

廖妙容, 吴龙, 张爱玲, 等. 猪 *LPAR3* 基因克隆及其在子宫内膜细胞的表达[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(2): 31-39.
LIAO Miaorong, WU Long, ZHANG Ailing, et al. Cloning of porcine *LPAR3* gene and its expression in endometrial cells[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(2): 31-39.

猪 *LPAR3* 基因克隆及其在子宫内膜细胞的表达

廖妙容¹, 吴龙¹, 张爱玲², 钟玉宜¹, 温丽娟¹,
张豪¹, 袁晓龙¹, 李加琪¹, 张哲¹

(1 广东省农业基因组学与分子育种重点实验室/华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642;

2 广东第二师范学院生物与食品工程学院/广东高校应用生态工程技术开发中心, 广东广州 510303)

摘要:【目的】获得猪 *LPAR3* 基因完整 mRNA 及基因结构, 研究其启动子活性; 探究 *LPAR3* 基因在子宫内膜的转录调控及可能影响母猪产仔的机制。【方法】应用 5'RACE 和 3'RACE 技术获取 *LPAR3* 基因完整 mRNA 序列; 预测 5'调控区潜在的启动子转录因子结合位点及 CpG 岛, 构建不同长度的启动子双荧光素酶报告基因重组载体, 与 pRL-TK 质粒共同转染至猪子宫内膜细胞, 检测启动子活性; 应用 RT-qPCR 比较 *LPAR3* 基因在妊娠第 12 天的二花脸猪和长大二元猪子宫内膜的相对表达量; 应用亚硫酸氢钠修饰后测序比较 *LPAR3* 基因在妊娠第 12 天的二花脸猪和长大二元猪子宫内膜的甲基化状态。【结果】猪 *LPAR3* mRNA 全长为 2 127 bp, 其中 5'UTR 和 3'UTR 的长度分别为 202 和 860 bp, CDS 区为 1 065 bp。克隆获得包括 *LPAR3* 转录起始位点上游 3 080 bp (-2 430/+650 bp) 的 5'调控序列, 分析预测显示该调控区不存在 TATA box, 存在 GC 元件、CPBP 及糖皮质激素受体 IR3 等调控因子结合位点, 且在 -190/-84 和 -44/+651 bp 处存在 2 个潜在 CpG 岛。成功构建 9 个不同长度的 5'缺失报告重组载体并转染猪子宫内膜细胞。双荧光素酶活性检测结果显示, 启动子 P4(+454/+80 bp) 的转录活性最高, 其次是 P6(-123/+80 bp)。RT-qPCR 结果显示, 妊娠第 12 天二花脸猪 *LPAR3* 基因在子宫内膜的表达量高于在其他组织的表达量, 且极显著高于在妊娠第 12 天长大二元猪子宫内膜的表达量, *LPAR3* 在 2 个猪种子宫内膜均处于低甲基化状态且差异不显著。【结论】猪 *LPAR3* mRNA 全长为 2 127 bp, 妊娠第 12 天 *LPAR3* 基因在二花脸猪子宫内膜表达量高于其在长大二元猪子宫内膜的表达, 显示 *LPAR3* 可能参与了猪早期妊娠并影响产仔数。

关键词: 猪; *LPAR3* 基因; 启动子; 子宫内膜; 妊娠; 甲基化

中图分类号: S813.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)02-0031-09

Cloning of porcine *LPAR3* gene and its expression in endometrial cells

LIAO Miaorong¹, WU Long¹, ZHANG Ailing², ZHONG Yuyi¹, WEN Lijuan¹,
ZHANG Hao¹, YUAN Xiaolong¹, LI Jiaqi¹, ZHANG Zhe¹

(1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding/College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Biology and Food Engineering Institute, Guangdong University of Education/Guangdong Development Center of Applied Ecology and Ecological Engineering in Universities, Guangzhou 510303, China)

Abstract: 【Objective】To obtain the complete mRNA sequence and structure of porcine *LPAR3* gene, study the gene promoter activity, and explore the transcriptional regulation of *LPAR3* gene in endometrium and the mechanisms which may affect sow farrowing. 【Method】The 5'RACE and 3'RACE techniques were used to

收稿日期: 2018-05-19 网络首发时间: 2019-01-30 09:10:00

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20190129.1006.010.html>

作者简介: 廖妙容 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 1113938628@qq.com; 通信作者: 张豪 (1965—), 教授, 博士, E-mail: zhanghao@scau.edu.cn

基金项目: 科技部科技基础工作专项 (2014FY120800); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-35); 广东扬帆计划 (2014YT02H042); 广东省科技计划项目 (2017A020208043)

obtain the complete *LPAR3* mRNA sequence. The potential promoter transcription factor binding sites and CpG islands in the 5' regulatory region were predicted. Recombinant vectors with different length of promoters and dual-luciferase reporter gene were constructed, then were transfected with pRL-TK plasmid into pig endometrial cells, and the promoter activities were detected. RT-qPCR was used to compare the relative expression of *LPAR3* gene in Erhualian(ER) and Landrace×Large White (LL) pigs on the 12th day of gestation. Sodium bisulfite modified sequencing was used to compare the methylation status of *LPAR3* gene in endometrial tissues of ER and LL pigs on the 12th day of gestation. 【Result】 The full length of pig *LPAR3* mRNA was 2 127 bp, the 5'UTR and 3'UTR were 202 and 860 bp respectively, and the CDS region was 1 065 bp. The 5' regulatory sequence, including 3 080 bp (−2 430/+650 bp) upstream of the *LPAR3* gene, was cloned. The online prediction results of the 5' regulatory region showed that there was no TATA box in the *LPAR3* promoter, but there were GC element and binding sites for CPBP and other regulatory factors. Two potential CpG islands were found at −190/−84 and −44/+651 bp. Nine recombinant vectors with 5' deletions of the promoter were constructed and transfected into pig endometrium cells. The dual-luciferase assay showed that the activity of promoter P4 (+454/+80 bp) was the highest, followed by P6 (−123/+80 bp). RT-qPCR results showed that the expression of *LPAR3* gene in the endometrium of ER pigs on the 12th day of gestation was higher than that in other tissues, and it was extremely significantly higher than that in the endometrium of LL pigs on the 12th day of gestation. The methylation status of *LPAR3* gene was low in the endometrium of two breeds and had no significant difference between two breeds. 【Conclusion】 The full length of pig *LPAR3* mRNA is 2 127 bp. The endometrial expression level of *LAPR3* gene in ER pigs is higher than that in LL pigs on the 12th day of gestation, indicating that *LPAR3* gene may be involved in early gestation of pigs and affects litter size.

Key words: pig; *LPAR3* gene; promoter; endometrium; gestation; methylation

产前损失是指子宫容量和胎盘大小造成胚胎或胎儿不能正常分娩,母猪的产前损失大约为 30%~50%^[1],在附植期胚胎死亡率可达 25%^[2],其中妊娠第 11 至 12 天由于妊娠识别失败而导致的胚胎死亡率大概为 20%,甚至达到 40%~50%^[3-4]。妊娠第 11 至 12 天 (GD11~GD12) 胚胎因妊娠识别失败而导致的胚胎死亡是母猪产前损失的主要来源,也是制约母猪窝产仔数的最主要因素,因此提高胚胎存活率是提高母猪繁殖力的关键。二花脸猪 (Erhualian, ER) 是我国以低胚胎死亡率、高产仔数而世界闻名的优质猪种,二花脸初产母猪的平均窝产仔数为 12 头,经产母猪的窝产活仔数可超过 16 头^[5],而外来猪种如大白猪和长白猪的窝产仔数一般在 11 头左右,一般情况下,引进猪种比我国地方种猪平均窝产仔数少 2~3 头。二花脸猪高产仔性能是受多个基因综合作用的结果,而且可能主要受子宫内基因表达水平的影响^[6]。研究发现,在猪附植期子宫内膜中,*LPAR3* 为差异表达基因,且可能是影响不同猪种 GD11~GD12 胚胎存活率进而造成不同猪种差异窝产仔数的主效基因^[7-8],然而 *LPAR3* mRNA 结构信息尚不完整,也鲜见对猪 *LPAR3* 启动子活性及其在子宫内膜表达的报道,完善 *LPAR3* mRNA 结

构信息并进行启动子转录活性研究,可以深入揭示 *LPAR3* 基因在不同猪附植期子宫内膜中差异表达的原因,为母猪早期胚胎死亡机制研究提供一定参考,从而为提高母猪产仔数的分子育种积累科学资料。

溶血磷脂酸 (Lysophosphatidic acid, LPA) 主要是由活化的血小板产生,或由磷酸二酯酶 (Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2, ENPP2) 催化水解膜磷脂形成溶血磷脂,溶血磷脂再被溶血磷脂酶 D 水解转化而成,LPA 形成后被释放到细胞外的体液^[9-10]。LPA 受体缺陷小鼠表明 LPA 通过 G 蛋白偶联受体 (LPAR1~LPAR6) 参与精子发生、受精、早期胚胎发育、胚胎植入、维持胚胎间距、蜕膜化、妊娠维持和分娩等生殖过程,揭示 LPA 及受体在脊椎动物繁殖活动中的作用具有重要意义^[11]。LPA 受体 (Lysophosphatidic acid receptor 3, LPAR3) 与雌性生殖系统密切相关^[12-13],LPAR3 参与子宫内膜容受性过程,子宫内膜容受性受到前列腺素、肽类激素等调节从而发生改变,进而影响胚胎植入率和妊娠率。小鼠 LPAR3 主要分布在子宫内膜上皮、腺上皮和部分基质细胞的胞质^[14],在小鼠胚胎围着床期的第 3 天开始 *LPAR3* mRNA 和蛋白能够在雌激素下调孕酮水平的诱导下开始表达;敲除 *LPAR3* 基因后会

出现小鼠胚胎附植延迟、胚胎间距的异常、窝产子数减少,以及子宫内膜环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)、前列腺素 E2(Prostaglandin E2, PGE2) 表达水平的降低,而激素水平的降低会导致孕酮信号传导或雌激素信号传导比率增加^[15-17]以及蜕膜反应的减弱^[18],不利于妊娠的建立和维持。Ye 等^[19]研究发现 *LPAR3* 通过 COX-2(合成前列腺素的限速酶)产生前列腺素 E2 和前列腺素 I2,促进胚胎植入以及保持适当的胚胎间距。在人体上使用 GnRH α /FSH/HCG 进行超促排卵过程中发现,通过调节 *LPAR3* 表达水平和时间可以影响人子宫内膜的容受性^[20],使子宫内膜和胚胎的发育不同步,造成妊娠率下降。

猪 *LPAR3* 基因在妊娠早期起到重要作用^[21],猪 *LPAR3* 基因定位 6 号染色体 q2.6~3.2 区段,开放阅读框为 1 065 bp,编码蛋白质的相对分子量为 40 400。研究发现,胚胎植入的猪子宫内膜中的 *LPAR3* mRNA 表达水平显著高于无胚胎植入或未孕猪子宫内膜的表达水平,且 *LPAR3* mRNA 表达水平在胚胎发育至囊胚阶段和胚胎植入前达到高峰,提示 *LPAR3* 参与子宫容受性的建立,并且其在猪子宫内膜的表达升高可能受胚胎、分泌因子和信号分子的调控^[22]。妊娠第 11 至 12 天的猪胚胎正处于围附植期,胚胎形态发生了巨大的变化,胚胎快速延伸,胚体滋养层开始合成并分泌一系列的激素、生长因子等物质,引发子宫内环境的改变,使得子宫内膜保持良好的容受性,启动母体的妊娠识别^[23]。雌激素在母猪妊娠第 12 天和第 15 天达到高峰,并发挥主要作用^[24]。雌激素使子宫内膜合成的前列腺素 F2 α (Prostaglandin F2 α , PGF2 α) 减少,并且阻止其进入子宫静脉,使黄体持续分泌孕酮,此时子宫内膜在胚胎合成和雌激素的刺激下产生 *LPAR3*,*LPAR3* 在妊娠第 12 天时在猪子宫腔上皮和腺上皮达到表达高峰。*LPAR3* 可与 LPA 结合进而激活 cAMP,促进细胞分裂-相关蛋白激酶(Mitogen-associated protein kinases, MAPK)、磷脂酶 C 和 Ca²⁺信号途径,诱导子宫内膜前列腺素内过氧化物酶 2(Prostaglandin-endoperoxide 2, PTGS2) 的表达,调节子宫内膜前列腺素 F2(Prostaglandin F2, PGF2) 和前列腺素 E2(Prostaglandin E2, PGE2) 的产生,促进胚胎种植和母体对胚胎的识别^[25],从而提高母猪的产仔数。这些结果都表明,猪 *LPAR3* 基因的表达在胚胎植入及妊娠建立中起关键作用。

鉴于 *LPAR3* 为影响妊娠第 11 至 12 天猪胚胎存活率的主效基因及其在繁殖过程中的重要作用,本研究通过 RACE 技术获取 *LPAR3* 完整的

mRNA 序列;随后克隆 *LPAR3* 的 5'调控区并利用生物信息学在线预测转录 5'调控区潜在转录因子结合位点及 CpG 岛;构建 9 个不同长度的启动子缺失片段,分析启动子活性;实时荧光定量 PCR 分析 *LPAR3* 基因在妊娠第 12 天二花脸猪和长大二元猪(Landrace \times Large White, LL) 子宫内膜的差异表达,子宫内膜 DNA 经过亚硫酸氢盐修饰后测序分析 *LPAR3* 基因的甲基化。对猪 *LPAR3* 启动子及在妊娠第 12 天二花脸猪和长大二元猪子宫内膜的差异表达进行研究,期望探析我国地方良种猪产仔数高于外来猪种产仔数的原因。

1 材料与方法

1.1 材料

猪耳、心、肝、脾、肺、肾、子宫内膜上皮组织等组织样采集于妊娠第 12 天(GD12)的第 3 胎纯种二花脸猪(GD12 ER)和长大二元猪(GD12 LL),GD12 ER 来源于温氏集团良洞猪场,GD12 LL 来源于阳江市阳东县广东源丰农业有限公司。子宫内膜上皮细胞的采集来源于屠宰场收集的卵泡期子宫。

第 1 链 cDNA 反转录试剂盒、TRIzol、PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit、荧光定量 SYBR[®]Premix Ex Taq[™] 试剂盒、大肠埃希菌株 DH5 α 、pMD-20T Vector、5'-Full RACE kit 试剂盒购于 TaKaRa 公司;无内毒素质粒小提试剂盒购于 OMEGA 公司;双荧光素酶检测试剂盒、pGL-3 Basic Vector、pRL-TK Vector 购于 Promega 公司;普通质粒提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购于 Thermo scientific 公司;胎牛血清、低糖 DMEM 购于 Invitrogen 公司;引物由广州英骏生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RACE 技术克隆 *LPAR3* mRNA 完整序列
根据 GenBank 和 Ensembl 数据库中提供的 *LPAR3* 基因参考序列(GenBank 登录号:100113360)设计引物(表 1)扩增 5'UTR 序列。扩增 PCR 片段用 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶分离并纯化,回收目的片段送广州英骏生物公司测序(下同)。利用 5'-Full RACE kit 试剂盒获得 *LPAR3* mRNA 的 5'UTR,主要步骤包括去磷酸化处理、去帽子反应、连接 5'RACE Adaptor、反转录反应、Outer PCR 反应、Inner PCR 反应。使用 3'-Full RACE kit 试剂盒经过反转录反应和巢式 PCR 反应获得 *LPAR3* mRNA 的 3'UTR,使用 SYBR[®]Premix Ex Taq[™] 试剂盒进行巢式 PCR 的 Outer PCR 和 Inner PCR 反应。电泳分析 5'RACE 和 3'RACE 产物,克隆至 pMD20-T

表 1 猪 *LPAR3* 基因 mRNA 克隆及启动子扩增所需引物信息
Table 1 The primers for cloning the mRNA and promoter of porcine *LPAR3* gene

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') ¹⁾ Primer sequence	产物大小/bp Product size
pLPAR3-5UTR	F: TGTCTCCACCGCTCTCT R: CCATCACCGTCTTCATTAG	
LPAR3-P	F: CCTTTTGGTGGAGAAGTGAGAC R: GCATGGTTCGAGCTGTTCTCT	3 080 (-2 430/+650)
p1	F: CG <u>ACGCGT</u> CG TGAAGTGGCTCAGCAGGTT R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG GAGGAGCGGTGGAGGAC	1 958 (-1 878/+80)
p2	F: CG <u>ACGCGT</u> CG TTGTATCCACCACATTGCC R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG GAGGAGCGGTGGAGGAC	1 435 (-1 355/+80)
p3	F: CG <u>ACGCGT</u> CG TTTCTGGGTTATGGTTTC R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG GAGGAGCGGTGGAGGAC	1 047 (-967/+80)
p4	F: CG <u>ACGCGT</u> CG GAGTTGTGTGGCTTCAGTT R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG GAGGAGCGGTGGAGGAC	534 (-454/+80)
p5	F: CG <u>ACGCGT</u> CG CTCTGTAGGGCTTGTGG R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG GAGGAGCGGTGGAGGAC	351 (-271/+80)
p6	F: CG <u>ACGCGT</u> CG TGCCTGGAACTGTCCGGT R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG GAGGAGCGGTGGAGGAC	203 (-123/+80)
p7	F: CG <u>ACGCGT</u> CG CTGCCAACTTTTCTCTCTGT R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG GAGGAGCGGTGGAGGAC	96 (-16/+80)
p8	F: CG <u>ACGCGT</u> CG CTCTGTAGGGCTTGTGG R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG TCCGACTTGCCCCGCCTA	218 (-271/-54)
p9	F: CG <u>ACGCGT</u> CG CTCTGTAGGGCTTGTGG R: CCG <u>CTCGAG</u> CGG GCATGGTTCGAGCTGTTCTCT	921 (-271/+650)
p-GADPH	F: ACGCCTGCCCTGTGTCCCAA R: GAAGCACGCCCTCTCGCCTC	190
pLPAR3	F: TGGTCGCCCCGTCCTCT R: AACTGAACATCCGCTCACACT	100
LPAR3-BSP1	F: GGTTCGAGGTACGGTTTTGTAGG R: AAACACCACTCCCAACAATATCCC	1 006
LPAR3-BSP2	F: CGGTTATGTATTTGGGGATTAG R: TTCCCGAATCTCTAAATACCTT	887

1) 加粗表示保护碱基, 下划线表示 *MluI* 酶切位点 (ACGCGT) 和 *XhoI* 酶切位点 (CTCGAG)

1) Bold type: Protective bases; Underline type: Restriction sites for *MluI*(ACGCGT) and *XhoI*(CTCGAG)

Vector 载体后送测序。将获得的 5'UTR 和 3'UTR 序列进行拼接, 获得完整的 mRNA 序列, 提交 GenBank, 获得基因序列号。

1.2.2 *LPAR3* 基因 5'调控区的扩增及生物信息学预测 以常规酚氯仿抽提法提取猪耳样 DNA, 以获得的 *LPAR3* 基因完整 mRNA 序列为基础, 设计 LPAR3-P 引物扩增 5'调控序列 (表 1)。目的片段回收纯化后加“A”尾, 连接至 pMD20-T Vector 载体后转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布氨苄青

霉素琼脂平板, 37 °C 条件下过夜培养; 挑取单克隆菌落于 LA 培养液中培养, 选阳性克隆菌液送公司测序; 测序鉴定正确的质粒命名为 T-LPAR3-P。将获得 *LPAR3* 基因 5'调控区序列通过在线软件 (<http://www.genomatix.de> 及 <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) 预测潜在转录因子结合位点; 通过在线网站 (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) 分析启动子以及潜在 CpG 岛 (CpG islands, CpGs)。

1.2.3 构建 *LPAR3* 基因启动子报告基因重组体及双荧光素酶活性检测 参照获得的 *LPAR3* 基因完整 mRNA 序列及 5'调控区序列设计 7 对引物 (p1~p7) (表 1); 通过在线软件发现 5'调控区-190/-84 和 -44/+651 bp 处存在 2 个潜在的 CpG 岛, 设计引物 p8、p9(表 1) 探究 CpG 对 *LPAR3* 基因启动子活性的影响。以 p1~p9 引物、T-*LPAR3*-P 质粒为模板, 扩增猪 *LPAR3* 基因不同的启动子片段。各 PCR 扩增片段回收纯化后用 *MluI* 和 *XhoI* 限制性内切酶进行双酶切, 同时对 pGL3-basic 载体进行酶切。酶切体系为: PCR 产物或 pGL3-basic Vector 50 μ L, 10 \times FastDigest Green Buffer 20 μ L, *MluI* 5 μ L, *XhoI* 5 μ L, ddH₂O 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 条件下水浴 3 h。各双酶切产物回收纯化后连至 pGL3-basic 载体, 连接反应体系为: 1 μ L Ligation Buffer, 2 μ L pGL3-basic 载体双酶切产物, 6.8 μ L 各个缺失片段双酶切回收的目的片段, 0.2 μ L T4 DNA 连接酶, 22 $^{\circ}$ C 条件下连接 2 h。将连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 涂板并在 37 $^{\circ}$ C 条件下过夜培养, 挑取单克隆进行测序。将阳性克隆经过双酶切鉴定正确的各重组质粒分别命名为 P1(-1 878/+80 bp)、P2(-1 355/+80 bp)、P3(-967/+80 bp)、P4(-454/+80 bp)、P5(-271/+80 bp)、P6(-123/+80 bp)、P7(-16/+80 bp)、P8(-271/-54 bp) 和 P9(-271/+650 bp), 并利用 OMEGA 无内毒素试剂盒提取重组质粒 P1~P9。

分离猪卵泡期的子宫内膜上皮组织并建立子宫内膜上皮细胞体外培养体系^[26], 用阳离子脂质体法将荧光素酶报告载体与内对照 pRL-TK 质粒共转染子宫内膜上皮细胞, 操作步骤按照 LipofectamineTM LTX and PLUSTM 试剂盒说明书进行。检测双荧光素酶报告基因 Luciferase 活性, 应用统计学方法, 分析多次独立试验比值, 分别计算其 $\bar{x} \pm SE$, 并据此作出统计图。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测相对表达量 按 Trizol 法提取 GD12 ER 各组织及 GD12 LL 子宫内膜的总 RNA, 利用第 1 链 cDNA 反转录试剂盒逆转录合成 cDNA。以 *GADPH* 为内参基因, 引物为 p-GADPH (表 1), 利用荧光定量 SYBR[®]Premix Ex TaqTM 试剂盒检测 *LPAR3* 基因表达, 引物为 pLPAR3 (表 1) 在 GD12 ER 各组织及 GD12 LL 子宫内膜的表达。样品设置相同的阈值线, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *LPAR3* 基因的相对表达量, CFX Manager 软件输出扩增的 *Ct* 值, 分析 *LPAR3* 在不同组织及猪中的表达是否存在差异。

1.2.5 猪 *LPAR3* 基因启动子甲基化检测 参考在

线网站 (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>) 设计扩增 CpGs 的甲基化特异性引物 LPAR3-BSP1、LPAR3-BSP2, 以亚硫酸修饰后的 GD12 ER 和 GD12 LL 的子宫内膜上皮组织 DNA 为模板, 进行亚硫酸氢盐 PCR (bisulfite sequencing PCR, BSP-PCR) 扩增。BSP-PCR 产物经过回收纯化、连接、转化后, 挑取阳性克隆送公司测序。根据甲基化的胞嘧啶 C 在亚硫酸氢盐处理后不被转化胸腺嘧啶 T 的原理, 统计 CpG 甲基化位点及比例, 并运用 BiQ Analyzer 软件分析启动子的甲基化状态。

1.2.6 主要分子生物学软件与数据库 基因序列查询: GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Ensembl: <http://asia.ensembl.org/index.html>; 转录因子结合位点分析: MatInspector: <http://www.genomatix.de/>, TFSEARCH: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>; 预测 CpG 岛: <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>; PCR 引物设计的软件: Primer primer5.0; 核酸序列比对、拼接的软件: DNASTAR。

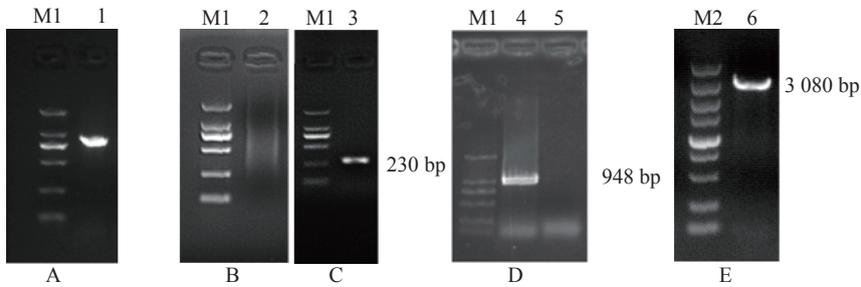
2 结果与分析

2.1 猪 *LPAR3* mRNA 克隆及 5'调控区的扩增

以二花脸 cDNA 为模板扩增获得 867 bp 的 *LPAR3* 部分片段 (图 1A), 测序后发现与 Ensemble 数据库预测 mRNA 序列存在 2 个碱基的突变, 其他序列完全相同。利用 RACE 试剂盒进行巢式 PCR (Outer PCR 和 Inner PCR) 后电泳, 分别获得 5'UTR 192 bp (图 1B、1C) 的单一目的条带。将目的条带连接载体后测序并与已知 mRNA 序列比对, 拼接后得到 202 bp 的 5'UTR。同样方法获得 3'UTR 948 bp (图 1D) 的单一目的条带, 拼接后获得 860 bp 的 3'UTR。将 5'RACE 试验获得的 mRNA 序列的第 1 个碱基确定为 +1, 根据 GeneBank 的基因信息和 RACE 试验结果设计引物, PCR 扩增后获得了猪 *LPAR3* 长为 3 080 bp (-2430/+650 bp) 的 5'调控序列 (图 1E)。将完整的 *LPAR3* mRNA 提交至 GenBank, 获得的基因序列号为 MH885288。

2.2 猪 *LPAR3* 基因 5'调控区的生物学信息学分析

将猪 *LPAR3* 基因 5'调控序列序列通过在线生物学软件进行分析, 结果显示 *LPAR3* 基因 5'调控序列不存在 TATA box, 存在 GC-box、CPBP (Core promoter-binding protein) 结合元件以及 cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB)、CCAAT 增强子结合蛋白 (CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP)、E-box 结合因子



M1 为 DL2000 marker, 从上到下依次为: 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp, M2 为 DL5000 marker, 从上到下依次为: 5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp; 1: *LPAR3* 基因 5'UTR 扩增条带; 2 和 3 分别为 5'RACE Outer 和 Inner 引物扩增特异性条带; 4 和 5 分别为 3'RACE Inner 和 Outer 引物扩增特异性条带; 6:*LPAR3* 基因 5'调控区的扩增条带

M1: DL2000 marker, from up to bottom: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, and 100 bp; M2: DL5000 marker, from up to bottom: 5 000, 3 000, 2 000, 1 500, 1 000, 750, 500, 250 and 100 bp; 1: Products of *LPAR3* 5'UTR amplification; 2 and 3: The specific bands of 5'RACE with Outer and Inner primers; 4 and 5: The specific bands of 3'RACE with Outer and Inner primers; 6: Products of *LPAR3* 5' regulatory sequence

图 1 猪 *LPAR3* 完整 mRNA 序列的 RACE 结果及 5'调控序列扩增结果

Fig. 1 RACE results of the complete mRNA sequence of pig *LPAR3* gene and amplification results of the 5' regulatory sequence

(E-box binding factors)、核因子 κB(nuclear factor κB, NFκB)、糖皮质激素受体 (Glucocorticoid receptor IR3) 等多个潜在转录因子结合位点 (图 2)。在 *LPAR3*

基因 5'调控区的-190/-84 和-44/+651 bp处存在 2 个 CpG 岛, 长度分别为 107 和 695 bp, CpG 1 岛有 10 个 CpG 位点, CpG 2 岛有 61 个 CpG 位点。

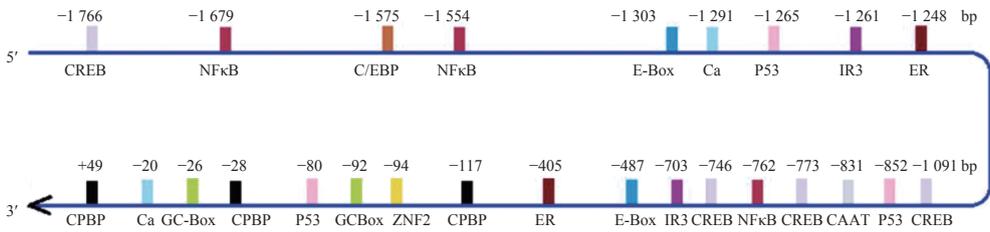
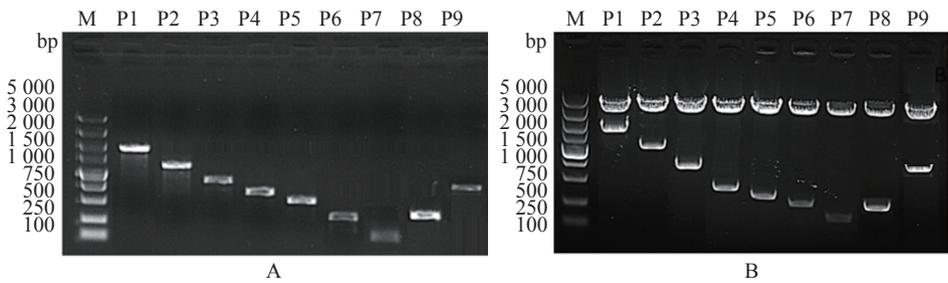


图 2 猪 *LPAR3* 基因 5'调控区重要调控元件与转录因子结合位点预测结果

Fig. 2 Predicted results of important regulatory elements and binding sites of transcription factors in the 5' regulatory region of pig *LPAR3* gene

2.3 猪 *LPAR3* 基因启动子片段重组体的转录活性
根据在线预测结果, 扩增 9 个不同长度的启动子缺失片段 (大小见表 1), 并成功构建 9 个不同长度

的缺失片段荧光素酶报告基因重组质粒, 启动子各缺失片段扩增及重组质粒鉴定结果见图 3。



M:DL5000 marker; P1~P9 片段大小分别约为 1 958、1 435、1 047、534、351、203、96、218 和 921 bp
M: DL5000 marker; The lengths of P1-P9 were 1 958, 1 435, 1 047, 534, 351, 203, 96, 218 and 921 bp, respectively

图 3 猪 *LPAR3* 基因启动子各缺失片段扩增 (A) 及双酶切鉴定 (B)

Fig. 3 Amplification of the deletion fragments of pig *LPAR3* gene promoter (A) and double enzyme digestion (B)

启动子片段活性检测结果如图 4 所示, 图 4A 结果表明: 启动子 P4 的活性最高, 其次是 P6、P5、P1、P3、P2、P7, 推测在-1 878/-1 355、-454/-271 和-123/-16 bp 区域可能为激活转录的正调控区; P6 位于转录起始位点附近, 因此 P6 区域可

能是 *LPAR3* 基因的核心启动子区域;-1 355/-967、-967/-454 和-271/-123 bp 这 3 个区域为负调控区。生物信息学 CpG 岛预测结果显示 *LPAR3* 基因 5'调控区的-190/-84 和-44/+651 bp 处存在 2 个 CpGs 岛, 设计启动子 P8、P9 验证 CpG 岛是否与转

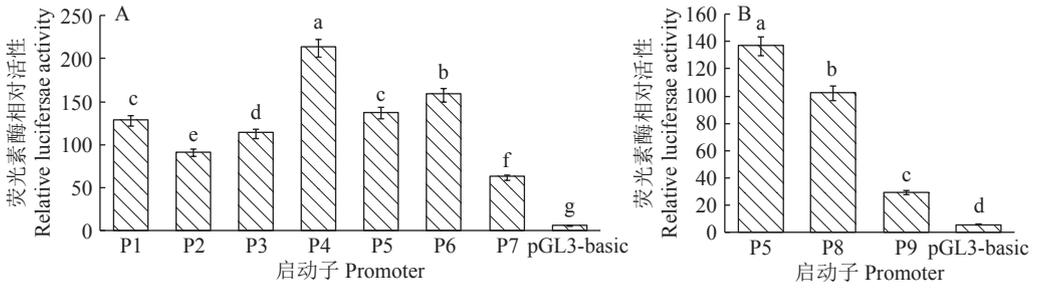
录活性有关。图 4B 结果显示 P5 活性显著高于 P8 和 P9, P8 活性显著高于 P9, 说明 CpG 岛的存在可能影响了转录水平。

2.4 猪 *LPAR3* 基因的相对表达及甲基化分析

在 GD12 ER 各种组织中, *LPAR3* 基因在子宫内膜中的表达量最高, 胃次之, 小肠和下丘脑少量表达, 而心、肝、脾、背最长肌和垂体几乎不表达 (图 5A)。另外 *LPAR3* 基因在 GD12 ER 子宫内膜中

的表达量极显著地高于其在 GD12 LL 子宫内膜中的表达量 (图 5B)。

提取 GD12 ER 和 GD12 LL 的子宫内膜组织 DNA, 经过亚硫酸氢盐修饰后用引物 *LPAR3*-BSP1、*LPAR3*-BSP2 扩增并测序, 结果显示: 在 GD12 ER 和 GD12 LL 的子宫内膜组织中, *LPAR3* 启动子甲基化水平均较低 (图 6)。t 检验结果表明 2 个猪种的子宫内膜 *LPAR3* 甲基化程度差异不显著 ($P=0.6733$)。

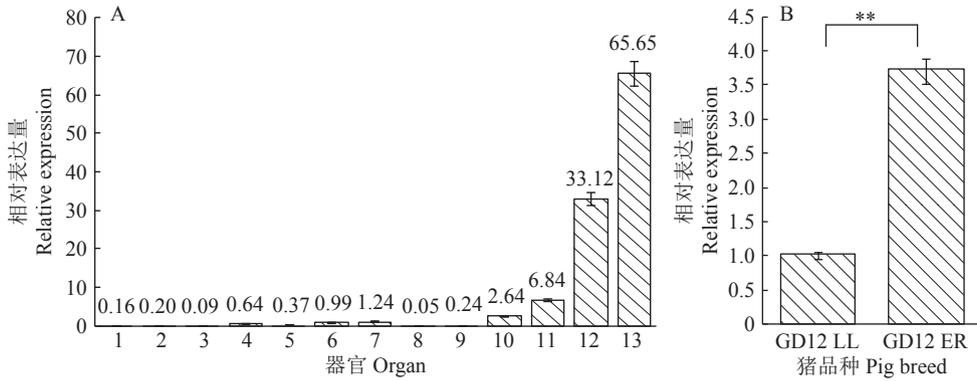


各图中, 柱子上的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)

In each graph, different lowercase letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's test)

图 4 猪 *LPAR3* 基因各启动子缺失片段转录活性

Fig. 4 Luciferase activities of *LPAR3* promoter deletion fragments

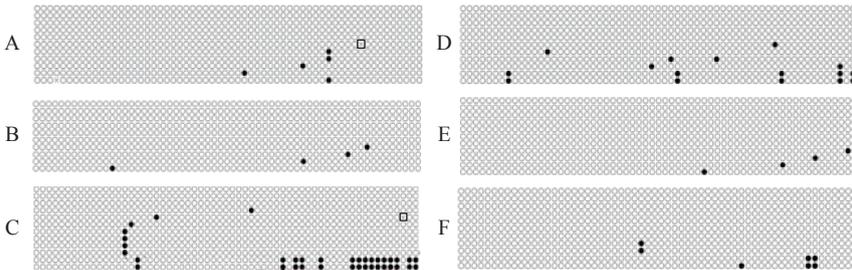


A 图中, 横坐标上的数字 1~13 分别表示心、肝、脾、肺、肾、大脑、小脑、肌肉、垂体、下丘脑、小肠、胃和子宫内膜; B 图中, “**”表示差异显著 ($P < 0.01$, t 检验)

In graph A, the numbers of 1~13 along the abscissa axis represented heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, cerebellum, muscle, pituitary, hypothalamus, small intestine, stomach and endometrium respectively; In graph B, “**” indicates significant difference ($P < 0.01$, t test)

图 5 猪 *LPAR3* mRNA 的组织表达谱

Fig. 5 Gene expression profile of pig *LPAR3* mRNA



A, B, C 为 GD12 ER *LPAR3* 基因甲基化状态; D, E, F 为 GD12 LL *LPAR3* 基因甲基化状态; 每行代表 1 个克隆, 黑色点表示甲基化的 CpG 位点, 白色点表示未被甲基化的 CpG 位点, 黑框表示碱基错配

A, B, C: Methylation status of GD12 ER *LPAR3*; D, E, F: Methylation status of GD12 LL *LPAR3*; Each row represents one clone, black dots indicate methylated CpG sites, white dot indicates non-methylated CpG sites, black boxes indicate base mismatches

图 6 GF12 ER 和 GD12 LL 猪 *LPAR3* 基因甲基化检测结果

Fig. 6 Detection results of methylation status of *LPAR3* gene in GF12 ER and GD12 LL pigs

3 讨论与结论

大量研究发现 *LPAR3* 基因与猪早期妊娠有关^[21], 转录组测序结果也发现 *LPAR3* 基因可能是影响不同猪种 GD11~GD12 胚胎存活率进而造成窝产仔数差异的主效基因^[8], 推测 *LPAR3* 基因在子宫内膜中对母猪妊娠和胚胎发育起调控作用, 进而影响母猪产仔数。本研究通过 RACE 技术获得 2 127 bp 的猪 *LPAR3* 完整 mRNA 序列, 将猪的 *LPAR3* 基因结构与人、鼠的 *LPAR3* 基因结构对比, 发现 3 个物种的 *LPAR3* 基因均由 3 个外显子和 2 个内含子组成, 猪 *LPAR3* 的第 3 个外显子长度的变异较大, 可能是受转录后可变剪接的影响。

生物信息学预测发现, 猪 *LPAR3* 基因启动子上存在潜在的雌激素受体元件 IR3 结合位点、雌激素受体 α 结合位点、NF κ B 等结合位点。在雌激素受体 IR3 和雌激素受体 α 中间还有 1 个核心启动子元件——果蝇启动子结构单元 (*Drosophila* initiator motifs) 的结合位点, 该激活元件可作用于没有 TATA box 的启动子区域参与启动子的激活。在猪围附植期, 胚胎延伸过程中释放雌激素信号可能作用于雌激素受体, 雌激素上调雌激素受体和孕激素受体表达水平, 雌激素受体和孕激素受体维持恰当的比例, 使得 *LPAR3* 在子宫的腔上皮和腺上皮表达达到高峰并成功识别^[27], 推测这些区域很有可能是雌激素及其受体与 *LPAR3* 基因 5'调控区相互作用以影响 *LPAR3* 表达的关键位点, 这需要深入的研究。

根据获得的 mRNA 完整序列设计引物扩增 *LPAR3* 基因的 5'调控区, 获得 3 080 bp 的 5'调控区序列。利用在线软件预测 *LPAR3* 基因启动子转录因子结合位点及 CpG 岛, 并且构建 9 个不同缺失长度的启动子双荧光素酶报告载体。双荧光活性检测结果显示, P4(-454/+80 bp) 启动子活性最高, 其次是 P6(-123/+80 bp)、P5(-271/+80 bp)、P1(-1 878/+80 bp)、P3(-967/+80 bp)、P2(-1 355/+80 bp) 和 P7(-16/+80 bp), 提示在 -1 878/-1 355、-454/-271 和 -123/-16 bp 区域可能为激活转录的正调控元件, 在 -1 355/-967、-967/-454 和 -271/-123 bp 这 3 个区域为负调控元件; 另外 P6 位于转录起始位点附近, 因此 P6 区域有可能为 *LPAR3* 基因的核心启动子区。研究发现, 启动子区存在的 CpG 岛的甲基化会影响转录因子的结合, 进而抑制基因的转录^[28]。P5 活性下降, 且在 P5 区域存在一个较长的 CpG 岛, 推测 P5 区域的 CpG 岛影响着启动子的活性, 因此设计引物扩增 P8(-271/-54 bp)、P9(-271/

+650 bp) 片段, 分析 CpG 岛与启动子活性的关系。结果显示 P8、P9 活性显著低于 P5 活性, 而 P8 活性显著高于 P9 活性, 说明 CpG 岛的存在影响了 *LPAR3* 基因启动子的强度。至于是哪一个 CpG 岛影响了启动子的强度, 还需要进一步分析。

实时荧光定量 PCR 结果表明, GD12 ER 猪子宫内膜的 *LPAR3* 基因的相对表达明显高于其他组织, 且极显著高于 *LPAR3* 基因在 LL 猪子宫内膜的表达, 这与前人的研究结果一致^[25-29]。

DNA 甲基化可以通过影响染色质结构、DNA 构象、稳定性以及蛋白质相互作用等方式调控基因表达。已有大量研究发现, DNA 甲基化影响基因差异表达^[30-31], 并与生长、繁殖等性状相关联^[32-33]。苏涛等^[34]研究发现, 妊娠第 18 天及第 32 天大白猪及梅山猪子宫内膜组织中大量基因具有差异甲基化, 提示了基因甲基化的差异可能是两猪品种产仔数差异的重要原因。为了进一步研究二花脸猪和长大二元猪子宫内膜 *LPAR3* 基因差异表达的表观遗传学机制, 本文利用子宫内膜 DNA 作为模板进行亚硫酸氢盐修饰后测序法检测 CpG 岛的甲基化, 结果表明, ER 猪和 LL 猪子宫内膜 *LPAR3* 基因均处于低甲基化水平, 且没有显著差异, 因此 *LPAR3* 基因甲基化差异不是造成 *LPAR3* 基因在 ER 和 LL 子宫内膜表达差异的原因, 因此也并非影响产仔数的原因。

本研究获得 *LPAR3* 基因的全长 mRNA 和 5'调控区, 启动子 -454/+80 和 -123/+80 bp 区转录活性最高; *LPAR3* 基因在妊娠第 12 天 ER 子宫内膜表达量极显著高于 LL, 但 2 个品种子宫内膜 *LPAR3* 的平均甲基化较低且没有显著差异, 甲基化不是 *LPAR3* 基因在 2 个猪种差异表达的关键因素。

参考文献:

- [1] TAYADE C, FANG Y, CROY B A. A review of gene expression in porcine endometrial lymphocytes, endothelium and trophoblast during pregnancy success and failure[J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53(3): 455-463.
- [2] 洪林君. 影响猪胚胎附植及胎盘褶皱发育相关基因的鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [3] BENNETT G L, LEYMASTER K A. Integration of ovulation rate, potential embryonic viability and uterine capacity into a model of litter size in swine[J]. *J Anim Sci*, 1989, 67(5): 1230-1241.
- [4] FOXCROFT G R, DIXON W T, NOVAK S, et al. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs[J]. *J Anim Sci*, 2006, 84(Suppl): E105-E112.
- [5] 葛云山, 徐金友, 刘明智, 等. 二花脸猪繁殖性能的观察[J]. *江苏农业科学*, 1982(4): 40-43.
- [6] 杜红丽, 陈静, 张玉山, 等. 二花脸与杜洛克猪繁殖相关

- 基因表达差异[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(2): 99-103.
- [7] KIM M, SEO H, CHOI Y, et al. Microarray analysis of gene expression in the uterine endometrium during the implantation period in pigs[J]. *Asian-australas J Anim Sci*, 2012, 25(8): 1102-1116.
- [8] 王首奇. 母猪怀孕 11-12 天子宫内膜差异表达基因的筛选与分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2011.
- [9] SEO H, CHOI Y, SHIM J, et al. Analysis of the lysophosphatidic acid-generating enzyme ENPP2 in the uterus during pregnancy in pigs[J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(4): 77.
- [10] MAUCO G, CHAP H, SIMON M F, et al. Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid production in phospholipase C-and thrombin-treated platelets: Possible involvement of a platelet lipase[J]. *Biochimie*, 1978, 60(6/7): 653-661.
- [11] YE X, CHUN J. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(1): 17-24.
- [12] 王澍. *LPAR3*、*COX-2* 和 *VEGF* 蛋白在反复移植失败患者着床期子宫内膜表达的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [13] CHA J, SUN X, DEY S K. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy[J]. *Nat Med*, 2012, 18(12): 1754-1767.
- [14] 郭燕红, 张雷, 邵素霞, 等. 溶血磷脂酸受体 3 在小鼠胚胎围着床期子宫内膜的表达及意义[J]. *解剖学报*, 2009, 40(1): 141-145.
- [15] SHAH B H, CATT K J. Roles of *LPA3* and *COX-2* in implantation[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2005, 16(9): 397-399.
- [16] DIAO H, LI R, EI ZOWALATY A E, et al. Deletion of lysophosphatidic acid receptor 3 (*Lpar3*) disrupts fine local balance of progesterone and estrogen signaling in mouse uterus during implantation[J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(5): 123.
- [17] HAMA K, AOKI J, INOUE A, et al. Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by *LPA3*-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice[J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(6): 954-959.
- [18] AIKAWA S, KANO K, INOUE A, et al. Autotaxin-lysophosphatidic acid-*LPA3* signaling at the embryo-epithelial boundary controls decidualization pathways[J]. *Embo J*, 2017, 36(14): 2146-2160.
- [19] YE X, HAMA K, CONTOS J J, et al. *LPA3*-mediated lysophosphatidic acid signaling in embryo implantation and spacing[J]. *Nature*, 2005, 435(7038): 104-108.
- [20] 李巍巍, 秦伟, 耿爱华, 等. *LPAR3*、*HOXA-11* 在 IVF 患者子宫内膜种植窗期的表达及意义[J]. *中国妇幼保健*, 2014, 29(12): 1922-1926.
- [21] SHEN J, ZHOU C, ZHU S, et al. Comparative transcriptome analysis reveals early pregnancy-specific genes expressed in peripheral blood of pregnant sows[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114036.
- [22] KAMINSKA K, WASIELAK M, BOGACKA, et al. Quantitative expression of lysophosphatidic acid receptor 3 gene in porcine endometrium during the periimplantation period and estrous cycle[J]. *Prostag Oth Lipid M*, 2008, 85(1/2): 26-32.
- [23] DEGRELLE S A, BLOMBERG L A, GARRETT W M, et al. Comparative proteomic and regulatory network analyses of the elongating pig conceptus[J]. *Proteomics*, 2009, 9(10): 2678-2694.
- [24] KNIGHT J W. Aspects of placental estrogen synthesis in the pig[J]. *Exp Clin Endocrinol*, 1994, 102(3): 175-184.
- [25] SEO H, HIM M, CHOI Y, et al. Analysis of lysophosphatidic acid (LPA) receptor and LPA-induced endometrial prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression in the porcine uterus[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(12): 6166-6175.
- [26] 高萍, 钟玉宜, 张爱玲. 母猪卵巢颗粒细胞的分离培养及鉴定[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(4): 131-135.
- [27] 徐慧颖, 李娜, 张云山. 胚胎植入: 子宫内膜容受性是关键[J]. *生殖医学杂志*, 2014, 23(3): 198-202.
- [28] BOYES J, BIRD A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein[J]. *Embo J*, 1992, 11(1): 327-333.
- [29] KIM M, SEO H, CHOI Y, et al. Analysis of stage-specific gene expression profiles in the uterine endometrium during pregnancy in pigs[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143436.
- [30] NAMOUS H, PEÑAGARICANO F, DEL CORVO M, et al. Integrative analysis of methylomic and transcriptomic data in fetal sheep muscle tissues in response to maternal diet during pregnancy[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 123.
- [31] 辛鹏慧, 岳永莉, 李燕, 等. 牛 4 种组织中 *ZARI* 基因表达及 DNA 甲基化修饰[J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41(10): 40-42.
- [32] 张永宏. 三个地方品种鸡肌肉组织基因组 DNA 甲基化分析[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [33] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远著. DNA 甲基化差异对猪生长性状的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(2): 105-110.
- [34] 苏涛, 刘敏, 侯斌, 等. 大白猪与梅山猪子宫内膜转录组及甲基化分析[C]//中国生理学会生殖科学专业委员会. 中国动物学会生殖生物学会第 2 次联合学术年会暨“生殖科学专业委员会第 2 次学术交流会”和“生殖生物学会第 16 次学术年会”论文集. 北京: 中国生理学会, 2017.

【责任编辑 庄 延】