

# 过表达组蛋白 H3K9me3 去甲基化酶对猪克隆胚胎发育的影响

李亚楠<sup>1,2,3</sup>, 张贤君<sup>1,2,3</sup>, 张宁<sup>1,2,3</sup>, 梁雅琳<sup>1,2,3</sup>, 张宇星<sup>1,2,3</sup>, 招华兴<sup>1,2,3</sup>,  
李紫聪<sup>1,2,3</sup>, 黄思秀<sup>1,2,3</sup>

1. 华南农业大学动物科学学院, 国家生猪种业工程技术研究中心, 广州 510642
2. 畜禽育种国家地方联合工程研究中心, 广州 510642
3. 广东省农业动物基因组学与分子育种重点实验室, 广州 510642

**摘要:** 组蛋白异常修饰是克隆胚胎发育的重要制约因素, 组蛋白 H3K9me3 去甲基化酶 KDM4 家族的过表达可以有效提高克隆胚胎的发育效率。为探究过表达 H3K9me3 去甲基化酶对猪克隆胚胎发育的影响, 本研究在猪克隆胚胎 1-细胞期和 2-细胞期分别注射 *KDM4A* mRNA 和 *KDM4D* mRNA 检测胚胎的囊胚率; 收集 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和胚胎注射水(对照组)的 2-细胞期克隆胚胎检测 H3K9me3 表达水平; 此外, 收集 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和胚胎注射水的 4-细胞期克隆胚胎进行单细胞转录组测序, 并对测序数据进行 GO 与 KEGG 富集分析。结果显示: 在 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 的猪克隆胚胎囊胚率显著高于对照组( $25.32 \pm 0.74\%$  vs  $14.78 \pm 0.87\%$ ), 注射 *KDM4D* mRNA 对猪克隆胚胎囊胚率无明显作用( $16.27 \pm 0.77\%$  vs  $14.78 \pm 0.87\%$ ); 在 2-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和 *KDM4D* mRNA 的克隆胚胎囊胚率与对照组相比均无显著差异( $32.18 \pm 1.67\%$ 、 $30.04 \pm 0.91\%$  vs  $31.22 \pm 1.40\%$ )。在 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 的克隆胚胎组蛋白 H3K9me3 表达水平低于对照组。通过测序, 筛选出 133 个差异表达基因, 其中上调基因 52 个、下调基因 81 个, GO 分析主要富集到与蛋白质定位相关的通路, KEGG 分析富集到细胞衰老和急性髓细胞白血病等相关通路。本研究结果表明, 过表达组蛋白 H3K9me3 去甲基化酶 KDM4A 可以显著提高猪克隆胚胎的发育效率。

**关键词:** 猪; 克隆胚胎; H3K9me3; KDM4A; KDM4D

收稿日期: 2022-07-18; 修回日期: 2022-11-08; 网络发布日期: 2022-11-28

基金项目: 广东省自然科学基金项目(编号: 2019B1515210027), 广东特支计划本土创新创业团队项目(编号: 2019BT02N630)和广东省畜禽地方品种保护与开发利用提升工程项目资助[Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2019B1515210027), Guangdong Special Support Plan Local Innovation and Entrepreneurship Team (No. 2019BT02N630) and Guangdong Province Livestock and poultry Local Breed Protection and Development and Utilization Promotion Project]

作者简介: 李亚楠, 在读硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: li321736803@163.com

通讯作者: 黄思秀, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: sxhuang815@scau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.22-244

## Effects of overexpression of histone H3K9me3 demethylase on development of porcine cloned embryos

Yanan Li<sup>1,2,3</sup>, Xianjun Zhang<sup>1,2,3</sup>, Ning Zhang<sup>1,2,3</sup>, Yalin Liang<sup>1,2,3</sup>, Yuxing Zhang<sup>1,2,3</sup>, Huaxing Zhao<sup>1,2,3</sup>, Zicong Li<sup>1,2,3</sup>, Sixiu Huang<sup>1,2,3</sup>

1. National Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, College of Animal Science of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

2. National & Local Joint Engineering Research Center for Breeding Animal Industry, Guangzhou 510642, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-animal Genomics and Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** The abnormal modification of histone is an important factor restricting development of porcine cloned embryos. Overexpression of histone H3K9me3 demethylase KDM4 family can effectively improve the developmental efficiency of cloned embryos. In order to explore the effects of overexpression of H3K9me3 demethylase on the development of porcine cloned embryos, *KDM4A* mRNA and *KDM4D* mRNA were injected respectively into porcine cloned embryos at the 1-cell stage and 2-cell stage to detect the blastocyst rate; 2-cell stage cloned embryos injected with *KDM4A* mRNA and embryo injection water (the control group) at the 1-cell stage were collected to detect the expression level of H3K9me3, and 4-cell stage cloned embryos were collected for single cell transcriptome sequencing, then the sequencing data was analyzed with KEGG and GO. The results showed that the blastocyst rate of porcine cloned embryos injected with *KDM4A* mRNA at 1-cell stage was significantly higher than that of the control group ( $25.32 \pm 0.74\%$  vs  $14.78 \pm 0.87\%$ ), while cloned embryos injected with *KDM4D* mRNA had a similar blastocyst rate with cloned embryos in control group ( $16.27 \pm 0.77\%$  vs  $14.78 \pm 0.87\%$ ). Porcine cloned embryos injected with *KDM4A* mRNA and *KDM4D* mRNA at 2-cell stage had a similar blastocyst rate with cloned embryos in control group ( $32.18 \pm 1.67\%$ ,  $30.04 \pm 0.91\%$  vs  $31.22 \pm 1.40\%$ ). The expression level of H3K9me3 in cloned embryos injected with *KDM4A* mRNA at 1-cell stage was lower than that in control group. There were 133 differentially expressed genes detected by transcriptome sequencing, including 52 up-regulated genes and 81 down-regulated genes. Pathways enriched by GO analyses were mainly related to protein localization. Pathways enriched by KEGG analyses were related to cellular senescence and acute myeloid leukemia. These results suggest that overexpression of histone H3K9me3 demethylase KDM4A can significantly improve the developmental efficiency of porcine cloned embryos.

**Keywords:** pig; cloning embryo; H3K9me3; KDM4A; KDM4D

猪克隆技术已成功应用于优良种群扩繁、濒危物种的保护和生物学等领域,但目前猪(*Sus scrofa*)的克隆效率只有 1%~5%左右<sup>[1]</sup>,严重限制了猪克隆技术的发展。大量研究表明,异常的表观遗传修饰是导致克隆胚胎异常发育的关键原因<sup>[2]</sup>,主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、X 染色体失活、基因组印记和染色质重塑等。

组蛋白甲基化是胚胎发育过程中十分重要的组蛋白修饰,涉及基因转录的激活和抑制。H3K9me3 是转录抑制的组蛋白修饰标记,受组蛋白甲基转移酶和组蛋白去甲基化酶的调节,是引起克隆胚胎重

编程障碍的关键表观遗传修饰<sup>[3]</sup>。KDM4 是最大的去甲基化酶亚家族之一,该家族主要包含 4 个成员(KDM4A-D),其中 KDM4A 和 KDM4D 均能使 H3K9me3 去甲基化,激活基因表达。Chung 等<sup>[4]</sup>发现过表达 KDM4A 能够有效降低 H3K9me3 活性并显著提高克隆胚胎的囊胚率,从而提高人类核移植衍生胚胎干细胞的生产效率。Matoba 等<sup>[5]</sup>发现与小鼠(*Mus musculus*)2-细胞期体外受精胚胎相比,克隆胚胎的重编程抗性区域存在高水平的 H3K9me3,在 1-细胞期注射 *KDM4D* mRNA 对 H3K9me3 进行去甲基化,重编程了大多数重编程抗性区域,并且大

幅提高了克隆效率。过表达去甲基化酶从而提高克隆胚胎发育效率的研究在牛(*Bos taurus*)<sup>[6]</sup>、绵羊(*Ovis aries*)<sup>[7]</sup>和猴(*Macaca mulatta*)<sup>[8]</sup>上也有报道。

转录组测序常用于基因表达水平的量化以识别差异表达基因,可揭示不同水平的细胞转录并协助推断信号通路<sup>[9]</sup>。此外,研究人员利用转录组测序可以详细分析表观遗传重编程过程中染色质和表观基因的变化<sup>[10]</sup>。单细胞转录组测序 Smart-seq2 扩增方法可检测少量细胞或胚胎样品中基因表达水平的变化。Liu 等<sup>[11]</sup>通过单细胞转录组测序结合胚胎活检获得具有不同发育潜力的小鼠克隆胚胎转录谱,成功鉴定出组蛋白去甲基化酶 KDM4B 和 KDM5B 是导致克隆胚胎发育停滞的关键因素。目前,在猪上关于过表达 KDM4 基因以提高克隆效率的研究报道较少。本课题组吴霄等<sup>[12]</sup>在 1-细胞期注射鼠源 KDM4B mRNA 和 KDM4D mRNA 未能去除 H3K9me3 甲基化修饰和有效提高猪克隆胚胎的发育效率。He 等<sup>[13]</sup>发现 4-细胞期克隆胚胎的 KDM4A 和 KDM4D 基因表达水平远低于体内受精胚胎。因此,本研究通过在猪克隆胚胎 1-细胞期和 2-细胞期注射猪源 KDM4A mRNA 和 KDM4D mRNA,以期去除早期克隆胚胎基因组 H3K9me3 修饰和提高克隆胚胎发育效率。另外,本研究对 1-细胞期注射 KDM4A mRNA 和胚胎注射水的 4-细胞期克隆胚胎进行单细胞转录组测序,以探究过表达 H3K9me3 去甲基化酶 KDM4A 对早期克隆胚胎发育的影响机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、细胞株和猪克隆胚胎

KDM4A 和 KDM4D 基因表达载体由南京金斯瑞生物科技有限公司合成;大白猪成体成纤维细胞采自广东温氏食品集团新兴县水台原种场;猪克隆胚胎由广东温氏集团种猪公司克隆实验室提供。

### 1.2 KDM4A 与 KDM4D 质粒的合成与验证

从 NCBI 上得到猪 KDM4A(XM\_021096835.1)、KDM4D(XM\_003129775.5)基因的编码区序列并进行密码子优化,利用 SnapGene 软件确定双酶切位点,将 2 个基因序列构建到空载体 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP

中,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成 2 个质粒。

合成得到含有质粒的甘油菌,接种于氨苄抗性培养基平板中培养。挑取多个单克隆菌株于液体培养基中,扩增培养后进行菌液 PCR 鉴定,对鉴定出的菌液按照普通质粒 DNA 小提试剂盒(Endo-free Plasmid Mini Kit II,广州飞扬生物工程有限公司)说明书进行质粒抽提,再用限制性内切酶 *Hind* III/*Xho* I(美国 Thermo Fisher 公司)对质粒进行双酶切鉴定。经过电泳验证的质粒送深圳华大基因进行测序,利用 SnapGene 软件比对序列确定合格的质粒。

### 1.3 KDM4A 和 KDM4D 基因的体外转录

用限制性内切酶 *Sma* I(美国 Thermo Fisher 公司)使质粒线性化,纯化回收线性化 DNA 后再使用体外转录试剂盒(mMESSAGE mMGACHINE™T7 Ultra,美国 Thermo Fisher 公司)对 RNA 进行加帽和加尾,回收体外转录产物,进行电泳和浓度鉴定,确定 mRNA 样品的质量后将浓度调整至 1000 ng/μL。

### 1.4 猪克隆胚胎胞浆显微注射

通过胞浆显微注射的方法将 KDM4A mRNA 和 KDM4D mRNA 注射入猪克隆胚胎。本研究进行两种注射:一种是在胚胎激活后 4~6 h 的 1-细胞期进行注射;另一种是在胚胎激活后 28~30 h 的 2-细胞期进行注射。注射胚胎分为 4 组:KDM4A 组、KDM4D 组、KDM4A+KDM4D 组(混合注射 KDM4A mRNA 和 KDM4D mRNA)、胚胎注射水(美国 Sigma 公司)组即对照组,注射浓度为 1000 ng/μL<sup>[8,14]</sup>,每个胚胎注射的体积为 10 pL。体外培养猪克隆胚胎,统计培养 48 h 的胚胎卵裂率、148 h 的胚胎囊胚率和囊胚细胞数。

### 1.5 免疫荧光检测猪克隆胚胎 H3K9me3 表达水平

收集在猪 1-细胞期注射 KDM4A mRNA 和胚胎注射水的 2-细胞期克隆胚胎,用操作液洗 3 次后转移到固定液中,室温固定 10 min;操作液洗 3 次后转移到通透液中,室温通透 20 min;操作液洗 3 次后转移到封闭液中,常温封闭 1 h;操作液洗 3 次后转移到一抗稀释液(北京安诺伦生物科技有限公司)中,4℃孵育过夜。操作液洗 3 次后转移到二抗稀释液(广州康龙生物科技有限公司)中,室温避光孵育

1 h; 操作液洗 3 次转移到 Hoechst 33342(美国 Sigma 公司)中, 室温避光孵育 5 min; 在载玻片中央滴上 20  $\mu$ L 抗荧光猝灭封片液, 操作液洗 3 次后将胚胎转移到载玻片上, 盖上盖玻片后转移到荧光显微镜下拍照。

### 1.6 单细胞转录组测序

本研究采用单细胞转录组测序 Smart-seq2 扩增方法, 由广州永极生物科技有限公司完成。收集在猪 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和胚胎注射水的 4-细胞期克隆胚胎, 放入含裂解液和 RNase Inhibitor 的收集管中, 随后快速放入液氮。总共收集 *KDM4A* mRNA 注射组和对照组 2 组克隆胚胎样品, 每组 3 管, 每管 4 个胚胎。

将收集的样品采用 Smart-seq2 方法扩增生成 cDNA, 并检测 cDNA 样品片段分布情况, 根据检测结果将合格的 cDNA 进行文库构建。质量检测合格的文库在 HiSeq Xten 测序仪上进行测序以获得每个样本的原始数据, 过滤掉低质量及接头污染的数据获取高质量的原始数据(clean reads), 并将其比对到参考基因组序列上。采用 THseq 软件根据比对的文件对基因进行 reads 统计并计算对应的 RPKM (reads per kilobase per million mapped reads), RPKM 代表每百万 reads 中来自某基因每千碱基长度的 reads 数。采用 DESeq2 软件计算  $p$  值和  $q$  值, 比较基因的 RPKM 值得到 FoldChange 值, 以  $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ ,  $q\text{-value} < 0.05$  为标准筛选差异表达基因。

### 1.7 数据统计分析

使用软件 SPSS25.0 对卵裂率、囊胚率、囊胚细胞数进行单因素方差分析(ANOVA), 数据以平均值  $\pm$  标准误(Mean  $\pm$  SEM)的形式表示, 不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ ), 不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 *KDM4A* 和 *KDM4D* 基因过表达载体的构建与体外转录

从 NCBI 获得猪 *KDM4A*(XM\_021096835.1)和 *KDM4D*(XM\_003129775.5)的基因序列, 编码区大小

分别为 3201 bp 和 1929 bp。*KDM4A* 和 *KDM4D* 编码区经过密码子优化后全长序列分别为 3210 bp 和 1938 bp, 构建到空载体 pcDNA3.1(+)-P2A-eGFP(由南京金斯瑞公司提供)中(图 1A), 得到 pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4A* 和 pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4D* 2 个基因表达载体, 长度分别为 9410 bp 和 8138 bp。pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4A* 表达载体中 *KDM4A* 的 CDS 序列用的是亚型 XP\_020952494.1。本研究对两个载体进行 *Hind* III/*Xho* I 双酶切鉴定, 双酶切后 pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4A* 长度分别为 3210 bp 和 6200 bp, pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4D* 长度分别为 1938 bp 和 6200 bp(图 1B)。这些结果表明, 过表达载体构建成功。

本研究利用限制性内切酶 *Sma* I 对 pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4A* 和 pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4D* 进行单酶切处理, 纯化回收线性化质粒后进行体外转录合成 *KDM4* mRNA 和 *KDM4D* mRNA。对体外转录获得的 mRNA 进行凝胶电泳, 结果显示 *KDM4A* mRNA 和 *KDM4D* mRNA 已成功转录(图 1C)。

### 2.2 注射 *KDM4A* 和 *KDM4D* mRNA 对猪克隆胚胎发育效率的影响

在猪克隆胚胎 1-细胞期和 2-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和 *KDM4D* mRNA, 培养克隆胚胎并观察记录其发育情况。1-细胞期注射的结果(表 1)表明, 3 个实验组(*KDM4A*、*KDM4D* 和 *KDM4A+KDM4D*)的卵裂率和囊胚细胞数与对照组相比无显著差异。*KDM4A* 组的囊胚率相较于对照组和 *KDM4D* 组都有极显著的提高( $P < 0.01$ ); *KDM4D* 组和 *KDM4A+KDM4D* 组的囊胚率与对照组相比均有提升趋势但不显著。由以上的结果可知, 在 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 能显著提高猪克隆胚胎的囊胚率, 注射 *KDM4D* mRNA 有提升作用。2-细胞期注射的结果(表 2)表明, 3 个实验组的囊胚率与对照组相比均无显著差异; *KDM4A+KDM4D* 组与 *KDM4D* 组相比, 囊胚细胞数显著增加( $P < 0.05$ )。

### 2.3 注射 *KDM4A* mRNA 对猪克隆胚胎 H3K9me3 水平的影响

在猪克隆胚胎 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和胚胎注射水, 培养克隆胚胎至 2-细胞期, 随后对

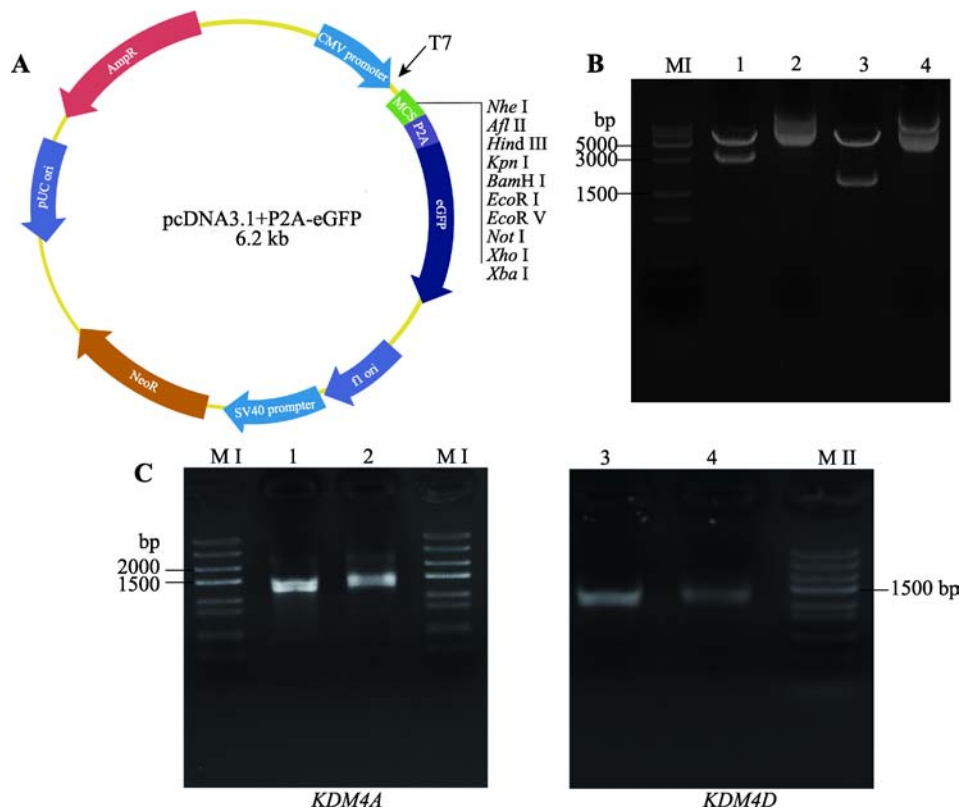


图 1 *KDM4A* 和 *KDM4D* 过表达载体的构建与体外转录结果

Fig. 1 Construction of *KDM4A* and *KDM4D* overexpression vectors and *in vitro* transcription results

A: 空载体图谱。B: pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4A* 和 pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4D* 双酶切电泳鉴定结果。MI: 8K DNA Marker; 1: pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4A* 双酶切的电泳条带; 2: 未进行酶切的质粒; 3: pcDNA(+)-P2A-eGFP-*KDM4D* 双酶切电泳条带; 4: 未进行酶切的质粒。C: *KDM4A* mRNA 和 *KDM4D* mRNA 体外转录结果。MI 和 MII: 5K DNA Marker; 1: *KDM4A* 体外转录加帽产物; 2: *KDM4A* 体外转录加尾产物; 3: *KDM4D* 体外转录加帽产物; 4: *KDM4D* 体外转录加尾产物。

表 1 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和 *KDM4D* mRNA 对猪克隆胚胎发育效率的影响

Table 1 Effects of injecting *KDM4A* mRNA and *KDM4D* mRNA at 1-cell stage on the developmental efficiency of porcine cloned embryos

组别	胚胎数( <i>n</i> )	卵裂数	卵裂率(%)	囊胚数	囊胚率(%)	囊胚细胞数
<i>KDM4A</i>	308(8)	228	74.03 ± 0.95	78	25.32 ± 0.74 <sup>aA</sup>	42.11 ± 2.39
<i>KDM4D</i>	295(8)	217	73.45 ± 0.92	48	16.27 ± 0.77 <sup>bB</sup>	43.79 ± 2.70
<i>KDM4A</i> + <i>KDM4D</i>	216(7)	155	71.76 ± 0.93	41	18.98 ± 1.01 <sup>abAB</sup>	38.59 ± 2.8
胚胎注射水(对照)	345(9)	250	72.46 ± 0.65	51	14.78 ± 0.87 <sup>bB</sup>	40.27 ± 2.22

*n* 表示实验重复数;囊胚率=囊胚数/克隆胚胎总数;不同的大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ ),不同的小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

表 2 2-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和 *KDM4D* mRNA 对猪克隆胚胎发育效率的影响

Table 2 Effects of injecting *KDM4A* mRNA and *KDM4D* mRNA at 2-cell stage on the developmental efficiency of porcine cloned embryos

组别	胚胎数( <i>n</i> )	囊胚数	囊胚率(%)	囊胚细胞数
<i>KDM4A</i>	202(6)	65	32.18 ± 1.67	35.18 ± 1.73 <sup>ab</sup>
<i>KDM4D</i>	243(7)	73	30.04 ± 0.91	32.47 ± 1.75 <sup>b</sup>
<i>KDM4A</i> + <i>KDM4D</i>	88(3)	26	29.55 ± 1.95	40.33 ± 4.00 <sup>a</sup>
胚胎注射水(对照)	221(6)	69	31.22 ± 1.40	35.44 ± 2.05 <sup>ab</sup>

*n* 表示实验重复数;囊胚率=囊胚数/2-细胞期克隆胚胎总数;不同的小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。



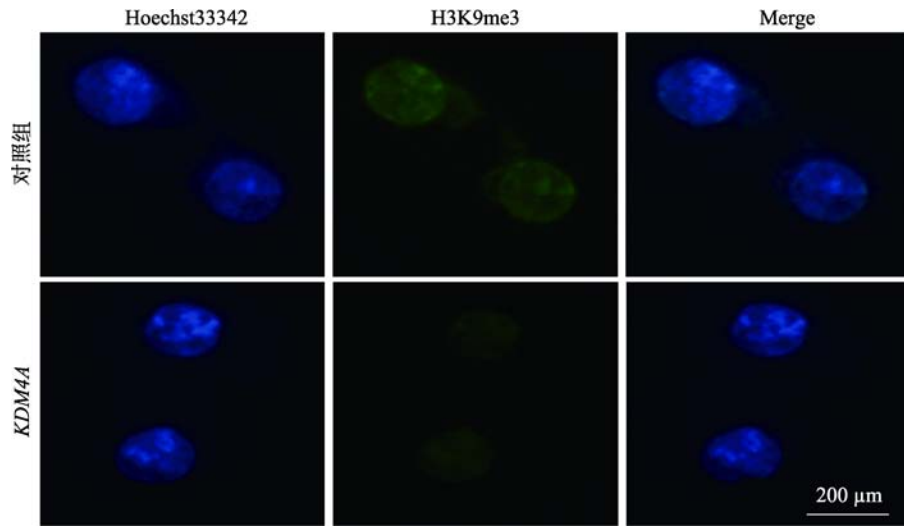


图 2 2-细胞期猪克隆胚胎 H3K9me3 免疫荧光结果

Fig. 2 Immunofluorescence of H3K9me3 in porcine cloned embryos at 2-cell stage

*KDM4A* mRNA 注射组和对照组的 2-细胞期克隆胚胎进行免疫荧光实验,检测组蛋白 H3K9me3 的表达水平。结果显示,*KDM4A* mRNA 注射组与对照组相比,H3K9me3 荧光信号强度更弱(图 2),这表明过表达 *KDM4A* 基因可以降低猪克隆胚胎组蛋白 H3K9me3 的表达水平。

#### 2.4 注射 *KDM4A* mRNA 猪克隆胚胎转录组 *KDM4A* 基因的差异表达分析

在猪克隆胚胎 1-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和胚胎注射水,培养猪克隆胚胎至 4-细胞期,随后收集 *KDM4A* mRNA 注射组和对照组的 4-细胞期克隆胚胎,进行 RNA-seq,对测序数据进行 *KDM4A* 表达量分析。结果显示,在注射 *KDM4A* mRNA 后的 4-细胞期克隆胚胎中,*KDM4A* 的 RPKM(reads per kilobase million)高于对照组(图 3),说明本研究注射 *KDM4A* mRNA 过表达了 *KDM4A*,同时表明注射 *KDM4A* mRNA 提高了猪克隆胚胎中 *KDM4A* 的表达量。

#### 2.5 过表达 *KDM4A* 基因对猪克隆胚胎转录组基因表达的影响

通过对转录组测序数据进行质量评估和基因组比对,确定测序数据是可信的。利用 R 软件 DESeq2 包对两组样本的基因转录本进行差异显著性分析,以  $|\log_2(\text{fold change})| > 1$  和  $q\text{-value} < 0.05$  为筛选标准,

共筛选出 133 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),其中上调表达基因 52 个,下调表达基因 81 个(图 4A),差异基因具体信息见附表 1。

为进一步了解 DEGs 的功能和探究过表达 *KDM4A* 基因对 4-细胞期克隆胚胎 DEGs 相关信号通路的影响,本研究利用 ClusterProfiler 包和 Gene Ontology 数据库对 DEGs 进行了 GO 与 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)富集分析。结果表明,在 DEGs 显著富集程度最高的前 20 条 GO 条目中,DEGs 数量最多的前 5 条包括:定位(localization)、细胞对化学刺激的反应(cellular response to chemical stimulus)、细胞定位(cellular localization)、细胞质溶胶(cytosol)、细胞器定位(organelle localization)(图 4B)。

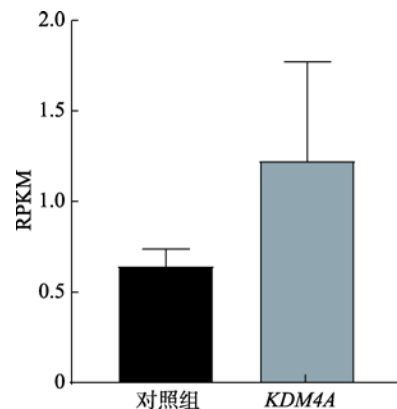


图 3 *KDM4A* 基因差异表达分析

Fig. 3 Differential expression of *KDM4A*

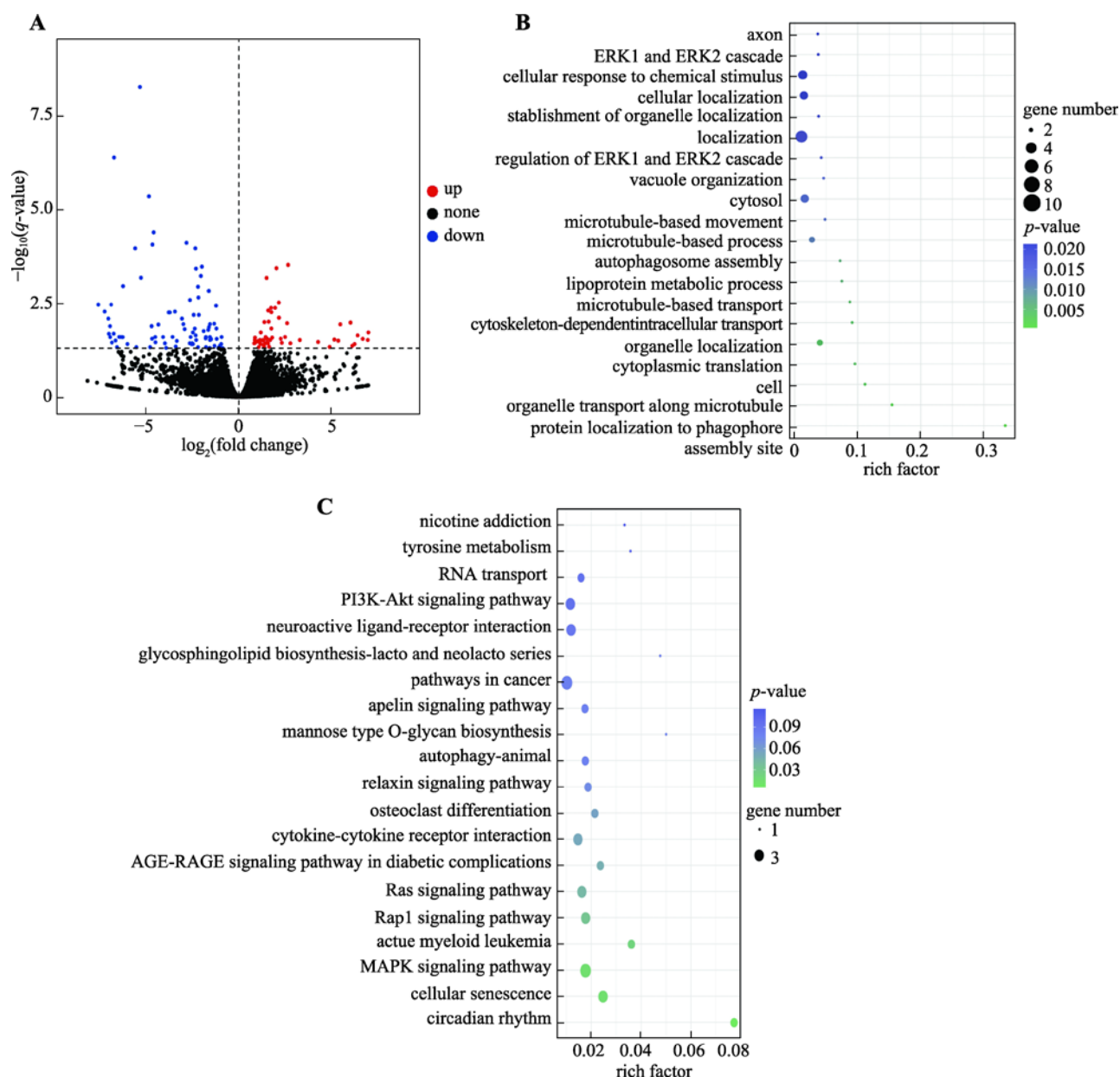


图 4 过表达 *KDM4A* 基因对猪克隆胚胎影响的转录组基因表达分析

Fig. 4 Transcriptome analysis of *KDM4A* overexpression on porcine cloned embryos

A: 差异表达基因火山图; B: 差异表达基因 GO 富集分析; C: 差异表达基因 KEGG 富集分析。

在 DEGs 富集程度最高的前 20 条 KEGG 信号通路中, 7 条显著富集的信号通路分别是: 昼夜节律(circadian rhythm)、细胞衰老(cellular senescence)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)、急性髓细胞白血病(acute myeloid leukemia)、Rap1 信号通路(Rap1 signaling pathway)、Ras 信号通路(Ras signaling pathway)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications) (图 4C)。

### 3 讨论

组蛋白 H3K9me3 是克隆胚胎有效重编程的主要表观遗传屏障, 降低 H3K9me3 异常表达水平增强克隆胚胎发育能力被大量研究。去甲基化酶 *KDM4A* 对于雌性哺乳动物早期胚胎植入及克隆胚胎发育至关重要<sup>[15,16]</sup>, Ruan 等<sup>[17]</sup>和 Weng 等<sup>[18]</sup>在猪 1-细胞期克隆胚胎中注射 *KDM4A* mRNA 有效降低了 H3K9me3

表达水平,提高克隆胚胎的囊胚率。研究指出 *KDM4A* 过表达可显著提高植入后胚胎中 *XIST* 的表达水平,导致克隆猪植入后死亡<sup>[17]</sup>。这表明 *KDM4A* 对克隆胚胎早期发育能力有增强作用,但不能增强克隆胚胎体内长期发育能力。过表达 *KDM4D* 可以挽救 H3K9me3 引起的体细胞核染色质结构缺陷,提高克隆胚胎发育能力<sup>[19]</sup>。Feng 等<sup>[20]</sup>和 Zhang 等<sup>[7]</sup>对牛和羊克隆胚胎显微注射 *KDM4D* mRNA,发现胚胎中 H3K9me3 水平降低,多功能相关基因表达水平提高,从而促进克隆胚胎的发育。本研究在猪克隆胚胎 1-细胞期和 2-细胞期注射 *KDM4D* mRNA 对克隆胚胎囊胚率均无显著提升,2-细胞期 *KDM4A*+*KDM4D* 共注射组囊胚细胞数却得到显著提高,说明去甲基化酶 *KDM4D* 可能存在物种特异性,在猪上 *KDM4D* 酶活性较低。此外,小鼠和猪序列的 Jmj C 结构域中存在一定差异<sup>[18]</sup>,这可能是注射 *KDM4D* mRNA 在猪克隆胚胎上几乎不发挥作用的重要原因。本研究在猪克隆胚胎 2-细胞期注射 *KDM4A* mRNA 和 *KDM4D* mRNA 均无法提高克隆胚胎的囊胚率,可能是因为 2-细胞期注射相较于 1-细胞期对猪克隆胚胎造成更大的机械损伤,从而对胚胎发育产生不利影响。

小鼠克隆胚胎中基因表达异常始于 2-细胞期,这对应着小鼠体外受精胚胎的合子基因组激活<sup>[5]</sup>。Wang 等<sup>[21]</sup>探索发现原始生殖细胞中 H3K9me3 水平较高,而合子形成过程中基因组 H3K9me3 修饰大量丢失,此后在植入前胚胎发育过程中 H3K9me3 标记的基因相对较少且稳定,这种 H3K9me3 修饰的动态模式与 Cao 等<sup>[22]</sup>对猪克隆胚胎的研究结果相似。研究发现猪 2-细胞期和 4-细胞期克隆胚胎中 H3K9me3 水平远高于体外受精胚胎<sup>[18]</sup>。这些研究表明 H3K9me3 异常水平可能导致胚胎基因组激活不成功和晚期发育所需的调节因子合成不足,最终导致克隆胚胎效率低下。因此,本研究在猪克隆胚胎 1-细胞期过表达 *KDM4A*,降低 H3K9me3 异常水平,促使胚胎中 H3K9me3 修饰更接近正常胚胎,从而改善猪克隆胚胎的发育效率。本研究在分析猪克隆胚胎转录组差异表达基因时发现 *PER1*、*MAP7*、*HMGA2*、*EIF4EBP1*、*TACC3*、*BCKDK*、*CSF1R* 基因在 H3K9me3 调控、胚胎发育及细胞增殖方面具有一定作用。昼夜节律

调节因子 *PER1* 基因的转录抑制与 H3K9 甲基化有关。*PER1* 启动子区异染色质标记 H3K9me3 表达降低时,人胃癌细胞中 *PER1* 的表达增加,说明 *PER1* 受到 H3K9me3 调控<sup>[23]</sup>。*MAP7* 转录受到组蛋白甲基化的影响,Zhao 等<sup>[24]</sup>研究表明 *MAP7* 通过组蛋白甲基化调节因子 *CBX1* 与 H3K9me3 结合介导的异染色质形成被转录抑制,从而促进细胞增殖。*HMGA2* 主要与异染色质区域相关,异染色质区域与核纤层蛋白相互作用。敲除 *HMGA2* 基因导致细胞中的异染色质标记 H3K9me3 在核内发生错误定位<sup>[25]</sup>,从而影响核纤层。据报道,*EIF4EBP1*(真核生物翻译起始因子 4 E 结合蛋白 1)通过抑制细胞周期蛋白 D1 表达导致细胞周期阻滞,影响胚胎发育<sup>[26]</sup>。*TACC3*、*BCKDK*、*CSF1R* 在卵母细胞和胚胎中表达,其中 *TACC3* 基因的缺失将导致小鼠胚胎死亡<sup>[27]</sup>;*BCKDK* 通过调节 *PDC* 磷酸化,维持细胞代谢平衡,促进胚胎发育<sup>[28]</sup>。此外,本研究 GO 富集分析发现,*KDM4A* mRNA 注射组与对照组的猪克隆胚胎差异表达基因功能主要集中在定位,可能是去甲基化酶行使功能前的细胞定位。据报道,定位于卵母细胞、颗粒细胞及卵泡膜细胞上的 *KDM4A* 基因表达可能影响体外受精胚胎发育,影响妊娠结果<sup>[29]</sup>。*KDM4D* 蛋白在染色质上的定位促进 H3K9me3 的甲基化<sup>[30]</sup>。KEGG 富集分析发现,差异表达基因集中在细胞衰老和急性髓细胞白血病相关通路,表明 *KDM4A* 可能通过去甲基化操控细胞增殖,改善克隆胚胎的发育能力。Zhang 等<sup>[31]</sup>发现 *KDM4A* 减少 H3K9me3 甲基化,保持细胞周期停滞从而减少细胞衰老。在急性髓细胞白血病患者细胞系中敲低 *KDM4A* 基因显著抑制白血病细胞增殖,说明 *KDM4A* 对急性髓细胞白血病细胞自我更新和存活具有重要作用<sup>[32]</sup>。

表观遗传重编程障碍是限制克隆技术实际应用的一个难题,异常的表观遗传修饰大大降低克隆胚胎效率。研究发现通过组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理<sup>[33,34]</sup>、过表达组蛋白去甲基化酶<sup>[35]</sup>、敲除或者干扰 *XIST* 基因的表达<sup>[36,37]</sup>等方法可修复异常表观遗传修饰,提高克隆胚胎的发育效率。然而,重编程障碍往往是由多个异常表观遗传修饰导致,因此有研究通过联合多种修复手段以加强修复效果。Matoba 等<sup>[5]</sup>发现 *TSA* 与 *KDM4D* 联合处理小鼠克隆胚胎比



TSA 单独处理克隆胚胎能更大幅度地提高囊胚率(87.5% vs 53.8%)。随后 Matoba 等<sup>[38]</sup>使用 *XIST* 突变体的供体细胞和 *KDM4D* mRNA 注射联合处理小鼠克隆胚胎, 极大地提高了克隆小鼠出生率(1.2%~1.8% vs 18.7%~23.5%)。由此可见, 通过联合多种修复手段提高克隆效率是一种可取的研究策略。

总之, 本研究通过过表达组蛋白 H3K9me3 去甲基化酶 *KDM4A* 显著提高了猪克隆胚胎的发育效率, 这对于体外胚胎生产具有重大意义。另一方面, 由于去甲基化酶的 mRNA 获得成本较高, 这种方法在实际生产中不能得到大规模应用。因此, 利用其他更高效的策略修复克隆胚胎异常表观遗传修饰以提高克隆胚胎发育能力仍待进一步研究。

## 附录:

附加材料见文章电子版 [www.chinagene.cn](http://www.chinagene.cn)。

## 参考文献(References):

- [1] Liu Y, Li J, Løvendahl P, Schmidt M, Larsen K, Callesen H. *In vitro* manipulation techniques of porcine embryos: a meta-analysis related to transfers, pregnancies and piglets. *Reprod Fertil Dev*, 2015, 27(3): 429–439. [DOI]
- [2] Yang XQ, Wu ZF, Li ZC. Advances in epigenetic reprogramming of somatic cells nuclear transfer in mammals. *Hereditas (Beijing)*, 2019, 41(12): 1099–1109.  
杨旭琼, 吴珍芳, 李紫聪. 哺乳动物体细胞核移植表观遗传重编程研究进展. *遗传*, 2019, 41(12): 1099–1109. [DOI]
- [3] Huang XW, Cheng XR, Wang N, Zhang YW, Liao C, Jin LH, Lei L. Histone variant H3.3 and its functions in reprogramming. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(3): 186–196.  
黄星卫, 程香荣, 王楠, 张雨薇, 廖辰, 金连弘, 雷蕾. 组蛋白 H3 变体 H3.3 及其在细胞重编程中的作用. *遗传*, 2018, 40(3): 186–196. [DOI]
- [4] Chung YG, Matoba S, Liu YT, Eum JH, Lu F, Jiang W, Lee JE, Sepilian V, Cha KY, Lee DR, Zhang Y. Histone demethylase expression enhances human somatic cell nuclear transfer efficiency and promotes derivation of pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(6): 758–766. [DOI]
- [5] Matoba S, Liu YT, Lu FL, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, Zhang Y. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*, 2014, 159(4): 884–895. [DOI]
- [6] Meng FL, Stamms K, Bennewitz R, Green A, Oback F, Turner P, Wei JW, Oback B. Targeted histone demethylation improves somatic cell reprogramming into cloned blastocysts but not postimplantation bovine concepti. *Biol Reprod*, 2020, 103(1): 114–125. [DOI]
- [7] Zhang YM, Wang QQ, Liu KL, Gao EE, Guan H, Hou J. Treatment of donor cells with recombinant *KDM4D* protein improves preimplantation development of cloned ovine embryos. *Cytotechnology*, 2018, 70(5): 1469–1477. [DOI]
- [8] Liu Z, Cai YJ, Wang Y, Nie YH, Zhang CC, Xu YT, Zhang XT, Lu Y, Wang ZY, Poo M, Sun Q. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2018, 172(4): 881–887. [DOI]
- [9] Janjic A, Wange LE, Bagnoli JW, Geuder J, Nguyen P, Richter D, Vieth B, Vick B, Jeremias I, Ziegenhain C, Hellmann I, Enard W. Prime-seq, efficient and powerful bulk RNA sequencing. *Genome Biol*, 2022, 23(1): 88. [DOI]
- [10] Matoba S, Zhang Y. Somatic cell nuclear transfer reprogramming: mechanisms and applications. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 471–485. [DOI]
- [11] Liu WQ, Liu XY, Wang CF, Gao YW, Gao R, Kou XC, Zhao YH, Li JY, Wu Y, Xiu WC, Wang S, Yin JQ, Liu W, Cai T, Wang H, Zhang Y, Gao SR. Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov*, 2016, 2: 16010. [DOI]
- [12] Wu X, Li G, Ao Z, Shi JS, Cai GY, Liu DW, Wu ZF, Li ZC. Effects of overexpression of H3K9me3 demethylase on the *in vitro* developmental efficiency of cloned porcine embryos. *Guangdong Agric Sci*, 2017, 44(10): 96–101.  
吴霄, 李果, 敖政, 石俊松, 蔡更元, 刘德武, 吴珍芳, 李紫聪. 过表达 H3K9me3 去甲基化酶对猪克隆胚胎体外发育效率的影响. *广东农业科学*, 2017, 44(10): 96–101. [DOI]
- [13] He XY, Tan C, Li ZC, Zhao CF, Shi JS, Zhou R, Wang XW, Jiang GL, Cai GY, Liu DW, Wu ZF. Characterization and comparative analyses of transcriptomes of cloned and *in vivo* fertilized porcine pre-implantation embryos. *Biol Open*, 2019, 8(4): bio039917. [DOI]
- [14] Liu X, Chen L, Wang T, Zhou JL, Li ZK, Bu GW, Zhang JJ, Yin SY, Wu DY, Dou CL, Xu T, He HN, Zhu W, Yu

- LT, Liu ZT, Zhang X, Chen ZX, Miao YL. TDG is a pig-specific epigenetic regulator with insensitivity to H3K9 and H3K27 demethylation in nuclear transfer embryos. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(11): 2674–2689. [DOI]
- [15] Sankar A, Kooistra SM, Gonzalez JM, Ohlsson C, Poutanen M, Helin K. Maternal expression of the histone demethylase KDM4A is crucial for pre-implantation development. *Development*, 2017, 144(18): 3264–3277. [DOI]
- [16] Lee JE, Chung YG, Eum JH, Lee Y, Lee DR. An efficient SCNT technology for the establishment of personalized and public human pluripotent stem cell banks. *BMB Rep*, 2016, 49(4): 197–198. [DOI]
- [17] Ruan DG, Peng JY, Wang XS, Ouyang Z, Zou QJ, Yang Y, Chen FB, Ge WK, Wu H, Liu ZM, Zhao Y, Zhao BT, Zhang QJ, Lai CD, Fan NN, Zhou ZW, Liu QS, Li N, Jin Q, Shi H, Xie JK, Song H, Yang XY, Chen JK, Wang KP, Li XP, Lai LX. XIST derepression in active X chromosome hinders pig somatic cell nuclear transfer. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(2): 494–508. [DOI]
- [18] Weng XG, Cai MM, Zhang YT, Liu Y, Liu C, Liu ZH. Improvement in the *in vitro* development of cloned pig embryos after KDM4A overexpression and an H3K9me3 methyltransferase inhibitor treatment. *Theriogenology*, 2020, 146: 162–170. [DOI]
- [19] Chen M, Zhu QS, Li C, Kou XC, Zhao YH, Li YH, Xu RM, Yang L, Yang LY, Gu L, Wang H, Liu XY, Jiang CZ, Gao SR. Chromatin architecture reorganization in murine somatic cell nuclear transfer embryos. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1813. [DOI]
- [20] Feng Y, Zhao X, Li ZD, Luo C, Ruan ZY, Xu J, Shen PL, Deng YF, Jiang JR, Shi DS, Lu FH. Histone demethylase KDM4D could improve the developmental competence of buffalo (*Bubalus bubalis*) somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos. *Microsc Microanal*, 2021, 27(2): 409–419. [DOI]
- [21] Wang CF, Liu XY, Gao YW, Yang L, Li C, Liu WQ, Chen C, Kou XC, Zhao YH, Chen JY, Wang YX, Le RR, Wang H, Duan T, Zhang Y, Gao SR. Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(5): 620–631. [DOI]
- [22] Cao ZB, Li YS, Chen Z, Wang H, Zhang ML, Zhou NR, Wu RH, Ling YH, Fang FG, Li N, Zhang YH. Genome-wide dynamic profiling of histone methylation during nuclear transfer-mediated porcine somatic cell reprogramming. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144897. [DOI]
- [23] Hernández-Rosas F, Hernández-Oliveras A, Flores-Peredo L, Rodríguez G, Zarain-Herzberg Á, Caba M, Santiago-García J. Histone deacetylase inhibitors induce the expression of tumor suppressor genes Per1 and Per2 in human gastric cancer cells. *Oncol Lett*, 2018, 16(2): 1981–1990. [DOI]
- [24] Zhao Y, Huang SY, Tan XR, Long LF, He QM, Liang XY, Bai JW, Li QJ, Lin JY, Li YQ, Liu N, Ma J, Chen YP. N6-methyladenosine-modified CBX1 regulates nasopharyngeal carcinoma progression through heterochromatin formation and STAT1 activation. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 30: e2205091. [DOI]
- [25] Divisato G, Chiariello AM, Esposito A, Zoppoli P, Zambelli F, Elia MA, Pesole G, Incarnato D, Passaro F, Piscitelli S, Oliviero S, Nicodemi M, Parisi S, Russo T. Hmga2 protein loss alters nuclear envelope and 3D chromatin structure. *BMC Biol*, 2022, 20(1): 171. [DOI]
- [26] Dong GZ, Zhang R, Hu Q, Martin EM, Qin YF, Lu CC, Xia YK, Wang XR, Du GZ. Prothioconazole induces cell cycle arrest by up-regulation of EIF4EBP1 in extravillous trophoblast cells. *Arch Toxicol*, 2022, 96(2): 559–570. [DOI]
- [27] Mahdipour M, Leitoguinho AR, Zacarias Silva RA, van Tol HT, Stout TA, Rodrigues G, Roelen BA. TACC3 is important for correct progression of meiosis in bovine oocytes. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132591. [DOI]
- [28] Heinemann-Yerushalmi L, Bentovim L, Felsenthal N, Vinestock RC, Michaeli N, Krief S, Silberman A, Cohen M, Ben-Dor S, Brenner O, Haffner-Krausz R, Itkin M, Malitsky S, Erez A, Zelzer E. BCKDK regulates the TCA cycle through PDC in the absence of PDK family during embryonic development. *Dev Cell*, 2021, 56(8): 1182–1194.e6. [DOI]
- [29] Krieg AJ, Mullinax SR, Grimstad F, Marquis K, Constance E, Hong Y, Krieg SA, Roby KF. Histone demethylase KDM4A and KDM4B expression in granulosa cells from women undergoing *in vitro* fertilization. *Assist Reprod Genet*, 2018, 35(6): 993–1003. [DOI]
- [30] Zoabi M, Nadar-Ponniah PT, Khoury-Haddad H, Usaj M, Budowski-Tal I, Haran T, Henn A, Mandel-Gutfreund Y, Ayoub N. RNA-dependent chromatin localization of KDM4D lysine demethylase promotes H3K9me3 demethylation. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(21): 13026–13038. [DOI]
- [31] Zhang BY, Long QL, Wu SS, Xu QX, Song SL, Han L, Qian M, Ren XH, Liu HX, Jiang J, Guo JM, Zhang XL, Chang X, Fu Q, Lam EWF, Campisi J, Kirkland JL, Sun Y.

- KDM4 orchestrates epigenomic remodeling of senescent cells and potentiates the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Aging*, 2021, 1(5): 454–472. [DOI]
- [32] Massett ME, Monaghan L, Patterson S, Mannion N, Bunschoten RP, Hoose A, Marmiroli S, Liskamp RMJ, Jørgensen HG, Vetrie D, Michie AM, Huang X. A KDM4A-PAF1-mediated epigenomic network is essential for acute myeloid leukemia cell self-renewal and survival. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 573. [DOI]
- [33] Zhao JG, Hao YH, Ross JW, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN, Prather RS. Histone deacetylase inhibitors improve *in vitro* and *in vivo* developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell Reprogram*, 2010, 12(1): 75–83. [DOI]
- [34] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin a after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183–189. [DOI]
- [35] Wang FC, Kou ZH, Zhang Y, Gao SR. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, 2007, 77(6): 1007–1016. [DOI]
- [36] Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang XZ, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science*, 2010, 330(6003): 496–499. [DOI]
- [37] Li GL, Zhong CL, Ni S, Liu DW, Cai GY, Li ZC, Yang HQ, Wu ZF. Establishment of porcine Xist knockout model using CRISPR/Cas9 system. *Hereditas (Beijing)*, 2016, 38(12): 1081–1089.  
李国玲, 钟翠丽, 倪生, 刘德武, 蔡更元, 李紫聪, 杨化强, 吴珍芳. 利用 CRISPR/Cas9 系统建立 Xist 基因敲除猪模型. *遗传*, 2016, 38(12): 1081–1089. [DOI]
- [38] Matoba S, Wang HH, Jiang L, Lu FL, Iwabuchi KA, Wu XJ, Inoue K, Yang L, Press W, Lee JT, Ogura A, Shen L, Zhang Y. Loss of H3K27me3 imprinting in somatic cell nuclear transfer embryos disrupts post-implantation development. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(3): 343–354. [DOI]

(责任编辑: 李明洲)

附表 1 差异基因信息

Supplementary Table 1 Differentially expressed genes information

基因	log <sub>2</sub> (fold change)	q-value	基因全称
KLF8	1.997811	0.000355	Kruppel like factor 8
DNMT3B	1.473665	0.000659	DNA methyltransferase 3 beta
PTPRF	2.130052	0.003008	protein tyrosine phosphatase receptor type F
TRAF4	1.927727	0.004178	TNF receptor associated factor 4
TRAF4	1.927727	0.004178	TNF receptor associated factor 4
DPH1	1.563425	0.004902	diphthamide biosynthesis 1
CCDC97	2.146315	0.007649	coiled-coil domain containing 97
RRAS	2.128313	0.007649	RAS related
ZFAND2A	1.35894	0.009931	zinc finger AN1-type containing 2A
EEF1AKMT4	5.96823	0.010173	endothelin converting enzyme 2
CSF1R	5.41609	0.011293	colony stimulating factor 1 receptor
CSF1R	5.41609	0.011293	colony stimulating factor 1 receptor
TACC3	1.1706	0.018806	transforming acidic coiled-coil containing protein 3
LOC100517161	6.346102	0.02264	zinc finger protein 84-like
LZTS3	2.470845	0.024996	leucine zipper tumor suppressor family member 3
WDR45	1.426172	0.024996	WD repeat domain 45
HSD11B1L	1.771295	0.025865	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 like
IL12RB2	2.234814	0.027892	interleukin 12 receptor subunit beta 2
ARHGEF7	1.475472	0.027892	Rho guanine nucleotide exchange factor 7
PRRT1B	1.514937	0.02821	proline rich transmembrane protein 1B
ZNF384	1.669346	0.030105	zinc finger protein 384
CUX2	1.287183	0.030105	cut like homeobox 2
RBM15B	1.124991	0.030105	RNA binding motif protein 15B
ZNF672	3.250366	0.030105	zinc finger protein 672
JMJD6	1.103369	0.031022	jumonji domain containing 6 arginine demethylase and lysine hydroxylase
LRRC47	1.296819	0.031022	leucine rich repeat containing 47
C9orf131	5.301555	0.03108	chromosome 1 C9 or f131 homolog
BCKDK	1.004491	0.032355	branched chain keto acid dehydrogenase kinase
PER1	1.502214	0.035736	period circadian regulator 1
NCOR2	2.296356	0.035901	nuclear receptor corepressor 2
TULP2	2.752729	0.036941	TUB like protein 2
TMEM201	1.402187	0.036941	transmembrane protein 201
NR2C2AP	1.553903	0.036941	nuclear receptor 2C2 associated protein
FAM241B	1.153835	0.038544	family with sequence similarity 241 member B
TIGD3	6.184582	0.038697	tigger transposable element derived 3
PPM1N	1.32515	0.040641	protein phosphatase, Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> dependent 1N (putative)
RGS16	1.328882	0.043015	regulator of G protein signaling 16
APOA4	6.063794	0.043015	apolipoprotein A4
RPL8	1.341393	0.045651	ribosomal protein L8
EIF4EBP1	1.056223	0.046982	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1

续表

基因	log <sub>2</sub> (fold change)	q-value	基因全称
MAP7	-1.01647	0.043015	microtubule associated protein 7
RBM7	-1.09526	0.049147	RNA binding motif protein 7
ART3	-1.18316	0.02821	ADP-ribosyltransferase 3
SCOC	-1.1983	0.01475	short coiled-coil protein
SPRY1	-1.2183	0.0036	sprouty RTK signaling antagonist 1
GCG	-1.29965	0.043015	glucagon
PCDH17	-1.31635	0.011002	protocadherin 17
GEN1	-1.55485	0.024996	GEN1 Holliday junction 5' flap endonuclease
DISP1	-1.60972	0.013646	dispatched RND transporter family member 1
TGFBR1	-1.64664	0.016093	transforming growth factor beta receptor 1
CALB1	-1.76425	0.046817	calbindin 1
ZNF169	-1.77106	0.024996	zinc finger protein 169
CLUL1	-1.88808	0.017345	clusterin like 1
ZNF883	-1.98158	0.000322	zinc finger protein 883
STX17	-2.03357	0.000584	syntaxin 17
STK17B	-2.14307	0.006393	serine/threonine kinase 17b
HMGA2	-2.16743	0.002167	high mobility group AT-hook 2
TYRP1	-2.18668	0.046982	tyrosinase related protein 1
BHLHE41	-2.28545	0.030105	basic helix-loop-helix family member e41
KCNJ13	-2.29227	0.000368	potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 13
GABRA2	-2.31172	0.02264	gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit alpha2
B3GNT5	-2.32781	0.000106	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
TWSG1	-2.35874	0.014833	twisted gastrulation BMP signaling modulator 1
LGALS1	-2.41885	0.006393	galectin like
MEOX2	-2.45842	0.018806	mesenchyme homeobox 2
VEGFC	-2.49785	0.036941	vascular endothelial growth factor C
TMEM269	-2.532	0.038601	transmembrane protein 269
LRCH1	-2.57745	0.024996	leucine rich repeats and calponin homology domain containing 1
PDIK1L	-3.03761	0.008081	PDLIM1 interacting kinase 1 like
ZIC4	-3.32435	0.031875	Zic family member 4
PROKR1	-3.38365	0.045054	prokineticin receptor 1
NEFL	-3.69491	0.005516	neurofilament light
ANKRD29	-3.75671	0.005516	ankyrin repeat domain 29
MECOM	-3.88929	0.048823	MDS1 and EVI1 complex locus
SERPINA11	-3.95704	0.036941	serpin family A member 11
CBLN4	-4.05442	0.024996	cerebellin 4 precursor
SLC17A8	-4.29634	0.011487	solute carrier family 17 member 8
ADAMTS20	-4.45725	0.034726	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 20
GPRC6A	-4.46843	0.024996	G protein-coupled receptor class C group 6 member A
LRRC9	-4.55004	3.94E-05	leucine-rich repeat-containing protein 9



续表

基因	$\log_2(\text{fold change})$	$q$ -value	基因全称
KLHL6	-4.61095	8.44E-05	kelch like family member 6
CSN2	-4.63826	0.027892	casein beta
LIPG	-5.28891	5.13E-09	lipase G, endothelial type
HCLS1	-5.48452	0.046817	hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
CREG2	-5.95678	0.038601	cellular repressor of E1A stimulated genes 2
FAM111B	-6.19037	0.001094	family with sequence similarity 111 member B
PRSS35	-6.5115	0.046817	serine protease 35
CTLA4	-6.68741	0.020276	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4

列表包括 88 个差异基因，其中 40 个上调基因，48 个下调基因；差异基因中还有 45 个基因（上调 12 个，下调 33 个）没有基因名称，未放入此表。