



霍洪安,李小雪,孙椰,等.猪卵泡发育过程中颗粒细胞内参基因表达稳定性分析[J].南京农业大学学报,2024,47(4):710-720.

HUO Yang'an, LI Xiaoxue, SUN Chen, et al. Stability analysis of reference gene expression in granulosa cells during porcine follicular development [J].

Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(4): 710-720.

## 猪卵泡发育过程中颗粒细胞内参基因表达稳定性分析

霍洪安,李小雪,孙椰,李齐发,杜星\*

(南京农业大学动物科技学院,江苏南京 210095)

**摘要:** [目的]本研究旨在分析猪卵泡发育不同阶段颗粒细胞内参基因的表达稳定性,筛选有效内参基因用于鉴定猪卵泡发育关键调控基因及其表达模式。[方法]基于形态学观察与类固醇激素检测分离猪腔前、有腔、成熟和闭锁卵泡,并收集相应颗粒细胞;利用 RT-qPCR 检测甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (*GAPDH*)、 $\beta$ -肌动蛋白 (*ACTB*)、ATP 合酶 F1 (*ATP5F1*)、 $\beta$ 2-微球蛋白 (*B2M*)、真核翻译伸长因子 1 $\alpha$  (*EEF1A1*)、次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1 (*HPRT1*)、核糖体蛋白 S3 (*RPS3*)、微管蛋白  $\alpha$ -1b (*TUBA1B*) 和泛素 C (*UBC*) 等 9 个候选内参基因在猪卵泡不同发育阶段颗粒细胞中的表达水平;综合  $\Delta Ct$ 、geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 等算法分析候选内参基因在猪卵泡发育过程中的表达稳定性。[结果]候选内参基因在猪卵巢颗粒细胞中的表达水平存在较大差异,其中 *EEF1A1* 和 *TUBA1B* 的表达水平较高,而 *HPRT1* 和 *UBC* 的表达水平较低;不同算法得到的稳定性存在差异,用  $\Delta Ct$ 、NormFinder 和 BestKeeper 分析发现 *RPS3* 和 *ATP5F1* 的稳定性较高,用 geNorm 分析发现 *GAPDH* 和 *HPRT1* 的稳定性较高,最终利用 RefFinder 进行综合权重分析得出候选内参基因的稳定性从高到低依次为 *RPS3*、*ATP5F1*、*HPRT1*、*EEF1A1*、*GAPDH*、*ACTB*、*TUBA1B*、*B2M*、*UBC*。进一步以不同表达稳定性内参基因为参照对母猪繁殖力候选基因 *FSHR* 和 *NORFA* 在卵泡发育过程中的表达模式进行检测,结果表明内参基因稳定性对准确鉴定目的基因表达水平和变化模式至关重要。[结论]*RPS3* 和 *ATP5F1* 在猪卵泡发育过程中具有较高的表达稳定性,可作为有效内参基因用于后续猪卵泡发育相关研究,为鉴定猪卵泡发育关键调控基因及其表达模式等相关内参基因研究提供理论依据。

**关键词:**猪;卵泡发育;卵巢颗粒细胞;RT-qPCR;内参基因;表达稳定性分析

中图分类号:S813

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0710-11

## Stability analysis of reference gene expression in granulosa cells during porcine follicular development

HUO Yang'an, LI Xiaoxue, SUN Chen, LI Qifa, DU Xing\*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** [Objectives] The aim of this study was to analyze the expression stability of reference genes in porcine granulosa cells (GC) during follicular development, and to further screen effective reference genes (RG) for the identification of key regulatory genes and their expression patterns. [Methods] Porcine preantral, antral, mature and atretic follicles were isolated and classified based on morphological observation with steroid hormone detection, and corresponding GC were collected. RT-qPCR was performed to detect the expression levels of nine candidate RG, including glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), actin beta (*ACTB*), tubulin alpha-1b (*TUBA1B*), ATP synthase f1 (*ATP5F1*), beta-2-microglobulin (*B2M*), ubiquitin C (*UBC*), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), ribosomal protein S3 (*RPS3*), and eukaryotic translation elongation factor 1 alpha (*EEF1A1*);  $\Delta Ct$ , geNorm, NormFinder, BestKeeper and RefFinder algorithms were used to analyze the expression stability of candidate RG in porcine GC during follicle development. [Results] The expression levels of candidate RG in porcine GC were significantly different, among which *EEF1A1* and *TUBA1B* had higher expression levels, while *HPRT1* and *UBC* had lower expression levels.  $\Delta Ct$ , NormFinder and BestKeeper analysis showed that *RPS3* and *ATP5F1* were the most stable RG, while *GAPDH* and *HPRT1* were found to be more stable by geNorm analysis. Finally, the comprehensive weighted analysis by RefFinder showed that the stability of the candidate RG was ranked as follows: *RPS3*, *ATP5F1*, *HPRT1*, *EEF1A1*, *GAPDH*, *ACTB*, *TUBA1B*, *B2M* and *UBC*. Furthermore, the expression patterns of fertility-associated candidate genes (*FSHR* and *NORFA*) during follicular development were analyzed with different RG as controls, and results showed that the stability of RG was important for accurate identification of the expression and patterns of target genes. [Conclusions] *RPS3* and *ATP5F1* with higher expression stability could be used as effective RG for subsequent studies on sow follicular development, which also provide a theoretical basis for ideal RG selection to identify the key regulatory genes and their expression patterns during sow follicular development.

**Keywords:** porcine; follicle development; granulosa cells; RT-qPCR; reference genes; expression stability analysis

收稿日期:2023-06-14

基金项目:国家自然科学基金项目(32372839,31902130);江苏省自然科学基金项目(BK20231475)

\*通信作者:杜星,副研究员,主要从事动物分子遗传研究,E-mail:duxing@njau.edu.cn。

我国是生猪养殖和猪肉消费第一大国,但在规模化养殖条件下母猪年生产力与畜牧业发达国家仍存在一定差距,这已成为制约我国养猪业健康发展的瓶颈。对母猪繁殖力的形成机制进行解析发现排卵数是影响母猪繁殖力最主要的初始因素,而作为母猪繁殖系统的基本功能单位,卵泡发育命运(成熟排卵或闭锁退化)可通过影响排卵数直接决定母猪繁殖力高低<sup>[1]</sup>。国内外研究证实卵巢颗粒细胞凋亡或程序性死亡是引发卵泡闭锁的主要诱因<sup>[2-3]</sup>,但前者的调控机制尚未完全明晰。因此,解析卵泡发育过程中颗粒细胞状态的生物学调控机制尤为重要。目前,高通量测序技术结合分子生物学手段是鉴定关键功能基因和构建分子调控网络的主要研究方法,上述过程往往需要选择可靠、有效且稳定表达的内参基因作为对照。

作为生命科学领域广泛应用的分子生物学技术,反转录荧光定量 PCR (reverse-transcript quantitative PCR, RT-qPCR) 是一种在 cDNA 底物经过聚合酶链式扩增反应过程中产生可接收荧光信号,并基于检测到的荧光信号值定量分析目标基因转录水平与表达丰度,进而初步了解该基因生物学功能的研究方法<sup>[4-5]</sup>。RT-qPCR 目前具有操作便利、反应快速和结果准确等优点,但其检测准确性也受到若干因素的影响,包括但不限于组织细胞数量和类型差异、RNA 提取完整性、反转录效率以及定量分析方法等<sup>[6-7]</sup>。针对上述影响因素,Bustin 等<sup>[8]</sup>和 Johnson 等<sup>[9]</sup>分别提出并优化了基于高准确性进行 RT-qPCR 试验的最低要求信息量准则(minimum information for publication of RT-qPCR expression, MIQE),其中着重对最适内参基因的选择和使用提出明确要求。内参基因,又名管家基因(housekeeping gene),是细胞内维持基础功能的一类基因,正常条件下其在生物体内应具有良好的表达稳定性<sup>[10-11]</sup>,因此被广泛应用于 RT-qPCR 等分子生物学试验并作为内部对照校正目标基因的表达水平<sup>[12-13]</sup>。理想的内参基因在不同生理条件下应始终保持较高的表达稳定性,但近年来研究表明理想的内参基因是不存在的,大多数内参基因的表达水平在生命进程不同时期、不同组织细胞类型、生物学过程以及体内外试验不同处理后均发生显著变化<sup>[14]</sup>。而且使用不同内参基因进行校正会对目标基因的表达水平产生较大影响<sup>[15]</sup>。因此,选择稳定表达的内参基因对于获得准确的目标基因表达数据至关重要。

尽管 MIQE 准则指出在进行 RT-qPCR 试验前需对内参基因的稳定性进行鉴定,但由于检测过程繁复耗时,目前仅有少数研究在特定组织细胞或生理过程中鉴定了最适内参基因<sup>[16-17]</sup>,多数研究则不加鉴别选择常用的内参基因(如 *GAPDH*、*ACTB* 和 *TUBULIN* 等)开展试验。目前国内外有关猪卵泡发育过程中颗粒细胞内部内参基因表达稳定性的研究报道较少。因此,本研究选择 9 个常见且在猪卵巢组织中具有一定表达水平的内参基因(*GAPDH*、*ACTB*、*TUBA1B*、*ATP5F1*、*B2M*、*HPRT1*、*UBC*、*RPS3* 和 *EEF1A1*)作为候选,利用  $\Delta Ct$ 、geNorm、NormFinder、BestKeeper 和 RefFinder 等算法综合分析上述候选内参基因在猪卵泡发育过程中的表达稳定性,为解析猪卵泡发育与颗粒细胞状态的调控机制过程中准确鉴定调控基因及其表达模式提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

随机选取 60 只体况良好、体重相近的 180 日龄健康且性成熟的杜长大三元杂交母猪(江苏淮安苏食集团),屠宰后立即采集双侧新鲜卵巢,浸润于 37 °C 含 10 g·L<sup>-1</sup>庆大霉素的磷酸盐缓冲液(PBS),并迅速带回实验室,用于猪不同发育阶段卵泡鉴定分级和卵巢颗粒细胞收集等后续试验。

### 1.2 卵泡分级与壁层卵巢颗粒细胞收集

利用预热的生理盐水和 75%乙醇溶液将新鲜收集的猪卵巢组织反复交替轻柔冲洗,彻底去除组织表面血渍及可能残留的污染源,随后使用手术刀和眼科镊切除多余附属组织并剥离单个卵泡,结合形态学观察与类固醇激素测定对不同发育阶段的猪卵泡进行鉴定分级。具体方法参照文献[18]。其中,腔前、有腔和成熟卵泡主要通过卵泡直径、腔体形成和卵泡液中雌二醇(17 $\beta$ -estradiol, E<sub>2</sub>)浓度为标准进行综合鉴定,而闭锁卵泡则表现为透明无色、卵泡膜表面无血管分布、卵泡内游离颗粒细胞较多(>2 500  $\mu$ L<sup>-1</sup>)且卵泡液雌二醇/孕酮指数(E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub> index)较低(<2.0)。分别将上述经过鉴定处于不同发育阶段的卵泡逐个扎破,待卵泡液排尽后剖开卵泡,利用小型细胞刮刀轻柔刮取并单独收集每个卵泡的壁层颗粒细胞,用于后续候选内参基因在猪卵泡发育过程中表达稳定性的分析与验证。

### 1.3 细胞总 RNA 的提取及反转录(RT)

选取等量不同发育阶段卵泡来源的颗粒细胞,采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,用氯仿-异丙醇法纯

化颗粒细胞总 RNA,经完整性、纯度和浓度检测后用于后续试验或置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。利用 PrimerScript<sup>TM</sup> RT Master Mix kit(南京诺唯赞公司)制备相应 cDNA。具体过程如下:以 500 ng 颗粒细胞总 RNA 为底物,加入 2  $\mu\text{L}$  4 $\times$  gDNA wiper Mix,混合均匀后置于 42  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 min,去除残留 DNA,随后在上述反应体系中加入 2  $\mu\text{L}$  5 $\times$  HiScript III qRT Super Mix,混合均匀后进行反转录。反应条件为 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min,85  $^{\circ}\text{C}$  5 s。测定 cDNA 浓度并利用 DEPC 水将所有样品稀释至同一水平后用于后续 RT-qPCR 试验。

#### 1.4 定量引物设计与扩增效率分析

通过 NCBI 中 GenBank 数据库获得猪 9 个候选内参基因的编码区序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计定量引物并交由南京擎科生物有限公司合成。引物信息详见表 1。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。反应体系:2 $\times$ Vazyme LAMP<sup>®</sup> Master Mix 5  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 3.5  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 0.5  $\mu\text{L}$ 。反应程序为 98  $^{\circ}\text{C}$  5 min;98  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min(40 个循环);72  $^{\circ}\text{C}$  5 min;4  $^{\circ}\text{C}$  保存。扩增产物经 20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳和高分辨率成像检验引物扩增单一性,进一步通过熔解曲线评估引物特异性。扩增产物经纯化后使用 pClone007 Versatile Simple Vector Kit(南京擎科生物有限公司)进行 TA 克隆构建重组质粒,挑取单克隆交由上海生工生物工程有限公司测序。将纯化的阳性重组质粒进行 10 倍等比例稀释,构建 6 个不同梯度的标准品,利用上述定量引物分别进行 qPCR 反应,基于 QuantStudio 6 和 7 Flex 系统默认基线获得的扩增循环阈值(cycle threshold,Ct)进行回归直线拟合,同时分析引物扩增效率( $E$ ), $E=(10^{-1/\text{slope}}-1)$ 和决定系数  $R^{2[8-9]}$ 。

表 1 候选内参基因定量引物信息

Table 1 RT-qPCR primer information of the candidate reference genes

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')	产物长度/bp Product size	斜率 Slope
<i>GAPDH</i>	F:GGACTCATGACCACGGTCCAT/R:TCAGATCCACAACCGACACGT	210	-3.490
<i>ACTB</i>	F:ACGGTGCCCATCTACGAGG/R:AGGAAGGAGGGCTGGAAGA	318	-3.432
<i>TUBA1B</i>	F:TGCCTGTGTACCGTGGTGAC/R:CCAACCTCCTCGTAATCCTTCTC	362	-3.175
<i>ATP5F1</i>	F:AAGAACGCAGCCCTCCTC/R:CATAGGGTCTGTCACTCC	181	-3.186
<i>B2M</i>	F:CTCTCACTGTCTGGCCTGGAT/R:ACAGGTCTGACTGCTCCGC	184	-3.234
<i>HPRT1</i>	F:GACCAGTCAACGGGCGAT/R:CAAGGGCATAGCCTACCACAA	259	-3.488
<i>UBC</i>	F:CCCTCGTCCGAATAGCCT/R:ATTGTCTCAGAGCCCGCTTC	108	-3.107
<i>RPS3</i>	F:CTCGGAGGTCTGGTGTCT/R:TTGGGTTCCACAATGCTCAC	243	-3.169
<i>EEF1A1</i>	F:CTGATTGTTGCTGCTGGTGT/R:TGGCTGTAGGGTGGCTCA	152	-3.157
<i>FSHR</i>	F:GTTTATTAGTATCCTTGCCACCAC/R:GCATCACAGCCTGCTCCA	222	
<i>NORFA</i>	F:AGGAACCTGCGTGGGAATC/R:CCGATCTCCAGCATGAAA	213	

注:*GAPDH*:甘油醛 3-磷酸脱氢酶基因 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene;*ACTB*: $\beta$ -肌动蛋白基因 Actin beta gene;*TUBA1B*:微管蛋白  $\alpha$ -1b 基因 Tubulin alpha-1b gene;*ATP5F1*:ATP 合酶 F1 基因 ATP synthase f1 gene;*B2M*: $\beta$ 2-微球蛋白基因 Beta-2-microglobulin gene;*HPRT1*:次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 1 基因 Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 gene;*UBC*:泛素 C 基因 Ubiquitin C gene;*RPS3*:核糖体蛋白 S3 基因 Ribosomal protein S3 gene;*EEF1A1*:真核翻译伸长因子 1 $\alpha$  基因 Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha gene;*FSHR*:促卵泡激素受体基因 Follicle stimulating hormone receptor gene;*NORFA*:卵泡闭锁相关非编码 RNA 基因 Noncoding RNA involved in follicular atresia gene.

#### 1.5 RT-qPCR 检测内参基因的表达水平

将上述获得的 cDNA 样品稀释至同一浓度并以其为底物,采用 AceQ<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix kit(南京诺唯赞生物有限公司)与 QuantStudio<sup>TM</sup> Real-Time PCR 定量分析仪,对 9 个候选内参基因在猪卵泡不同发育阶段颗粒细胞中的表达水平进行定量检测。10  $\mu\text{L}$  反应体系:SYBR Green Mix 5  $\mu\text{L}$ ,cDNA 1  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物各 0.2  $\mu\text{L}$ ,DEPC 水 3.6  $\mu\text{L}$ 。反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s(40 个循环);95  $^{\circ}\text{C}$  15 s;60  $^{\circ}\text{C}$  1 min;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。基于 RT-qPCR 反应获得的 Ct 值分析内参基因表达水平,Ct 值越小表明基因表达水平越高。每组设立 3 个独立重复样本,定量检测重复 3 次。

#### 1.6 候选内参基因表达稳定性分析

基于上述 RT-qPCR 反应获得的 Ct 值分别利用  $\Delta C_t$ <sup>[19]</sup>、geNorm<sup>[20]</sup>、NormFinder<sup>[21]</sup>、BestKeeper<sup>[22]</sup> 以及 RefFinder<sup>[23]</sup> 算法分析候选内参基因的表达稳定性。其中,geNorm 算法(<https://genorm.cmgg.be/>)将 Ct 值转换为相对表达量,随后计算候选内参基因表达稳定性 M 值,M 值越小表示内参基因表达稳定性越高。该算法可分析配对变异值(V)并以  $V<0.15$  为标准评估内参基因最适使用数。当  $V_n/V_{n+1}<0.15$  时, $n$  为最适内参基因数;反之, $n+1$  则为最适内参基因数。NormFinder 算法(<https://moma.dk/normfinder-software>)通过综合组间与组内变异进行内参基因稳定性值(stability value,SV)分析,但仅能获得一个最适内参基

因。BestKeeper 算法 (<https://www.gene-quantification.com/bestkeeper.html>) 通过计算  $C_t$  值的变异系数 (coefficient of variation,  $CV$ ) 和标准偏差 (standard deviation,  $SD$ ) 评价内参基因的表达稳定性。RefFinder 算法 (<http://blooge.cn/RefFinder/>) 可基于上述不同算法的评价结果进一步通过计算权重几何均值对内参基因表达稳定性进行综合排名。权重几何均值 ( $G$ ) 计算公式如下:

$$G = \sqrt[4]{R_1 \cdot R_2 \cdot R_3 \cdot R_4}$$

### 1.7 候选内参基因稳定性验证

为验证候选内参基因的稳定性,选择 2 个稳定性较高和较低的候选内参基因作为对照进行 RT-qPCR 试验,分别对卵巢颗粒细胞标志基因促卵泡激素受体基因 ( $FSHR$ )<sup>[24]</sup> 和母猪卵泡闭锁相关非编码 RNA 基因 ( $NORFA$ )<sup>[25]</sup> 的表达水平进行归一化处理,综合鉴定两者在猪卵泡不同发育阶段颗粒细胞中的表达水平与变化模式。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因的相对表达水平,每组设立 3 个独立样本,试验进行 3 次技术重复。

### 1.8 数据分析

采用 SPSS 22.0 与 GraphPad Prism 8.3 软件对猪卵泡发育过程中不同候选内参基因的定量数据进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 候选内参基因定量引物特异性和扩增效率分析

以猪卵巢颗粒细胞 cDNA 为模板,利用表 1 中定量引物对 9 个候选内参基因进行 PCR 扩增,扩增产物经  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳检测。结果均表现为单一、清晰、明亮且与设计目的片段长度一致的特异性扩增条带 (图 1-A)。熔解曲线分析发现每对定量引物仅能产生一个特异性单峰 (图 1-B)。进一步分析

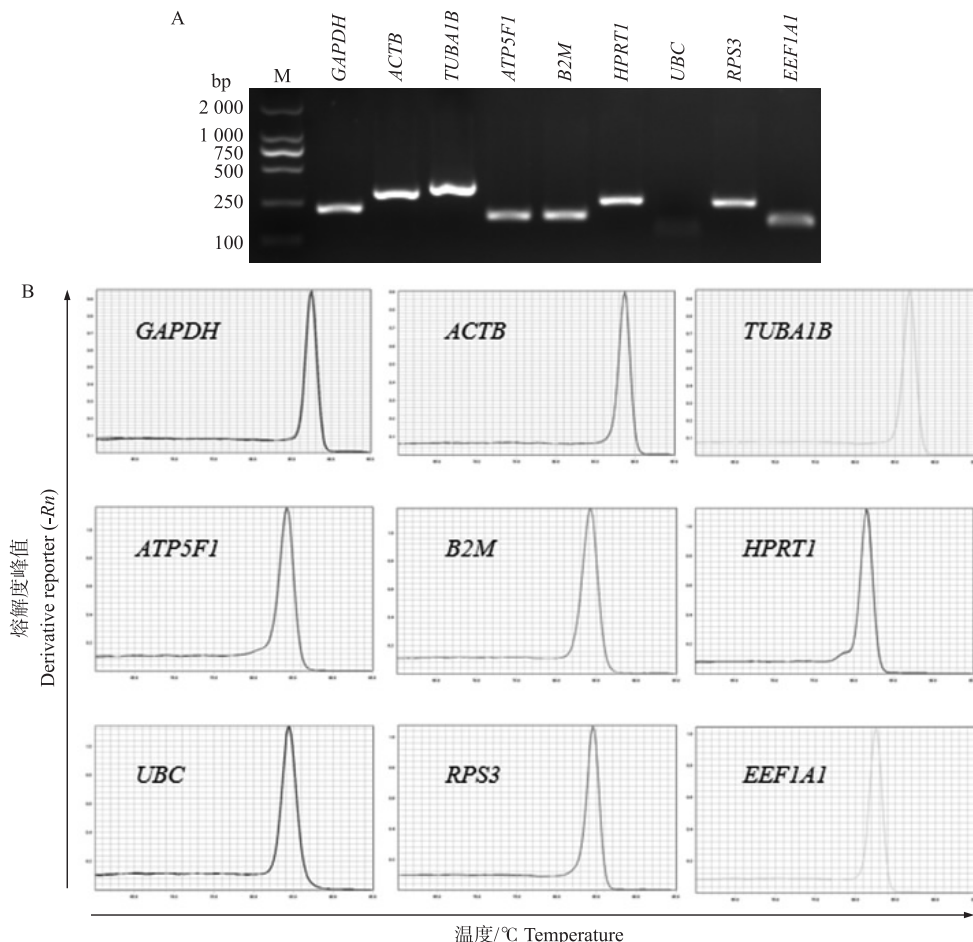


图 1 候选内参基因定量引物特异性分析

Fig. 1 Primer specificity analysis of the candidate reference genes

A. 定量引物扩增产物 (M: DL 2 000 标准品) RT-qPCR primer amplification products (M: DL 2 000 marker);  
B. 候选内参基因熔解曲线 Melting curve of the candidate reference genes.

发现 9 对定量引物的扩增效率为 90%~110%, 决定系数均大于 0.99(表 2)。上述结果表明本研究设计的候选内参基因定量引物具有良好的特异性, 可用于后续 RT-qPCR 试验。

表 2 候选内参基因定量引物验证信息

Table 2 Validation information for RT-PCR primer of the candidate reference genes

基因 Gene	扩增效率/% Amplification efficiency	决定系数 $R^2$	基因 Gene	扩增效率/% Amplification efficiency	决定系数 $R^2$
<i>GAPDH</i>	94.42	0.999	<i>HPRT1</i>	93.50	0.994
<i>ACTB</i>	95.33	0.997	<i>UBC</i>	109.85	0.996
<i>TUBA1B</i>	106.54	0.996	<i>RPS3</i>	106.79	0.995
<i>ATP5F1</i>	105.98	0.998	<i>EEF1A1</i>	107.40	0.996
<i>B2M</i>	103.81	0.995			

2.2 候选内参基因表达水平与表达模式分析

从图 2 可见: 所有内参基因的  $C_t$  值范围 16.29~27.30, 且在卵泡不同发育阶段内参基因表达水平存在差异。其中, *EEF1A1* 和 *TUBA1B* 在卵巢颗粒细胞中的表达水平较高(平均  $C_t$  值分别为 16.27 和 16.75), 而 *UBC* 和 *HPRT1* 的表达水平较低(平均  $C_t$  值分别为 27.30 和 24.33)。另外, 候选内参基因在卵泡发育过程中的表达模式也存在差异, 比如 *EEF1A1* 与 *RPS3* 在卵泡发育过程中表达变化趋势较为集中, 而 *UBC* 与 *B2M* 的表达变化趋势较为离散, 尤其是在卵泡闭锁阶段。

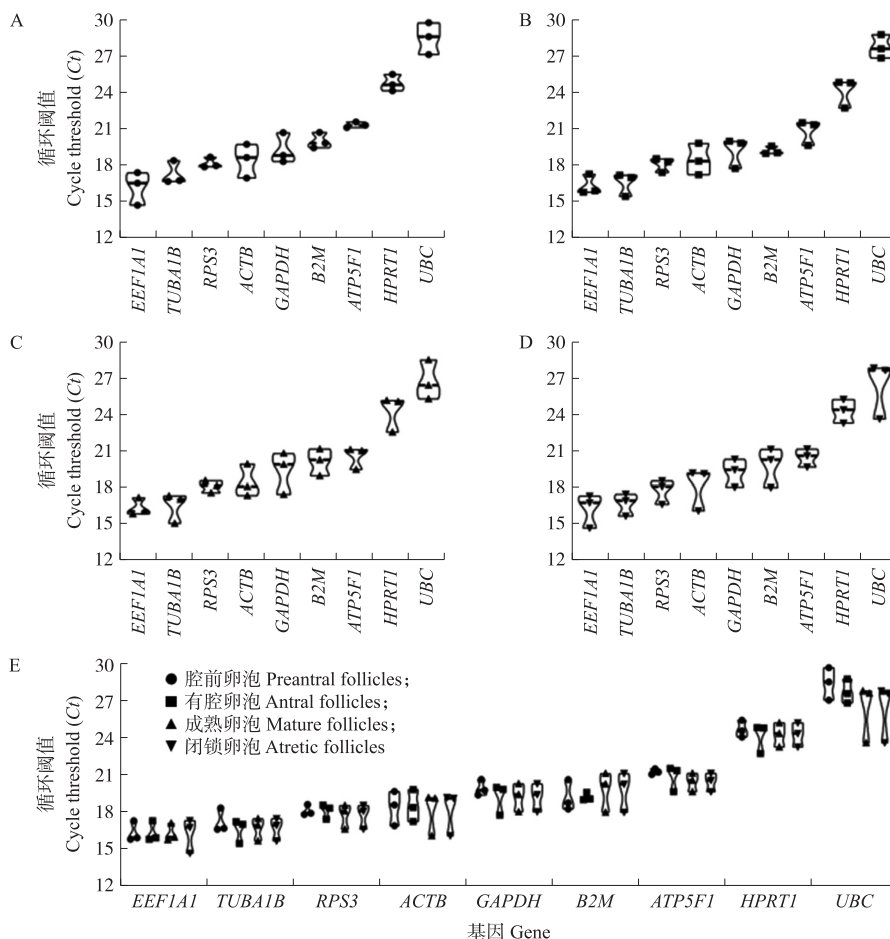


图 2 候选内参基因在卵泡发育不同阶段颗粒细胞中的表达模式

Fig. 2 Reference genes (RG) expression patterns in different stages of follicular granulosa cells

A. 腔前卵泡 Preantral follicles; B. 有腔卵泡 Antral follicles; C. 成熟卵泡 Mature follicles; D. 闭锁卵泡 Atretic follicles; E. 所有样本 All samples.

2.3 基于不同方法分析候选内参基因表达稳定性

2.3.1  $\Delta C_t$  分析结果 首先通过基于  $\Delta C_t$  法获得的标准偏差 ( $SD$ ) 分析候选内参基因表达稳定性,  $SD$  值越小表明内参基因表达稳定性越高。由图 3 中的  $SD$  值得出各基因的稳定性如下: 腔前卵泡中 *ATP5F1* 的

稳定性最高, *B2M* 的稳定性最低; 有腔卵泡中 *B2M* 的稳定性最高, *GAPDH* 的稳定性最低; 成熟卵泡中 *RPS3* 的稳定性最高, *GAPDH* 的稳定性最低; 闭锁卵泡中 *ATP5F1* 的稳定性最高, *UBC* 的稳定性最低; 卵泡发育过程中, *RPS3* 和 *ATP5F1* 的稳定性较高, 而 *UBC* 和 *ACTB* 的稳定性较低。

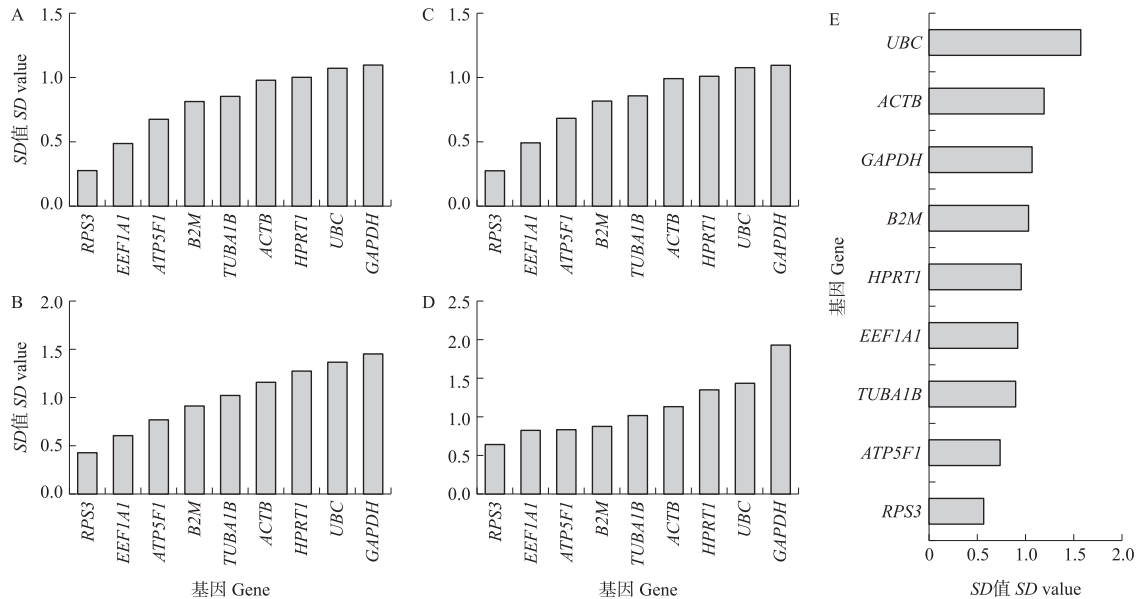


图 3  $\Delta Ct$  法 (*SD* 值) 分析内参基因的表达稳定性

Fig. 3 The stability of the RG expression analyzed by  $\Delta Ct$  method (*SD* value)

A. 腔前卵泡 Preantral follicles; B. 有腔卵泡 Antral follicles; C. 成熟卵泡 Mature follicles; D. 闭锁卵泡 Atretic follicles; E. 所有样本 All samples.

**2.3.2 geNorm 分析** 利用基于稳定性 *M* 值的 geNorm 算法分析候选内参基因表达稳定性, *M* 值越小表明内参基因表达稳定性越高。如图 4 所示: 腔前卵泡中 *ACTB* 和 *UBC* 的 *M* 值最小, 表明其稳定性均最高, 而 *TUBA1B* 的 *M* 值最大, 表明其稳定性最低。同理: 有腔卵泡中 *GAPDH* 和 *HPRT1* 的稳定性均最高, 而 *UBC* 的稳定性最低; 成熟卵泡中 *TUBA1B* 和 *HPRT1* 的稳定性均最高, 而 *B2M* 的稳定性最低; 闭锁卵泡中 *TUBA1B* 和 *RPS3* 的稳定性均最高, 而 *UBC* 的稳定性最低; 卵泡发育过程中, *GAPDH* 和 *HPRT1* 的稳定性均最高, 而 *UBC* 的稳定性最低。另外, 通过 geNorm 对内参基因最适使用数进行配对变异分析发现  $V_2/V_3$  值小于 0.15 (图 4-F), 表明对猪卵泡发育过程进行 RT-qPCR 分析需要 2 个内参基因进行归一化对照。

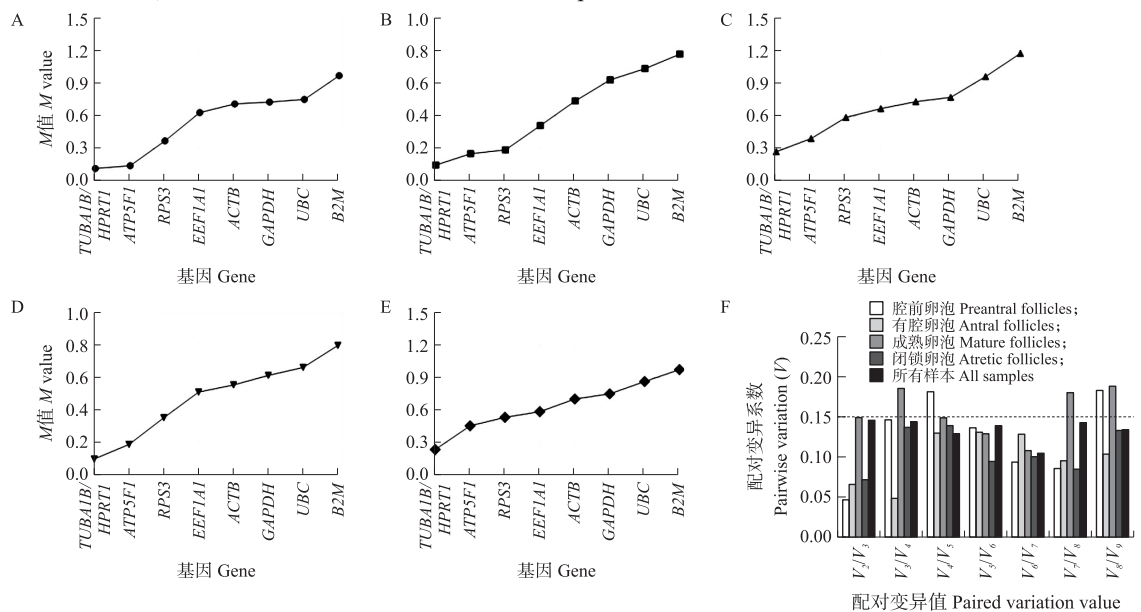


图 4 基于 geNorm 法 (*M* 值) 分析内参基因表达稳定性

Fig. 4 The stability of the RG expression analyzed based on the *M* value of geNorm method

A. 腔前卵泡 Preantral follicles; B. 有腔卵泡 Antral follicles; C. 成熟卵泡 Mature follicles; D. 闭锁卵泡 Atretic follicles; E. 所有样本 All samples; F. 配对变异分析 Pairwise variation analysis.

**2.3.3 NormFinder 分析** 通过基于稳定性值(SV)的 NormFinder 算法分析候选内参基因表达稳定性,SV 值越小表明基因稳定性越高。如表 3 所示:腔前卵泡中 *RPS3* 的 SV 值最小,表明其稳定性最高,*TUBA1B* 的 SV 值最大,表明其稳定性最低。同理:有腔卵泡中 *RPS3* 的稳定性最高,*UBC* 的稳定性最低;成熟卵泡中 *EEF1A1* 的稳定性最高,*UBC* 的稳定性最低;闭锁卵泡中 *EEF1A1* 的稳定性最高,*UBC* 的稳定性最低。卵泡发育过程中候选内参基因的稳定性从高到低依次为:*RPS3*、*ATP5F1*、*HPRT1*、*EEF1A1*、*GAPDH*、*ACTB*、*TUBA1B*、*B2M*、*UBC*。其中,*RPS3* 和 *ATP5F1* 的稳定性较高,而 *UBC* 和 *B2M* 的稳定性较低。

表 3 基于 NormFinder 法稳定值(SV)的基因表达稳定性排名

Table 3 Ranking of gene expression stability based on the expression stability value(SV) from NormFinder method

排名 Rank	腔前卵泡 Preantral follicles		有腔卵泡 Antral follicles		成熟卵泡 Mature follicles		闭锁卵泡 Atretic follicles		所有样本 All samples	
	基因 Gene	稳定值 SV	基因 Gene	稳定值 SV	基因 Gene	稳定值 SV	基因 Gene	稳定值 SV	基因 Gene	稳定值 SV
1	<i>RPS3</i>	0.173	<i>RPS3</i>	0.136	<i>EEF1A1</i>	0.183	<i>EEF1A1</i>	0.137	<i>RPS3</i>	0.226
2	<i>GAPDH</i>	0.264	<i>TUBA1B</i>	0.446	<i>RPS3</i>	0.308	<i>RPS3</i>	0.328	<i>ATP5F1</i>	0.482
3	<i>HPRT1</i>	0.367	<i>ATP5F1</i>	0.487	<i>ACTB</i>	0.409	<i>TUBA1B</i>	0.461	<i>EEF1A1</i>	0.523
4	<i>ATP5F1</i>	0.404	<i>HPRT1</i>	0.559	<i>ATP5F1</i>	0.560	<i>B2M</i>	0.472	<i>ACTB</i>	0.543
5	<i>B2M</i>	0.588	<i>ACTB</i>	0.572	<i>TUBA1B</i>	0.600	<i>ACTB</i>	0.494	<i>HPRT1</i>	0.573
6	<i>UBC</i>	0.747	<i>EEF1A1</i>	0.631	<i>HPRT1</i>	0.936	<i>GAPDH</i>	0.568	<i>GAPDH</i>	0.596
7	<i>ACTB</i>	0.880	<i>B2M</i>	0.647	<i>GAPDH</i>	1.023	<i>HPRT1</i>	0.674	<i>TUBA1B</i>	0.836
8	<i>EEF1A1</i>	0.891	<i>GAPDH</i>	0.662	<i>UBC</i>	1.035	<i>ATP5F1</i>	0.675	<i>B2M</i>	1.067
9	<i>TUBA1B</i>	1.705	<i>UBC</i>	1.027	<i>B2M</i>	1.822	<i>UBC</i>	1.210	<i>UBC</i>	1.203

**2.3.4 BestKeeper 分析** 利用基于 Ct 值计算标准差(SD)和变异系数(CV)的 BestKeeper 算法分析候选内参基因表达稳定性,其值越小表明基因稳定性越高。如表 4 所示:腔前卵泡中 *ATP5F1* 的 SD 值最小,表明其稳定性最高,*EEF1A1* 的 SD 值最大,表明其稳定性最低。同理:有腔卵泡中 *B2M* 的稳定性最高,*GAPDH* 的稳定性最低;成熟卵泡中 *RPS3* 的稳定性最高,*GAPDH* 的稳定性最低;闭锁卵泡中 *ATP5F1* 的稳定性最高,*UBC* 的稳定性最低。卵泡发育过程中,候选内参基因表达水平的标准差范围为 0.45~1.22,变异系数范围为 2.49~5.16,其中 *RPS3* 和 *ATP5F1* 的稳定性较高,而 *ACTB* 和 *UBC* 的稳定性较低。

表 4 基于 BestKeeper 法 SD 和 CV 值的基因表达稳定性排名

Table 4 Ranking of gene expression stability based on the SD and CV value from BestKeeper method

排名 Rank	腔前卵泡 Preantral follicles			有腔卵泡 Antral follicles			成熟卵泡 Mature follicles			闭锁卵泡 Atretic follicles			所有样本 All samples		
	基因 Gene	标准差 SD	变异系数 CV	基因 Gene	标准差 SD	变异系数 CV	基因 Gene	标准差 SD	变异系数 CV	基因 Gene	标准差 SD	变异系数 CV	基因 Gene	标准差 SD	变异系数 CV
1	<i>ATP5F1</i>	0.16	0.75	<i>B2M</i>	0.25	1.31	<i>RPS3</i>	0.35	1.92	<i>ATP5F1</i>	0.53	2.60	<i>RPS3</i>	0.45	2.49
2	<i>RPS3</i>	0.33	1.83	<i>RPS3</i>	0.45	2.47	<i>EEF1A1</i>	0.55	3.37	<i>TUBA1B</i>	0.68	4.04	<i>ATP5F1</i>	0.63	3.02
3	<i>GAPDH</i>	0.47	2.38	<i>EEF1A1</i>	0.63	3.87	<i>ATP5F1</i>	0.71	3.47	<i>HPRT1</i>	0.68	2.78	<i>TUBA1B</i>	0.69	4.14
4	<i>HPRT1</i>	0.49	1.98	<i>UBC</i>	0.69	2.48	<i>B2M</i>	0.78	3.90	<i>RPS3</i>	0.74	4.19	<i>HPRT1</i>	0.79	3.24
5	<i>TUBA1B</i>	0.75	4.33	<i>TUBA1B</i>	0.74	4.44	<i>TUBA1B</i>	0.94	5.72	<i>GAPDH</i>	0.81	4.23	<i>EEF1A1</i>	0.79	4.84
6	<i>UBC</i>	0.90	3.18	<i>ATP5F1</i>	0.80	3.83	<i>ACTB</i>	0.98	5.34	<i>EEF1A1</i>	1.05	6.43	<i>GAPDH</i>	0.86	4.41
7	<i>B2M</i>	0.94	4.90	<i>ACTB</i>	0.90	4.85	<i>HPRT1</i>	1.14	4.71	<i>B2M</i>	1.20	6.06	<i>B2M</i>	0.91	4.66
8	<i>ACTB</i>	0.99	5.38	<i>HPRT1</i>	0.93	3.84	<i>UBC</i>	1.18	4.41	<i>ACTB</i>	1.35	7.43	<i>ACTB</i>	1.03	5.61
9	<i>EEF1A1</i>	1.00	6.17	<i>GAPDH</i>	0.96	4.99	<i>GAPDH</i>	1.29	6.69	<i>UBC</i>	1.81	6.88	<i>UBC</i>	1.22	4.48

**2.3.5 RefFinder 分析** 采用 RefFinder 算法对上述分析获得的候选内参基因表达稳定性进行综合分析,结果如表 5 所示:腔前卵泡中 *RPS3* 的权重几何均数最小,表明其稳定性最高;*TUBA1B* 的权重几何均数最大,表明其稳定性最低。同理:有腔卵泡中 *RPS3* 稳定性最高,*UBC* 稳定性最低;成熟卵泡中 *EEF1A1* 稳定性最高,*UBC* 稳定性最低;闭锁卵泡中 *RPS3* 稳定性最高,*UBC* 稳定性最低。候选内参基因在猪卵泡发育过

表 5 RefFinder 分析结果

Table 5 RefFinder analysis results

排名 Rank	腔前卵泡 Preantral follicles			有腔卵泡 Antral follicles			成熟卵泡 Mature follicles			闭锁卵泡 Atretic follicles			所有样本 All samples		
	基因 Gene	几何均数 Geomean	几何均数 Geomean	基因 Gene	几何均数 Geomean	几何均数 Geomean	基因 Gene	几何均数 Geomean	几何均数 Geomean	基因 Gene	几何均数 Geomean	几何均数 Geomean	基因 Gene	几何均数 Geomean	几何均数 Geomean
1	<i>RPS3</i>	1.93	1.78	<i>RPS3</i>	1.78	1.78	<i>EEF1A1</i>	1.78	1.78	<i>RPS3</i>	1.68	1.68	<i>RPS3</i>	1.41	1.41
2	<i>GAPDH</i>	2.78	2.99	<i>TUBA1B</i>	2.99	2.21	<i>RPS3</i>	2.21	2.21	<i>TUBA1B</i>	2.06	2.06	<i>ATP5F1</i>	2.21	2.21
3	<i>ATP5F1</i>	3.36	3.36	<i>HPRT1</i>	3.36	2.66	<i>TUBA1B</i>	2.66	2.66	<i>EEF1A1</i>	2.63	2.63	<i>HPRT1</i>	2.78	2.78
4	<i>UBC</i>	3.38	3.57	<i>ATP5F1</i>	3.57	3.46	<i>ATP5F1</i>	3.46	3.46	<i>ATP5F1</i>	3.60	3.60	<i>GAPDH</i>	3.46	3.46
5	<i>HPRT1</i>	3.83	4.36	<i>GAPDH</i>	4.36	3.98	<i>HPRT1</i>	3.98	3.98	<i>B2M</i>	5.29	5.29	<i>EEF1A1</i>	4.74	4.74
6	<i>ACTB</i>	4.45	4.45	<i>B2M</i>	4.45	4.28	<i>ACTB</i>	4.28	4.28	<i>HPRT1</i>	5.38	5.38	<i>TUBA1B</i>	5.21	5.21
7	<i>B2M</i>	5.14	5.42	<i>EEF1A1</i>	5.42	7.35	<i>B2M</i>	7.35	7.35	<i>GAPDH</i>	5.73	5.73	<i>ACTB</i>	5.83	5.83
8	<i>EEF1A1</i>	6.45	6.19	<i>ACTB</i>	6.19	7.48	<i>GAPDH</i>	7.48	7.48	<i>ACTB</i>	6.32	6.32	<i>B2M</i>	7.74	7.74
9	<i>TUBA1B</i>	7.77	7.35	<i>UBC</i>	7.35	8.00	<i>UBC</i>	8.00	8.00	<i>UBC</i>	9.00	9.00	<i>UBC</i>	9.00	9.00

程中表达稳定性的几何权重总排名从高到低依次为 *RPS3*、*ATP5F1*、*HPRT1*、*EEF1A1*、*GAPDH*、*ACTB*、*TUBA1B*、*B2M*、*UBC*。其中,*RPS3* 和 *ATP5F1* 的表达稳定性较高,可用于后续相关 RT-qPCR 研究。

#### 2.4 候选内参基因稳定性验证

为了进一步验证候选内参基因的稳定性,分别采用稳定性较高(*RPS3* 或 *ATP5F1*) 和较低(*B2M* 和 *UBC*) 的候选内参基因作为对照,检测繁殖性状关键基因(*FSHR* 与 *NORFA*) 在猪卵泡发育过程中的表达水平。结果发现:使用高稳定性内参基因作为对照时,2 个目的基因的表达趋势一致且变异幅度较小,而使用不稳定内参基因作为对照时,2 个目的基因的表达水平均产生较大变异,且表达模式与前人研究结果呈现显著差异。例如,使用低稳定内参基因 *B2M* 作为对照时,*FSHR* 在有腔卵泡的颗粒细胞中异常显著高表达,表达水平是腔前卵泡颗粒细胞中的 6.03 倍,显著高于使用稳定内参基因(*RPS3* 和 *ATP5F1*) 作为对照时的 *FSHR* 表达水平,分别达到 1.93 倍和 1.90 倍(图 5)。上述结果表明选用稳定的内参基因作为对照,可有效提高目的基因表达水平检测准确性,避免有偏和错误结果产生。

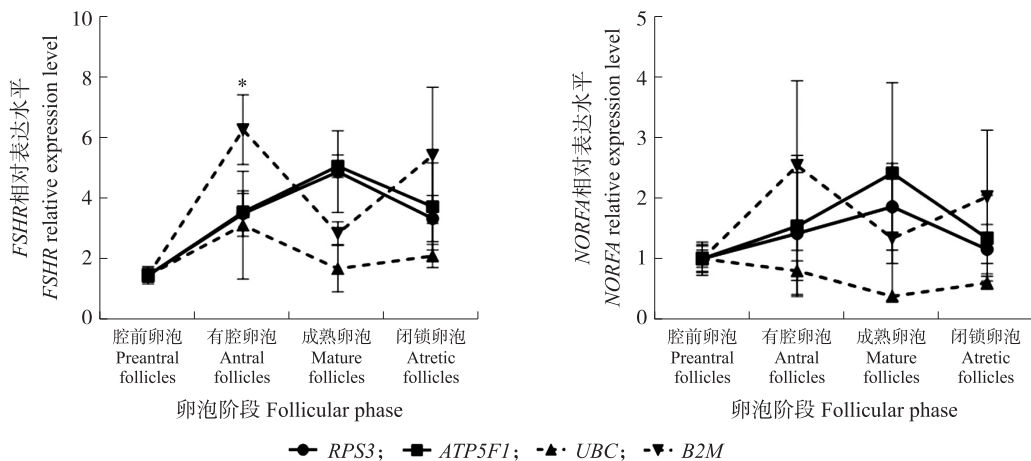


图 5 候选内参基因稳定性验证

Fig. 5 Stability validation of the candidate reference genes

### 3 讨论

准确分析目标基因的表达水平与变化模式是精准鉴定关键功能基因以及从分子水平全面了解生命体重要生理过程发生与发展调控机制的前提。而基于高稳定性内参基因进行 RT-qPCR 试验可有力保障基因表达检测的准确性,因此被广泛应用于畜牧学和分子生物学等多个研究领域。研究发现不同猪种相同内脏组织中的最适内参基因不同<sup>[26]</sup>,且内参基因表达稳定性在同猪种不同组织中也存在较大差异<sup>[27]</sup>。随着研究逐渐深入,相关报道对猪抗细菌侵染(外周血单核细胞)、精子生成和品质(睾丸支持细胞)、肌肉发育和脂肪生成(骨骼肌细胞/脂肪细胞)以及胚胎着床和发育(子宫细胞/胚胎)等多种重要经济性性状形成过程中内参基因的稳定性进行系统鉴定<sup>[28-31]</sup>。然而遗憾的是,目前尚未见对母猪卵泡发育过程中颗粒细胞内参基因表达稳定性进行探究的报道,而对女性和母牛卵泡发育相关的研究<sup>[32-33]</sup>表明,鉴定母猪卵泡发育过程中稳定表达的内参基因至关重要。

大多数内参基因表达稳定性的相关研究和分析仅依靠 2~3 种方法进行综合评价,由于算法不同往往会造成最适内参基因不一致的现象<sup>[34]</sup>。本研究综合 5 种分析方法对猪卵泡发育过程中候选内参基因的表达稳定性进行分析,发现  $\Delta Ct$  法、NormFinder 和 BestKeeper 算法分析结果一致性较高,且明显有别于 geNorm 分析结果,这可能是由于前三者算法相似,同时与后者算法存在一定差异造成的<sup>[35]</sup>。为提高分析准确性,进一步使用基于综合分析法的 RefFinder 算法集成上述 4 种方法分析结果<sup>[23]</sup>,最终获得猪卵泡发育过程中 9 个候选内参基因表达稳定性综合排名。其中,*RPS3* 作为真核生物核糖体成熟的关键调控基因在猪卵泡发育过程中的表达最稳定,这与前人在蝴蝶幼虫发育中的研究结果一致<sup>[16]</sup>,暗示猪卵泡发育过程中颗粒细胞内部成熟核糖体丰度较为稳定。近年来研究发现 *RPS3* 参与起始因子翻译、基因转录调控并抑制猪瘟病毒增殖<sup>[36]</sup>,但其对猪卵泡发育的调控作用尚不清楚。*ATP5F1* 作为线粒体 ATP 合酶的关键亚基在猪卵泡发育过程中也具有较高的表达稳定性,这与前人在诱导多能干细胞重编程和水牛精子发生

过程的研究结果一致<sup>[14]</sup>,表明 ATP 合酶稳定供能对于维持卵泡发育、精子发生和细胞重编程等大量耗能生理过程至关重要<sup>[37-38]</sup>。目前研究发现 ATP5F1 在断奶仔猪背最长肌纤维类型转化过程中扮演重要角色<sup>[39]</sup>,但其能否影响猪卵泡发育仍需进一步研究。

另外,本研究发现 *UBC* 和 *B2M* 在猪卵泡发育过程中的表达稳定性较低。*UBC* 是维持哺乳动物细胞泛素化水平的应激调节泛素基因之一,其编码的泛素蛋白广泛参与底物泛素化水解过程<sup>[40]</sup>。前人研究发现猪卵泡发育过程中颗粒细胞内部泛素化水平发生剧烈变化,这可能导致 *UBC* 表达不稳定<sup>[41]</sup>,同时暗示 *UBC* 潜在通过泛素化修饰影响猪卵泡发育。*B2M* 基因编码的微球蛋白几乎存在于所有真核细胞表面,参与机体多种免疫反应过程<sup>[42]</sup>。前人研究表明 *B2M* 基因对氧含量极其敏感,常氧条件下其表达较为稳定,而卵泡发育过程中耗氧量增加导致氧含量快速减少可能是造成 *B2M* 表达不稳定的原因<sup>[43-44]</sup>。令人意外的是,广泛应用的内参基因 *GAPDH*、*ACTB* 和 *TUBA1B* 在猪卵泡发育过程中的表达稳定性处于中等或较低水平。其中,*GAPDH* 作为关键酶参与包括糖酵解在内的多种代谢过程<sup>[45]</sup>,因此卵泡发育过程中缺氧环境导致糖酵解途径激活可能是引起 *GAPDH* 基因表达稳定性降低的内在因素,这与前人的研究结果一致<sup>[12]</sup>。*ACTB* 和 *TUBA1B* 是细胞骨架蛋白的重要组成部分<sup>[46-47]</sup>,相关研究指出两者在细胞干性表现过程中表达变化较为剧烈,因此不适宜在干性细胞中作为内参基因<sup>[48]</sup>。猪卵泡发育过程中颗粒细胞不仅表现为体积增大,其干性也逐渐加强,可在排卵后分化为黄体颗粒细胞,这可能导致两者在猪卵泡发育过程中表达稳定性较低的原因。上述研究也表明对雌性哺乳动物卵泡发育的相关研究不可盲目使用 *GAPDH*、*ACTB* 和 *TUBA1B* 作为内参基因。

本研究发现猪卵泡发育过程中不同内参基因的表达丰度存在较大差异,因此使用不同内参基因作为归一化标准鉴定目标基因表达水平会产生不同结果。为验证本研究分析结果的可靠性,选择稳定性不同的内参基因对猪卵泡发育过程中颗粒细胞内 *FSHR* 和 *NORFA* 的表达水平与变化模式进行鉴定。结果发现使用高表达稳定性内参基因(*RPS3* 和 *ATP5F1*)时,*FSHR* 和 *NORFA* 的表达水平随着猪卵泡发育逐渐增加,在闭锁卵泡中显著下调,该变化趋势符合两者生物学功能<sup>[24-25]</sup>;而选择 *UBC* 和 *B2M* 作为内参基因可导致两者在猪卵泡发育过程中表达紊乱且与前期研究结果严重不符。除此之外,为了避免由于样本间差异对试验结果造成影响,本研究在试验过程中始终坚持归一化原则,即在样本制备和使用时保持细胞数量、RNA 用量以及 cDNA 浓度的一致性,可确保选择高表达稳定性内参基因进行相对定量的试验结果能真实反映目的基因在不同样本间表达水平的差异,而非由未归一化处理所造成的假阳性结果。综上所述,本研究系统鉴定了猪卵泡不同发育阶段颗粒细胞中内参基因的表达稳定性,证实 *RPS3* 和 *ATP5F1* 可作为稳定有效的内参基因用于后续猪卵泡发育研究,研究结果为进一步鉴定猪卵泡发育关键调控基因及其表达模式提供理论基础。

#### 参考文献 References:

- [1] McGee E A, Hsueh A J W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles[J]. *Endocrine Reviews*, 2000, 21(2): 200-214.
- [2] Liang W C, Fu W M, Wong C W, et al. The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 22513-22525.
- [3] Du X, Pan Z X, Li Q Q, et al. SMAD4 feedback regulates the canonical TGF- $\beta$  signaling pathway to control granulosa cell apoptosis[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 151.
- [4] Huo Y G, Li Q Q, Yang L, et al. SDNOR, a novel antioxidative lncRNA, is essential for maintaining the normal state and function of porcine follicular granulosa cells[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(4): 799.
- [5] 曾强, 关钦泽, 王思琪, 等. 猪 CYP11A1 基因编码区扩增及核心启动子区的鉴定与分析[J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(4): 743-751. DOI:10.7685/jnau.202109001.  
Zeng Q, Guan Q Z, Wang S Q, et al. Amplification of porcine *CYP11A1* gene coding region and identification and analysis of core promoter region[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(4): 743-751 (in Chinese with English abstract).
- [6] Bustin S A, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction[J]. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2004, 15(3): 155-166.
- [7] Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(6): e56.
- [8] Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611-622.
- [9] Johnson G, Nour A A, Nolan T, et al. Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments[J]. *Methods in Molecular*

- Biology, 2014, 1160:5-17.
- [10] Fraser C M, Gocayne J D, White O, et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium* [J]. Science, 1995, 270(5235):397-403.
- [11] Koonin E V. How many genes can make a cell; the minimal-gene-set concept [J]. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2000, 1: 99-116.
- [12] Barber R D, Harmer D W, Coleman R A, et al. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues [J]. Physiological Genomics, 2005, 21(3):389-395.
- [13] 杨显英, 熊显荣, 韩杰, 等. 小鼠卵巢组织定量 PCR 分析中内参基因的筛选 [J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(2):446-453.  
Yang X Y, Xiong X R, Han J, et al. Identification of suitable reference gene for quantitative RT-PCR analysis in mouse ovaries [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2019, 50(2):446-453 (in Chinese with English abstract).
- [14] Panina Y, Germond A, Masui S, et al. Validation of common housekeeping genes as reference for qPCR gene expression analysis during iPSC reprogramming process [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):8716.
- [15] 华永琳, 张小玉, 曹海港, 等. 猪骨骼肌内参基因的筛选及验证 [J]. 中国畜牧杂志, 2022, 58(8):224-228.  
Hua Y L, Zhang X Y, Cao H G, et al. Screening and verification of internal reference genes in porcine skeletal muscle [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2022, 58(8):224-228 (in Chinese).
- [16] Zhao X Y, Guo J W, Lu Y H, et al. Reference genes for expression analysis using RT-qPCR in *Cnaphalocrosis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Insects, 2022, 13(11):1046.
- [17] 徐颂为, 黄忍, 杨璐, 等. 山羊不同组织实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021(24):31-35, 40.  
Xu S W, Huang R, Yang L, et al. Screening of reference genes for real-time fluorescence quantification PCR in different goat tissues [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2021(24):31-35, 40 (in Chinese with English abstract).
- [18] Pan Z X, Zhang J B, Lin F, et al. Expression profiles of key candidate genes involved in steroidogenesis during follicular atresia in the pig ovary [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(12):10823-10832.
- [19] Silver N, Best S, Jiang J, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR [J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7:33.
- [20] Vandesompele J, de Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. Genome Biology, 2002, 3(7):RESEARCH0034.
- [21] Andersen C L, Jensen J L, Ørntoft T F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [J]. Cancer Research, 2004, 64(15):5245-5250.
- [22] Pfaffl M W, Tichopad A, Prgomet C, et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations [J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(6):509-515.
- [23] Xie F L, Wang J Y, Zhang B H. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes [J]. Functional & Integrative Genomics, 2023, 23(2):125.
- [24] Du X, Zhang L F, Li X Y, et al. TGF- $\beta$  signaling controls FSHR signaling-reduced ovarian granulosa cell apoptosis through the SMAD4/miR-143 axis [J]. Cell Death & Disease, 2016, 7(11):e2476.
- [25] Du X, Liu L, Li Q Q, et al. NORFA, long intergenic noncoding RNA, maintains sow fertility by inhibiting granulosa cell death [J]. Communications Biology, 2020, 3(1):131.
- [26] Park S J, Kwon S G, Hwang J H, et al. Selection of appropriate reference genes for RT-qPCR analysis in Berkshire, Duroc, Landrace, and Yorkshire pigs [J]. Gene, 2015, 558(1):152-158.
- [27] Nygard A B, Jørgensen C B, Cirera S, et al. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR [J]. BMC Molecular Biology, 2007, 8:67.
- [28] Ju X H, Yong Y H, Xu H J, et al. Selection of reference genes for gene expression studies in PBMC from *Bama* miniature pig under heat stress [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2011, 144(1/2):160-166.
- [29] Wang Y, Wu Z W, Fang T, et al. Identification of internal reference genes for porcine immature Sertoli cells under heat stress [J]. Reproduction in Domestic Animals, 2022, 57(11):1344-1352.
- [30] Lee W J, Jang S J, Lee S C, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction in porcine embryos [J]. Reproduction, Fertility, and Development, 2017, 29(2):357-367.
- [31] Wang Y Y, Zhao Y Q, Li J, et al. Evaluation of housekeeping genes for normalizing real-time quantitative PCR assays in pig skeletal muscle at multiple developmental stages [J]. Gene, 2015, 565(2):235-241.
- [32] Cadenas J, Pors S E, Nikiforov D, et al. Validating reference gene expression stability in human ovarian follicles, oocytes, cumulus cells, ovarian medulla, and ovarian cortex tissue [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(2):886.
- [33] Khan M I U R, Dias F C F, Dufort I, et al. Stable reference genes in granulosa cells of bovine dominant follicles during follicular growth, FSH stimulation and maternal aging [J]. Reproduction, Fertility, and Development, 2016, 28(6):795-805.
- [34] 周宏专, 苏霞, 林路路, 等. 犬细小病毒感染 F81 细胞 microRNA 荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(3):96-103.  
Zhou H Z, Su X, Lin L L, et al. Screening of reference genes for microRNA fluorescence quantitative PCR in CPV-infected F81 cells [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 55(3):96-103 (in Chinese with English abstract).

- [35] 王盼乔,虞夏清,翟于菲,等. 甜瓜属异源多倍体不同倍性材料内参基因的筛选及评估[J]. 南京农业大学学报,2024,47(2):205-212. DOI:10.7685/jnau.202301001.  
Wang P Q, Yu X Q, Zhai Y F, et al. Reference gene selection and evaluation for *Cucumis* allopolyploids with different ploid levels[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(2):205-212 (in Chinese with English abstract).
- [36] Zhao D, Zhang L, Song M Z, et al. RPS3-induced antiviral cytokines inhibit the proliferation of classical swine fever virus[J]. Acta Virologica, 2022, 66(1):55-64.
- [37] Ashish S, Bhure S K, Harikrishna P, et al. Identification and evaluation of reference genes for accurate gene expression normalization of fresh and frozen-thawed spermatozoa of water buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. Theriogenology, 2017, 92:6-13.
- [38] Wan B Y, Huang L B, Jing C W, et al. Zearalenone promotes follicle development through activating the SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway in the ovaries of weaned gilts[J]. Journal of Animal Science, 2022, 100(4):skac058.
- [39] Fan Q W, Long B S, Yan G K, et al. Dietary leucine supplementation alters energy metabolism and induces slow-to-fast transitions in longissimus dorsi muscle of weanling piglets[J]. The British Journal of Nutrition, 2017, 117(9):1222-1234.
- [40] Park H, Yoon M S, Ryu K Y. Disruption of polyubiquitin gene *Ubc* leads to defective proliferation of hepatocytes and bipotent fetal liver epithelial progenitor cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 435(3):434-440.
- [41] Wang Y Z, Zeng S M. Melatonin promotes ubiquitination of phosphorylated pro-apoptotic protein bcl-2-interacting mediator of cell death-extra long (*Bim<sub>EL</sub>*) in porcine granulosa cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(11):3431.
- [42] Wang H B, Liu B R, Wei J. Beta2-microglobulin (B2M) in cancer immunotherapies: biological function, resistance and remedy [J]. Cancer Letters, 2021, 517:96-104.
- [43] 金君学, 慕新月, 刘子瑜, 等. Mito-Tempo 修复过氧化氢诱导的猪卵母细胞线粒体损伤机制研究[J]. 东北农业大学学报, 2023, 54(6):28-34.  
Jin J X, Qi X Y, Liu Z Y, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced mitochondrial damage rescued by Mito-Tempo in porcine oocytes[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2023, 54(6):28-34 (in Chinese with English abstract).
- [44] Moein S, Javanmard S H, Abedi M, et al. Identification of appropriate housekeeping genes for gene expression analysis in long-term hypoxia-treated kidney cells[J]. Advanced Biomedical Research, 2017, 6:15.
- [45] Yan Y, Zang X, Jamieson C S, et al. Biosynthesis of the fungal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitor heptelidic acid and mechanism of self-resistance[J]. Chemical Science, 2020, 11(35):9554-9562.
- [46] Bunnell T M, Burbach B J, Shimizu Y, et al.  $\beta$ -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool[J]. Molecular Biology of the Cell, 2011, 22(21):4047-4058.
- [47] Akhmanova A, Maiato H. Closing the tubulin deetyrosination cycle[J]. Science, 2017, 358(6369):1381-1382.
- [48] Mammoto A, Ingber D E. Cytoskeletal control of growth and cell fate switching[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2009, 21(6):864-870.

责任编辑:周广礼