

# 乏情和发情初产母猪下丘脑-垂体-卵巢轴中 lincRNAs 表达谱比较分析

任巧玲<sup>1</sup>, 张家庆<sup>1</sup>, 陆东锋<sup>2</sup>, 王璟<sup>1</sup>, 陈俊峰<sup>1</sup>, 马强<sup>1</sup>, 白献晓<sup>1</sup>, 郭红霞<sup>1</sup>, 高彬文<sup>1</sup>, 邢宝松<sup>1</sup>

1. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河南省畜禽繁育与营养调控重点实验室, 郑州 450002

2. 河南花花牛实业总公司, 郑州 450000

**摘要:** 初产母猪断奶后能否正常发情对养猪生产影响重大, 也是初产母猪被淘汰的主要原因。本研究以乏情和发情初产母猪为研究对象, 首次利用 RNA-seq 技术对其下丘脑-垂体-卵巢轴中的基因间长链非编码 RNAs(long intergenic noncoding RNAs, lincRNAs)进行筛选比较, 得到 lincRNAs 的表达图谱, 并对其特征和功能进行了初步分析。结果显示, 在乏情和发情初产母猪下丘脑-垂体-卵巢轴中鉴定得到 3519 个 lincRNAs, 以发情组为对照共有 17 个 lincRNAs 存在差异表达, 其中 12 个表达上调, 5 个表达下调( $FC \geq 2, P < 0.05$ )。选择 4 个差异表达的 lincRNAs 经 qRT-PCR 验证, 其表达水平与测序结果基本一致。对这 17 个差异表达的 lincRNAs 进行 GO 分析、KEGG 通路分析及 lincRNA-mRNA 共表达网络分析, 发现这些 lincRNAs 主要与猪卵母细胞减数分裂成熟、卵巢细胞分化及颗粒细胞凋亡等生殖活动相关。本研究结果丰富了猪 lincRNAs 数据资源, 为进一步深入研究初产母猪的生殖机能提供了理论依据。

**关键词:** lincRNAs; 乏情; 发情; 初产母猪; 下丘脑-垂体-卵巢轴

收稿日期: 2019-11-14; 修回日期: 2020-02-29

**基金项目:** 河南省农业科学院科技创新创意项目(编号: 2020CX06), 河南省重点研发专项(编号: 182102110063), 河南省财政预算科研专项项目(编号: 2019CY015)和河南省农业科学院自主创新项目(编号: 2019ZC42)资助[Supported by Science and Technology Innovation Program (No. 2020CX06), Key Special Research and Development Program of Henan Province (No. 182102110063), Henan Province Financial Budget for Scientific Research Program (No. 2019CY015), and the Program for Independent Innovative Research in Henan Academy of Agricultural Sciences (No. 2019ZC42)]

**作者简介:** 任巧玲, 硕士, 副研究员, 研究方向: 猪的育种与营养。E-mail: renql76@163.com

张家庆, 博士, 助理研究员, 研究方向: 猪的育种与繁殖。E-mail: zjq8650612@163.com

任巧玲和张家庆为并列第一作者。

**通讯作者:** 邢宝松, 博士, 副研究员, 研究方向: 猪的育种与管理。E-mail: baosong@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-347

网络出版时间: 2020/3/17 10:34:49

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.r.20200316.1144.002.html>

## Comparison and analysis of lincRNAs expression profile in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis of anestrous and estrous primiparous sows

Qiaoling Ren<sup>1</sup>, Jiaqing Zhang<sup>1</sup>, Dongfeng Lu<sup>2</sup>, Jing Wang<sup>1</sup>, Junfeng Chen<sup>1</sup>, Qiang Ma<sup>1</sup>, Xianxiao Bai<sup>1</sup>, Hongxiao Guo<sup>1</sup>, Binwen Gao<sup>1</sup>, Baosong Xing<sup>1</sup>

1. Henan Key Laboratory of Farm Animal Breeding and Nutritional Regulation, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

2. Henan Huahuan Industrial Corporation, Zhengzhou 450000, China

**Abstract:** The normal estrus in weaned primiparous sows has a great impact on pig production and abnormal estrus is the main reason for the elimination of primiparous sows. In this study, we studied the long intergenic noncoding RNAs (lincRNAs) in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis of anestrous and estrous primiparous sows. These long intergenic noncoding RNAs (lincRNAs) were screened and compared through RNA-seq analysis. The expression profiles of lincRNAs were obtained and their characteristics and functions were preliminarily analyzed. There are 3519 novel lincRNAs identified in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis of anestrous and estrous primiparous sows. Compared with estrous primiparous sows, 17 differentially expressed lincRNAs were identified, including 12 up-regulated lincRNAs and 5 down-regulated lincRNAs ( $FC \geq 2$ ,  $P < 0.05$ ). The four lincRNA transcripts obtained through selection were verified by qRT-PCR, which are consistent with the RNA-seq results. The GO, KEGG pathway, and lincRNA-mRNA co-expression network analysis of these 17 lincRNAs revealed that these lincRNAs were mainly involved in reproductive activities, such as oocyte meiosis mature, ovarian cells differentiation and granulosa cells apoptosis. The results enriched the data resources of pig lincRNAs and provided useful information for further research about the reproductive performance of primiparous sows.

**Keywords:** lincRNAs; anestrous; estrus; primiparous sows; hypothalamic-pituitary-ovarian axis

初产母猪乏情或发情延迟已成为养猪生产中的一个常见难题。大长二元母猪作为当今瘦肉型商品猪生产的主要母本,其乏情问题对生产的影响重大。造成初产母猪乏情的主要原因有遗传、环境、营养和管理水平等因素,随着规模化猪场管理水平的提高及动物营养研究的深入,非遗传因素已得到了很好的改善。近年来,一些学者从基因遗传方面对母猪情期控制进行了一些有意义的探索。研究发现在发情和乏情母猪的下丘脑-垂体-卵巢轴中许多生殖激素基因的表达发生了明显的改变,如 *Kiss1*、*GPR54*、*GnRH*、*ER $\alpha$* 、*PR*、*LEPR*、*FSH* 和 *LH* 等在乏情母猪体内显著下调,这些基因均与母猪的发情等生殖活动密切相关<sup>[1,2]</sup>。Kong 等<sup>[2]</sup>报导在发情和乏情全同胞初产母猪的垂体和卵巢中均检测到 *PPAR $\gamma$*  的表达量较高,且存在显著差异( $P < 0.01$ ),并证实了

该基因通过调控卵泡细胞的发育平衡来最终调控断奶后初产母猪的发情行为。另外,研究表明由 *TAC3* 编码的 NKB 与其受体 NK3R 结合能够促进 GnRH 的释放进而诱导动物初情期的启动,当 *TAC3* 发生突变时,导致低促性腺激素综合症的发生,动物初情期启动失败<sup>[3-5]</sup>。下丘脑-垂体-卵巢轴(hypothalamic-pituitary-ovarian axis, HPOA)是一个完整而协调的神经内分泌系统,它的每个环节均有其独特的神经内分泌功能,并且互相调节、互相影响,在哺乳动物的生殖活动中起着主要的调节作用,也是研究动物生殖问题的关键切入点。

lincRNA (long intergenic noncoding RNA, lincRNA) 是一类由蛋白编码基因间的非编码序列转录且转录本长度超过 200 nt 的功能性 RNA 分子<sup>[6]</sup>。随着高通量 RNA-seq 技术的发展,不同物种中越来越多的

lincRNAs 被鉴定, 至今在哺乳动物基因组中已发现 3500 多种 lincRNAs, 多项研究已经证实一些 lincRNAs 在不同的生物过程中发挥着重要作用, 如表观遗传调控<sup>[7]</sup>、多能性维持和基因转录调控<sup>[8]</sup>、X 染色体失活<sup>[9]</sup>及生殖调控<sup>[10,11]</sup>等。与 mRNA 相比, lincRNA 的表达水平在组织间变化更大, 许多 lincRNAs 优先在大脑和睾丸组织中表达<sup>[6]</sup>。lincRNAs 的组织特异性表达表明其具有发育和细胞类型特异性功能<sup>[12]</sup>。目前 lincRNAs 在初产母猪乏情和发情状态下下丘脑-垂体-卵巢轴中的表达及功能还鲜有报导。为了探索 lincRNAs 在初产母猪下丘脑-垂体-卵巢中的表达情况以及对生殖活动的影响, 本研究对乏情和发情初产母猪下丘脑-垂体-卵巢轴中的 lincRNAs 进行全基因组筛选比较, 并对其特征和功能进行了初步分析, 为进一步深入研究初产母猪的生殖机能提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和样品制备

试验猪为体况和年龄基本一致的半同胞初产长大二元母猪, 由河南鄱陵天鹏牧业有限公司提供。在同等条件下饲养在同一圈舍内, 每天用同一头公猪试情 1~2 次, 选取断奶后 7 d 有明显发情反应的 3 头视为正常发情母猪(发情组), 屠宰后分别取下丘脑、垂体和卵巢, 用生理盐水冲洗后, 立即放入液氮中保存。选取公猪试情到 21 d 仍无任何发情反应的 3 头视为乏情母猪(乏情组), 屠宰后分别取下丘脑、垂体和卵巢, 处理方法同发情母猪。

### 1.2 样品总 RNA 提取

采用 RNAiso Plus (日本 TaKaRa 公司)试剂盒分别提取乏情组 3 头母猪和发情组 3 头母猪的下丘脑、垂体和卵巢组织总 RNA, 用 Nano-Drop ND-2000 紫外分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)分析浓度, 用 Agilent BioAnalyzer 2100 (加拿大 Agilent Technologies 公司)进行质量检测, 所有样品要求:  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 2.1$ , RIN > 8.0。分别取等量乏情和发情母猪的下丘脑、垂体、卵巢质检合格的 RNA 混合成 6 个样品池。

### 1.3 cDNA 文库构建和 RNA-seq

分别从 6 个混池中取大约 20  $\mu\text{g}$  RNA, 用带有 Oligo(dT)的磁珠(无锡百迈格生物科技有限公司)富集 PolyA<sup>+</sup> RNA, 并加入 RNA 断裂试剂(美国 Ambion 公司)使之片段化。用六碱基随机引物和 M-MuLV 逆转录酶(上海生工生物工程股份有限公司)合成第一链 cDNA, 用 DNA 聚合酶 I、RNase H 和 dNTPs (上海生工生物工程股份有限公司)合成第二链 cDNA。依照 Illumina HiSeq2500 测序平台的要求, 对构建的 6 个 cDNA 文库依次进行末端修复、3'末端加 A、连接接头后纯化、PCR 扩增富集、定量, 质检符合要求后上机测序。测序工作由上海欧易生物医学科技有限公司完成。

### 1.4 序列比对和转录本构建

6 个文库测序获得的 Raw reads 进行质控处理获得 Clean reads, 用 Tophat (v2.0.14)软件把每个样本的 Clean reads 比对到猪参考基因组(*Sus scrofa* 11.1) (表 1)。用 Cufflinks (v2.2.1)把比对上的片段拼接成

表 1 6 个 cDNA 文库测序质量和比对信息统计分析

Table 1 Statistical analysis of sequence quality and alignment information of six cDNA libraries

样品	Raw reads	Clean reads	Q30 (%)	Mapped reads	Mapping ratio (%)
乏情下丘脑	53,306,278	52,516,724	97.14	43,261,322	82.38
发情下丘脑	53,268,878	52,432,800	97.05	41,257,875	78.69
乏情垂体	53,334,742	52,476,820	96.96	43,582,111	83.05
发情垂体	5,331,090	52,573,730	97.14	42,844,655	81.49
乏情卵巢	53,216,626	52,195,962	96.70	41,861,577	80.20
发情卵巢	53,222,368	52,209,252	96.70	41,381,612	79.26

转录本(GTF 格式), 把来自乏情组和发情组的 6 个 Cufflinks 拼接转录本用 Cufflinks 软件包中的 Cuffmerge 融合成 1 个非冗余转录组, 后续用这个非冗余转录组来鉴定 novel lincRNAs。

### 1.5 lincRNAs 鉴定

乏情和发情母猪下丘脑、垂体、卵巢融合非冗余转录组中的 lincRNAs 通过以下步骤鉴定<sup>[13,14]</sup>:

(1)用 Cuffcompare 把融合转录本与 Ensembl 数据库中的已知注释比对, 去除可能的已知转录本; (2)过滤掉单外显子和长度小于 200 bp 的转录本; (3)只挑选离 Ensembl 中注释的猪的任何编码基因或持家的非编码基因至少 500 bp 远的转录本; (4)分别用蛋白编码潜力计算软件 CNCI 和 CPAT 预测所筛选转录本的编码潜力, 二者取交集即为 lincRNAs (图 1)。

### 1.6 差异表达的 lincRNAs 和差异表达的 mRNAs 筛选

利用 DESeq 软件(<http://bioconductor.org/packages/>

release/bioc/html/DESeq.html)对各样本的 counts 数目进行标准化处理(采用 baseMean 值来估算表达量), 计算差异倍数, 并采用 NB (负二项分布检验的方式)对 reads 数进行差异显著性检验, 筛选  $P < 0.05$  且 Fold Change  $> 2$  的为差异表达的 lincRNAs 和 mRNAs。lincRNAs 和 mRNAs 表达量计算用 FPKM 法, 即每百万片段中来自某一基因每千碱基长度的片段数目。

### 1.7 lincRNAs 功能预测

对于差异表达的 17 个 lincRNAs, 计算每个 lincRNA 与蛋白编码基因之间的 Pearson 相关系数, 选取  $P < 0.05$ ,  $|r| > 0.8$  的基因, 即为与之共表达的编码基因。使用 DAVID 软件在线对共表达蛋白编码基因进行功能富集和通路分析, 用超几何检验, 找出与整个基因组背景相比, 共表达基因显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路。

### 1.8 lincRNA-mRNA 共表达网络分析

为了鉴定差异表达的 lincRNAs 和差异表达的

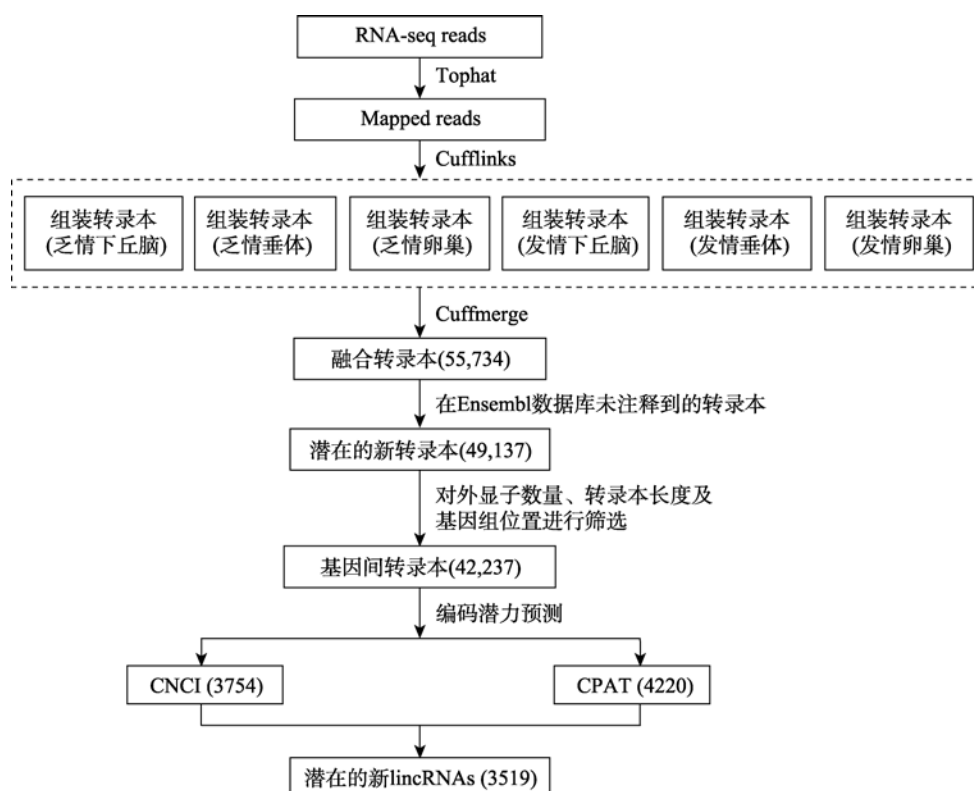


图1 猪 lincRNAs 鉴定流程

Fig. 1 Overview of pig lincRNAs identification pipeline

mRNAs 之间的相互作用, 在 lincRNAs 和 mRNAs 进行 Pearson 相关性分析的基础上构建了 lincRNA-mRNA 共表达网络。即先选取  $P < 0.05$ ,  $|r| > 0.8$  关系对, 然后用 Cytoscape 软件来构建 lincRNA-mRNA 共表达网络。

## 1.9 差异表达 lincRNAs qRT-PCR 验证

分别选取 2 个表达上调和 2 个表达下调的 lincRNAs 进行 qRT-PCR 验证(每个组织重复 3 次)。RNA 为实验室测序时提取冻存的 RNA, 即乏情母猪(3 个下丘脑样品、3 个垂体样品、3 个卵巢样品)和发情母猪(3 个下丘脑样品、3 个垂体样品、3 个卵巢样品)的总 RNA。用 RevertAid Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)合成 cDNA, 根据 SYBR Premix Ex Taq™ (日本 TaKaRa 公司)说明书进行 qRT-PCR 验证。以 GAPDH 为内参基因, 引物由武汉赛维尔生物科技有限公司设计、合成, 引物序列见表 2。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 lincRNAs 的相对表达量。 $t$  检验对相对表达量进行统计分析, 数据表示为“平均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$  SD),  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 转录本组装及 lincRNAs 鉴定

为了鉴定乏情和发情初产母猪下丘脑-垂体-卵

巢轴中的 lincRNAs, 首先用 Illumina HiSeq2500 对乏情和发情初产母猪的下丘脑、垂体和卵巢组织进行了转录组测序, 去除接头及低质量序列后, 平均每个样本得到 52,400,881 条 clean reads, 平均有 42,364,859 条比对到了猪的参考基因组(*Sus scrofa* 11.1), 平均比率为 80.85% (表 1)。利用 Cufflinks 重建了每个样本的转录组, 并用 Cuffmerge 软件将乏情和发情母猪的下丘脑、垂体、卵巢的重建转录组融合成 1 套无冗余的转录组, 共有 55,734 条转录本, 利用 CNCI 软件预测得到 3754 条 lincRNAs, 利用 CPAT 软件预测得到 4220 条 lincRNAs, 二者的交集为 3519 条 lincRNAs (图 1)。这些 lincRNAs 分布在除 Y 染色体以外的所有染色体上(图 2)。

### 2.2 lincRNAs 结构特征分析

以前的研究已经表明人和小鼠的 lincRNAs 与其蛋白编码基因在结构上有很大的差异, 如转录本长度、外显子长度和外显子数量等。为了鉴定本研究分析的 3519 个 lincRNAs 是否也具有这些特征, 将这些 lincRNAs 与 Ensembl 数据库中所注释的猪 mRNAs (更新于 2019 年 6 月, 共有 48,413 个 mRNAs) 进行了比较。结果发现 lincRNAs 的这些特征与以往的研究十分类似<sup>[15,16]</sup>: 转录本平均长度(1797 bp)明显小于 mRNA (3551 bp) (图 3A), 外显子平均长度(571 bp)大于 mRNA (285 bp) (图 3B), 外显子平均个数(3.1 个)小于 mRNA (12 个) (图 3C)。

表 2 引物序列信息

Table 2 The sequence information of primers

lincRNA	引物序列(5'→3')	复性温度( )	扩增长度(bp)
TCONS_00049640	F: TTCTCATAGTCCCCACACAGCC R: CTTCTTCTTTCTCTTCCTTCCCC	60	177
TCONS_00001098	F: TGAGGAAGAGCAGATAGCCAGTC R: AGGTATTTCAGGAGGGCATCTA	60	224
TCONS_00005732	F: TCCTTTCAGATTGGCTGGTGTT R: CCACAGTCCAGGTCATCAAGC	60	230
TCONS_00012288	F: GCCCAGTGGATTTCATTTGC R: TGATACCATTCTTCCTGTTCTCC	60	185
GAPDH	F: GTGAAGGTCGAGTGAACGGA R: CCATTGATGTTGGCGGGAT	60	252



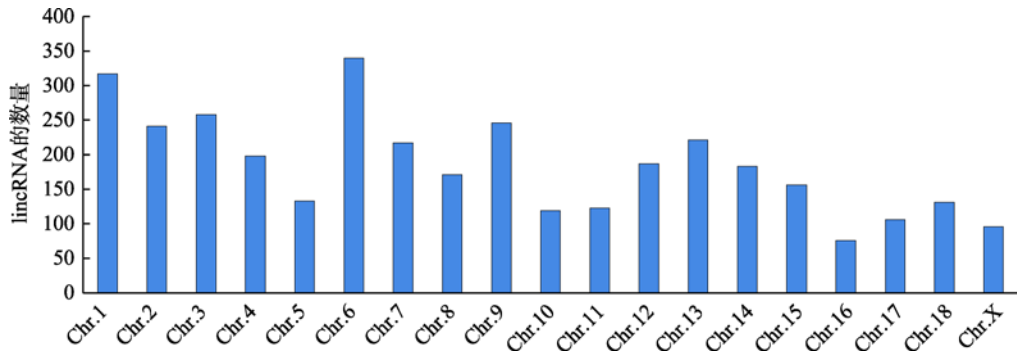


图2 lincRNAs 在染色体上的分布

Fig. 2 The chromosome distribution of lincRNAs

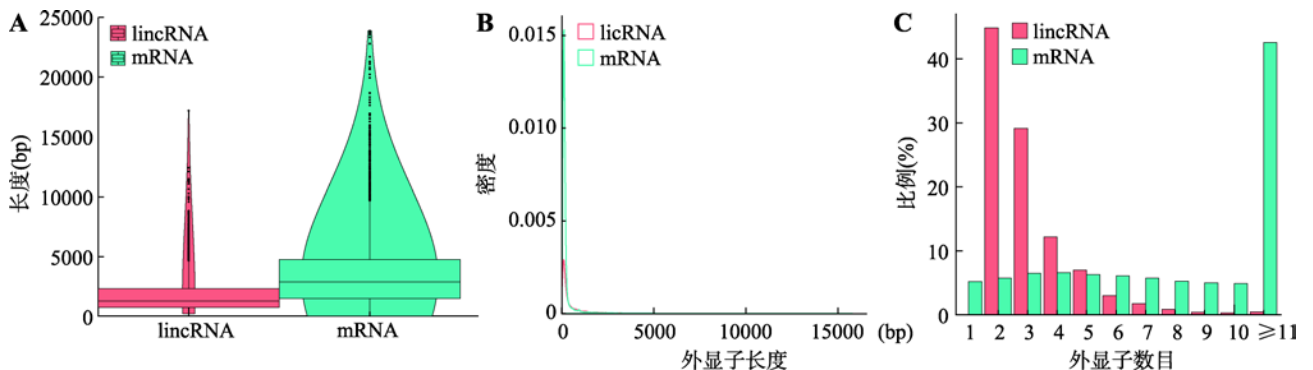


图3 lincRNAs 和 mRNAs 转录本长度、外显子长度和外显子个数比较

Fig. 3 Comparisons of transcript length, exon length and exon number of lincRNAs and mRNAs

A: 转录本长度比较; B: 外显子长度比较; C: 外显子个数比较。

### 2.3 差异表达 lincRNAs 和差异表达 mRNAs 的表达谱

为探讨 lincRNAs 的功能,利用 DEseq 软件对乏情组和发情组下丘脑-垂体-卵巢轴中的 lincRNAs 进行差异表达分析。共有 17 个 lincRNAs 存在差异表达,以发情组为对照组,其中 12 个上调表达,5 个下调表达( $FC \geq 2$ ,  $P < 0.05$ ) (表 3)。这 17 个 lincRNAs 中, TCONS\_00035245 上调倍数最高( $\log_2FC$  值为 15.665), TCONS\_00032971 下调倍数最高( $\log_2FC$  值为 16.210)。散点图(图 4A)揭示了这 17 个 lincRNAs 在两组间的变化情况,聚类分析热图(图 5A)揭示了这 17 个 lincRNAs 在不同样本间表达模式的关系,即乏情组的 3 种组织聚为一类,发情组的 3 种组织聚为一类,在两组间都是垂体和卵巢的表达模式更为相似,聚为一小类。

同时,对 mRNAs 差异表达分析显示,共有 72

mRNAs 存在差异表达,以发情组为对照,其中的 35 个上调,37 个下调( $FC \geq 2$ ,  $P < 0.05$ )。在一个组(乏情组或发情组)平均表达量较高,且在另一组表达量大于 1 (乏情组或发情组)的 17 个 mRNAs 具体情况如表 4 所示。同样,散点图(图 4B)揭示了这 72 个 mRNAs 在两组间的变化情况,聚类分析热图(图 5B)揭示了这 72 个 mRNAs 在不同样本间表达模式的关系,该模式关系与上述的 17 个 lincRNAs 相似。

### 2.4 差异表达 lincRNAs 验证

为了验证 RNA-seq 结果的可靠性,选取 4 个差异表达的 lincRNAs 进行验证(图 6)。RNA-seq 生物信息学分析筛选的 17 个差异表达 lincRNAs 均为与对照组相比在下丘脑、垂体、卵巢 3 种组织中表达趋势一致的 lincRNAs。qRT-PCR 验证结果显示, TCONS\_00012288 在下丘脑(图 6A)有上调趋势( $P > 0.05$ ), TCONS\_00001098 在卵巢(图 6C)有下调趋

表 3 17 个差异表达 lincRNAs 相关信息  
Table 3 The relevant information of 17 differentially expressed lincRNAs

转录本 ID	基因 ID	平均表达量		P 值	log <sub>2</sub> FC	调控	位置
		乏情组	发情组				
TCONS_00035245	XLOC_018088	51.963	0.001	0.003	15.665	上调	Chr.4(+):139486869~139488925
TCONS_00006245	XLOC_003209	38.671	0.001	0.012	15.239	上调	Chr.10(+):76375911~76390174
TCONS_00038863	XLOC_019956	31.061	0.001	0.014	14.923	上调	Chr.5(-):46693872~46740946
TCONS_00039679	XLOC_020371	29.799	0.001	0.017	14.863	上调	Chr.6(+):4250343~4255208
TCONS_00049640	XLOC_025373	68.476	3.245	0.024	4.399	上调	Chr.8(-):31318960~31504408
TCONS_00041695	XLOC_021350	36.005	0.611	0.026	5.881	上调	Chr.6(+):91775209~91809105
TCONS_00041696	XLOC_021350	36.005	0.611	0.026	5.881	上调	Chr.6(+):91802418~91809105
TCONS_00040987	XLOC_020986	24.830	0.001	0.027	14.600	上调	Chr.6(+):57220929~57255522
TCONS_00031805	XLOC_016327	63.453	3.241	0.029	4.291	上调	Chr.3(+):140652352~140654672
TCONS_00027978	XLOC_014327	60.319	3.346	0.034	4.172	上调	Chr.2(-):8241783~8244938
TCONS_00001098	XLOC_000568	103.316	9.467	0.042	3.448	上调	Chr.1(+):137503074~137507662
TCONS_00029995	XLOC_015378	26.051	0.306	0.045	6.414	上调	Chr.3(+):4643111~4645116
TCONS_00032971	XLOC_016898	0.001	75.785	0.001	16.210	下调	Chr.3(-):60770406~60792096
TCONS_00025231	XLOC_012981	0.317	30.704	0.036	6.600	下调	Chr.18(-):57407991~57423170
TCONS_00009672	XLOC_005062	0.001	26.692	0.040	14.704	下调	Chr.12(-):952204~953646
TCONS_00005732	XLOC_002919	102.234	672.631	0.048	2.718	下调	Chr.10(+):22597153~22603044
TCONS_00012288	XLOC_006336	13.226	78.923	0.049	2.577	下调	Chr.13(+):128701400~128715093

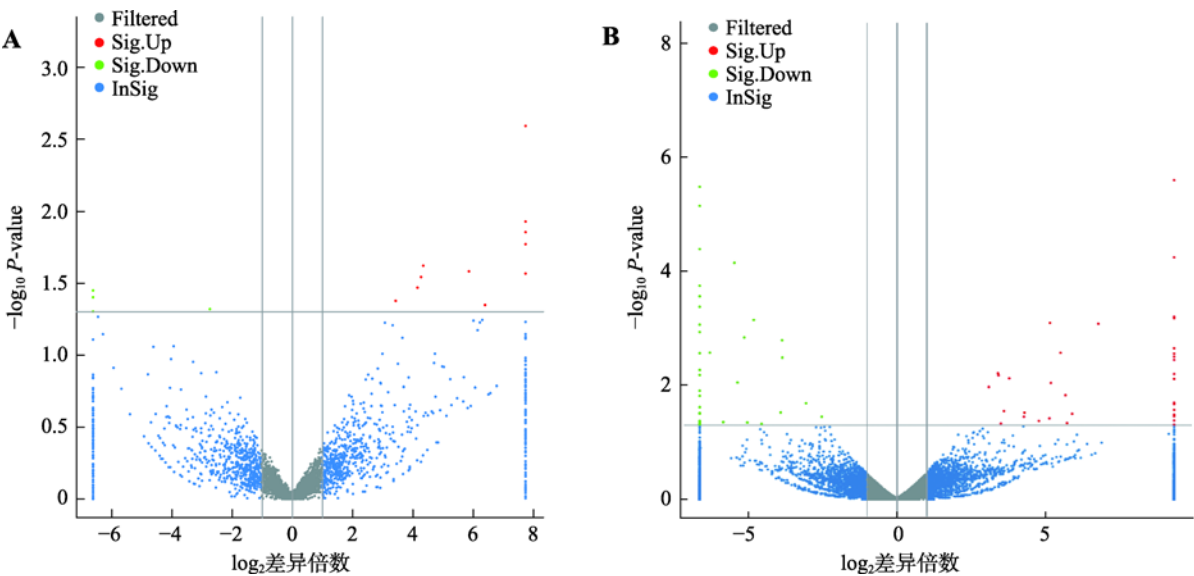


图 4 差异表达 lincRNAs 和 mRNAs 散点图  
Fig. 4 The scatter plots of differentially expressed lincRNAs and mRNAs  
A: 差异表达 lincRNAs 散点图; B: 差异表达 mRNAs 散点图。

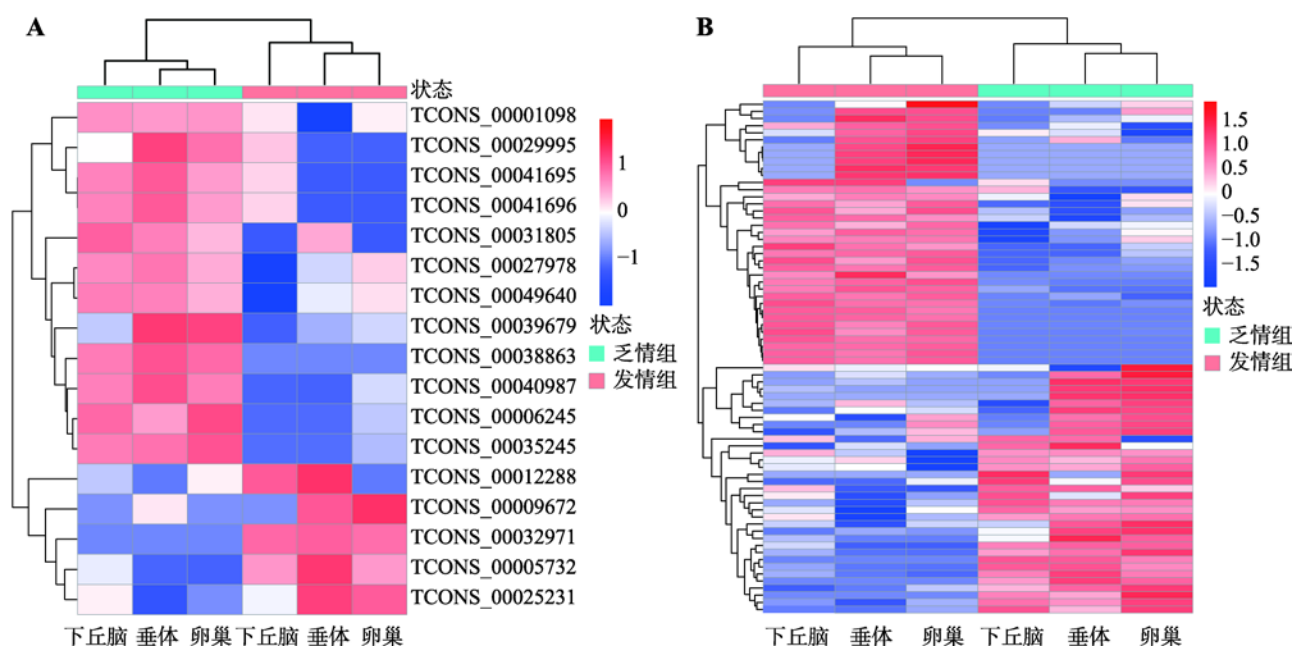


图 5 差异表达 lincRNAs 和 mRNAs 聚类分析热图

Fig. 5 The hierarchical clustering heatmaps of differentially expressed lincRNAs and mRNAs

A: 差异表达 lincRNAs 聚类分析热图; B: 差异表达 mRNAs 聚类分析热图。

表 4 17 个差异表达的 mRNAs 相关信息

Table 4 The relevant information of 17 differentially expressed mRNAs

转录本 ID	基因名称	平均表达量		P 值	log <sub>2</sub> FC	调控
		乏情组	发情组			
ENSSSCT00000031961		125.320	3.532	0.001	5.149	上调
ENSSSCT00000036099	TRAPPC9-002	142.211	1.300	0.012	6.744	上调
ENSSSCT00000022861	UQCC3-201	655.643	62.058	0.006	3.401	上调
ENSSSCT00000011345		404.656	37.820	0.007	3.420	上调
ENSSSCT00000015759		202.943	14.773	0.008	3.780	上调
ENSSSCT00000001351	PPP1R11-001	820.812	96.141	0.011	3.094	上调
ENSSSCT00000028568	C14H10orf116-201	1129.122	18.993	0.031	5.894	上调
ENSSSCT00000025288		202.590	5.782	0.038	5.131	上调
ENSSSCT00000036373	TSPAN6-002	602.708	21.985	0.042	4.777	上调
ENSSSCT00000001615	SLA-DRB1-201	229.961	4.358	0.046	5.722	上调
ENSSSCT00000016351	MMP13-201	3706.129	5.799	0.049	9.320	上调
ENSSSCT00000012778		18.317	803.462	7.06E-05	5.455	下调
ENSSSCT00000022502		7.887	220.445	0.001	4.805	下调
ENSSSCT00000000207	TUBA1C-201	552.531	7980.832	0.002	3.852	下调
ENSSSCT00000032751	TXLNG-002	16.643	238.873	0.003	3.843	下调
ENSSSCT00000033602	PGRMC1-003	22.350	184.633	0.020	3.046	下调
ENSSSCT00000029673		75.697	434.230	0.035	2.520	下调



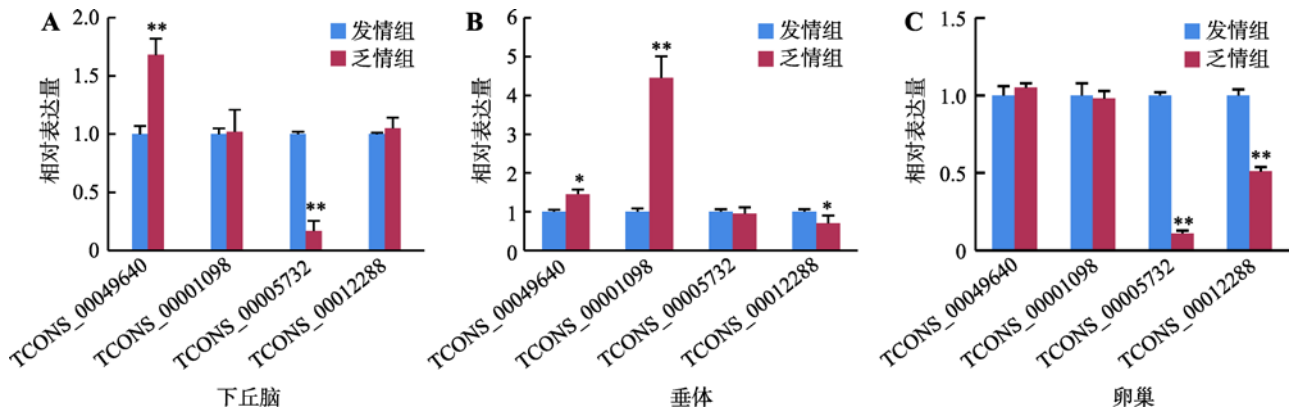


图 6 差异表达 lincRNAs 的 qRT-PCR 验证

Fig. 6 qRT-PCR validation of differentially expressed lincRNAs

A: 差异表达 lincRNAs 在下丘脑中的相对表达量; B: 差异表达 lincRNAs 在垂体中的相对表达量; C: 差异表达 lincRNAs 在卵巢中的相对表达量。\*表示  $P < 0.05$ , 有统计学差异; \*\*表示  $P < 0.01$ , 差异显著。

势( $P > 0.05$ ), 但 RNA-seq 结果为 TCONS\_00012288 表达下调, TCONS\_00001098 表达上调。除上述两种情况外, 其他所有 lincRNAs 在下丘脑、垂体和卵巢中的结果均与 RNA-seq 相同, 即上调的 lincRNAs 与对照组相比, 在下丘脑、垂体和卵巢中均为上调的趋势, 下调的 lincRNAs 与对照组相比, 在下丘脑、垂体、卵巢中均为下调的趋势。

## 2.5 GO 富集和 KEGG 通路分析

为了预测差异表达 lincRNAs 的功能, 对 17 个差异表达的 lincRNAs 经 Pearson 相关分析共得到 256 个共表达基因。这些基因前 30 富集的 GO 条目如图 7 所示。GO 分析表明与 lincRNAs 共表达基因最富集条目为正调控 NF-kappa 转录因子的活动(生物学过程, GO:0051092)、蛋白磷酸酶 1(细胞组分, GO:00164)和细胞周期蛋白依赖性蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性(分子功能, GO:000469)。此外, KEGG 通路分析表明, 与 lincRNAs 共表达基因主要与疾病的发生发展、抗原加工递呈、T 细胞受体信号通路和细胞粘附分子等通路相关(图 8)。

## 2.6 lincRNA-mRNA 共表达网络分析

17 个差异表达的 lincRNAs 和 72 个差异表达的 mRNAs, 在分析其存在共表达关系的基础上, 构建了 lincRNA-mRNA 共表达网络(图 9)。在这个网络中共包括 89 个节点和 274 个关系对, 其中有 174 个正调控关系对, 100 个负调控关系对。此外, 分析还

显示, 1 个 mRNA 可能与 1~11 个 lincRNAs 相关, 而 1 个 lincRNA 则与 3~33 个 mRNAs 相关。

## 3 讨论

近年来研究表明, 越来越多的 lincRNAs 参与哺乳动物的生殖调控, 如 lincRNA-Xist 介导哺乳动物 X 染色体失活<sup>[9]</sup>, lincRNA-Neat1 在黄体形成和妊娠维持中起重要作用<sup>[17]</sup>, lincRNA-MIR503HG 和 linc00629 与人类的胎盘和胎儿发育密切相关<sup>[18]</sup>。与人类和其他哺乳动物相比, lincRNAs 是如何调控母猪生殖活动的还未见报道<sup>[19,20]</sup>。本研究首次对乏情和发情初产母猪下丘脑-垂体-卵巢轴中的 lincRNAs 进行了鉴定和分析, 系统研究了乏情和发情初产母猪下丘脑-垂体-卵巢轴中差异表达 lincRNAs 和 mRNAs 的比较图谱, 并对其生物学功能进行了初步的探索, 为深入研究 lincRNAs 在初产母猪情期启动中的作用提供分子生物学参考, 也为深入阐明初产母猪复杂的生殖机制提供了新的分子标记方向。

本研究共鉴定出 3519 条 lincRNAs, 这些 lincRNAs 的转录本平均长度为 1797 bp, 外显子平均长度为 571 bp, 外显子平均个数为 3.1, 分布在除 Y 染色体以外的所有染色体上。与蛋白编码转录本相比较, 这些 lincRNAs 具有较短的转录本长度、较少的外显子个数和较长的外显子长度, 这些特征与以往的研究报导一致<sup>[15,16]</sup>。在这些 lincRNAs 中共有 17 个存在差异表达, 以发情组为对照其中 12 个上

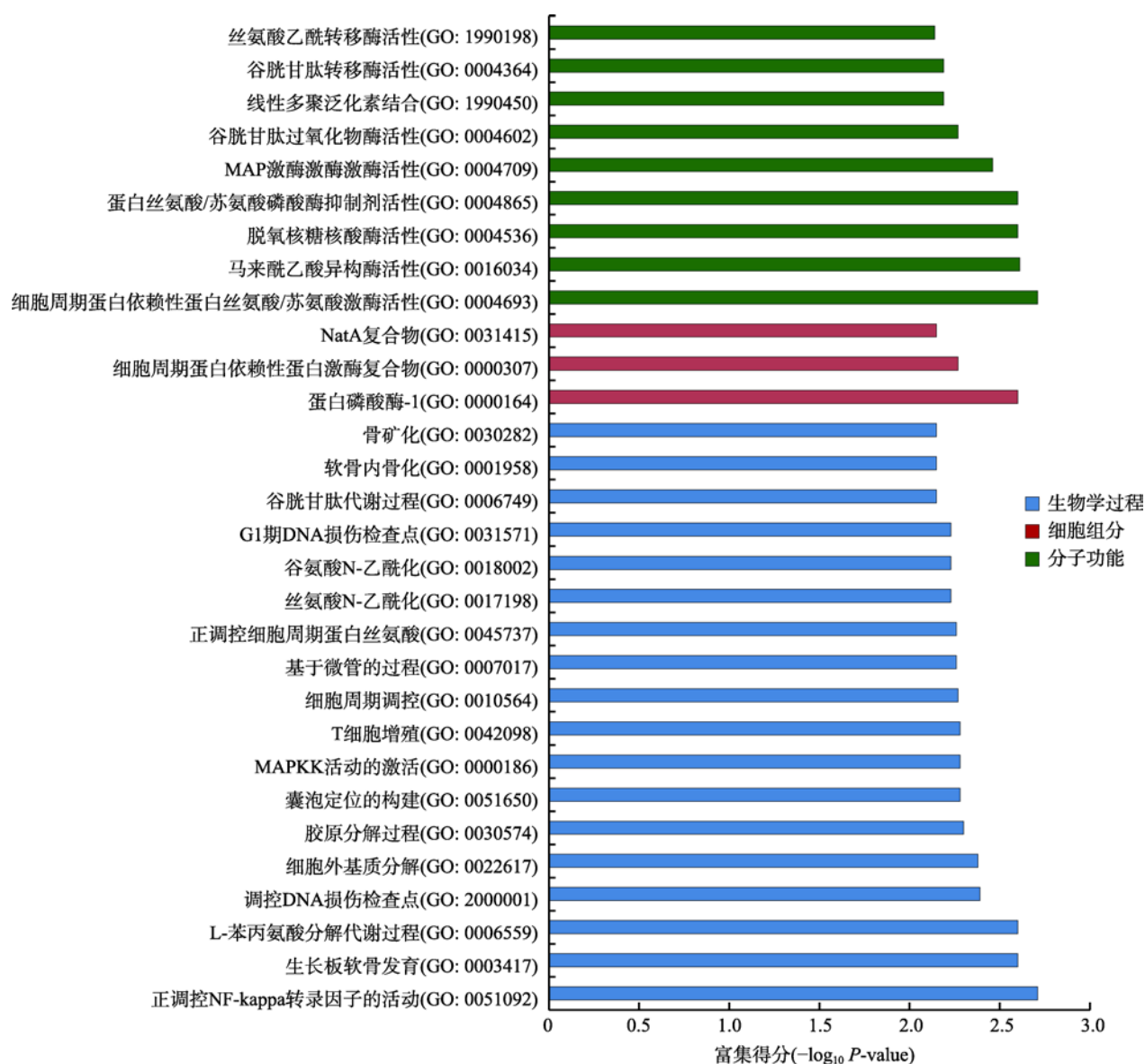


图 7 共表达基因最富集的前 30 个 GO 条目

Fig. 7 Top 30 most enriched GO terms of co-expressed genes

GO: ID 代表该功能在 GO 数据库中的编号。

调, 5 个下调。同时也对 mRNAs 的表达情况进行了分析, 发现共有 72 个 mRNAs 存在差异表达, 以发情组为对照其中 35 个上调表达, 37 个下调表达。

lincRNAs 通常不编码蛋白质, 而是通过与染色体或蛋白质结合来实现自身的功能, 特别是与某些转录因子的结合。最近的研究已经表明 lincRNAs 的生物学功能可以通过与之共表达的基因来预测。为了进一步探讨差异表达 lincRNAs 对初产母猪情期启动等生殖活动的影响, 对与之共表达的 256 个基因进行了 GO 富集和 KEGG 通路分析。对发情母猪

而言, 共表达基因富集到的 MAP 激酶活性(GO: 0004709)、细胞周期蛋白依赖性蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性(GO: 0004693)、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶复合物(GO: 0000307)和胶原分解过程(GO: 0030574)等 GO 条目都直接或间接与母猪发情生物学机制相关。动物发情最显著的生理特征是卵巢上的卵泡发育成熟并排卵, 在发情期卵母细胞受到促性腺激素的刺激后恢复第一次减数分裂, 在这一过程中卵母细胞发生了一系列的变化, 如染色体聚集、核仁解体、生发泡破裂(GVBD)、纺锤体组装和排出

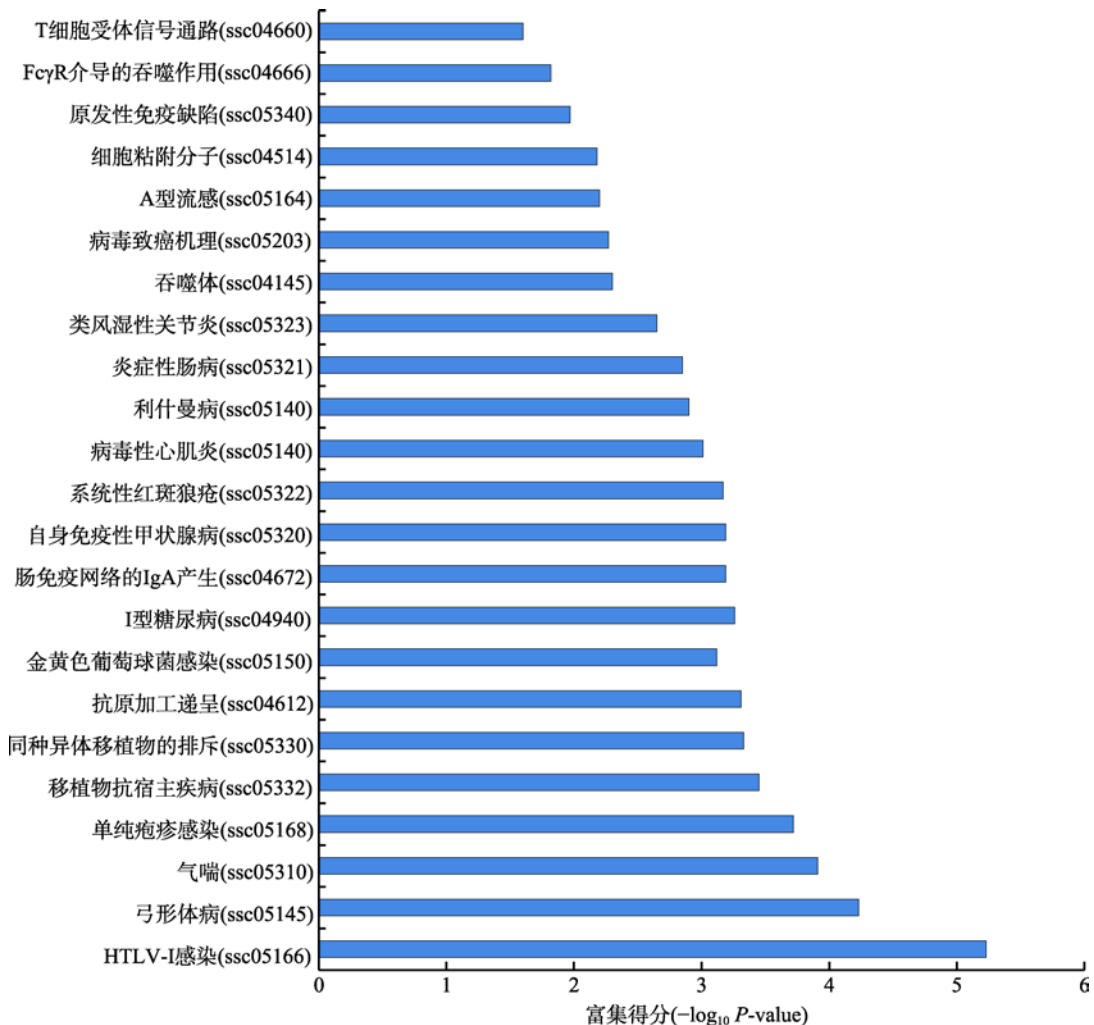


图 8 共表达基因显著富集的通路

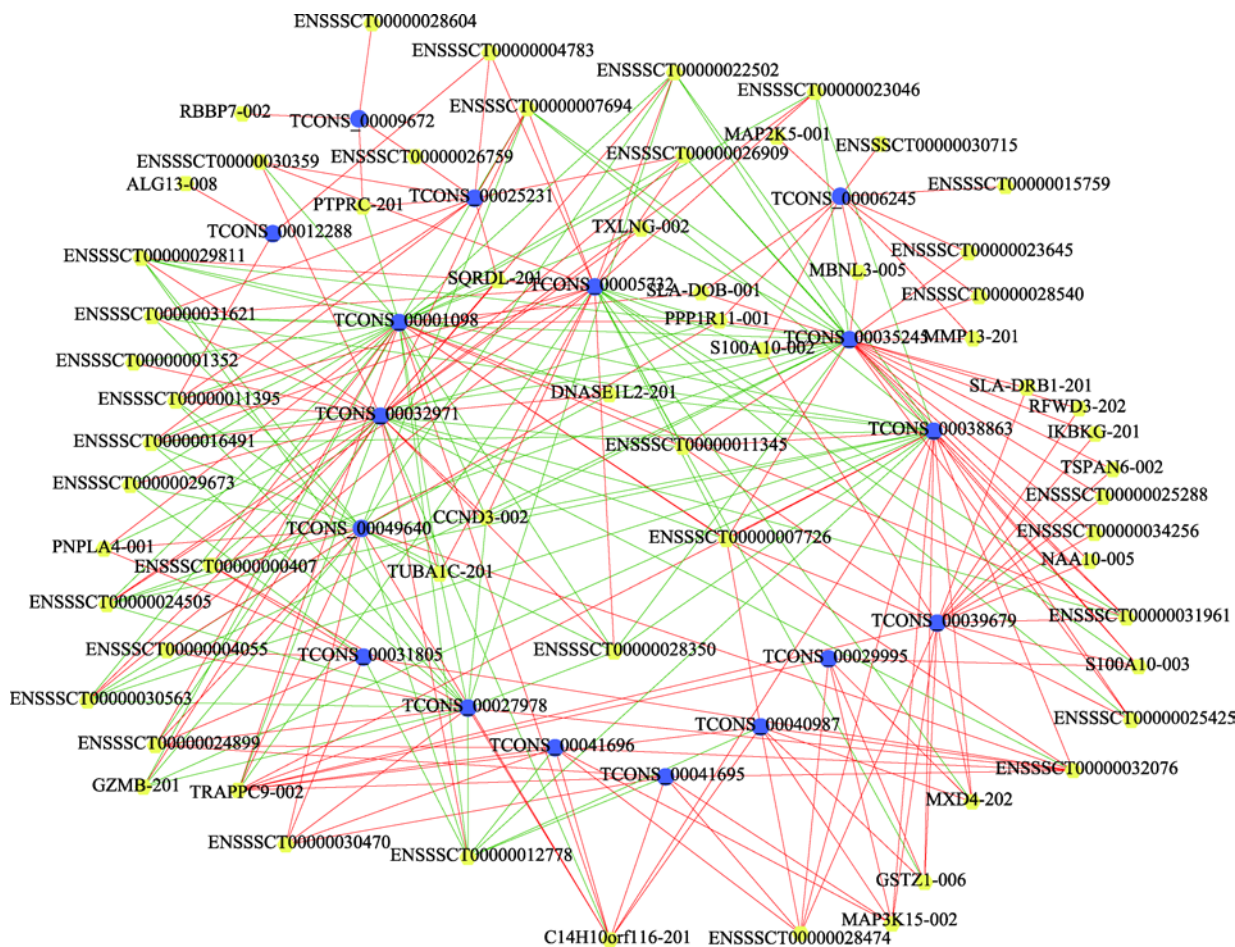
Fig. 8 Significantly enriched pathways of co-expressed genes

Pathway: ID 代表该通路在 KEGG 数据库中的编号。

第一极体(PB1)<sup>[21-24]</sup>。成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)在哺乳动物卵母细胞减数分裂成熟过程中起着关键性的调控作用,它发挥活性的催化亚基就是由细胞周期蛋白依赖性蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶构成<sup>[25,26]</sup>。在猪卵丘卵母细胞复合体培养过程中抑制 MPF 的活性,卵母细胞减数分裂成熟显著受阻,同时 MPF 活性还影响卵母细胞减数分裂成熟过程中母源基因的表达<sup>[27]</sup>。在发育不良的猪卵母细胞内,MPF 催化亚基和调节亚基的 mRNA 和蛋白表达水平都显著降低<sup>[28]</sup>。这说明 MPF 的高水平表达及正常激活在猪卵母细胞成熟过程中起关键作用。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一类广泛存在于真核细胞中的丝

氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在卵母细胞减数分裂成熟过程中也具有重要作用。研究发现,MAPK 调控卵母细胞减数分裂过程中微管和染色质的行为,在小鼠卵母细胞减数分裂时,即使 MPF 的活性被抑制,MAPK 依然能够诱导卵母细胞染色质凝聚和纺锤体形成<sup>[29,30]</sup>。在猪卵母细胞减数分裂成熟过程中,用 MAPK 专用抑制剂抑制 MAPK 的活性,染色体分离、第一极体排出和 MII 期纺锤体的形成都被抑制<sup>[31]</sup>。另外,GO 条目胶原分解过程(GO: 0030574)与发情动物的排卵行为密切相关。在蛋白分解酶的作用下,排卵前卵泡顶端胶原分解和细胞死亡是卵泡即将破裂排卵的标志。因此推测,对发情母猪而言,差异表达 lincRNAs 主要是通过调控卵母细胞的减数分





本研究利用 lincRNA-mRNA 共表达网络分析来确定差异表达的 lincRNAs 和差异表达的 mRNAs 之间的关系。在这个 lincRNA-mRNA 共表达网络中, *TRAPPC9* 基因关联到的 lincRNAs (11 个)最多, 在人体内该基因编码的蛋白 NIBP 参与膜泡运输过程, 增强  $\text{TNF}\alpha$  诱导的 NF- $\kappa\text{B}$  活性, 直接与 IKK 和 MAP3K14 相互作用, 参与 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的经典激活和替代激活<sup>[40,41]</sup>, NIBP 在进化过程中高度保守, 而猪又拥有与人类极为相似的基因特征, 因此, 推测差异表达的 lincRNAs 通过调控 *TRAPPC9* 基因的表达来参与 NF- $\kappa\text{B}$  信号通路的激活过程, 从而影响母猪的生殖活动。另外, 该网络与 TCONS\_00009672 共表达的 *RBBP7* 基因与卵母细胞的减数分裂成熟密

切相关。*RBBP7* 是一个休眠的母源 mRNA, 在卵母细胞成熟过程中被招集并翻译来调控组蛋白的去乙酰化, 与成熟相关的组蛋白乙酰化水平降低对卵母细胞减数分裂成熟正常进行及染色体准确分离至关重要, *RBB7* 被 SiRNA 耗尽的卵母细胞出现了严重的染色体错排、着丝粒-微管连接不当、SAC 功能受损、胞质分裂缺陷和 MII 非整倍体发生率增加<sup>[42,43]</sup>。因此, 在猪下丘脑-垂体-卵巢轴中的鉴定 TCONS\_00009672 很有可能也是通过调节 *RBBP7* 基因来实现对卵母细胞成熟发育的影响, 从而影响母猪的发情活动, 详尽的机理还得进一步的挖掘探讨。

本研究通过 RNA-seq 技术分析了乏情和发情初产母猪下丘脑-垂体-卵巢轴中 lincRNAs 的表达图谱, 并对差异表达 lincRNAs 的功能进行初步分析, 发现这些 lincRNAs 主要与卵母细胞的减数分裂成熟、卵巢细胞分化及颗粒细胞凋亡等生殖活动相关, 但与重要生殖激素相关的生物学过程并未预测到, 存在测序没有生物学重复, 预测到的差异表达 lincRNAs 并不全面所致的可能。

## 参考文献(References):

- [1] Zhou DS, Zhuo Y, Che LQ, Lin Y, Fang ZF, Wu D. Nutrient restriction induces failure of reproductive function and molecular changes in hypothalamus-pituitary-gonadal axis in postpubertal gilts. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7): 4733–4742. [DOI]
- [2] Kong LJ, Wang AG, Fu JL, Lai CH, Wang XF, Lin HC. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is involved in weaning to estrus of primiparous sows by regulating the expression of hormone genes in hypothalamus-pituitary-ovary axis. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2007, 20(3): 340–350. [DOI]
- [3] Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JS, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, Rahily SO, Semple RK. *TAC3* and *TACR3* mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*, 2009, 41(3): 354–358. [DOI]
- [4] Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of Gonadotropin-Releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 2010, 151(8): 3479–3489. [DOI]
- [5] Song S, Cui P, Wang YY, Jiang SD, Zhang XR, Fang FG, Li SB. Expression of neurokinin B in hypothalamus, pituitary and ovary of rats. *J Northwest Sci-Tech Univ Agric Fore(Nat Sci Ed)*, 2015, 43(6): 7–14, 20. 宋爽, 崔培, 王尧尧, 蒋书东, 章孝荣, 方富贵, 李书宝. 神经激肽 B 在大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴上的表达. 西北农林科技大学(自然科学版), 2015, 43(6): 7–14, 20. [DOI]
- [6] Ulitsky I, Bartel DP. LincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 2013, 154(1): 26–46. [DOI]
- [7] Popadin K, Gutierrez-Arcelus M, Dermitzakis ET, Antonarakis SE. Genetic and epigenetic regulation of human lincRNA gene expression. *AM J Hum Genet*, 2013, 93(6): 1015–1026. [DOI]
- [8] Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, Young G, Lucas AB, Ach R, Bruhn L, Yang XP, Amit I, Meissner A, Regev A, Regev A, Rinn JL, Root DE, Lander ES. LincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*, 2012, 477(7364): 295–300. [DOI]
- [9] Augui S, Nora EP, Heard E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(6): 429–442. [DOI]
- [10] Li JY, Gao ZL, Wang XY, Liu HB, Zhang Y, Liu ZH. Identification and functional analysis of long intergenic noncoding RNA genes in porcine pre-implantation embryonic development. *Sci Rep*, 2016, 6: 38333. [DOI]
- [11] Muys BR, Lorenzi JCC, Zanette DL, Bueno RdBL, Araújo LFd, Dinarte-Santos AR, Alves CP, Ramão A, Molfetta GAd, Vidal DO, Silva WA Jr. Placenta-enriched LincRNAs *MIR503HG* and *LINC00629* decrease migration and invasion potential of JEG-3 cell line. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151560. [DOI]
- [12] Amin V, Harris RA, Onuchic V, Jackson AR, Charnecki T, Paithankar S, Lakshmi Subramanian SL, Riehle K, Coarfa C, Milosavljevic A. Epigenomic footprints across 111 reference epigenomes reveal tissue-specific epigenetic regulation of lincRNAs. *Nat Commun*, 2015, 6: 6370–6380. [DOI]
- [13] Zhou C, Li S, Deng LL, Guan Y, Chen DK, Yuan XK, Xia TR, He XL, Shan YW, Li CC. Transcriptome analysis reveals long intergenic noncoding RNAs contributed to growth and meat quality differences between yorkshire and wannanhua pig. *Genes*, 2017, 8(8): E203. [DOI]

- [14] Zhao YH. Identification and functional analysis of lincRNA based on multi-tissue transcriptome data in mice[Dissertation]. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, 2015.  
赵宇慧. 基于多组织转录组数据的小鼠 lincRNA 的鉴定和功能分析[学位论文]. 中国科学院北京基因组研究所, 2015. [DOI]
- [15] Tang ZL, Wu Y, Yang YL, Yang YCT, Wang ZS, Yuan JP, Yang Y, Hua CJ, Fan XH, Niu GG, Zhang YB, Lu ZJ, Li K. Comprehensive analysis of long non-coding RNAs highlights their spatio-temporal expression patterns and evolutionary conservation in *Sus scrofa*. *Sci Rep*, 2017, 7: 43166. [DOI]
- [16] Li JY, Gao ZL, Wang XY, Liu HB, Zhang Y, Liu ZH. Identification and functional analysis of long intergenic noncoding RNA genes in porcine pre-implantation embryonic development. *Sci Rep*, 2016, 6: 38333. [DOI]
- [17] Liu KS, Li TP, Ton H, Mao XD, Chen YJ. Advances of long noncoding RNAs-mediated regulation in reproduction. *Chin Med J(Engl)*, 2018, 131(2): 226–234. [DOI]
- [18] Muys BR, Lorenzi JCC, Zanette DL, De Barros Lima E, Bueno R, De Araujo LF, Dinarte-Santos AR, Alves CP, Ramao A, De Molfetta GA, Vidal DO, Silva WA. Placenta-enriched lincRNAs *MIR503HG* and *LINC00629* decrease migration and invasion potential of JEG-3 cell line. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151560. [DOI]
- [19] Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev*, 2011, 25(18): 1915–1927. [DOI]
- [20] Lv J, Liu H, Yu SH, Liu HB, Cui W, Gao Y, Zheng T, Qin G, Guo J, Zeng TB, Han ZB, Zhang Y, Wu Q. Identification of 4438 novel lincRNAs involved in mouse pre-implantation embryonic development. *Mol Gen Genomics*, 2015, 290(2): 685–697. [DOI]
- [21] Zhang JY, Lv S, Niu HM, Lei AM. Research progress on the asymmetric division in mammalian oocytes. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(4): 279–291.  
张俊玉, 吕珊, 牛慧敏, 雷安民. 哺乳动物卵母细胞不对称分裂的研究进展. *遗传*, 2018, 40(4): 279–291. [DOI]
- [22] Zhu XL, Qi ST, Liu J, Chen L, Zhang C, Yang SW, OuYang YC, Hou Y, Schatten H, Song YL, Xing FQ, Sun QY. Synaptotagmin1 is required for spindle stability and metaphase-to-anaphase transition in mouse oocytes. *Cell Cycle*, 2012, 11(4): 818–826. [DOI]
- [23] Solc P, Schultz RM, Motlik J. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(9): 654–664. [DOI]
- [24] Yang F, Zhang BY, Feng GD, Xiang W, Ma YX, Chen H, Chu MX, Wang PQ. A Mechanistic review of how hypoxic microenvironment regulates mammalian ovulation. *Hereditas(Beijing)*, 2016, 38(2): 109–117.  
杨芳, 张宝云, 冯光德, 向伟, 马云霞, 陈航, 储明星, 王凭青. 卵巢低氧微环境调节哺乳动物排卵的分子机制. *遗传*, 2016, 38(2): 109–117. [DOI]
- [25] Nanassy L, Lee K, Javor A, Machaty Z. 316 Changes in MPF activity in porcine oocytes following activation by various methods. *Reprod Fert Develop*, 2006, 18(2): 265–265. [DOI]
- [26] Faerge I, Terry B, Kalous J, Wahl P, Lessl M, Ottesen JL, Hyttel P, Grøndahl C. Resumption of meiosis induced by meiosis-activating sterol has a different signal transduction pathway than spontaneous resumption of meiosis in denuded mouse oocytes cultured *in vitro*. *Biol Reprod*, 2001, 65(6): 1751–1758. [DOI]
- [27] Zhang DX, Park WJ, Sun SC, Xu YN, Li YH, Cui XS, Kim NH. Regulation of maternal gene expression by MEK/MAPK and MPF signaling in porcine oocytes during *in vitro* meiotic maturation. *J Reprod Dev*, 2011, 57(1): 48–56. [DOI]
- [28] Zhang DX, Cui XS, Kim NH. Molecular characterization and polyadenylation-regulated expression of cyclin B1 and Cdc2 in porcine oocytes and early parthenotes. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(1): 38–50. [DOI]
- [29] Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(9): 2037–2055. [DOI]
- [30] Lee SE, Kim JH, Kim NH. Inactivation of MAPK affects centrosome assembly, but not actin filament assembly, in mouse oocytes maturing *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(7): 904–911. [DOI]
- [31] Lee J, Miyano T, Moor RM. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*, 2000, 8(2): 119–125. [DOI]
- [32] Lan W, Petznick A, Heryati S, Rifada M, Tong L. Nuclear factor-κB: central regulator in ocular surface inflammation



- and diseases. *Ocul Surf*, 2012, 10(3): 137–148. [DOI]
- [33] Siomek A. NF- $\kappa$ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(3): 323–331. [DOI]
- [34] Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF- $\kappa$ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res*, 2011, 21(1): 146–158. [DOI]
- [35] Ling XQ, Wang JK. Techniques for assaying the activity of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(5): 551–570.  
凌小倩, 王进科. 转录因子 NF- $\kappa$ B 活性检测技术. 遗传, 2013, 35(5): 551–570. [DOI]
- [36] Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Mol Cell*, 2004, 13(6): 853–865. [DOI]
- [37] Ma JJ, Ren ZJ, Ma Y, Xu L, Zhao Y, Zheng CG, Fang YH, Xue T, Sun BL, Xiao WH. Targeted knockdown of EGR-1 inhibits IL-8 production and IL-8-mediated invasion of prostate cancer cells through suppressing EGR-1/NF- $\kappa$ B synergy. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 34600–34606. [DOI]
- [38] Pavlová S, Kluska K, Vašíček D, Rybáň L, Harrath AH, Alwasel SH, Sivotkin AV. The involvement of SIRT1 and transcription factor NF- $\kappa$ B (p50/p65) in regulation of porcine ovarian cell function. *Anim Reprod Sci*, 2013, 140(3–4): 180–188. [DOI]
- [39] Sirotkin AV, Dekanová P, Harrath AH, Alwasel SH, Vašíček D. Interrelationships between sirtuin1 and transcription factors P53 and NF- $\kappa$ B(P50/P65) in the control of ovarian cell apoptosis and proliferation. *Cell Tissue Res*, 2014, 358(4): 627–632. [DOI]
- [40] Cai HQ, Zhang YY, Pypaert M, Walker L, Ferro-Novick S. Mutants in *trsl20* disrupt traffic from the early endosome to the late Golgi. *J Cell Biol*, 2005, 171(5): 823–833. [DOI]
- [41] Hu WH, Pendergast JS, Mo XM, Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Li F, Walters WM, Blits B, He L, Shaal SM, Bethea JR. NIBP, a novel NIK and IKK $\beta$ -binding protein that enhances NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem*, 2005, 280(32): 29233–29241. [DOI]
- [42] Balboul A, Stein P, Schultz RM, Schindler K. Knockdown of RBBP7 unveils a requirement of histone deacetylation for CPC function in mouse oocytes. *Cell Cycle*, 2014, 13(4): 600–611. [DOI]
- [43] Balboul A, Stein P, Schultz RM, Schindler K. RBBP4 regulates histone deacetylation and bipolar spindle assembly during oocyte maturation in the mouse. *Biol Reprod*, 2015, 92(4): 105–117. [DOI]

(责任编辑: 李明洲)