

奶牛早期妊娠阶段外周血中 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因的表达

程 蕾 王定发 向 敏 胡修忠 刘晓华 凌明湖 夏 瑜

武汉市农业科学院畜牧兽医科学研究所, 武汉 430208

摘要 为研究干扰素刺激基因 *IFITM1* 和 *RSAD2* 在奶牛早期妊娠阶段外周血中的表达规律, 于人工授精后 0、14、18、21 和 28 d 采集奶牛外周血, 利用荧光定量 PCR 检测 *IFITM1* 和 *RSAD2* 的相对表达量, 采用化学发光法同步检测血清中孕酮浓度; 并深入分析自然发情和同期发情 2 种状态下青年母牛外周血中 *RSAD2* 基因的相对表达及其在 18 d 和 21 d 外周血白细胞亚类(淋巴细胞、NK 细胞、单核细胞)中的相对表达。结果表明, 妊娠牛与空怀牛血清孕酮在 21 d 和 28 d 呈显著差异。人工授精后 14 d 和 18 d *IFITM1* 基因在妊娠牛与空怀牛中都显著下调, 但在空怀牛与妊娠牛间差异不显著。妊娠牛外周血中 *RSAD2* 于 21 d 显著上调; 18 d 时, *RSAD2* 在妊娠青年牛外周血中的表达量显著高于空怀牛。进一步分析结果表明: 自然发情条件下, 妊娠牛外周血中 *RSAD2* 表达量显著高于空怀牛, 同期发情条件下该基因在趋势上与之类似但统计学上不显著。人工授精后 18 d 和 21 d, *RSAD2* 在妊娠牛与空怀牛外周血淋巴细胞、NK 细胞和单核细胞中的表达均无显著差异。研究提示: *IFITM1* 不适合用于奶牛早期妊娠诊断; 利用 *RSAD2* 的相对表达量可望对青年牛在 18 d 做出早期诊断, 具体判别标准有待于进一步扩群分析。

关键词 奶牛; *IFITM1*; *RSAD2*; 妊娠诊断; 基因表达

中图分类号 S 823.9⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)03-0089-08

早期妊娠诊断是通过尽早发现空怀牛并对其进行发情处理和再次人工授精, 可缩短产犊间隔、减少空怀导致的经济损失。比较常见的妊娠诊断方法有直肠触诊和超声波检查, 分别于人工授精后 35 d 和 26 d 进行诊断^[1], 目前在生产上尚未广泛推广的牛妊娠相关蛋白(PAG)ELISA 试剂盒能在妊娠后 28 d 做出较为可靠的判断^[2]。如果人工授精后 18~20 d 能排查出空怀牛, 即可对其进行快速的同期发情处理, 在第 21~23 天进行复配, 减少空怀天数, 提高奶牛的繁殖效率^[3]。牛早期胚胎发育的过程中, 母体妊娠识别发生在受精后 14~18 d^[4-5], 在此阶段, 孕体合成和分泌干扰素- τ (IFN- τ)。IFN- τ 一方面作用于子宫, 抑制 PGF_{2 α} 的释放、阻止黄体溶解和维持孕酮的分泌; 另一方面进入系统循环, 通过上调母体免疫细胞中干扰素刺激基因的表达量, 增加对感染病毒后的抵抗力, 促进母体系统对胎儿的识别以及胚胎的定植^[6]。已有研究表明, 利用定量 PCR

技术检测白细胞中干扰素刺激基因的表达水平可以进行妊娠诊断^[7-8], 据此, 便有望能在奶牛人工授精后一个情期内诊断出空怀牛。

干扰素诱导的跨膜蛋白 1 (interferon-induced transmembrane protein 1, *IFITM1*) 是干扰素诱导跨膜蛋白家族的成员之一^[9], 具有调节细胞增殖与分化的功能。*IFITM1* 启动子区域含有干扰素刺激反应元件, 干扰素可诱导 *IFITM1* 基因在 U937、Jurkat、K562 等细胞中表达, 与细胞的粘附、增殖、肿瘤免疫及抗病毒有关。转录组学研究证实: *IFITM1* 在牛孕体着床之前参与胎儿与母体之间的免疫调节, 在子宫内膜组织中显著上调表达^[10]。Northern 杂交结果还表明: 妊娠 15 d 和 18 d 牛子宫内膜 *IFITM1* 基因显著上调表达^[11]。*RSAD2* (radical S-adenosyl methionine domain containing 2, *RSAD2*) 是 I 型干扰素诱导产生的细胞质抗病毒蛋白, 机体在病毒感染状态下 *RSAD2* 可对干扰素

收稿日期: 2014-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201766); 武汉市农科院人才发展专项(CX201240); 武汉市农科院青年英才计划项目(YC201201)
程 蕾, 畜牧师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖, E-mail: chenglei_011@126.com

产生应答,进而限制病毒复制并调节获得性免疫^[12-13]。研究证实,反刍动物妊娠早期 IFN- τ 可诱导子宫内膜组织中 *RSAD2* 基因上调表达^[14-15],另外,其抗病毒作用可促进细胞因子分泌,利于孕体存活与发育。采用 RNA-seq 技术对牛妊娠 16 d 时孕体和子宫内膜 2 种组织的转录组分析发现,*RSAD2* 基因仅在子宫内膜组织中表达,且其表达量在所有子宫内膜组织特异性表达基因中位居前列^[16]。同处于发情周期中的母羊相比,妊娠 14~20 d 母羊 *RSAD2* 基因在子宫内膜腺体、间质和免疫细胞中表达量显著增加^[17]。总之,干扰素刺激基因 *IFITM1* 和 *RSAD2* 在妊娠识别阶段母体子宫中的表达量具有显著变化,可见这 2 个基因在奶牛胚胎发育过程中发挥了重要的作用。尽管母体早期妊娠免疫应答过程中可系统激活干扰素刺激基因,但尚不清楚 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因在外周血中(白细胞)是否也存在与子宫组织中类似的表达规律,它们能否作为奶牛妊娠诊断的有效候选标志物研究方面尚未见报道。

本研究以中国荷斯坦奶牛为试验牛群,分别于人工授精后 0、14、18、21 和 28 d 采集外周血,根据直肠检查结果并结合血清孕酮含量,将试验奶牛分为妊娠牛和空怀牛,用荧光定量 PCR 方法检测 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因在不同胎次和不同发情诱因奶牛(包括妊娠牛和空怀牛)外周血中的表达变化规律,同时通过分离人工授精后 0、18 和 21 d 奶牛外周血中的淋巴细胞、NK 细胞和单核细胞,进一步检测 *RSAD2* 基因在不同白细胞亚类中的表达量,旨在为深入揭示早期妊娠阶段 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因的表达规律以及建立分子妊娠诊断方法提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物及处理方法

第 1 批次:武汉市金旭畜牧科技发展有限公司产后 60 d 以上不发情、产后配 1~3 次仍未受胎奶牛和达到配种条件尚未发情的青年牛共 12 头,采用生源 2+1(宁波三生药业有限公司)对奶牛实施同期发情和定时输精;第 2 批次:武汉市惠尔康扬子江乳业有限公司奶牛场体况一致的青年牛 19 头,10 头自然发情青年牛按照正常程序进行人工授精,9 头达到配种条件但尚未发情的青年牛采用同期发情技术,方法同第 1 批次;第 3 批次:武汉市惠尔康扬

子江乳业有限公司青年牛 9 头,全部采用同期发情和定时输精程序,方法同第 1 和第 2 批次。第 1 批次试验奶牛用于分析早期妊娠阶段外周血中 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因的表达规律,第 2 批次和第 3 批次试验奶牛用于进一步分析 *RSAD2* 基因在不同发情诱因和不同白细胞亚类中的表达规律。

1.2 样品采集

第 1 批次和第 2 批次试验奶牛分别于人工授精后 0、14、18、21 和 28 d 尾静脉采集血液 5~10 mL,一部分血液放入 EDTAK₂ 自动定量静脉采血管(武汉致远医疗科技有限公司),2 h 内冷藏送到实验室提取 RNA,于 -80 °C 保存备用;另一部分用于分离血清,5 000 r/min 离心 15 min,收集至 1.5 mL 离心管中,-20 °C 保存。第 3 批次试验奶牛于人工授精后 0、18 和 21 d 采集外周血,2 h 内冷藏运输至实验室后进行白细胞亚类分离和细胞总 RNA 提取。

1.3 试验动物分组

每组试验奶牛于人工授精后 50~60 d 进行直肠检查,根据直肠检查的结果将试验牛分为妊娠牛和空怀牛。其中,第 1 批次:妊娠牛 7 头,空怀牛 5 头。第 2 批次:自然发情妊娠牛 5 头,空怀牛 5 头;同期发情妊娠牛 6 头,空怀牛 3 头。第 3 批次:妊娠牛 5 头,空怀牛 4 头。

1.4 血清样本孕酮含量测定

孕酮测定使用北京西门子医疗诊断设备有限公司生产的孕酮测定试剂盒,严格按照试剂盒使用说明进行操作,孕激素测定的标准曲线范围为 0~60 ng/mL。

1.5 白细胞亚类分离、总 RNA 提取及反转录

采用单核细胞、淋巴细胞和 NK 细胞分离试剂盒(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)分离牛外周血中白细胞亚类。利用 RNAprep pure 血液总 RNA 提取试剂盒或 RNAprep pure 培养细胞总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)分别提取全血或白细胞亚类中总 RNA,具体步骤参照试剂盒说明书进行。利用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo Scientific)分析 RNA 样本浓度与纯度($OD_{260/280} = 1.9 \sim 2.1$);利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,通过质检的样本分装后于 -80 °C 保存备用。反转录采用 RevertAid™ First-Strand cDNA Synthesis kit(Fermentas)进行,每个反应 RNA 用量为 500 ng,具体步骤参照试剂盒说

说明书进行。

1.6 牛 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因的荧光定量 PCR 检测

用于荧光定量 PCR 扩增的预混液 (SYBR® Green Mix) 购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司, 反应体系共 20 μL : 2 \times SYBR® Green 10 μL , 上下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), cDNA 模板 0.3 μL , 最后用

ddH₂O 补至 20 μL 。根据 NCBI 中牛 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因序列设计定量引物, 以牛内参基因 β -Actin 为参照^[8], 详细引物信息见表 1。每个样本重复 3 次, 定量 PCR 实验在罗氏 LightCycler® 480 实时荧光 PCR 仪上进行。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 60 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 58~61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 40 个循环; 熔解曲线及信号采集: 58~95 $^{\circ}\text{C}$, 0.5 $^{\circ}\text{C/s}$, 共 10 s。

表 1 定量 PCR 引物的序列及参数

Table 1 Primer sequences and parameters used for the real-time quantitative PCR

目的基因 Target genes	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Temperature	扩增长度/bp Product size
<i>IFITM1</i>	F: ATCAACATCCGCAGCGACAC R: TCAGGCACTTGGCGGTAGAG	61	184
<i>RSAD2</i>	F: GCTGAAAGAAGCAGGTATGGA R: CGTACTTCTGGAACCACTCT	58	176
β -Actin	F: CTGGACTTTCGAGCAGGAGAT R: GGATGTCTGACGTCACTTC	58	208

1.7 数据分析

定量 PCR 实验采用 ΔCt 法计算基因的相对表达量^[18], 0 d 时各基因的相对表达量校正为 1, 其他时间点的表达量均为 0 d 时表达量的倍数。试验数据用“平均值 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SE}$)”表示, 妊娠牛与空怀牛各时间点基因表达量的差异采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别表示显著和极显著差异水平。

2 结果与分析

2.1 *IFITM1* 和 *RSAD2* 在奶牛人工授精后 0~28 d 外周血中的表达

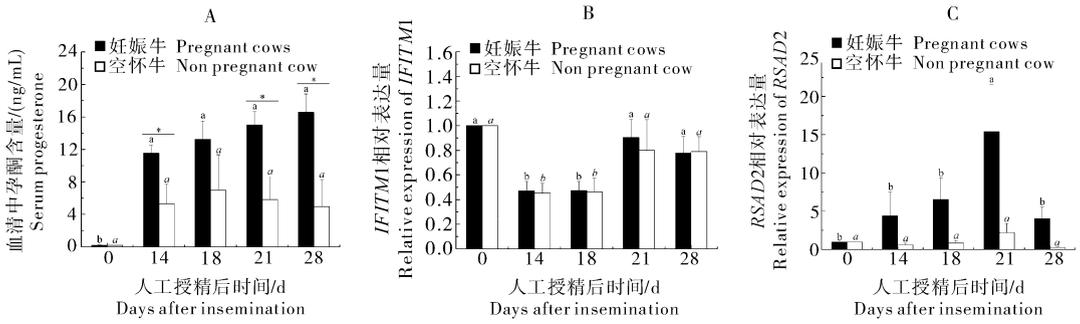
奶牛血清中的孕酮含量以及 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因表达的变化见图 1。妊娠奶牛人工授精后 0~28 d 血清中孕酮的平均含量发生了显著变化 (图 1A)。其中, 人工授精后 14、18、21 和 28 d 妊娠牛血清中孕酮含量均显著高于 0 d ($P < 0.05$), 而空怀牛血清中孕酮含量无显著变化。与空怀牛相比, 在 14、21 和 28 d 妊娠牛血清中孕酮含量差异显著 ($P < 0.05$)。妊娠牛和空怀牛人工授精后 14 d 和 18 d 外周血中 *IFITM1* 基因的表达量均显著低于 0 d ($P < 0.05$), 但该基因在妊娠牛与空怀牛之间 (14 d 和 18 d) 的表达均无显著差异 (图 1B)。人工授精后妊娠牛外周血中 *RSAD2* 基因的表达量持续上升, 21 d 达到峰值后下降, 空怀牛人工授精 0~28 d 外周血中 *RSAD2* 基因的表达量无显著变化 (图 1C)。其中, 人工授精后 21 d, 妊娠牛外周血液中 *RSAD2* 基因的表达量显著高于 0 d ($P < 0.05$), 其他时间点的表达量与 0 d 无显著差异。妊娠牛与

空怀牛间, *RSAD2* 基因在人工授精后同一时间点的表达均无显著差异。

2.2 *RSAD2* 在同期发情和自然发情青年牛人工授精后 0~28 d 外周血中的表达

青年牛人工授精后血清孕酮水平以及 *RSAD2* 基因表达的变化见图 2。青年牛人工授精后妊娠牛和空怀牛血清中的孕酮含量均发生了显著变化 (图 2A), 青年牛人工授精后, 妊娠牛血清中的孕酮含量持续上升, 而且各时间点均显著高于 0 d ($P < 0.05$); 空怀牛血清中孕酮的含量在人工授精后 14 d 和 18 d 均显著高于 0 d ($P < 0.05$), 但是在一个情期结束时, 即人工授精后 21 d 孕酮的含量下降, 与 0 d 无显著差异。与空怀牛相比, 18、21 和 28 d 妊娠牛血清中的孕酮含量差异显著 ($P < 0.05$)。

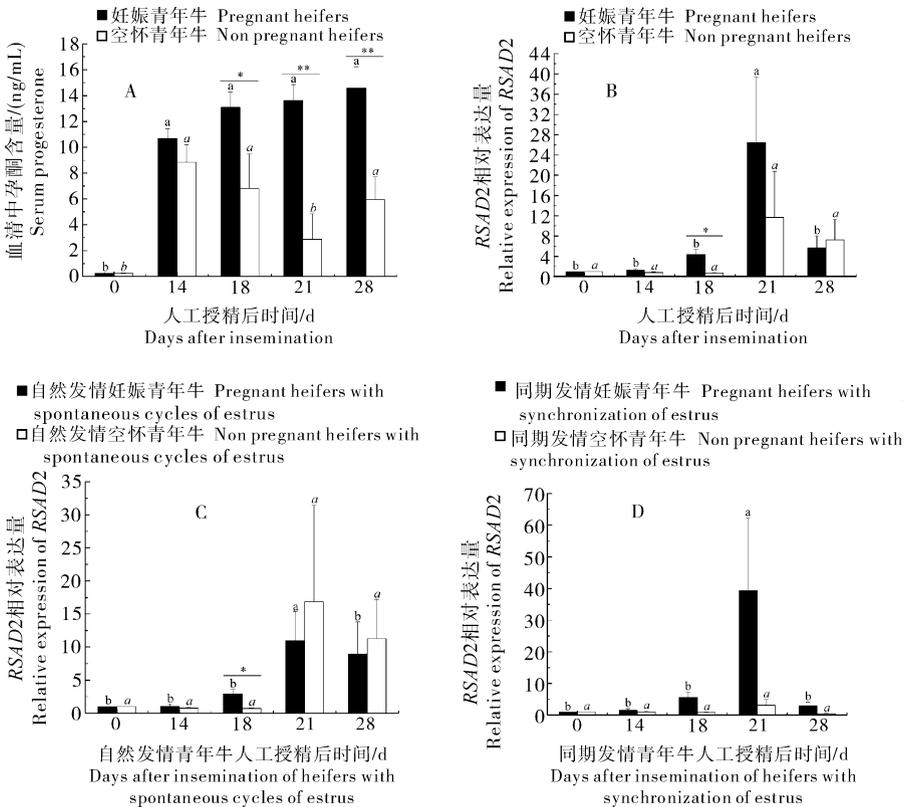
人工授精后 21 d, 妊娠牛外周血液中 *RSAD2* 基因的表达量显著高于 0 d ($P < 0.05$), 其他时间点妊娠牛外周血液中 *RSAD2* 基因的表达量与 0 d 无显著差异; 空怀牛人工授精 0~28 d 外周血中 *RSAD2* 基因的表达量无显著变化。人工授精后 18 d, 妊娠牛血液中 *RSAD2* 基因的表达量显著高于空怀牛 ($P < 0.05$) (图 2B)。自然发情青年牛和同期发情青年牛于人工授精后 0~28 d, 妊娠牛 *RSAD2* 基因的表达趋势一致, 均在 21 d 发生显著变化; 空怀牛 *RSAD2* 基因的表达量均无显著变化 (图 2C 和 2D)。但是, 自然发情的青年牛于人工授精后 18 d, 妊娠牛血液中 *RSAD2* 基因的表达量显著高于空怀牛 ($P < 0.05$); 而同期发情妊娠牛与空怀牛血液中 *RSAD2* 基因的表达量在统计学上差异没有达到显著水平。



不同小写字母表示与妊娠牛人工授精后 0 d 相比, 差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母(斜体)表示与空怀牛人工授精后 0 d 相比, 差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示妊娠牛与空怀牛相比, 差异极显著 ($P < 0.01$); * 表示妊娠牛与空怀牛相比, 差异显著 ($P < 0.05$), 下同。Bars with different letters indicates the significant difference level at $P < 0.05$ compared with the pregnant cows at 0 d after insemination. Bars with different letters (italic) indicates the significant difference at $P < 0.05$ compared with the non-pregnant cows at 0 d after insemination. ** indicates the significant difference level at $P < 0.01$ between the pregnant cows and the non-pregnant cows. * indicates the significant difference level at $P < 0.05$ between the pregnant cows and the non-pregnant; the same as below.

图 1 血清孕酮的平均含量(A)以及 *IFITM1* 和 *RSAD2* 在奶牛外周血中的相对表达量(B 和 C)

Fig. 1 Average serum progesterone (A) and relative gene expressions of bovine *IFITM1* and *RSAD2* in bovine peripheral blood (B and C)



A: 青年牛血清中孕酮的含量 Average serum progesterone; B: *RSAD2* 在青年牛外周血中的相对表达量 Relative gene expression of *RSAD2* in peripheral blood of all the heifers; C: *RSAD2* 在自然发情青年牛外周血中的相对表达量 Relative gene expression of *RSAD2* in peripheral blood of the heifers with spontaneous cycles of estrus; D: *RSAD2* 在同期发情青年牛外周血中的相对表达量 Relative gene expression of *RSAD2* in peripheral blood of the heifers with synchronization of estrus.

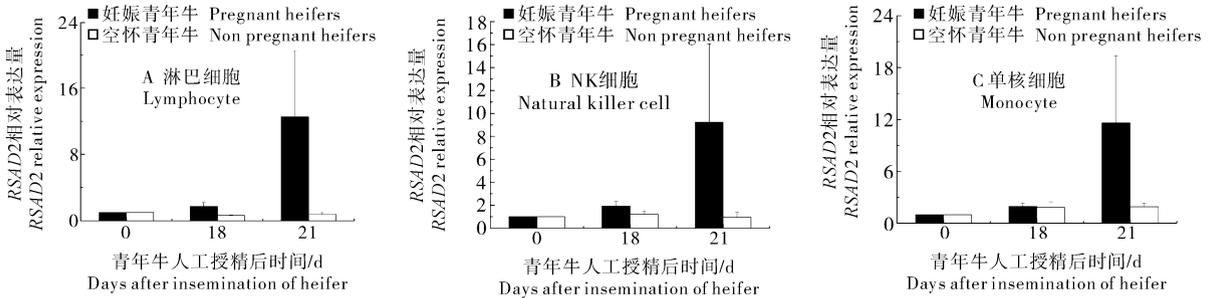
图 2 青年牛血清中的孕酮平均含量和 *RSAD2* 在奶牛外周血液中的相对表达量

Fig. 2 Average serum progesterone and relative gene expressions of *RSAD2* in peripheral blood of heifers

2.3 *RSAD2* 基因在奶牛外周血不同白细胞亚类中的表达

RSAD2 基因在奶牛外周血白细胞亚类中的表达结果显示,人工授精后 18 d 和 21 d,妊娠牛与空怀牛外周血淋巴细胞、NK 细胞和单核细胞中 *RSAD2* 基因的相对表达量无显著差异(图 3);趋势上,人工授精后 18 d 和 21 d 妊娠牛外周血淋巴细胞、NK 细胞和单核细胞中 *RSAD2* 基因呈持续上

调表达;而空怀牛中 *RSAD2* 基因的相对表达量无明显变化。其中,人工授精后 18 d,妊娠牛外周血淋巴细胞、NK 细胞和单核细胞中 *RSAD2* 基因分别上调 1.73、1.94 和 1.95 倍;空怀牛淋巴细胞中 *RSAD2* 基因平均下调 1.57 倍,而空怀牛 NK 细胞和单核细胞中 *RSAD2* 基因分别上调 1.24 倍和 1.82 倍。总体上,妊娠牛与空怀牛 *RSAD2* 基因的表达量在淋巴细胞中差别最大,但不具备统计学意义。



A: 淋巴细胞 Lymphocyte; B: NK 细胞 Natural killer cell; C: 单核细胞 Monocyte.

图 3 *RSAD2* 在奶牛外周血白细胞亚类中的相对表达量

Fig. 3 Relative gene expressions of bovine *RSAD2* in peripheral blood leukocytes subsets

3 讨论

孕酮是维持妊娠的必要条件,主要来源于卵巢的黄体细胞。对于空怀牛,黄体退化发生在发情周期的第 15~19 天,随之,孕酮浓度会迅速下降;而对于妊娠牛,黄体不发生退化,孕酮浓度一直平稳上升。本研究表明人工授精后第 21 天和第 28 天,妊娠牛血清中孕酮含量均显著高于空怀牛,说明试验奶牛血清中孕酮的变化规律与黄体发育保持一致;同时研究发现人工授精后第 14 天或者第 18 天,妊娠牛血清中孕酮含量显著高于空怀牛,提示孕酮含量在奶牛人工授精后一个情期内即发生了显著的变化,能够作为鉴别妊娠牛和空怀牛的依据。但是, Han 等^[19]的报道指出,以奶牛人工授精后 18 d 的孕酮含量来判断妊娠牛与空怀牛,空怀牛的准确率为 100%,妊娠牛的准确率为 47%,只有在人工授精后 21~24 d 才能利用孕酮含量准确判断奶牛是否妊娠。如果能在下一次排卵期之前准确排查出空怀牛,并对其实施同期发情和再次人工授精,可提高奶牛的繁殖效率。因此,挖掘奶牛血液样本中的妊娠生物标记物并开发于一个情期内进行妊娠诊断的技术显得尤为重要。

本研究利用荧光定量 PCR 方法检测奶牛人工授精后血液中 *IFITM1* 基因的表达量,结果表明妊娠牛和空怀牛血液中 *IFITM1* 基因的表达量无显著差异。可能原因是外周血白细胞并不是检测 *IFITM1* 基因表达变化的理想样品。尽管在早期妊娠阶段,子宫内膜组织中该基因上调表达,但是其不同部位的表达量不同。*IFITM1* 基因主要在子宫内腺体上皮细胞中表达,在子宫腔上皮细胞和基质中的表达丰度低^[11],基于 *IFITM1* 基因表达复杂的时空性,本试验中的血液样本尚不能检测到 *IFITM1* 基因表达的变化;之前研究表明,用 *lacZ* 报告基因取代鼠 *IFITM1* 基因编码区域使 *IFITM1* 等位基因丧失功能,之后感染单核细胞增生李斯特氏菌,血液中白细胞亚类包括粒细胞、单核细胞和 B 淋巴细胞等的含量无显著变化,正常的免疫应答也没有受到任何影响,提示 IFN- τ 信号产生的免疫应答并不依赖于 *IFITM1*^[20],因此,干扰素刺激基因 *IFITM1* 可能并非被牛 IFN- τ 系统激活。从另一个方面来讲,IFN- τ 也可能并非唯一的妊娠识别信号,滋养层细胞还可以分泌其他蛋白如 TKDP^[21] 和 PAG^[22],这些蛋白也具有阻止“溶黄”作用,可能与 IFN- τ 一起在妊娠识别时期与妊娠建立过程中发挥

协同作用。最新的研究也指出:经典的干扰素刺激基因最早可能由孕体分泌的前列腺素诱导产生,随着妊娠识别的发生和 $IFN-\tau$ 的分泌,促使这些干扰素刺激基因的表达量上升到峰值^[23]。另外,本研究结果也表明,人工授精后 14 d 和 18 d,妊娠牛和空怀牛血液中的 *IFITM1* 基因的表达量均显著低于 0 d,这可能与该基因在早期胚胎发育过程中的分子生物学功能有关,具体的调控机制有待于进一步研究。

本研究同时对奶牛人工授精后血液中 *RSAD2* 基因的表达进行了分析,结果显示:虽然在第 1 批次试验牛中(不分胎次的情况下)空怀牛与妊娠牛中 *RSAD2* 基因的表达量无显著差异,但是人工授精后 21 d 妊娠牛 *RSAD2* 基因的表达量显著高于 0 d。*RSAD2* 包含 S-腺苷基甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)结构域,可以催化各种反应,包括特殊的甲基化、异构化、成环作用、无氧化和蛋白质残基的形成。胚胎植入前, SAM 蛋白参与子宫内膜细胞中 DNA 前体、维生素、辅助因子、抗生素和除草剂类氨基酸的生物合成和降解途径,有利于孕体的发育与植入^[24]。同时, *RSAD2* 还能在胚胎植入前,特别是在孕体的免疫系统和抗病毒能力尚未发育完善情况下,阻止病毒感染子宫^[17]。研究结果提示:血液中 *RSAD2* 基因的上调表达有利于妊娠识别和早期胚胎的建立。KIZAKI 等^[25] 也发现,日本黑牛×荷斯坦奶牛杂交 F_1 代的经产牛在妊娠 21 d 时,外周血白细胞中 *RSAD2* 的表达量上调 2.33 倍;但 Green 等^[26] 利用基因芯片技术研究初产荷斯坦牛人工授精后妊娠 18 d 与妊娠 15 d 2 个时间点外周血白细胞中的转录组学差异时并未发现 *RSAD2* 基因的差异表达。这些研究结果之间的差异可能与试验奶牛的品种和胎次有关。基于此,本研究进一步分析了青年牛(第 2 批次试验牛)外周血液中 *RSAD2* 基因的表达,结果表明人工授精后 18 d 妊娠牛外周血液中 *RSAD2* 基因的表达量显著高于空怀牛。可能是因为青年牛妊娠识别阶段的胚胎较经产牛大, $IFN\tau$ 的产量相对较高,也可能由于青年牛中 $IFN\tau$ 的浓度高于青年牛,导致这个时期青年牛中 $IFN-\tau$ 刺激引起的 *RSAD2* 基因的表达变化较明显^[26]。研究结果提示:通过检测 *RSAD2* 基因的表达量可望对奶牛进行分子妊娠诊断。

为了进一步分析 *RSAD2* 基因作为妊娠诊断候

选基因的敏感度,本研究首先比较了自然发情和同期发情 2 种状态下基因的表达量,结果表明:自然发情的条件下,妊娠牛外周血中 *RSAD2* 基因的表达量在 18 d 显著高于空怀牛,同期发情条件下,妊娠牛和空怀牛 *RSAD2* 基因的表达趋势一致,但差异不显著。这可能与本试验中同期发情空怀牛头数较少有关,也可能因为遗传、营养、个体状态(疾病)等导致动物个体间差异较大,具体原因有待深入研究。早期妊娠阶段,母体免疫细胞的表型发生变化,即 NK 细胞、 $\gamma\delta T$ 细胞和 T_{reg} 细胞被募集至子宫内膜以及 Th1 应答被抑制,从而促进母体对父系抗原的免疫耐受^[6]。基于此,本研究进一步比较了 *RSAD2* 基因在不同白细胞亚类中的表达情况,尽管人工授精后 18 d 妊娠牛与空怀牛中 *RSAD2* 基因的差异表达在淋巴细胞中较大,但是不具备统计学意义。有意思的是,中性粒细胞可以快速且特异性地对妊娠信号产生应答,可能是干扰素刺激基因在妊娠早期作用的靶细胞^[25],但是奶牛妊娠识别阶段中性粒细胞中 *RSAD2* 基因的表达情况尚不清楚,因此,进一步研究人工授精后 14~18 d 妊娠牛与空怀牛外周血中性粒细胞中 *RSAD2* 基因的表达差异,对于提高基于转录组水平的妊娠诊断方法的敏感度和建立快速并且科学的妊娠诊断技术具有重要意义。

本研究对奶牛早期妊娠阶段外周血液中 *IFITM1* 基因和 *RSAD2* 基因的表达规律进行了研究,结果表明,妊娠牛和空怀牛外周血 *IFITM1* 基因的表达量无显著差异;青年牛人工授精后 18 d,妊娠牛外周血 *RSAD2* 基因的表达量显著高于空怀牛,结果提示 *IFITM1* 基因不能作为妊娠诊断的有效标记基因,人工授精后 18 d 外周血中 *RSAD2* 基因的相对表达量可望作为青年牛妊娠诊断的依据。基于不同发情状态下妊娠牛与空怀牛外周血中 *RSAD2* 基因的表达存在差异,依据该基因在外周血中(总白细胞中)的表达水平进行妊娠诊断的相关判别标准有待于扩大样本验证和进一步优化。本研究也为深入探讨 *IFITM1* 和 *RSAD2* 基因对牛早期胚胎发育的调控规律提供了参考。

参 考 文 献

- [1] KASTELIC J P, CURRAN S, PIERSON A R, et al. Ultrasonic

- evaluation of the bovine conceptus[J]. *Theriogenology*, 1988, 29:39-43.
- [2] 李艳艳, 胡建宏, 雷静, 等. 牛妊娠相关糖蛋白 ELISA 对早期妊娠诊断效果的影响[J]. *家畜生态学报*, 2013, 34(3):54-57.
- [3] LUCY M C, MCDUGALL S, NATION D P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems[J]. *Animal Reproduction Science*, 2004, 82/83: 495-512.
- [4] BAZER F W, THATCHER W W, HANSEN P J, et al. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1991, 43:39-47.
- [5] THATCHER W W, MEYER M D, DANET-DESNOYERS G. Maternal recognition of pregnancy[J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1995, 49:S15-S28.
- [6] OTT T L, GIFFORD C A. Effects of early conceptus signals on circulating immune cells; lessons from domestic ruminants [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2010, 64(4):245-254.
- [7] YANKEY S J, HICKS A B, CARNAHAN G K, et al. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes[J]. *The Journal of Endocrinology*, 2001, 170:R7-R11.
- [8] GIFFORD C A, RACICOT K, CLARK D S, et al. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows [J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90:274-280.
- [9] AKYORLI C B, BEKAC M, HOLKO M, et al. Expression of *IFITM1* in chronic myeloid leukemia parents[J]. *Leukemia Research*, 2005, 29(3):283-286.
- [10] BAUERSACHS S, MITKO K, ULBRICH E S, et al. Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy[J]. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2008, 116(7):371-384.
- [11] PRU J K, AUSTIN K J, HAAS A L, et al. Pregnancy and interferon- τ upregulate gene expression of members of the 1-8 family in the bovine uterus[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65, 1471-1480.
- [12] KATZE M G, HE Y, GALE M Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2: 675-687.
- [13] HELBIG K J, LAU D T, SEMENDRIC L, et al. Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector[J]. *Hepatology*, 2005, 42:702-710.
- [14] GRAY C A, ABBEY C A, BEREMAND P D, et al. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus[J]. *Biology of Reproduction*, 2006, 74:383-394.
- [15] KLEIN C, BAUERSACHS S, ULBRICH S E, et al. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the pre-attachment period [J]. *Biology of Reproduction*, 2006, 74:253-264.
- [16] MAMO S, MEHTA J P, FORDE N, et al. Conceptus-endometrium crosstalk during maternal recognition of pregnancy in cattle[J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 87(1):1-9.
- [17] SONG G, BAZER F W, SPENCER T E. Pregnancy and interferon tau regulate *RSAD2* and *IFIH1* expression in the ovine uterus[J]. *Reproduction*, 2007, 133:285-295.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25:402-408.
- [19] HAN H, AUSTIN K J, REMPEL L A, et al. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows[J]. *The Journal of Endocrinology*, 2006, 191:505-512.
- [20] KLYMIUK I, KENNER L, ADLER T, et al. *In vivo* functional requirement of the mouse *ifitm1* gene for germ cell development, interferon mediated immune response and somitogenesis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e44609.
- [21] CHAKRABARTY A, ROBERTS M R. *Ets-2* and *C/EBP-beta* are important mediators of ovine trophoblast Kunitz domain protein-1 gene expression in trophoblast [J]. *BMC Molecular Biology*, 2007, 8:14.
- [22] GREEN J A, XIE S, ROBERTS R M. Pepsin-related molecules secreted by trophoblast [J]. *Reviews Reproduction*, 1998, 3(1): 62-69.
- [23] SPENCER T E, FORDE N, DORNIK P, et al. Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants[J]. *Reproduction*, 2014, 146(4):377-387.
- [24] SOFIA H J, CHEN G, HETZLER B G, et al. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29:1097-1106.
- [25] KIZAKI K, SHICHIJO-KIZAKI A, FURUSAWA T, et al. Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2013, 11:6.
- [26] GREEN J C, OKAMURA C S, POOCK S E, et al. Measurement of interferontau (IFN-tau) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20 d after insemination in dairy cattle[J]. *Animal Reproduction Science*, 2010, 121:24-33.

Transcriptional analysis of *IFITM1* and *RSAD2* in maternal peripheral blood during early pregnancy of dairy cows

CHENG Lei WANG Ding-fa XIANG Min HU Xiu-zhong
LIU Xiao-hua LING Ming-hu XIA Yu

*Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Wuhan Academy of Agricultural Science,
Wuhan 430208, China*

Abstract The present experiment aimed to estimate mRNA transcriptions of *IFITM1* and *RSAD2* in the peripheral blood of Chinese Holstein dairy cows during early pregnancy. Peripheral blood at five different time points (0 d, 14 d, 18 d, 21 d, and 28 d) after artificial insemination (AI) were collected. Real-time PCR was employed to detect the relative gene expressions of *IFITM1* and *RSAD2*, while plasma P4 was detected by Chemiluminescence Immunoassay (CLIA) at the same time. Transcriptions of *RSAD2* were evaluated in the whole blood of heifers with spontaneous cycles of estrus and/or synchronization of estrus. In addition, typical peripheral blood leukocyte subsets (lymphocyte, natural killer cell, and monocyte) were isolated at 0 d, 18 d, and 21 d after AI and gene transcriptions of *RSAD2* were detected. The results showed that pregnant cows had significant higher ($P < 0.05$) plasma P4 levels than non-pregnant cows at 21 d and 28 d. At 14 d and 18 d, transcriptions of bovine *IFITM1* in peripheral blood were significantly declined compared with cows at 0 d ($P < 0.05$), but there was no significant difference between pregnant cows and non-pregnant cows. Although transcriptions of *RSAD2* in pregnant cows were elevated significantly at 21 d ($P < 0.05$), expressions of *RSAD2* in pregnant heifers were significantly higher than those in non-pregnant cows as early as 18 d. Further analysis discovered that transcriptions of *RSAD2* in pregnant cows with spontaneous cycles of estrus were significant higher than those in non-pregnant cows at 18 d. There was a same trend in cows with synchronization of estrus, but the difference was not statistically significant. At 18 d and 21 d, there was no significant difference of *RSAD2* expression in the blood leukocyte subsets between the pregnant cows and non-pregnant cows. These results indicated that transcriptions of bovine *IFITM1* was not reliable for early pregnancy diagnosis, while *RSAD2* could be applied in bovine pregnancy diagnosis at 18 d in heifers. Further study on the standard which could increase the sensitivity of the test is needed.

Key words dairy cows; *IFITM1*; *RSAD2*; pregnancy diagnosis; gene expression

(责任编辑:边书京)