路分析,共发现 17 条通路,其中与本研究内容相关的通路为卵巢类固醇生成通路,其包含 *ADCY3*、*CYP17A1*、*ADCY8*、*GNAS*、*BMP6* 5 个基因。

表 4 牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中差异表达基因的 GO 功能分析

Table 4 GO analysis of differentially expressed genes in GCs and TCs of dominant follicles in cattle

GO 类别 GO category	GO 组别 GO group	基因数 Number of genes
生物学过程 Biological process	细胞黏附 Cell adhesion	14
	弹性纤维集合体 Elastic fiber assembly	4
	细胞对氨基酸刺激的反应 Cellular response to amino acid stimulus	7
	胶原原纤维组织 Collagen fibril organization	6
	内皮细胞分化 Endodermal cell differentiation	5
	细胞迁移的正向调节 Positive regulation of cell migration	9
	细胞外基质的组织 Extracellular matrix organization	7
	正调控骨矿化 Positive regulation of bone mineralization	5
	心脏发育 Heart development	8
	通过 4-硫酸软骨素糖胺聚糖的肽交联 Peptide cross-linking via chondroitin 4-sulfate glycosaminoglycan	3
	内皮细胞增殖的负调控 Negative regulation of endothelial cell proliferation	4
	成骨细胞分化的正向调控 Positive regulation of osteoblast differentiation	5
	细胞外的原纤维组织 Extracellular fibril organization	3
	基因表达的正调控 Positive regulation of gene expression	8
	血管生成 Vasculogenesis	5
	骨小梁形成 Bone trabecula formation	3
	转化生长因子受体信号通路 Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	5
	蛋白质杂三聚作用 Protein heterotrimerization	3
	血管的发育 Blood vessel development	4
	细胞与底物黏附的正向调节 Positive regulation of cell-substrate adhesion	4
	表面形态发生 Face morphogenesis	4
	成骨细胞分化 Osteoblast differentiation	6
细胞组分 Cellular component	蛋白质的细胞外基质 Proteinaceous extracellular matrix	27
	细胞外空间 Extracellular space	45
	胶原蛋白三聚物 Collagen trimer	9
	细胞外的外泌体 Extracellular exosome	57
	细胞外基质 Extracellular matrix	10
	肌纤维膜 Sarcolemma	7
	黏着斑 Focal adhesion	13
	小窝 Caveola	5
	双细胞的紧密连接 Bicellular tight junction	6
	微纤维 Microfibril	3
分子功能 Molecular function	受体复合体 Receptor complex	6
	黏着连接 Adherens junction	4
	钙离子结合 Calcium ion binding	26
	肝素结合 Heparin binding	11
	整合素结合 Integrin binding	7
	细胞外基质结构成分 Extracellular matrix structural constituent	7
	细胞外基质结合 Extracellular matrix binding	6
	糖胺聚糖结合 Glycosaminoglycan binding	4
	胶原蛋白结合 Collagen binding	4

2.5 牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中 *Hub* 基因的 PPI 网络互作分析

PPI 结果(图 1)显示,排名前 10 位的 *Hub* 基因分别是透明质酸介导的运动受体基因(*HMMR*)、着丝粒蛋白 F 基因(*CENPF*)、着丝粒蛋白 E 基因(*CENPE*)、驱动蛋白家族 11 基因(*KIF11*)、Discs 大同源物关联蛋白 5 基因(*DLGAP5*)、MIS18 结合蛋白 1 基因(*MIS18BP1*)、表皮细胞转移序列 2 基

因(*ECT2*)、正核分裂周期蛋白 80 基因(*NDC80*)、多梳蛋白复合体 1 基因(*PRC1*)、PDZ 结合激酶基因(*PBK*)。

2.6 Real-time PCR 验证分析

Real-time PCR 结果(表 5)显示,*CYP17A1*、*ADCY8* 在 TCs 中的表达量极显著高于 GCs ($P<0.01$);*ADCY3*、*BMP6* 在 TCs 中的表达量显著高于 GCs ($P<0.05$),*GNAS* 在 GCs 中的表达量极

显著高于 TCs ($P<0.01$)。ADCY3、CYP17A1、ADCY8、GNAS、BMP6 在 GCs 和 TCs 中的表达趋势与 GEO 芯片数据结果一致。

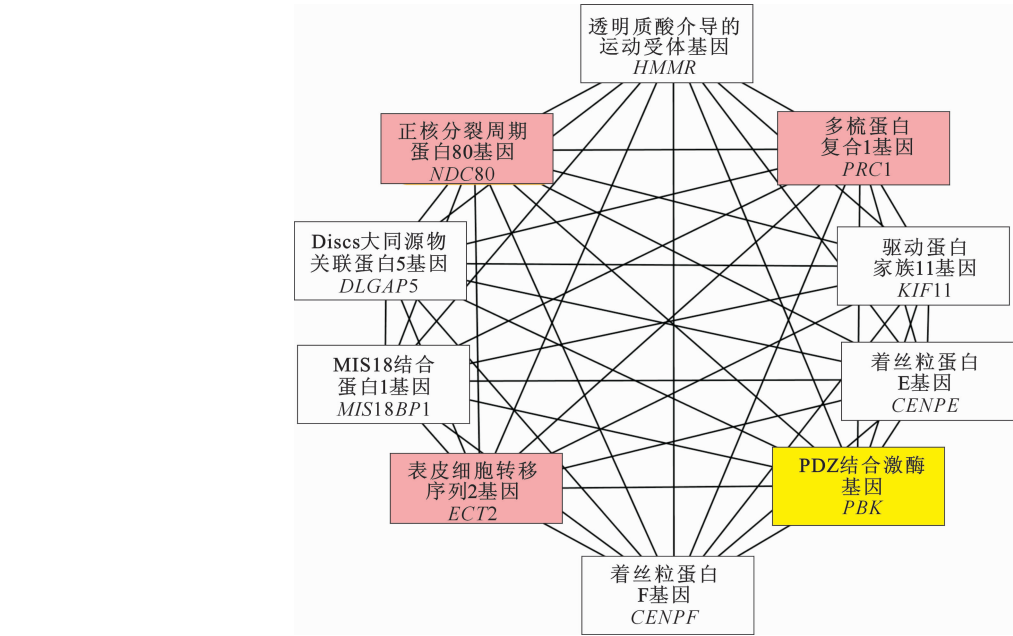


图 1 牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中排名前 10 位 Hub 基因的 PPI 网络互作分析

Fig. 1 PPI analysis of top 10 Hub genes in GCs and TCs of dominant follicles in cattle

表 5 差异表达基因在牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中的相对表达量

Table 5 Relative expression of differentially expressed genes in GCs and TCs of dominant follicles in cattle

细胞 Cell	ADCY3	CYP17A1	ADCY8	GNAS	BMP6
GCs	8.93±1.57	17.66±32.72	5.28±0.23	12.89±2.42 **	9.25±0.33
TCs	39.47±1.04 *	271.31±22.52 **	57.33±2.16 **	3.65±0.68	40.07±0.87 *

注:同列数据后标 ** 和 * 分别表示在 $P<0.01$ 和 $P<0.05$ 水平差异显著。
Note: ** and * indicate significant difference at $P<0.01$ and $P<0.05$ levels, respectively.

3 讨论

卵母细胞、GCs 和 TCs 是雌性动物卵泡的主要组成部分,它们在激素合成、卵泡发育和闭锁过程中起着至关重要的作用^[10]。由 GCs 分泌的胰岛素样生长因子 I (IGF- I)、激活素和抑制素可以通过自分泌/旁分泌来调节卵巢的功能^[11]。TCs 不仅支持发育中卵泡的结构,而且为 GCs 合成雌激素提供雄激素,从而刺激早期卵泡的生长发育^[12-13]。在雌性动物卵巢中,激素的生成是由 GCs 和 TCs 特异性表达的一系列类固醇酶通过协同作用来完成的^[14]。GCs 通过缝隙连接将信号传递到卵母细胞,对卵子的发生、形成和成熟以及受精后胚胎发育至关重要^[15]。

研究发现,类固醇样原急性调节蛋白(STAR)通过将胆固醇运输到线粒体来调节雄激素的分泌^[16],而 TCs 所表达的细胞色素 P450 11A1

(CYP11A1)、细胞色素 CYP17A1 和 HSD3B2 均为雄激素生物合成的关键酶^[17]。体外研究表明,TCs 的一个关键特征是雄激素分泌的增加是由 LH 以剂量依赖性的方式驱动的^[18-19]。CYP17A1 是催化孕烯酮转化为 17-羟基孕烯酮和孕酮转化为 17-羟基孕酮的定性调节剂,是雄激素生物合成的限速酶^[20]。CYP17A1 主要表达于肾上腺、睾丸间质细胞和卵巢膜细胞,其活性的增加能够显著促进 TCs 中雄激素的生物合成和分泌^[21]。CYP17A1 启动子区翻译起始位点上游-34 位点的 T 突变为 C 被认为会增加 CYP17A1 基因的表达,进而导致雄激素的合成增加,这是由于突变增加了转录因子 Sp1 的结合位点所致^[22]。腺苷酸环化酶 8 (ADCY8)是一种膜结合酶,在高等脊椎动物中催化 ATP 形成 cAMP。研究表明,慢性输注人类情绪稳定剂卡马西平能够显著降低小鼠的回避行为,这是通过 ADCY8 活性发挥作用^[23]。此外,还有研究指出 ADCY8 可以促进接

受型子宫内膜的形成,在子宫内膜容受性发育中起重要作用^[24]。鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(GNAS)复合位点能产生多个选择性剪接转录本,GNAS 复合位点的转录本以组织特异性的方式被印迹,它与牛的胴体性状、产奶量和生殖性状存在显著相关性^[25]。在猪上,有研究证实了 GNAS 编码多个印迹或双等位基因表达的转录本^[26]。在人类中,GNAS 复合位点编码片段的突变会导致严重的内分泌疾病,如假性甲状腺机能亢进和垂体肿瘤^[27]。ADCY3 通过催化信号分子 cAMP 的形成以响应 G 蛋白信号。Baxendale 等^[28]研究表明,减数分裂后的生殖细胞可以产生 ADCY3 蛋白。敲除小鼠 ADCY3 后发现其是嗅觉丧失,还会导致雄性小鼠精子活力不足,进而导致不育^[29]。在雌性动物中,ADCY3 参与了卵母细胞减数分裂信号通路。骨形态发生蛋白 6 (BMP6)是 TGF-akt 通路中的一员,BMP6 可以抑制 cAMP 的产生,从而导致 STAR 和 P450_{scc} mRNA 的水平降低,却不影响芳香化酶 mRNA 水平,使孕激素水平显著下降^[30]。牛卵泡内 GCs 和 TCs 在激素的调控下有序的进行增殖、分化,与其相关的基因也在不同时空准确表达。优势卵泡 GCs 和 TCs 协同合成雌激素与抑制素,抑制促卵泡素 (FSH)的分泌,导致其他卵泡的发育受阻,最终走向闭锁^[31]。本研究通过对 GEO 数据库 GSE83524 RNA-seq 表达谱进行分析,共获得 247 个差异表达基因,其中 43 个表达上调,204 个表达下调。通过对所有差异表达基因进行 GO、KEGG 信号通路及 PPI 网络互作分析,共筛选出 ADCY3、CYP17A1、ADCY8、GNAS、BMP6 5 个在卵巢中参与类固醇激素合成的基因,Real-time PCR 验证分析结果显示这 5 个基因在 GCs 和 TCs 中的表达趋势与 GEO 芯片数据结果一致。因此推测这 5 个基因在牛优势卵泡 GCs 和 TCs 中对生殖激素的合成及分泌起了重要作用,为进一步研究其在生殖激素合成及分泌过程中的调控机理奠定基础。

4 结 论

本研究在牛优势卵泡 GCs 与 TCs 中获得 247 个差异表达基因,其中 43 个基因表达上调,204 个基因表达下调。通过 GO 功能富集、KEGG 信号通路分析及 PPI 网络互作分析,筛选出 5 个与牛卵泡中类固醇激素合成相关的基因,其中 CYP17A1、ADCY8、ADCY3、BMP6 在 TCs 中的表达量均显著高于 GCs,GNAS 在 GCs 中的表达量极显著高于

TCs,因此推测这 5 个基因在牛优势卵泡 GCs 和 TCs 中对生殖激素的合成及分泌起了重要作用。

[参考文献]

- [1] Muraly P, Xingzi G, John D, et al. Developmental programming: sheep granulosa and theca cell-specific transcriptional regulation by prenatal testosterone [J]. *Endocrinology*, 2020, 161(8):1-52.
- [2] 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 & Cellular Endocrinology*, 2017, 439:379-394.
- [3] Folger J K, Jimenez-Krassel F, Ireland J J, et al. 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]. *Biol Reprod*, 2013, 89(6):1-8.
- [4] Matsuda M F, Inoue N, Goto Y, et al. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules [J]. *J Reprod Dev*, 2006, 52(6):695-705.
- [5] Young J M, McNeilly A S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle [J]. *Reproduction*, 2010, 140(4):489-504.
- [6] Edson M A, Nagaraja A K, Matzuk M M. The mammalian ovary from genesis to revelation [J]. *Endocrine Reviews*, 2009, 6:624-712.
- [7] 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.
- [8] Bonnet A, Bevilacqua C, Benne F, et al. Transcriptome profiling of sheep granulosa cells and oocytes during early follicular development obtained by laser capture microdissection [J]. *BMC Genomics*, 2011, 417(12):1-15.
- [9] 孟金柱. 牛卵泡发育相关基因表达的研究 [D]. 山西太谷: 山西农业大学, 2014.
- [10] Meng J Z. Research of genes expression may associate with bovine follicular development [D]. Taigu, Shanxi: Shanxi Agricultural University, 2014.
- [11] Orisaka M, Tajima K, Tsang B K, et al. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2009, 2(1):1-7.
- [12] Sirotkin A V. Cytokines: signalling molecules controlling ovarian functions [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(6):857-861.
- [13] Tajima K, Orisaka M, Mori T, et al. Ovarian theca cells in follicular function [J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2007, 15(5):591-609.
- [14] Wang H, Andoh K, Hagiwara H, et al. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(11):4930-4936.
- [15] Liu X, Qiao P, Jiang A, et al. Paracrine regulation of steroido-

- genesis in theca cells by granulosa cells derived from mouse preantral follicles [J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015:1-8.
- [15] Khan D R, Fournier E, Dufort I, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in granulosa cells during folliculogenesis [J]. *Reproduction*, 2016, 151(6):R103.
- [16] Yang M, Wang L, Wang X, et al. IL-6 promotes FSH-induced VEGF expression through JAK/STAT3 signaling pathway in bovine granulosa cells [J]. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 2017, 44:293-302.
- [17] Lainé A L, Lachie C, Furlong J, et al. A bovine-specific FSH enzyme immunoassay and its application to study the role of FSH in ovarian follicle development during the postnatal period [J]. *Animal*, 2019, 13(8):1666-1675.
- [18] Ryan K E, Glister C, Lonergan P, et al. Functional significance of the signal transduction pathways Akt and Erk in ovarian follicles; *in vitro* and *in vivo* studies in cattle and sheep [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2008, 1(1):2-2.
- [19] Tajima K, Orisaka M, Mori T, et al. Ovarian theca cells in follicular function [J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2007, 15(5):591-609.
- [20] Gilep A A, Sushko T A, Usanov S A. At the crossroads of steroid hormone biosynthesis; the role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17 [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, 1814(1):200-209.
- [21] Goodarzi M O. Association study of CYP17 and HSD11B1 in polycystic ovary syndrome utilizing comprehensive gene coverage [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2012, 18(6):320-324.
- [22] Kaur R, Kaur T, Kaur A. Genetic association study from North India to analyze association of CYP19A1 and CYP17A1 with polycystic ovary syndrome [J]. *Journal of Assisted Reproduction & Genetics*, 2018, 35(6):1123-1129.
- [23] Malsen M V, Lith H A V, Oppelaar H, et al. Interspecies trait genetics reveals association of Adcy8 with mouse avoidance behavior and a human mood disorder [J]. *Biological Psychiatry*, 2009, 66(12):1123-1130.
- [24] Zhang L, An X P, Liu X R, et al. Characterization of the transcriptional complexity of the receptive and pre-receptive endometria of dairy goats [J]. *Entific Reports*, 2015, 5(1):1-18.
- [25] Sikora K M, Magee D A, Berkowicz E W, et al. DNA sequence polymorphisms within the bovine guanine nucleotide-binding protein Gs subunit alpha (Gs α)-encoding (GNAS) genomic imprinting domain are associated with performance traits [J]. *BMC Genetics*, 2011, 12(1):4.
- [26] Oczkowicz M, Agata P K, Ropka-Molik K, et al. Expression and imprinting analysis of the *NESP55* gene in pigs [J]. *Gene Expression Patterns*, 2012, 12(1-2):18-23.
- [27] Plagge A, Kelsey G, Germain-Lee E L. Physiological functions of the imprinted *Gnas* locus and its protein variants *Gas* and *XLas* in human and mouse [J]. *Journal of Endocrinology*, 2008, 196(2):193-214.
- [28] Baxendale R W, Fraser L R. Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa [J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 66:181-189.
- [29] Livera G, Xie F, Garcia M A, et al. Inactivation of the mouse adenylyl cyclase 3 gene disrupts male fertility and spermatozoan function [J]. *Molecular Endocrinology*, 2018, 5:1277-1290.
- [30] Otsuka F, Moore R K, Shimasaki S. Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(35):32889-32895.
- [31] Vitale A M, Gonzalez O M, Parborell F, et al. Inhibin a increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats [J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 67(6), 1989-1995.