

猪胚胎附植期 *Eph A4* 的组织表达及其多态性对产仔数的影响

付言峰^{1,2} 王爱国² 李兰³ 傅金銮² 方晓敏¹ 王学敏¹ 李碧侠¹ 任守文^{1*}

(1. 江苏省农业科学院 畜牧研究所,南京 210014; 2. 中国农业大学 动物科学技术学院,北京 100193;
3. 中国农业大学 动物医学院,北京,100193)

摘要 为研究 *Eph A4* 对猪繁殖性能的影响,在猪妊娠第 13 天(附植前期)、第 18 天(中期)和第 24 天(后期),用 PCR-SSCP 方法检测了 7 个品种的 950 头母猪群中 *Eph A4* 基因的多态性,检测了 *Eph A4* 基因在大白猪子宫内膜等组织中的 mRNA 和蛋白表达量,并与猪的产仔数进行了关联分析。结果表明:*Eph A4* 基因在子宫内膜附着点的 mRNA 表达量要高于任何其他组织的,且妊娠第 13、18 和 24 天的表达量差异不显著,但妊娠猪极显著低于空怀猪的($P < 0.01$);*Eph A4* 的蛋白表达量在附植前、中和后期的表达量两两间差异均显著($P < 0.05$),且妊娠第 18 天最高,妊娠第 24 天最低。*Eph A4* 基因第 3 外显子上检测到了 2 个突变位点 EphA4_1 和 EphA4_2。EphA4_1 是一个 A→G 的突变,使谷氨酸变成了赖氨酸,G 为优势等位基因,且 GG 基因型关联的产仔数显著高于 AG 或 GG 基因型的($P < 0.05$);EphA4_2 是一个 T→C 的突变,C 为优势等位基因,且 CC 基因型关联的产仔数显著高于 TC 或 TT 基因型的($P < 0.05$)。上述结果表明,*Eph A4* 的表达对猪的胚胎附植发挥着一定的调控作用,EphA4_1 位点 GG 基因型和 EphA4_2 位点 CC 基因型可以作为产仔数性状的标记基因型。

关键词 猪; *Eph A4*; 胚胎附植; 表达; 多态性; 产仔数

中图分类号 S 828;S 813.3

文章编号 1007-4333(2013)03-0128-10

文献标志码 A

Expression of *Eph A4* in tissues during embryo implantation and its polymorphism influence on litter size in pigs

FU Yan-feng^{1,2}, WANG Ai-guo², LI Lan³, FU Jin-luan², FANG Xiao-min¹,
WANG Xue-min¹, LI Bi-xia¹, REN Shou-wen^{1*}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

3. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Erythropoietin-Producing Hepatocellular receptor A4 (*Eph A4*) plays a role of regulating embryo implantation in some mammals. In order to investigate *Eph A4* effect on swine reproduction performances, mRNA and protein expression of *Eph A4* in endometrium of Yorkshire was detected on pregnancy day-13 (pre-implantation), day-18 (mid-implantation) and day-24 (post-implantation). Association of *Eph A4* polymorphism with the reproductive traits was assessed by SSCP in 950 sows of seven breeds. Results showed that, mRNA expression intensity on endometrium attachment sites was higher than any other tissues. There were no significant differences in mRNA expression intensity on pregnancy day 13, 18 and 24, however, the mRNA intensity in pregnant sows was significantly lower than in non-pregnant sows ($P < 0.01$). There were significant differences in protein expression among pregnancy day 13, 18 and 24 ($P < 0.05$), and it expressed highest on 18 d and lowest on 24 d. Two single nucleotide polymorphism (SNP) loci, EphA4_1 and EphA4_2 in Exon 3 of *Eph A4* gene were determined whether *Eph A4* polymorphism influenced litter size.

收稿日期: 2012-08-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31201767,31172176); 江苏省博士后科研资助计划经费; 江苏省农业科学院博士后基金(026056511104); 江苏省农业种质资源库(BM2011134)

第一作者: 付言峰, 助理研究员, 博士, 主要从事猪遗传育种与繁殖研究, E-mail: fuyanfeng@gmail.com

通讯作者: 任守文, 研究员, 主要从事猪遗传育种与生产研究, E-mail: renshouwen@yahoo.com.cn

At *EphA4_1* locus, there was a A/G transition, and the A/G mutation directly caused an amino acid change, from glutamic acid into lysine acid; G allele seemed to have advantageous effects on litter size, and litter size associated with GG was significantly higher than that of AG or AA ($P < 0.05$). At *EphA4_2* locus, C allele seemed to have advantageous effects on litter size, and litter size associated with CC was significantly higher than that of TC or TT ($P < 0.05$). In conclusion, *Eph A4* expression might play role in the regulation of embryo implantation in pigs, GG genotype at *EphA4_1* and CC genotype at *EphA4_2* were favorable marker genotypes for litter size.

Key words pig; *Eph A4*; embryo implantation; expression; polymorphism; litter size

猪产仔数是重要的繁殖性状和经济性状^[1-2]。由于猪的产仔数性状遗传力(10%~15%)非常低,所以用传统的选择手段进行猪产仔数的育种比较困难^[3]。随着分子生物学技术的发展,分子标记辅助选择技术(Marker-assisted selection, MAS)为选育猪产仔数性状提供了一个新的手段,这就需要发现大量影响猪重要性状的分子标记。目前主要用候选基因法挖掘这些分子标记,其基本原理是假设所选标记或基因本身就是影响性状的主效基因,再利用比较医学、比较基因组学等的研究结果,将其他物种(如人类、小鼠等)中发现的控制某些同类或相似性状的基因作为畜禽经济性状的候选基因^[4]。采用候选基因法,现已发现许多影响猪产仔数性状的主效基因,如第一个成功与猪产仔数关联的基因-雌激素受体基因(estrogen receptor, *ESR*)^[4]、催乳素受体基因(prolactin receptor, *PRLR*)^[5]、视黄醇结合蛋白4基因(retinol-binding protein 4, *RBP4*)^[6]和白血病因子(leukemia factor, *LIF*)^[7]等。

胚胎附植是一个在妊娠建立过程中的重要步骤,因为很多的胚胎在这个过程中死亡^[8],而早期胚胎(妊娠第10~30天)的死亡是导致产仔数下降的一个重要原因^[9],所以胚胎附植期非常重要,研究影响胚胎附植的基因表达也非常重要。目前,有研究表明 *Eph-Ephrin* 系统在人^[10-12]和小鼠^[13]的胚胎附植过程中发挥着重要作用。*Eph A4* 是 *Eph-Ephrin* 家族中非常重要的基因,是一个编码多效性细胞的因子,通常在子宫内膜上表达 mRNA 直至产生 *Eph A4* 蛋白质^[13]。用免疫组化和 RT-PCR 方法,已证明在小鼠妊娠的第 1.5~5.5 天之间, *Eph A4* 基因在小鼠的子宫内膜腔上皮细胞和腺上皮细胞上均可持续地表达^[13]。*Eph A4* 可以连接 *Ephrin A* 和 *Ephrin B* 亚系基因,使 A 和 B 亚系在“窗口期”可以严格地相互作用^[14],所以 *Eph A4* 可能在 *Eph-Ephrin* 系统内发挥着关键作用。

本研究为探讨 *Eph A4* 作为猪繁殖性状候选基因的可能性,试验分离猪 *Eph A4* 基因的部分序列,

分析这个基因在 17 种组织中的表达,旨在为猪胚胎附植调控机理研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

多态性研究的试验材料来自于北京华都种猪繁育有限公司、浙江大学实验牧场、金华种猪场和金华农校,共计 950 头母猪,包括 250 头长白猪、420 头大白猪、95 头约克夏猪、44 头二花脸猪、48 头苏钟猪、45 头梅山猪和 48 头金华猪。耳组织采集后放在含 70%乙醇的 1.5 mL 离心管中, -20 °C 保存;试验猪血样采用 0.5 mol/L EDTA 抗凝剂抗凝, -20 °C 保存。耳组织样基因组使用高盐法提取,血样基因组使用酚-仿抽提法提取^[15],之后溶解到 TE 溶剂中,于 4 °C 保存。产仔数记录包括个体号、场-年-季、品种、胎次、总产仔数(total number born, TNB)和产活仔数(number born alive, NBA)等。

基因表达研究的试验材料来自于北京华都种猪繁育有限公司,以 9 头大白母猪为研究对象,按猪场常规进行饲喂和管理,同时在自由采食及饮水条件下,注意进行疾病的防治和行为体况的观察。在同场、相同管理条件下进行单圈饲养,进行同期发情处理(间隔 12 h 左右重复授精 2~3 次),相同种公猪精液授精妊娠。以最后一次配种为 0 d 计,分别在配种第 13 天(附植前期)、第 18 天(附植中期)和第 24 天(附植后期),各屠宰 3 头健康的 3 或 4 胎龄体况基本一致的全同胞纯种大白母猪。每头猪采集 6 种繁殖组织(卵巢、输卵管、子宫内膜附植点、子宫内膜非附植点、子宫体和子宫颈)和 17 种全身组织(大脑皮层、下丘脑、垂体、脊髓、心脏、肝脏、脾、肺、肾、肾上腺、胃、胰腺、大肠、小肠、膀胱、肌肉和脂肪)。观察并采集母猪子宫内膜、母-胎界面及胚泡或胚胎组织,部分组织立即液氮冷冻随后提取总 RNA,另对部分组织用 4%多聚甲醛(仲甲醛)固定 24 h,贮存于 70%乙醇中直至进行常规的石蜡包埋处理。

1.2 引物设计

到目前为止,对猪 *Eph A4* 基因的各个外显子划分仍未有详细的报道。利用 DNAMAN 软件,将人 *Eph A4* 基因的各外显子序列(GenBank NM_004438)、小鼠 *Eph A4* 基因的各外显子序列(GenBank NM_007936.3)分别与猪的 cDNA

(GenBank NM_001134967.1)序列进行比对,初步确定了猪 *Eph A4* 基因外显子序列及其各外显子边界,并划分出 17 个外显子,其中第 3 外显子最长,为 664 bp。因而本研究主要针对第 3 外显子设计引物,由上海英潍捷基(Invitrogen)生物公司合成(表 1)。

表 1 猪 *Eph A4* 基因第 3 外显子的 PCR-SSCP 分析用引物序列及反应条件

Table 1 Primer pairs and PCR conditions used in the PCR-SSCP analysis of the swine Exon 3 in *Eph A4* gene

引物 Primers	引物序列 Sequences(5'→3')	退火温度/℃ Temperature	产物长度/bp Product size
EphA4_31	AAGTGTGCAACGTGATGGAA GGTTTTAACTGTGGTAGCGG	59	236
EphA4_32	GAGCGTTTTATCCGAGAGAG GCGAGATTGCGAACTGTGAG	61	236
EphA4_33	CACTGAGCAAAAAGGGGTTC GCATTCTCCATTCCGCTCTT	59	296
EphA4_1	AGGGGTCTCTATCTGGCGTTT CAGTACATTTTTGGCACATCC	60	204
EphA4_2	GGATGTGCCAAAAATGTACTG GCATTCTCCATTCCGCTCTT	59	100
<i>GAPDH</i>	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTA	62	452

1.3 聚合酶链式反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)

PCR 反应体系(15 μL): $10\times$ buffer 1.5 μL , dNTP mix(10 mmol/L) 0.5 μL , 上下游引物(10 pmol/ μL)各 0.5 μL , *Taq* 酶(10 U/ μL) 0.5 μL , 模板 DNA(100 ng/ μL) 1.0 μL , 加灭菌 ddH₂O 至 15 μL 。反应条件:PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min;35 个循环(94℃ 变性 40 s;55℃ 退火 30 s;72℃ 延伸 90 s);72℃ 终延伸 7 min;4℃ 保存。取 3 μL PCR 产物,加 1 μL $10\times$ Loading buffer 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

SSCP 反应:配制 30 mL 的聚丙烯酰胺凝胶液(30% 丙烯酰胺 8.0~12.0 mL, $10\times$ TBE 3 mL, 50% 甘油 3 mL, 10% 过硫酸铵 210 μL , TEMED 20 μL , 蒸馏水 16.0~12.0 mL),混合均匀后迅速灌胶。加上样液(2 μL PCR 产物, 8 μL 变性 Buffer), 98℃ 变性 10 min, 迅速置于冰上,冰浴 8 min。110 V, 电泳 10~15 h。用 0.1% 的硝酸银染色 15 min

后,倒掉,用蒸馏水把胶再洗一下;直接用 2% 的氢氧化钠显色约 15 min 左右,中间可以观察一下,最后直接用蒸馏水终止显色。

1.4 反转录 PCR(RT-PCR)

反转录 PCR 是以 cDNA 为模板,分别 PCR 扩增 *Eph A4* 和 *GAPDH* 基因的目的片段。采用 25 μL 反应体系,即:ddH₂O 17.3 μL , $10\times$ Buffer 2.5 μL , 10 mmol/L dNTPs Mix 2.0 μL , 上下游引物(10 pmol/ μL)各 0.6 μL , cDNA 模板 1.5 μL , *Taq* 聚合酶(5 U/ μL) 0.5 μL 。PCR 反应条件:97℃ 预变性 5 min 后进行 30 次循环(95℃ 30 s, 退火温度见表 1, 30 s, 72℃ 1 min),再 72℃ 延伸 10 min,降温至 4℃ 停止反应并于 -20℃ 保存。*GAPDH* 持家基因的扩增循环次数为 27 次。

1.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)

猪子宫内膜组织样本用蛋白裂解液(0.05 mol/L Tris·HCl, NaCl 8.76 mg/mL, 1% TritonX-100

and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PMSF)裂解,提取出的总蛋白用 BCA 蛋白定量试剂盒(Sunbio)检测。1)电泳:50~100 μg 的蛋白样品通过 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白的分离。2)转膜:将蛋白转移到 PVDF 膜(BioRad),转膜完毕后,将膜取出放入 TBS-T 中洗 1 次,时间 5 min。3)封闭:用 TBST 配制 5%脱脂奶粉,将膜浸入后,室温放置 1 h。4)一抗孵育:用封闭液将一抗(Santa cruz)按照一定比例稀释,将膜与一抗一起孵育,4 度过夜。孵育结束,TBS-T 洗 3 次,每次 5 min。5)二抗孵育:用封闭液稀释 HRP 标记的二抗(Santa cruz),稀释比例 1:3 000,将稀释后的二抗与膜共同孵育 2~3 h。孵育结束,TBS-T 洗 3 次,每次 5 min。6)DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒经适当显色后,用水终止显色。ECL 曝光:使用 ECL 化学发光显色液。

1.6 研究模型

分别统计分析 2 个多态位点的基因频率和基因型频率,并进行 χ^2 适合性检验。建立模型 I 和模型 II 分析单个或 2 个位点的基因型或合并基因型效应与产仔数的关系。采用 SAS(Version 8.2)的 GLM 程序进行数据的处理与分析。不同基因型对应的产仔数用最小二乘均数±标准误(LS means±SE)来表示,模型如下

$$Y_{ijkl} = \mu + HYS_i + B_j + P_k + G_l + e_{ijkl} \quad (1)$$

$$Y_{ijklm} = \mu + HYS_i + B_j + P_k + Ga_l + Gb_m + (Ga_l \times Gb_m) + e_{ijklm} \quad (2)$$

式中: Y 为第 i 个场-年-季的第 j 个品种第 k 个胎次第 l 个基因型个体的生产性能(总产仔数 TNB 或产活仔数 NBA)观察值; μ 为群体均值; HYS_i 为第 i 个场-年-季的效应; B_j 为第 j 个品种的效应; P_k 为第 k 个胎次的效应; G_l 为基因型 l 的效应; Ga_l 为 a 位点 l 基因型的效应; Gb_m 为 b 位点 m 基因型的效应; e 为随机残差。

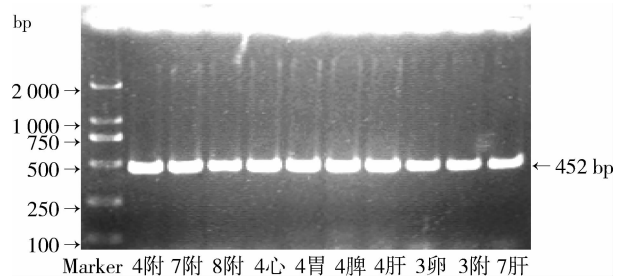
半定量处理后的数据采用 SAS 8.2 统计软件包进行 GLM 分析,并进行同一基因不同组织表达量的 Duncan 和最小二乘均数多重比较,结果以 LSmeans±SE 表示。实时荧光定量 PCR 的数据利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析,得到 *Eph A4* 的 mRNA 的相对表达量,内参基因为 *GAPDH*。

2 结果与分析

2.1 持家基因在部分组织中的 RT-PCR 结果

在随机提取的组织样 cDNA 中进行持家基因

(*GAPDH*)的 PCR 扩增,琼脂糖检测结果表明,用各组织样抽提的总 RNA 反转录出来的 cDNA 质量良好,可以进行下一步的定量 PCR 试验(图 1)。



从左至右分别为第 4、7、8 头猪的子宫内附点,第 4 头猪的心脏、胃、脾、肝,第 3 头猪的卵巢、子宫内附点和第 7 头猪的肝脏。Marker 为 2 000 bp。

From left to right, the tissues were endometrium attachment sites of 4th, 7th, 8th pig, heart, stomach, spleen and liver of 4th pig, ovary and endometrium attachment sites of 3rd pig, and liver of 7th pig. Marker is 2 000 bp size.

图 1 持家基因(*GAPDH*)在随机抽取组织的 cDNA 中扩增产物的琼脂糖检测结果

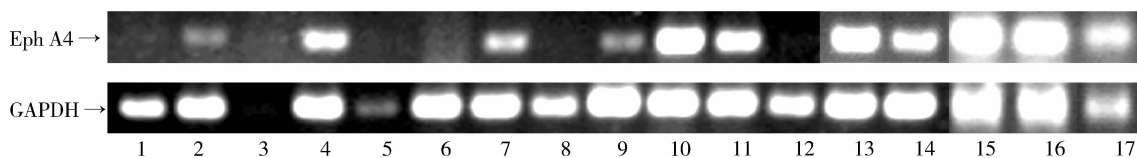
Fig. 1 Results of agarose electrophoresis for PCR products of housekeeping gene (*GAPDH*) using cDNA of different tissues in pigs

2.2 猪 *Eph A4* 基因组织表达特异性分析结果

对猪、人和小鼠的 *Eph A4* 基因的 cDNA 序列做比较的话,猪的(GenBank NM_001134967)与人(GenBank NM_004438)相似度为 92%,与小鼠(GenBank NM_007936)的相似度为 89%。

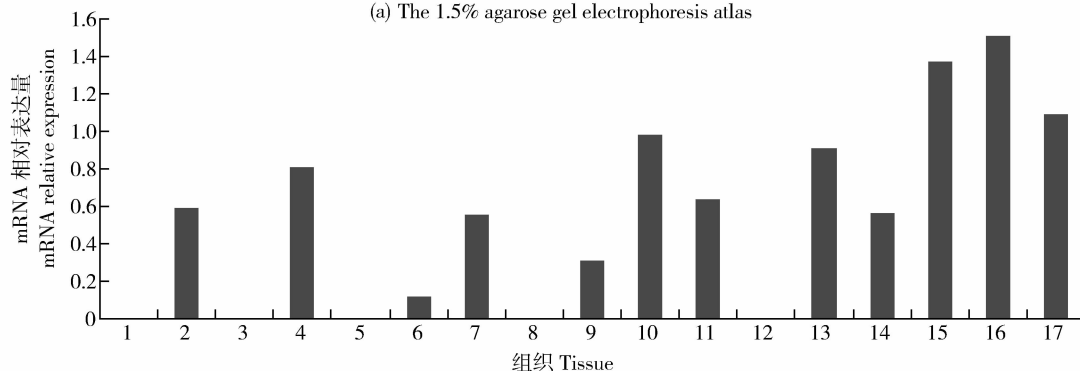
以持家基因 *GAPDH* 为内标,对猪肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、卵巢、子宫、大脑、脂肪、肌肉、小肠、大肠、膀胱、胃、心脏、妊娠第 13 天子宫内膜、妊娠第 18 天子宫内膜和妊娠第 24 天子宫内膜共 17 种组织样中 *Eph A4* 基因的组织表达特异性进行了 RT-PCR 半定量分析,凝胶电泳图结果请见图 2(a)。应用灰度值分析软件 Image J(Image Processing and Analysis in Java,网址: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)对 *Eph A4* 基因的表达量做相对于内标基因 *GAPDH* 的对比分析,以确定目的基因在各组织样中相对于持家基因表达量的相对值,统计结果请见图 2(b)所示。

结果表明,*Eph A4* 基因的 mRNA 在妊娠第 24 天子宫内膜上的表达量最高,其次为第 18 天和第 13 天的;较高表达的组织样为肾脏、小肠和胃;较低表达的组织样为脾脏、子宫、大脑、大肠、肌肉和心脏;没有表达的组织样为肝脏、肺脏、卵巢、脂肪和膀



(a) 1.5%琼脂糖电泳图

(a) The 1.5% agarose gel electrophoresis atlas



(b) Eph A4与GAPDH的mRNA表达量的比值 (Eph A4/ GAPDH)

(b) Ratio of Eph A4 and GAPDH mRNA expression intensity (Eph A4/ GAPDH)

GAPDH 为持家基因。1. 肝脏, 2. 脾脏, 3. 肺脏, 4. 肾脏, 5. 卵巢, 6. 子宫, 7. 大脑, 8. 脂肪, 9. 肌肉, 10. 小肠, 11. 大肠, 12. 膀胱, 13. 胃, 14. 心脏, 15. 妊娠第 18 天子宫内膜, 16. 妊娠第 24 天子宫内膜, 17. 妊娠第 13 天子宫内膜。

GAPDH is as positive control. 1. Liver, 2. Spleen, 3. Lung, 4. Kidney, 5. Ovary, 6. Uterus, 7. Brain, 8. Fat, 9. Muscle, 10. Small intestine, 11. Large intestine, 12. Bladder, 13. stomach, 14. Heart, 15. Endometrium on pregnancy day 18, 16. Endometrium on pregnancy day 24, 17. Endometrium on pregnancy day 13.

图 2 *Eph A4* 基因在不同组织中的 mRNA 表达量检测结果Fig. 2 mRNA expression intensity of swine *Eph A4* in different tissues

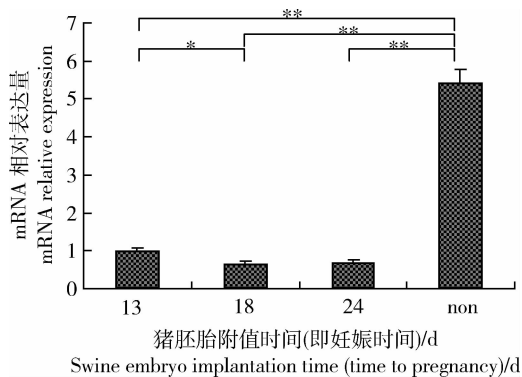
胱。表达量高低依次为: 妊娠第 24 天子宫内膜 > 妊娠第 18 天子宫内膜 > 妊娠第 13 天子宫内膜 > 小肠 > 胃 > 肾脏 > 大肠 > 大脑 > 脾脏 > 心脏 > 子宫 > 肝脏/肺脏/卵巢/脂肪/膀胱, *Eph A4* 在母猪子宫内膜中有较高的表达, 但卵巢上却基本没有表达, 可能与卵巢组织提取的 RNA 质量不佳有关, 这提示 *Eph A4* 与猪的繁殖性能相关, 但需进一步确证。

2.3 *Eph A4* 在子宫内膜附着点上的 mRNA 表达

实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR) 中 CT 值的含义是每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数, 本研究将各组织样的实时荧光定量 PCR 的 CT 值换算成 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值后做成柱形图, 如图 3。

在母猪妊娠的第 13、18 和 25 天 (胚胎附植期), 用实时定量 PCR 法在子宫内膜附着点检测到 *Eph A4* 的 mRNA 表达, 将交配后未妊娠母猪的子宫内膜作为对照, mRNA 表达量会随着妊娠日的不同而有所波动。

Eph A4 在胚胎附植期的 mRNA 表达量呈先降低后升高的趋势。在母猪妊娠第 13 天的 mRNA



non 为空怀猪。* 为差异显著性水平 $P < 0.05$, ** 为差异显著性水平 $P < 0.01$ 。

The "non" meant non-pregnant pigs. Single and double asterisks indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

图 3 通过定量 PCR 方法得到的猪胚胎附植期 *Eph A4* 在子宫内膜附着点的 mRNA 表达变化Fig. 3 Change in expression intensity of *Eph A4* mRNAs on swine endometrium attachment sites during swine embryo implantation period by real-time PCR technology

表达量最高, 然后表达降低到妊娠第 18 天, 且二者差异显著 ($P < 0.05$), 从妊娠第 18 天到第 24 天,

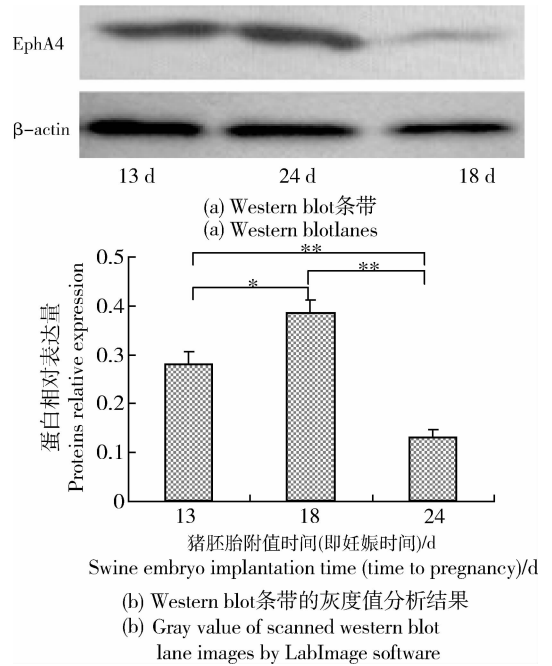
mRNA 表达量稍有增加,且第 13 天和第 24 天差异不显著;作为对照组, *Eph A4* 在未妊娠猪的表达量极高,比妊娠第 13、18 和 24 天的都要高的多,且差异均极显著($P < 0.01$)。

2.4 *Eph A4* 在子宫内膜上的蛋白表达

Western blot 结果是以 β actin 为内参的蛋白相对表达量(*Eph A4*/ β actin)。猪胚胎附植早(13 d)、中(18 d)和晚期(24 d)*Eph A4* 基因在子宫内膜中的蛋白表达曲线呈先升高后降低的趋势,即在胚胎附植早期至中期的过程中表达量持续升高,在胚胎附植中期至晚期的过程中表达量持续降低;其中妊娠第 18 天的表达量最高,其次为第 13 天的表达量,最低为第 24 天,且 3 个妊娠日两两间的表达量差异均极显著($P < 0.01$)(图 4)。

2.5 SNPs 检测

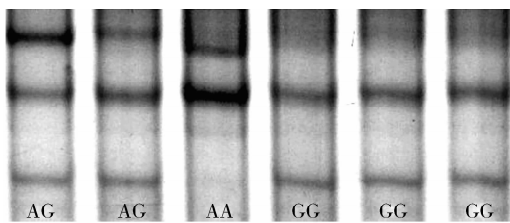
Eph A4 基因的第 3 外显子是一段长 664 bp 的序列,在这段序列上,通过 PCR-SSCP 方法检测出了 2 个 SNP 突变位点。随机抽出 6 个猪耳组织样 PCR 扩增后进行 SNP 检测。PCR 扩增产物均经过测序以进一步确认突变位点。以 *Eph A4* 基因的全长 cDNA 序列为研究对象,2 个突变位点分别位于第 715 和 750 bp 处,分别记为 EphA4_1 和 EphA4_2 位点,发生的突变为为 A→G 和 T→C 的突变(图 5)。



* 为差异显著性水平 $P < 0.05$, ** 为差异显著性水平 $P < 0.01$ 。Single and double asterisks indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

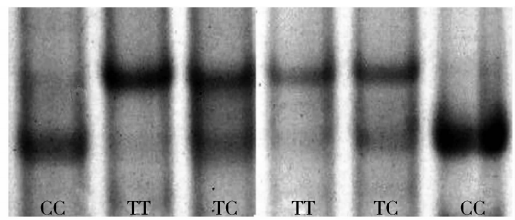
图 4 通过 Western blot 方法得到的猪胚胎附植期 *Eph A4* 在子宫内膜附着点的蛋白表达变化

Fig. 4 Change in expression intensity of *Eph A4* proteins on swine endometrium attachment sites during swine embryo implantation period by western blot technology



(a) EphA4_1 多态位点基因型

(a) Genotypes of the SSCP marker of EphA4_1 PCR products



(b) EphA4_2 多态位点基因型

(b) Genotypes of the SSCP marker of EphA4_2 PCR products

图 5 *Eph A4* 基因的 PCR-SSCP 检测结果

Fig. 5 PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) results for the Erythropoietin-producing hepatocellular A4(*Eph A4*) gene polymorphism

2.6 基因频率和基因型频率

总产仔数(TNB)和产活仔数(NBA)数据按胎次进行分析,胎次包括第 1 胎次、第 2 胎次、第 3~8 胎次和所有胎次(1~8)4 个级别。EphA4_1 和 EphA4_2 位点的 3 种基因型在大白、长白和杜洛克猪中均检测到,卡方(χ^2)检验证明 EphA4_1 等位基

因的基因型频率和基因频率在除大白猪的试验猪群外,其他均处于 Hardy-Weinberg 平衡分布,EphA4_2 等位基因的频率和基因频率在除二花脸猪的试验猪群处,其他均处于 Hardy-Weinberg 平衡分布(表 2)。

表2 长白、大白和杜洛克猪中 EphA4_1 和 EphA4_2 多态位点基因频率和基因型频率

Table 2 Allele and genotype frequencies of EphA4_1 and EphA4_2 in Landrace, Yorkshire and Duroc sows

品种 Breed	头数 NO	EphA4_1					χ^2 值	头数 NO	EphA4_2					χ^2 值
		基因型频率 Genotype freq			等位基因频率 Allele freq				基因型频率 Genotype freq			等位基因频率 Allele freq		
		AA	AG	GG	A	G			TT	TC	CC	T	C	
长白 Landrace	250	24	99	127	0.29	0.71	0.58	172	44	71	57	0.46	0.54	4.97
大白 Yorkshire	420	100	181	139	0.45	0.55	7.23*	262	83	118	61	0.54	0.46	2.26
杜洛克 Duroc	95	3	39	53	0.24	0.76	1.73	58	19	21	18	0.51	0.49	4.41
二花脸 Erhualian	44	10	28	6	0.55	0.45	3.55	44	1	34	9	0.41	0.59	15.73**
苏钟 Suzhong	48	6	29	13	0.43	0.57	2.64	48	13	18	17	0.46	0.54	2.87
梅山 Meishan	45	6	24	15	0.40	0.60	0.56	45	9	29	7	0.52	0.48	3.82
金华 Jinhua	48	6	30	12	0.44	0.56	3.49	48	13	28	7	0.56	0.44	1.64
总计 Total	950	155	430	365	0.39	0.61	2.21	677	182	319	176	0.50	0.50	2.35

注：* 为差异显著性水平为 0.05，** 为差异显著性水平为 0.01。

Note: Single and double asterisks indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

2.7 多态性与产仔数的关联分析

与基因型关联的最小二乘均数(Least squares means)、基因加性效应(Additive effects)和等位基因间的显性效应(Dominant effects)值见表3。对于长白和大白猪中,在第1胎、第2胎和所有胎次上,EphA4_1多态位点的3个基因型AA,AG和GG对产仔数的影响差异显著($P < 0.05$),但是对杜洛

克猪的影响无显著差异;EphA4_2多态位点基因型对产仔数的影响与EphA4_1相同。

在EphA4_1多态位点处,以基因型关联的产仔数(最小二乘均数)为衡量标准,在第1胎、第2胎和所有胎次上,纯合子基因型GG与杂合子基因型AA或AG对总产仔数(TNB)或产活仔数(NBA)的影响差异显著($P < 0.05$)。GG基因型比AA基

表3 EphA4_1 和 EphA4_2 基因型效应对猪产仔数的影响(最小二乘均值±标准误)

Table 3 Effects of EphA4_1 and EphA4_2 on litter size in pigs (LS means±SE)

项目 Item	基因型 Genotype	第1胎 First parity			第2胎 Second parity		
		窝数 Litters	总产仔数 TNB	产活仔数 NBA	窝数 Litters	总产仔数 TNB	产活仔数 NBA
EphA4_1	AA	127	9.96±0.25 Aa	9.37±0.25 A	112	10.51±0.34 Aa	9.99±0.34 a
	AG	316	10.61±0.19 ABb	10.04±0.19 AB	197	11.14±0.28 ABa	10.67±0.28 b
	GG	319	10.94±0.20 Bb	10.34±0.20 B	177	11.71±0.29 Bb	10.95±0.30 b
加性效应 Additive effect			-0.49	-0.48		-0.60	-0.48
显性效应 Dominant effect			0.16	0.18		0.03	0.20
EphA4_2	TT	180	10.29±0.23 Aa	9.72±0.23 Aa	110	11.18±0.39 ab	10.46±0.39 ab
	TC	176	10.40±0.23 Aa	9.77±0.22 Aa	86	10.66±0.40 Aa	9.94±0.41 Aa
	CC	133	11.16±0.27 Bb	10.37±0.25 Ab	62	12.00±0.45 Bb	11.17±0.46 Bb
加性效应 Additive effect			-0.43	-0.33		-0.41	-0.36
显性效应 Dominant effect			-0.32	-0.27		-0.93	-0.88

续表

项目 Item	基因型 Genotype	第3及以上胎次 Third and above parity			所有胎次 All parities		
		窝数 Litters	总产仔数 TNB	产活仔数 NBA	窝数 Litters	总产仔数 TNB	产活仔数 NBA
EphA4_1	AA	94	10.78±0.43 a	10.38±0.42 a	333	10.30±0.30 A	9.85±0.30 Aa
	AG	150	11.34±0.42 b	10.74±0.42 a	563	10.83±0.29 B	10.33±0.29 Bb
	GG	118	11.43±0.43 b	10.86±0.43 a	614	11.18±0.30 C	10.60±0.30 Bc
加性效应 Additive effect			-0.32	-0.24		-0.44	-0.37
显性效应 Dominant effect			0.23	0.11		0.09	0.11
EphA4_2	TT	78	11.46±0.35 Aa	10.56±0.33 A	368	10.96±0.23 Aa	10.12±0.22 Aa
	TC	62	11.53±0.36 Aa	10.71±0.34 A	324	10.92±0.23 Aa	10.06±0.23 Aa
	CC	34	12.87±0.44 Bb	11.90±0.42 B	229	11.94±0.26 Bb	10.95±0.25 Bb
加性效应 Additive effect			-0.70	-0.67		-0.49	-0.42
显性效应 Dominant effect			-0.63	-0.52		-0.53	-0.48

注:不同的字母代表基因型间不同的显著水平(A,B为($P \leq 0.01$),a,b为($P \leq 0.05$))

Note: Values with different superscripts show significant levels within genotypes (A,B($P \leq 0.01$),a,b($P \leq 0.05$))

因型的总产仔数按胎次分别高出0.98(第1胎),1.20(第2胎)和0.88头(所有胎次),GG基因型比AA基因型的产活仔数按胎次分别高出0.97(第1胎),0.96(第2胎)和0.75头(所有胎次)。

在EphA4_2多态位点处,以最小二乘均数为衡量标准,TT与TC基因型间差异不显著,在第1胎、第2胎和所有胎次上,纯合子基因型CC与杂合子基因型TT或TC对总产仔数(TNB)或产活仔数(NBA)的影响差异显著($P < 0.05$)。CC基因型比TT基因型的总产仔数按胎次分别高出0.87(第1胎),0.82(第2胎)和0.98头(所有胎次),CC基因型比TT基因型的产活仔数按胎次分别高出0.65(第1胎),0.71(第2胎)和0.83头(所有胎次)。

对于EphA4_1位点,按总产仔数估算,基因加性效应值最高的为0.60,出现在第2胎次;按产活仔数估算,基因加性效应值最高的为0.48,也在第2胎次。EphA4_1位点处的等位基因(A和G)间的显性效应值,按总产仔数估算,显性效应值最高的为0.23,出现在第3及以上胎次;按产活仔数估算,基因加性效应值最高的为0.11,也在第3及以上胎次。

对于EphA4_2位点,按总产仔数估算,基因加性效应值最高的为0.70,出现在第3及以上胎次;按产活仔数估算,基因加性效应值最高的为0.63,

也在第3及以上胎次。EphA4_2位点处的等位基因(T和C)间的显性效应值,按总产仔数估算,显性效应值最高的为0.93,出现在第2胎次;按产活仔数估算,基因加性效应值最高的为0.88,也在第2胎次。

3 讨论与结论

3.1 基因表达

现在已有报道在人的子宫内膜表面上皮和胚胎表达的与胚胎附植相关的基因,包括配体和受体,这表明分子系统机制可能调节着原始的附植过程,如整合素(Integrins)^[16]、活化白细胞粘附分子(Activated leukocyte cell adhesion molecule)^[17]和L-选择素(L-selectin)^[18]。猪胚胎附植过程的特点是粘附的前期特别长,这段时间包括胚胎的迁移和在子宫内的间隔控制,因为猪的附植程度较浅,所以胚胎滋养层和腔上皮会紧密互锁^[19]。“窗口期”之后,在胚胎附着在子宫内膜上皮之前,二者会有一个“会话”,以决定胚胎在什么时间什么地点附着在子宫腔^[20-21]。由于猪的附着前期特别长,在胚胎滋养层细胞侵入腔上皮细胞之前有充分的时间,所以这就使猪成为一个研究猪胚胎着附植早期的动物模型^[22]。

Eph A4 基因属于 *Eph-Ephrin* 家族中的一员, 是一个编码多效性细胞的因子, 通常在子宫内壁上表达 mRNA 直至产生 *Eph A4* 蛋白质^[13]。用免疫组化和 RT-PCR 方法, 已证明在小鼠妊娠的第 1.5~5.5 d 之间, *Eph A4* 基因在小鼠的子宫内腔上皮细胞和腺上皮细胞上均可持续地表达^[13]。*Eph A4* 可以连接 *Ephrin A* 和 *Ephrin B* 亚系基因, 使 A 和 B 亚系在“窗口期”可以严格地相作用^[14,23], 所以 *Eph A4* 作为 *Eph-Ephrin* 系统内的一关键因子, 在胚胎附植过程中发挥着关键作用。本研究在胚胎附植期猪的子宫内壁上检测出了 *Eph A4* 基因的表达, 这也预示着 *Eph A4* 对猪的产仔数有着重要影响。自此, *Eph A4* 可能是一个影响猪繁殖性状的主效候选基因。

在本研究中, 采用半定量 PCR、实时荧光定量 PCR 和 Western-blot 方法, 在猪胚胎附植前(妊娠第 13 天)、中(妊娠第 18 天)、后期(妊娠第 24 天)均检测到 *Eph A4* 基因在猪子宫内腔中的表达。半定量结果表明 *Eph A4* 在猪子宫内腔上的表达量要高于全身其他组织的, 这与 *Muc1* 基因在猪胚胎附植期的表达趋势一致^[24]。实时荧光定量 PCR 的结果表明, 而 *Eph A4* 在胚胎附植期间均呈现逐渐降低的趋势, 且妊娠猪的表达量远低于空怀猪的。这与同属 *Eph-Ephrin* 家族的 *Eph A5* 和 *Eph A7* 基因在猪胚胎附植期的 mRNA 逐渐增加的表达趋势^[25] 不一致, 说明此家族可能在猪胚胎附植期发挥了多种作用。Ren 报道的 *Muc1* 基因在猪胚胎附植期的表达趋势为先降低后增加^[24]。Western-blot 的结果表明, *Eph A4* 在母猪子宫内腔细胞和腺细胞上的表达在胚胎附植期呈现先升高(妊娠第 13~18 天)后降低(妊娠第 18~24 天)的趋势。这表明 *Eph A4* 可能在胚胎附植中发挥着排斥力的作用, 这与 Fujiwara^[11] 和 Fujii^[13] 等人的研究结果相似。

Eph A4 在 mRNA 水平和蛋白水平上表达的差异性可能由于这些基因转录水平上的差异所致。这些研究成果表明 *Eph A4* 在猪初始的胚胎与子宫内腔的相互影响过程中发挥重要作用。在小鼠上, 免疫组化的结果表明 *Eph A1* 在子宫内腔表皮上的表达量呈现下降的趋势^[13]。在人上, 定量 PCR 和免疫组化结果表明 *Ephrin A1* 在子宫内腔的上皮上表达量非常明显^[11]。据研究, *Eph-Ephrin* 系统广泛在细胞-细胞交互、间接细胞迁移和细胞粘附等过程中发挥着作用^[11-12]。*Eph-Ephrin* 家族内有

许多亚系, 如 *Eph A1-Ephrin A1* 亚系, 亚系间相互作用, 可以比较容易地相互弥补缺陷^[26]。

3.2 基因多态性

标记辅助选择 (Marker-Assisted Selection, MAS) 可以提高动物育种中的遗传进展, 并且随着不断发现越来越多的影响动物主要性状的分子标记, MAS 的应用会越来越广泛, 如 MAS 在繁殖性状选育中的应用前景就十分广阔。目前越来越多的研究发现某些细胞因子对猪繁殖活动也很重要, 特别是对猪的胚胎附植过程发挥着重要作用, 如转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)^[27], 环指蛋白 4 基因 (The ring finger protein 4 gene, RNF4)^[28], 白血病抑制因子 (LIF)^[7], 这些基因也成为影响猪产仔数性状的候选基因, 同理, 本试验研究的 *Eph A4* 基因也是一个影响繁殖活动的细胞因子。

本试验中, *EphA4_1* 处 A→G 的突变直接引起了氨基酸的变化, 使谷氨酸变成了赖氨酸, 从而使蛋白质发生了改变, 这预示着 *EphA4_1* 位点多态性可能与 *Eph A4* 基因的功能性变化有关。*EphA4_2* 处 T→C 的突变没有引起氨基酸的直接变化, 但这个多态性位点可能通过连锁不平衡与直接影响繁殖性状的位点相作用, 从而间接影响到氨基酸直至蛋白质的变化^[28]。

在长白和杜洛克猪中, *EphA4_1* 和 *EphA4_2* 位点多态性与总产仔数 (TNB) 和产活仔数 (TNB) 均显著关联, 这说明 *Eph A4* 可能是猪繁殖性状的一个比较好的候选基因。在第 1 胎、第 2 胎和所有胎次上, *EphA4_1* 位点的 GG 基因型和 *EphA4_2* 位点的 CC 基因型所关联的总产仔数和产活仔数与其他基因型的均存在显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 *EphA4_1* 位点的 AA 与 AG 基因型间, *EphA4_2* 位点的 TT 与 TC 基因型间差异均不显著。另外, 在第 1 胎、第 2 胎和所有胎次上, 携带 *EphA4_1* 位点处 G 等位基因和 *EphA4_2* 位点处 C 等位基因猪的总产仔数和产活仔数均比较多。

按照基因频率和基因型频率来说, *EphA4_1* 和 *EphA4_2* 位点在不同猪群中的分布有不同的特点, 即 *EphA4_1* 位点的 A 等位基因频率在引入品种 (长白、大白、杜洛克) 中的分布要低于本地品种 (二花脸、苏钟、梅山、金华) 的, G 等位基因频率则呈相反分布, 且在不同猪群中的等位基因频率大小均为 $A < G$; 而 *EphA4_2* 位点 T 和 C 的等位基因频率在引入品种和本地品种中的分布则无明显差异, 长白、

二花脸和苏钟猪群中的等位基因频率为 $T < C$, 而其他猪群中的则为 $T > C$ 。这些突变位点在不同猪群中的多态性分布规律为分子育种提供了一定的理论参考。

综上所述, *EphA4* 基因作为 *Eph-Ephrin* 系统中重要的一员, 在猪的胚胎附植活动中发挥着重要作用, 且其第3外显子有2个多态位点, 与猪的产仔数关联分析显著。 *Eph A4* 可以作为猪产仔数的候选基因用于分子育种。

参 考 文 献

- [1] Linville R, Pomp D, Johnson R, et al. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine[J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79: 60-67
- [2] Campbell E, Nonneman D, Rohrer G. Fine mapping a quantitative trait locus affecting ovulation rate in swine on chromosome 8[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 81: 1706-1714
- [3] Johnson R, Nielsen M, Casey D. Responses in ovulation rate, embryonal survival, and litter traits in swine to 14 generations of selection to increase litter size [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77: 541-557
- [4] Rothschild M, Jacobson C, Vaske D, et al. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93: 201-205
- [5] Vincent A, Evans G, Short T, et al. The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs[C]// *Proceedings of 6th World Congr Genet Appl Anim Prod*, Armidale, University of New England, 1998: 15-18
- [6] Rothschild M, Messer L, Day A, et al. Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs[J]. *Mammalian Genome*, 2000, 11: 75-77
- [7] Lin H, Liu G, Wang A, et al. Effect of polymorphism in the leukemia inhibitory factor gene on litter size in Large White pigs[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36: 1833-1838
- [8] Park K, Inoue T, Ueda M et al. CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins $\alpha 6$, $\alpha 3$ and $\beta 1$ [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2000(6): 252-257
- [9] Geisert R, Schmitt R. Early embryonic survival in the pig; Can it be improved[J]. *Journal of Animal Science*, 2002, 80: 54-65
- [10] Frisen J, Holmberg J, Barbacid M. Ephrins and their Eph receptors: Multitalented directors of embryonic development [J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18: 5159-5165
- [11] Fujiwara H, Yoshioka S, Tatsumi K et al. Human endometrial epithelial cells express ephrin A1; Possible interaction between human blastocysts and endometrium via Eph-ephrin system [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002, 87: 5801-5807
- [12] Red-Horse K, Kapidzic M, Zhou Y et al. EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation [J]. *Development*, 2005, 132: 4097-4106
- [13] Fujii H, Tatsumi K, Kosaka K et al. Eph-ephrin A system regulates murine blastocyst attachment and spreading [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, 235: 3250-3258
- [14] Gale N, Holland S, Valenzuela D et al. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis [J]. *Neuron*, 1996, 17: 9-20
- [15] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 483-485
- [16] Lessey B. Adhesion molecules and implantation[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2002, 55: 101-112
- [17] Fujiwara H, Tatsumi K, Kosaka K, et al. Human blastocysts and endometrial epithelial cells express activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 88: 3437-3443
- [18] Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, et al. Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface[J]. *Science*, 2003, 299: 405-408
- [19] Carson D, Bagchi I, Dey S, et al. Embryo implantation [J]. *Developmental Biology*, 2000, 223: 217-237
- [20] Lim H, Song H, Paria B, et al. Molecules in blastocyst implantation: uterine and embryonic perspectives [J]. *Vitamins and Hormones*, 2002, 64: 44-77
- [21] Simón C, Dominguez F, Remohí J, et al. Embryo effects in human implantation [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006, 943: 1-16
- [22] Lee K, DeMayo F. Animal models of implantation [J]. *Reproduction*, 2004, 128: 679
- [23] Qin H, Noberini R, Huan X, et al. Structural characterization of the EphA4-ephrin-B2 complex reveals new features enabling Eph-ephrin binding promiscuity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285: 644-654
- [24] Ren Q, Guan S, Fu J, et al. Temporal and spatial expression of *muc1* during implantation in sows [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11: 2322-2335
- [25] Fu Y, Fu J, Yang L, et al. Expression of Eph-Ephrin A molecules in endometrium during swine embryo implantation examined using real-time RT-PCR [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10: 1445-1451
- [26] Flanagan J, Vanderhaeghen P. The ephrins and Eph receptors in neural development [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 1998, 21: 309-345
- [27] Wu Y, Wang A, Li N, et al. Association with TGF- $\beta 1$ gene polymorphisms and reproductive performance of large white pig [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2010, 45: 1028-1032
- [28] Niu B, Ye L, Li F et al. Identification of polymorphism and association analysis with reproductive traits in the porcine RNF4 gene [J]. *Animal Reproduction Science*, 2009, 110: 283-292