

麻俊渊, 王进娥, 李洋, 等. 牦牛妊娠期和产后乏情期卵巢蛋白组学分析 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (4): 429–438.

MA J Y, WANG J E, LI Y, et al. Ovarian Proteomics of Yaks in Pregnancy and Postpartum Anestrus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (4): 429–438.

牦牛妊娠期和产后乏情期卵巢蛋白组学分析

麻俊渊, 王进娥, 李洋, 胡淞茗, 陈舟,
李书元, 杨妍梅, 扎西英派, 霍生东*

(西北民族大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730030)

摘要:【目的】研究牦牛产后乏情期和妊娠期卵巢中差异蛋白的表达情况。【方法】选择青海省湟源县一户牧民自然放牧牛群中处于妊娠期和产后乏情期牦牛各3头为研究对象, 采集卵巢组织, 利用TMT定量蛋白质组学技术发掘不同时期卵巢差异表达蛋白。【结果】妊娠期和产后乏情期卵巢组织中差异表达蛋白有57个, 其中乏情期卵巢组织中上调蛋白38个, 下调蛋白19个; COG分析发现, 差异表达蛋白功能集中于能量的生产与转化、蛋白质周转、氨基酸转运与代谢等过程; GO分析发现, 差异表达蛋白集中于代谢、繁殖等生物过程, 涉及细胞器成分等细胞组分, 参与转运活性等分子功能; KEGG分析发现, 差异表达蛋白共参与27条信号通路, 其中, 缓激肽(BK)、胆固醇侧链裂解酶(P450scc)参与卵巢类固醇激素生成通路, 谷胱甘肽过氧化物酶1(GSH-P1)、谷胱甘肽S转移酶A2(GSTA2)、谷胱甘肽转移酶(GST)和天冬氨酸转氨酶(AST)参与氨基酸转运与蛋白质代谢通路, 磷脂酰肌醇-3-激酶蛋白(PI3K)参与PI3K-Akt细胞凋亡信号通路。【结论】BK、P450scc、GSH-P1、GSTA2、GST、AST和PI3K与牦牛乏情的产生密切相关。

关键词: 妊娠期; 产后乏情; 蛋白质组学; 卵巢; 牦牛

中图分类号: S 857.2+1

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 04-0429-10

Ovarian Proteomics of Yaks in Pregnancy and Postpartum Anestrus

MA Junyuan, WANG Jine, LI Yang, HU Songming, CHEN Zhou,
LI Shuyuan, YANG Yanmei, ZHAXI Yingpai, HUO Shengdong*

(Life Science and Engineering College, Northwest University for Nationalities, Lanzhou, Gansu 730030, China)

Abstract: 【Objective】Differentially expressed proteins (DEPs) in ovaries of yak s in pregnancy and postpartum anestrus were identified. 【Method】Ovarian tissues of 3 randomly selected yaks each in pregnancy or postpartum anestrus from a natural grazing herd in Huangyuan County, Qinghai Province were sampled for DEP identification by the TMT method. 【Result】Thirty-eight upregulated and 19 downregulated DEPs were found in the yaks. The COG analysis indicated the major functions of the proteins related to the production and transformation of energy, protein turnover, and amino acid transport and metabolism. The Go analysis showed that they were mainly annotated in the biological processes of metabolism and reproduction, associated with the cellular component including organelle cell components, and participated in molecular function including the molecular transport activity. Whereas KEGG revealed their involvements in 27 signaling pathways that included BK and P450scc in the ovarian steroid hormone production, GSH-P1, GSTA2, GST, and AST in the amino acid transport and protein metabolism, and PI3K in the PI3K-Akt apoptosis signaling. 【Conclusion】The current study identified specific DEPs in yak ovary, i.e., BK, P450scc, GSH-P1, GSTA2, GST, AST, and PI3K, that were closely related to the onset of anestrus in the animal.

Key words: Pregnancy; postpartum anestrus; proteomics; ovary; yak

收稿日期: 2021-11-14 初稿; 2022-01-25 修改稿

作者简介: 麻俊渊 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 牦牛生殖调控 (E-mail: Junyuanmaxbmd@163.com)

* 通信作者: 霍生东 (1979-), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 牦牛季节性发情、哺乳动物产后乏情等 (E-mail: huoshd@xbmu.edu.cn)

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (31920190204、31920200076); 甘肃省重点研发计划项目 (17YF1NA067); 甘肃省教育厅优秀研究生“创新之星”项目 (2021CXZX-683)

0 引言

【研究意义】牦牛是高原地区主要畜种，其繁殖性能较低，通常为两年一胎或三年两胎^[1,2]。极少数牦牛在分娩后一定时间内机体恢复顺利进入下一个发情周期，而大多数会进入产后乏情期，呈不发情表现。造成哺乳动物产后乏情的外部原因有饲养状况、温度气候、品种年龄和疾病等^[3]。但造成牦牛产后乏情的关键生物因子及影响机制并不明确。本研究利用差异蛋白质组学分析，更好地分析理解牦牛妊娠分娩后易乏情的生理变化规律，对于深入研究妊娠期和产后乏情期卵巢的生理特性和揭示产后乏情机理具有一定参考价值。【前人研究进展】蛋白质组学（Proteomics）是探究生物体蛋白质组的组成及变化规律的科学^[4]，该技术最初为阐明蛋白质的种类，现被广泛应用于精确定位特定蛋白质的结构和功能的研究^[5]。蛋白质是生命活动的体现者和执行者，对蛋白质整体进行动态分析，能更深入揭示生命活动的真谛^[6]。海超^[7]对冷冻前后精子进行同步蛋白质组学分析探讨精子冷冻损伤的分子机制；赵国顺^[8]建立了牦牛不同直径卵泡液蛋白表达图谱，发现了不同时期卵泡液对卵母细胞发育影响的关键蛋白及作用机制。阮崇美^[9]通过构建不同发育期白牦牛睾丸蛋白质表达谱，发现白牦牛性机能旺盛期睾丸支持细胞增殖调控机制。Pei 等^[10]通过分析不同直径牦牛卵泡差异表达蛋白，寻找到了卵泡成熟的标志蛋白。赵兴绪^[11]利用蛋白质组学技术筛选出天祝白牦牛发情期与妊娠期卵巢差异表达蛋白。霍生东等^[12]通过转录组与定量蛋白质组学分析相结合，筛选出卵巢周期停滞相关基因和蛋白质。【本研究切入点】牦牛在妊娠期和产后乏情期，卵巢上卵泡发育均处于静止状态^[13]，但不同时期机体生殖生理活动却完全不同；且蛋白质组学技术在牦牛妊娠与分娩后卵巢周期停滞方面的应用尚未见有关研究。【拟解决的关键问题】通过蛋白质组学技术分析牦牛妊娠期和产后乏情期卵巢差异表达蛋白，整理发掘牦牛妊娠分娩后因卵巢停滞而导致乏情的关键生物因子，为开展牦牛乏情期与妊娠期相关蛋白研究与分子调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

在青海省海晏县牧民自然放牧牦牛群挑选 6 岁左右、临床观察确定处于妊娠期和产后乏情期的母牦牛。

1.2 样品采集与处理

临床检查无可见疾病，挑选处于妊娠期和产后乏情期牦牛各 3 头，屠宰后立即采集卵巢，修剪附属组织，预温生理盐水洗净卵巢表面的血迹污物，迅速放入液氮内保存运输。冻存样品送北京百迈客生物科技有限公司（Biomarker technologies）进行 TMT（Tandem mass tags）定量蛋白质组学技术分析检测。

1.3 基于 TMT 定量蛋白组学分析

1.3.1 卵巢蛋白质提取及含量测定 参照已有研究方法提取卵巢蛋白质^[14]。适量的蛋白质裂解液（8 mol·L⁻¹ 尿素、1% SDS），冰上超声 2 min 后裂解 30 min，4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min，取蛋白质上清。使用 Thermo Scientific Pierce BCA 试剂盒（Thermo，USA）进行蛋白定量。

1.3.2 酶解烷基化以及 TMT 标记 取蛋白样品 100 μg，用裂解液补充体积到 100 μL。加入终浓度 10 mmol·L⁻¹ TCEP 还原剂，在 37 ℃ 下反应 60 min。加入终浓度 40 mmol·L⁻¹ 碘乙酰胺，室温下避光反应 40 min。每管加入预冷丙酮 [V（丙酮）：V（样品）=6:1]，-20 ℃ 沉淀 4 h，10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min，弃上清。用 50 mmol·L⁻¹ TEAB 充分溶解样品，按照质量比 1:50（酶:蛋白）加入 Trypsin 在 37 ℃ 酶解过夜。TMT 试剂（Thermo，USA）加入乙腈解冻重组，并加入多肽溶液进行标记，室温孵育 2 h；加入羟胺，室温反应 15 min，将等量标记产物混合于管中，真空浓缩仪抽干^[14-15]。

1.3.3 LC-MS/MS 检测 采用纳升级液相色谱串联质谱技术（Easy-nLC 1200 结合 Q Exactive 质谱仪）进行分析^[15]。肽段用质谱上样缓冲液溶解，蛋白上样后经 C18 色谱柱（75 μm×25 cm，Thermo，USA）分离 120 min，体积流量为 300 μL·min⁻¹。EASY-nLC 液相梯度洗脱，流动 A 相 2% 乙腈（加 0.1% 甲酸），B 相 80% 乙腈（加 0.1% 甲酸）。按照以下程序进行梯度洗脱：0~1 min、0~5% B 相，1~63 min、5%~23% B 相，63~88 min、23%~48% B 相，88~89 min、48%~100% B 相，89~95 min、100% B 相。MS 和 MS/MS 采集之间自动切换，质谱分辨率分别是 70 K 和 35 K。MS 扫描范围为（m/z）350~1 300，选择 top20 的母离子进行二级碎裂，动态排除时间为 18 s。用软件 Thermo Xcalibur 4.0（Thermo，USA）进行数据采集。

1.3.4 蛋白质比对及差异表达蛋白筛选 利用数据库检索得到原始数据后，按照 Score Sequest HT>0 且 unique peptide≥1，并去除空白值的标准筛选可信蛋白。计算组间蛋白质表达差异倍数（Fold change，FC），以 1.5 倍差异表达，即 |Log₂FC|>1.5 且 P<0.05

作为差异表达蛋白（Differentially expressed proteins, DEPs）的筛选标准。

1.3.5 生物信息学分析 将鉴定到的蛋白质序列与 GO、COG、KEGG 等数据库进行比对，获得蛋白在各数据库的注释信息。

1.4 数据统计分析

试验数据用 SPSS 25 软件进行统计分析。生物量结果采用 SPSS 25 软件对数据进行单因素方差分析（ANOVA），应用多重比较 Tukey 检测对数据之间的差异性进行检验， $P<0.05$ 、 $|\text{Log}_2\text{FC}|>1.5$ 时表示差异具有统计学意义。采用主成分分析（Principal

component analysis, PCA）评价同时期卵巢蛋白质相似性。利用 Origin 构建了不同时期卵巢组差异表达蛋白热图。

2 结果与分析

2.1 差异表达蛋白鉴定结果

试验共鉴定到 4457 个蛋白质，都具有定量表达信息。两组样本间有 57 个差异表达蛋白，且与妊娠期组相比，产后乏情卵巢组织中表达上调蛋白 38 个，表达下调蛋白 19 个，差异表达蛋白信息见表 1。

表 1 差异表达蛋白信息统计
Table 1 Statistical information on DEPs

序号 Number	标识 ID	蛋白名称 Protein names	调节 Regulated
1	Q4U0F3	热休克 70 kDa 蛋白 1B (HSP70.2) Heat shock 70 kDa protein 1B (HSP70.2)	下调 Down
2	D4QBF3	血红蛋白β Hemoglobin beta	上调 Up
3	L8I5Y3	胶原结合蛋白 Collagen-binding protein	上调 Up
4	A0A5A9Q697	未知 Deleted	上调 Up
5	A0A5A9QF16	未知 Deleted	下调 Down
6	A0A5A9PW39	未知 Deleted	上调 Up
7	L8J5R1	谷胱甘肽 S-转移酶 A2（片段） Glutathione S-transferase A2 (Fragment)	上调 Up
8	A0A5A9PVT1	未知 Deleted	上调 Up
9	L8HPR0	缓激肽 Bradykinin	下调 Down
10	A0A5A9QYU8	未知 Deleted	下调 Down
11	L8ICZ3	天冬氨酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.1) Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	上调 Up
12	A0A5A9Q9K0	未知 Deleted	下调 Down
13	A0A5A9QIY6	未知 Deleted	上调 Up
14	L8HXR0	胆固醇侧链裂解酶，线粒体（EC 1.14.15.6） Cholesterol side-chain cleavage enzyme, mitochondrial (EC 1.14.15.6)	上调 Up
15	L8HVE1	EPM2A相互作用蛋白 EPM2A-interacting protein 1	上调 Up
16	L8INV1	肽基脯氨酰顺反异构酶 (EC 5.2.1.8) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	上调 Up
17	A0A5A9R284	未知 Deleted	上调 Up
18	A0A5A9QP43	未知 Deleted	上调 Up
19	A0A5A9Q6B8	未知 Deleted	上调 Up
20	A0A5A9QVH4	未知 Deleted	下调 Down
21	L8IKU4	D-3-磷酸甘油酸脱氢酶 (EC1.1.1.95) D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	上调 Up
22	P00435	谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GPx-1) (EC 1.11.1.9) Glutathione peroxidase 1 (GPx-1) (EC 1.11.1.9)	上调 Up
23	L8HR71	视网膜脱氢酶2 Retinal dehydrogenase 2	下调 Down
24	L8IBL3	氨基肽酶 (EC 3.4.11.-)（片段） Aminopeptidase (EC 3.4.11.-) (Fragment)	上调 Up
25	A0A5A9QJL1	未知 Deleted	上调 Up
26	A0A5A9Q7A9	未知 Deleted	上调 Up
27	A0A5A9Q4N6	未知 Deleted	下调 Down
28	L8HS12	未鉴定的蛋白质（片段） Uncharacterized protein (Fragment)	上调 Up
29	L8IZP3	肾上腺素，线粒体（片段） Adrenodoxin, mitochondrial (Fragment)	上调 Up
30	L8I6P6	非综合征性听力障碍蛋白5样蛋白 Non-syndromic hearing impairment protein 5-like protein	上调 Up
31	L8IL81	α-2-巨球蛋白受体相关蛋白 Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein	上调 Up
32	L8HM51	胰蛋白酶抑制剂（片段） Pancreatic trypsin inhibitor (Fragment)	上调 Up
33	L8HXY3	含有 Ig 样结构域的蛋白质（片段） Ig-like domain-containing protein (Fragment)	上调 Up
34	L8HVF6	硒蛋白 M Selenoprotein M	上调 Up
35	L8HX05	神经元特异性钙结合蛋白海马钙素 Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin	下调 Down
36	A0A5A9QIW4	未知 Deleted	下调 Down
37	L8HVV6	中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	上调 Up
38	A0A5A9QMW0	未知 Deleted	上调 Up

续上表

序号 Number	标识 ID	蛋白名称 Protein names	调节 Regulated
39	L8IS41	E3 UFM1-蛋白连接酶 1 E3 UFM1-protein ligase 1	下调 Down
40	L8HY99	含三部分基序的蛋白质 3 (片段) Tripartite motif-containing protein 3 (Fragment)	下调 Down
41	Q860K0	MHC I 类抗原 (片段) MHC class I antigen (Fragment)	下调 Down
42	A0A5A9QEA2	未知 Deleted	上调 Up
43	L8HU38	含有 Ig 样结构域的蛋白质 (片段) Ig-like domain-containing protein (Fragment)	下调 Down
44	L8I6S3	谷胱甘肽转移酶 (EC 2.5.1.18) (片段) Glutathione transferase (EC 2.5.1.18) (Fragment)	下调 Down
45	A0A5A9QAJ2	未知 Deleted	上调 Up
46	L8HUU8	SRA 茎环相互作用 RNA 结合蛋白, 线粒体 SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	上调 Up
47	L8I2B7	碱性磷酸酶 (EC 3.1.3.1) (片段) Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) (Fragment)	上调 Up
48	A0A5A9QZ00	未知 Deleted	下调 Down
49	A0A5A9Q3H5	未知 Deleted	下调 Down
50	A0A5A9R1T6	未知 Deleted	上调 Up
51	L8HU32	含有 Ig 样结构域的蛋白质 (片段) Ig-like domain-containing protein (Fragment)	下调 Down
52	A0A5A9Q609	未知 Deleted	上调 Up
53	A0A5A9QMW5	未知 Deleted	上调 Up
54	L8IIL6	醌氧化还原酶 PIG3 (片段) Quinone oxidoreductase PIG3 (Fragment)	上调 Up
55	L8IUD0	含有 EGF 样模块的粘蛋白样激素受体样 1 (片段) EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (Fragment)	上调 Up
56	L8IC02	ER 腔蛋白保留受体 (片段) ER lumen protein-retaining receptor (Fragment)	上调 Up
57	L8HUM8	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶 (EC 2.7.1.153) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (EC 2.7.1.153)	下调 Down

2.2 总蛋白主成分分析

利用妊娠期组的 3 个样本和产后乏情期组的 3 个样本中定量蛋白强度数据进行主成分分析, 如图 1 所示。结果表明, 2 组样本分布在二维空间不同的区域, 区分明显, 显示妊娠期组和产后乏情期卵巢蛋白之间的分离趋势。

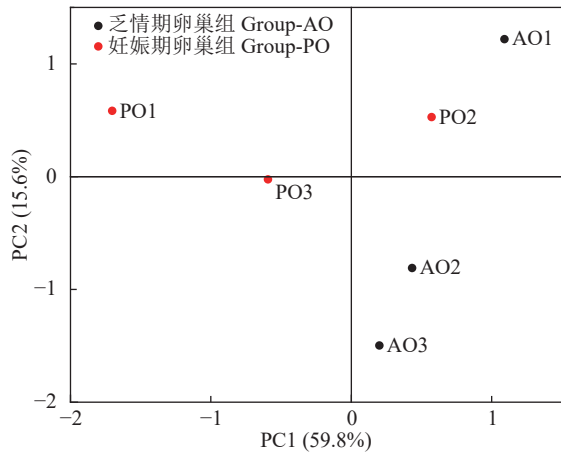


图 1 总蛋白主成分分析
Fig. 1 Principal component analysis on all proteins

2.3 差异表达蛋白热图分析

为了进一步显示妊娠期组和产后乏情期组之间的差异, 将 57 个差异表达蛋白利用层次聚类分析绘制了热图, 如图 2 所示。图中红色表示蛋白表达量高, 绿色表示蛋白表达量低。系统聚类分析表明, 2 组样本差异蛋白区分明显, 表达模式存在差异,

组内重复性良好, 且聚类模式与主成分分析结果一致。

2.4 差异表达蛋白 COG 分析

差异表达蛋白 COG (Clusters of orthologous groups) 分析结果 (图 3) 显示, 下调差异表达蛋白功能集中于核苷酸运输与代谢。上调差异表达蛋白功能集中于细胞周期、氨基酸转运与代谢、辅酶的运输和代谢、翻译与核糖体结构、无机离子转运与代谢和防卫机制等方面。差异表达蛋白在能源生产与转化、脂质运输与代谢、蛋白质周转、次生代谢物合成转运代谢等功能中均存在上调和下调差异表达蛋白, 且以上调表达为主。

2.5 差异表达蛋白 GO 分析

差异表达蛋白 GO (Gene ontology) 分析结果 (图 4) 显示, 各有 221 个蛋白注释到生物学过程, 主要集中在代谢、繁殖、生殖等生物过程; 242 个蛋白注释到亚细胞组分, 主要涉及细胞器成分、高分子复合物、膜部件等细胞组分; 77 个蛋白注释到分子功能, 主要参与转运活性等分子功能。

2.6 差异表达蛋白 KEGG 分析

差异表达蛋白 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 分析结果 (图 5) 显示, 妊娠组与产后乏情组卵巢组织 57 个差异表达蛋白共参与到 27 条 KEGG 信号通路。其中与繁殖激素分泌调控有关的信号通路有卵巢类固醇生成和甾类激素生物合成; 与能量代谢有关的信号通路有氨基酸的生物合成、

碳代谢和谷胱甘肽的合成；与卵泡发育有关的信号通路有 PI3K-Akt 信号通路。差异表达蛋白 KEGG 分析结果提示牦牛产后乏情与生殖激素异常分泌调控、能量代谢失衡状态和卵泡不正常闭锁有着密切的关系。

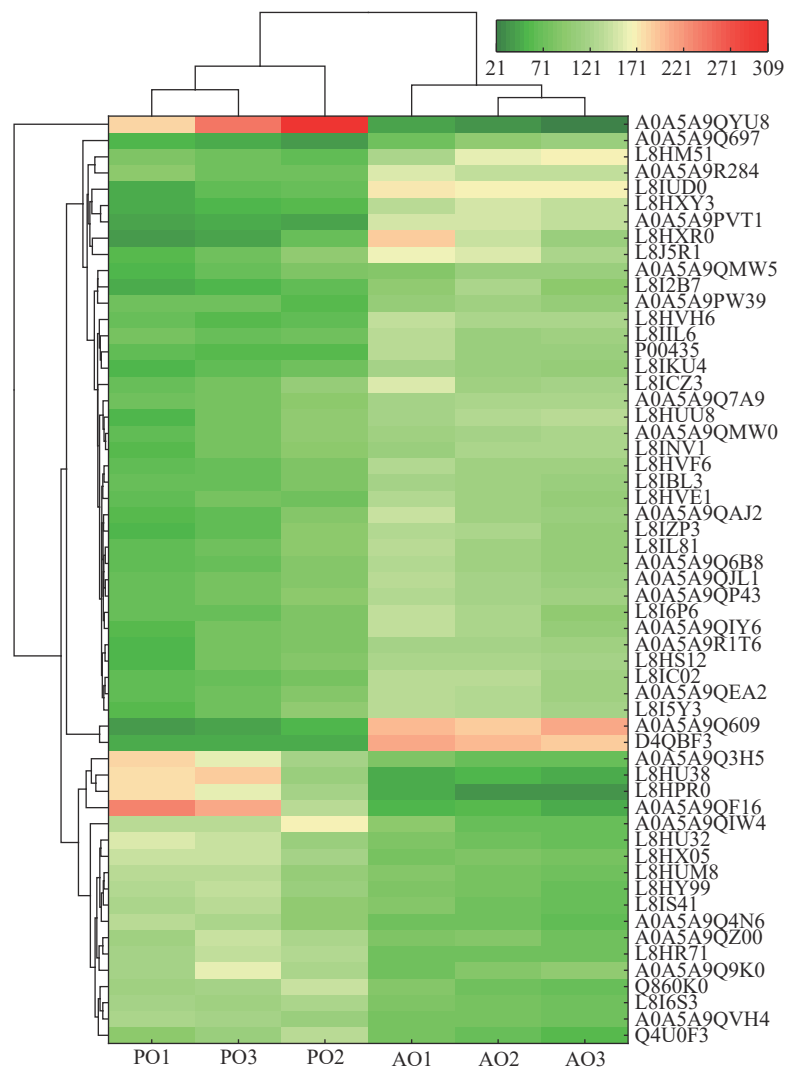


图 2 差异表达蛋白热图

Fig. 2 Heat map of DEPs

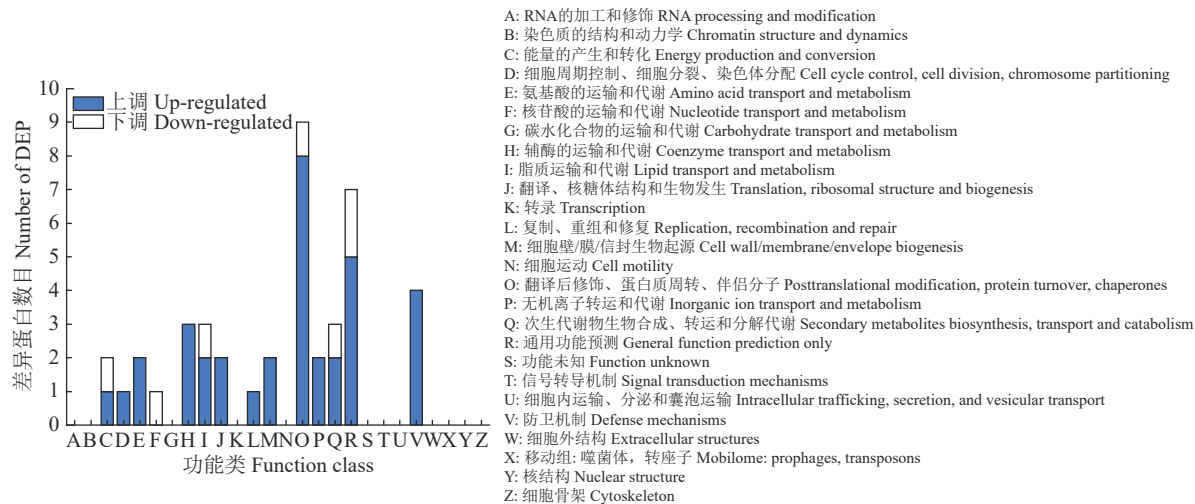


图 3 差异表达蛋白 COG 分析

Fig. 3 COG analysis on DEPs

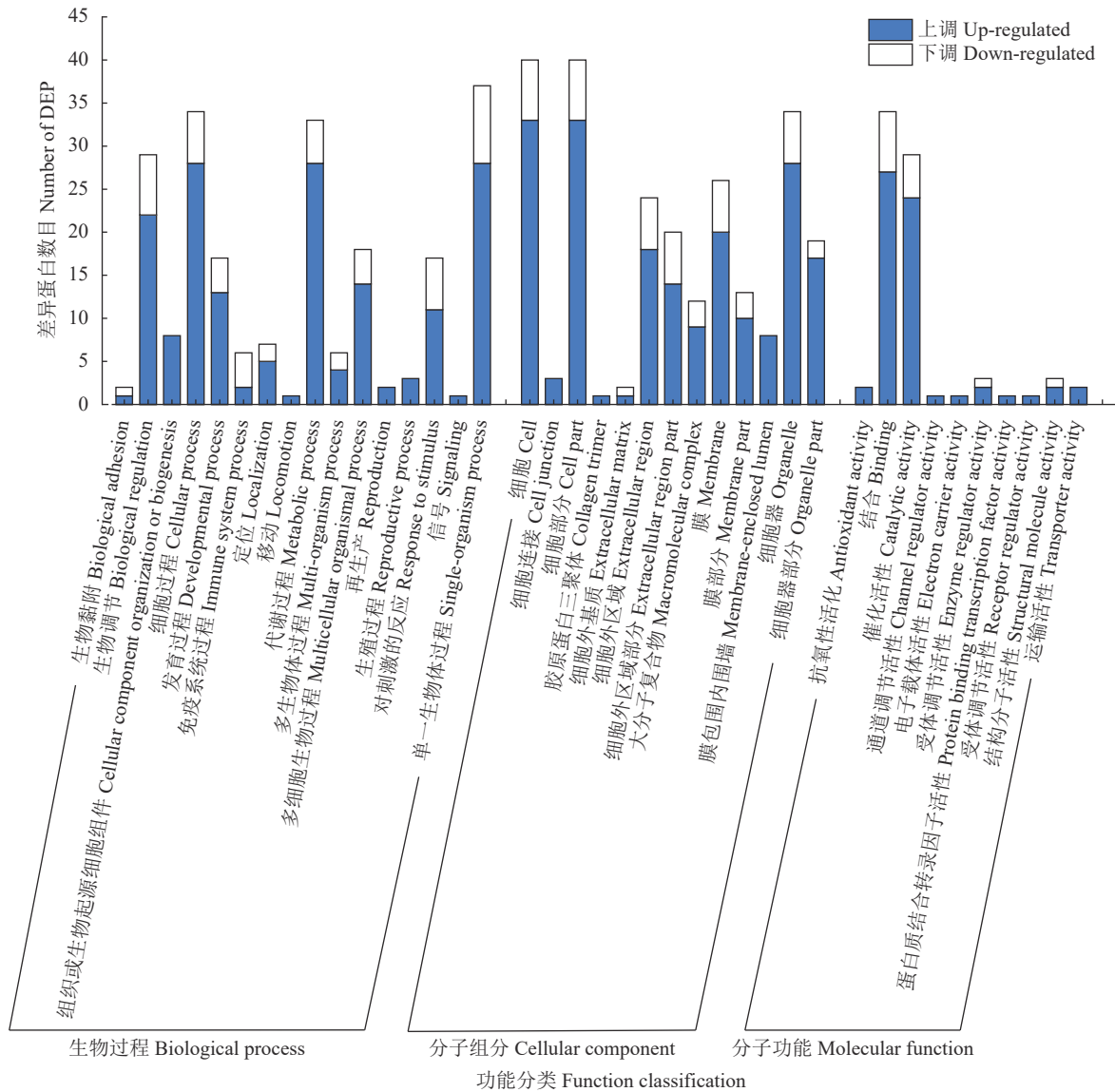


图 4 差异表达蛋白 GO 分析

Fig. 4 GO analysis on DEPs

3 讨论

3.1 牦牛生殖激素分泌的调节

产后乏情期胆固醇侧链裂解酶 (Cytochrome P450 side chain cleavage enzyme, P450scc)、肾上腺素 (Adrenaline)、线粒体 (Mitochondrion) 较妊娠期表达上调, 通过 KEGG 差异蛋白代谢通路分析发现 P450scc 通过参与卵巢类固醇生成、甾类激素生物合成和细胞色素 P450 生物代谢过程。胆固醇是体内合成的所有类固醇激素的初始底物^[16], 牦牛性类固醇激素合成的第一步是肾上腺线粒体 P450scc 催化胆固醇转化为孕烯醇酮^[17, 18], 生成的孕烯醇酮可作为底物, 通过下游酶形成孕激素、雄激素和雌激素^[19]。牦牛乏情期 P450scc、Adrenaline 和 mitochondrion 表达上调, 加强了孕烯醇酮合成分泌。有研究发现,

母牛产后乏情期雌二醇 (Estradiol, E₂) 含量较妊娠期变化不大且处于较低水平, 但孕酮 (Progesterone, P₄) 含量升高^[20], 因此推断孕烯醇酮作为激素原主要用于 P₄ 的合成。P₄ 是调节卵巢机能的重要激素^[21], 其调节作用具有浓度依赖性, 低浓度能够促进卵泡发育, 高浓度时反而对卵泡的发育有抑制作用^[22]。促黄体素 (Luteinizing hormone, LH) 脉冲频率增加能够加强 E₂ 的分泌进而诱导 LH 峰出现和排卵发生^[23], 但 P₄ 则能抑制 LH 的脉冲频率^[24]。因此, 产后乏情期, 高浓度 P₄ 足以将 LH 脉冲频率降低到一定程度, 从而抑制卵泡波的出现, 使得牦牛卵泡处于静止时期, 卵泡波不能正常发育和排卵, 进而诱发乏情的产生。

同时, 有研究发现缓激肽 (Bradykinin, BK) 和缓激肽 B2 (Bradykinin B2 receptor, BKB2) 受体在发

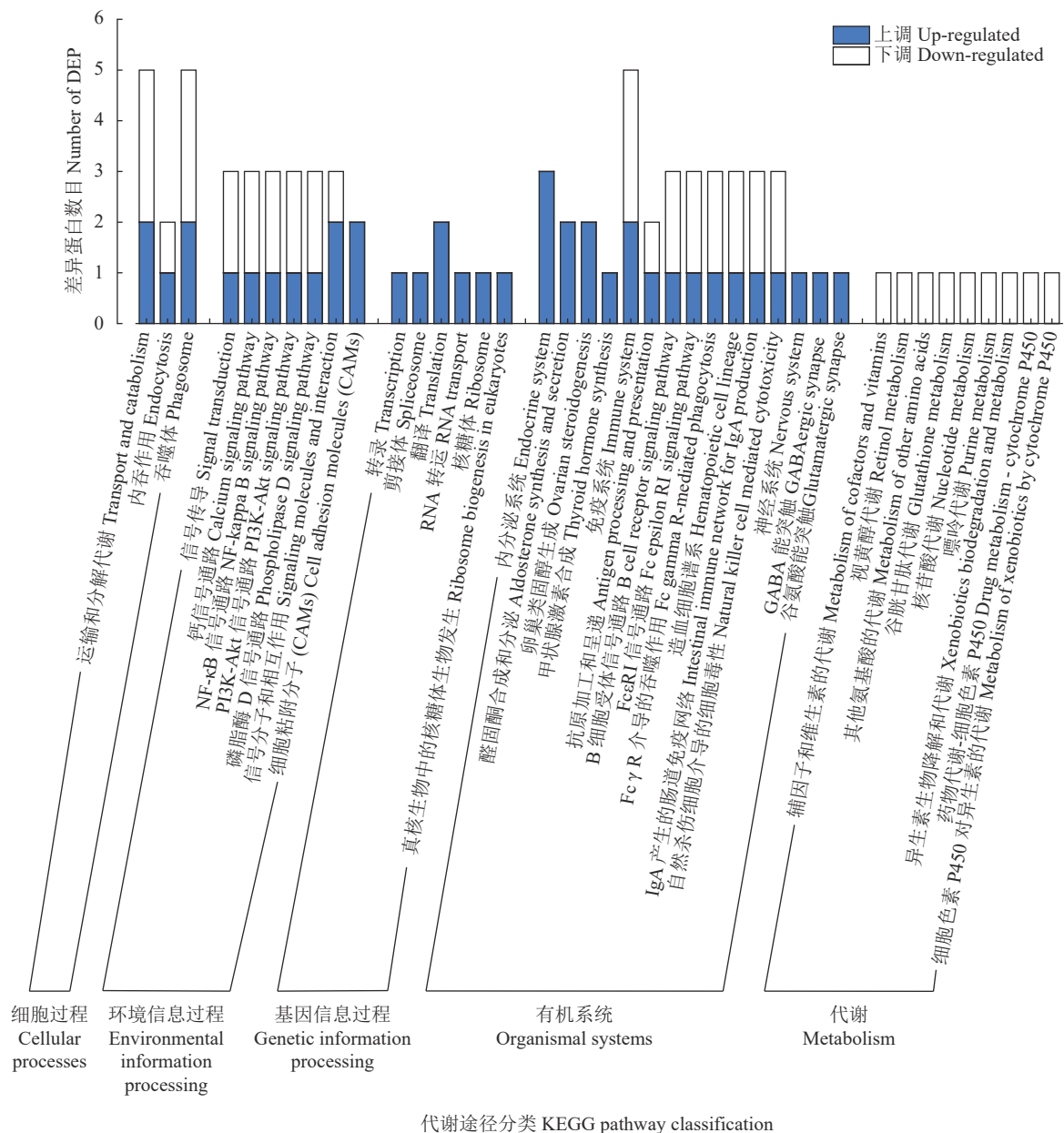


图 5 差异表达蛋白 KEGG 分析
Fig. 5 KEGG analysis on DEPs

情期前高表达，在发情期间急剧下降，并且推测变化与 LH 的释放有关，证明 BK 和 BKB2 的水平与发情周期正相关^[25]。本试验中，产后乏情期 BK 较妊娠期表达下调，表明 BK 在牦牛产后乏情病理过程中也发挥了一定的作用。

3.2 牦牛生殖周期的能量平衡

产后乏情期谷胱甘肽过氧化物酶 1 (Glutathione peroxidase 1, GSH-P1)、谷胱甘肽 S-转移酶 A2 (Glutathione S-transferase A2, GSTA2) 和天冬氨酸转氨酶 (Aspartate amino transferase, AST) 较妊娠期表达上调，谷胱甘肽转移酶 (Glutathione transferase, GST) 较妊娠期表达下调。通过 KEGG 差异蛋白代

谢通路分析发现 GSH-P1、GSTA2、GST 参与 GSH 代谢。草食动物小肠内食源性外源氨基酸的生物吸收是依靠 GSH 合成与分解时利用 γ -谷氨酰基循环实现的，其吸收方式为主动转运^[26, 27]。GST 可催化 GSH 形成含 GSH 的结合物，结合物经消化道排出体外，产后乏情期 GST 表达下调可通过减少 GSH 的排出以加强 γ -谷氨酰基循环，提高牦牛对饲草中外源氨基酸的吸收能力，继而减缓代谢的负平衡状态。AST 参与氨基酸的分解供能的开始阶段，其在产后乏情期表达上调，表明牦牛在产后糖代谢供能不足的情况下，更多的氨基酸通过转氨基作用转化为丙酮酸，进而参与三羧酸循环来弥补机体糖储量不足

造成的能量负平衡。能量负平衡状态下机体优先从繁殖中转移营养能量^[28],并开始通过脂肪代谢和蛋白质代谢提供所需能量,这一状态容易诱发以卵巢静止为主的乏情过程^[29]。有研究发现,牦牛在能量负平衡的状态下其生殖激素分泌模式会发生一定改变^[30],机体以降低自身代谢和增大存活几率为目的,生殖激素分泌减少,最终也会导致牦牛较长时间不发情。

3.3 牦牛卵巢原始卵泡激活

产后乏情期磷脂酰肌醇-3-激酶蛋白(Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)较妊娠期表达下调,并且通过 KEGG 差异蛋白代谢通路分析发现 PI3K 参与 PI3K/AKT (Protein kinase B) 信号通路。PI3K/AKT 细胞凋亡信号通路是体内的基础信号通路^[31],对卵巢休眠^[32]、初始卵泡激活^[33]有重要意义,卵泡激活便是基于 PI3K-AKT 信号通路实现的^[34]。原始卵泡是雌性哺乳动物繁殖的基本功能单位^[35]。进入卵泡池中的原始卵泡则有助于内分泌和排卵,并促进雌性生育^[36]。因此,原始卵泡的休眠、死亡和激活之间的平衡对于维持适当的生殖寿命^[37]和调控生殖进程极其重要^[38]。PI3K-AKT 信号通路中,AKT 的激活导致通路下游分子磷酸化,使得卵泡激活^[39]。本研究中,乏情期差异蛋白 PI3K 表达下降,造成 PI3K/AKT 信号通路负调控,其对于牦牛产后原始卵泡闭锁、退化以致乏情的产生具有一定的因果关系。

在本研究中还发现乏情期较妊娠期之间的其他差异表达蛋白还广泛存在于不同功能通路中,如次生代谢物的生物合成运输与分解、一般功能预测、碳代谢、复制重组和修复以及细胞吞噬等过程中,表明牦牛的产后乏情在分子层面上也可能与之相关,但具体如何影响,需要后期更深入的研究。

4 结论

本研究利用蛋白质组学技术筛选分析牦牛妊娠期和产后乏情期卵巢组织间的差异蛋白,发现牦牛产后乏情的出现与差异表达蛋白 BK、P450scc 参与卵巢类固醇激素生成;GSH-P1、GSTA2、GST 和 AST 参与氨基酸转运与蛋白质代谢;PI3K 参与 PI3K-Akt 细胞凋亡有关。本研究有助于更好地分析理解牦牛妊娠分娩后易乏情的生理变化规律,对于深入研究牦牛妊娠期和产后乏情期卵巢的生理特性和揭示产后乏情期关键生物因子具有一定参考价值。

参考文献:

[1] 刘敏清,何翊阔,潘阳阳,等. HSP27基因在牦牛卵母细胞和体外早期胚胎中的表达[J]. 核农学报, 2021, 35 (12): 2716-2723.

LIU M Q, HE H H, PAN Y Y, et al. Expression of HSP27 gene in yak oocytes and early embryos in vitro [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35 (12): 2716-2723. (in Chinese)

[2] 赵寿保,武甫德,裴杰,等. 牦牛提前发情调控技术的研究[J]. 中国牛业科学, 2018, 44 (3): 34-36.

ZHAO S B, WU F D, PEI J, et al. Study on technology of early Oestrus control in yak [J]. *China Cattle Science*, 2018, 44 (3): 34-36. (in Chinese)

[3] NASCIMENTO T, SOARES LOPES E Jr, DE SOUZA MIRANDA M, et al. Factors affecting postpartum ovarian activity of goats in tropical semi-arid region [J]. *Revista De La Facultad De Ciencias Agrarias UNCuyo*, 2021, 53 (1): 330-345.

[4] 季美超,付斌,张养军. 基于质谱的蛋白质组学方法新进展[J]. 质谱学报, 2021, 42 (5): 862-877.

JI M C, FU B, ZHANG Y J. Recent progress of analytical methods of proteomics based on mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2021, 42 (5): 862-877. (in Chinese)

[5] 付莉霞,程子倩,王洪,等. 基于质谱的血液蛋白质组学:血液学研究的新焦点[J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44 (1): 204-213.

FU L X, CHENG Z Q, WANG H, et al. MS-based blood proteomics: Emerging research focus in hematology [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2022, 44 (1): 204-213. (in Chinese)

[6] BHATTACHARYA T. Controlling mixing and segregation in time periodic granular flows[D]. Pittsburgh: University of Pittsburgh, 2011.

[7] 海超. 褪黑素对牛冷冻保存精子的蛋白质组学研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2020.

HAI C. Proteomics study on the role of melatonin in frozen bovine sperm[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2020. (in Chinese)

[8] 赵国顺. 天祝白牦牛和双峰驼卵泡发育过程中卵泡液差异蛋白质组学研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.

ZHAO G S. Comparative proteomics studies of follicular fluid during the different periods of follicular development in Tianzhu white yak and Bactrian camel[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2013. (in Chinese)

[9] 阮崇美. 不同发育期白牦牛睾丸蛋白质组学分析及生殖相关候选基因HSP60生物学研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.

RUAN C M. Proteomic analysis of white yak testis in different developmental stages and reproductive candidate gene HSP60 biology research[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017. (in Chinese)

[10] PEI J, SONG R D, BAO P J, et al. Differential proteomic analysis demonstrates follicle fluid participate immune reaction and protein translation in yak [J]. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18 (1): 34.

[11] ZHAO X X. A proteomics study of Tianzhu white yak ovary during estrus and pregnancy [J]. *Pakistan Veterinary Journal*, 2014, 34 (1): 87-91.

[12] HUO S D, CHEN Z, LI S Y, et al. A comparative transcriptome and proteomics study of post-partum ovarian cycle arrest in yaks (*Bos grunniens*) [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2022, 57 (3): 292-303.

[13] 张寿,王应安,贾荣莉,等. 高原牦牛卵巢及卵泡的形态观测[J]. 中

- 国兽医科技, 2001, 31 (6): 32-33.
- ZHANG S, WANG Y A, JIA R L, et al. Morphological observation of ovary and follicle in plateau yak [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2001, 31 (6): 32-33. (in Chinese)
- [14] 李晨雷, 齐昆龙, 刘鉴珂, 等. 大白母猪发情期前后唾液蛋白组学分析 [J]. *中国农业大学学报*, 2022, 27 (2): 98-109.
- LI C L, QI K L, LIU Y K, et al. Salivary proteomics analysis of large white sows before and after estrus [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2022, 27 (2): 98-109. (in Chinese)
- [15] 纪万里, 王婷婷, 安骞, 等. 基于定量蛋白质组学技术探究半夏泻心汤对慢性胃炎大鼠影响的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (9): 1-8.
- JI W L, WANG T T, AN R, et al. Mechanism of Banxia Xiexintang on rats with chronic gastritis based on quantitative proteomics [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, 27 (9): 1-8. (in Chinese)
- [16] EFIMOVA V S, ISAEVA L V, OREKHOV P S, et al. Using a viral 2A peptide-based strategy to reconstruct the bovine P450scc steroidogenic system in *S. cerevisiae*: Bovine P450scc system expression using 2A peptides [J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 325: 186-195.
- [17] ZHU H B, REN Q L, YAN Z Y, et al. Human HAND1 inhibits the conversion of cholesterol to steroids in trophoblasts [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2021.
- [18] ONO K, YANO A, ISHIMURA K. Effect of peripherally derived steroid hormones on the expression of steroidogenic enzymes in the rat choroid plexus [J]. *The Journal of Medical Investigation: JMI*, 2021, 68 (3.4): 238-243.
- [19] 邹鹏达. LH诱导山羊卵泡膜细胞Akt磷酸化及对雄激素生成的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- ZOU P D. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and its effect on androgen production in goat theca cells [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016. (in Chinese)
- [20] 美日阿依·买合买提, 朱梦婷, 牟健, 等. 舍饲哈萨克母羊在乏情期补饲精料对其诱导发情效果及相关生殖激素变化规律的研究 [J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2020, 38 (6): 686-690.
- MEHRAY·MAIHEMAITI, ZHU M T, MU J, et al. Study on the effects of supplementary feeding of feed during non-estrus period induces estrus and reproductive hormone changes in Kazak sheep [J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2020, 38 (6): 686-690. (in Chinese)
- [21] 王洋洋. FSH对牛体外有腔卵泡膜细胞和颗粒细胞类固醇激素合成相关基因表达的影响 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- WANG Y Y. Effects of FSH on gene expression related to steroidogenesis in bovine follicles cultured in vitro [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019. (in Chinese)
- [22] 孙金莉, 颜晓红, 林莉, 等. 体外受精方案晚卵泡期不同浓度孕酮干预对妊娠结局的影响 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2019, 39 (10): 803-809.
- SUN J L, YAN X H, LIN L, et al. Influence of the different concentration of progesterone intervention on pregnancy outcomes in late follicular phase of gonadotropin-releasing hormone agonist cycles of *in vitro* fertilization [J]. *Chinese Journal of Reproduction and Contraception*, 2019, 39 (10): 803-809. (in Chinese)
- [23] GREISEN S, LEDET T, OVESEN P. Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells [J]. *Human Reproduction*, 2001, 16 (10): 2061-2065.
- [24] RYTELEWSKA E, KIEZUN M, KISIELEWSKA K, et al. Chemerin as a modulator of ovarian steroidogenesis in pigs: An *in vitro* study [J]. *Theriogenology*, 2021, 160: 95-101.
- [25] 段宇, 夏成, 吴凌, 等. 产后乏情奶牛血浆生化参数的变化 [J]. *中国兽医杂志*, 2014, 50 (4): 26-28.
- DUAN Y, XIA C, WU L, et al. Alterations of plasma metabolites and hormones in postpartum anestrus cows [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50 (4): 26-28. (in Chinese)
- [26] CONNOLLY L, BRIGGS E. Acquired pyroglutamic acidemia in a critically ill patient with chronic paracetamol use: A case report [J]. *SAGE Open Medical Case Reports*, 2022, 10: 2050313X211068561.
- [27] 彭影琦. L-茶氨酸对肠道吸收与转运氨基酸的调节作用及机制 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
- PENG Y Q. Regulation and mechanism of L-theanine on intestinal absorption and transport of amino acids [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [28] ZHANG J, WANG G, ZHAO C, et al. 1H NMR plasma metabolomic profiling of ovarian quiescence in energy balanced postpartum dairy cows [J]. *Veterinary Quarterly*, 2018, 38 (1): 47-52.
- [29] UDDIN A M, ATIKUZZAMAN M, HOSSAIN M K. Postpartum cyclicity of Holstein-Friesian crossbred cows shows relation with serum biochemical profiles during 45-60 days postpartum [J]. *Pakistan Veterinary Journal*, 2019, 40 (2): 257-260.
- [30] GO N. Regulation of primordial follicle formation, dormancy, and activation in mice [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2021, 67 (3): 189-195.
- [31] 姜凤丽, 王晓滨, 宗婧, 等. PI3K-Akt/mTOR信号通路对卵巢早衰相关性研究进展 [J]. *黑龙江科学*, 2019, 10 (2): 50-51.
- JIANG F L, WANG X B, ZONG J, et al. Research progress on the correlation between PI3K-Akt/mTOR signaling pathway and premature ovarian failure [J]. *Heilongjiang Science*, 2019, 10 (2): 50-51. (in Chinese)
- [32] 胡小靖. Mfn2在PCOS大鼠卵巢的表达及其对大鼠卵泡发育的影响与机制的初步探讨 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- HU X J. Expression of Mitofusin2 in pcos rat and its mechanism of effect on rat follicle development [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2014. (in Chinese)
- [33] 李德保, 周莉, 孙祖越. 早发性卵巢功能不全相关信号通路研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30 (2): 121-127.
- LI D B, ZHOU L, SUN Z Y. Research advances of premature ovarian insufficiency-related signaling pathways [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2020, 30 (2): 121-127. (in Chinese)
- [34] SANTOS J M S, LINS T L B G, BARBERINO R S, et al. Kaempferol promotes primordial follicle activation through the

- phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured *in vitro* [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2019, 86 (3) : 319–329.
- [35] ZHANG T, HE M, ZHAO L, et al. HDAC6 regulates primordial follicle activation through mTOR signaling pathway [J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12: 559.
- [36] 张焱, 张华. 哺乳动物卵巢卵泡发育调控机制研究进展 [J]. 生理学报, 2020, 72 (1) : 63–74.
- ZHANG Y, ZHANG H. Research advances in regulating mechanisms of mammalian ovarian folliculogenesis [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2020, 72 (1) : 63–74. (in Chinese)
- [37] 梁菁媛, 邓彦飞, 赵易敏, 等. 哺乳动物原始卵泡体外培养与激活调控研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55 (7) : 5–9.
- LIANG J Y, DENG Y F, ZHAO Y M, et al. Research progress on *in vitro* culture and activation regulation of mammalian primordial follicles retraction [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2019, 55 (7) : 5–9. (in Chinese)
- [38] WATANABE R, SASAKI S, KIMURA N. Activation of autophagy in early neonatal mice increases primordial follicle number and improves lifelong fertility [J]. *Biology of Reproduction*, 2019, 102 (2) : 399–411.
- [39] CORDEIRO C N, CHRISTIANSON M S, SELTER J H, et al. *In vitro* activation: A possible new frontier for treatment of primary ovarian insufficiency [J]. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif)*, 2016, 23 (4) : 429–438.

(责任编辑: 张梅)