

冯贲, 高若男, 许衡, 等. 妊娠早期与未妊娠母猪子宫内膜差异表达蛋白鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 6-21.

FENG Y, GAO R N, XU H, et al. Identification of differentially expressed proteins in the early pregnancy sow uterine embryo attachment site, non-attachment site, and non-pregnant sow uterine tissue [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 6-21.

## 妊娠早期与未妊娠母猪子宫内膜差异表达蛋白鉴定

冯贲<sup>1</sup>, 高若男<sup>1</sup>, 许衡<sup>2,3</sup>, 何凡<sup>1</sup>, 李清春<sup>1</sup>, 祁梦凡<sup>1</sup>, 符彬彬<sup>1</sup>,  
张化鹏<sup>1</sup>, 闫坤<sup>1</sup>, 艾子凯<sup>1</sup>, 鲁慧文<sup>2</sup>, 龚怀正<sup>4</sup>, 黄涛<sup>1,3\*</sup>

1. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000;
2. 新疆天康畜牧科技有限公司, 新疆 乌鲁木齐 830000;
3. 新疆生猪种业工程技术研究中心, 新疆 昌吉 831100;
4. 第八师 133 团农业发展服务中心, 新疆 石河子 832000

**摘要:** 旨在研究母猪受孕的过程中胚胎的附植点与非附植点的蛋白质表达变化。通过采集配种后 15 d 的妊娠母猪子宫内膜胚胎附植点、非附植点与未妊娠母猪子宫内膜样品, 利用 4D-Lable free 技术筛选差异表达蛋白, 并进行生物信息学分析, 从中筛选出目标蛋白白细胞活化黏附因子 (ALCAM) 进行验证。结果: 妊娠母猪子宫内膜非附植点与未妊娠猪相比, 差异表达蛋白有 229 个, 其中表达量上调的有 103 个, 下调的有 126 个; 妊娠母猪子宫内膜附植点与非附植点的差异表达蛋白有 129 个, 其中上调 54 个, 下调 75 个; 妊娠母猪子宫内膜附植点与未妊娠猪相比, 差异表达蛋白有 198 个, 其中上调 119 个, 下调 79 个。差异蛋白的基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 注释结果表明, 胚胎附植过程中, 免疫反应过程细胞-细胞黏附反应均从附植 15 d 开始出现, 其中在胚胎附植点还存在血管形成发生等过程, 反映这些蛋白在母猪早期妊娠建立过程中可能发挥重要的调控作用。Western blot 结果表明, ALCAM 蛋白在妊娠母猪子宫内膜附植点蛋白水平表达量极显著高于非附植点 ( $P < 0.01$ ), 在妊娠母猪子宫内膜非附植点蛋白表达量极显著高于未妊娠猪 ( $P < 0.01$ )。综上, 本研究找到了部分在妊娠母猪子宫内膜胚胎附植点、非附植点及未妊娠母猪子宫内膜中的差异表达蛋白, 并验证了其中的 ALCAM 蛋白在胚胎附植过程中可能具有重要的生物学功能, 其表达水平的变化与胚胎附植点的形成和妊娠的建立密切相关。研究结果为深入理解母猪胚胎附植的分子机制提供了新的视角和潜在的生物标志物, 为未来的生殖生理研究和临床应用奠定了基础。

**关键词:** 子宫内膜; 胚胎附植点; 非附植点; 蛋白组学

**中图分类号:** S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)07-0006-16

## Identification of differentially expressed proteins in the early pregnancy sow uterine embryo attachment site, non-attachment site, and non-pregnant sow uterine tissue

FENG Yun<sup>1</sup>, GAO Ruonan<sup>1</sup>, XU Heng<sup>2,3</sup>, HE Fan<sup>1</sup>, LI Qingchun<sup>1</sup>, QI Mengfan<sup>1</sup>, FU Binbin<sup>1</sup>,  
ZHANG Huapeng<sup>1</sup>, YAN Kun<sup>1</sup>, AI Zikai<sup>1</sup>, LU Huiwen<sup>2</sup>, GONG Huaizheng<sup>4</sup>, HUANG Tao<sup>1,3\*</sup>

1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China;
2. Xinjiang Tiankang Animal Science and Technology Co., Ltd., Urumchi 830000, China;
3. Xinjiang Pig Breeding Industry Engineering Technology Research Center, Changji 831100 China;
4. Agricultural Development Service Center, 133rd Regiment, 8th Division, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** The present study aimed to investigate the changes in protein expression at the implantation site and non-implantation site of the embryo during the early pregnancy of sows. By collecting samples of the endometrium from the implantation site, non-implantation site, and non-pregnant sows' uterus at 15 days post-mating, we utilized the 4D-Lable free technology to screen for differentially expressed proteins (DEPs) among these three groups and conducted bioinformatics analysis. Subsequently, we identified the target protein ALCAM for valida-

收稿日期: 2024-03-22; 修回日期: 2025-04-16

项目基金: 国家自然科学基金项目 (31960645); 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项 (2022E02138); 兵团重点领域科技攻关计划项目 (2022AB012); 天山英才人才培养计划项目 (2022TSYCCX0047)

第一作者: 冯贲, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 黄涛, 教授, 博士生导师, 主要从事猪分子遗传育种方面的研究, E-mail: taohuang100@sina.com。

tion. The results showed that, compared with the non-pregnant sows, there were 229 DEPs in the non-implantation site of the pregnant sows, with 103 upregulated and 126 downregulated proteins. There were 129 DEPs between the implantation site and the non-implantation site of the pregnant sows, with 54 upregulated and 75 downregulated proteins. Compared with the non-pregnant sows, there were 198 DEPs at the implantation site of the pregnant sows, with 119 upregulated and 79 downregulated proteins. The GO and KEGG annotation results of the DEPs indicated that, during embryo implantation, the immune response and cell-cell adhesion processes began to appear at 15 days of implantation. Additionally, angiogenesis was observed at the implantation site, suggesting that these proteins might play important regulatory roles in the establishment of early pregnancy in the sows. The Western blot results showed that the expression level of the ALCAM protein at the implantation site was significantly higher than that at the non-implantation site ( $P < 0.01$ ), and the expression level at the non-implantation site was significantly higher than that in the endometrium of the non-pregnant sows ( $P < 0.01$ ). In summary, in this study, some DEPs were identified in the endometrium of the pregnant sows at the implantation site, non-implantation site, and in the non-pregnant sows, and it was validated that ALCAM protein might have important biological functions during embryo implantation. The changes in its expression level were closely related to the formation of the implantation site and the establishment of pregnancy. This study provided a new perspective and potential biomarker for a deeper understanding of the molecular mechanisms of embryo implantation in sows and laid the foundation for future reproductive physiology research and clinical applications.

**Keywords:** endometrium; embryo attachment site; non-attached planting site; proteomics

猪不仅是人类食用肉类的重要来源,也是研究哺乳动物包括人类生殖生理学的模型。猪作为一种非侵袭性胎盘的动物,子宫腔上皮(iuminal epithelium, LE)在整个怀孕过程中都保持完整。胚胎着床伴随着子宫腔上皮细胞高极性到低极性的转变以及腺上皮(glandular epithelium, GE)的分泌,这个过程的启动包括子宫内膜上皮层与滋养层细胞的粘连,子宫内膜需要达到接受状态,而胚泡要达到侵袭状态。这个过程中子宫内膜上皮细胞形态发生变化,使得子宫内膜上皮细胞顶端质膜的分子组成发生变化。例如,子宫内膜上皮细胞糖基末端的厚度和细胞表面电荷减少,使得子宫内膜上皮细胞获得了根尖黏附能力<sup>[1]</sup>。在植入时,受精卵会产生雌激素,这是母猪早期妊娠的信号,猪的胚胎在怀孕的第11~12天以及怀孕的第15~25天之间分泌的雌激素水平平均会增加。其主要原因来自胚胎的雌激素、I型干扰素(IFNG)、II型干扰素(IFND)与孕酮(P4)联合在时间和空间上调节子宫内膜基因的表达,从而促进了子宫细胞的功能和结构变化。在哺乳动物的子宫建立胚胎着床条件的过程中,P4刺激孕激素(progesterone, PGR)受体阳性基质细胞产生多种孕激素,作用于子宫上皮和滋养外胚层,调节干扰素刺激基因(IFN-stimulated genes, ISGs)的表达。P4和干扰素激活互补的细胞信号通路,调节滋养外胚层附着于LE和浅腺上皮(superficial glandular epithelia, SGE)的基因表达,改变子宫间质细胞表型,沉默PGR和雌激素受体1(ESR1)基因,发出妊娠识别信号,抑制免疫识别基因,改变膜通透性,增强孕母因子交换,增加子宫内膜血管通透性和激活基因运输营养物质进入子宫腔<sup>[2]</sup>。

蛋白质组学为探索子宫内膜功能提供了更为客观

和可信的方法,因此,对怀孕早期子宫的研究将有助于更好地理解胚胎附植的机制,蛋白质在表达调控方面和动物生长发育中承担重要的角色。目前,对妊娠早期母猪子宫内膜中蛋白的研究较少,因此鉴定妊娠早期母猪子宫内膜差异性蛋白及研究其调控机制具有重要意义。

本试验采集了配种后第15天妊娠母猪胚胎附植点(P)、非附植点(FP)和非妊娠的母猪子宫内膜(NP),分离蛋白,采用4D-Lable free技术来筛选在妊娠早期差异表达的蛋白,以期探讨母猪胚胎附植过程的分子调控机制,为提高母猪繁殖率、增加经济效益提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

苯甲基磺酰氟溶液(PMSF)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒,购自上海碧云天生物技术股份有限公司;高效RIPA裂解液(组织/细胞),Solarbio,购自北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白质定量检测试剂盒,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;白细胞活化黏附因子(ALCAM),购自美国CST公司;一抗为鼠源ALCAM蛋白特异性抗体,二抗为抗鼠IgG抗体,均购自美国CST公司。

### 1.2 试验样品

选取新疆天康畜牧有限公司健康长大二元母猪,在配种后第15天,采集2头妊娠母猪胚胎附植点子宫内膜、非附植点子宫内膜与2头非妊娠的母猪子宫内膜,置于干冰中冷冻保存,运回实验室并置于液氮保存备用。

### 1.3 总蛋白提取及定量

液氮取出样品,捣碎并称重。每1 mg组织中加

入 200  $\mu\text{L}$  RIPA 蛋白裂解液（裂解液在用前按比例加入 PMSF），放入 1.5 mL EP 管中，在冰盒中裂解后 4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000  $g$  离心 15 min，取上清液即为组织蛋白，再对蛋白含量进行测定并变性。

#### 1.4 SDS-PAGE 并定量测序

每个样品取 30  $\mu\text{g}$ ，变性，12 000 r/min 离心 5 min，取上清液 30  $\mu\text{L}$ ，在 5% 浓缩胶和 12% 的分离胶中分别在 80 V 和 120 V 电压下电泳，考马斯亮蓝染色 1 h，脱色液脱色背景清晰拍照。

各样品蛋白取等量进行酶解。加入 20% TCA，混匀沉淀之后离心，弃上清液，丙酮洗涤沉淀。晾干后加入四乙基溴化铵（TEAB），超声打散沉淀，加入胰蛋白酶，酶解过夜。加入二硫苏糖醇（DTT）使其终浓度为 5 mmol/L，56  $^{\circ}\text{C}$  还原 30 min。之后加入碘乙酰胺（IAA）使其终浓度为 11 mmol/L，室温避光孵育 15 min。

液相色谱-质谱联用分析，肽段用液相色谱流动相 A 相溶解后使用 NanoElute 超高效液相系统进行分离。流动相 A 为含 0.1% 甲酸和 2% 乙腈的水溶液；流动相 B 为含 0.1% 甲酸和 100% 乙腈溶液。液相梯度设置：0 ~ 70 min，4% ~ 22% B；70 ~ 84 min，22% ~ 30% B；84 ~ 87 min，30% ~ 80% B；87 ~ 90 min，80% B，流速维持在 450.00 nL/min。肽段经由超高效液相系统分离后被注入 Capillary 离子源中进行电离，然后进 tims-TOF Pro 质谱进行分析。离子源电压设置为 2.0 kV，肽段母离子及其二级碎片都使用高分辨的 TOF 进行检测和分析。二级质谱扫描范围设置为 100 ~ 1 700。数据采集模式使用平行累积串行碎裂（PASEF）模式。一张一级质谱采集后进行 10 次 PASEF 模式采集母离子电荷数在 0 ~ 5 范围内的二级谱图，串联质谱扫描的动态排除时间设置为 30 s，避免母离子的重复扫描。

Lable-free 蛋白组学定量分析：猪子宫内膜蛋白数据质量评估及表达差异分析。蛋白质定性和定量分析是采用 Max Quant 软件完成的。使用 IBM SPASS 软件（Ver 19）独立样本  $t$  检验函数对 P、FP 和 NP 上皮蛋白样品检测结果进行统计学分析，筛选显著性表达差异蛋白，变异系数（CV）<0.3 表示有统计学差异显著。

#### 1.5 生物信息学分析方法

功能注释分析：蛋白在基因本体论（GO）可进行 3 个方面分类注释，包括生物进程（BP）、细胞组

成（CC）和分子功能（MF）；京都基因与基因组百科全书（KEGG）数据库用来分析蛋白通路。

蛋白质直系同源簇（COG）/真核生物蛋白相邻类的聚簇（KOG）注释：利用 COG 和 KOG 蛋白数据库，通过对比将目标蛋白序列注释到数据库中，每一簇数据库由直系同源序列构成，由此可以推测该蛋白序列的功能。

功能富集：利用双尾 Fisher 检验对鉴定的 GO 和 KEGG 通路以及结构域富集的差异蛋白进行检测。用假发现率（false discovery rate, FDR）和  $P < 0.05$  的多重假设检验校正。

差异蛋白的富集分析和富集聚类：通过分析所有蛋白质的  $P$  值对蛋白质功能进行富集，过滤掉低富集度的蛋白质。过滤的  $P$  值矩阵用  $x = -\lg [P \text{ 值}]$  表示，再由  $x$  值对每个功能类别做  $z$  变换（数据标准化处理，以消除不同功能类别之间的数据量纲差异）， $z$  值用于单方聚类分析（欧几里得距离，平均距离聚类）。用 R 语言中 pheatmap 包对差异蛋白进行聚类分析。

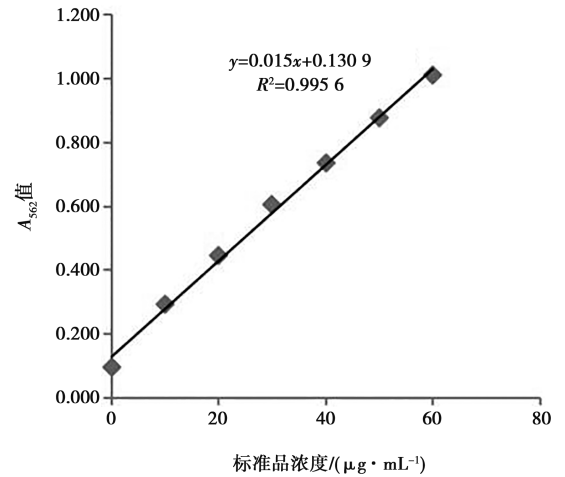
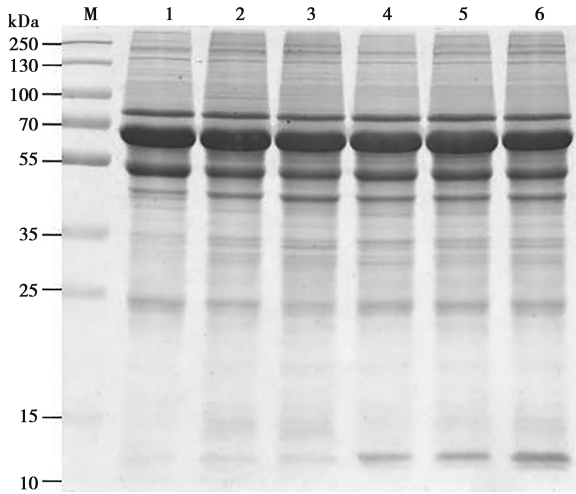
#### 1.6 差异蛋白 ALCAM 表达量验证

将 RIPA 与 PMSF 按 100 : 1 的比例混合，混合液最好现配现用。加入 P、FP 以及 NP 组织样品，随后用移液器反复吹打 30 s 后，12 000  $g$  离心 5 min 收集上清液蛋白裂解液。BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测每孔提取蛋白的浓度。通过 SDS-PAGE 分离蛋白样品，将分离后的蛋白质转移到硝酸纤维膜上，封闭液对膜进行封闭；将膜与特异性一抗进行孵育，以识别目标蛋白；随后用 TBST 缓冲液润洗印迹膜 3 次，每次 5 min，以去除未结合的一抗；加入二抗进行孵育，二抗与一抗结合并带有可检测的标记；最后，再次用 TBST 缓冲液润洗印迹膜 3 次，每次 5 min，以去除未结合的二抗。使用 Odyssey CLx 近红外双色荧光成像系统对印迹膜进行检测，获取目标蛋白的发光信号，从而定量分析目标蛋白的表达水平。

## 2 结果与分析

### 2.1 母猪子宫内膜组织蛋白质的提取及电泳检测

采集 P、FP 以及 NP 组织，匀浆后提取蛋白质，采用 BCA 测定蛋白质浓度，绘制蛋白浓度测定标准曲线（图 1），回归方程为： $y = 0.015x + 0.1309$ ， $R^2 = 0.9956$ （图 1）。在同体积的样品中，不同样品的蛋白质提取量表现出一定的差异（表 1）。



M. 蛋白 Marker; 1~6. 编号分别为 NP4、NP5、P7、P8、FP7 和 FP8 样品。

图 1 总蛋白 SDS-PAGE 分析 (A) 及蛋白定量标准曲线 (B)

表 1 妊娠与非妊娠猪子宫内膜总蛋白提取结果

样品编号	蛋白浓度/ ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	样品总体积/ $\mu\text{L}$	蛋白总量/ $\mu\text{g}$
NP4	3.78	450.0	1 701.0
NP5	3.19	450.0	1 435.5
P7	2.68	450.0	1 206.0
P8	3.29	450.0	1 480.5
FP7	3.55	450.0	1 597.5
FP8	2.87	450.0	1 291.5

## 2.2 蛋白质谱鉴定

样品蛋白经 SDS-PAGE 鉴定符合试验要求后, 用酶消化, 收集蛋白进行液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析, 身份识别, 通过无标记蛋白质组质谱检测肽。结果表明, 肽段主要分布在 7~20 个氨基酸, 符合基于胰蛋白酶酶解和高能碰撞解离 (HCD) 碎裂方式的规律 (图 2A); 10 kDa 以下蛋白因多次丙酮沉淀和漂洗而丢失, 10 kDa 以上蛋白分布比较均匀 (图 2B); 大部分蛋白的覆盖度在 20% 以下, 表明蛋白的覆盖率和在样品中的丰度成正相关关系 (图 2C); 蛋白的分子量与覆盖度呈现负相关关系, 因分子量较大的蛋白理论上能够产生更多的酶解肽段 (图 2D); 大部分蛋白对应 2 个以上肽段, 有利于增加定量结果的精确性和可信性 (图 2E)。以上结果均表明了本次质谱鉴定结果分布符合质控要求。

## 2.3 P、FP 以及 NP 皮尔森相关系数分析

样品蛋白经 4D-Label free 定量分析后, 通过质谱分析一共鉴定到 5 305 个蛋白可定量 (图 3A)。利用所有样本两两之间计算皮尔森相关系数而绘制的热

图, 结果皮尔森相关系数均大于 0.95 (图 3B), 说明蛋白质在 P、FP 以及 NP 间均有一定的表达差异。

## 2.4 P、FP 和 NP 组织差异蛋白筛选

以 P、FP 和 NP 组织的蛋白质平均丰度水平差异倍数 (fold change, FC) 大于或小于 1.5 倍且  $CV < 0.3$  为标准确定差异蛋白。分别筛选 P 与 FP、P 与 NP、FP 与 NP 组织的差异表达蛋白, 将 3 组数据进行韦恩图对比分析, 如图 4 所示。FP 与 NP 相比, 差异表达蛋白有 229 个, 其中表达量上调的有 103 个, 下调的有 126 个; P 与 FP 相比, 差异表达蛋白有 129 个, 其中上调 54 个, 下调 75 个; P 与 NP 相比, 差异表达蛋白有 198 个, 其中上调 119 个, 下调 79 个。

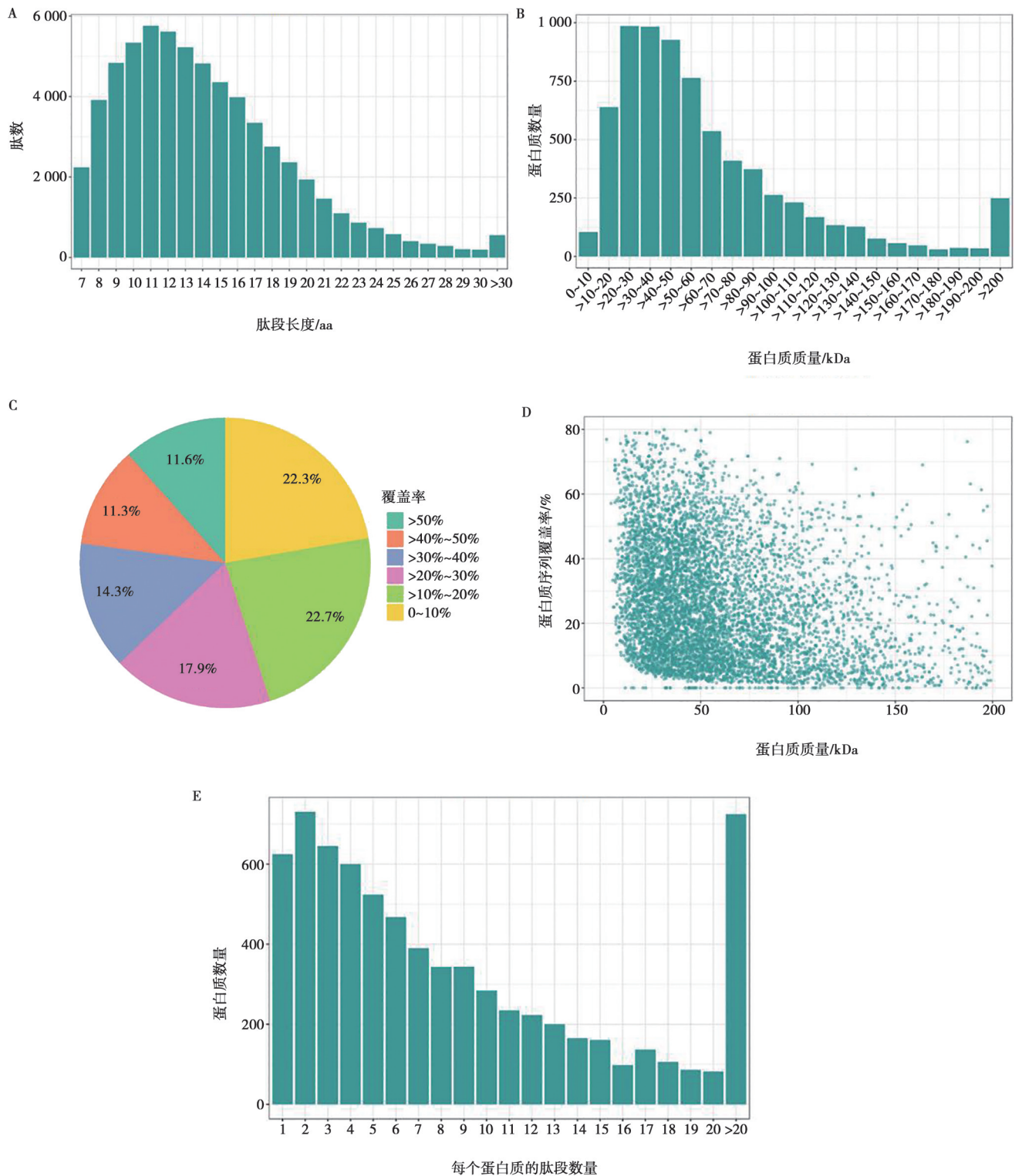
## 2.5 P、FP 和 NP 组织中差异表达蛋白的生物信息学分析

### 2.5.1 差异表达蛋白的亚细胞定位

亚细胞定位结果表明, 妊娠猪 P 与 FP 的差异蛋白中, 27.13% 的蛋白定位于细胞质, 24.03% 定位于细胞核, 19.38% 定位于细胞质膜, 14.73% 定位于线粒体, 9.3% 定位于细胞外, 4.65% 共定位于细胞质、细胞核, 0.78% 定位于其他 (图 5A); P 与 NP 的差异蛋白中, 24.75% 的蛋白定位于细胞质, 22.73% 的蛋白定位于细胞外基质, 15.66% 的蛋白定位于细胞质膜, 10.1% 的蛋白定位于线粒体, 4.55% 的蛋白定位于内质网, 3.54% 的蛋白共定位于细胞质、细胞核, 3.54% 定位于其他 (图 5B); FP 与 NP 的差异蛋白中, 23.58% 的蛋白定位于细胞核, 21.4% 的蛋白定位于细胞质, 16.59% 的蛋白定位于细胞外, 15.28% 的蛋白定位于细胞质膜, 11.35% 的蛋白定位

于线粒体, 4.37%的蛋白共定位于细胞质、细胞核, 3.93%的蛋白定位于其他, 3.49%的蛋白定位于内质

网 (图 5C)。



A. 所有鉴定到的肽段的长度分布; B. 所有鉴定到的蛋白分子量分布; C. 蛋白的覆盖度分布; D. 质谱鉴定到的蛋白分子量与覆盖度的关系; E. 每个蛋白对应的肽段数量。

图 2 样品蛋白质质谱鉴定结果

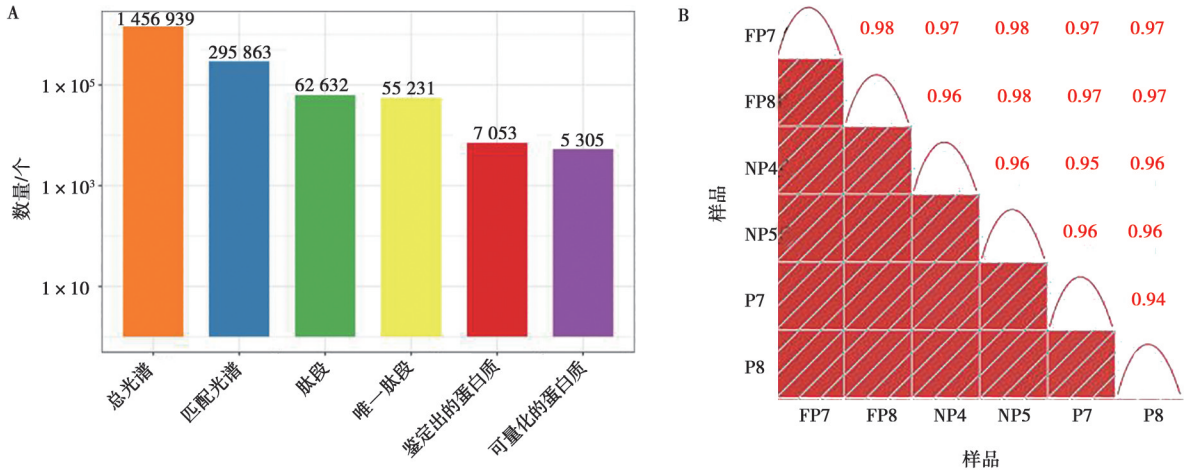


图3 4D-Label free 鉴定的质谱、肽段和蛋白 (A) 及两两样品间蛋白定量的皮尔森相关系数热图 (B)

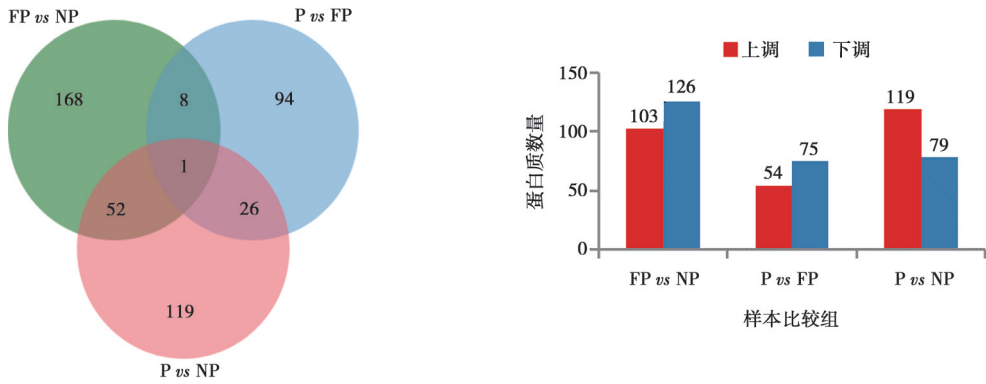
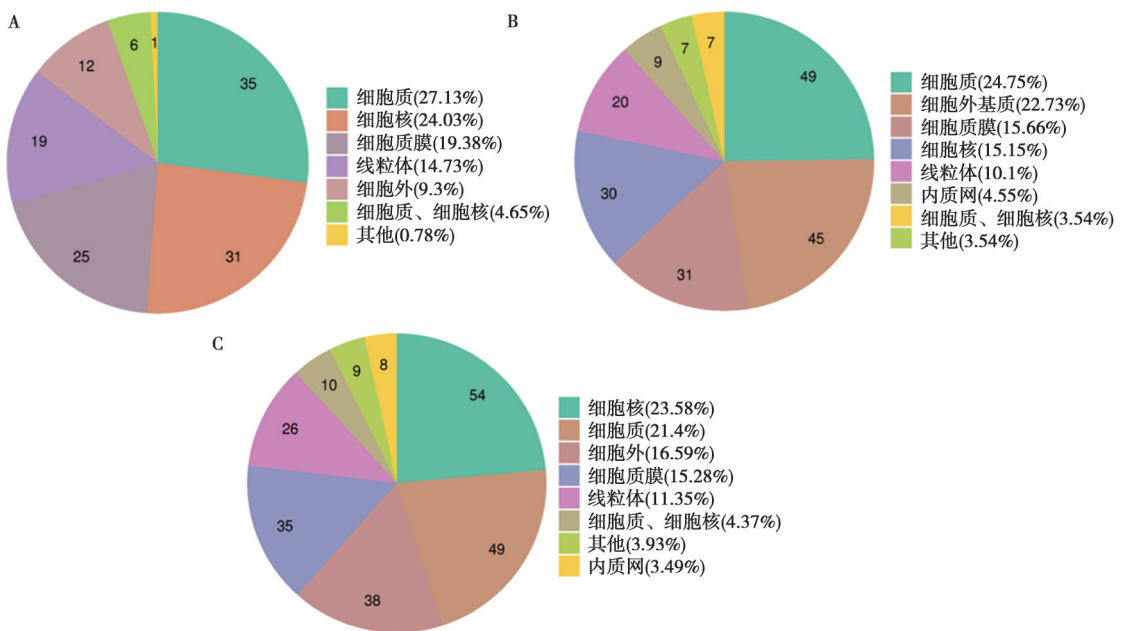


图4 两两样品间蛋白韦恩图



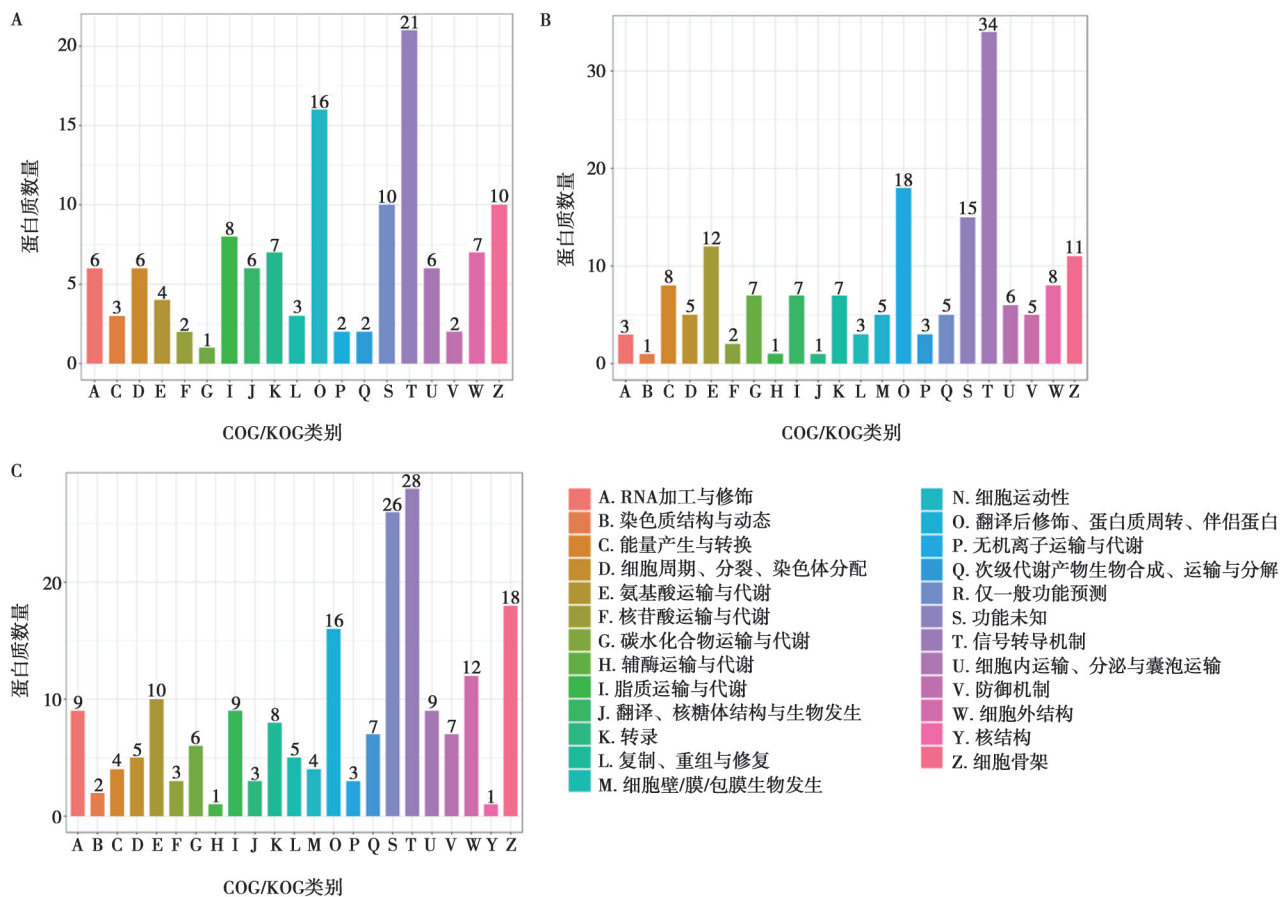
A. P 与 FP 差异蛋白定位分布; B. P 与 NP 差异蛋白定位分布; C. FP 与 NP 差异蛋白定位分布。

图5 差异表达蛋白的亚细胞结构定位分布

### 2.5.2 差异表达蛋白的 COG 分析

P 与 FP 差异表达蛋白 COG 分析结果表明 (图 6A), 蛋白参与 RNA 加工与修饰、翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣蛋白和细胞骨架等, 其中参与信号转导机制的蛋白最多, 碳水化合物运输与代谢的蛋白最少, 10 个蛋白功能未知。P 与 NP 差异表达蛋白 COG 分析发现 (图 6B), 蛋白主要参与信号转导机制、翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣蛋白等, 其中, 功能未知蛋白 15 个, 以参与信号转导机制的蛋白最多, 与上述结果一致, 最少的蛋白为染色质结构与动态、辅

酶转运与代谢。FP 与 NP 差异表达蛋白的 COG 分析发现 (图 6C), 蛋白主要参与信号转导机制、细胞骨架、翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣蛋白, 其中, 功能未知蛋白 26 个, 以参与信号转导机制的蛋白最多, 细胞骨架蛋白次之, 与以上结果有一定的差异。研究发现, 细胞迁移需要细胞骨架的重塑, 在此过程中, 微丝主导伪足的形成, 微管能够主导迁移方向, 子宫内膜上皮细胞中角蛋白纤维重塑可增加细胞的黏附性, 对胚胎的附植有重要意义。



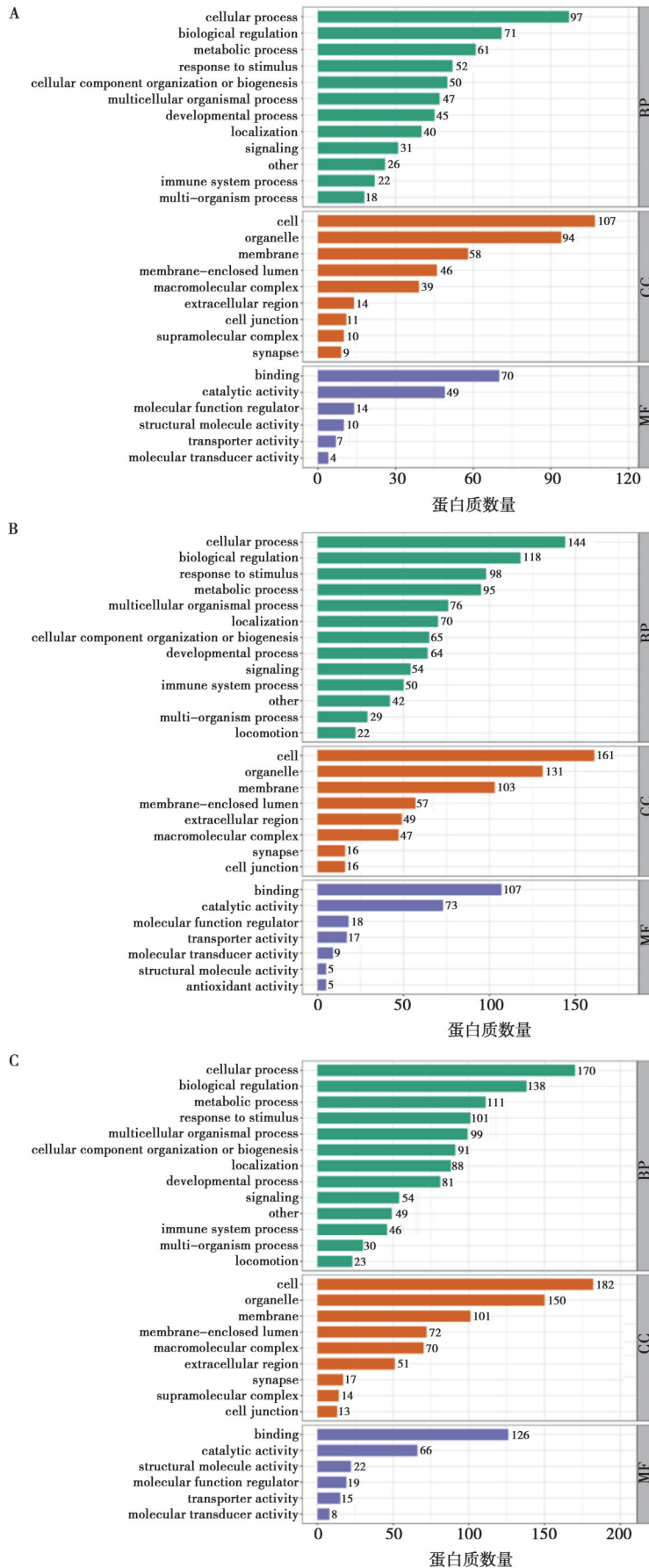
A. P 与 FP 差异蛋白; B. P 与 NP 差异蛋白; C. FP 与 NP 差异蛋白。

图 6 差异表达蛋白的 COG/KOG 功能分类分布

### 2.5.3 差异表达蛋白的 GO 二级注释分类

通过对 P 与 FP 差异表达蛋白的生物进程、细胞组成和分子功能 GO 分析发现, 生物进程中差异表达蛋白质功能主要在细胞过程 (cellular process)、生物调节 (biological regulation)、代谢过程 (metabolic process)、刺激反应 (response to stimulus)、发育过程 (developmental process) 等; 细胞组成分类中, 差异蛋白主要位于胞外 (extracellular region)、细胞膜

(membrane)、膜腔 (membrane-enclosed lumen)、分子复合物 (macromolecular complex) 等; 分子功能分类中差异表达蛋白主要为蛋白结合 (binding)、分子功能调节 (molecular function regulator)、结构分子活性 (structural molecule activity)、信号传导活性 (molecular transducer activity) 等 (图 7A)。P 与 NP 差异表达蛋白的 GO 分析 (图 7B) 以及 FP 与 NP 差异表达蛋白的 GO 注释 (图 7C) 均与上述结果相似。



A. P 与 FP 差异表达蛋白; P 与 NP 差异表达蛋白; C. FP 与 NP 差异表达蛋白。

图 7 差异表达蛋白 GO 二级注释分类中统计分布情况

#### 2.5.4 差异表达蛋白的 GO 分析

通过对差异表达蛋白分别进行了 GO 分类、KEGG 通路和蛋白结构域富集分析, 气泡图中给出了最显著富集的前 20 个分类的结果。

P 与 FP 差异表达蛋白的 GO 富集结果见图 8, 通过 GO 分类中的生物进程、细胞组成、分子功能, 分别分析差异表达蛋白在各 GO 功能条目的富集程度并排序, 发现差异蛋白主要位于细胞外间隙 (cell-cell contact zone)、细胞骨架 (cytoskeleton)、细胞间连接 (cell-cell junction)、膜的整合部分 (integral component of membrane) 等; 主要参与细胞因子刺激的细胞反应 (cellular response to cytokine stimulus)、凋亡信号通路的调控 (regulation of apoptotic signaling pathway)、白细胞分化的调节 (regulation of leukocyte differentiation)、对过氧化氢的反应 (cellular response to hydrogen peroxide) 以及相关免疫应答反应等生物学功能; 主要分子功能是受损的 DNA 结合 (damaged DNA binding)、参与细胞黏附的蛋白质结合 (protein binding involved in cell adhesion)、参与细胞-细胞黏附的蛋白质结合 (protein binding involved in cell-cell adhesion)、葡萄糖跨膜转运活性 (glucose transmembrane transporter activity)、糖跨膜转运活性 (sugar transmembrane transporter activity) 等有关。

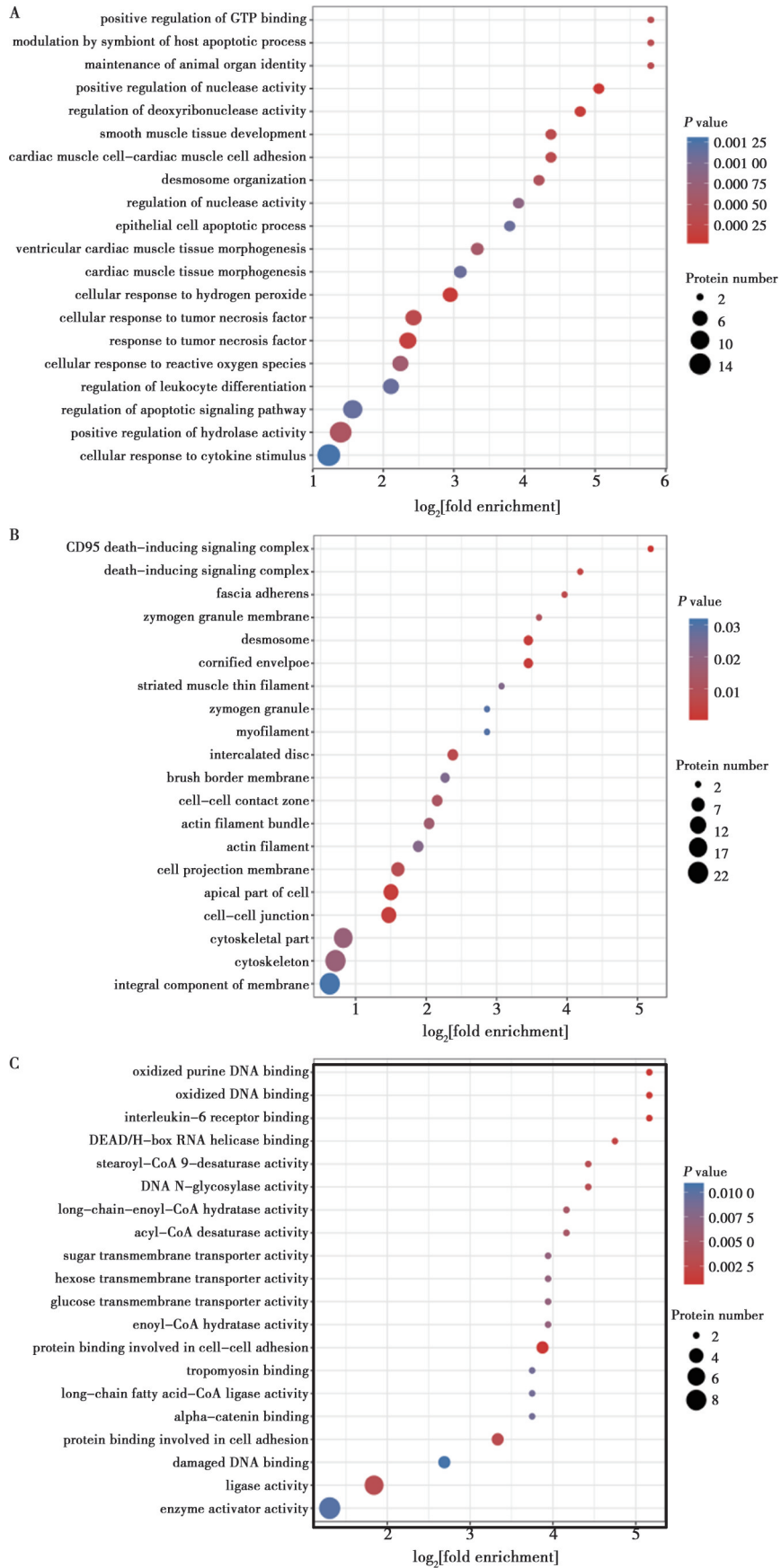
P 与 NP 差异表达蛋白的 GO 富集结果见图 9, P 与 NP 差异表达蛋白的生物进程、细胞组成、分子功能富集程度并排序, 差异蛋白主要位于细胞表面 (cell surface)、细胞质膜 (plasma membrane)、分泌小泡 (secretory vesicle)、分泌粒 (secretory granule)、细胞外区域 (extracellular region)、细胞外间隙 (extracellular space) 等部位; 参与调节型的胞吐途径 (regulated exocytosis)、细胞介导的免疫 (neutrophil mediated immunity)、防御反应调节 (regulation of defense response)、淋巴细胞活化调节 (regulation of lymphocyte activation)、炎症反应调节 (regulation of acute inflammatory response)、白细胞-细胞黏附调节 (regulation of leukocyte cell-cell adhesion)、蛋白质加工 (protein processing)、伤口愈合调节 (regulation of wound healing) 以及相关血管形成调节等生物学功能, 其中最显著的是免疫应答反应过程; 分子功能包括类固醇结合蛋白 (steroid binding)、脂质转运蛋白

活性 (lipid transporter activity)、血小板反应蛋白受体 (thrombospondin receptor activity) 以及相关跨膜信号受体活性与信号受体活性等生理活动。

FP 与 NP 差异表达蛋白的 GO 富集结果见图 10, FP 与 NP 差异表达蛋白的生物进程、细胞组成和分子功能富集程度并排序, 差异蛋白主要位于细胞质区域 (cytoplasmic region)、胞质囊泡膜 (cytoplasmic vesicle membrane)、质膜部分 (plasma membrane part)、细胞外间隙 (extracellular space)、细胞外基质 (extracellular matrix) 等部位; 参与等调节型的胞吐途径 (regulated exocytosis)、细胞-细胞黏附的正向调节 (positive regulation of cell-cell adhesion)、激素分泌的正调控 (positive regulation of hormone secretion)、伤口愈合的负调控 (negative regulation of wound healing) 以及相关免疫应答反应等生物学功能; 分子功能包括 CD4 受体结合 (CD4 receptor binding)、肌动蛋白-依赖 ATP 酶活性 (actin-dependent ATPase activity)、结构分子活性 (structural molecule activity)、细胞骨架的结构组成部分 (structural constituent of cytoskeleton) 以及相关辅因子等活动。

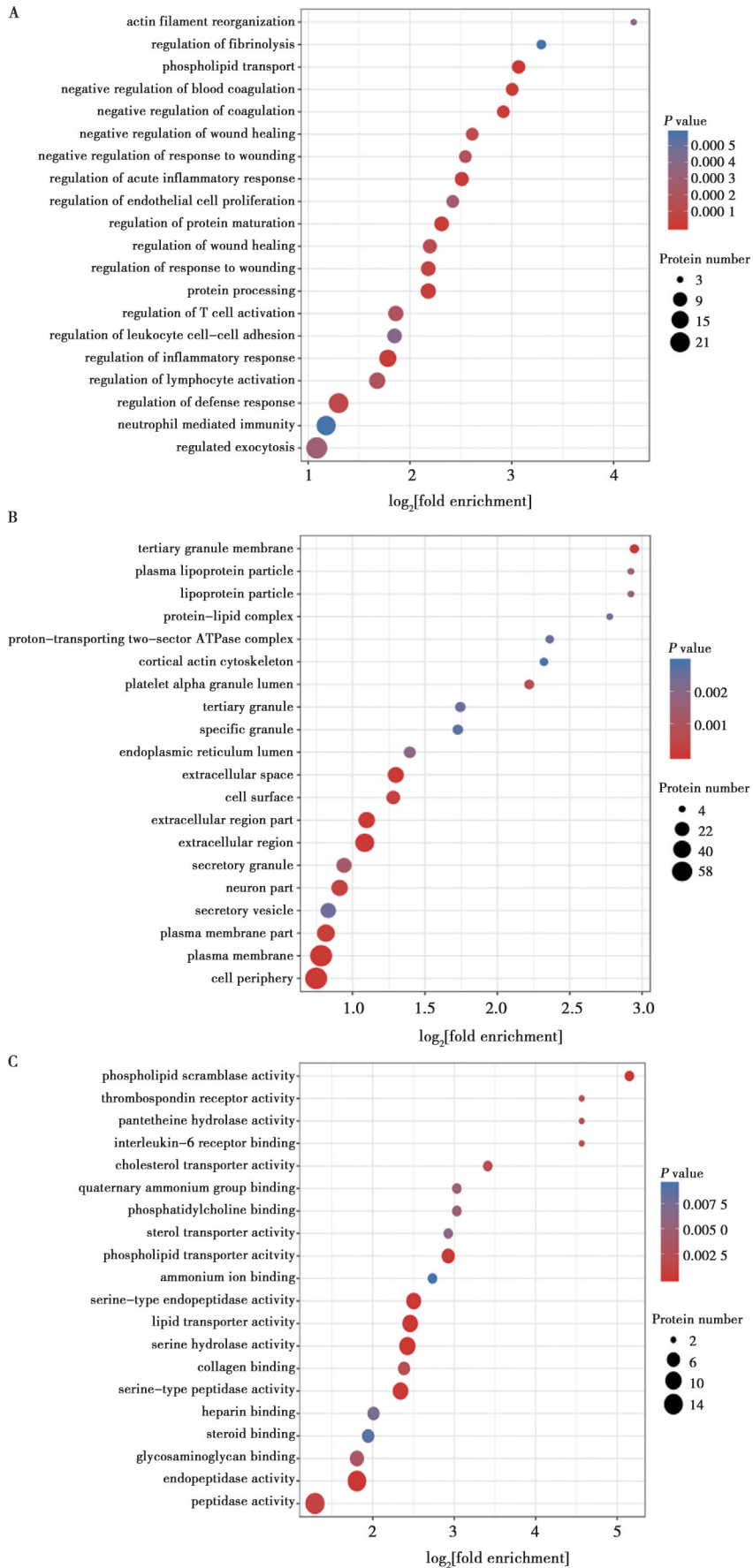
#### 2.5.5 差异表达蛋白的 KEGG 分析

由图 11 发现, P 与 NP 的差异表达蛋白在 KEGG 通路注释主要富集于信号通路, 如 PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway) 等与免疫有关的通路, 还包括有机物代谢, 如丁酸盐代谢 (butanoate metabolism)、脂肪酸代谢 (fatty acid metabolism) 等通路; P 与 NP 差异表达蛋白的结果显示, 主要集中于补体和凝血级联反应 (complement and coagulation cascades)、胆固醇代谢 (cholesterol metabolism) 以及幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导 (epithelial cell signaling in *Helicobacter pylori* infection) 通路; FP 与 NP 差异表达蛋白结果显示, 金黄色葡萄球菌感染 (*Staphylococcus aureus* infection)、补体和凝血级联通路 (complement and coagulation cascades)、肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system) 同样参与免疫反应。上述结果表明, P、FP 相关的通路均与免疫相关, 说明妊娠 15 d 可能作为母体与胎儿发生信息交流的关键时期。



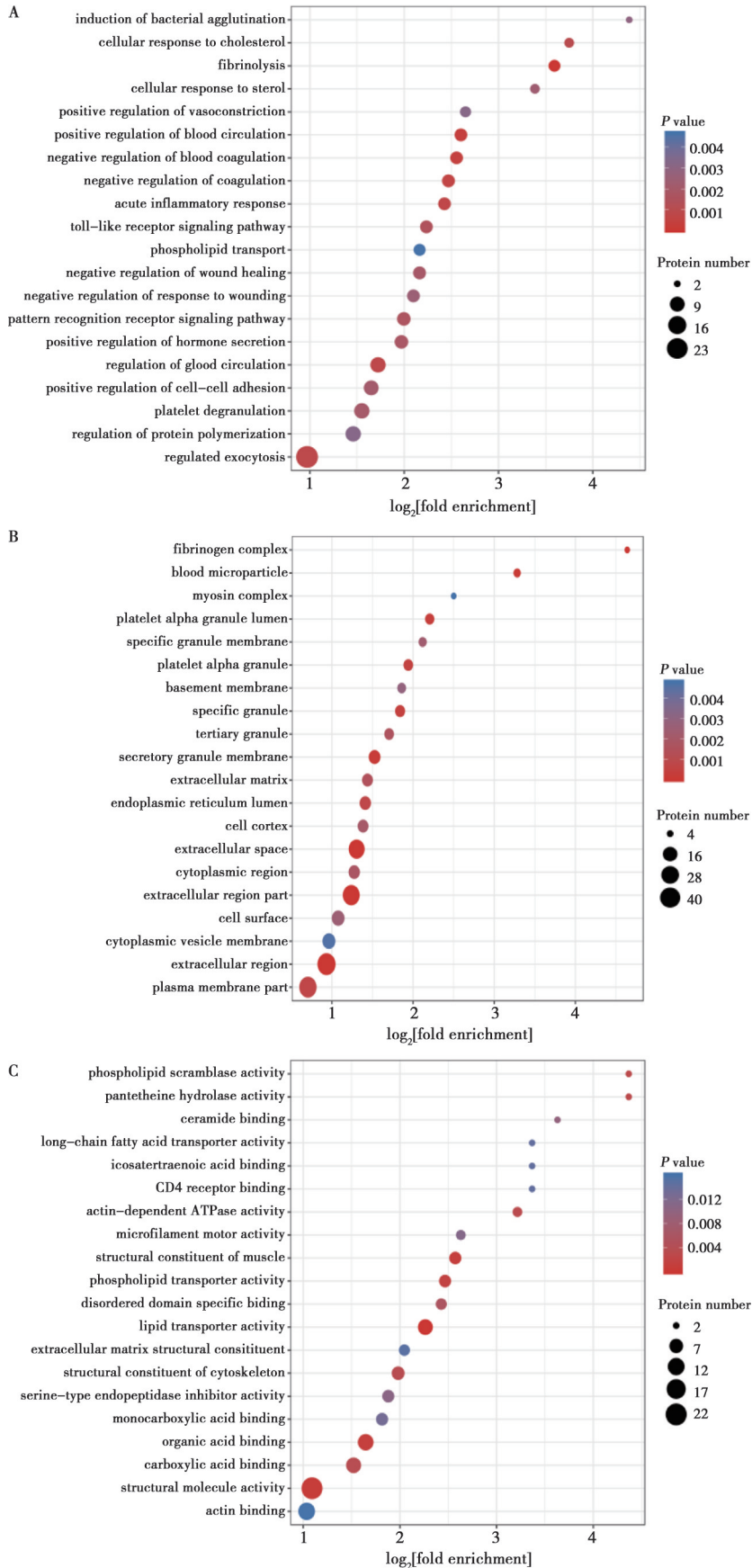
A. 生物进程; B. 细胞组成; C. 分子功能。

图8 P与FP差异表达蛋白在GO功能分类中富集分布气泡图



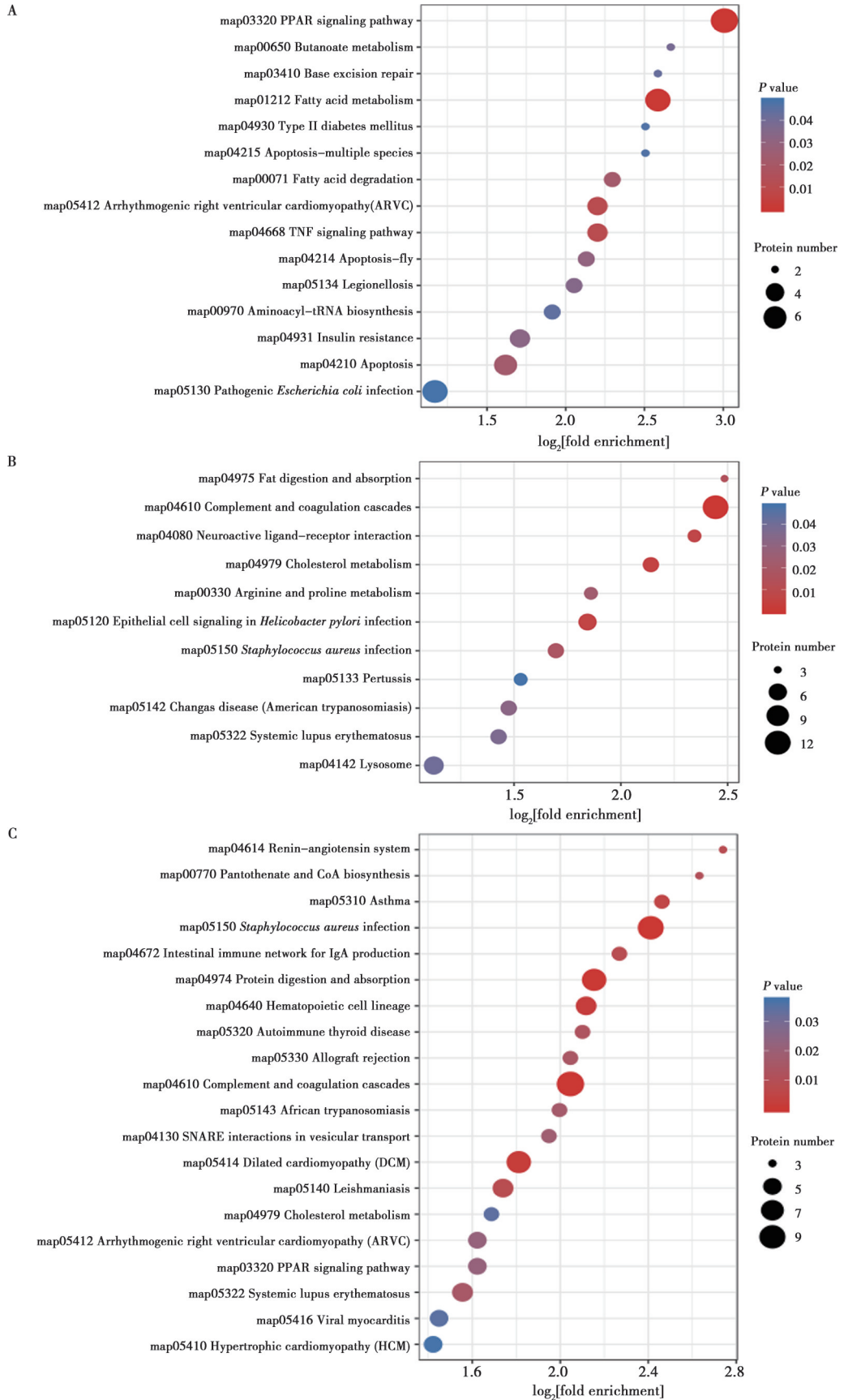
A. 生物进程; B. 细胞组成; C. 分子功能。

图9 P与NP差异表达蛋白在GO功能分类中富集分布气泡图



A. 生物进程； B. 细胞组成； C. 分子功能。

图 10 FP 与 NP 差异表达蛋白在 GO 功能分类中富集分布气泡图



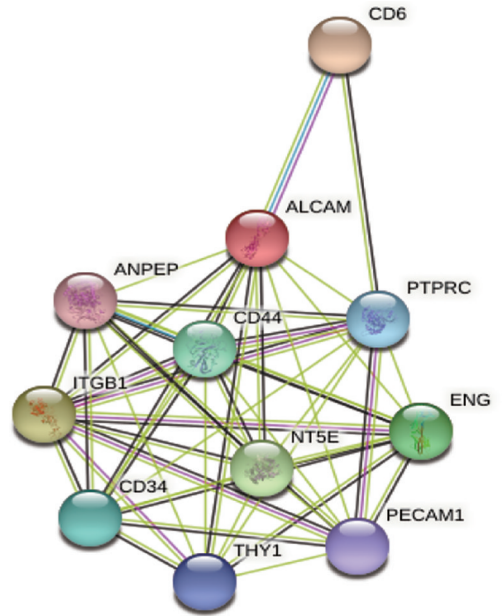
A. P 与 FP 差异表达蛋白； B. P 与 NP 差异表达蛋白； C. FP 与 NP 差异表达蛋白。

图 11 差异表达蛋白在 KEGG 通路中富集分布气泡图

### 2.6 差异蛋白 ALCAM

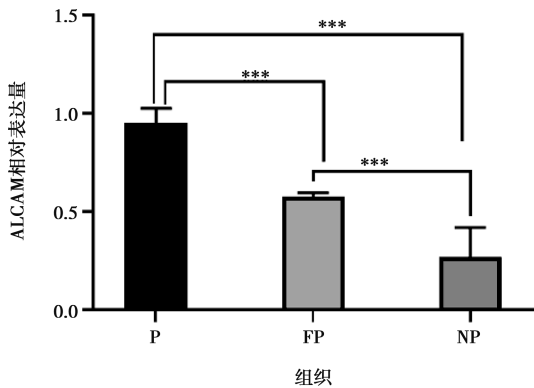
选取差异表达蛋白 ALCAM，通过使用 uniprot 对 ALCAM 进行 BLAST 比对，发现猪的 ALCAM 蛋白序列与人、大鼠、小鼠的相似度超过 88%。这表明该蛋白在哺乳动物中具有高度保守性，对 ALCAM 进行蛋白互作预测，发现 ALCAM 能够与多个蛋白发生互作，在图 12 中共展示了其中 11 个互作蛋白，STRING 的 GO 和 KEGG 功能富集结果表明，ALCAM 相互作用蛋白的生物学过程包括血管生成、细胞黏附、细胞表面受体信号通路、内生性刺激反应、对有机物的反应，显著富集到 ALCAM 相互作用蛋白主要位于细胞、细胞连接、细胞质膜，显著富集到的 ALCAM 相互作用蛋白的信号通路包括细胞黏附分子、ECM 受体相互作用、造血、白细胞跨内迁移、蛋白聚糖在癌症等。

通过 Western blot 对 ALCAM 蛋白进行差异表达验证，结果表明（图 13），ALCAM 蛋白水平在 P 组织显著高于 FP 组织 ( $P < 0.001$ )，同时，FP 组织显著高于 NP 组织 ( $P < 0.001$ )。



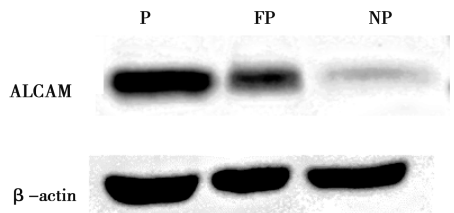
注：CD6 为白细胞分化抗原 6，ANPEP 为氨肽酶 N，PTPRC 为蛋白酪氨酸磷酸酶受体 C，CD44 为白细胞分化抗原 44，ITGB1 为整合素 β1，ENG 为内皮糖蛋白，NTSE 为核苷酸磷酸二酯酶，CD34 白细胞分化抗原 34，PECAM1 血小板内皮细胞黏附分子 1，THY1 为 Thy-1 细胞表面抗原。

图 12 ALCAM 蛋白网络互作



注：\*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图 13 ALCAM 蛋白在 P、FP 与 NP 组织中的相对表达量



### 3 讨论

蛋白质组学分析结果表明，在胚胎附植过程中，子宫内膜上皮细胞可能对胚胎产生不同的反应，这通常取决于母体的发育状况<sup>[1]</sup>。在胚胎附植早期阶段，一些妊娠失败的母猪腔上皮内无法发生这些基本变化，实际上，在这类母畜中，因为不能适当调节上皮的屏障功能以促进滋养外胚层附着，从而导致胚胎植入失败，导致妊娠失败<sup>[4]</sup>。

由于胚胎与子宫内膜的第一次接触是子宫腔内的

上皮，因此本研究特别研究了子宫内膜上皮的功能状态及其蛋白质组的相关变化，利用 4D-Label free、质谱和生物信息学工具，鉴定得到在妊娠 15 d 母猪子宫内胚胎附植点、非附植点及非妊娠母猪子宫内特有的差异表达蛋白，并对这些蛋白的功能作用进行了探讨。前人对母胎接触面的研究考虑到了单个蛋白质表达的变化，例如负责合成由子宫和胚胎产生的信息交流，这些差异蛋白对于正常调节生殖过程，如黏附因子、细胞因子或生长因子非常重要。Liu 等<sup>[5]</sup>研究证实，敲除子宫内膜中的钙结合蛋白 S100A11，不

仅降低了小鼠的胚胎着床率，而且人的子宫内膜容受性和免疫应答相关因子的表达也会受到不利影响；Yin 等<sup>[5]</sup>的研究表明，通过敲除小鼠子宫中的 N-乙酰乙酰酶/N-磺基转移酶 1 (NDST1) 基因，小鼠的生殖道发育和卵巢功能虽然看似正常，但在胚胎着床的过程中，由于子宫内膜无法正常脱落，而导致小鼠胚胎无法在子宫内膜上正常着床。这些研究说明了 NDST1 及其作用的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (HSPG) 在胚胎着床时的母胎交流过程中发挥重要的作用。然而，关于猪的早期妊娠附植点、非附植点和未妊娠子宫内膜组织蛋白质组学研究还未见报道。本研究通过对子宫内膜上皮组织进行蛋白质组学分析，根据滋养外胚层球体粘连的有无将其定义为“妊娠”或“未妊娠”，发现了一个包含大量以前没有研究过的蛋白质特征。

按照胎盘嵌入子宫内膜的方式来区分，与人类等胎盘深度侵入子宫内膜的哺乳动物不同，猪是一种具有非侵袭性胎盘的物种，LE 在整个怀孕过程中都保持完好无损<sup>[6]</sup>。胚胎着床过程伴随着子宫腔上皮细胞极性从高到低的转变以及 GE 的分泌<sup>[8-9]</sup>。在植入时，受精卵会产生雌激素，这是识别母猪怀孕的信号<sup>[10]</sup>。猪胚胎在妊娠第 11~12 天以及妊娠第 15~25 天之间分泌的雌激素水平上升<sup>[6]</sup>。来自胚胎的雌激素、IFNG 和 IFND 与 P4 一起可以在时间和空间上调节子宫内膜基因的表达，从而决定子宫细胞的功能和结构变化<sup>[12]</sup>。因此，了解妊娠期间子宫内膜重塑的分子机制对于研究母猪多胎的分子基础非常重要。胚胎的成功发育依赖于胚胎和母体之间的分子相互作用<sup>[14]</sup>。在妊娠第 12~13 天之前，猪胚胎一直自由漂浮在子宫腔中，直到它们与子宫腔上皮对接并附着在子宫腔上皮。到了这个发育阶段，胚胎开始由组织提供营养支持，从妊娠第 15 天开始，血液开始提供营养<sup>[15]</sup>。这些功能变化伴随着广泛的子宫内膜重构<sup>[16]</sup>，但是猪在围床期这一组织中的特定蛋白质组学特征尚不清楚。

本研究通过 4D-Label free 蛋白质组学技术，鉴定到 1 456 939 个肽段，其中，胚胎非附植点与未妊娠猪子宫内膜之间有 229 个差异表达蛋白；胚胎附植点与非附植点之间有 129 个差异表达蛋白；胚胎附植点与未妊娠母猪子宫内膜之间有 198 个差异表达蛋白。GO 富集分析表明，差异表达蛋白主要分布在细胞膜、细胞质、细胞核，主要功能均与免疫调节相关，表明此时正处于母胎交流的关键时期，由于携带了来自父亲的抗原，胎儿容易被母体免疫系统识别为“外来”物质，此时为了保护胎儿，多种免疫相关通路共同作用，保护胎儿免受母体免疫系统的攻击。

KEGG 富集通过对参与的路径进行分析，结果表明差异蛋白参与的主要靶标路径均与免疫反应相关，这证实了 GO 富集分析结果。ALCAM 等蛋白在胚胎附植点呈显著上调，该蛋白质是一种跨膜糖蛋白，广泛参与细胞间黏附、信号传导等生物学过程，被发现与细胞骨架组织和黏附过程均有关<sup>[17]</sup>，推测可能在妊娠早期发挥重要作用。

综上所述，通过 4D-Label free 蛋白质组学技术建立了猪早期妊娠关键期子宫内膜的质谱分析，以识别妊娠特有的蛋白质，这些蛋白质可能对胚胎妊娠有重要作用，本文提供的数据可为今后研究子宫生理学提供一定的基础，这一认识也可能有助于我们了解猪早期胚胎丢失率高的原因，同时也为提高猪的繁殖效率提供了研究思路。

## 参考文献：

- [1] THIE M, DENKER H W. *In vitro* studies on endometrial adhesiveness for trophoblast: cellular dynamics in uterine epithelial cells [J]. *Cells Tissues Organs*, 2002, 172 (3): 237-252.
- [2] BAZER F W, BURGHARDT R C, JOHNSON G A, et al. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways [J]. *Reprod Biol*, 2008, 8 (3): 179-211.
- [3] TUROWSKI G, TONY PARKS W, ARBUCKLE S, et al. The structure and utility of the placental pathology report [J]. *APMIS*, 2018, 126 (7): 638-646.
- [4] ALMIÑANA C, HEATH P R, WILKINSON S, et al. Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3): e33625.
- [5] LIU X M, DING G L, JIANG Y, et al. Down-regulation of S100A11, a calcium-binding protein, in human endometrium may cause reproductive failure [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97 (10): 3672-3683.
- [6] YIN Y, WANG A, FENG L, et al. Heparan sulfate proteoglycan sulfation regulates uterine differentiation and signaling during embryo implantation [J]. *Endocrinology*, 2018, 159 (6): 2459-2472.
- [7] OSTRUP E, BAUERSACHS S, BLUM H, et al. Differential endometrial gene expression in pregnant and nonpregnant sows [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83 (2): 277-285.
- [8] GEISERT R D, ZAVY M T, MOFFATT R J, et al. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1990, 40: 293-305.
- [9] BURGHARDT R C, BOWEN J A, NEWTONG R, et al. Extracellular matrix and the implantation cascade in pigs [J]. *J Reprod Fertil Suppl*, 1997, 52: 151-164.
- [10] IGWEBUIKE U M. A review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats [J]. *Anim Reprod Sci*, 2009, 112 (1/2): 1-7.
- [11] BAZER F W, SONG G, THATCHER W W. Roles of conceptus secretory proteins in establishment and maintenance of pregnancy in ru-

minants [J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2012, 25 (1): 1-16.

[12] MARCELO P, LEFEVRE F. Induction of the IFN- $\gamma$  gene and protein is linked to the establishment of cell polarity in a porcine epithelial cell line [J]. Exp Cell Res, 2002, 280 (1): 33-44.

[13] BAZER F W, WU G, SPENCER T E, et al. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals [J]. Mol Hum Reprod, 2010, 16 (3): 135-152.

[14] BAZER F W, VALLET J L, ROBERTS R M, et al. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy [J]. JReprod Fertil, 1986, 76 (2): 841-580.

[15] DANTZER V. Electron microscopy of the initial stages of placenta-  
tion in the pig [J]. Anat Embryol (Berl), 1985, 172 (3): 281-293.

[16] CENCICA, GUILLOMOT M, KOREN S, et al. Trophoblastic interferons; do they modulate uterine cellular markers at the time of conceptus attachment in the pig? [J]. Placenta, 2003, 24 (8/9): 862-869.

[17] FERRAGUT F, VACHETTA V S, TRONCOSO M F, et al. ALCAM/CD166: a pleiotropic mediator of cell adhesion, stemness and cancer progression [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2021, 61: 27-37.

· 信息 ·

## 21 种畜牧、兽医科学类中国科技核心期刊中《畜牧与兽医》 综合评价总分排名第九位

《2024年版中国科技期刊引证报告（核心版）自然科学卷》以《中国科技论文与引文数据库》（CSTPCD）为基础，采用科学客观的研究方法与评价方式，遴选中国自然科学领域各学科分类重要期刊作为统计来源期刊。2024年版引证报告共收录了在中国（不含港澳台地区）正式出版的1998种中文期刊和167种英文期刊，其中畜牧、兽医科学类期刊共收录21种，包括19本中文期刊和2本英文期刊，《畜牧与兽医》综合评价总分排名第九位。21种期刊主要指标详见附表。

附表 2023年畜牧、兽医科学类期刊主要指标

序号	刊名	核心总被引频次			核心影响因子			综合评价总分		学科扩 散指标	学科影 响指标	红点 指标
		数值	排名	离均差率	数值	排名	离均差率	数值	排名			
1	ANIMAL NUTRITION	951	15	-0.49	1.612	2	0.65	51.9	2	6.52	0.81	0.25
2	JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY	1 123	13	-0.40	1.403	4	0.44	46.8	4	6.48	0.81	0.08
3	蚕业科学	627	19	-0.66	0.660	16	-0.32	34.3	13	7.19	0.43	0.25
4	动物医学进展	1 522	9	-0.19	0.670	15	-0.31	41.7	8	16.05	0.90	0.52
5	动物营养学报	7 671	1	3.11	1.990	1	1.04	78.4	1	16.33	1.00	0.82
6	家畜生态学报	1 158	12	-0.38	0.643	17	-0.34	34.6	12	8.90	0.95	0.54
7	经济动物学报	215	21	-0.88	0.510	20	-0.48	26.6	19	3.71	0.71	0.53
8	粮食与饲料工业	807	16	-0.57	0.618	19	-0.37	28.3	18	7.81	0.57	0.22
9	饲料工业	2 549	6	0.36	1.529	3	0.57	45.6	5	11.00	0.90	0.73
10	饲料研究	3 500	3	0.87	1.202	6	0.23	32.2	16	13.43	0.95	0.70
11	畜牧兽医学报	2 563	5	0.37	1.060	8	0.09	44.1	7	12.14	0.95	0.59
12	畜牧与兽医	1 484	11	-0.21	0.730	14	-0.25	39.1	9	9.48	0.86	0.57
13	畜牧与饲料科学	797	17	-0.57	0.620	18	-0.37	36.8	11	8.14	0.86	0.47
14	中国动物传染病学报	648	18	-0.65	0.821	11	-0.16	24.7	20	5.33	0.76	0.56
15	中国家禽	1 966	7	0.05	0.911	10	-0.07	33.6	15	7.71	0.95	0.56
16	中国兽药杂志	572	20	-0.69	0.462	21	-0.53	23.6	21	7.95	0.76	0.25
17	中国兽医科学	1 102	14	-0.41	0.772	12	-0.21	33.8	14	8.05	0.86	0.57
18	中国兽医学报	1 808	8	-0.03	0.761	13	-0.22	37.4	10	11.38	0.95	0.56
19	中国畜牧兽医	3 121	4	0.67	1.004	9	0.03	45.3	6	15.29	0.95	0.65
20	中国畜牧杂志	3 551	2	0.90	1.189	7	0.22	47.4	3	12.95	1.00	0.63
21	中国预防兽医学报	1 484	10	-0.21	1.338	5	0.37	31.0	17	6.52	0.81	0.47
21种期刊平均值		1 868			0.976							

注：数据来自中国科学技术信息研究所《2024年版中国科技期刊引证报告（核心版）自然科学卷》。