



基于山羊40K液相芯片鉴定的 *RHO* 基因调控山羊产羔数的机制探究

谢蓓伊庭, 沈阳阳, 安振江, 孟春花, 刘丰慧, 张俊, 张建丽, 曹少先, 李隐侠*, 钱勇*
(江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏省畜禽精准育种工程研究中心, 农业农村部种养结合重点实验室, 南京 210014)

摘要: 旨在筛选与山羊产羔数关联的候选基因, 探究 *RHO* 基因调控山羊产羔数的分子机制。本研究利用 GenoBaits® 山羊 40K 液相芯片对 337 只正在选育的波尔山羊与海门山羊的杂交群体进行 SNP 基因分型, 结合头胎产羔表型进行全基因组关联分析; PCR 方法克隆山羊 *RHO* 基因编码区, 进行序列和结构特征分析; 分离山羊卵巢大、小卵泡和卵巢颗粒细胞, 采用 RT-qPCR、CCK-8、ELISA 等方法检测基因表达水平、细胞增殖及雌激素水平。结果鉴定到山羊第 28 号染色体的 44 302 456 处即 *RHO* 基因上游 177 365 bp 处的 C/T 突变与头胎产羔数显著关联; 克隆得到山羊 *RHO* 基因编码区全长 768 bp, 编码 255 个氨基酸残基, 与其他哺乳动物高度同源; *RHO* 基因在山羊各组织中广泛表达, 在卵巢组织中极显著高表达 ($P < 0.01$), 且在小卵泡中的表达水平极显著高于大卵泡 ($P < 0.01$); 过表达 *RHO* 基因显著降低细胞增殖能力 ($P < 0.05$) 和细胞增殖标志基因 *PCNA* ($P < 0.05$)、*MKI67* ($P < 0.01$) 的 mRNA 表达水平, 显著下调山羊卵巢颗粒细胞中 *CYP19A1* 基因表达水平和培养液中 E2 浓度 ($P < 0.05$)。本研究基于山羊 40K 液相芯片鉴定到 *RHO* 基因与山羊产羔数显著关联, 研究发现其通过负调控山羊卵巢颗粒细胞增殖, 降低颗粒细胞 *CYP19A1* 的表达, 抑制 E2 的合成从而调控山羊的产羔性能。

关键词: 山羊 40K 液相芯片; *RHO*; 细胞增殖; 雌激素合成

中图分类号: S827.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0258-12

Mechanism Investigation of *RHO* Gene Regulation on Goat Litter Size Based on the Goat 40K Liquid Chip

XIE Beiyiting, SHEN Yangyang, AN Zhenjiang, MENG Chunhua, LIU Fenghui, ZHANG Jun,
ZHANG Jianli, CAO Shaoxian, LI Yinxia*, QIAN Yong*

(Key Laboratory of Crop and Animal Integrated Farming of Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Jiangsu Province Engineering Research Center for Precision Animal Breeding, Institute of Animal Science,
Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The study aimed to screen candidate genes associated with litter size in goats and investigate the molecular mechanism by which the *RHO* gene regulates goat litter size. The GenoBaits® Goat 40K liquid chip was used to perform SNP genotyping on a hybrid population of 337 Boer goats and Haimen goats under selection, and a genome-wide association study was conducted in combination with the first-parity litter size phenotype. The coding region of the goat *RHO* gene was cloned by the PCR method, and its sequence and structural characteristics were analyzed. The large

收稿日期: 2025-05-07

基金项目: 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS[2021]114)

作者简介: 谢蓓伊庭, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖相关研究, E-mail: eating0314@163.com

* 通信作者: 李隐侠, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: liyxmh@jaas.ac.cn; 钱勇, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: jaasqy@163.com

and small follicles and ovarian granulosa cells of goats were isolated, and methods such as RT-qPCR, CCK-8, and ELISA were used to detect gene expression levels, cell proliferation, and estrogen levels. A C/T mutation on chromosome 28 (position 44 302 456, 177 365 bp upstream of *RHO*) was significantly associated with first-parity litter size. The cloned *RHO* coding region spanned 768 bp, encoding 255 amino acids with high homology to other mammals. The *RHO* gene was widely expressed in various tissues of goats, and its expression was extremely significantly higher in ovarian tissue ($P < 0.01$), and the expression level in small follicles was extremely significantly higher than that in large follicles ($P < 0.01$). Overexpression of the *RHO* gene significantly reduced cell proliferation ability ($P < 0.05$) and the mRNA expression levels of cell proliferation marker genes *PCNA* ($P < 0.05$) and *MKI67* ($P < 0.01$), and significantly down-regulated the expression level of the *CYP19A1* gene and the E2 concentration in the culture medium of goat ovarian granulosa cells ($P < 0.05$). This study identified that the *RHO* gene was significantly associated with goat litter size based on the goat 40K liquid chip. The study found that it regulates goat litter performance by negatively regulating the proliferation of goat ovarian granulosa cells, reducing the expression of *CYP19A1* in granulosa cells, and inhibiting the synthesis of E2.

Keywords: goat 40K liquid chip; *RHO*; cell proliferation; estrogen synthesis

* **Corresponding authors:** LI Yinxia, E-mail: liyxmh@jaas.ac.cn; QIAN Yong, E-mail: jaasqy@163.com

产羔性能是衡量山羊经济效益的重要指标之一,受多个潜在基因调控^[1-3]。在不同山羊品种中已鉴定到多个基因的遗传变异对产羔数有显著的影响,如 Zhang^[4]等发现细胞分裂周期蛋白 25A (*CDC25A*) 基因核心启动子区 g. 51731829A>C 突变与山羊产羔数显著关联,AA 型个体的产羔数显著优于其他基因型;*KISS1* 基因 g. 2540 C>T 突变与印度山羊产羔数显著关联,CT 和 TT 型个体的产羔数显著高于 CC 型^[5]。然而,可能还存在其他影响山羊产羔性能的未知基因。随着 SNP 基因分型技术的不断发展和应用,开展全基因组关联分析 (GWAS) 鉴定与经济性状显著关联的候选基因和遗传变异变得更加高效和快捷^[6]。液相芯片是一种用于 SNP 分型和全基因组关联分析的高效工具,通常包含数万个在基因组上均匀分布的 SNPs 位点,可实现对个体基因组的全面扫描^[7]。在绵羊方面,张嘉良等^[8]基于 50K 液相芯片进行 8 个绵羊群体遗传结构分析和羊毛性状的选择信号分析;在家驴方面,设计一款 40K 液相芯片用于家驴早期的分子标记辅助选择、品种鉴定等^[9]。本研究利用山羊 40K 液相芯片通过关联分析鉴定到 *RHO* 基因 (ras homolog family member U) 与山羊头胎产羔数显著关联,但是 *RHO* 如何调控山羊的产羔性能尚未可知。

RHO 也称为 WRCH1 (Wnt 反应性 Cdc42 同系物 1),是 Rho GTPase 家族中的一员,在细胞骨架重组、细胞迁移、增殖和信号转导等过程中发挥重要作用^[10-11]。在体外培养的细胞中,*RHO* 可调控粘着斑的形成,控制细胞的黏附与迁移^[12-13],同时还参与紧密连接的形成和上皮形态发生^[14]。以神经嵴细胞的上皮间质转化过程为例,上调 *RHO* 会影响细胞极性和迁移,而下调 *RHO* 则会正向调控细胞的粘附过程^[15]。*RHO* 蛋白作用于肌动蛋白细胞骨架,刺激细胞形成纤毛状突起,同时还能刺激静止细胞重新进入细胞周期^[16]。*RHO* 还在多种生物模型的发育过程中发挥作用:在非洲爪蟾和鸡胚胎中,*RHO* 及其最近缘蛋白 THOV 受 Wnt 信号诱导,分别调控神经嵴细胞的迁移和特化阶段^[17]。在斑马鱼心脏形态发生期间,Wnt 信号刺激房室管中 *RHO* 的表达,其功能缺失会损害房室管形成和心脏环化的过程^[18]。在繁殖发育方面,*RHO* 在多种脊椎动物胚胎的早期发育阶段均有表达^[19],例如在鸡胚中,*RHO* 在 Hamburger-Hamilton 5 期的原条和 Hensen 结中表达,在前神经板中也能检测到其存在^[20]。

本研究通过全基因组关联分析方法筛选出 *RHO* 基因与山羊产羔数显著关联。然而,从当前研究现状来看,*RHO* 基因在调控动物繁殖领域的

研究仍处于相对薄弱阶段,关于其在山羊上的序列特征、表达模式等研究更是鲜有报道。为进一步解析 *RHO* 基因调控山羊产羔性能的分子机制,本研究拟克隆山羊 *RHO* 基因编码区,深入分析其序列和结构特征,探究其在山羊各组织中的表达模式,并重点解析其对山羊卵巢颗粒细胞功能包括细胞增殖、雌激素合成能力的影响,初步阐明其调控山羊卵泡发育及产羔性能的潜在分子机制,为揭示山羊繁殖性能的调控机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用山羊为正在选育的波尔山羊(Boer goats)和海门山羊(Haimen goats)的杂交群体,来自江苏绿羊谷养殖科技发展有限公司,统一饲养管理,营养和饲养管理条件一致,其产羔记录由该公司提供。使用 EDTA-K2 抗凝管采取 337 只成年的选育群母羊颈静脉血液 2 mL,寄往石家庄博瑞迪生物技术有限公司进行 GenoBaits®山羊 40K 液相芯片(型号:PHR0176_Ch40K_V1.0)的 SNP 基因分型。随机选取选育群成年山羊母羊 3 只,屠宰后收集心、肝、脾、肺、肾、卵巢和腿肌组织,放入 -80 °C 冰箱中保存备用。试验中用来分离卵巢颗粒细胞的山羊卵巢取自海安屠宰场,放于 37 °C 生理盐水中,4 h 以内带回实验室,分离大、小卵泡和卵巢颗粒细胞^[21]。

1.2 基因组 SNPs 测定、数据处理及关联分析

利用 Plink(V1.90)软件对 337 只山羊基因组中的 SNPs 位点进行质控,质控标准参考史露露等^[22]的研究,质控后的 SNPs 位点采用混合线性模型与产羔记录表型进行全基因组关联分析。GWAS 显著性阈值采用 Bonferroni 校正法设定,即 $P < 1.11 \times 10^{-6}$ (0.05/45,023),同时参考 suggestive 阈值 $P < 2.22 \times 10^{-5}$ (1/45,023)。模型如下:

$$y = X\alpha + Z\beta + W\mu + e$$

式中, y 为目标位点基因型的效应量; α 为所有固定效应构成的向量; β 表示标记效应, SNP; μ 表示随机效应,这里指个体的亲缘关系; e 表示随机残差效应向量; X 、 Z 、 W 分别表示 α 、 β 、 μ 的结构矩阵。

1.3 试验过程中使用的试剂

试验中 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis kit (+gDNA wiper) 和 real-time PCR 试剂盒 ChamQ Universal

SYBR qPCR Master Mix、2×Phanta Master Mix (Dye Plus)、Lipofectmine3000 转染试剂、CCK-8 试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司, DNA 胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.4 卵巢颗粒细胞的分离、培养和细胞转染

将从屠宰场中带回的卵巢取出并置于大烧杯中,用大量生理盐水冲洗 3 遍至清澈;手术剪剪掉卵巢周围组织,置于烧杯中;生理盐水冲洗两次,75% 酒精冲洗 20 s 后迅速捞出,生理盐水再次冲洗 3 次;选取 3~5 mm 大小,表面光滑透亮的卵泡,用 5 mL 注射器搭配 5.5 号输液针头抽取卵泡液,打入装有 PBS(含 1% 双抗)的 15 mL 离心管中;1 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,弃掉上清,加入 5 mL PBS 重悬,再离心 5 min,重复两次;清洗后的细胞弃掉上清,细胞沉淀用预热的 DMEM/F-12(含 1% 双抗)培养基重悬细胞并将细胞接种于 6 孔板中,置于 37 °C、5% CO_2 细胞培养箱中培养;24 h 后观察细胞贴壁情况,吸出 1 mL 培养基弃掉,加入 1 mL 新鲜培养液;48 h 后观察细胞情况, PBS 清洗 2 次,更换新鲜培养液,进行后续试验。

分离的卵巢颗粒细胞使用含有 10% 胎牛血清(FBS, Sigma)和 1% 青霉素-链霉素混合液(penicillin-streptomycin solution, 100×)的 DMEM/F12(上海源培生物科技股份有限公司)培养基在 37 °C、5% CO_2 培养箱中恒温培养。铺板至 12 孔板,利用 Lipofectmine 3000 转染 pcDNA3.1(+)和 pcDNA3.1-*RHO*,开展后续试验。

1.5 RNA 提取和逆转录

采用 RNA 提取试剂盒提取山羊组织、大小卵泡、山羊卵巢颗粒细胞的 mRNA, Nanodrop2000 测定 RNA 的浓度和纯度;用逆转录试剂盒合成 cDNA 的第一链,备用。

1.6 引物的合成、PCR 扩增

根据山羊 *RHO* 预测序列(序列号:XM_018042530.1)、*CYP19A1* 预测序列(序列号:NM_001285747.1)、*MKI67* 预测序列(序列号:XM_005698601.3)、*PCNA* 预测序列(序列号:XM_005688167.3)用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,用于山羊 *RHO* 基因编码区的扩增、表达载体构建和山羊 *RHO* 基因组织表达谱的鉴定。内参基因 *GAPDH* 序列参考文献[23]。引物由南京擎科生物科技有限公司合成,基因对应的引物名称、引物序列、片段长度等相关信息见表 1。

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

引物 Primer	基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primers sequence	退火温度/℃ T _m	产物长度/bp Products length	用途 Usage
P1	<i>RHO</i>	F: ATAAAGCTTACCTACCCGACCGCCTTTGT R: ATACTCGAGACTTTCACCCTGGACACC	63	1 190	CDS 扩增及表达载体构建
P2	<i>RHO</i>	F: GTCAGTGAGAAATGGGTGC R: TGTAGGAGGTGGCTTTGAT	60	187	RT-qPCR
P3	<i>CYP19A1</i>	F: ATCCCGATTGTCAGTAA R: TGTAAGAAAGGTGCAACAG	60	109	RT-qPCR
P4	<i>MKI67</i>	F: GAGGTGGCTCAGGTTCGT R: TCGGATCTGGGTTTCATA	60	114	RT-qPCR
P5	<i>PCNA</i>	F: AAGTGCTGGAGGCGCTTAA R: TTGGACATGCTGGTGAGG	60	190	RT-qPCR
P6	<i>GAPDH</i>	F: TCGGAGTGAACGGATTCTG R: ATCTCGCTCCTGGAAGATG	60	227	RT-qPCR

下划线部分为添加的 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点

The underlined area for the added digestion site of *Hind* III and *Xho* I

1.7 生物信息学分析

利用 DNAMAN 6.0、Snapgene 6.0 软件对山羊 *RHO* 基因核苷酸和氨基酸序列与其他哺乳动物进行比对,参考物种序列见表 2。

表 2 不同物种 *RHO* 序列信息Table 2 *RHO* sequence information of different species

物种 Species	登录号 Accession No.	
	核苷酸 登录号 Nucleotide No.	氨基酸 登录号 Amino acid No.
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_021205.6	NP_067028.1
牛 <i>Bos taurus</i>	NM_001098147.1	NP_001091616.1
猪 <i>Sus scrofa</i>	XM_021072737.1	XP_020928396.1
鼠 <i>Mus musculus</i>	NM_133955.5	NP_598716.1

1.8 RT-qPCR

采用 RT-qPCR 方法检测 *RHO* 基因在山羊各组织的表达模式、过表达山羊 *RHO* 卵巢颗粒细胞中 *RHO* 基因 (*RHO* 过表达效率检测) 表达水平、*RHO* 基因在山羊大卵泡和小卵泡中的表达水平。20 μ L 反应体系包括 1 μ L cDNA, 上、下游引物各 0.4 μ L, 2 $\times$ ChamQ Universal SYBR PCR Master Mix 10 μ L, 最后加 ddH₂O 补齐至 20 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s (40 个循环); 熔解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 60 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s。每个组织样品及 *GAPDH* 内参基因各设置 3 孔重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析处理数据。

1.9 *RHO* 基因过表达载体的构建

限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切质粒 pcDNA3.1(+) 和 PCR 扩增获得的 *RHO* 基因胶回收产物, 37 $^{\circ}$ C 3 h 后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收后将酶切后的质粒和基因片段用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 转化感受态细胞 DH5 α 后取适量涂于含 Amp 抗性的琼脂板中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 挑取单克隆, 测序鉴定得到过表达载体 pcDNA3.1-*RHO*。

1.10 CCK-8 检测

将 96 孔板中转染 pcDNA3.1(+) 的对照组山羊卵巢颗粒细胞和 pcDNA3.1-*RHO* 的试验组山羊卵巢颗粒细胞分别于 24、48 h 后加入 CCK-8 溶液, 利用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (OD 值), 分析 *RHO* 基因对山羊卵巢颗粒细胞增殖的影响。

1.11 E2 含量测定

在 12 孔板中培养转染 pcDNA3.1(+) 的对照组山羊卵巢颗粒细胞和 pcDNA3.1-*RHO* 的试验组山羊卵巢颗粒细胞, 48 h 后收取细胞培养液, 将收集的培养液采用雌二醇 (Estradiol, E2) 试剂盒 (北方生物技术研究所, 北京) 进行测定。显色终止后, 利用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光值 (OD 值)。

1.12 数据分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件执行 T 检验对不同处理的两组数据进行统计学处理分析, “ns”、“*”和 “**” 分别表示差异不显著 ($P > 0.05$)、差异显著 ($P < 0.05$) 和差异极显著 ($P < 0.01$)。

2 结果

2.1 选育山羊基因组 SNP 测定及质量控制

使用山羊 40K-GBTS 芯片对 337 个正在选育的山羊群体个体进行 SNP 检测,其中个体检出率为

100%,原始数据经过质控获得 45 023 个 SNPs 位点用于后续分析,常染色体上所有 SNPs 分布情况(图 1)表明,变异位点主要分布在基因间区(占比 54.86%)和内含子区(占比 37.76%)。

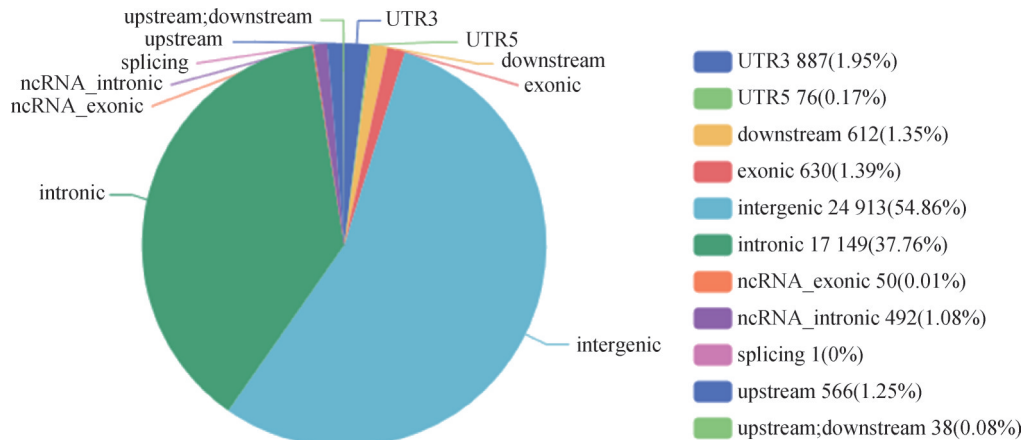


图 1 基于 40K 液相芯片的 SNPs 基因分布情况

Fig. 1 The distribution of SNPs among genes was investigating using the 40K chip

2.2 全基因组关联分析及候选基因 SNPs 鉴定

基于山羊 40K SNPs 芯片技术,采用混合线性模型对 337 个杂交山羊样本的头胎产羔数表型和质

控后约 40K SNPs 分子标记进行全基因组关联分析。结果显示,1 个 SNP 位点与选育山羊的头胎产羔数显著关联,位于 28 号染色体(图 2)。

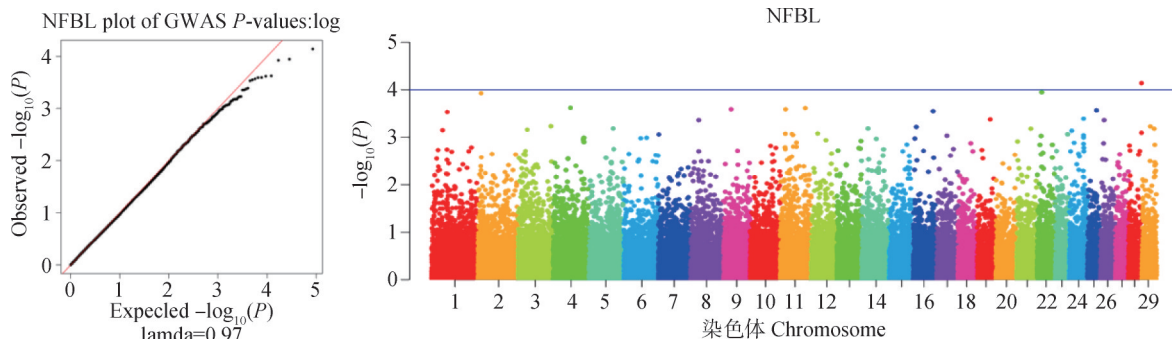


图 2 基于 40K 芯片测序结果的选育群山羊头胎产羔数的 QQ 图和曼哈顿图

Fig. 2 QQ and Manhattan plots of the first-parity litter size of goats in the breeding population based on the sequencing results of the 40K chip

将此显著的 SNP 进行注释发现,该位点位于第 28 号染色体 (NCBI 序列号: NC_030835.1) 的 44 302 456 处,位于 *RHOU* 基因上游 177 365 bp 处的 C/T 突变。SPSS 软件分析结果再一次确认了 *RHOU* 基因 44 302 456 位的 C/T 突变与杂交山羊头胎产羔数的显著关联(表 3)。

2.3 山羊 *RHOU* 基因 CDS 区的扩增

提取山羊卵巢组织 RNA,逆转录得到 cDNA,

并以此 cDNA 为模板,P1 为引物(表 1)进行 PCR 扩增,得到特异性条带 1 条(图 3)。测序发现扩增产物大小与预测结果一致,与引物源序列的一致性为 99.39%,说明该扩增产物为山羊 *RHOU* 基因的 CDS 区。

2.4 山羊 *RHOU* 基因 CDS 区序列分析

测序分析发现山羊 CDS 区全长 768 bp,碱基组成分析发现山羊 *RHOU* 基因 CDS 区序列中 A、T、

表 3 繁殖性能相关 SNP 关联分析结果

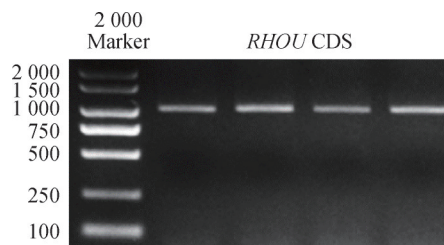
Table 3 Results of association analysis of SNP related to reproductive performance

基因名称 Gene	基因型 Genotype	头胎产羔数 The first-parity litter size
<i>RHO</i>	TT	2.19 ± 1.25 ^a
	TC	2.30 ± 1.33 ^{ab}
	CC	1.65 ± 0.80 ^c

肩标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 肩标相同小写字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)

Different lowercase letters as superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$), while the same lowercase letter as superscript indicate no significant difference ($P > 0.05$)

G、C 碱基含量分别为 20.19%、17.32%、31.11% 和 31.38%, 其中 A+T 含量为 37.51%, G+C 含量为 62.49%。与 NCBI 网站中山羊 *RHO* 基因预测序列 (登录号: XM_018042530.1) 比对发现, 本研究扩增的山羊 *RHO* 基因序列与预测序列的相似性为

图 3 *RHO* 基因 CDS 区扩增电泳产物凝胶电泳图Fig. 3 Gel electrophoresis image of amplified products from the CDS region of *RHO* gene

99.61%, 有 3 处碱基发生了突变, 包括第 378 bp 处 T>C 突变, 引起第 129 位氨基酸由 Gly 变为 Arg; 第 385 bp 处的 G>C 突变, 引起第 160 位氨基酸由 Ser 变为 Thr; 以及未造成氨基酸改变的 478 bp 处 T>A 突变。山羊 *RHO* CDS 核苷酸序列与人、牛、猪和小鼠的核苷酸序列相似性分别为 88.93%、97.14%、90.22% 和 85.50% (图 4)。

图 4 不同物种 *RHO* 基因核苷酸序列比对结果Fig. 4 Alignment result of nucleotide sequence of *RHO* gene among different species

2.5 山羊 *RHO* 氨基酸序列分析

测序获得的山羊 *RHO* 基因编码 255 个氨基酸残基,蛋白序列比对发现,*RHO* 蛋白与人、牛、

猪和小鼠的氨基酸序列相似性分别为 96.47%、98.43%、94.12% 和 88.24%(图 5)。

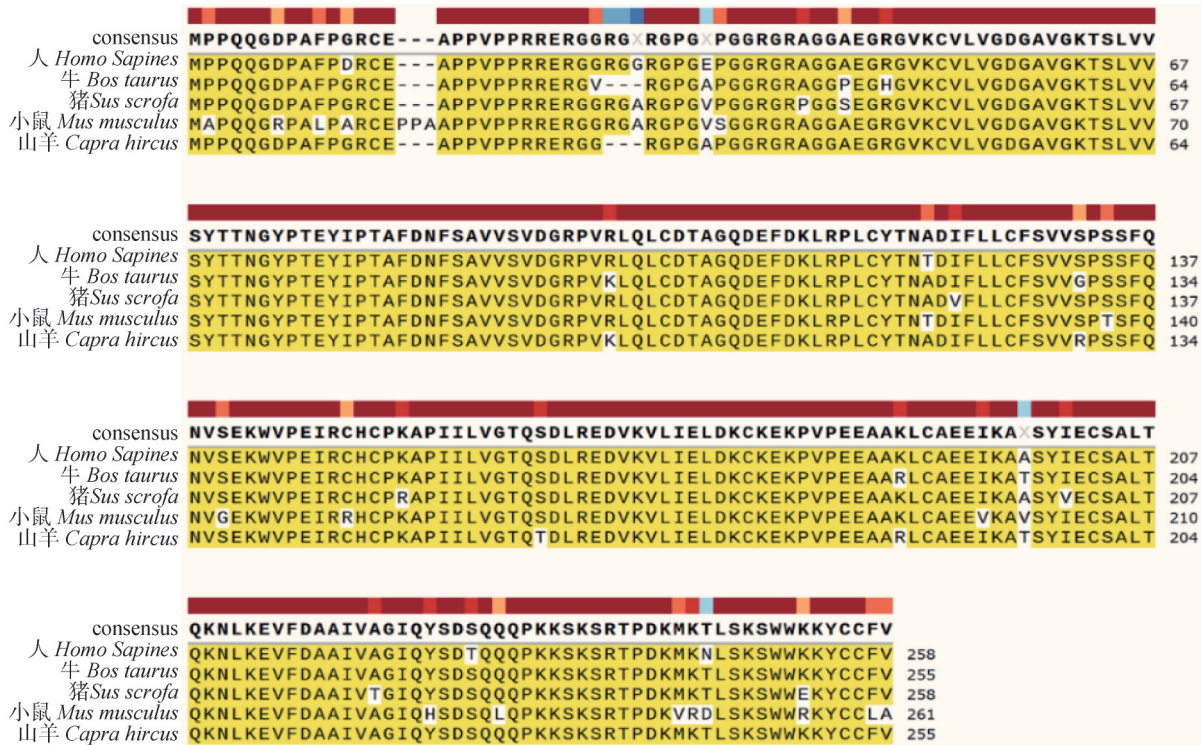
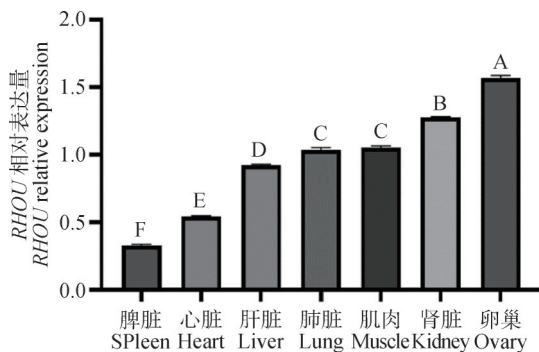


图 5 不同物种 *RHO* 氨基酸序列相似性比对结果

Fig. 5 Alignment result of amino acid sequence of *RHO* among different species

2.6 山羊 *RHO* 基因组织表达模式

为了检测 *RHO* 基因在山羊各组织的表达模式,以 *GAPDH* 基因为内参,RT-qPCR 检测发现 *RHO* 基因在山羊各组织中广泛表达,其中在卵巢中高表达,并极显著高于其他组织($P < 0.01$,图 6)。



不同大写字母间表示差异极显著($P < 0.01$)

Different capital letters indicate extremely significant differences ($P < 0.01$)

图 6 山羊 *RHO* 基因组织表达谱

Fig. 6 The tissue expression profile of *RHO* gene in goat

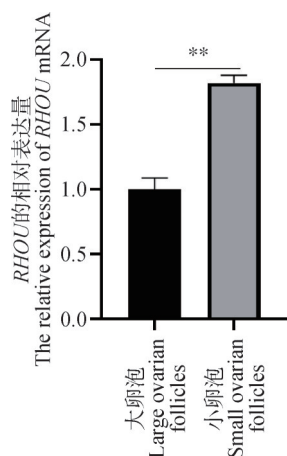
2.7 *RHO* 基因参与调控卵泡的发育

分离山羊卵巢中的大卵泡和小卵泡,提取 RNA, RT-qPCR 方法检测大、小卵泡中 *RHO* 的表达水平。结果发现 *RHO* 在大卵泡中的 mRNA 表达水平极显著低于小卵泡($P < 0.01$,图 7)。

2.8 山羊 *RHO* 基因过表达载体构建和效率的检测

以山羊卵巢组织 cDNA 为模板,利用引物 P1 (表 1)扩增山羊 *RHO* 基因 CDS 区。扩增产物用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切,克隆到过表达载体 pcDNA3.1(+)中,转化 DH5 α 感受态细胞,提取质粒并进行酶切鉴定,结果显示目的片段成功连接到载体中(图 8A)。

分离山羊卵巢颗粒细胞,将 pcDNA3.1 空载(对照组)和 pcDNA3.1-*RHO* 载体(试验组)转染至山羊卵巢颗粒细胞中,24 h 后收集对照组和试验组细胞,提取 RNA。RT-qPCR 检测发现,试验组细胞中 *RHO* 的 mRNA 表达水平极显著高于对照组



*表示差异显著 ($P < 0.05$); **表示差异极显著 ($P < 0.01$); ns 表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下同

* indicate significant difference ($P < 0.05$); ** indicate extremely significant difference ($P < 0.01$); ns indicate no significant difference ($P > 0.05$). The same as below

图7 大、小卵泡中 *RHO* 的 mRNA 水平

Fig. 7 The mRNA levels of *RHO* in large and small ovarian follicles

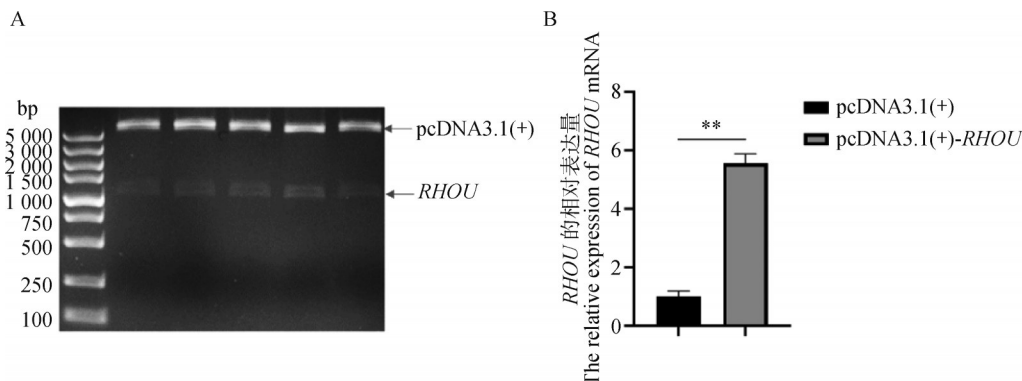
($P < 0.01$, 图 8B), 表明所构建载体在山羊卵巢颗粒细胞中成功过表达 *RHO* 基因。

2.9 *RHO* 基因对山羊卵巢颗粒细胞增殖的影响

采用 CCK-8 试剂盒检测 *RHO* 基因对山羊卵巢颗粒细胞增殖的影响, 结果显示, 过表达山羊 *RHO* 基因 24、48 h 后, 试验组与对照组的 $OD_{450\text{ nm}}$ 值均显著下降 ($P < 0.05$, 图 9A)。RT-qPCR 检测显示, 与对照组相比, 过表达山羊 *RHO* 基因后山羊卵巢颗粒细胞中调控细胞增殖的标志基因 *PCNA* 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$, 图 9B), *MKI67* 的 mRNA 表达水平极显著降低 ($P < 0.01$, 图 9C)。

2.10 *RHO* 基因调控山羊颗粒细胞 E2 合成

为了进一步探究 *RHO* 调控山羊繁殖性能的机制, 在山羊卵巢颗粒细胞中过表达 *RHO* 基因, RT-qPCR 检测发现, 与对照组相比, 过表达山羊 *RHO* 基因后山羊颗粒细胞中 *CYP19A1* 基因表达水平极显著下降 ($P < 0.01$, 图 10A)。ELISA 方法检测过表达 *RHO* 后培养液中 E2 的含量, 结果发现, 与对照组相比, 过表达 *RHO* 极显著下调培养液中 E2 浓度 ($P < 0.01$, 图 10B), 说明 *RHO* 基因参与调控山羊卵巢颗粒细胞中雌激素的合成。



A. pcDNA3.1-*RHO* 质粒双酶切后 PCR 鉴定; B. 过表达 *RHO* 后的 *RHO* mRNA 水平

A. Identification by PCR after double enzyme digestion of the pcDNA3.1-*RHO* plasmid; B. The mRNA level of *RHO* after the overexpression of *RHO*

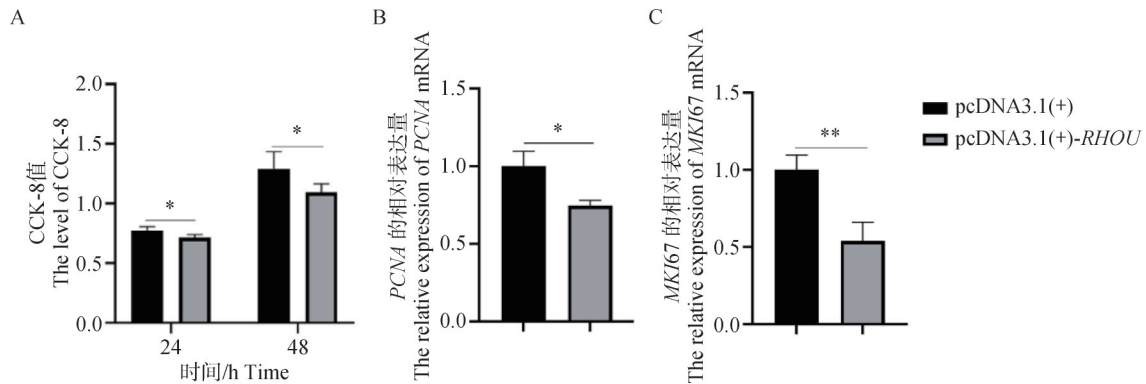
图8 山羊 *RHO* 基因过表达载体构建和效率的检测

Fig. 8 Construction of the overexpression vector for the goat *RHO* gene and detection of its overexpression efficiency

3 讨论

RHO 基因属于非经典的 RhoGTPase 成员之一, 最初被鉴定为 Wnt 非经典通路的靶基因, 与经典的 Rho GTPase (RhoA、Rac1 和 Cdc42) 相比具有 N 端和 C 端延伸结构域, 并通过 C 端棕榈酰方式与膜结构结合, 诱导小鼠乳腺上皮细胞发生转化^[24]。

目前其功能方面的研究主要集中在调控细胞迁移、细胞骨架和组织器官发育等方面^[12,16], 在繁殖调控方面的研究较少。本研究前期通过 40K 山羊液相芯片采用全基因组关联分析鉴定到 *RHO* 基因与山羊产羔数显著关联。相似的, Brazert 等^[25]发现 *RHO* 参与人颗粒细胞的功能调控。综上, 说明 *RHO* 基因参与调控动物的繁殖性能。已有研究

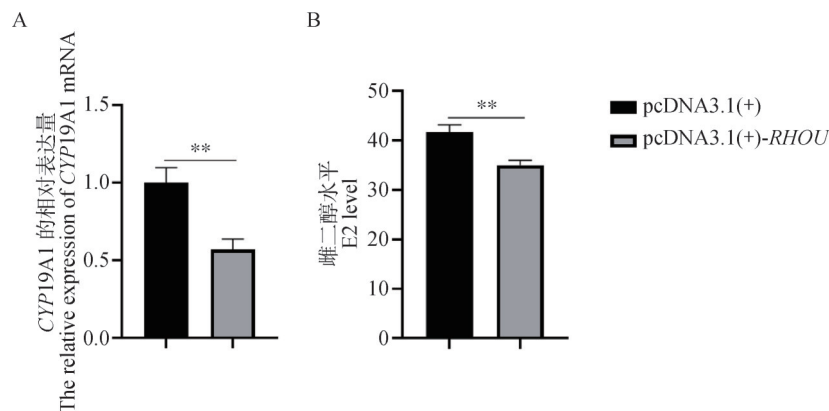


A. 过表达 *RHOV* 对细胞增殖的影响; B、C. 过表达 *RHOV* 对增殖标志基因 *PCNA* 和 *MKI67* 表达的影响

A. Effect of *RHOV* overexpression on cell proliferation; B, C. Effects of *RHOV* overexpression on the expression of proliferation marker genes (*PCNA* and *MKI67*)

图9 山羊 *RHOV* 基因对卵巢颗粒细胞增殖的影响

Fig. 9 The effect of goat *RHOV* gene on the proliferation of ovarian granulosa cells



A. 过表达 *RHOV* 对卵巢颗粒细胞中 *CYP19A1* 表达的影响; B. 过表达 *RHOV* 对卵巢颗粒细胞中 *E2* 的影响

A. Effect of *RHOV* overexpression on *CYP19A1* expression in granulosa cells; B. Effects of *RHOV* overexpression on the *E2* synthesis

图10 *RHOV* 基因调控山羊颗粒细胞 *E2* 合成

Fig. 10 The *RHOV* gene regulates the synthesis of *E2* in goat granulosa cells

表明, Rho GTPase 家族成员在不同组织中的表达存在显著差异, 且部分成员于特定组织内发挥着独特作用^[26-28]。本研究发现, *RHOV* 基因在山羊各组织中均广泛表达, 其中在卵巢组织中的表达水平相对较高, 且在小卵泡中的表达水平极显著高于大卵泡, 推测 *RHOV* 基因可能通过调控卵巢功能影响山羊的繁殖性能。前人研究发现, Rho GTPase 中的成员 Cdc42, 其在卵巢中的表达水平以及卵母细胞膜的分布随着卵泡激活显著增强^[29], Rho GTP 酶成员 MIRO1 参与调控猪卵母细胞的成熟^[30], 推测 *RHOV* 基因可能通过调控山羊卵巢的功能影响其产羔性能。

雌二醇(*E2*)是维持母羊卵泡正常发育、排卵和

繁殖力的主要类固醇激素, 多羔母羊(胎产羔数 ≥ 2 只)血清中 *E2* 含量显著高于单羔母羊^[31-33], 而 *CYP19A1* 基因是卵巢颗粒细胞中 *E2* 合成的限速酶^[34]。酪蛋白激酶 1 α 通过调节小鼠卵巢颗粒细胞中 *CYP19A1* 的表达来介导雌二醇的分泌^[35]; 转录因子 SMAD4 和 miR-10b 通过靶向 *CYP19A1*, 促进卵巢颗粒细胞中 *E2* 的释放^[36]。本研究发现, 在山羊卵巢颗粒细胞中过表达 *RHOV* 后 *E2* 水平极显著下调, 且调控 *E2* 合成的关键酶 *CYP19A1* 的 mRNA 表达水平显著下调, 说明 *RHOV* 通过负调控 *CYP19A1* 表达影响山羊卵巢颗粒细胞中 *E2* 合成。

RHO 家族蛋白在细胞增殖调控进程中扮演着关键角色, 能够通过激活 PAK1 和 JNK1 通路, 参与

细胞增殖的调控^[37]。CCK-8 试剂通过在 450 nm 处测定细胞的吸光度值间接反映细胞增殖能力^[38], *PCNA* 通过与 DNA 聚合酶 δ 或 p21 相互作用调节 DNA 合成,被用作增殖或再生标志物^[39-40], *MKI67* 基因负责编码抗原 Ki-67,与促进细胞增殖紧密相关^[41-42],以上 3 种方法均可用于检测细胞增殖的能力。本研究发现过表达 *RHO* 基因后,细胞增殖的标志基因 *MKI67*、*PCNA* 的表达水平均出现了显著下降。24、48 h 时 CCK-8 法检测所得的细胞吸光度值显著下调,说明 *RHO* 调控山羊卵巢颗粒细胞的增殖。Slaymi^[43]等研究发现, *RHO* 基因能抑制肠道上皮细胞生长,其表达对非经典 Wnt 信号敏感且在结肠、直肠癌中减少,本研究结果与其研究结论一致。由此表明, *RHO* 基因可能通过调控卵巢颗粒细胞增殖进而影响雌激素合成,调控山羊的产羔数,但其具体的作用机制仍有待进一步探究。

4 结 论

本试验通过全基因组关联分析筛选出 *RHO* 基因与山羊产羔数显著关联。克隆获得山羊 *RHO* 基因编码区序列,全长 768 bp,编码 256 个氨基酸。*RHO* 基因在山羊卵巢中表达水平最高,小卵泡中的表达量极显著高于大卵泡;成功构建山羊 *RHO* 基因过表达载体,转染山羊卵巢颗粒细胞显示 *RHO* 基因负调控其增殖水平,可通过降低颗粒细胞 *CYP19A1* 的表达从而抑制 E2 的合成进而调控山羊繁殖性能。

参考文献 (References):

- [1] ZHU J H, ZHANG H Y, BAI Y Y, et al. Relationship between SNPs of *POU1F1* gene and litter size and growth traits in Shaanbei White Cashmere goats [J]. *Animals (Basel)*, 2019, 9(3):114.
- [2] 刘泽林, 杨 娟, 许铭洙, 等. 山羊 ZBP1 基因多态性及与产羔性能的关联分析[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(1):161-173.
- LIU Z L, YANG J, XU M Z, et al. Association analysis between polymorphisms of ZBP1 gene and lambing performance in goats [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(1):161-173. (in Chinese)
- [3] 兰 蓉, 朱 兰, 姚新荣, 等. 山羊产羔数全基因组关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(4):549-554.
- LAN R, ZHU L, YAO X R, et al. Genome-wide association study of lambing number in goat [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(4):549-554. (in Chinese)
- [4] ZHANG T Y, WANG J X, BAI Y Y, et al. A functional SNP of the core promoter region within goat *CDC25A* gene affects litter size [J]. *Front Vet Sci*, 2025, 11:1471123.
- [5] JEET V, MAGOTRA A, BANGAR Y C, et al. Evaluation of candidate point mutation of kisspeptin 1 gene associated with litter size in Indian goat breeds and its effect on transcription factor binding sites [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2022, 78:106676.
- [6] MAHMOUDI P, RASHIDI A, NAZARI-GHADIKOLAEI A, et al. Genome-wide association study reveals novel candidate genes for litter size in Markhoz goats [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9:1045589.
- [7] 王有栋, 曹志平, 李玉茂, 等. SNP 芯片技术原理及其在鸡遗传育种中的应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(9):4165-4175.
- WANG Y D, CAO Z P, LI Y M, et al. The principle of SNP chip technology and its application in chicken genetic breeding [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(9):4165-4175. (in Chinese)
- [8] 张嘉良, 黄 畅, 杨永林, 等. 基于 50K 液相芯片的中国绵羊群体遗传结构与羊毛性状选择信号分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56(7):3164-3176.
- ZHANG J L, HUANG C, YANG Y L, et al. Genetic structure and wool trait selection signatures analysis of Chinese sheep populations based on 50K liquid SNP chip [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56(7):3164-3176. (in Chinese)
- [9] 李 聪, 刘书琴, 高峰, 等. 家驴 40K 液相芯片开发及其初步应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(12):5538-5548.
- LI C, LIU S Q, GAO F, et al. Development and preliminary application of domestic donkey 40K liquid chip [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55(12):5538-5548. (in Chinese)
- [10] FAURE S, FORT P. Atypical RhoV and RhoU GTPases control development of the neural crest [J]. *Small GTPases*, 2011, 2(6):310-313.
- [11] CANOVAS NUNES S, MANZONI M, PIZZI M, et al. The small GTPase RhoU lays downstream of JAK/STAT signaling and mediates cell migration in multiple myeloma [J]. *Blood Cancer J*, 2018, 8(2):20.
- [12] CHUANG Y Y, VALSTER A, CONIGLIO S J,

- et al. The atypical Rho family GTPase Wrch-1 regulates focal adhesion formation and cell migration[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 11):1927-1934.
- [13] BRAZIER H, KRANC W, CHERMULA B, et al. The Rho GTPase Wrch1 regulates osteoclast precursor adhesion and migration[J]. *Int Biochem Cell Biol*, 2009, 41(6):1391-1401.
- [14] BRADY D C, ALAN J K, MADIGAN J P, et al. The transforming Rho family GTPase Wrch-1 disrupts epithelial cell tight junctions and epithelial morphogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(4):1035-1049.
- [15] FORT P, GUÉMAR L, VIGNAL E, et al. Activity of the RhoU/Wrch1 GTPase is critical for cranial neural crest cell migration [J]. *Dev Biol*, 2011, 350 (2) : 451-463.
- [16] TAO W, PENNICA D, XU L, et al. Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(14):1796-1807.
- [17] GUÉMAR L, SANTA BARBARA P, VIGNAL E, et al. The small GTPase RhoV is an essential regulator of neural crest induction in *Xenopus*[J]. *Dev Biol*, 2007, 310(1):113-128.
- [18] DICKOVER M, HEGARTY J M, LY K, et al. The atypical Rho GTPase, RhoU, regulates cell-adhesion molecules during cardiac morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 2014, 389(2):182-191.
- [19] WOO S, STRASSER L. Atypical RhoUV GTPases in development and disease[J]. *Biochem Soc Trans*, 2024, 52(1):89-97.
- [20] NOTARNICOLA C, LE G L, FORT P, et al. Dynamic expression patterns of RhoV/Chp and RhoU/Wrch during chicken embryonic development[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(4):1165-1171.
- [21] NANDI S, GUPTA P S P, MONDAL S. Ammonia concentrations in different size classes of ovarian follicles of sheep (*Ovis aries*): possible mechanisms of accumulation and its effect on oocyte and granulosa cell growth *in vitro*[J]. *Theriogenology*, 2016, 85(4): 678-687.
- [22] 史露露, 胡明月, 赖伟宁, 等. 基于 50K SNP 芯片的夏洛来羊遗传结构及选择信号分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023, (6):49-53, 59, 139-140.
- SHI L L, HU M Y, LAI W N, et al. Genetic structure and selection signal analysis of charolais sheep based on 50K SNP chip[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2023, (6):49-53, 59, 139-140. (in Chinese)
- [23] 徐颂为, 黄 忍, 杨 璐, 等. 山羊不同组织实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021, (24):31-35, 40, 145.
- XU S W, HUANG R, YANG L, et al. Screening of reference genes for real-time fluorescence quantification PCR in different goat tissues[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021, (24):31-35, 40, 145. (in Chinese)
- [24] SHUTES A, BERZAT A C, CHENETTE E J, et al. Biochemical analyses of the Wrch atypical Rho family GTPases[J]. *Methods Enzymol*, 2006, 406:11-26.
- [25] BRAZERT M, KRANC W, CHERMULA B, et al. Human ovarian granulosa cells isolated during an IVF procedure exhibit differential expression of genes regulating cell division and mitotic spindle formation [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(12):2026.
- [26] BOUREUX A, VIGNAL E, FAURE S, et al. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(1):203-216.
- [27] CSÉPÁNYI-KÖMI R, SÁFÁR D, GRÓSZ V, et al. In silico tissue-distribution of human Rho family GTPase activating proteins[J]. *Small GTPases*, 2013, 4(2):90-101.
- [28] MALOSIO M L, GILARDELLI D, PARIS S, et al. Differential expression of distinct members of Rho family GTP-binding proteins during neuronal development: identification of Rac1B, a new neural-specific member of the family[J]. *J Neurosci*, 1997, 17 (17):6717-6728.
- [29] YAN H, ZHANG J, WEN J, et al. CDC42 controls the activation of primordial follicles by regulating PI3K signaling in mouse oocytes [J]. *BMC Biol*, 2018, 16(1):73.
- [30] PAN Z N, ZHANG H L, ZHANG K H, et al. Insufficient MIRO1 contributes to declined oocyte quality during reproductive aging [J]. *Sci China Life Sci*, 2025, 68(3):764-776.
- [31] TERA DOLEBO A, MELESSE A, PORCU C, et al. Increased number of large non-atretic follicles and co-dominance effects account for high litter sizes in Bonga sheep[J]. *Anim Sci J*, 2020, 91(1):e13384.
- [32] XU Q, WANG C, WANG L, et al. Correlation analysis of serum reproductive hormones and metabolites during multiple ovulation in sheep [J]. *BMC Vet Res*, 2022, 18(1):290.
- [33] BOTTINO J P, PÉREZ-CLARIGET R, RODRIGUEZ M G K, et al. Multiple matings modify

- the estrous length, the moment of ovulation, and the estradiol and LH patterns in ewes [J]. *Anim Reprod Sci*, 2021, 18(3):e20210045.
- [34] ZHANG, Y, ZHANG S, LU J H, et al. Genes encoding aromatases in teleosts: evolution and expression regulation [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2014, 205:151-158.
- [35] LUO, X, ZHANG D, ZHENG M J, et al. Casein kinase 1 α mediates estradiol secretion via CYP19A1 expression in mouse ovarian granulosa cells [J]. *BMC Biol*, 2024, 22(1):176.
- [36] LI Q Q, DU X, PAN X Z, et al. The transcription factor SMAD4 and miR-10b contribute to E2 release and cell apoptosis in ovarian granulosa cells by targeting CYP19A1 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 476:84-95.
- [37] VLACHOS S, HARDEN N. Genetic evidence for antagonism between Pak protein kinase and Rho1 small GTPase signaling in regulation of the actin cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis [J]. *Genetics*, 2011, 187(2):501-512.
- [38] 高丕尧, 龙军先, 甘嘉亮, 等. CCK-8 法与 Alamar blue 法对 RKO 细胞株增殖活力测试条件的对比分析 [J]. *华西药理学杂志*, 2015, 30(1):38-41.
- GAO P Y, LONG J X, GAN J L, et al. Comparative analysis of CCK-8 and alamar blue on RKO cell proliferation activity test conditions [J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 30(1):38-41. (in Chinese)
- [39] DONG X, LU S, TIAN Y, et al. Bavachinin protects the liver in NAFLD by promoting regeneration via targeting PCNA [J]. *J Adv Res*, 2024, 55:131-144.
- [40] FROUIN I, MAGA G, DENEGRI M, et al. Human proliferating cell nuclear antigen, poly (ADP-ribose) polymerase-1, and p21waf1/cip1. A dynamic exchange of partners [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(41):39265-39268.
- [41] XIONG D D, ZENG C M, JIANG L, et al. Ki-67/MKI67 as a predictive biomarker for clinical outcome in gastric cancer patients: an updated meta-analysis and systematic review involving 53 studies and 7078 patients [J]. *J Cancer*, 2019, 10(22):5339-5354.
- [42] UXA S, CASTILLO-BINDER P, KOHLER R, et al. Ki-67 gene expression [J]. *Cell Death Different*, 2021, 28(12):3357-3370.
- [43] SLAYMI C, VIGNAL E, CRÈS G, et al. The atypical RhoU/Wrch1 Rho GTPase controls cell proliferation and apoptosis in the gut epithelium [J]. *Biol Cell*, 2019, 111(5):121-141.
- (编辑 郭云雁)