

犏牛雄性不育相关 lncRNA 的鉴定与分析

阿果约达, 熊显荣*, 王 艳, 杨显英, 韩 杰, 王 斌, 李 键*

(西南民族大学生命科学与技术学院, 青藏高原动物遗传资源保护与利用国家教育部重点实验室, 成都 610041)

摘要: 旨在分析成年健康牦牛和犏牛(3~4岁)睾丸组织中长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA) 的表达谱, 从而探究 lncRNA 与犏牛雄性不育机制的关联性, 为解释犏牛雄性不育的机理提供理论依据。采集成年(3~4岁)健康牦牛、犏牛各3头的睾丸组织, 构建 cDNA 文库后进行高通量测序, 筛选出差异的 lncRNA, 通过对差异显著的 lncRNA 与 mRNA 位置关系以及结合能的判定预测顺式作用(cis)和反式作用(tran)的靶基因, 并进行 GO、KEGG 功能分析。结果表明, 共得到牦牛和犏牛候选 lncRNA 转录本分别为 20 363 和 24 133 个, 两个文库筛选出 6 178 个显著差异 lncRNA, 其中有 2 470 个在犏牛睾丸组织与牦牛比较上调, 3 708 个下调。筛选得到差异显著 lncRNA 的候选靶基因 2 676 个, 这些基因参与 58 个功能分类, 共涉及 306 条通路; 其中主要富集的通路包括轴突指导、内吞、Hedgehog 等信号通路。综上表明, 部分 lncRNA 介导的靶基因 *PTGDS*、*IGF2*、*MEST*、*GLIS3*、*NOTCH2*、*HOXA10*、*HOXA11* 与犏牛雄性不育相关, lncRNA 在犏牛的生殖发育中对其雄性不育具有重要的调控作用。利用 RNA-Seq 技术筛选出成年牦牛和犏牛睾丸组织 lncRNA, 并进行差异分析, 为探讨犏牛雄性不育的机制提供更完善的转录组数据。

关键词: 牦牛; 犏牛; 雄性不育; 转录组; lncRNA

中图分类号: S823.8⁺5.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2019)03-0551-11

Identification and Analysis of Long Non-coding RNA Associated with Cattle-yak Male Infertility

A GUO Yueda, XIONG Xianrong*, WANG Yan, YANG Xianying,
HAN Jie, WANG Bin, LI Jian*

(Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Exploitation of Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The objective of this study was to explore the link between lncRNAs and the mechanism of male infertility of cattle-yak by analyzing the gene expression profile about lncRNA in testis tissue of adult healthy yak and cattle-yak (3-4 years old). This study provided the base for further interpreting the mechanism of male infertility of cattle-yak. Testis tissues of 3 adult healthy yaks and 3 adult healthy cattle-yaks were collected to construct the cDNA libraries. And, the structure and function of genes were analyzed by using high-throughput sequencing and differentially expressed lncRNAs (DELncRNAs) were screened between yak and cattle-yak. Then the cis-targeted and tran-targeted genes of DELncRNAs were predicted by exploring the positional relation and binding energy between lncRNA and mRNA, and the GO and KEGG pathway enrich-

收稿日期: 2018-07-16

基金项目: 国家重点研发专项(2018YFD0502304); 四川省科技支撑计划(2017NZ0076); 牦牛遗传资源保护利用创新团队(13CXTD01); 西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2018SZ07)

作者简介: 阿果约达(1992-), 男, 四川凉山州人, 彝族, 硕士生, 主要从事动物细胞与胚胎工程研究, E-mail: aguoyoda@126.com

* 通信作者: 李 键, 主要从事牦牛细胞生物学和发育生物学研究, E-mail: jianli_1967@163.com; 熊显荣, 主要从事动物细胞与胚胎工程研究, E-mail: xianrongxiang@163.com

ment analysis was also made. The results displayed that 20 363 and 24 133 candidate lncRNA transcripts of yak and cattle-yak were respectively obtained, 6 178 DELncRNAs of which were selected. Compared with yak, there were 2 470 up-regulated and 3 708 down-regulated lncRNAs in cattle-yak. Meanwhile 2 676 candidate target genes of DELncRNAs were obtained. The analytical results indicated that these genes participated in 58 functional classifications and participated in 306 signal pathways. And, they were mainly involved in such signal pathways as axon guidance, endocytosis and hedgehog. In conclusion, these findings inferred that some lncRNA-mediated target genes (*PTGDS*, *IGF2*, *MEST*, *GLIS3*, *NTOCH2*, *HOXA10*, *HOXA11*) were associated with male infertility of cattle-yak, and lncRNA may played an important role in the reproductive development of cattle-yak. Moreover, the gap analysis of lncRNA was made by using RNA-Seq technology, which provided more complete data for further exploring the mechanisms of male infertility of cattle-yak on transcriptome.

Key words: yak; cattle-yak; male infertility; RNA-seq; lncRNA

牦牛 (*Bos grunniens*) 是分布在我国青藏高原及其毗邻海拔 3 000 米以上高寒牧区的特有牛种资源。高原地区环境艰苦, 物种稀缺, 牦牛素有“高原之舟”的美誉。然而牦牛较其他畜种繁殖性能低, 生产性能低下, 并不能满足肉类生产的发展。因此通过牦牛有目的性的与其他普通牛(黄牛、肉牛、奶牛)杂交得到的 F1 代犏牛可以达到比亲本产肉量高、产奶量大、役用能力强、营养价值肉质风味优等杂种优势。但是犏牛的雄性不育阻碍了其杂种优势的利用, 尽管能够通过回交或人工授精生育 F2、F3 代犏牛, 但与 F1 代比较其杂种优势减弱且接近消失, 适应能力较弱。因此犏牛在农业生产不能被广泛的利用^[1]。

睾丸是雄性哺乳动物产生精子和分泌雄性激素的场所, 其发育程度在雄性生殖系统中占据重要的地位。犏牛雄性不育近年来一直是牦牛学研究的重点。造成犏牛雄性不育主要是染色体和基因差异、激素内分泌失调、细胞核质互作、基因型不育等原因。

随着 RNA-seq 高通量测序技术的迅速发展与应用, 高通量测序技术已经被证明是一种分析真核生物基因组转录组的高度敏感和精确的方法^[2], 通过在 RNA 水平上转录组深度测序的技术对犏牛雄性不育的研究更加深入。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是长度 > 200 bp 的非编码 RNA, 可以与染色质修饰蛋白质, RNA 结合蛋白, 小 RNA 和其他的 lncRNA 相互作用, 以调节各种生理过程。近年来, 在人、牛、绵羊、鼠、野猪上鉴定到 lncRNA^[3]。lncRNA 在转录调控、表观遗传、细胞分化、相关疾病及其他生物过程中起关键作用^[4-5]。部分 lncRNA 可以通过调节转录状态作用

于单个 mRNA 基因甚至整个染色体^[6-7]。Liang 等^[8]通过对小鼠精原细胞 lncRNA/mRNA 相关性的分析, 结果表明, 精子发生的协调变化与 lncRNA 在转录和转录后的水平上相关, lncRNA 可以调节复杂的基因。虽然目前已经有牦牛和犏牛转录组比较分析, 其中曾贤彬等^[9]通过高通量测序结果筛选并比较牦牛和犏牛与精原干细胞的更新和分化、精子形成以及减数分裂、细胞凋亡等相关基因的表达差异, 同时也证实了 F1 代犏牛生精细胞只能分化至圆形细胞期。Xu 等^[10]通过对牦牛与犏牛睾丸组织 microRNA 的差异分析, 研究与精子发生相关的 miRNA 有助于更好地了解精子发生阻滞机制。但是关于牦牛和犏牛睾丸组织转录组 lncRNA 的比较还属于空白。鉴于此, 本研究将通过利用 RNA-seq 转录组差异比较, 并进行生物信息学分析, 为进一步从分子水平阐释犏牛雄性不育的发育过程及遗传机理奠定基础, 并提供重要的理论数据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究牦牛与犏牛的睾丸组织样本均采自于四川省阿坝州红原县屠宰场(北纬 31°51′~33°19′, 东经 101°51′~103°23′; 海拔 3 600 m 左右), 选取健康成年(3~4 岁)的雄性牦牛、犏牛各 3 头, 屠宰后迅速使用无菌剪刀采集睾丸组织, 剥离睾丸组织白膜装进冻存管, 放入液氮中带回实验室, -80 °C 保存备用。

1.2 RNA 的提取, 文库构建及高通量转录组测序

利用 TRIzol (Invitrogen 公司, 美国) 法提取 3 头

牦牛和 3 头犏牛睾丸组织样本的 RNA, 分别各取等量 30 μL 并混合组成两个 RNA 池(RNA pool), 使用 Nanodrop ND-1000 分光光度计和 Bioanalyzer 2100 生物分析仪(Agilent 公司, 美国)对试验过程中的 RNA 浓度以及 RNA 完整性进行鉴定。利用生物素标记的特异性探针(Ribo-ZeroTM rRNA Removal Kit)去除核糖体 rRNA, 通过乙醇沉淀得到无 rRNA 的剩余物, 接着使用 TruSeq RNA Sample Prep Kit(Illumina 公司, 美国)在一定的温度和离子条件下通过混合仪将已经纯化的 mRNA 进行约 200 bp 的片段化, 随后使用 TruSeq[®] Stranded kit (Illumina 公司, 美国)中的随机引物、反转录酶以及将 mRNA 打断后作为模板合成第 1 条链 cDNA, 使用合成缓冲液, DNA 聚合酶 I 和 RNase H 进行第 2 条链 cDNA 的合成, 将末端纯化以及利用外切核酸酶和聚合酶将突出端修复为平端后, 又将得到的产物双链 cDNA 的 3' 端加上碱基“A”, 并使 cDNA 片段连接到测序接头对其进行 PCR 扩增反应, 最后建立出双末端测序文库。将构建好的文库使用 Agilent 2100 和 qRT-PCR 方法对文库质检以保证文库质量之后, 在 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序。

1.3 转录组数据分析

通过使用 SOAPnuke(v1.5.2)对测序产生的原始数据进行去除含 adapte 的 reads、含 N 比率 > 10% 的 reads、低质量的 reads(质量值 $Q \leq 10$) 处理后得到 clean reads。利用 HISAT2 将处理后的净测序序列比对到参考基因组上并使用 String Tie 进行组装, 将重构后的转录本再通过 cuffcompare 与已知的 mRNA 及 lncRNA 比较, 获得相互的位置关系。通过 CPC、txCdsPredict、CNCI 以及 pfam 数据库对保留下来的转录本编码能力进行预测, 使用 RSEM 计算通过 Bowite2 比对到参考序列的净测序序列基因和转录本的表达量, 使用 FPKM 标准化处理便于样本间的相互比较。两组文库间的比较通过 $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$, FDR(false discovery rate) ≤ 0.01 作为显著差异表达的参考。将 lncRNA 在 mRNA 上、下游 10 k 内判定为顺式作用 cis, 超过此范围值的用 RNAplex 分析 lncRNA 与 mRNA 的结合能 < -30 则判定为反式作用 tran, 同时它们需满足相关系数斯皮尔曼系数 spearman ≥ 0.6 及皮尔森系数 pearson_cor ≥ 0.6 定义为相关, 利用 Blast2 GO 软件和 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)

数据库比对分别对 lncRNA 候选靶基因进行 GO(GO term)分析和 KEGG 富集分析。

1.4 lncRNA 的荧光定量 PCR 差异验证

通过随机筛选出 8 个 lncRNA, 其中 LTCONS_00070732、LTCONS_00028984、LTCONS_00024814、LTCONS_00056498 在转录组数据中表现为上调, LTCONS_00054787、LTCONS_00056576、LTCONS_00023375、LTCONS_00074328 在转录组数据犏牛中表现为下调, 其中 \log_2 (犏牛/牦牛)的数值 ≥ 1 代表上调, ≤ -1 代表下调。对上述 lncRNA 进行荧光定量 PCR (qRT-PCR)反应, 内参基因选择 RPS18, 引物均由南京金斯瑞公司合成, 引物序列信息见表 1。荧光定量 PCR 反应总体积 15 μL ; 上、下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL , cDNA 1.0 μL , ddH₂O 5.5 μL , SYBR[®] Premix Ex TaqTM II 7.5 μL ; PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环, 3 个重复。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算比较牦牛和犏牛 lncRNA 的相对表达量, 并对转录组结果进行验证分析。

2 结果

2.1 高通量测序评估

本研究通过选用成年健康牦牛和犏牛共计 6 个样本进行测序。组成了 2 个 cDNA 文库, 共生成测序得到牦牛和犏牛睾丸组织原始序列分别为 83.3 Mb、84.4 Mb, 经过过滤处理后得到净测序序列 81.7 Mb、83.7 Mb, clean reads 比对达到了 98.09%、98.82%。Q30 质量值百分率分别达到了 94.87%、94.51%, 将 clean reads 比对到参考基因组映射率分别达到 82.78%、82.54%, RNA-seq 数据已上传至 NCBI (登录号 SRP156262)。测序结果质量较高, 满足后续的分析需要。

2.2 lncRNA 的鉴定及差异表达分析

利用 Cuffmerge 工具将组装结果进行合并筛选组装后, 保留其中在 NONCODE 数据库中分类统计 i、j、u、x 和 o 5 类 lncRNA 较多的转录本。共获得候选牦牛和犏牛 lncRNA 转录本共 25 365 个(图 1), 其中得到犏牛 lncRNA 24 133 个, 牦牛 lncRNA 20 363 个。整体看来 mRNAs 表达量高于 lncRNAs。mRNAs 与 lncRNAs 转录本长度也体现出不同(图 2)。通过 Bowite2 处理后, 计算出相关表达量, 筛选条件下共获得 6 178 个表达差异的 lncRNA。其中, 表达上调的有 2 470 个, 表达下调的有 3 708 个(图 3)。

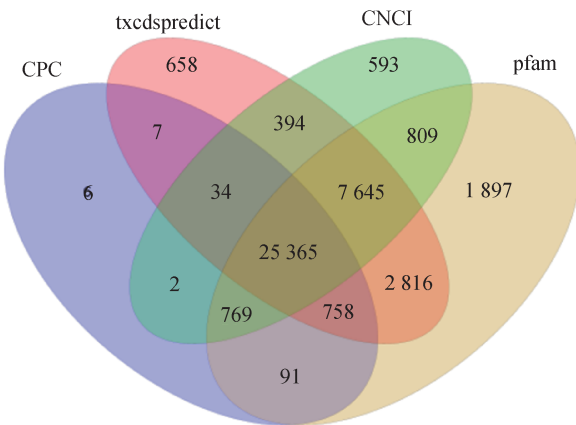
表 1 lncRNAs 引物信息

Table 1 Primers for lncRNAs

长链非编码 RNA lncRNAs	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Size
LTCONS_00024718	F:TTTCACGCTTGGTAGAGTTGC R:CAGGTGGAACGCTGGGTAT	157
LTCONS_00056498	F:GGGTTGCCCACTTTCTGTGTC R:AAGGGGTCTTTCTCGATTCC	106
LTCONS_00041936	F:GGAACCCCTTCAGCAAGACTAT R:TTCACCTGGTGGACCCAATGTAG	160
LTCONS_00028984	F:TGGTTGACCCATCCTTGCC R:AGCATTAAAGCCCGGTCCATT	116
LTCONS_00054787	F:GAGGGATATGATATGGTCCGG R:ATCTTGAGGGTTCTGGGTGTC	161
LTCONS_00056576	F:GTCTCATCAATGGGCTCATTCA R:TATGGTGGAGGACATCCGTTT	149
LTCONS_00023375	F:AACCCTGAGGCTTGTGTCTCT R:GTAGGCTCTGGGAGTTGGTGAT	197
LTCONS_00074328	F:TCTCATCCCTGGAAACCAGAG R:GCCTCGATGCTCCTTGTCTAT	136
RPS18	F:CGCCGCCATGTCTCTAGTAA R:AGGTCGATGTCTGCTTTCCT	162

F. 上游引物;R. 下游引物

F. Forward primer; R. Reverse primer



CPC、txcdspredict、CNCI 3 种方法与 pfam 蛋白数据库比对预测编码能力

The illustration shows the results compared with CPC, txcdspredict, CNCI and pfam protein database

图 1 lncRNA 预测结果维恩图

Fig. 1 The Venn diagram of lncRNA predicted results

2.3 lncRNA 靶基因预测

通过计算 lncRNA 与 mRNA 的两个相关系数

spearman_cor 和 pearson 的值,以及 lncRNA 与 mRNA 的位置关系和结合能的判定。结果显示,得到 15 350 个潜在相关靶基因,其中潜在顺式作用(cis)靶基因 13 907 个,潜在反式作用(trans)靶基因 1 448 个;在 $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$, $\text{FDR} \leq 0.01$ 显著选择下,差异显著的靶基因 2 676 个。犏牛与牦牛差异倍数前 10 的 lncRNA 及其靶基因如表 2 所示。

2.4 差异 lncRNA 靶基因的 GO 和 KEGG 富集分析

GO 分析结果显示,差异显著 lncRNA 的靶基因参与到 58 个功能分类,注释到生物学过程、细胞组分及分子功能 3 大类,其中生物学过程中主要注释到细胞过程、单有机体过程、生物调节、代谢过程、生物过程的调控等,细胞组分主要涉及到细胞、细胞部分、细胞器、细胞膜、细胞器部分、细胞膜部分等,分子功能主要涉及到结合、催化活性、核酸结合转录因子活性、单传感器活性、分子功能活性等(图 4)。

KEGG 富集分析结果显示,牦牛睾丸组织和犏

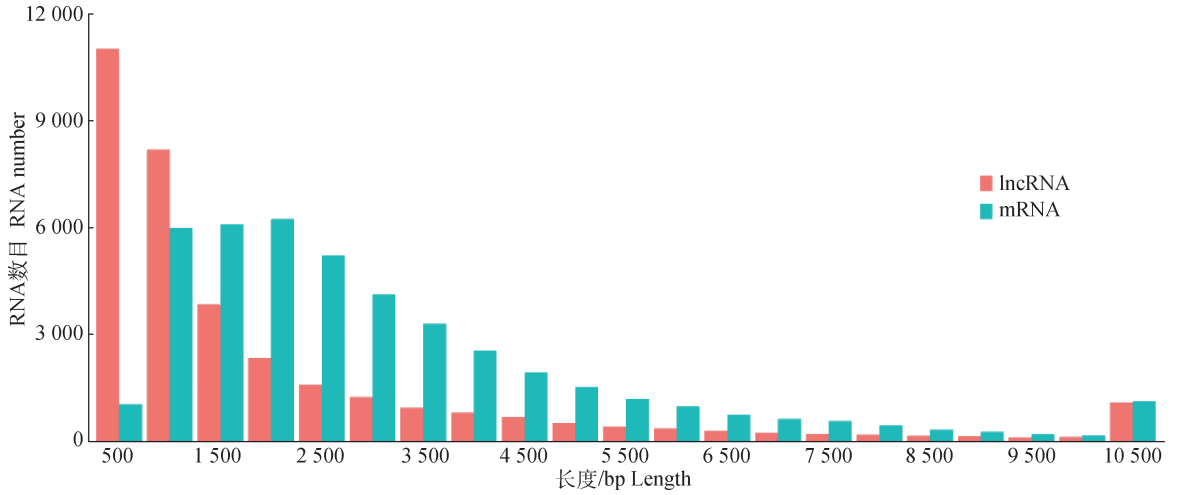
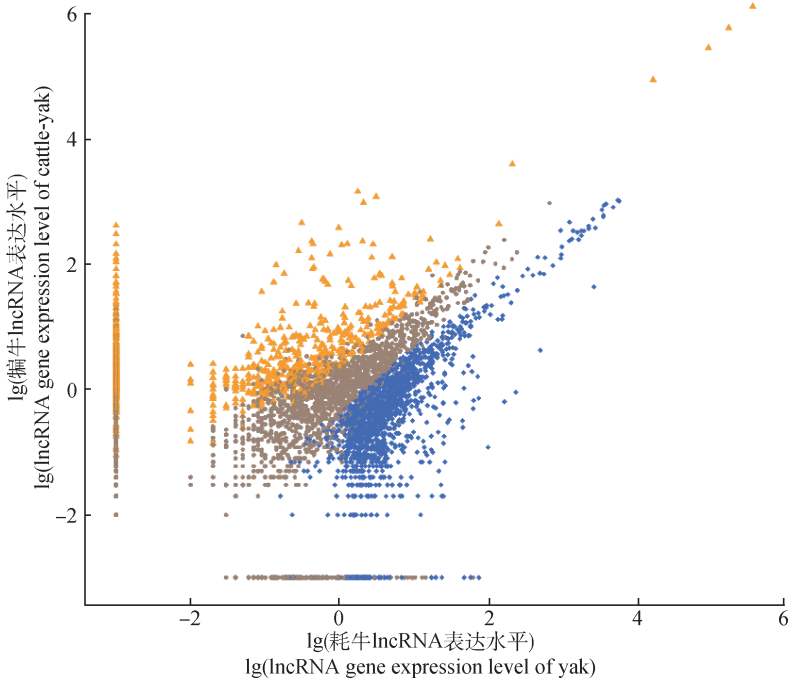


图 2 牦牛和犏牛 lncRNA 和 mRNA 转录本长度分布图
 Fig. 2 Transcript length distribution of yak and cattle-yak lncRNAs and mRNA



黄色. 上调基因; 棕色. 无显著差异基因; 蓝色. 下调基因
 Yellow is the up-regulated gene; brown is the no significantly different gene; blue is the down-regulated gene

图 3 样本间的差异 lncRNA 散点图
 Fig. 3 Differentially expressed lncRNA scatter plot

牛睾丸组织差异表达 lncRNA 的靶基因共富集到 306 个通路上,富集程度较高的前 10 的通路如表 3 所示,其中富集程度最高的是轴突指导(axon guidance),其次为内吞(endocytosis)和 Hedgehog 信号通路(hedgehog signaling pathway)等。

2.5 lncRNA 的表达验证

根据荧光定量 PCR 结果的差异倍数 \log_2 (犏

牛/牦牛)与转录组测序结果中 \log_2 (Fold change) 的比较,结果表明:LTCONS_00024718、LTCONS_00056498、LTCONS_00041936、LTCONS_00028984 的荧光定量结果与转录组结果都上调;LTCONS_00054787、LTCONS_00056576、LTCONS_00023375、LTCONS_00074328 的荧光定量结果与转录组结果都下调(图 5),表明荧光定量 PCR 的验证与转录组

测序数据趋势一致。

表 2 差异倍数最大的前 10 lncRNA 及其上调和下调靶基因

Table 2 Top 10 up-regulated and top 10 down-regulated lncRNA with the greatest fold changes and its target genes

lncRNA	log ₂ (犏牛/牦牛)	预测靶基因 Predicted target gene
LTCONS_00006319	17.018	<i>BEX2</i> (brain expressed X-linked 2)
LTCONS_00012062	16.207	<i>BEX2</i> (brain expressed X-linked 2)
LTCONS_00006600	16.116	<i>ATRX</i> (ATP-dependent helicase)
LTCONS_00001764	15.636	<i>LZTFL1</i> (leucine zipper transcription factor-like 1)
LTCONS_00082697	15.486	<i>MAP7D2</i> (MAP7 domain containing 2)
LTCONS_00025579	15.412	<i>PTPN4</i> (tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4)
LTCONS_00081706	14.725	<i>PPFIA1</i> (PTPRF interacting protein alpha 1)
		<i>PTGDS</i> (prostaglandin D2 synthase 21 ku)
LTCONS_00001358	14.672	<i>LCNL1</i> (Lipocalin like 1)
		<i>ABCA2</i> (ATP-Binding Cassette transporter 1)
LTCONS_00043121	14.638	<i>MMP15</i> (matrix metalloproteinase 15)
LTCONS_00037339	14.504	<i>PDCD6IP</i> (programmed cell death 6 interacting protein)
LTCONS_00060715	-13.034	<i>MEST</i> (mesoderm specific transcript)
LTCONS_00066787	-12.953	<i>SRGAP3</i> (slit-Robo GTPase-activating proteins 3)
LTCONS_00033187	-12.840	<i>GLIS3</i> (GLI-similar 3)
LTCONS_00054778	-12.563	<i>IGF2</i> (insulin-like growth factor II)
LTCONS_00036367	-12.409	<i>TMEM26</i> (transmembrane protein 26)
LTCONS_00076700	-12.388	<i>LGALS4</i> (lupus familiaris galectin-4)
LTCONS_00028394	-12.383	<i>NOTCH2</i> (neurogenic locus notch homolog protein 2)
		<i>HOXA11</i> (homeo box A11)
		<i>HOXA10</i> (homeo box A10)
LTCONS_00045161	-11.888	<i>GFPT2</i> (glutamine fructose-6-phosphate transaminase 2)
		<i>HSD3B7</i> (3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase)
LTCONS_00001002	-11.865	<i>SETD1A</i> (SET domain containing protein 1A)

表 3 DElncRNAs 差异靶基因 KEGG 富集前 10 通路

Table 3 Top 10 enriched KEGG pathways in DElncRNAs

KEGG 通路	差异基因数	P 值
KEGG pathway	DEGs number	P-value
轴突指导 Axon guidance	64	2.146×10^{-7}
内吞作用 Endocytosis	84	3.468×10^{-5}
Hedgehog 信号通路 Hedgehog signaling pathway	20	6.615×10^{-5}
前列腺癌 Prostate cancer	28	8.364×10^{-5}
cGMP-PKG 信号通路 cGMP-PKG signaling pathway	51	9.141×10^{-5}
基底细胞癌 Basal cell carcinoma	19	1.061×10^{-4}
Wnt 信号通路 Wnt signaling pathway	43	1.062×10^{-4}
microRNA 在癌症中 microRNAs in cancer	49	4.104×10^{-4}
钙信号通路 Calcium signaling pathway	55	4.432×10^{-4}
肾素分泌 Renin secretion	25	4.437×10^{-4}

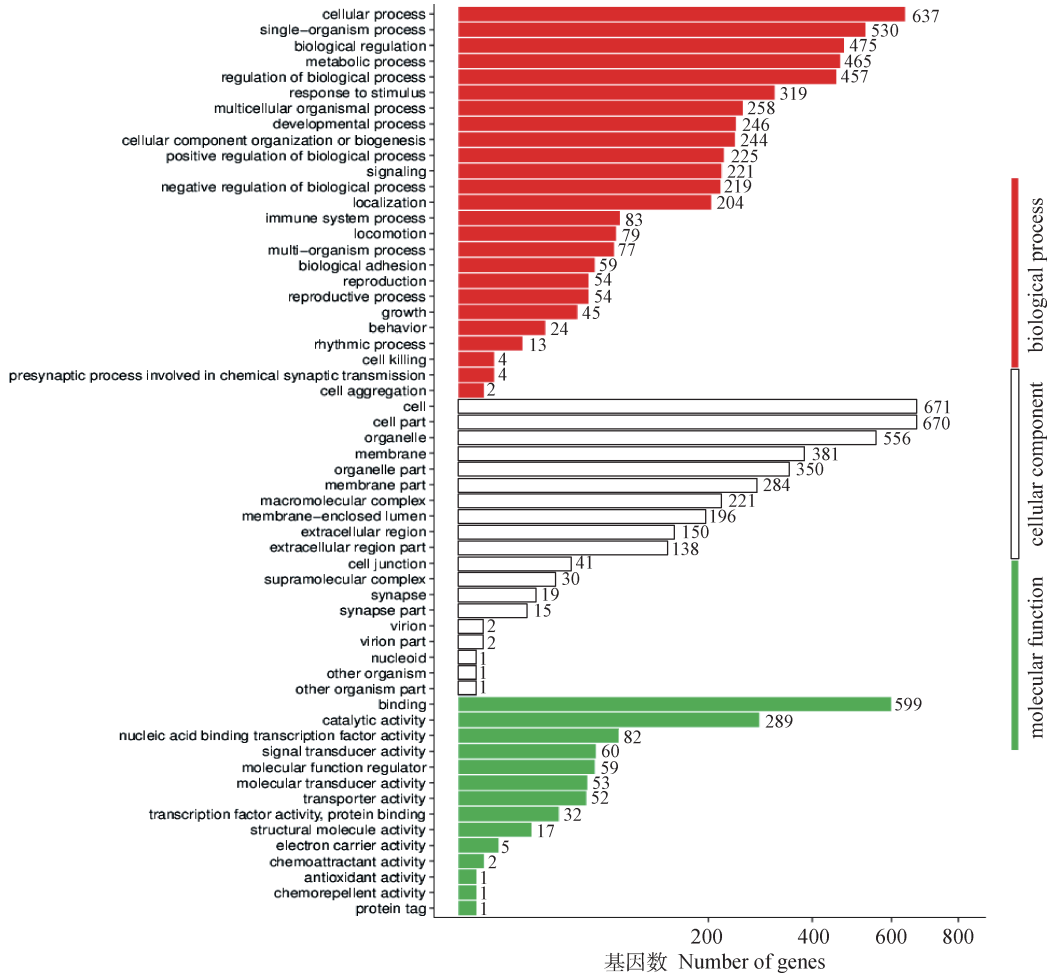


图 4 GO 分析差异 lncRNA 靶基因

Fig. 4 GO analysis of the target genes of DElncRNAs

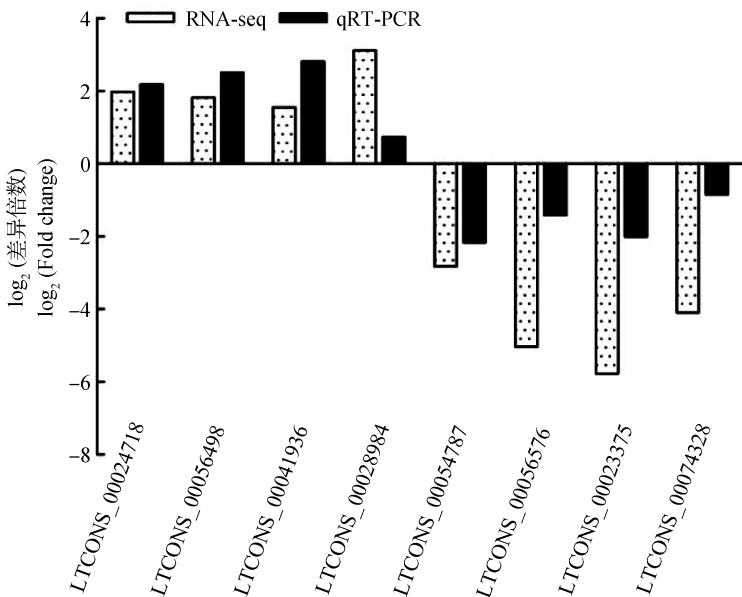


图 5 qRT-PCR 结果与测序结果比较

Fig. 5 Comparison of the results between RNA-seq and qRT-PCR

3 讨论

本研究以 F1 代犏牛雄性不育为出发点,对牦牛与犏牛睾丸组织分别进行高通量测序,鉴定出 lncRNA,并筛选出差异表达候选 lncRNA 的靶基因,在转录组层面上为探讨犏牛 F1 代雄性不育与 lncRNA 可能存在的关联提供有价值的信息。在犏牛样本中结果鉴定得到 24 133 个候选 lncRNA,其中在 $|\log_2(\text{Fold change})| \geq 1$, $\text{FDR} \leq 0.01$ 的过滤条件下,与牦牛对比存在显著差异 lncRNA 6 178 个,并预测出差异靶基因 2 676 个,GO 分析靶基因表达注释涉及到 3 大功能中有 25 个注释到生物过程,19 个注释到细胞组成部分,15 个注释到分子功能部分;在生物过程中,差异显著的靶基因较为富集包括细胞过程、单有机体过程、代谢过程等,但是除了这些常规的富集过程外,发育、生殖和细胞组成或生物发生也占了部分比重,此结果可能与犏牛较牦牛睾丸组织结构的异常相关^[11]。在细胞组成部分,差异靶基因较为富集除包括细胞、细胞部分、细胞器等这类常规的富集类别外,还包括高分子复合物、超分子复合物、细胞结合等类别。犏牛精子发生的阻滞是造成犏牛雄性不育的主要原因之一,核酸、蛋白质是生物体内重要的高分子化合物,而核酸中 DNA 担负传递遗传信息并通过转录翻译后表达为蛋白,推测这可能与犏牛多基因遗传不平衡相关^[12]。染色体、核糖体属于超分子复合物,研究发现犏牛仅有少数的精母细胞能够形成联会复合体^[13],并且 F1 代犏牛异源的 X 染色体和 Y 染色体不能够协调共存,平衡被扰乱等异常可能与此富集相关;另外,F1 代犏牛生精细胞无精子,支持细胞和间质细胞等存在异常可能与细胞组成差异相关。在分子功能类别中,差异的靶基因主要富集于结合、催化活性外,核酸结合转录因子的活性与蛋白结合转录因子活性,DNA 同转录因子的相互作用可以调控基因的表达,从而在犏牛的生长和发育中发挥重要作用^[14]。

KEGG 结果显示富集程度前 10 通路中,包括轴突指导、Hedgehog 信号通路、cGMP-PKG 信号通路、Wnt 信号通路与钙信号通路。其中,轴突内不同的第二信使水平包括钙离子(Ca^{2+})、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)等是决定导向信号能发生何种反应的因素。因此,轴突导向与信号通路有密不可分的联系,不同的信号通路决定了不同的调控作用。Hedgehog 信号通路在控制细胞增殖、

调节细胞分化及保持成体干细胞的自稳态中起着非常重要的作用,甚至该通路的异常激活也会导致许多疾病发生^[15]。在 Hedgehog 信号通路中参与精原干细胞分化更新相关的 *CCND1* 基因和细胞抗凋亡基因 *BCL-2* 等出现了下调,推测可能是因为 lncRNA LTCONS_00072845 的下调影响其靶基因 *CCND1* 的低水平表达,低水平的 *CCND1* 会影响细胞的增殖,诱导细胞凋亡^[16],从而导致各级生殖细胞发育与凋亡过程的异常造成精子不能正常的发育与成熟。Hedgehog 家族成员作为细胞间的信号蛋白是胚胎发育过程中许多基本过程的关键介质,信号是由一种胶质瘤相关癌基因同系物(*GLI*)家族的锌指转录因子介导的,其中可能是 lncRNA LTCONS_00004788 的调控改变了靶基因 *GLI3* 的表达,*GLI3* 的下调可能对犏牛早期生长发育有影响^[17]。cGMP-PKG 信号转导途径可以影响精子的运动性、睾丸生殖细胞的发育、腹周膜的放松、睾丸激素的合成以及睾丸血管的扩张^[18]。Wnt 信号通路对于发育过程中的不同过程和成年动物组织内环境稳态来说是至关重要的。Wnt 信号的扰动会导致先天缺陷、癌症和其他疾病,规范的 Wnt 信号是成年哺乳动物正常睾丸功能的一部分^[19-20]。在 Wnt 信号通路中的轻微扰乱会引起生殖细胞的损失与凋亡,并证明通过灭活 β -连环蛋白(β -catenin)的功能能够使小鼠的精子发生失败以及使 Wnt 信号升高后造成成年小鼠精子发生障碍^[21]。另外, Ca^{2+} 是个普遍的第二信使,它调节各种生理功能,如收缩、分泌、新陈代谢、增殖等^[22]。通过对 Ca^{2+} 的正调控可以促使睾丸支持细胞中调节精子形成的两种激素睾酮和促卵泡素的增加^[23],推测犏牛促卵泡素分泌不足以及细胞扩张^[24]与钙离子的调控相关。内吞作用机制是控制着细胞膜的脂质和蛋白质组成,从而调节细胞与环境的相互作用。与内吞通路相关的早期内体抗原 1(early endosome antigen 1, *EEA1*)基因受雄性激素调控影响成年小鼠睾丸中的精子发生^[25],推测是 *EEA1* 受到 lncRNA LTCONS_00007420 的调控表达量降低,影响内吞通路细胞和环境相互作用,从而对犏牛的精子发生产生影响。micro-RNAs 在调节哺乳动物精子发生过程中也发挥重要的作用^[10],其中已证实与精子发生相关的 microRNA 如 miR-122、miR-383、miR-34 等在该通路中出现了失调。另外 3 个富集通路都是与疾病相关的,基底细胞癌通路中因为其中涉及到 Wnt

信号通路以及 Hedgehog 信号通路中部分基因的介导,在基底细胞癌通路中除了肿瘤抑制因子补丁蛋白同系物 1(patchd 1, *PTCH1*)基因上调外,其他与通路相关的差异基因均出现了下调,通路中抑制肿瘤的增殖,促进了细胞凋亡的发生。在前列腺癌通路中,成纤维生长因子受体 1(fibroblast growth factor receptor 1, *FGFR-1*)作为精子发生的必要条件^[26],犏牛睾丸中 *FGFR-1* 受到 lncRNA LTCONS_00023912 的调控出现下调,从而可能影响到犏牛的精子发生;有研究表明前列腺癌通路的激活与雄性不育存在一定关联^[27],雄激素大多数生理作用是由雄激素受体(androgen receptor, *AR*)介导的, *AR* 作为 lncRNA LTCONS_00012265 的靶基因,其功能在男性中是必不可少的,用于适当的性别分化、青春期发育和正常精子形成的调节^[28],推测前列腺癌通路中 *FGFR-1*、*AR*、*BCL-2* 以及细胞周期蛋白 D1 的下调可能对犏牛较牦牛呈现出性情温顺、睾酮表达下调以及精子发生阻滞产生一定的影响。有研究发现高密度饮食造成血清中睾酮和雌二醇、芳香化酶和促黄体激素受体的基因和蛋白质的异常表达以及睾丸形态的改变,通过血管紧张性转化酶抑制剂可以恢复正常^[29]。由此推测肾素-血管紧张素通路可能在睾丸和激素正常的生殖调控中起关键作用。

在 lncRNA 差异中,在前 10 的 lncRNA(表 2)上调中,其靶基因前列腺素 D2 合成酶 21 ku (prostaglandin D2 synthase 21 ku, *PTGDS*)在公鸡弱精子症的研究中,弱精症的公鸡睾丸中 *PTGDS* 的表达极显著高于正常公鸡^[30],上调与雄性不育相关除 *PTGDS* 外,笔者并未发现其他的前 10 上调 lncRNA 的靶基因与雄性不育有相关联系性的研究。其中,亮氨酸拉链转录因子样 1(leucine zipper transcription factor-like 1, *LZTFL1*)、蛋白酪氨酸磷酸酶非受体 4(tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4, *PTPN4*)同样作为肿瘤抑制因子,程序性细胞死亡 6 相互作用蛋白(programmed cell death 6 interacting protein, *PDCD6IP*)作为细胞凋亡基因,其相对的高表达能诱导细胞凋亡^[31-33]。在前 10 lncRNA 下调的靶基因中,胰岛素样生长因子 2(insulin-like growth factor II, *IGF2*)是细胞增殖、分化和发育的有效刺激因子;中胚层特异性转录本(mesoderm specific transcript, *MEST*)是位于人染色体 7q32 上的印记基因,已有研究发现在特发性不

育患者存在 *IGF2* 的低甲基化和 *MEST* 的高甲基化情况与其精子质量差相关^[34],由此可推测可能是其对应 lncRNA 的介导基因的甲基化,从而下调了基因的表达。锌指转录因子 Gli 类似物 3(GLI-similar 3, *GLIS3*)是一种转录因子,通过敲除小鼠睾丸的 *GLIS3* 基因发现小鼠睾丸显著变小,生殖细胞显著减少,纯合敲除小鼠几乎没有精子产生^[35],可见犏牛中 *GLIS3* 的下调可能是其雄性不育原因之一。同源框基因 A10(homeo box A10, *HOXA10*)和同源框基因 A11(homeo box A11, *HOXA11*)基因的突变会导致睾丸的异常发育,精子生成障碍^[36-37]。NOTCH 信号的激活增加了精原细胞的凋亡和睾丸重量的减小,在生殖细胞中有条件地敲除 *NOTCH1*(neurogenic locus notch homolog protein 1)对精子形成和男性生殖力没有影响,可能是其它家族成员的补偿作用^[38],犏牛较牦牛 *NOTCH2* 的下调可能与犏牛雄性不育相关,仍需进一步研究证实。

4 结 论

本研究采用 RNA-seq 测序技术对成年健康雄性犏牛和牦牛睾丸组织进行转录组测序,筛选出差异常 lncRNAs,并对差异显著的 lncRNAs 与其共表达的差异顺式和反式作用靶基因进行生物信息学分析,推测 lncRNA 可能在犏牛的进化发育中对其雄性不育具有重要的调节作用,为从 lncRNA 的角度分析犏牛与牦牛睾丸组织在转录组中的差异及犏牛雄性不育的进一步研究提供理论依据。

参考文献(References):

- [1] WANG S, PAN Z, ZHANG Q, et al. Differential mRNA expression and promoter methylation status of SYCP3 gene in testes of yaks and cattle-yaks[J]. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47(3): 455-462.
- [2] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [3] ZHAN S Y, DONG Y, ZHAO W, et al. Genome-wide identification and characterization of long non-coding RNAs in developmental skeletal muscle of fetal goat [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 666.
- [4] CHEN X, YAN G Y. Novel human lncRNA-disease association inference based on lncRNA expression profiles [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(20): 2617-

- 2624.
- [5] ZHANG C W, GAO L Z, XU E Y. LncRNA, a new component of expanding RNA-protein regulatory network important for animal sperm development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2016, 59:110-117.
- [6] BAO J Q, WU J W, SCHUSTER A S, et al. Expression profiling reveals developmentally regulated lncRNA repertoire in the mouse male germline[J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(5):107.
- [7] PONTING C P, OLIVER P L, REIK W. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4):629-641.
- [8] LIANG M, LI W Q, HUI T, et al. Sequential expression of long noncoding RNA as mRNA gene expression in specific stages of mouse spermatogenesis[J]. *Sci Rep*, 2014, 4:5966.
- [9] 曾贤彬, 柴志欣, 王永, 等. 犏牛精子发生阻滞的比较转录组研究[J]. 中国科学:生命科学, 2014, 44(6):584-601.
ZENG X B, CHAI Z X, WANG Y, et al. Comparative transcriptome analysis of spermatogenesis arrest in cattle-yak[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2014, 44:584-601. (in Chinese)
- [10] XU C F, WU S X, ZHAO W S, et al. Differentially expressed microRNAs between cattleyak and yak testis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):592.
- [11] 卢建远, 方向东. F1 代犏牛睾丸的解剖组织结构研究[J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(12):61-63.
LU J Y, ZI X D. Study on anatomical structure of F1 generation cattle-yak testicles[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2014, 46(12):61-63. (in Chinese)
- [12] 钟金城. 犏牛雄性不育的多基因遗传不平衡假说[J]. 西南民族大学学报:自然科学版, 1997, 23(1):90-92.
ZHONG J C. Polygenic inheritance unbalance hypothesis about sterility of the male yak-cattle[J]. *Journal of Southwest Nationalities College: Natural Science Edition*, 1997, 23(1):90-92. (in Chinese)
- [13] 屈旭光, 李齐发, 刘振山, 等. 牦牛、犏牛睾丸组织中 SYCP3 基因 mRNA 表达水平研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(8):1132-1136.
QU X G, LI Q F, LIU Z S, et al. The study on the expression level of SYCP3 mRNA in yak and cattle-yak testis [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(8):1132-1136. (in Chinese)
- [14] ZAMANIGHOMI M, LIN Z X, WANG Y, et al. Predicting transcription factor binding motifs from DNA-binding domains, chromatin accessibility and gene expression data[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(10):5666-5677.
- [15] DICKSON B J. Molecular mechanisms of axon guidance[J]. *Science*, 2002, 298(5600):1959-1964.
- [16] FU M F, WANG C G, LI Z P, et al. Minireview: cyclin D1: normal and abnormal functions[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(12):5439-5447.
- [17] HUANG Y Z, WANG K Y, HE H, et al. Haplotype distribution in the *GLI3* gene and their associations with growth traits in cattle[J]. *Gene*, 2013, 513(1):141-146.
- [18] MIDDENDORFF R, DAVIDOFF M S, BEHREND S, et al. Multiple roles of the messenger molecule cGMP in testicular function [J]. *Andrologia*, 2000, 32(1):55-59.
- [19] MACDONALD B T, TAMAI K, HE X. Wnt/ β -catenin signaling: components, Mechanisms, and Diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1):9-26.
- [20] CLEVERS H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease[J]. *Cell*, 2006, 127(3):469-480.
- [21] KERR G E, YOUNG J C, HORVAY K, et al. Regulated wnt/beta-catenin signaling sustains adult spermatogenesis in mice[J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(1):3.
- [22] BERRIDGE M J. Calcium signalling remodelling and disease[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(2):297-309.
- [23] LOSS E S, JACOBUS A P, WASSERMANN G F. Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: calcium inflow and electrophysiological changes [J]. *Life Sci*, 2011, 89(15-16):577-583.
- [24] 廖珂. 牦牛、普通牛和犏牛睾丸组织 microRNA 的比较研究[D]. 成都:西南民族大学, 2016:6-13.
LIAO K. Comparative analysis of micro RNA in yak, ordinary cattle and catttle-yak testis tissue [D]. Chengdu: Southwest Minzu University, 2016:6-13. (in Chinese)
- [25] KUMAR A, DUMASIA K, DESHPANDE S, et al. Direct regulation of genes involved in sperm release by estrogen and androgen through their receptors and coregulators[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 171:66-74.
- [26] COTTON L, GIBBS G M, SANCHEZ-PARTIDA L G, et al. FGFR-1 signaling is involved in spermiogenesis and sperm capacitation[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(1):75-84.
- [27] RUHAYEL Y, GIWERCMAN A, ULMERT D, et al.

- Male infertility and prostate cancer risk: a nested case-control study[J]. *Cancer Causes Control*, 2010, 21(10): 1635-1643.
- [28] SOLAKIDI S, PSARRA A M G, NIKOLAROPOULOS S, et al. Estrogen receptors α and β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in human sperm; localization of ER β and AR in mitochondria of the Midpiece[J]. *Human Reprod*, 2005, 20(12): 3481-3487.
- [29] ALVES-PEREIRA J L, FRANTZ E D, DA FONTE RAMOS C. Beneficial effects of Renin-Angiotensin system blockers on testicular steroidogenesis[J]. *J Urol*, 2014, 192(6): 1878-1883.
- [30] 富丽, 孙研研, 薛夫光, 等. 公鸡弱精症相关候选基因的表达分析[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(6): 889-895.
FU L, SUN Y Y, XUE F G, et al. The expression of the six candidate genes for asthenospermia of the rooster[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(6): 889-895. (in Chinese)
- [31] WEI Q, ZHOU W, WANG W N, et al. Tumor-suppressive functions of leucine zipper transcription factor-like 1[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2942-2950.
- [32] WU C W, CHEN J H, KAO H L, et al. PTPN3 and PTPN4 tyrosine phosphatase expression in human gastric adenocarcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(2B): 1643-1649.
- [33] YUE Y J, GUO T T, LIU J B, et al. Exploring differentially expressed genes and natural antisense transcripts in sheep (*Ovis aries*) skin with different wool fiber diameters by digital gene expression profiling[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129249.
- [34] POPLINSKI A, TÜTTELMANN F, KANBER D, et al. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of *MEST* and *IGF2/H19 ICR1*[J]. *Int J Androl*, 2010, 33(4): 642-649.
- [35] KANG H S, CHEN L Y, LICHTI-KAISER K, et al. Transcription factor GLIS3: a new and critical regulator of postnatal stages of mouse spermatogenesis[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(11): 2772-2783.
- [36] QUINONEZ S C, INNIS J W. Human *HOX* gene disorders[J]. *Mol Genet Metab*, 2014, 111(1): 4-15.
- [37] HSIEH-LI H M, WITTE D P, WEINSTEIN M, et al. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility[J]. *Development*, 1995, 121(5): 1373-1385.
- [38] HUANG Z H, RIVAS B, AGOULNIK A I. NOTCH1 gain of function in germ cells causes failure of spermatogenesis in male mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e71213.

(编辑 程金华)