

陆婷婷, 邹娴, 杨镇玮, 等. 基于高通量测序的山羊卵巢基质、卵泡转录组分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 23-32.
LU Tingting, ZOU Xian, YANG Zhenwei, et al. Transcriptome analysis of goat ovaries and follicles based on high-throughput sequencing[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(2): 23-32.

基于高通量测序的山羊卵巢基质、卵泡转录组分析

陆婷婷^{1†}, 邹 娴^{1,2†}, 杨镇玮¹, 雷 放¹, 陈奕业¹,
柳广斌¹, 孙宝丽¹, 刘德武¹, 李耀坤¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院 动物科学研究所/畜禽育种
国家重点实验室/广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】比较山羊 *Capra hircus* 卵巢基质、大卵泡和小卵泡间的 mRNA 表达图谱, 为探究卵泡发育机制提供一定的研究基础。【方法】采用高通量测序技术对发情期川中黑山羊的卵巢基质、大卵泡和小卵泡进行转录组测序, 利用生物信息学方法检测 mRNA 表达谱, 筛选差异基因, 对其进行 GO 和 KEGG 通路分析, 最后随机抽取 5 个差异基因进行荧光定量 PCR 验证。【结果】卵巢基质 vs 大卵泡、卵巢基质 vs 小卵泡和小卵泡 vs 大卵泡的差异表达基因分别为 524、180 和 403 个。筛选出 *INHA*、*TNFRSF19* 等 15 个与卵泡发育相关的基因, 其主要富集在内质网蛋白质加工、类固醇生物合成、卵母细胞减数分裂等信号通路。通过 qRT-PCR 验证, 定量结果与测序结果基本一致。【结论】川中黑山羊卵巢基质、大卵泡和小卵泡的基因表达模式不同, 小卵泡与卵巢基质的基因表达模式更相近。

关键词: 山羊; 卵巢基质; 卵泡; 转录组; 高通量测序
中图分类号: S827 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)02-0023-10

Transcriptome analysis of goat ovaries and follicles based on high-throughput sequencing

LU Tingting^{1†}, ZOU Xian^{1,2†}, YANG Zhenwei¹, LEI Fang¹, CHEN Yiye¹,
LIU Guangbin¹, SUN Baoli¹, LIU Dewu¹, LI Yaokun¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Animal
Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding/
Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition Research, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 【Objective】To compare the expression profiles of mRNA among ovarian stroma, large follicles and small follicles of goat (*Capra hircus*), and lay a foundation for exploring the mechanism of follicular development. 【Method】High-throughput sequencing technology was used to sequence the transcriptome of ovarian stroma, large follicles and small follicles in Chuanzhong black goats during estrus. The expression profiles of mRNA were detected by bioinformatics, and the differentially expressed genes were screened out. The GO and KEGG pathways of differentially expressed genes were analyzed. Finally, five differentially expressed genes were randomly selected and were verified by fluorescence quantitative PCR. 【Result】The differentially expressed genes of ovarian stroma vs large follicles, ovarian stroma vs small follicles and small follicles vs large follicles were 524, 180 and 403, respectively. Fifteen genes related to follicular development, such as *INHA* and *TNFRSF19*, were screened.

收稿日期: 2019-05-05 网络首发时间: 2020-01-07 11:39:19
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20200106.0923.032.html>
作者简介: 陆婷婷 (1996—), 女, 硕士研究生, E-mail: tingtinglu18@163.com; 邹 娴 (1985—), 女, 博士研究生, E-mail: zouxian08@163.com; †对本文贡献相同; 通信作者: 李耀坤 (1986—), 男, 副教授, 博士, E-mail: ykli@scau.edu.cn
基金项目: 广东省教育厅青年创新人才项目 (2017KQNCX014); 广东省公益研究与能力建设项目 (2017B020201014, 2017A020208050)

They were mainly involved in endoplasmic reticulum protein processing, steroid biosynthesis, oocyte meiosis signaling pathway and so on. Quantitative results were basically consistent with sequencing results verified by qRT-PCR. 【Conclusion】 The gene expression profiles of ovarian stroma, large follicles and small follicles in Chuanzhong black goats are different, and the gene expression patterns of small follicles and ovarian stroma are relative more similar.

Key words: goat; ovarian stroma; follicle; transcriptome; high-throughput sequencing

山羊 *Capra hircus* 繁殖力影响养羊业的经济效应, 受遗传、营养、管理水平等因素影响, 是复杂的数量性状。母羊的产羔数是山羊繁殖性能之一, 由排卵数决定, 主要受遗传因素影响, 与卵泡发育息息相关^[1]。卵泡发育是一个极其复杂的过程, 在发育过程中绝大多数卵泡会闭锁, 只有少数卵泡能成熟并排卵^[2-3]。

目前, 关于整个卵巢的研究越来越多^[4-5], 但卵巢作为一个动态发育的生殖器官, 包含不同发育阶段的卵泡, 如原始卵泡、生长卵泡、成熟卵泡等。因此, 在研究卵巢时, 有必要对其细分后再开展研究。Terenina 等^[6]对猪卵巢健康小卵泡和闭锁小卵泡转录组的研究发现 *CCDC80*、*GADD45A*、*ZNF628* 等基因在闭锁小卵泡中的表达量超过健康小卵泡 5 倍, 认为可能是卵泡闭锁的标志基因。Zhang 等^[7]在猪健康卵泡和早期闭锁卵泡的转录组研究中发现 450 个显著差异表达基因。李鹏飞等^[8-9]对牛的优势卵泡和从属卵泡进行转录组测序发现差异显著的 *PRSS35*、*PTGRF* 和 *ARID4B* 等基因与卵泡发育相关。Hatzirodos 等^[10]在牛健康大卵泡和健康小卵泡的转录组研究中发现, 在大卵泡中 *STAT4* 和 *XBPI* 基因表达上调, *MGEA5* 基因下调; 而 *KIT*、*IHH* 和 *MEST* 基因在小卵泡中最为活跃。吴阳升等^[11]通过分析绵羊小卵泡和中卵泡转录组发现, 在中卵泡表达上调的基因有 *IGFBP1*、*INHBA* 和 *TIMP1* 等, 下调的有 *C-FOS*、*EGRI*、*FOSB* 等。综上, 猪、牛和绵羊不同发育阶段卵泡的基因表达模式不同, 然而山羊的卵泡转录组研究以及卵巢基质和卵泡之间的基因表达模式鲜见报道。

川中黑山羊是我国优秀的地方山羊品种^[12], 经过长期的自然和人工选择, 繁殖性能突出, 遗传性能稳定, 母羊平均产羔率为 236.78%, 羔羊成活率为 91%^[13]。目前对川中黑山羊繁殖性能的研究较少。转录组包括编码 RNA 和非编码 RNA, 指在某一特定条件下细胞或组织内所有转录产物的总和, 从整体水平研究基因结构和功能^[14]。转录组测序是通过高通量测序技术, 对生物体全部基因的测序,

反映生命体处于不同环境条件下的不同基因表达水平及调控模式^[15]。本研究以发情期的川中黑山羊为研究对象, 应用高通量测序技术对卵巢基质、大卵泡和小卵泡进行转录组测序, 比较分析三者的转录水平差异, 探索卵巢基质、大卵泡和小卵泡间的 mRNA 表达模式。旨在从转录组水平揭示卵巢不同部位的遗传差异, 丰富山羊卵巢基质、大卵泡和小卵泡的转录组数据信息, 筛选出的基因可为山羊卵泡发育提供一定的基因资源和新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 试验动物和样品采集

选用南方某种羊场 10 头健康的川中黑山羊母羊, 年龄 3.5~4.5 岁。采用前列腺素 1 次注射法对每只母羊注射氯前列烯醇 0.1 mg, 24 h 后第 1 次发情, 18 d 后确认第 2 次发情, 采用公羊试情法确认母羊是否发情, 以母羊摇尾、站立并接受爬跨视为发情^[16-19]。发情后 24 h 内进行屠宰并采集卵巢。

卵巢用 PBS 缓冲液洗 3 次, 分离小卵泡 (Small follicle, SF, $d<3$ mm)、大卵泡 (Large follicle, LF, $d>1$ cm) 和卵巢基质, 各 6 个重复组, 其中 1 个小卵泡样本包含 8~10 个小卵泡, 1 个大卵泡样本仅包含 1 个大卵泡, 连同分离后的卵巢基质放入冻存管, 立即置于液氮中, 带回实验室于 -80°C 冰箱保存, 用于后续试验。试验所得的卵巢基质样品中有少量 $d<3$ mm 的小卵泡, 所有 $d>1$ cm 的大卵泡已分离出来。

1.2 总 RNA 抽提、cDNA 文库构建和转录组测序

将卵巢基质、大卵泡和小卵泡完全研磨, 用 Trizol 试剂提取总 RNA (Invitrogen, 美国)。通过 DanoDrop ND-2000 分光光度计 (Thermo Science, 美国)、10 g/L 琼脂糖凝胶分别检测 RNA 的浓度和纯度、完整性。每个样品取 3 μL 总 RNA, 构建 cDNA 文库, 利用 Illumina HiSeq 测序平台进行双末端测序。整个流程委托上海派森诺生物科技股份有限公司完成。

1.3 转录组数据分析

对测序数据采用 Cutadapt 软件去除 3'端的接

头, 去除的部分与接头有至少 10 bp 重叠 (AGATC GGAAG), 允许 20% 碱基错配; 去除平均占比低于 Q20(碱基识别准确率在 99% 以上的碱基所占百分比) 的 Reads。通过 Bowtie2 软件 (GCF_001704415.1_ARSL1_genomic; <http://www.ensembl.org/>) 建立参考基因组索引, 使用 Tophat2 软件的 microexon-search 和 library-type=fr-firststrand 参数将过滤后的 Reads 比对到参考基因组上, 默认 Reads 和参考基因组序列的碱基错配在 2 个之内即为比对成功。采用 R 语言 DESeq 程序包对差异基因进行筛选, 条件为: $|\log_2$ 表达差异倍数 >1 , 显著性 $P<0.05$, 至少有 4 个样品的 FPKM(每百万 Reads 中来自某一基因每千碱基长度的 Reads 数目, Fragments per kilobase per million of reads) 大于 1。通过 R 语言 Pheatmap 软件包对所有基因和样品进行双向聚类分析。

1.4 差异基因功能注释

利用 Gene ontology(GO) 数据库对所有差异基因进行注释, 通过 Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) 数据库对差异基因进行通路分析, 采用超几何分布计算差异基因显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路, $P<0.05$ 为显著富集。

1.5 qRT-PCR 验证分析

从差异基因中随机选择 5 个基因, 利用 qRT-PCR 进行转录组表达谱验证分析, PCR 反应体系 10 μ L: 5 μ L SYBR® Green Master Mix, 上下游引物各 0.5 μ L, 1 μ L cDNA 和 3 μ L ddH₂O。反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 30 s, 58 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 34 个循环。引物设计参考 NCBI 的山羊相关基因序列, β -actin 作为内参基因, 用 Primer 5.0 软件设计, 并送 Sangon Biotech 合成引物 (表 1)。

表 1 用于 qRT-PCR 检测的基因引物
Table 1 Gene primers for qRT-PCR detection

基因	引物序列(5'→3')	扩增长度/bp
Gene	Primer sequence	Product length
CYP19A1	F: CCGAAGTTGTGCCTATTGC	101
	R: GCTGGGACCTGGTATTGAG	
INHBA	F: CATGTGGGAAAAGTGGGGGA	146
	R: TCAAAGTGCAGCGTCTTCCT	
KITLG	F: CATTTATCTTCAACTGCTCCTA	191
	R: CCACCATCTCGCTTATCC	
SERP1	F: GTCTTCCTGTGCTCGCTCTTC	268
	R: CGATTATGGCTTCCGATTTC	
GPNMB	F: CCTGTCTTTGCCTTCAC	230
	R: AAATCCACCAGGGAGTCGT	
β -actin	F: TGCTTCTAGCGGACTGATT	106
	R: TACAATCAAAGTCCTCGGCCAC	

1.6 数据统计分析

试验数据用 SPSS 22.0 统计软件分析, 通过独立样本 t 检验来进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 测序数据质控

将本研究所得的测序数据经过质量控制, 对 Clean reads 进行碱基含量分布和碱基质量分布统计, Q30(碱基识别准确率在 99.9% 以上的碱基所占百分比) 在 91% 以上, 测序数据与山羊的数据库序列相似性在 83% 以上 (表 2)。综合表明测序数据质量好, 满足后续分析的要求。

2.2 差异基因筛选

测序结果分析表明, 卵巢基质和大卵泡之间显著差异表达的基因总数为 524 个, 其中显著上调的有 238 个, 显著下调的有 286 个; 卵巢基质和小卵

表 2 测序数据质控
Table 2 Quality control of sequencing data

样品 ¹⁾	有效测序量	有效测序的占比/%	Q30 ²⁾ /%	样品 ¹⁾	有效测序量	有效测序的占比/%	Q30 ²⁾ /%
Sample	No. of clean reads	Ratio of clean reads		Sample	No. of clean reads	Ratio of clean reads	
O1	105 953 656	99.68	94.28	LF1	104 768 836	99.62	94.23
O2	102 197 046	99.34	92.71	LF2	100 396 168	99.70	94.85
O3	105 678 158	99.41	92.86	LF3	104 879 676	99.48	94.15
O4	101 844 278	99.44	92.86	LF4	102 209 432	99.37	92.57
O5	107 096 856	99.32	91.31	LF5	100 346 902	99.75	93.86
O6	104 231 700	99.57	92.09	LF6	101 449 700	99.50	92.26
SF1	102 014 414	99.69	94.88	SF4	105 756 846	99.19	91.52
SF2	102 993 890	99.45	94.24	SF5	103 645 956	99.58	93.79
SF3	106 653 668	99.77	94.11	SF6	106 529 902	99.45	92.38

1) O: 卵巢基质; LF: 大卵泡; SF: 小卵泡; 2) 碱基识别准确率在99.9%以上的碱基所占百分比
1) O: Ovarian stroma; LF: Large follicle; SF: Small follicle; 2) Percentage of bases with base recognition accuracy above 99.9%

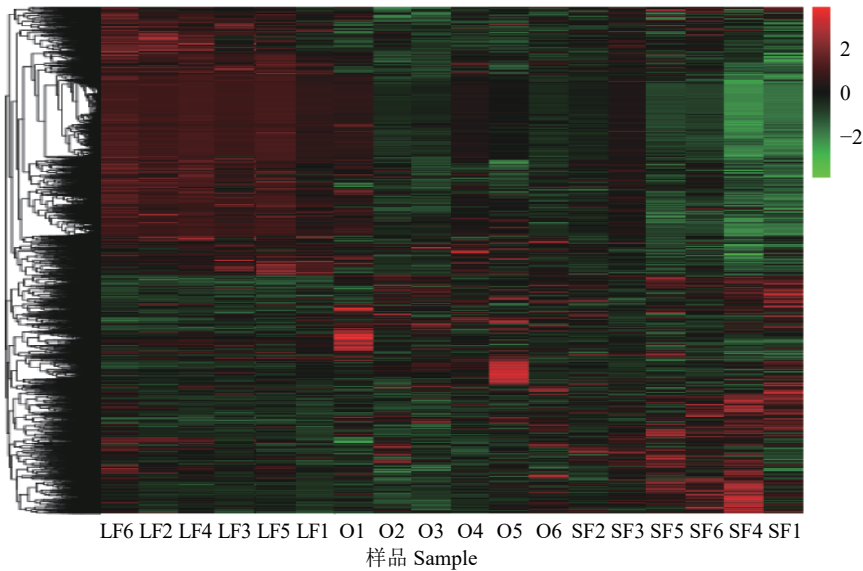
泡之间显著差异表达的基因总数为 180 个, 其中显著上调的有 25 个, 显著下调的有 155 个; 大卵泡和小卵泡之间显著差异表达的基因总数为 403 个, 其中显著上调的有 281 个, 显著下调的有 122 个。结合近年哺乳动物中与卵泡发育相关的基因的报道^[6, 20-33], 我们发现本试验中 15 个差异表达的基因可能与卵泡发育相关, 包括 *INHA*、*INHBA*、*CYP19A1*、*MGST1*、*BEX2*、*APOA1*、*APOA2*、*MMP15*、*CITED1*、*PRSS23*、*LRP8*、*ADAMTS1*、*SPARCL1*、*TNFRSF1B* 和 *TNFRSF19*。按照 *P* 值大小筛选排名

前 10 的差异表达基因, 再根据差异倍数从大到小进行排序^[34-35], 结果如表 3 所示。通过聚类图 (图 1) 发现, 卵巢基质、大卵泡和小卵泡各样本的基因分别聚类在一起, 且同一组几个不同样本聚类在同一个簇中。此外, 卵巢基质与小卵泡间差异基因的数量最少, 且大部分基因表达量相似 (图 1), 推测小卵泡和卵巢基质间的表达模式较为相似。大卵泡与卵巢基质、小卵泡的差异表达基因数量较多, 且表达量相差较大, 推测大卵泡与卵巢基质、小卵泡的基因表达模式差异较大。

表 3 不同卵巢部位间排名前 10 位的差异表达基因
Table 3 Top ten differentially expressed genes among different parts of ovary

项目 ¹⁾	基因	log ₂ (FC) ²⁾	<i>P</i>	项目 ¹⁾	基因	log ₂ (FC) ²⁾	<i>P</i>	项目 ¹⁾	基因	log ₂ (FC) ²⁾	<i>P</i>
Item	Gene			Item	Gene			Item	Gene		
O vs LF	<i>EVI2A</i>	1.69	3.45×10 ⁻⁶	O vs SF	<i>KCTD12</i>	1.57	1.52×10 ⁻³	LF vs SF	<i>GLI1</i>	2.13	1.22×10 ⁻⁶
	<i>IRF2BP2</i>	1.24	5.84×10 ⁻⁷		<i>CFD</i>	1.43	3.02×10 ⁻⁴		<i>SLC25A34</i>	1.57	5.72×10 ⁻⁶
	<i>PNRC1</i>	1.16	8.06×10 ⁻⁶		<i>PTCH2</i>	-2.23	2.59×10 ⁻³		<i>PRRT2</i>	1.35	2.55×10 ⁻⁵
	<i>GPR21</i>	1.06	6.22×10 ⁻⁶		<i>GDF5</i>	-1.84	1.99×10 ⁻³		<i>PPMIJ</i>	1.34	3.08×10 ⁻⁵
	<i>TMEM176B</i>	-1.86	1.27×10 ⁻⁵		<i>GLI1</i>	-1.48	3.80×10 ⁻⁴		<i>TNRC6C</i>	1.24	2.21×10 ⁻⁵
	<i>RDH11</i>	-1.50	1.84×10 ⁻⁶		<i>EMID1</i>	-1.32	4.01×10 ⁻⁴		<i>EFNB3</i>	1.10	2.00×10 ⁻⁵
	<i>MINOS1</i>	-1.37	6.17×10 ⁻⁶		<i>MYCL</i>	-1.30	3.35×10 ⁻⁴		<i>EFS</i>	1.07	3.58×10 ⁻⁵
	<i>MPDU1</i>	-1.09	1.09×10 ⁻⁵		<i>DPEP3</i>	-1.26	1.47×10 ⁻³		<i>ADGRL1</i>	1.04	1.63×10 ⁻⁵
	<i>NME1</i>	-1.06	1.01×10 ⁻⁵		<i>DPEP2</i>	-1.23	1.68×10 ⁻³		<i>KITLG</i>	-1.85	1.34×10 ⁻⁵
	<i>ARL2BP</i>	-1.05	3.12×10 ⁻⁶		<i>CNRIP1</i>	-1.20	1.81×10 ⁻³		<i>TMEM176B</i>	-1.49	3.67×10 ⁻⁵

1) O: 卵巢基质; LF: 大卵泡; SF: 小卵泡; 2) FC: 表达差异倍数
1) O: Ovarian stroma; LF: Large follicle; SF: Small follicle; 2) FC: Expression fold-change



O: 卵巢基质; LF: 大卵泡; SF: 小卵泡; 图例右侧的数字为基因表达上调或下调的倍数
O: Ovarian stroma; LF: Large follicle; SF: Small follicle; Numbers by the legend are expression fold-changes for up- or down-regulated genes

图 1 不同卵巢部位间差异表达基因的聚类图
Fig. 1 Cluster analysis of differentially expressed genes among different parts of ovary

2.3 共有的差异表达基因

在卵巢基质 vs 大卵泡、卵巢基质 vs 小卵泡、小卵泡 vs 大卵泡这 3 组中有 4 个共有的差异表达基因; 卵巢基质 vs 大卵泡、卵巢基质 vs 小卵泡之间有 73 个共有的差异表达基因; 卵巢基质 vs 大卵泡、小卵泡 vs 大卵泡之间有 186 个共有的差异表达基因; 卵巢基质 vs 小卵泡、小卵泡 vs 大卵泡之间有

29 个共有的差异表达基因。

2.4 差异表达基因的生物学功能分析

基于 GO 数据库, 对差异基因进行功能分类, 各功能分类下差异前 10 位的 GO 条目如表 4、表 5 和表 6 所示。在卵巢基质 vs 大卵泡 (表 4) 中有 15 个 GO 条目显著富集 ($P<0.05$), 包括催化活性、细胞质、细胞膜、细胞内膜结合细胞器、转移酶活性

表 4 卵巢基质 vs 大卵泡部分差异表达基因的 GO 功能分类

Table 4 GO functional classification of partial differentially expressed genes in ovarian stroma vs large follicle			
分类 Category	条目 Term	基因数目 Gene count	<i>P</i>
生物学过程 Biological process	RNA加工过程 RNA processing	5	2.70×10^{-2}
	细胞组分 Cellular component		
细胞组分 Cellular component	细胞 Cell	66	1.90×10^{-2}
	细胞部分 Cell part	65	2.40×10^{-2}
	细胞内部 Intracellular	63	1.70×10^{-3}
	细胞内的部分 Intracellular part	55	6.00×10^{-3}
	细胞质 Cytoplasm	39	9.80×10^{-4}
	细胞内膜结合细胞器 Intracellular membrane-bounded organelle	36	2.50×10^{-2}
	膜结合细胞器 Membrane-bounded organelle	36	2.50×10^{-2}
	细胞质部分 Cytoplasmic part	28	2.80×10^{-2}
	分子功能 Molecular function		
分子功能 Molecular function	催化活性 Catalytic activity	51	8.20×10^{-4}
	磷酸核苷结合 Nucleotide phosphate binding	22	4.60×10^{-2}
	核苷酸结合 Nucleotide binding	22	4.60×10^{-2}
	转移酶活性 Transferase activity	21	1.50×10^{-2}
	转移酶活性(转移含磷基团)	12	2.70×10^{-2}
	Transferase activity (Transferring phosphorus-containing groups)		
	异构酶活性 Isomerase activity	5	2.00×10^{-2}

表 5 卵巢基质 vs 小卵泡部分差异表达基因的 GO 功能分类

Table 5 GO functional classification of partial differentially expressed genes in ovarian stroma vs small follicle			
分类 Category	条目 Term	基因数目 Gene count	<i>P</i>
生物学过程 Biological process	初级代谢过程 Primary metabolic process	13	4.70×10^{-2}
	细胞对应激的反应 Cellular response to stress	4	4.40×10^{-2}
分子功能 Molecular function	小分子结合 Small molecule binding	12	2.30×10^{-4}
	碳水化合物衍生物结合 Carbohydrate derivative binding	11	2.50×10^{-4}
	核苷酸结合 Nucleotide binding	11	5.90×10^{-4}
	磷酸核苷结合 Nucleoside phosphate binding	11	5.90×10^{-4}
	核糖核苷结合 Ribonucleoside binding	10	6.00×10^{-4}
	核苷结合 Nucleoside binding	10	6.00×10^{-4}
	嘌呤核苷三磷酸结合 Purine ribonucleoside triphosphate binding	10	6.00×10^{-4}
	嘌呤核苷结合 Purine nucleoside binding	10	6.00×10^{-4}
	嘌呤核糖核苷结合 Purine ribonucleoside binding	10	6.00×10^{-4}
	核糖核苷酸结合 Ribonucleotide binding	10	6.70×10^{-4}

等。在卵巢基质 vs 小卵泡 (表 5) 中有 25 个 GO 条目显著富集 ($P<0.05$), 包括小分子结合、碳水化合物衍生物结合、核苷酸结合、磷酸核苷结合、嘌呤核苷三磷酸结合等。在小卵泡 vs 大卵泡 (表 6) 中有 64 个 GO 条目显著富集 ($P<0.05$), 包括细胞过程、细胞内部、线粒体部分、嘌呤核苷酸结合等。

基于 KEGG 数据库的通路富集分析 (各组对比项目中前 10 位的信号通路见表 7), 在卵巢基质

vs 大卵泡中差异表达基因涉及 55 条通路, 显著富集的通路有 46 个 ($P<0.05$), 包括氧化磷酸化、代谢途径、内质网蛋白质加工、柠檬酸循环、类固醇生物合成等。在卵巢基质 vs 小卵泡中差异表达基因涉及 27 条通路, 显著富集的通路有 17 个 ($P<0.05$), 包括细胞周期、错配修复、DNA 复制、卵母细胞减数分裂、RNA 转运、孕酮介导的卵母细胞成熟等。在小卵泡 vs 大卵泡中差异表达基因涉及 42 条通路,

表 6 小卵泡 vs 大卵泡部分差异表达基因的 GO 功能分类
Table 6 GO functional classification of partial differentially expressed genes in small follicle vs large follicle

分类 Category	条目 Term	基因数目 Gene count	<i>P</i>
生物学过程 Biological process	细胞进程 Cellular process	73	3.40×10^{-2}
	有机环状化合物代谢过程 Organic cyclic compound metabolic process	31	1.70×10^{-2}
	有机氮化合物代谢过程 Organonitrogen compound metabolic process	17	3.80×10^{-2}
	有机磷代谢过程 Organophosphate metabolic process	10	1.60×10^{-2}
	含核苷的小分子代谢过程 Nucleobase-containing small molecule metabolic process	9	3.50×10^{-2}
	嘌呤核糖核苷代谢过程 Purine ribonucleoside metabolic process	8	2.00×10^{-2}
	嘌呤核苷代谢过程 Purine nucleoside metabolic process	8	2.00×10^{-2}
	核糖核苷代谢过程 Ribonucleoside metabolic process	8	2.00×10^{-2}
	糖基化合物代谢过程 Glycosyl compound metabolic process	8	2.90×10^{-2}
	核苷代谢过程 Nucleoside metabolic process	8	2.90×10^{-2}
细胞组分 Cellular component	细胞内 Intracellular	64	2.70×10^{-3}
	细胞质 Cytoplasm	35	2.80×10^{-2}
	细胞质部分 Cytoplasmic part	29	2.30×10^{-2}
	线粒体 Mitochondrion	14	9.20×10^{-4}
	线粒体部分 Mitochondrial part	10	5.20×10^{-3}
	细胞器膜 Organelle membrane	10	2.30×10^{-2}
	线粒体膜 Mitochondrial membrane	9	5.70×10^{-3}
	细胞器包膜 Organelle envelope	9	9.00×10^{-3}
	线粒体包膜 Mitochondrial envelope	9	9.00×10^{-3}
	囊膜 Envelope	9	9.00×10^{-3}
分子功能 Molecular function	磷酸核苷结合 Nucleoside phosphate binding	28	2.90×10^{-3}
	核苷酸结合 Nucleotide binding	28	2.90×10^{-3}
	嘌呤核苷酸结合 Purine nucleotide binding	25	2.10×10^{-3}
	嘌呤核苷结合 Purine nucleoside binding	24	3.30×10^{-3}
	嘌呤核苷三磷酸结合 Purine ribonucleoside triphosphate binding	24	3.30×10^{-3}
	嘌呤核糖核苷结合 Purine ribonucleoside binding	24	3.30×10^{-3}
	核苷结合 Nucleoside binding	24	3.30×10^{-3}
	核糖核苷结合 Ribonucleoside binding	24	3.30×10^{-3}
	嘌呤核糖核苷酸结合 Purine ribonucleotide binding	24	4.10×10^{-3}

表 7 卵巢基质、大卵泡和小卵泡部分差异表达基因的 KEGG 代谢通路

Table 7 KEGG metabolic pathway of partial differentially expressed genes in ovarian stroma, large follicle and small follicle

项目 ¹⁾	通路	数目	P
Item	Pathway	Count	
O vs LF	代谢途径 Metabolic pathway	298	4.90×10 ⁻¹⁷
	抗生素的生物合成 Antibiotic biosynthesis	79	1.30×10 ⁻¹⁴
	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	77	1.10×10 ⁻²²
	内质网蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	70	1.00×10 ⁻¹⁴
	泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis	34	6.30×10 ⁻³
	细胞周期 Cell cycle	32	7.30×10 ⁻³
	甲状腺激素信号通路 Thyroid hormone signaling pathway	29	5.00×10 ⁻³
	柠檬酸循环 Citrate cycle	17	2.20×10 ⁻⁶
	Notch信号通路 Notch signaling pathway	13	4.90×10 ⁻²
	类固醇生物合成 Steroid biosynthesis	12	1.90×10 ⁻⁴
O vs SF	癌症的途径 Pathway in cancer	28	3.20×10 ⁻²
	细胞周期 Cell cycle	25	4.50×10 ⁻⁹
	抗生素的生物合成 Antibiotic biosynthesis	17	4.00×10 ⁻²
	RNA转运 RNA transport	16	1.10×10 ⁻²
	嘌呤代谢 Purine metabolism	15	3.70×10 ⁻²
	卵母细胞减数分裂 Oocyte meiosis	13	8.30×10 ⁻³
	嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	11	1.30×10 ⁻²
	DNA复制 DNA replication	9	2.30×10 ⁻⁴
	孕酮介导的卵母细胞成熟 Progesterone-mediated oocyte maturation	9	4.30×10 ⁻²
	错配修复 Mismatch repair	8	8.90×10 ⁻⁵
SF vs LF	代谢途径 Metabolic pathway	248	5.60×10 ⁻⁴
	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	74	3.80×10 ⁻¹⁹
	内质网蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	67	6.00×10 ⁻¹²
	抗生素的生物合成 Antibiotic biosynthesis	54	7.80×10 ⁻⁴
	泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis	40	2.90×10 ⁻⁴
	甲状腺激素信号通路 Thyroid hormone signaling pathway	32	1.40×10 ⁻³
	AMPK信号通路 AMPK signaling pathway	32	8.70×10 ⁻³
	蛋白酶体 Proteasome	31	1.10×10 ⁻¹²
	Notch信号通路 Notch signaling pathway	15	1.50×10 ⁻²
	类固醇生物合成 Steroid biosynthesis	9	2.10×10 ⁻²

1) O: 卵巢基质; LF: 大卵泡; SF: 小卵泡
1) O: Ovarian stroma; LF: Large follicle; SF: Small follicle

显著富集的通路有 30 个 ($P<0.05$), 包括氧化磷酸化、蛋白酶体、内质网蛋白质加工等。

2.5 基因筛选及 qRT-PCR 验证分析

从 3 组差异基因中筛选 5 个基因, 分别是

CYP19A1 和 *INHBA*(卵巢基质 vs 大卵泡)、*GPNMB* (卵巢基质 vs 小卵泡)、*KITLG* 和 *SFRP1*(小卵泡 vs 大卵泡), 进行 qRT-PCR 验证 (图 2)。这些基因的表达变化趋势与测序结果基本一致, 说明测序结果可靠。

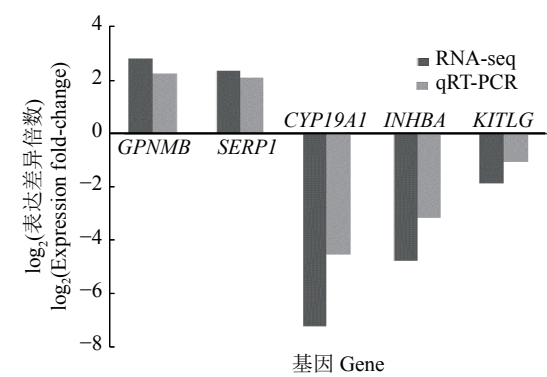


图 2 不同卵巢部位间差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 2 Quantitative identification of differentially expressed genes among different parts of ovary by qRT-PCR

3 讨论

山羊性成熟时,以卵泡波的形式募集卵泡,并使卵泡发育至成熟排卵^[36]。在形成有腔卵泡之前,卵泡的发育不受生殖激素调控,发育比较缓慢;在形成腔体时,性腺轴会分泌激素,促进卵泡发育或闭锁^[37-38]。山羊是单胎或二胎动物^[3],与人类相似,研究卵泡不同发育阶段的作用机制,山羊是较好的动物模型。

本研究采用高通量测序技术,首次对川中黑山羊的卵巢基质、大卵泡和小卵泡的 mRNA 表达量进行研究。结果表明卵巢基质、大卵泡和小卵泡的表达模式不同,其中卵巢基质和小卵泡的表达模式更相近,可能是因为在分离卵泡时,每个卵巢基质中 $d>1\text{ cm}$ 的大卵泡已分离出来,但不可避免的,卵巢基质中含有少量的 $d<3\text{ mm}$ 的小卵泡,从而造成卵巢基质和小卵泡的基因表达模式更相近。

通过差异基因分析,筛选出与其他哺乳动物卵泡发育或闭锁有关的基因,包括在大卵泡上调的抑制素基因家族、细胞色素 *P450* 家族 19 亚家族成员 1 (*CYP19A1*)、*MGST1*、*BEX* 家族、*APO* 家族、*MMP* 家族、*CITED* 家族、*PRSS23*、*LRP8*;在大卵泡下调的 *ADAMTS1*、*SPARCL1*、*TNFRSF* 家族。在猪^[6]和牛^[8,11]的研究中,抑制素基因家族在闭锁卵泡或小卵泡中低表达,通过负反馈调节抑制垂体分泌促卵泡激素,影响卵泡闭锁。*INHA* 和 *INHBA* 在牛大卵泡上调^[10],有助于卵泡膜产生雄激素并抑制垂体产生卵泡刺激素。*CYP19A1* 的过表达增加大窦状卵泡类固醇合成^[6-8],促进卵泡发育。谷胱甘肽代谢 *MGST1* 与细胞的代谢和解毒能力有关,其高表达可能表示健康卵泡的解毒能力更好^[39]。*BEX* 家族是 X 染色体连锁基因家族,*BEX2* 在小卵泡低表达,引起线粒体凋亡,使细胞周期阻滞于 G1 期,从而调控

颗粒细胞增殖和凋亡^[9,40-41]。载脂蛋白 *APOA1* 在中卵泡中高表达,可能参与了卵泡的选择及发育过程^[11]。基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMP) 家族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,可能与卵泡体积的快速增大有关^[11]。*ADAMTS1* 基因家族与膜外结构域的分裂有关,在小卵泡中表达上调^[9],在经产奶牛排卵前的卵泡中上调^[42]。*SPARCL1* 是 *SPARC* 家族一员,在小卵泡中高表达,阻滞细胞停留在 G1 期,抑制细胞增殖^[9,43]。但 *IGFBP5*、*IGF1*、*MMP9*、*PGRMC1* 等基因的表达量与其他研究报道的不一致。值得注意的是,在本研究中经典颗粒细胞凋亡标志物 TNF 受体超家族 (*TNFRSF1B*、*TNFRSF19*) 在大卵泡中下调^[8],与一些研究报道的无显著差异不同^[6-7]。

进一步对差异基因功能分析发现,卵巢基质 vs 大卵泡、卵巢基质 vs 小卵泡、小卵泡 vs 大卵泡三者富集的通路大不相同,其中,卵巢基质 vs 大卵泡、小卵泡 vs 大卵泡富集的通路较多,且有大部分是相同的;而卵巢基质 vs 小卵泡富集的通路较少,与其他 2 组差异较大。说明可能是大卵泡的生物学功能较为丰富。功能富集表明不同组织表现出不同的富集特征,核苷酸结合和磷酸核苷结合过程在 3 组中都共同富集,但在卵巢基质 vs 大卵泡中,特有的 GO 条目包括 RNA 加工过程、细胞质、细胞内膜、酶的催化活性等,可能是因为大卵泡阶段代谢过程比较旺盛,大卵泡与卵巢基质之间物质运输比较频繁。在卵巢基质 vs 小卵泡中特有的 GO 条目有细胞应激反应、初级代谢过程等,可能是因为小卵泡正处于初级发育阶段。在小卵泡 vs 大卵泡中特有的 GO 条目有线粒体和线粒体膜、细胞器内膜等,可能是因为卵泡发育过程主要受到线粒体膜的调控。

与卵巢基质相比,柠檬酸循环和类固醇生物合成信号通路在大卵泡中上调。柠檬酸循环保证机体能量供给和促进物质代谢^[44]。类固醇生物合成在卵泡发育中起着重要的作用^[45],例如类固醇合成快速调节蛋白 (Steroidogenic acute regulatory protein, STAR) 可介导胆固醇进入线粒体内膜,调控孕酮和雌激素的合成^[46-48],影响卵泡发育;健康卵泡中 *CYP19A1* 的上调,促进孕烯醇酮形成,孕烯醇酮是黄体酮 (Progesterone, P4) 和雌二醇 (Estradiol, E2) 的底物,可能是促进卵泡发育的主要因素^[7]。

在卵巢基质 vs 小卵泡中,差异基因富集的信号通路与细胞分裂周期有关。有研究^[49-50]报道,在小鼠卵泡发育阶段,细胞周期、DNA 复制和减数分裂等多个信号通路被激活,与本试验结果一致,可能在小卵泡阶段,卵母细胞发育上调了与细胞分裂相

关的信号通路。

在小卵泡 vs 大卵泡中, 差异基因富集的甲状腺激素信号通路、内质网蛋白质加工、AMPK 信号通路、类固醇生物合成和 Notch 信号通路在猪^[7]和牛^[10]的卵泡转录组研究中均有报道。内质网蛋白质加工和甲状腺激素信号通路的显著富集, 可能是因为随着卵泡发育, 颗粒细胞分化成熟, 甾体激素合成逐渐增强^[51-52], 物质代谢也因此增强。在人和大鼠的研究中发现^[53], 类固醇激素 (如孕酮) 与不同膜受体结合, 抑制颗粒细胞的有丝分裂或凋亡, 从而抑制卵泡发育或闭锁, 维持卵泡的平衡状态。关于绵羊的研究发现, Notch 信号通路调节细胞增殖、分化和凋亡, 参与卵巢基质卵泡的发育^[54]。

4 结论

卵巢基质、大卵泡、小卵泡的差异 mRNA 表达模式不相同, 其中卵巢基质与小卵泡更相近。就卵泡发育而言, 深入研究这些特异性 mRNA 在卵泡不同发育阶段的作用有着重要意义。本文从生物信息学角度分析卵巢不同组织表达谱, 为下一步差异基因的功能验证及其在卵泡发育中的作用提供一定的理论基础。

致谢: 感谢谢志全帮助分离小卵泡和大卵泡, 感谢赵智锋帮助分析转录组测序结果!

参考文献:

[1] CUI H X, ZHAO S M, CHENG M L, et al. Cloning and expression levels of genes relating to the ovulation rate of the Yunling black goat[J]. *Biol Reprod*, 2009, 80(2): 219-226.

[2] WANG X, ZOU P, HE Y, et al. Effect of luteinizing hormone on goat theca cell apoptosis and steroidogenesis through activation of the PI3K/AKT pathway[J]. *Anim Reprod Sci*, 2018, 190: 108-118.

[3] YANG D, JIANG T, LIN P, et al. Knock-down of apoptosis inducing factor gene protects endoplasmic reticulum stress-mediated goat granulosa cell apoptosis[J]. *Theriogenology*, 2017, 88: 89-97.

[4] ZI XD, LU J Y, ZHOU H, et al. Comparative analysis of ovarian transcriptomes between prolific and non-prolific goat breeds via high-throughput sequencing[J]. *Reprod Domest Anim*, 2018, 53(2): 344-351.

[5] LING YH, REN C H, GUO X F, et al. Identification and characterization of microRNAs in the ovaries of multiple and uniparous goats (*Capra hircus*) during follicular phase[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 339.

[6] TERENCE E, FABRE S, BONNET A, et al. Differentially expressed genes and gene networks involved in pig ovarian follicular atresia[J]. *Physiol Genomics*, 2017, 49(2): 67-80.

[7] ZHANG J, LIU Y, YAO W, et al. Initiation of follicular atresia: Gene networks during early atresia in pig ovaries[J]. *Reproduction*, 2018, 156(1): 23-33.

[8] 李鹏飞, 孟金柱, 景灵婕, 等. 转录组测序筛选牛卵泡发育相关基因及其表达差异分析[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(15): 187-195.

[9] 李鹏飞, 孟金柱, 谢建山, 等. PDF2 和 ODF1 转录组测序筛选牛卵泡发育相关基因[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(2): 300-309.

[10] HATZIRODOS N, IRVING-RODGERS H F, HUMMITZSCH K, et al. Transcriptome profiling of granulosa cells of bovine ovarian follicles during growth from small to large antral sizes[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 24.

[11] 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.

[12] 江昱, 王杰, 金鑫燕. 不同四川黑山羊品种 mtDNA-loop 区遗传多样性分析[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(27): 15052-15054.

[13] 杨新月, 周多恩, 李斌, 等. 湖羊和川中黑山羊 *GDF9*、*BMPR-IB*、*GnRHR* 基因多态性及其与产羔数的关联分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(15): 106-110.

[14] 王丽华. DBP 降解菌 DNB-S1 转录组学研究及功能基因的筛选[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.

[15] 邓素芳. 基于 RNA-Seq 的野生蕉 (*Musa itinerans*) 果皮颜色差异形成的分析机制研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2018.

[16] 尹修远, 王建, 李拥军, 等. 同期发情技术在绵羊生产上的应用[J]. *当代畜牧*, 2018(30): 18-20.

[17] 谭晓山, 王燕, 皇甫江云, 等. 山羊发情控制技术[J]. *贵州畜牧兽医*, 2017, 41(6): 27-29.

[18] 吕永锋, 任茂源, 郭彬彬, 等. 舍饲陇东绒山羊同期发情及繁殖性状的研究[J]. *中国草食动物科学*, 2018, 38(6): 71-72.

[19] 王珂, 于轩, 任茂源, 等. 不同受体羊同期发情及胚胎移植效果的研究[J]. *畜牧兽医杂志*, 2018, 37(6): 1-3.

[20] LI W, LI C, CHEN S, et al. Effect of inhibin A on proliferation of porcine granulosa cells in vitro[J]. *Theriogenology*, 2018, 114: 136-142.

[21] HATZIRODOS N, HUMMITZSCH K, IRVING-RODGERS H F, et al. Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 40.

[22] CHOI H, RYU K Y, ROH J. Kruppel-like factor 4 plays a role in the luteal transition in steroidogenesis by down-regulating Cyp19A1 expression[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 316(6): E1071-E1080.

[23] 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.

[24] OGIWARA K, TAKAHASHI T. Nuclear progesterin receptor phosphorylation by Cdk9 is required for the expression of Mmp15, a protease indispensable for ovulation in medaka[J]. *Cells*, 2019, 8: 215. doi: 10.3390/cells8030215.

- [25] MAZZONI G, SALLEH S M, FREUDE K, et al. Identification of potential biomarkers in donor cows for in vitro embryo production by granulosa cell transcriptomics[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175464.
- [26] DIAO H, XIAO S, LI R, et al. Distinct spatiotemporal expression of serine proteases Prss23 and Prss35 in periimplantation mouse uterus and dispensable function of Prss35 in fertility[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56757.
- [27] 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.
- [28] KIM K, BLOOM M S, FUJIMOTO V Y, et al. Variability in follicular fluid high density lipoprotein particle components measured in ipsilateral follicles[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2016, 33(3): 423-430.
- [29] SRIRAMAN V, SINHA M, RICHARDS J S. Progesterone receptor-induced gene expression in primary mouse granulosa cell cultures[J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(2): 402-412.
- [30] SAMIR M, GLISTER C, MATTAR D, et al. Follicular expression of pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha), interleukin 6(IL6) and their receptors in cattle: TNFalpha, IL6 and macrophages suppress thecal androgen production in vitro[J]. *Reproduction*, 2017, 154(1): 35-49.
- [31] MIAO X, LUO Q, ZHAO H, et al. Ovarian transcriptomic study reveals the differential regulation of miRNAs and lncRNAs related to fecundity in different sheep[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35299.
- [32] ZHENG Z G, XU H, SUO S S, et al. The essential role of H19 contributing to cisplatin resistance by regulating glutathione metabolism in high-grade serous ovarian cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26093.
- [33] OJIMA F, SAITO Y, TSUCHIYA Y, et al. Runx3 regulates folliculogenesis and steroidogenesis in granulosa cells of immature mice[J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 375(3): 743-754.
- [34] YAN Q, ZHENG D M, YU J S, et al. Comprehensive analysis of miRNA-mRNA-lncRNA networks in non-smoking and smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50: 1140-1153.
- [35] XIE L, YAO Z H, ZHANG Y, et al. Deep RNA sequencing reveals the dynamic regulation of miRNA, lncRNAs, and mRNAs in osteosarcoma tumorigenesis and pulmonary metastasis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 772.
- [36] 何冬倩. 山羊卵巢颗粒细胞中 chi-miR-130b-5p 的靶向基因研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- [37] 曹婧. Aurora B 及其 SUMO 修饰对小鼠卵泡发育和颗粒细胞生长的影响及调控机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [38] 程国虎. *CDC25C* 基因在成年山羊与幼年_省略_羊卵巢颗粒细胞中的表达及功能验证[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [39] BONNET A, LE CAO K A, SANCRISTOBAL M, et al. In vivo gene expression in granulosa cells during pig terminal follicular development[J]. *Reproduction*, 2008, 136(2): 211-224.
- [40] NADERI A, LIU J, BENNETT I C. BEX2 regulates mitochondrial apoptosis and G1 cell cycle in breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(7): 1596-1610.
- [41] 韩秋悦, 范颜会, 王雅丽, 等. BEX2 与 INI1/hSNF5 蛋白的相互作用及其在细胞周期中的功能鉴定[J]. *遗传*, 2012, 34(6): 711-718.
- [42] 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-R110.
- [43] CLAESKENS A, ONGENAE N, NEEFS J M, et al. Hevin is down-regulated in many cancers and is a negative regulator of cell growth and proliferation[J]. *Br J Cancer*, 2000, 82(6): 1123-1130.
- [44] 陈立兰. 三羧酸循环酶 CS 和 SDHB 对卵巢癌生物学行为和 mtDNA 的作用研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [45] MESTWERDT W. Follicular granulosa cells in relationship to steroid biosynthesis in the periovulation phase[J]. *Fortschr Med*, 1977, 95(6): 361-365.
- [46] STOCCO D M, ZHAO A H, TU L N, et al. A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 441: 7-16.
- [47] 毛宁. 香猪类固醇激素合成关键基因差异表达的分子机制研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2018.
- [48] 苗艳平, 刘若男, 魏彦辉, 等. 绵羊卵巢 oar-mir-150 靶向调节类固醇激素合成急性调节蛋白基因的表达[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(2): 234-245.
- [49] 周成杰. Centromere protein F 在小鼠卵母细胞减数分裂及早期胚胎发育过程中的功能研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2017.
- [50] 文佳. GSK-3 β 调控小鼠卵母细胞第一次减数分裂与原始卵泡形成机制的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [51] 曹俊国, 陈敏, 李文, 等. 哺乳动物卵泡发育调控分子机制研究进展[J]. *特产研究*, 2018, 40(4): 114-118.
- [52] 袁晓华, 张莉莉, 盛喜霞, 等. PGRMC1 介导孕酮抑制卵泡发育的作用及机制研究[J]. *海南医学*, 2019, 30(1): 1-5.
- [53] LODDE V, PELUSO J J. A novel role for progesterone and progesterone receptor membrane component 1 in regulating spindle microtubule stability during rat and human ovarian cell mitosis[J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(4): 715-722.
- [54] JING J, JIANG X, CHEN J, et al. Notch signaling pathway promotes the development of ovine ovarian follicular granulosa cells[J]. *Anim Reprod Sci*, 2017, 181: 69-78.