

陈卓,牛晓艳,刘春晓,等. 基于同期发情处理的家兔卵巢组织形态和差异表达基因分析[J]. 山西农业科学, 2025, 53(6):94-107.

CHEN Z, NIU X Y, LIU C X, et al. Analysis of ovary histological morphology and differentially expressed genes in domestic rabbit based on synchronized estrus treatment[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(6):94-107.

doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2025.06.12

## 基于同期发情处理的家兔卵巢组织形态和 差异表达基因分析

陈卓,牛晓艳,刘春晓,吴苏君,闫益波,詹海杰

(山西农业大学 动物科学学院,山西太原 030032)

**摘要:**为研究家兔卵巢响应孕马血清促性腺激素(PMSG)作用过程中组织学形态的变化及基因差异表达和功能富集的情况,将9只4~5月龄雌性日本大耳白兔随机平均分成3组(CK、T1和T2组),于试验第1天10:00给试验组注射PMSG 50 IU,CK组注射等量生理盐水,分别于注射后24 h屠宰CK和T1组,72 h屠宰T2组,解剖后摘取左右两侧卵巢,将左侧卵巢置于4%多聚甲醛溶液中固定用于切片制作和HE染色,右侧卵巢速冻后进行转录组测序。结果表明,PMSG处理后卵巢质量和卵巢指数均有增大的趋势,但各组间差异不显著;各组初级卵泡数和次级卵泡数差异不显著,成熟卵泡数T2组显著多于CK和T1组。转录组测序获得总reads数平均为45 530 086条, clean reads数平均为42 402 397条, Q20为97.68%, Q30为93.55%,测序质量符合后续分析的要求。差异表达基因分析结果显示,CK组相对于T1组共鉴定出536个差异表达基因,CK组相对于T2组共鉴定出668个差异表达基因,T1组相对于T2组共鉴定出407个差异表达基因,其中3组共有差异基因13个,涉及到与繁殖密切相关的 *CA11*、*FAT2*、*RUNX2*等基因。KEGG通路分析富集到一系列与繁殖相关的通路,包括类固醇激素合成、MAPK信号通路、催产素信号通路、叶酸生物合成等过程。研究通过PMSG成功诱导家兔同期发情,并通过转录组测序在3组中鉴定到13个共同的差异表达基因,涉及一系列与繁殖相关的功能基因和通路。

**关键词:**家兔;卵巢;组织形态;转录组测序;繁殖

中图分类号:S829.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2481(2025)06-0094-14

## Analysis of Ovary Histological Morphology and Differentially Expressed Genes in Domestic Rabbit based on Synchronized Estrus Treatment

CHEN Zhuo, NIU Xiaoyan, LIU Chunxiao, WU Sujun, YAN Yibo, ZHAN Haijie

(College of Animal Sciences, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030032, China)

**Abstract:** To investigate the histological morphology changes, differential gene expression and functional gene enrichment in the ovaries of rabbits in response to pregnant mare serum gonadotropin(PMSG), in this study, nine female Japanese white rabbits aged 4-5 months were randomly and evenly divided into three groups(CK, T1, and T2). 50 IU PMSG was injected to the test groups at 10:00 am at the first experimental day, and the CK group was injected with an equal amount of saline. The CK and T1 group were slaughtered 24 hours after injection, and the T2 group was slaughtered 72 hours after injection. Both sides of ovaries were removed after dissection. The left ovary was fixed in 4% of paraformaldehyde solution for sectioning and HE staining, and the right ovary was frozen for transcriptome sequencing. The results showed that after PMSG treatment, the ovarian weight and ovarian index showed an increasing trend, but there was no significant difference among the groups. There was no significant difference in the number of primary follicles and secondary follicles among the groups, and the

收稿日期:2025-08-26

基金项目:山西省基础研发计划项目(202103021224174);山西农业大学优秀博士启动项目(2024BQ14)

作者简介:陈卓,在读硕士,研究方向:家兔分子育种,E-mail:chenzhuo4578@outlook.com

通信作者:牛晓艳,研究员,博士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究,E-mail:nxysxau2022@163vip.com

number of mature follicles in the T2 group was significantly higher than that in the CK group and the T1 group. The total number of reads obtained by transcriptome sequencing was 45,530,086 on average, the number of clean reads was 42,402,397 on average, the Q20 was 97.68%, the Q30 was 93.55%. The sequencing quality met the requirements of subsequent analysis. The results of differential gene analysis showed that a total of 536 differentially expressed genes were identified in the CK group compared to T1 group, 668 differentially expressed genes were identified in the CK group compared to T2 group, 407 differentially expressed genes were identified in the T1 group compared to T2 group. Among them, there were 13 common differentially expressed genes appeared in the three groups, involving genes closely related to reproduction, such as the genes of *CA11*, *FAT2* and *RUNX2*. KEGG pathway analysis enriched a series of pathways related to reproduction, including steroid hormone synthesis, MAPK signaling pathway, oxytocin signaling pathway, folate biosynthesis and other processes. Synchronized estrus of rabbit was successfully induced by PMSG in this study, and 13 common differentially expressed genes were identified in 3 groups, which were closely related with a series of reproduction gene and pathways.

**Keywords:** domestic rabbit; ovary; histological morphology; transcriptome sequencing; reproduction

作为一种节粮型小型草食动物,家兔可有效利用植物蛋白和秸秆等农副产品,养殖方式灵活、资金周转快,是缓解“人畜争粮”矛盾和实现乡村振兴的有效途径。我国是养兔大国,存栏量和出口量均居世界首位,2023年家兔存栏量、出栏量和兔肉产量分别为1.31亿只、3.19亿只和45.9万t,兔业总产值达到331.51亿元,产业发展呈现增长态势<sup>[1]</sup>。随着机械化和自动化技术的推广应用,规模化、集约化和标准化养殖成为未来养兔业的发展趋势,这必然要求繁殖效率的大幅度提升,而目前国内繁殖母兔每年提供的商品兔数量相比国外仍存在较大差距,亟待提高<sup>[2]</sup>,而提升母兔繁殖潜力的关键在于对其卵泡发育和调控机制的充分了解。

雌性哺乳动物的卵巢担负着激素分泌和产生成熟卵子的双重作用,是繁衍子代的核心器官,卵巢的基本功能单位是卵泡,卵泡是否发育正常,对母体的健康及繁殖能力具有根本性的影响。卵泡发育是在下丘脑-垂体-卵巢轴的调控下,由多细胞参与的,微环境协同作用的复杂过程。垂体分泌的促卵泡素(Follicle stimulating hormone, FSH)和促黄体素(Luteinizing hormone, LH)是调节卵泡生长发育的主要激素。一方面,FSH可促使腔前卵泡发育到有腔卵泡阶段,并诱导颗粒细胞产生LH受体,维持卵泡的生长;另一方面,FSH和LH协同作用可调节卵母细胞恢复减数分裂,进而成熟排卵<sup>[3]</sup>。在分子层面,生长分化因子9(Growth differentiation factor 9, GDF9)和骨形态发生蛋白15(Bone morphogenetic protein 15)是卵巢内重要的旁分泌因子,对早期卵泡发育、颗粒细胞和膜细胞功能起重要的调控作用<sup>[4]</sup>。研究表明,GDF9/BMP15可

通过结合I型、II型丝氨酸-苏氨酸激酶受体,启动胞内Smads信号转导通路,发挥生物学功能<sup>[5]</sup>,敲除GDF9的小鼠卵泡停止发育<sup>[6]</sup>。此外,GDF9/BMP15不同基因型对绵羊的排卵率也有显著的影响,表现为杂合子促进排卵而纯合子引起不育<sup>[7]</sup>。

孕马血清促性腺激素(Pregnant mare gonadotrophin hormone, PMSG)是目前诱导家畜发情的常用药物,同时具有FSH和LH活性,不仅可促进家畜卵泡生长,也可促使卵巢内的血流量增加。PMSG在动物体内半衰期较长,重复超排效果好于FSH,与促性腺激素释放激素(Gonadotrophin-releasing hormone, GnRH)相比,价格更为低廉,在牛<sup>[8]</sup>、羊<sup>[9]</sup>、猪<sup>[10]</sup>、鹿<sup>[11]</sup>等家畜的催情、同期发情和超排过程中被广泛使用。HU等<sup>[12]</sup>通过全转录组测序技术,研究了利用PMSG和人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, hCG)联合诱导天府黑兔同期发情和排卵后不同时间点卵巢组织差异mRNA和差异miRNA的表达情况,发现了与繁殖相关的诸如PI3K-Akt、ECM受体互作等通路。韦燕佩<sup>[13]</sup>应用高通量mRNA测序技术,在刺激排卵前后母兔的下丘脑和卵巢组织中发现大量与繁殖相关的基因,它们集中在刺激反应、激素水平调节、G蛋白偶联受体结合、类固醇生成等通路中。

目前,围绕着母兔卵泡发育方面的研究多集中在PMSG诱导超排和同期发情的剂量选择<sup>[14-15]</sup>和效果<sup>[16]</sup>方面,对于影响其繁殖过程的机制研究较少。本研究在诱导家兔同期发情的基础上,通过组织学和转录组测序方法分析了不同时间点基因表达差异,以期筛选出与家兔卵泡发育相关的基因和通路,为深入揭示家兔繁殖调控机制以及

相关候选基因的挖掘及应用提供理论和试验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物

供试 9 只 4 月龄、体况良好、体质量相近(约 2.5 kg)、未经产的雌性日本大耳白兔购自北京西山昌扬养殖场,许可证号为 SCXK(京)2021—0008,饲养于山西农业大学动物科技试验站,动物的饲养管理和处死过程符合《山西农业大学动物福利伦理审查规定》(许可证号为 SYXK(晋)2020—0003)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 试验动物分组及处理 所有试验兔均为单笼饲养(笼位面积为 0.025 m<sup>2</sup>),每天 8:00 和 17:00 由专人定时饲喂母兔维持饲料(北京斯贝福生物技术有限公司)70 g,自由饮水,光照周期为 14L:10D,预饲期 7 d,试验期 3 d。

试验期开始时,将 9 只试验兔随机平均分为 3 组,每组 3 只。试验组于试验第 1 天 10:00 由大腿内侧肌肉注射 50 IU PMSG,诱导同期发情,对照组(CK)注射等量 0.9% 的生理盐水。注射后 24、72 h 分别设为 T1、T2 组。

1.2.2 卵巢形态测定及组织学切片制备 分别于 PMSG 处理后 24、72 h 采用断颈法处死 CK、T1 和 T2 组试兔,立即解剖并摘取左右卵巢,电子秤(精度 0.1 g)称质量并计算卵巢指数,同时测量卵巢的长度和宽度。测量完毕后迅速将左侧卵巢投入 4% 多聚甲醛中固定,将右侧卵巢投入液氮中速冻备用。

卵巢指数=卵巢质量/兔子宰前体质量 (1)

卵巢组织固定后经修整、二甲苯和梯度乙醇脱水、浸蜡和包埋、切片、摊片、粘片、烤片、二甲苯脱蜡、苏木精染色、盐酸分化、水洗、伊红染色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明和中性树胶封片后置于正置光学显微镜下观察,成像后采用 3DHISTECH 数字全扫描仪扫描生成高清图片,对各组初级卵泡、次级卵泡和成熟卵泡进行统计。

### 1.2.3 文库构建和数据处理

1.2.3.1 RNA 的提取与检测 采用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取卵巢组织的总 RNA,随后分别采用 NanoDrop2000 分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,采用 Agilent2100/Labchip GX 检测

RNA 片段的完整性。

1.2.3.2 文库构建与数据质控 样品检测合格后,文库的制备、测序及质控流程交付北京百迈克生物科技有限公司完成。文库构建的主要流程为:使用带有 Oligo(dT)的磁珠富集卵巢 mRNA;加入 Fragmentation Buffer 将 mRNA 随机打断;以 mRNA 为模板,合成 cDNA 第 1 链和第 2 链;纯化的双链 cDNA 进行末端修复,加 A 尾并连接测序接头,最后通过 PCR 富集获得 cDNA 文库;质量合格的文库使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行 PE150 模式测序。

对测序下机的 raw data 通过去除含有接头的 reads 和低质量的 reads(包括 N 比例 ≥10% 的 reads,质量值 Q ≤10 的碱基数占比超过 50% 的 reads),最后得到 clean reads 后进行后续分析。使用 HISAT2 软件<sup>[17]</sup>将 clean reads 与家兔参考基因组(Oryctolagus cuniculus.UM\_NZW\_1.0.genome.fa)进行比对,获取 reads 在参考基因组上的定位信息。利用 StringTie 软件<sup>[18]</sup>将比对到家兔参考基因组上的 reads 进行组装,用于后续分析。

1.2.3.3 基因表达量计算和差异基因分析 根据测序 reads 比对到每个转录本中的数目,计算该基因的表达水平。使用 StringTie 软件采用 FPKM(Fragment per kilobase of transcript per million fragments mapped)值进行转录本表达量的标准化,作为衡量基因表达水平的指标。

$FPKM = \frac{\text{cDNA 片段数}}{\text{比对到参考基因组上的片段数} \times \text{转录本长度(kb)}}$  (2)

使用 DESeq2 软件<sup>[19]</sup>进行差异基因分析,差异基因的筛选标准为  $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1.0$  且  $P < 0.05$ 。

1.2.3.4 差异基因的 GO 和 KEGG 富集分析 使用 ClusterProfiler 软件<sup>[20]</sup>用超几何检验方法分别对差异基因进行生物学过程(Biological process, BP)、分子功能(Molecular function, MF)和细胞组分(Cellular content, CC)的 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,并绘制气泡图,以  $P \leq 0.05$  为富集通路显著性标准。

1.2.4 差异基因的 qRT-PCR 验证 为验证转录组测序结果的准确性,以 GADPH 为内参基因,随机挑选 6 个差异表达基因(CA11、FABP4、INHBB、INHBA、NSDHL、RUNX2)通过实时荧光定量 PCR 方法进行检测,引物设计采用 Primer Premier

5.0软件,由上海生工生物工程有限公司合成,如表1所示。其中,合成第1链cDNA反应体系为20.0 μL,包含模板(总RNA)100 ng,5×All-in-One Reaction Mix for qPCR 4.0 μL, *Transcript<sup>®</sup>* Uni All-in-one Enzyme Mix 1.0 μL,补足 ddH<sub>2</sub>O至20.0 μL。反应程序为:50℃孵育5 min,85℃加热2 min失活,-20℃保存备用。qPCR反应体系

为20.0 μL,其中,模板cDNA 1.5 μL,上下游引物各0.4 μL,2×*PerfectStart<sup>®</sup>* Green qPCR SuperMix 10.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 7.7 μL。反应程序为:94℃预变性30 s;94℃变性5 s,57℃退火30 s,72℃延伸30 s,共40个循环。采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算各基因的相对表达量,并与RNA-Seq结果进行比较。

表1 用于验证的差异表达基因引物

Tab.1 Primers of differentially expressed genes for validation

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')	退火温度/℃ Annealing Temp.	产物大小/bp Product length
<i>CA11</i>	CACGCAGGTGGCAGGT	AGGAAGTAGGCGTCGTTCTTG	57	96
<i>FABP4</i>	TGAAGTCACCGCAGATGACAG	TTTCATGATGCATTCCACCACC	57	148
<i>INHBB</i>	TTGCCGAGGCAGATGGC	CTTCTCCAACACGTAGGGCA	57	136
<i>INHBA</i>	TGTGACGGCAAGGTCAACAT	GTTCTGGCCATCGTCGTAGT	57	121
<i>NSDHL</i>	CACCCCCACCATCCAGTAAC	TCACTGCCCTCAAAGACGAC	57	106
<i>RUNX2</i>	CGGTGCAAACCTTTCTCCAGC	GCAGCCTTAAATGACTCTGTTGG	57	148
<i>GADPH</i>	GAGCACCAGAGGAGGACGA	TGGGATGGAAACTGTGAAGAG	57	150

### 1.3 数据分析

采用MS Excel 2016对各级卵泡扫描数据进行描述性统计分析,数据均以“平均值±标准差(标准误)”表示。采用SPSS 24.0软件中的单因素方差分析(Oneway ANOVA)及Duncan's多重比较功能,检验各组间差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 PMSG处理前后卵巢形态变化

从图1可以看出,家兔卵巢为淡粉红色,呈纺锤形,表面有大小不一的卵泡突出。与CK相比,

T1组卵巢体积增大,充血卵泡数增加,T2组卵巢体积进一步增加,充血卵泡数显著增多。从表2可以看出,屠宰时各组家兔活质量为2460~2723 g,差异不显著;左卵巢质量为0.15~0.42 g,右卵巢质量为0.18~0.49 g,2个处理均高于对照,但差异不显著;卵巢指数对照低于处理,但差异不显著;卵巢大小2个处理也有增大的趋势,但差异不显著;表面充血卵泡数左侧卵巢处理组极显著多于对照( $P<0.01$ ),右侧卵巢处理组显著多于对照( $P<0.05$ ),表明PMSG处理刺激了母兔卵泡的生长。

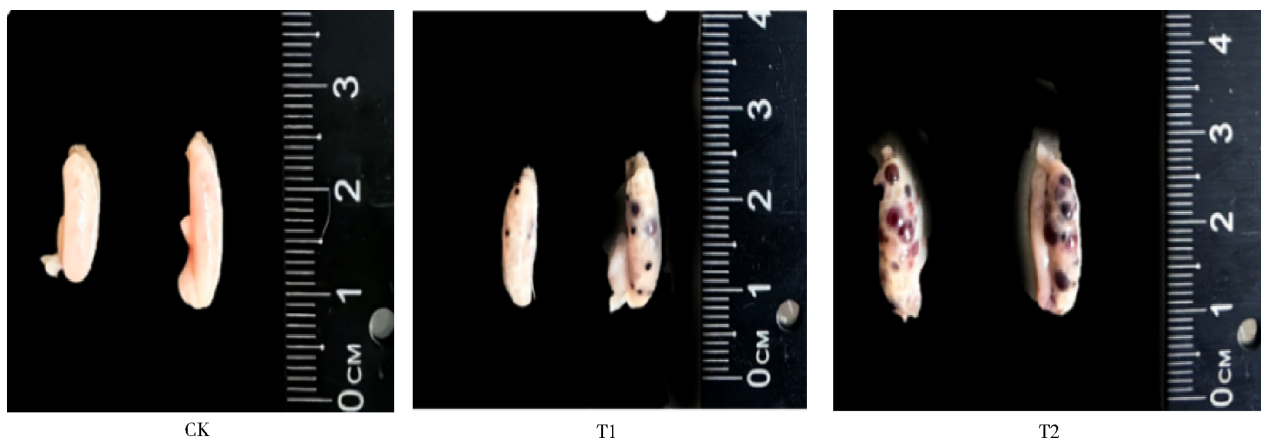


图1 PMSG处理前后各组卵巢形态变化

Fig.1 Change of ovary morphology before and after PMSG treatment

表 2 PMSG 处理前后各组卵巢物理形态参数(平均值 ± 标准差)

Tab.2 Ovary physical morphology indexes before and after PMSG treatments(mean ± SD)

组别 Group	屠宰体质量/g Slaughter weight	卵巢质量/g Ovarian weight		充血卵泡/个 Hypertrophied follicle number				卵巢大小/mm <sup>2</sup> Ovarian size				卵巢指数/% Ovarian index
		左 Left	右 Right	左 Left		右 Right		左 Left		右 Right		
				左 Left	右 Right	左 Left	右 Right	左 Left	右 Right	左 Left	右 Right	
CK	2 675.03±106.07a	0.15±0.04a	0.18±0.01a	0.00±0.00Aa	0.50±0.71a	46.07±2.82a	77.53±3.53a	0.012±0.001a				
T1	2 723.32±60.28a	0.33±0.19a	0.35±0.19a	14.00±4.35Bb	14.30±6.02b	124.76±73.67a	137.03±37.02a	0.023±0.015a				
T2	2 610.03±80.00a	0.42±0.26a	0.49±0.25a	12.04±7.21Bb	13.71±4.93b	123.61±58.14a	147.02±47.58a	0.031±0.005a				

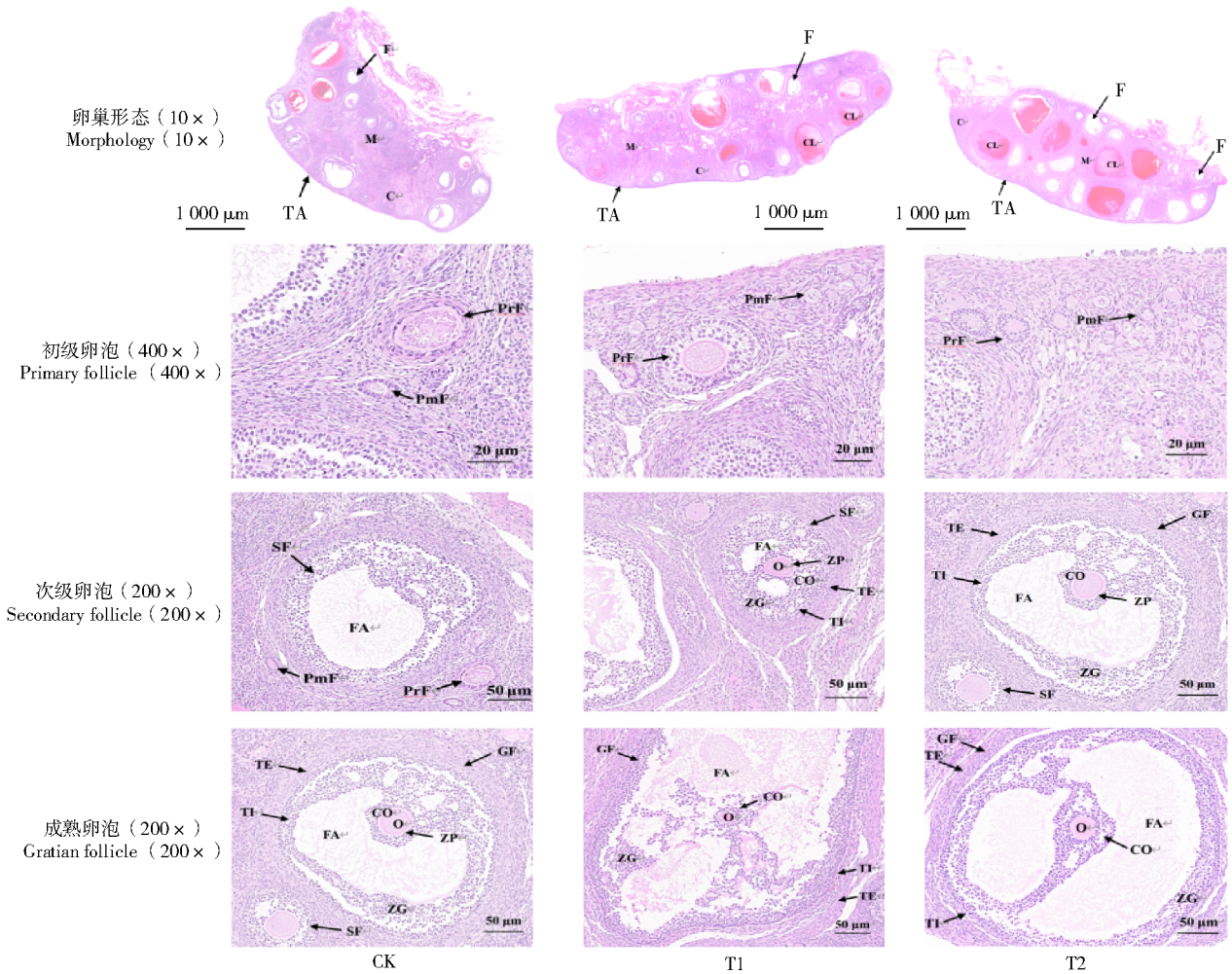
注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著( $P<0.05$ );不同大写字母表示处理间差异极显著( $P<0.01$ )。表 3 同。

Note: The different lowercase letters after the same column of data indicated significant differences among the treatments( $P<0.05$ ); The different capital letters indicated extremely significant differences among the treatments( $P<0.01$ ). The same as Tab.3.

2.2 PMSG 处理前后卵巢组织学变化

形态如图 2 所示。

PMSG 处理前后各组卵巢和各级卵泡的组织



C. 皮质; M. 髓质; TA. 白膜; F. 卵泡; CL. 黄体; PmF. 原始卵泡; PrF. 初级卵泡; SF. 次级卵泡; GF. 成熟卵泡; FA. 卵泡腔; O. 卵母细胞; CO. 卵丘; TI. 内膜层; TE. 外膜层; ZG. 颗粒层; ZP. 透明带

C. Cortex; M. Medulla; TA. Tunica albuginea; F. Follicle; CL. Corpus luteum; PmF. Primitive follicle; PrF. Primary follicle; SF. Secondary follicle; GF. Mature follicle; FA. Follicular antrum; O. Oocyte; CO. Cumulus oophorus; TI. Theca interna; TE. Theca externa; ZG. Zona granulosa; ZP. Zona pellucida

图 2 PMSG 处理前后各组卵巢和各级卵泡的组织形态

Fig.2 Histological morphology of ovaries and follicles of all levels before and after PMSG treatment

从图2可以看出,将卵巢HE切片置于显微镜(10×~400×)下观察,可清楚观察到细胞质、卵泡液、皮质、髓质、胶原纤维等被伊红染成不同程度的紫色或红色,可通过形态和组织学特征清楚地区分各级卵泡。其中,初级卵泡无卵泡腔,但可明显地分辨出初级卵母细胞,细胞核大,呈圆形,核仁明显;周围包绕一层立方状的卵泡细胞。次级卵泡细胞间出现新月形的卵泡腔,内含卵泡液,初级卵母细胞周围出现透明带,并可观察到放射冠;卵泡膜分化成内、外2层,内膜层含有多边形或梭形的膜细胞,外膜层主要由结缔组织构

成,胶原纤维较多。成熟卵泡是次级卵泡发育的最终阶段,体积明显增大,卵泡腔扩大,使初级卵母细胞与周围的卵泡细胞位于卵泡腔的一侧,形成卵丘。

从表3可以看出,各组初级卵泡数量均明显多于次级卵泡和成熟卵泡数量,初级卵泡数量对照多于2个试验组,但差异不显著;次级卵泡数量T2组较多,但各组间差异不显著,成熟卵泡数量T2组显著多于对照和T1组( $P<0.05$ ),但对照和T1组间差异不显著。

表3 PMSG处理前后各组各级卵泡数比较(平均值±标准差)

Tab.3 Comparison of follicle numbers of all levels in different groups before and after PMSG treatment(mean±SD)

组别 Group	初级卵泡数量 No. primary follicle	次级卵泡数量 No. secondary follicle	成熟卵泡数量 No. mature follicle	组别 Group	初级卵泡数量 No. primary follicle	次级卵泡数量 No. secondary follicle	成熟卵泡数量 No. mature follicle
CK	51.02±29.70a	5.53±2.12a	1.01±1.41a	T2	34.31±10.50a	10.33±4.93a	6.34±2.08b
T1	42.73±31.67a	5.76±3.51a	2.30±1.52a				

### 2.3 RNA-Seq数据质控

对9个样品下机数据(raw data)的reads数分别进行统计,并对带接头、低质量的reads进行过滤,同时对测序样本的GC含量(GC%)进行统计,

结果如表4所示,平均总reads数为45 530 086条,平均clean reads数为42 402 397条,平均Q20为97.68%,平均Q30为93.55%,clean reads占总reads的百分比为93.12%,平均GC含量为52.78%。

表4 下机数据统计及质控结果

Tab.4 Statistics of raw data and quality control results

兔耳号 ID	分组 Group	总reads数/条 Total reads number	Q20/%	Q30/%	过滤后reads条数 Clean reads number	过滤后占比/% Clean reads proportion	GC含量/% GC content
L2056	CK	43 485 386	97.90	94.37	40 642 790	93.46	53.09
L2065	CK	48 514 426	97.38	93.30	44 974 763	92.70	51.87
L2078	CK	43 825 482	97.80	93.32	40 461 378	92.32	53.26
L2053	T1	39 405 954	97.60	93.84	36 698 311	93.13	52.88
L2075	T1	38 387 486	97.86	93.26	35 721 462	93.05	52.90
L2090	T1	46 114 312	97.46	93.04	42 913 635	93.06	53.50
L2030	T2	49 316 792	97.75	93.74	46 053 097	93.38	53.19
L2035	T2	46 207 058	97.68	93.52	43 177 360	93.46	52.18
L2087	T2	54 513 874	97.70	93.54	50 978 777	93.52	52.13
平均值 Average		45 530 086	97.68	93.55	42 402 397	93.12	52.78

### 2.4 参考基因组比对分析

将过滤后的clean reads与家兔参考基因组进行比对,并统计mapped reads在指定参考基因组不同区域(外显子、内含子和基因间区)的数目,结果如表5所示,比对到外显子区的基因条目范围为

7.21%~9.95%,比对到内含子区的基因条目范围为8.82%~13.33%,比对到基因间区的基因条目范围为77.99%~84.26%,说明家兔基因组目前尚有大量基因未进行注释。

表 5 Clean reads 与家兔参考基因组序列比对结果

Tab.5 Alignment results of clean reads and domestic rabbit genome sequence

条

兔耳号 ID	分组 Group	比对 reads 总数 Mapped reads number	比对到内含子区域的 reads 数 Mapped to intron	比对到外显子区域的 reads 数 Mapped to exon	比对到基因间区的 reads 数 Mapped to intergene
L2056	CK	40 642 790	4 901 520(12.06%)	3 861 065(9.95%)	31 697 311(77.99%)
L2065	CK	44 974 763	5 455 438(12.13%)	3 683 433(8.19%)	35 835 891(79.68%)
L2078	CK	40 461 378	3 661 754(9.05%)	2 917 265(7.21%)	33 882 357(83.74%)
L2053	T1	36 698 311	4 121 220(11.23%)	2 737 694(7.46%)	29 839 396(81.31%)
L2075	T1	35 721 462	4 218 705(11.81%)	2 932 732(8.21%)	28 570 025(79.98%)
L2090	T1	42 913 635	3 518 918(8.82%)	2 969 624(6.92%)	36 159 029(84.26%)
L2030	T2	46 053 097	4 536 230(9.85%)	3 343 455(7.26%)	38 173 412(82.89%)
L2035	T2	43 177 360	5 755 542(13.33%)	3 652 804(8.46%)	33 769 013(78.21%)
L2087	T2	50 978 777	5 434 338(10.66%)	4 175 162(8.19%)	41 369 277(81.15%)

注: 括号中数字代表比对到不同基因组区域的 reads 数占总 reads 数的比例。

Note: The number in parentheses represented the proportions of reads that mapped to different genome regions.

2.5 差异表达基因分析

火山图和韦恩图如图 3-A~D 所示。

PMSG 处理前后各组卵巢差异表达基因的火

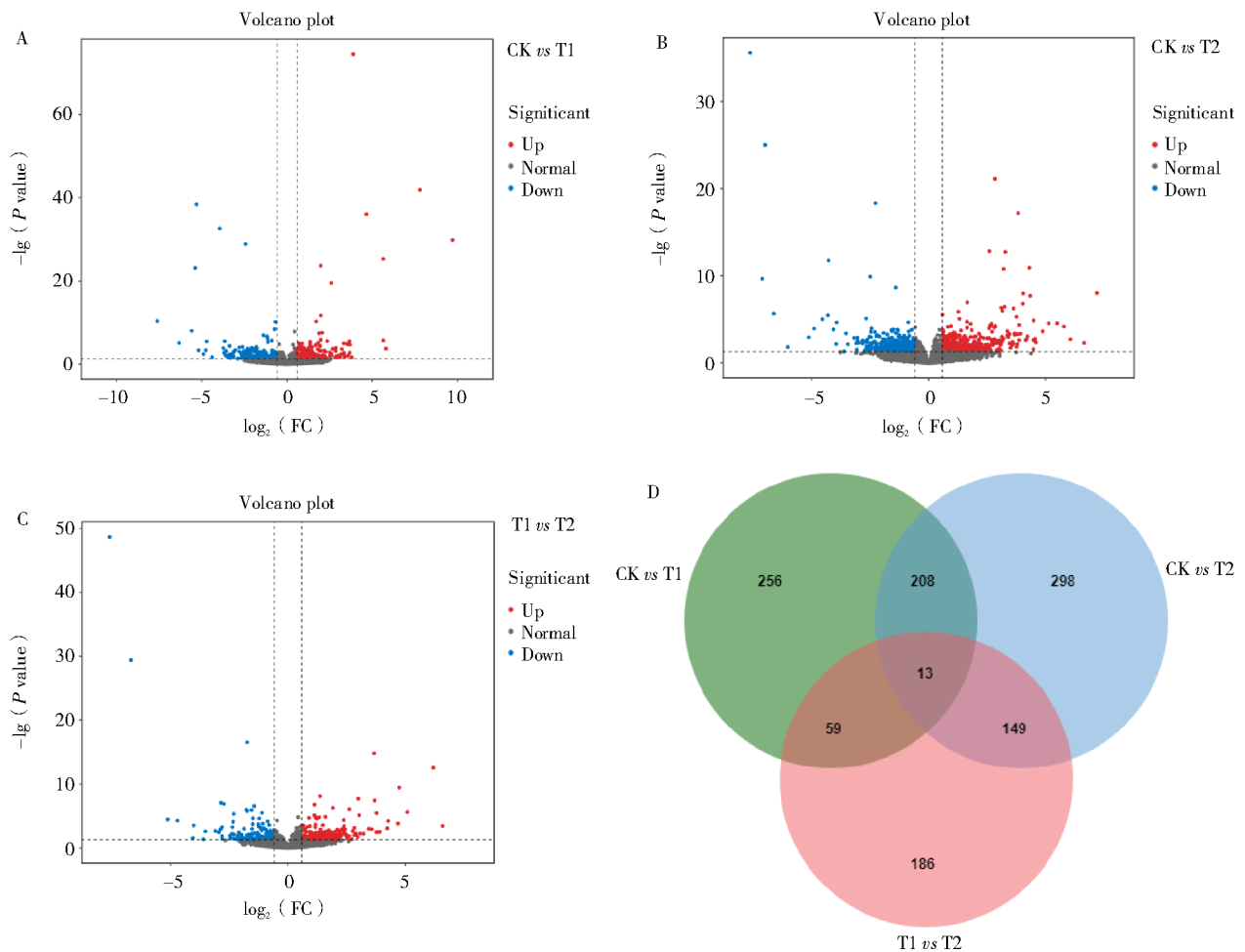


图 3 PMSG 处理前后各组卵巢差异表达基因的火山图和韦恩图

Fig.3 Volcano plot and Venn plot of differentially expressed genes of ovaries in each group before and after PMSG treatment

从图3可以看出,CK相对于T1组共鉴定出536个差异表达基因,其中,上调表达282个,下调表达254个(图3-A);CK相对于T2组,共鉴定出668个差异表达基因,其中,上调表达403个,下调表达265个(图3-B);T1组相对于T2组,共鉴定出407个差异表达基因,其中,上调表达253个,下调表达154个(图3-C)。为了更加直观地展示不同组间差异基因的情况,采用韦恩图进行统计,从

图3-D可以看出,CK相对于T1组和CK相对于T2组共有基因221个,CK相对于T1组和T1组相对于T2组共有基因72个,CK相对于T2组和T1组相对于T2组共有基因162个,3个组共有基因13个,包括*CBLN3*、*FAT2*、*CDH15*、*CA8*等基因。表6列出了CK相对于T1组和CK相对于T2组表达差异最显著的10个基因。

表6 CK相对于T1和CK相对于T2差异表达基因(前10个)

Tab.6 Top 10 differentially expressed genes in CK vs T1 group and CK vs T2 group

基因 Gene	CK相对于T1 CK vs T1			基因 Gene	CK相对于T2 CK vs T2		
	表达差异倍数 $\log_2 \text{fold change} $	<i>P</i>	方向 Direction		表达差异倍数 $\log_2 \text{fold change} $	<i>P</i>	方向 Direction
<i>F5</i>	5.797	$1.7 \times 10^{-4}$	上调	<i>FABP4</i>	6.639	$5.0 \times 10^{-3}$	上调
<i>LOC100343607</i>	5.647	$1.9 \times 10^{-6}$	上调	<i>GPR88</i>	6.063	$1.9 \times 10^{-3}$	上调
<i>PDILT</i>	3.693	$1.9 \times 10^{-5}$	上调	<i>SNCG</i>	5.779	$6.7 \times 10^{-5}$	上调
<i>ABCA4</i>	3.191	$3.7 \times 10^{-3}$	上调	<i>KCNH3</i>	5.495	$2.8 \times 10^{-5}$	上调
<i>SLC13A4</i>	3.099	$2.1 \times 10^{-2}$	上调	<i>SMIM43</i>	5.125	$2.8 \times 10^{-5}$	上调
<i>CBLN3</i>	-7.613	$4.2 \times 10^{-11}$	下调	<i>CBLN3</i>	-7.099	$2.2 \times 10^{-10}$	下调
<i>FAT2</i>	-6.345	$7.4 \times 10^{-6}$	下调	<i>FAT2</i>	-6.613	$2.1 \times 10^{-6}$	下调
<i>CDH15</i>	-4.902	$3.9 \times 10^{-3}$	下调	<i>CBLN1</i>	-6.015	$1.5 \times 10^{-5}$	下调
<i>CA8</i>	-4.713	$3.5 \times 10^{-3}$	下调	<i>CDH15</i>	-5.121	$1.2 \times 10^{-3}$	下调
<i>GRID2IP</i>	-3.747	$1.3 \times 10^{-3}$	下调	<i>CA8</i>	-4.532	$9.8 \times 10^{-2}$	下调

## 2.6 差异表达基因的功能富集分析

对CK相对于T1组、CK相对于T2组和T1组相对于T2组分别进行GO富集分析,图4-A~C为3个差异表达基因分别富集到生物过程(Biological process, BP)、细胞组分(Cellular component, CC)和分子功能(Molecular function, MF)最显著的前10个条目。CK相对于T1组共显著富集到368个GO条目( $P < 0.05$ ),极显著富集到81个GO条目( $P < 0.01$ )。其中,较多基因富集在细胞质组分(Obsolete cytoplasmic part, 30个)、催化活性(Catalytic activity, 16个)和细胞质囊泡(Cytoplasmic vesicle, 12个)等功能条目中(图4-A)。CK相对于T2组共显著富集到600个GO条目( $P < 0.05$ ),极显著富集到121个GO条目( $P < 0.01$ )。其中较多基因富集在ATP结合(ATP binding, 79个)、细胞质(Cytoplasm, 112个)和催化活性(Catalytic activity, 23个)等功能条目中(图4-B)。T1组相对于T2组共显著富集到508个GO条目( $P < 0.05$ ),极显著富集到65个GO条目( $P < 0.01$ ),其中,较

多基因富集在金属离子结合(Metal ion binding, 49个)、GTP酶激活剂活性(GTPase activator activity, 12个)和催化活性(Catalytic activity, 20个)等功能条目中(图4-C)。

KEGG分析结果显示,CK相对于T1组共显著富集在35条信号通路中( $P < 0.05$ ),极显著富集在15条信号通路中( $P < 0.01$ );CK相对于T2组共显著富集在73条信号通路中( $P < 0.05$ ),极显著富集在42条信号通路中( $P < 0.01$ );T1组相对于T2组共显著富集在18条信号通路中( $P < 0.05$ ),极显著富集在7条信号通路中( $P < 0.01$ )。

表7是3组差异基因富集最显著的前10条通路,从表7可以看出,差异基因显著富集在造血细胞系(Hematopoietic cell lineage)、类固醇生物合成(Steroid biosynthesis)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、催产素信号通路(Oxytocin signaling pathway)、叶酸合成(Folate biosynthesis)等信号通路中,共包含约120个差异表达基因。



图 4 PMSG 处理前后各组卵巢差异表达基因的 GO 富集分析

Fig.4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes of ovaries in each group before and after PMSG treatment

表7 PMSG处理前后各组卵巢差异表达基因的KEGG富集分析  
**Tab.7 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes of ovaries in each group before and after PMSG treatment**

通路ID Pathway ID	通路名称 Pathway	富集到该通路下 差异基因数目 Enriched DEG number	P 值 P value	富集的差异基因名称 DEG name	上下调情况 Up/down regulated
ko05152	Tuberculosis	28	$5.61 \times 10^{-8}$	<i>NewGene_25433, ATP6V0A2, CAMK2A, CD14, CD74, CEBPB, CIITA, CTSS, EFCAB7, IL10RA, IRAK2, ITGAM, ITGAX, ITGB2, KSR1, LOC100009097, LOC100337909, LOC100338913, LOC100341358, LOC100343144, LOC100351416, LOC100352301, LOC100352672, RLA-DR-ALPHA, RLA-DRB1, SYK, TLR1, TLR4</i>	上/下调
ko0464	Hematopoietic cell lineage	19	$5.28 \times 10^{-7}$	<i>NewGene_25433, CD14, CD22, CD36, CD37, CD8A, CSF1R, CSF2RA, IL7R, ITGA4, ITGAM, LOC100009097, LOC100341358, LOC100343144, LOC100351416, LOC100352672, LOC100352809, RLA-DR-ALPHA, RLA-DRB1</i>	上调
ko05140	Leishmaniasis	17	$6.22 \times 10^{-7}$	<i>NewGene_25433, ITGA4, ITGAM, ITGB2, JUN, LOC100008803, LOC100009097, LOC100337909, LOC100338913, LOC100341358, LOC100343144, LOC100351416, LOC100352301, LOC100352672, RLA-DR-ALPHA, RLA-DRB1, TLR4</i>	上/下调
ko00100	Steroid biosynthesis	7	$1.61 \times 10^{-6}$	<i>EBP, LOC100355623, LOC127489716, LSS, MSMO1, NSDHL, TM7SF2</i>	下调
ko00900	Terpenoid backbone biosynthesis	6	$2.59 \times 10^{-6}$	<i>ACAT2, FDPS, LOC100346274, LOC127486917, MVD, MVK</i>	下调
ko04620	Toll-like receptor signaling pathway	9	$1.11 \times 10^{-3}$	<i>CCL5, CD40, CD80, CXCL10, CXCL11, CXCL9, IRF5, MAP2K6, PIK3R3</i>	上/下调
ko00640	Propanoate metabolism	6	$1.35 \times 10^{-3}$	<i>NewGene_24965, ACAT2, BCKDHB, ECHDC1, LDHA, PCCA</i>	上/下调
ko04010	MAPK signaling pathway	18	$1.41 \times 10^{-3}$	<i>CACNA2D2, DUSP4, FGF7, GADD45G, ISOC1, ISOC2, JUN, KIT, LOC127488808, LOC127488889, LOC127488890, MEF2C, MKNK1, NLK, RASGRF2, RASGRP1, RASGRP3, TAMALIN</i>	上/下调
ko04921	Oxytocin signaling pathway	11	$2.81 \times 10^{-3}$	<i>CACNA2D2, CAMK1, CAMK2A, CDKN1A, GUCY1A1, JUN, KCNJ5, LOC127493711, MEF2C, NOS3, OXTR</i>	上/下调
ko00790	Folate biosynthesis	5	$2.85 \times 10^{-3}$	<i>GCH1, LOC100344949, LOC100345716, LOC100348276, PCBD2</i>	下调

## 2.7 差异基因的qRT-PCR验证

以 *GADPH* 为内参基因, 随机选择 *CA11*、*FABP4*、*INHBA*、*INHBB*、*RUNX2*、*NSDHL* 等6个差异表达基因进行表达量的检测, 并与转录组

结果进行比较, 结果如图5所示, qRT-PCR的结果与RNA-Seq结果表达量趋势基本一致, 说明RNA-Seq测序结果可靠。

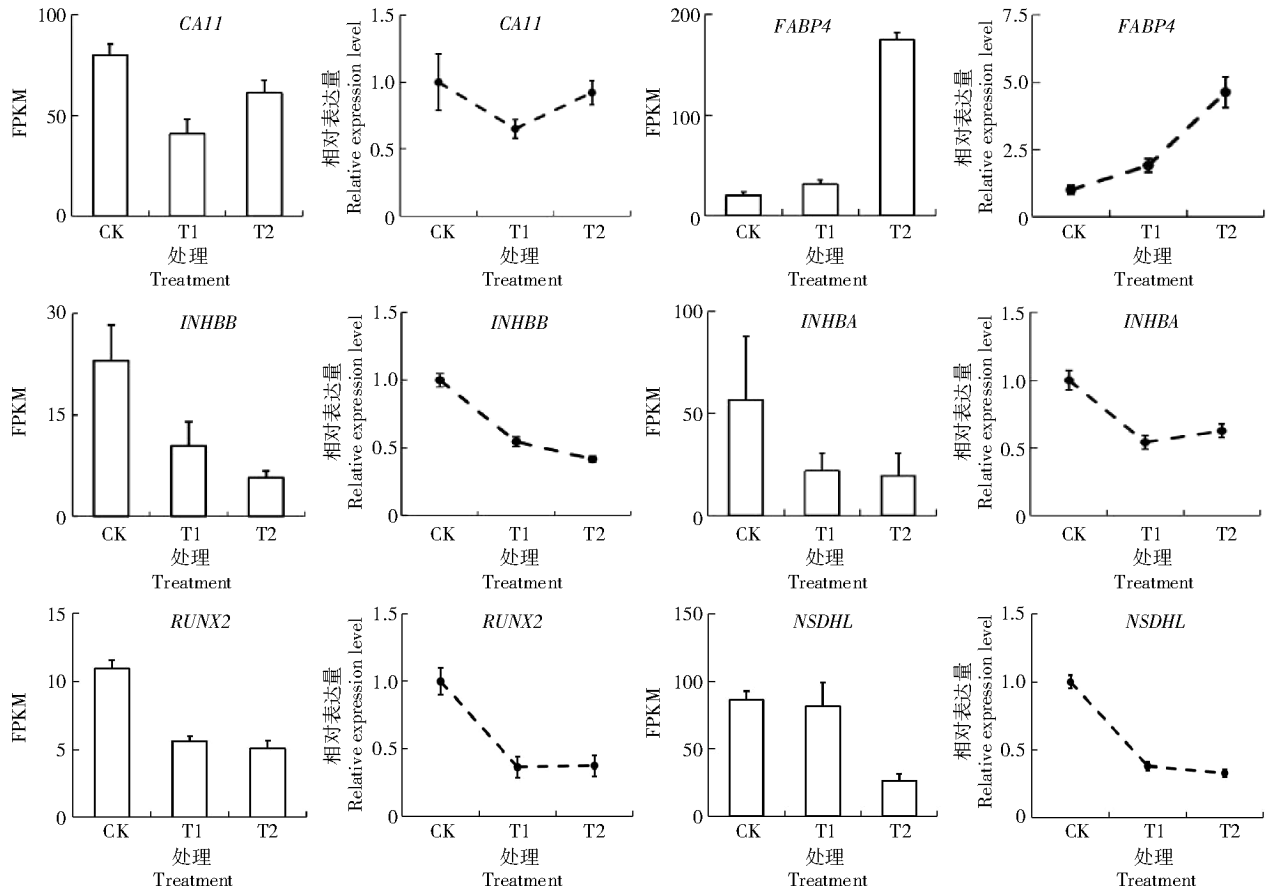


图 5 随机 6 个差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig.5 qRT-PCR validation of 6 random differentially expressed genes

### 3 结论与讨论

#### 3.1 PMSG 处理后卵巢形态和各级卵泡数的变化

PMSG 是来源于妊娠 40~150 d 母马血液的一类促性腺激素,其含糖量可达 45%,远远高于 FSH 和 LH,生理作用包括刺激卵泡生长、影响卵泡细胞蛋白质的合成以及透性,并可影响公畜精细管发育和精子的生成<sup>[21]</sup>。本研究中,注射 PMSG 后,家兔左右卵巢质量和大小都有所增加,左右两侧卵巢充血卵泡数显著增加,说明卵巢对激素作用敏感,发生了形态上的变化。PINCUS<sup>[22]</sup>研究表明,PMSG 有引发卵泡囊肿和卵泡充血的趋势。毛冠平等<sup>[23]</sup>也研究表明,PMSG 有 FSH 和 LH 的双重活性,一方面可促进卵泡生长发育,另一方面可促进卵巢内血液流量增加。所以,在一定剂量范围内,外源注入的 PMSG 可刺激母兔卵泡大量发育,同时,PMSG 会导致卵巢血管扩张,并进一步导致卵泡内压升高,从而使得颗粒膜和内膜破裂,血液大量流入,从而形成充血卵泡,这与本研究所

观察到的现象相符。

通过对卵巢组织切片的观察,发现注射 PMSG 后初级卵泡和次级卵泡数量无显著差异,而成熟卵泡数量注射后 72 h 显著高于 CK 和注射后 24 h 组。有研究认为,PMSG 对有腔卵泡之前的各级卵泡发育不起作用,卵泡的大小及分化阶段不同,对 PMSG 的反应程度也各不相同<sup>[15]</sup>。在有腔卵泡阶段,卵泡颗粒细胞上出现了 FSH 受体,并进一步在内膜细胞上出现 LH 受体,此时,PMSG 会作用于卵巢,促进卵泡的生长发育和卵巢血管增生,导致卵巢体积增大和有腔卵泡数的增加。

在诱导同期发情外源激素剂量方面,杨喜喜等<sup>[14]</sup>研究了不同剂量的 PMSG 对家兔卵巢组织形态的影响,分别注射 50、70、90 IU 的 PMSG 后测定卵巢形态和组织参数,结果表明,随着注射剂量增加,次级卵泡和三级卵泡的直径均表现出缩小的趋势,其中,90 IU 会导致卵巢的不良反应。冉兴荣等<sup>[16]</sup>研究了 PMSG 对成年獭兔超排和胚胎质量

的影响,结果表明,使用 50 IU PMSG+100 IU hCG 的外源激素组合处理效果最好。因此,本研究选择肌肉注射 50 IU PMSG 诱导日本大耳白兔同期发情。

### 3.2 PMSG 处理后卵巢差异表达基因和通路

本研究发现,在  $\log_2|\text{fold change}|\geq 1, P<0.05$  的阈值下,PMSG 处理 24 h 共有 536 个差异表达基因,与 CK 相比,上调表达 282 个,下调表达 254 个;PMSG 处理 72 h 共有 668 个差异表达基因,与 CK 相比,上调表达 403 个,下调表达 265 个;2 个处理组相比共有 407 个差异表达基因,其中上调表达 253 个,下调表达 154 个,3 组共有的差异表达基因 13 个,其中包括 *CA11*、*CBLN3*、*FAT2*、*CDH15*、*RUNX2*、*IGFBP2* 等功能已知的基因以及一些测序过程中发现的新基因。DU 等<sup>[24]</sup>研究表明,*FAT2* 作为一种钙离子依赖的细胞粘附素家族成员,在高低产云上山羊子宫组织中具有显著的表达量差异,并被进一步鉴定为与该品种产羔数有关的候选基因。*RUNX2* 是 Runt 家族相关转录因子,通过调节生物体中一系列与细胞增殖、分化、凋亡相关的过程来调节机体的发育,并在哺乳动物的卵泡发育、排卵和黄体形成过程中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。高可心<sup>[26]</sup>研究了 *RUNX1* 和 *RUNX2* 在奶山羊卵巢颗粒细胞中的表达调控机理,结果表明,它们可直接与 *StAR*、*HSD3B* 以及 *CYP11A1* 启动子区结合并促进其转录,进而促进 hCG 诱导孕酮的生成。晏航<sup>[27]</sup>筛选了在同期发情状态下多浪羊卵巢不同发育时期的差异表达基因,结果表明,*RUNX2* 等 6 个基因为卵巢卵泡发育的重要候选基因。*IGFBP2* 为胰岛素结合蛋白家族成员,可通过抑制胰岛素的作用调控胚胎发育。解领丽<sup>[28]</sup>在 3 月龄和 8 月龄湖羊卵巢组织中筛选出 2 903 个差异表达的 mRNAs 和 636 个差异表达的 lncRNAs,通过互作网络分析,发现一些 lncRNA 可能通过调控 *AMH*、*IGFBP2*、*INHBA*、*CYP11B1*、*StAR* 等基因的表达而影响卵巢的发育。因此,推测上述这些基因可能在家兔卵巢卵泡生长发育过程中起到关键作用,并可进一步影响其繁殖性能。

对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析,发现富集最为显著的前 10 条通路中,涉及到繁殖相关的通路主要有类固醇生物合成(ko00100: Steroid biosynthesis)、MAPK 信号通路(ko04010: MAPK biosynthesis)、催产素信号通路(ko04921:

Oxytocin signaling pathway) 和叶酸生物合成(ko00790: Folate biosynthesis),共包含了 41 个差异表达基因。王璠<sup>[29]</sup>研究了促排 3 号刺激对母兔繁殖生理的影响及分子机制,结果表明,注射组(A3)和未注射组(N)的差异基因富集到了 cAMP 信号通路、MAPK 信号通路以及 AMPK 等信号通路中,与本研究发现类似。韩浩园等<sup>[30]</sup>也研究表明,产单羔和多羔的槐山羊卵巢的差异表达基因富集在 MAPK 信号通路中。MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)通路可调控细胞凋亡与增殖等细胞内基本的生命活动,并且与脂质代谢相关<sup>[29]</sup>。一些研究发现,处于妊娠期的反刍动物,其血液中皮质醇的浓度会升高,而皮质醇可通过激活 MAPK 通路调节子宫内膜的炎症反应<sup>[30-31]</sup>。类固醇生物合成通路包含了类固醇激素的生物合成,性腺分泌的激素中很大一部分属于类固醇激素,如雌二醇、孕酮等。王茂晗等<sup>[32]</sup>研究了影响阳原驴产驹数的关键基因和通路,通过对 4 头产双驹和 5 头产单驹母驴的卵巢组织进行血液转录组测序分析和比较,结果表明,差异基因显著富集在卵巢类固醇生成相关通路中。王俊杰<sup>[33]</sup>在对不同产羔数的济宁青山羊卵泡颗粒细胞单细胞图谱的构建与差异基因富集分析中也发现,类固醇代谢通路为显著富集的信号通路。催产素是由下丘脑前区内“视上核”和“室旁核”神经内分泌细胞合成的肽类激素,通过垂体后叶释放,到达靶器官,具有促进子宫平滑肌收缩和促进分娩的作用,并在动物的骨代谢和能量代谢中发挥作用<sup>[34]</sup>。谢望为等<sup>[35]</sup>研究了双峰驼繁殖季和非繁殖季下丘脑和垂体基因的表达变化,KEGG 富集分析发现,差异基因主要富集在 MAPK 信号通路、催产素生成信号通路、卵巢类固醇生成等通路中。另外,本研究还极显著富集到叶酸合成通路,杜彦丽等<sup>[36]</sup>通过对产蛋和不产蛋茶花鸡的卵巢组织进行 RNA-Seq 分析,筛选影响其产蛋的候选基因,KEGG 信号通路富集分析显著富集到了叶酸合成信号通路,说明该通路在卵泡形成过程中可能发挥重要作用。除上述通路外,KEGG 分析还显著富集到了造血细胞系、Toll 样受体信号通路等一些与家兔免疫功能相关的信号通路中,这些通路内基因表达发生显著变化的原因还需要进一步研究。

本研究基于 PMSG 诱导母兔同期发情后分别通过组织学切片和 RNA-Seq 技术研究了发情前

后不同时间点家兔卵巢的组织学变化和差异表达基因及通路,结果表明,PMSG处理后72h(T2组)成熟卵泡数量显著多于PMSG处理后24h(T1组)和未处理组(CK);转录组测序发现,3组共有的差异表达基因13个,其中包括*CA11*、*CBLN3*、*FAT2*、*CDH15*、*RUNX2*、*IGFBP2*等繁殖相关的基因;KEGG分析发现,显著基因主要富集在类固醇激素合成、MAPK信号通路、催产素合成以及叶酸合成等与卵泡发育相关的通路和免疫相关的通路中,可能与家兔繁殖相关。后续应进一步对显著富集通路内的基因进行分析,采用如加权共表达网络(WGCNA)等技术深入挖掘影响卵泡发育的关键基因,为家兔繁殖过程的精准调控奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 武拉平,秦应和. 2024年中国兔产业发展情况和2025年发展展望[J]. 中国畜牧杂志,2025,61(3):409-413.  
WU L P, QIN Y H. Development of rabbit industry in China in 2024 and its prospect in 2025[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2025, 61(3):409-413.
- [2] 汪荣才,叶达丰,叶红霞. 我国兔产业发展现状及改善措施[J]. 浙江畜牧兽医,2020,45(2):9-12.  
WANG R C, YE D F, YE H X. The development situation and improvement measures of rabbit industry in our country[J]. Zhejiang Journal Animal Science and Veterinary Medicine, 2020, 45(2):9-12.
- [3] 张家骅. 家畜生殖内分泌学[M]. 北京:高等教育出版社,2007:184-196.  
ZHANG J H. Reproductive endocrinology in domestic animals [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 184-196.
- [4] 应诗家,于建宁,施振旦. GDF9/BMP15对卵泡发育的调控[J]. 家畜生态学报,2013,34(9):8-12.  
YING S J, YU J N, SHI Z D. Review of regulatory functions of GDF9/BMP15 in follicular development[J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2013, 34(9):8-12.
- [5] MOORE R K, OTSUKA F, SHIMASAKI S. Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(1):304-310.
- [6] DONG J W, ALBERTINI D F, NISHIMORI K, et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis[J]. Nature, 1996, 383:531-535.
- [7] JAVANMARD A, AZADZADEH N, ESMAILIZADEH A K. Mutations in bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 genes are associated with increased litter size in fat-tailed sheep breeds[J]. Veterinary Research Communications, 2011, 35(3):157-167.
- [8] 李正春. PMSG诱导荷斯坦青年母牛发情试验研究[J]. 中国牛业科学, 2009, 35(5):33-34.  
LI Z C. Study on rut test of PMSG induction for Holstein youth cows[J]. China Cattle Science, 2009, 35(5):33-34.
- [9] 邓宇,赵瑞霞,李宝栋,等. 外源激素处理提高小尾寒羊和蒙古羊春季繁殖力的研究[J]. 畜牧与兽医,2024,56(1):6-12.  
DENG Y, ZHAO R X, LI B D, et al. Improving fertility in spring for Small-tailed Han sheep and Mongolian sheep by exogenous hormone treatment[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56(1):6-12.
- [10] 吴俊辉,高凤磊,卫恒习,等. 猪场批次化生产模式和激素的选择[J]. 猪业科学,2020,37(4):40-42.  
WU J H, GAO F L, WEI H X, et al. Selection of batch management mode and hormone in pig farm[J]. Swine Industry Science, 2020, 37(4):40-42.
- [11] 赵刚,邓福金,李宁,等. 不同剂量PMSG及输精时间对梅花鹿发情率和受胎率的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2023(8):129-133.  
ZHAO G, DENG F J, LI N, et al. Effects of different doses of PMSG and sperm infusion time on estrus rates and conception rates of Sika deer[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2023(8):129-133.
- [12] HU S Q, LIANG X H, REN X F, et al. Integrated analysis of mRNA and miRNA expression profiles in the ovary of *Oryctolagus cuniculus* in response to gonadotrophic stimulation[J]. Frontiers in Endocrinology, 2019, 10:744.
- [13] 韦燕佩. 基于转录组测序技术分析家兔刺激性排卵机制[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2024.  
WEI Y P. Analysis of stimulated ovulation mechanism in rabbits based on transcriptome sequencing technology[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2024.
- [14] 杨喜喜,铁雅楠,王志亮,等. 不同剂量孕马血清促性腺激素超排处理对家兔卵巢组织形态和胚胎发育的影响[J]. 动物学杂志,2023,58(4):597-606.  
YANG X X, TIE Y N, WANG Z L, et al. Effects of different doses of pregnant mare serum gonadotropin on ovary morphology and embryonic development in rabbits[J]. Chinese Journal of Zoology, 2023, 58(4):597-606.
- [15] 周娜,铁雅楠,杨雅楠,等. 不同浓度PMSG和HCG组合对家兔超数排卵的影响[J]. 中国农学通报,2023,39(2):93-97.  
ZHOU N, TIE Y N, YANG Y N, et al. Effect of combinations of different concentrations of PMSG and HCG on rabbit superovulation[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2023, 39(2):93-97.
- [16] 冉兴荣,伏晓玉,铁雅楠,等. 不同剂量PMSG对獭兔超数排卵效果及胚胎质量的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2022,57(3):12-16.  
RAN X R, FU X Y, TIE Y N, et al. Effects of different dosages of PMSG on performance of superovulation and embryo quality in rex rabbits[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2022, 57(3):12-16.
- [17] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12(4):357-360.
- [18] PERTEA M, PERTEA G M, ANTONESCU C M, et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(3):290-295.
- [19] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation

- of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12):550.
- [20] YU G C, WANG L G, HAN Y Y, et al. Clusterprofiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *Omics*, 2012, 16(5):284-287.
- [21] 孙世坤, 桑雷, 陈冬金, 等. PMSG在兔同期发情中应用研究进展[J]. *中国畜禽种业*, 2017, 13(9):65-66.  
SUN S K, SANG L, CHEN D J, et al. Research progress on the application of PMSG in synchronous estrus of rabbits[J]. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, 2017, 13(9):65-66.
- [22] PINCUS G. Control of conception by hormonal steroids[J]. *Science*, 1966, 153:493-500.
- [23] 毛冠平, 张金友, 刘云波, 等. PMSG对兔超数排卵的影响及卵巢组织学观察[J]. *中国养兔*, 2004(6):17-22.  
MAO G P, ZHANG J Y, LIU Y B, et al. The effects of PMSG on superovulation and histological study of rabbit ovaries[J]. *Chinese Journal of Rabbit Farming*, 2004(6):17-22.
- [24] DU X L, LIU Y F, HE X Y, et al. Uterus proliferative period *CeRNA* network of Yunshang black goat reveals candidate genes on different kidding number trait[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14:1165409.
- [25] PARK E S, LIND A K, DAHM-KÄHLER P, et al. *RUNX2* transcription factor regulates gene expression in luteinizing granulosa cells of rat ovaries[J]. *Molecular Endocrinology*, 2010, 24(4):846-858.
- [26] 高可心. *RUNX1*和*RUNX2*在奶山羊卵巢颗粒细胞中的表达调控机理及功能研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2018.  
GAO K X. Regulation and function of runt-related transcription factors(*RUNX1* and *RUNX2*) in goat granulosa cells[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2018.
- [27] 晏航. 基于转录组测序筛选多浪羊卵巢卵泡期相关基因[D]. 阿拉尔:塔里木大学, 2023.  
YAN H. Transcriptome sequencing based screening of follicular related genes in the ovaries of Duolang sheep[D]. Ala'er: Tarim University, 2023.
- [28] 解领丽. 湖羊卵巢不同发育阶段 lncRNA 的鉴定与功能分析 [D]. 北京:中国农业科学院, 2019.  
XIE L L. Identification and functional analysis of lncRNA at different developmental stages of Hu sheep ovary[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [29] 王璠. 促排3号刺激对母兔繁殖生理的影响及其分子机制 [D]. 扬州:扬州大学, 2023.  
WANG F. Effect of LHRH-A3 on the reproductive physiology of female rabbits and its molecular mechanism[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023.
- [30] 韩浩园, 李世凯, 杨瑞巧, 等. 基于转录组测序挖掘槐山羊高繁关键候选基因[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(12):5077-5090.  
HAN H Y, LI S K, YANG R Q, et al. Mining key candidate genes for high reproduction performance of Huai goats based on transcriptome sequencing[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(12):5077-5090.
- [31] 孟瑶. 早期妊娠对绵羊子宫内膜 AMPK、MAPK/Erk 和 PI3K/mTOR 通路的影响[D]. 邯郸:河北工程大学, 2024.  
MENG Y. Effects of early pregnancy on AMPK, MAPK/Erk and PI3K/mTOR pathways in the endometrium of sheep[D]. Handan: Hebei University of Engineering, 2024.
- [32] 王茂哈, 苏咏梅, 朱文进, 等. 不同产驹数原驹血液转录组分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2024, 51(10):4391-4399.  
WANG M H, SU Y M, ZHU W J, et al. Transcriptome analysis of blood in Yangyuan donkeys with different litter size[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 51(10):4391-4399.
- [33] 王俊杰. 济宁青山羊产羔数性状的基因组和卵泡发育的转录组研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2020.  
WANG J J. Genome analysis of litter size trait and transcriptome analysis of follicular development of Jining grey goat[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2020.
- [34] HERMESCH A C, KERNBERG A S, LAYOUN V R, et al. Oxytocin: physiology, pharmacology, and clinical application for labor management[J]. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2024, 230(3):S729-S739.
- [35] 谢望为, 刘鹤洁, 吉木斯, 等. 双峰驼繁殖与非繁殖季下丘脑、垂体差异基因筛选与分析[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2025, 46(1):1-11.  
XIE W W, LIU H J, JI M S, et al. Screening and analysis of hypothalamic and pituitary differential genes in the breeding and non-breeding seasons of Bactrian camel[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2025, 46(1):1-11.
- [36] 杜彦丽, 朱娜, 陈依婷, 等. 茶花鸡卵巢组织特征及其转录组分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2025, 61(2):169-175.  
DU Y L, ZHU N, CHEN Y T, et al. Histological characteristics and transcriptome analysis of *Camellia* chicken ovary[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2025, 61(2):169-175.