

· 研究报告 ·

周平 新疆农垦科学院研究员、院长、省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室主任，新疆生产建设兵团绵羊分子设计育种团队首席科学家，农业部肉羊遗传改良专家委员会委员。获第三届“兵团青年科技奖”、兵团组织部“优秀人才奖”等，入选“兵团英才计划”第一层次人才。主要从事绵羊种质资源创新与新品种培育、地方特色牛、羊品种保护技术研究以及野生种质在家养羊新品种培育中的作用等基础与应用基础研究。



王立民 新疆农垦科学院研究员、体细胞研究实验室主任。主要从事绵羊基因编辑育种和哺乳动物体细胞克隆方面的研究。培育了 FAD1 转基因羊、IGF1 转基因羊、FGF5 基因编辑细毛羊、FecB 基因编辑哈萨克羊等。优化绵羊体细胞核移植技术平台，发现卵母细胞转录调控因子 TRIM28 和精子 miR-449b 可改进克隆胚胎的基因组重编程，将体细胞核移植妊娠率提高至 30%，获得新疆首例混血 (50%) 盘羊克隆后代。



蛋白质组学技术对不同性别中国美利奴细毛羊 (军垦型) 皮肤差异蛋白的筛选

张译元, 郭延华, 唐红, 王新华, 王立民, 周平

新疆农垦科学院 畜牧兽医研究所 省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室, 新疆 石河子 832000

张译元, 郭延华, 唐红, 王新华, 王立民, 周平. 蛋白质组学技术对不同性别中国美利奴细毛羊 (军垦型) 皮肤差异蛋白的筛选. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3925-3939.

ZHANG YY, GUO YH, TANG H, WANG XH, WANG LM, ZHOU P. Proteomics-based screening of differentially expressed proteins in skin of Chinese merino fine sheep (JunKen type) of different gender. Chin J Biotech, 2022, 38(10): 3925-3939.

Received: April 20, 2022; **Accepted:** August 1, 2022

Supported by: State Key Laboratory for Sheep Genetic Improvement and Healthy Production, Herbivorous Livestock Healthy Breeding Innovative Talents Training Demonstration Base Project (2019CB002); National GMO Major Project (2016ZX08008-001); Science and Technology Innovation Talent Program of the Xinjiang Production and Construction Corps (2021CB031)

Corresponding authors: ZHOU Ping. E-mail: zhpqxqf@163.com

WANG Limin. E-mail: wanglm1980@126.com

基金项目: 省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室草食家畜健康养殖创新人才培养示范基地项目 (2019CB002); 国家转基因重大专项 (2016ZX08008-001); 兵团科技创新人才计划 (2021CB031)

摘要: 旨在了解性别因素对绵羊毛性状的影响。以周岁雄性和雌性中国美利奴羊 (军垦型) 为研究对象, 利用液相色谱-串联质谱联用技术和数据非依赖性采集策略的定量蛋白质组学技术筛选皮肤组织差异表达蛋白, 并对筛选获得的差异蛋白进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 代谢通路和蛋白互作分析。结果显示, 共计筛选获得差异表达蛋白 674 种, 其中, 280 种蛋白表达上调, 394 种蛋白表达下调; 通过进一步分析发现, 与皮肤毛囊发育及羊毛表型相关的差异蛋白有 43 种, 上调差异蛋白 30 种, 下调差异蛋白 13 种。GO 注释结果显示, 在分子功能方面, 差异蛋白在氧结合、硫酸软骨素结合、亚铁血红素结合、谷胱甘肽过氧化物酶活性和转运活性等 37 个过程显著富集; 在生物过程方面, 差异蛋白在细胞氧化解毒作用、肌肉收缩调节、Notch 信号通路、钙离子跨膜转运和谷胱甘肽新陈代谢等 120 个过程显著富集; 在细胞组分方面, 主要富集在肥大细胞颗粒、细胞核、肌质网状组织和内质网等 31 个过程。KEGG 通路结果表明, 这些差异蛋白涉及 16 条信号通路, 其中, MAPK、P53 信号通路和羊毛生长发育密切相关。蛋白质网络互作结果显示, COL1A1 蛋白与 MMP2、SPARC、THBS1 等差异表达蛋白联系较为紧密, 其可能在羊毛生长发育过程中发挥着关键作用。本研究为揭示不同性别绵羊毛性状的分子机制积累了基础数据。

关键词: 性别; 中国美利奴细毛羊 (军垦型); 皮肤; 蛋白质组

Proteomics-based screening of differentially expressed proteins in skin of Chinese merino fine sheep (JunKen type) of different gender

ZHANG Yiyuan, GUO Yanhua, TANG Hong, WANG Xinhua, WANG Limin, ZHOU Ping

State Key Laboratory for Sheep Genetic Improvement and Healthy Production, Research Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, Xinjiang, China

Abstract: The purpose of this study was to understand the effect of gender on the traits of wool. One-year-old male and female Chinese merino sheep (JunKen type) were used to screen differentially expressed proteins in skin tissues by quantitative proteomics using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and data independent acquisition (DIA) strategy. This was followed by GO function annotation, KEGG metabolic pathway and protein network interaction analysis on the differential proteins obtained. The result showed that there were 674 differentially expressed proteins between male and female groups, whereas 280 proteins were up-regulated and 394 proteins were down-regulated in the male group. Through further comparison and analysis, there were 43 differentially expressed proteins related to skin hair follicle development and wool phenotype, 30 up-regulated and 13 down-regulated. The GO annotation analysis of differentially expressed proteins were mainly enriched in 37 processes of molecular function such as oxygen binding, chondroitin sulfate binding, heme

binding, glutathione peroxidase activity and glutathione transferase activity; 120 biological processes such as cellular oxidant detoxification, regulation of muscle contraction, notch signaling pathway, calcium ion transmembrane transport and glutathione metabolism; and 31 processes related to cellular components such as mast cell granule, nucleus, sarcoplasmic reticulum and endoplasmic reticulum lumen. KEGG analysis showed that the differentially expressed proteins were involved sixteen signaling pathways, among which MAPK and p53 signaling pathways were closely related to wool growth and development. The protein network interaction analysis discovered that COL1A1 was closely related to MMP2, SPARC, THBS1 and other differentially expressed proteins, which might play a key role in wool growth and development. Thus, this study obtained basic data for revealing the molecular mechanism of sheep wool traits of different gender.

Keywords: gender; Chinese merino fine sheep (JunKen type); skin; proteomics

羊毛是一种重要的天然纤维材料,羊毛的品质直接决定了纺织品的品质和价格。影响羊毛品质特性的因素除了品种、年龄、部位、环境、营养等条件外,性别也是影响羊毛品质的又一重要因素。关鸣轩等^[1]研究显示,性别对新吉细毛羊的主要经济性状存在显著影响,尤其在密度和弯曲度特性上公羊毛的质量优于母羊。在阿勒泰羊的研究中,公羊的底绒长度整体也优于母羊^[2]。张小伟等^[3]对多胎细毛羊主要经济性状的非遗传因素进行分析指出,公羊毛长、毛密度、细度、匀度、剪毛后体重、剪毛量均极显著大于母羊。陶卫东等^[4]、王鹏宇等^[5]研究均证实,性别对产毛量、毛长度、毛细度影响显著。但另有研究表明,性别只对内蒙古白绒山羊的抓绒量、抓绒后体重、毛长度影响极显著,对其细度影响却不显著。乔国艳等^[6]研究也显示,性别仅对体重有极显著影响,对产毛量、毛长、毛纤维直径等性状影响不显著。本课题组实验前期对周岁中国美利奴羊公羊与母羊毛产量、毛细度进行了跟踪检测,结果显示,公羊毛产量与毛细度均优于母羊。综上所述,性别是影响绵羊毛产量和毛品质的重

要因素之一,但其机理尚未明确。因此,解析性别影响羊毛性状的分子机制并阐明其对羊毛生长、发育的机理具有重要意义。

近年来,随着蛋白质组学技术和生物信息技术飞速发展、数据非依赖性采集 (data-independent acquisition, DIA) 技术的出现,为全新的定量蛋白质组学开辟了新的领域,大大提升了实验准确性。目前,该技术已被广泛应用于斑马鱼、小鼠、大鼠、人类体液和组织等研究^[7-9]。有关绵羊毛品质方面的蛋白组学研究国内外已有相关报道。Plowman 等^[10]通过比较来自葡萄牙 3 种不同遗传类型绵羊群体羊毛的蛋白组和微观特征,发现 3 个品种之间角蛋白相关蛋白和角蛋白 kRT75、kRT78 存在显著差异,推测其是决定羊毛蛋白质组品质性状的主效因子。Zhao 等^[11]通过蛋白组学技术研究了中国敖汉细毛羊与小尾寒羊体侧皮肤毛囊的蛋白表达模式,筛选获得了数种差异表达蛋白,为更好地了解调节羊毛直径的分子机制并确定生产细羊毛提供新策略。截至目前,有关性别影响羊毛产量与毛品质的蛋白组学研究鲜有报道。基于此,本研究在前期获得不同性别中国

美利奴羊 (军垦型) 毛产量、毛细度表型数据基础上, 利用 DIA 技术筛选挖掘不同性别绵羊皮肤组织差异表达蛋白, 为探索羊毛生长、发育的分子机理及进一步细毛羊分子辅助育种积累基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品

选取新疆农垦科学院种羊场处于相同饲喂条件下的健康周岁中国美利奴羊 (军垦型) 公羊和母羊各 3 只, 在其肩胛骨后缘 10 cm 处采集 1 cm² 皮肤组织样品, 用生理盐水冲洗干净后, 迅速投入液氮保存。蛋白质组学 DIA 检测委托上海吉凯基因科技有限公司完成。

1.2 主要试剂及仪器

SDT 裂解液 (2% SDS, 100 mmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT), 100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6); 匀浆仪, MP 公司; EasynLC 液相色谱仪、Acclaim PepMap RSLC C₁₈ 色谱柱 (P/N164943)、Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪、真空浓缩仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

将皮肤组织剪碎, 加入适量的 SDT 裂解液, 转移至 Lysing Matrix A 管中匀浆破碎 (6.0 m/s, 60 s, 2 次) 后, 再进行超声破碎 (功率 15%, 超声 1 s 暂停 1 s, 1 min 1 个循环, 共 2 个循环) 后, 于沸水中煮 10 min, 之后用 14 000×g 离心 15 min, 分离上清, 用 0.22 μm 滤膜过滤上清, 收集滤液。最后采用二辛可宁酸 (bicinechoninic acid, BCA) 法定量蛋白质, 并分装于 -80 °C 保存备用。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳

取样品蛋白质各 20 μg, 加入 6×上样缓冲液, 充分混匀后沸水中煮 5 min, 离心取上清进行

12.0% SDS-PAGE 电泳 (恒压 250 V, 40 min), 0.25% 考马斯亮蓝染色。

1.3.3 FASP (filter-aided sample preparation) 酶解

将每个样品的蛋白质溶液各取 200 μg, 加入 DTT 至终浓度为 100 mmol/L, 沸水浴 5 min, 冷却至室温。加入 200 μL 尿素 (UA buffer) 混匀, 转入 30 kDa 超滤离心管中, 12 500×g 离心 25 min, 弃滤液 (重复该步骤两次)。加入 100 μL 碘乙酰胺溶液 (100 mmol/L iodoacetamide (IAA) in UA buffer), 600 r/min 振荡 1 min, 室温避光反应 30 min, 12 500×g 离心 25 min。加入 100 μL UA buffer, 离心 15 min, 重复该步骤两次。加入 100 μL 0.1 mol/L 三乙胺-碳酸缓冲液 (triethylammonium bicarbonate buffer, TEAB buffer), 12 500×g 离心 15 min, 重复该步骤两次。加入 40 μL 胰蛋白酶 (4 μg trypsin in 40 μL 0.1 mol/L TEAB buffer), 600 r/min 振荡 1 min, 37 °C 放置 16–18 h。换新收集管, 12 500×g 离心 15 min; 再加入 20 μL 0.1 mol/L TEAB 缓冲液, 12 500×g 离心 15 min 收集酶解后产生的多肽混合物。采用 C18 Cartridge 进行脱盐, 并冻干后加入 40 μL 0.1% 甲酸溶液进行复溶和肽段定量。

1.3.4 DDA 谱图库建立

取所有样品的肽段混合物通过高 pH 反相色谱柱分离成 48 个组分。采用 EasynLC 液相系统和 Orbitrap Fusion Lumos 质谱系统, 色谱柱为 Acclaim PepMap RSLC C₁₈ 色谱柱 (0.05 mm×150 mm, 5 μm, 100 Å, nano viper), 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸和 80% 乙腈水溶液。样品以 300 nL/min 的流速经非线性梯度分离: 0–5 min, 1% B; 5–95 min, 1%–28% B; 95–110 min, 28%–38% B; 110–115 min, 38%–100% B; 115–120 min, 100% B。喷雾电压 2.0 kV。

质谱参数设置如下: (1) MS: scan range (m/z)=350–1 500; resolution=60 000; AGC target=3e6; maximum injection time=30 ms; include charge states=2–7; filter dynamic exclusion: exclusion duration=30 s; (2) dd-MS2: isolation window=1.6 m/z , resolution=15 000; AGC target=1e5; maximum injection time=45 ms; NCE=28%。将质谱产生的原始数据通过 Spectronaut Pulsar X (version 12, Biognosys AG) 进行分析,生成谱图库 (Uniprot OvisAries (Sheep)_28046_20191117)。

1.3.5 DIA 质谱分析

各样品取出 6 μ L 加入 1 μ L 10 \times iRT 肽段,混合后进样 6 μ L,整个液质系统及方法同 DDA 谱图库的建立。表 1 设置了 42 个隔离窗口, DIA 质谱具体参数设置如下: (1) MS: scan range (m/z)=350–1 500; resolution=60 000; AGC target=3e6; maximum injection time=50 ms; (2) DIA: resolution=15 000; AGC target=2e5; maximum injection time=45 ms; NCE=28%。

1.3.6 数据处理

采用 Spectronaut Pulsar X 软件 (Version 12.0.20491.8.29697) 默认参数 (BGS Factory Settings) 对 DIA 数据进行分析,所有蛋白和多肽定性分析在 Q value 为 0.01 的水平下进行 (相当于 FDR 为 1.0%),在二级质谱 (MS2) 水平下通过峰面积进行定量分析,得到定量数据后,进行归一化处理,将每个样本的碎片离子峰面积除以该次试验的总离子流图 (total ion chromatogram, TIC) 以消除不同试验间肽段信号间系统误差的影响。将同一肽段的离子峰面积加和到肽段水平,对肽段信息进行双尾 t -test,筛选具有显著差异的肽段 ($P<0.05$),归到蛋白水平,将蛋白质表达差异倍数>1.5 倍且 $P<0.05$ (t -test) 作为差异表达蛋白质。

表 1 DIA 隔离窗口设置

Table 1 DIA isolation window settings

DIA window	Start (m/z)	End (m/z)	Width
1	350	405	55
2	405	429	24
3	429	453	24
4	453	466	13
5	466	479	13
6	479	492	13
7	492	505	13
8	505	518	13
9	518	531	13
10	531	544	13
11	544	557	13
12	557	570	13
13	570	583	13
14	583	596	13
15	596	609	13
16	609	622	13
17	622	635	13
18	635	648	13
19	648	661	13
20	661	674	13
21	674	687	13
22	687	700	13
23	700	713	13
24	713	726	13
25	726	739	13
26	739	752	13
27	752	765	13
28	765	778	13
29	778	796	18
30	796	814	18
31	814	832	18
32	832	855	23
33	855	878	23
34	878	901	23
35	901	924	23
36	924	947	23
37	947	981	34
38	981	1 015	34
39	1 015	1 063	48
40	1 063	1 111	48
41	1 111	1 189	78
42	1 189	1 500	311

1.3.7 生物信息学分析

得到差异蛋白后,利用 BLAST2GO 对目标

蛋白质进行 GO 注释, 并利用 ProScan 搜索欧洲生物信息研究所 (European bioinformatics institute, EBI) 数据库中与目标蛋白质匹配的保守基序, 将其相关的功能信息注释给目标蛋白质序列; 运行 ANNEX 对注释信息进一步补充, 并在不同的 GO 类别之间建立联系, 以提高注释的准确性。对目标蛋白质集合进行 KEGG 通路注释时, 利用 KAAS (KEGG automatic annotation server) 软件, 通过比对 KEGG 数据库, 将目标蛋白质序列进行 KEGG 归类, 并根据归类自动获取其参与的通路信息。

2 结果与分析

2.1 实验动物的羊毛表型特征

本研究中, 选取相同饲喂条件下的健康周岁中国美利奴羊 (军垦型) 公羊和母羊各 3 只为实验对象, 针对产毛量、毛长度和毛细度做了数据测量和统计学分析 (表 2)。在产毛量和毛长度方面, 公羊与母羊差异不显著 ($P>0.05$); 毛细度方面, 公羊较母羊有极显著优势 ($P<0.01$)。

2.2 SDS-PAGE 电泳

BCA 蛋白质定量法对细毛羊公羊、母羊皮肤组织蛋白定量, 其样品上样量为 20 μL , 经 SDS-PAGE 分离后, 电泳条带清晰且样本间平行性较好 (图 1)。

2.3 差异蛋白定量结果分析

检测的 2 组样品, 在“1% FDR”的过滤标准下, 公羊组总共有 17 629 条肽段和 2 878 个蛋白得到鉴定, 母羊组总共有 16 957 条肽段

和 2 853 个蛋白得到鉴定。2 种性别羊皮肤组织中含量差异的蛋白质 ($P<0.05$ 且差异倍数 >1.5 倍) 共 674 个。公羊皮肤组织表达上调的蛋白质数量为 280 个, 表达下调的蛋白质数量为 394 个 (表 3)。与羊毛生长发育相关的上调差异蛋白有 30 个, 下调差异蛋白有 13 个 (表 4)。将 674 个差异蛋白进行层次聚类分析, 左侧 3 列表示公羊组 3 个皮肤组织蛋白, 右侧 3 列表示母羊组 3 个皮肤组织蛋白, 图中颜色表示表达量值, 上调的蛋白质为红色, 下调的蛋白质为绿色, 公羊组和母羊组组内 3 个样本蛋白表达的趋势基本一致, 并且样本重复性较好 (图 2)。

2.4 差异表达蛋白质 GO 分析

通过 Fisher 精确检验 (Fisher's exact text) 对 674 个差异蛋白从生物学过程、分子功能和细胞组分 3 个方面进行功能富集分析。GO 分析表明, 参与生物过程的蛋白分别涉及细胞过程 (17.27%)、生物调节 (14.62%)、代谢过程 (11.36%) 和对刺激的反应 (9.87%) 等 (图 3), 这些差异蛋白在细胞氧化解毒作用、肌肉收缩调节、Notch 信号通路、钙离子跨膜转运、谷胱甘肽新陈代谢等 120 个过程显著富集 (图 4A); 参与分子功能的蛋白分别涉及结合 (50.70%)、催化活性 (23.10%)、分子功能调节 (7.53%) 和结构分子活性 (6.88%) 等 (图 3), 这些差异蛋白在氧结合、硫酸软骨素结合、亚铁血红素结合、谷胱甘肽过氧化物酶活性和转运活性等

表 2 不同性别羊的羊毛性状统计

Table 2 Wool traits statistics of different gender sheep

Samples	The average of wool yield (kg)	The average of wool length (cm)	The average of fineness (μm)
Rams	5.38 \pm 1.70	9.92 \pm 1.11	15.05** \pm 0.64
Ewes	4.81 \pm 0.34	9.25 \pm 0.86	16.86** \pm 0.89

** : extremely significant difference ($P<0.01$).

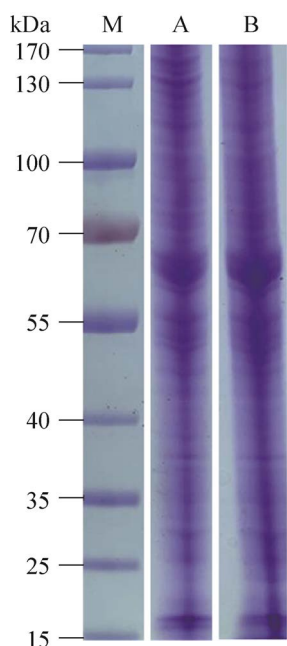


图 1 不同性别羊皮肤样品总蛋白的 SDS-PAGE 电泳图 M: 分子量标准蛋白; A: 公羊组皮肤组织蛋白; B: 母羊组皮肤组织蛋白

Figure 1 SDS-PAGE electrophoresis of total proteins in sheep skin samples of different gender. M: protein marker; A: skin tissue proteins of male group; B: skin tissue proteins of female group.

37 个过程显著富集 (图 4B); 细胞组分分别涉及细胞部分 (21.55%)、细胞器部分 (16.96%)、蛋白复合物 (12.69%) 和细胞器 (12.62%) 等 (图 3), 这些差异蛋白在肥大细胞颗粒、细胞核、肌质网状组织和内质网腔等 31 个过程显著富集 (图 4C)。

表 3 不同性别羊皮肤组织蛋白鉴定结果

Table 3 Identification of proteins in sheep skin samples of different gender

Samples	Total number of peptides	Total number of proteins	Total number of differential proteins	Total number of up-regulated proteins	Total number of down-regulated proteins
Raws	17 629	2 878	674	280	394
Ewes	16 957	2 853			

Significant differences of expression proteins were analyzed ($P < 0.05$), and fold change > 1.5 .

2.5 差异表达蛋白质信号通路鉴定

差异表达蛋白 KEGG 富集分析结果显示, 共富集 16 条 KEGG 信号通路, 经过筛选发现 MAPK 信号通路、P53 信号通路可能和羊毛生长发育存在相关性。结果还显示了差异蛋白参与了化学致癌作用、细胞色素 P450 介导外源性物质代谢、铂耐药性和脂肪消化吸收等信号通路 (图 5)。

2.6 与皮肤毛囊发育及羊毛表型相关的差异表达蛋白质的网络互作分析

蛋白质与蛋白质之间的相互作用构成了细胞生化反应网络的一个主要组成部分, 对调控细胞及其信号有重要意义。通过 NCBI 数据库查找差异蛋白中与毛发生长发育、毛发表型相关的蛋白, 最终选取 43 个差异蛋白利用 STRING 数据库绘制蛋白质互作网络图 (图 6)。

在蛋白质互作网络中, 节点表示单个蛋白, 线表示它们之间的关系。两个蛋白之间, 线条数目越多, 表示联系越紧密。结果表明, 相互关联的中心是以 PCOLCE 蛋白为核心, 分别与 COL1A1、COL17A1 和 SPTLC3 蛋白进行互作, 形成的 3 个分支, 推测可能参与 3 种信号通路。除了 PCOLCE、COL1A1 节点外, MMP2、SPARC、THBS1 等蛋白也为主要枢纽蛋白。提示这些蛋白质可能与羊毛生长发育存在紧密联系。

表 4 与羊毛生长发育相关的差异表达蛋白

Table 4 Differentially expressed proteins related to wool growth and development

No.	Accession	Name or annotation	Fold change	<i>P</i> value
1	W5Q5U5	KRT4	+4.75	1.841 6E-04
2	W5P9D4	PRR9	+3.95	4.043 8E-03
3	C8BKD5	SPARC	+3.56	4.808 0E-04
4	W5Q9H1	ZYX	+3.01	8.391 4E-03
5	W5P8A4	FA2H	+2.56	1.128 4E-04
6	W5QH53	FMO5	+2.43	1.282 9E-04
7	W5P316	NAMPT	+2.34	1.444 2E-04
8	W5P7G4	TNC	+2.29	1.656 4E-03
9	W5P481	COL1A1	+2.24	1.003 1E-04
10	W5Q517	PCOLCE	+2.16	7.376 3E-05
11	W5PGS4	FABP5	+2.14	9.958 3E-05
12	F5AY94	KAP11-1	+2.02	3.513 5E-04
13	W5PWD8	SOX9	+1.96	2.150 7E-04
14	A6ZE98	ABHD5	+1.96	6.762 0E-06
15	W5Q611	KRT1	+1.94	5.332 2E-08
16	W5PH35	CYP1B1	+1.93	8.494 4E-03
17	W5Q5S8	KRT79	+1.88	5.703 7E-06
18	W5PGA9	NCSTN	+1.78	3.150 3E-02
19	C8BKE4	MMP2	+1.77	1.082 4E-02
20	W5QGS4	PHGDH	+1.70	1.361 2E-05
21	W5PST4	COL18A1	+1.70	2.082 2E-04
22	W5NWF6	SFRP1	+1.67	2.311 3E-03
23	W5PHP8	LRG1	+1.64	1.546 0E-03
24	W5QI38	GPRC5D	+1.63	7.486 2E-04
25	W5P6V2	COL17A1	+1.62	7.038 0E-03
26	U3MXA9	KRT17	+1.62	1.921 4E-03
27	W5PMH8	SPTLC3	+1.56	3.538 9E-02
28	W5QFP0	THBS1	+1.56	3.919 2E-06
29	W5PU19	LSS	+1.56	3.284 2E-04
30	W5PRQ8	HSD17B14	+1.52	1.999 4E-04
31	W5PSZ2	NFIC	-0.66	8.510 9E-03
32	W5Q6H2	KRT82	-0.65	7.478 7E-04
33	W5Q731	ILK	-0.63	3.455 0E-03
34	W5QAK7	SCARB1	-0.61	4.764 6E-03
35	W5P3B5	YWHAZ	-0.56	3.196 8E-05
36	O02849	PADI3	-0.56	6.236 9E-06
37	W5PB37	RRAS	-0.48	1.984 1E-02
38	W5P6X5	STMN1	-0.47	9.441 3E-06
39	W5NR84	S100A3	-0.44	1.841 7E-03
40	W5QDM1	HDAC7	-0.42	4.644 4E-03
41	W5QGJ0	CHP1	-0.41	2.394 0E-03
42	W5PSZ5	ANXA1	-0.40	1.006 2E-06
43	A2SW69	ANXA2	-0.28	3.238 0E-06

Accession No. are from UniProt database (<https://www.uniprot.org/uploadlists/>); +: up-regulated expression; -: down-regulated expression.

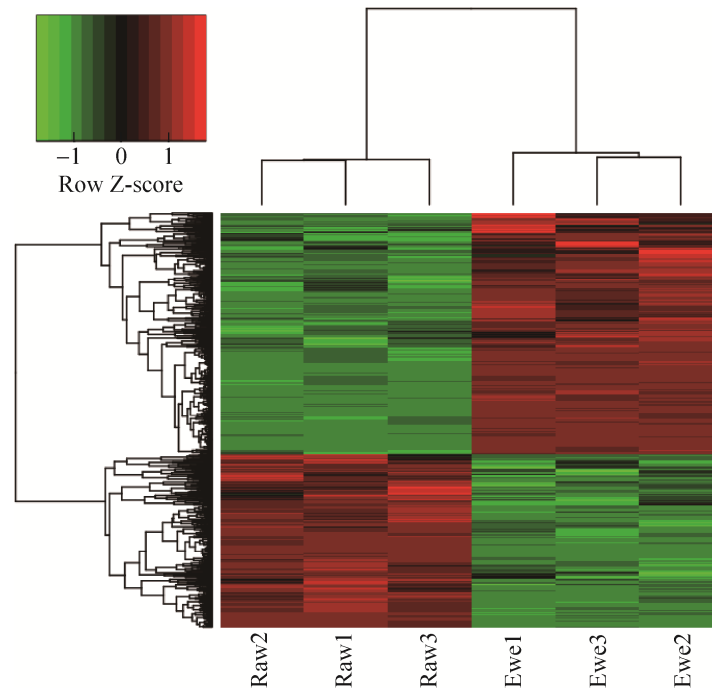


图 2 差异蛋白质层次聚类分析

Figure 2 Cluster analysis of differentially expressed proteins.

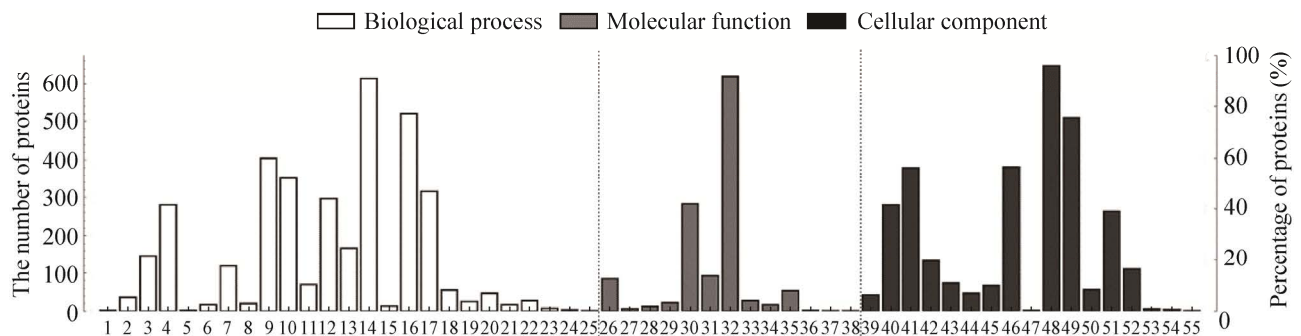


图 3 差异表达蛋白的 GO 功能注释二级分类统计图

Figure 3 GO classification level 2 of differentially expressed proteins. 1: pigmentation; 2: cell population proliferation; 3: immune system process; 4: developmental process; 5: carbon utilization; 6: rhythmic process; 7: multi-organism process; 8: growth; 9: metabolic process; 10: response to stimulus; 11: reproductive process; 12: localization; 13: multicellular organismal process; 14: cellular process; 15: cell killing; 16: biological regulation; 17: cellular component organization or biogenesis; 18: locomotion; 19: detoxification; 20: biological adhesion; 21: signaling; 22: behavior; 23: biomineralization; 24: cell aggregation; 25: nitrogen utilization; 26: structural molecule activity; 27: cargo receptor activity; 28: translation regulator activity; 29: antioxidant activity; 30: catalytic activity; 31: molecular function regulator; 32: binding; 33: transcription regulator activity; 34: molecular transducer activity; 35: transporter activity; 36: molecular carrier activity; 37: cargo adaptor activity; 38: small molecular sensor activity; 39: extracellular region; 40: membrane; 41: organelle; 42: extracellular region part; 43: synapse part; 44: synapse; 45: cell junction; 46: protein-containing complex; 47: virion; 48: cell part; 49: organelle part; 50: supramolecular complex; 51: membrane part; 52: membrane-enclosed lumen; 53: host cellular component; 54: nucleoid; 55: other organism part.

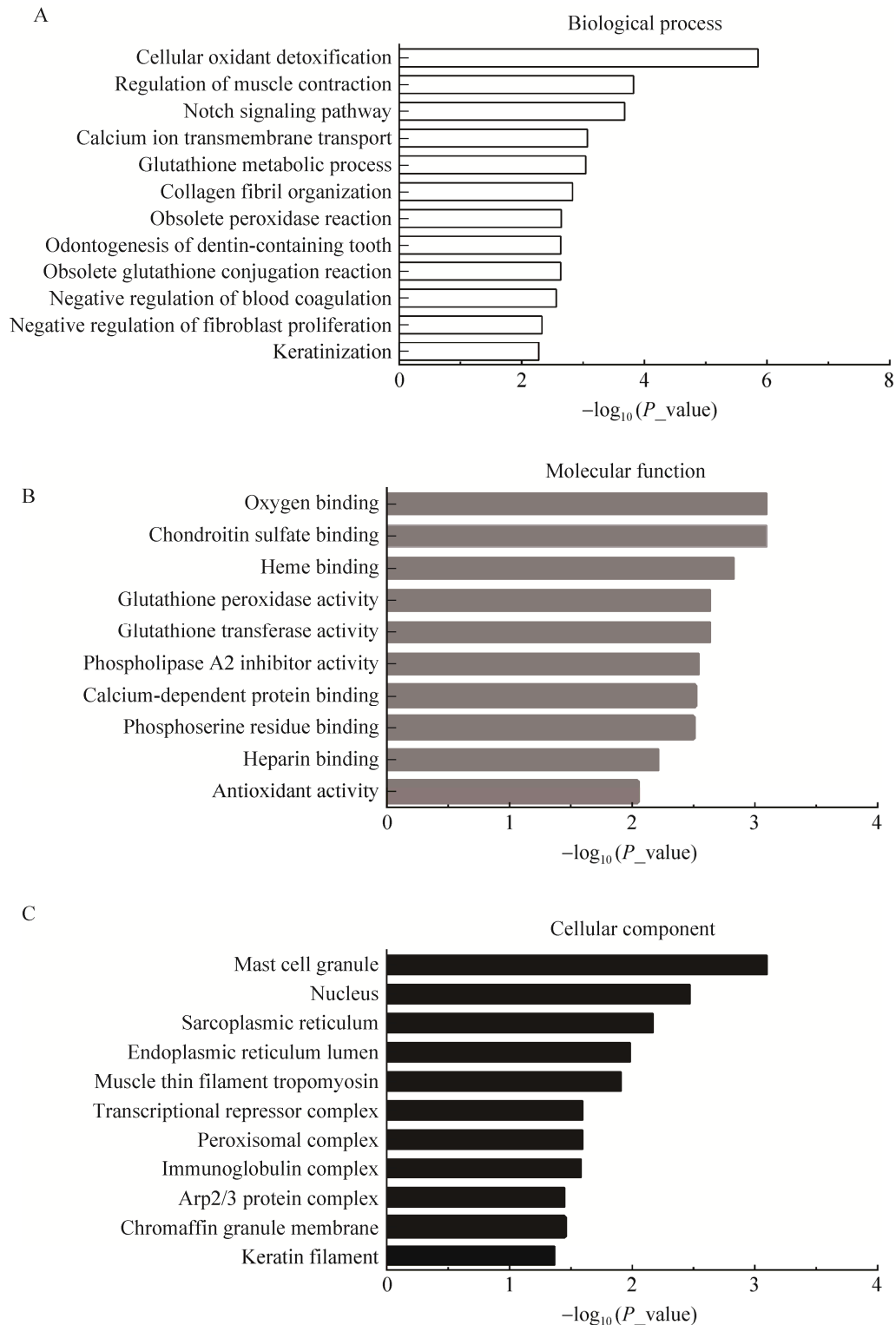


图 4 差异表达蛋白质的GO功能注释 A: 生物学过程; B: 分子功能; C: 细胞组分

Figure 4 GO functional analysis of differential proteins. (A) Biological process. (B) Molecular function. (C) Cellular component.

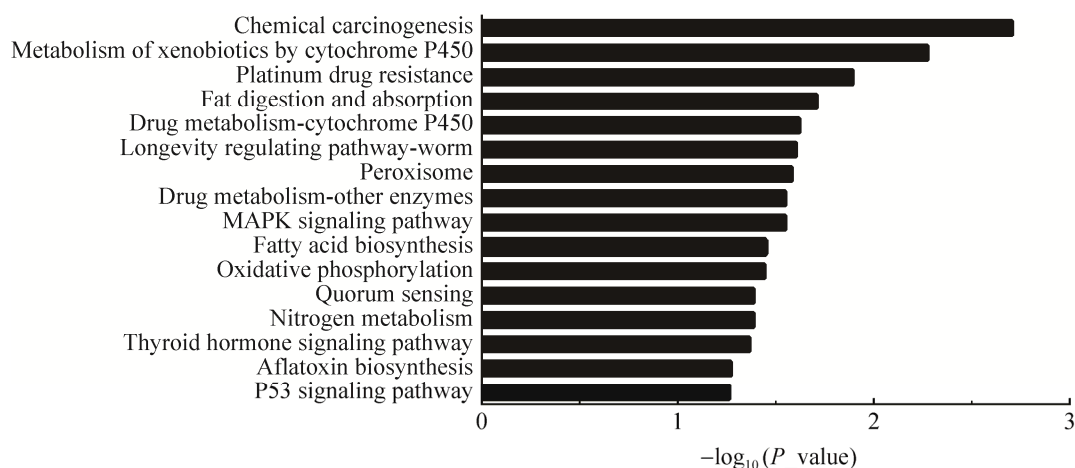


图5 差异表达蛋白质KEGG富集分析

Figure 5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed proteins.

3 讨论

羊毛的品质特性与品种、性别、年龄、季节和营养状况等多种因素有关。为探索性别因素对中国美利奴细毛羊羊毛经济性状的影响,本研究应用基于DIA的定量蛋白质组学分析技术,比较在羊毛生长发育过程中公羊与母羊皮肤组织蛋白组分差异表达,结果表明,获得的公羊和母羊蛋白质组种类数量相近,但由于公羊与母羊不同的生理状态,这些蛋白质的表达量也存在差异,共鉴定出674个差异表达蛋白质,其中280个上调表达,394个下调表达。与羊毛生长发育相关的上调差异蛋白有30个,下调差异蛋白有13个。其中羊毛主要结构蛋白—角蛋白中间丝(keratin intermediate filament, KIF)和角蛋白关联蛋白(keratin-associated protein, KAP)的出现频率较高,比如在公羊皮肤组织中筛选到上调表达的蛋白有KRT1、KRT79、KRT17、KRT4和KAP11-1,在母羊皮肤中筛选到上调表达的蛋白则只有KRT82。

角蛋白是羊毛纤维的主要成分蛋白,也是

毛囊重要的结构蛋白。Mardaryev等^[12]研究表明,miR-31能够靶向作用于KRT16、KRT17、同源异型框转录因子3(distal-less homeobox 3, DLX3)和成纤维细胞生长因子10蛋白(fibroblast growth factor-10, FGF10)在毛发生长周期的早期和中期可促进毛发生长期的发育,改变毛发基质角质形成细胞的分化和毛干的形成。KRT4蛋白属于II型角蛋白,在内根鞘中表达,其与胸腺素 β 4(thymosin β 4, T β 4)相互作用来介导细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路,从而促进次级毛囊的发育,进而提高羊绒产量和羊毛生长^[13]。KRT79和KRT82也属于II型角蛋白,KRT79在早期毛芽中表达^[14],而KRT82仅在纤维角质层中表达^[15]。KRT家族基因在绵羊皮肤不同结构中表达,从而改变羊毛的纤维结构^[16]。由此可见,KRT基因家族成员对羊毛结构发挥重要作用。

KAP是毛纤维基质的重要组成部分。Jin等^[17]研究结果显示,KAP11-1基因在辽宁山羊初级毛囊退行期的表达量显著高于生长期,而在次级毛囊中结果恰好相反;其次,该基因在

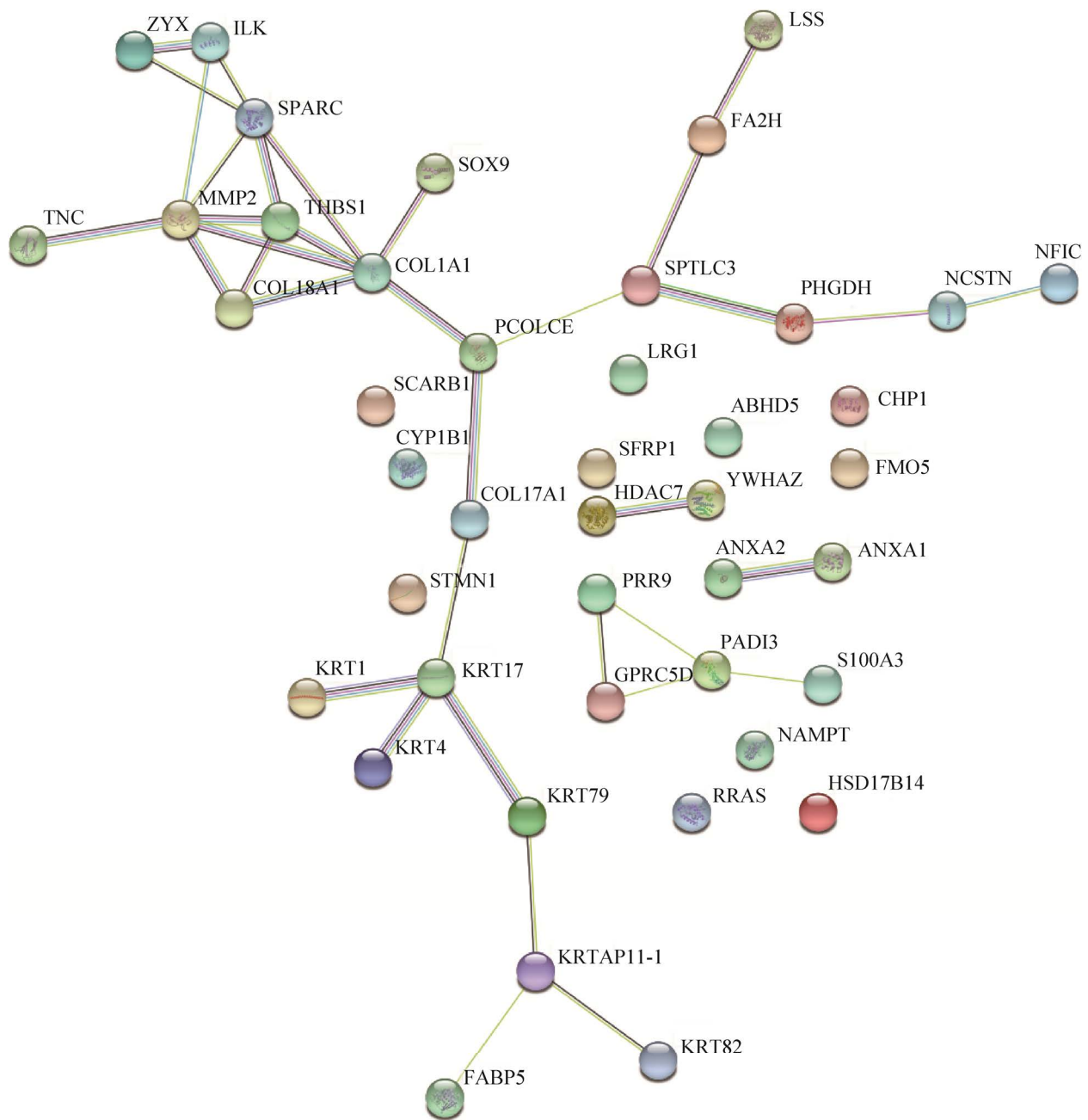


图6 差异表达蛋白质互作网络图

Figure 6 Interaction network of differentially expressed proteins.

毛囊内根鞘、毛发基质中表达较高，在毛球中表达较低；Liang 等^[18]研究发现 KAP11-1 的 mRNA 表达水平在毛囊退行期和静止期先增加后降低，过表达 KAP11-1 后，WNT2、KRT17、骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2)

和转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β -1, TGF- β -1) 基因的 mRNA 表达水平平均增加。初步认为，KAP11-1 基因可能是以级联调控方式参与调节毛囊的生长发育。

另外，本研究还筛选出其他一些与毛发生

长密切相关的重要基因, 诸如富含脯氨酸蛋白质 9 (pseudo-response regulator 9, PRR9)、脂肪酸 2-羟化酶 (fatty acid 2-hydroxylase, FA2H)、上皮型脂肪酸结合蛋白 5 (fatty acid-binding protein 5, FABP5) 和 $\alpha 1$ -I 型胶原蛋白 (collagen, type I, alpha 1, COL1A1) 等。PRR9 作为负责交联的谷氨酰胺的底物, 与毛囊皮肤发育过程中结构蛋白生物合成有关^[19]; FA2H 在羊绒皮肤的端粒中高度表达, 可用于提高羊绒产量^[20]; FABP5 是皮脂腺和生长期毛囊球的标志基因^[21]。COL1A1 和 COL1A2 是羊绒再生的必需基因, 与毛囊周期发育密切相关^[20]。这些基因是否与性别因素存在相关性, 目前尚不清楚。

前胶原 C 端蛋白酶增强子 (procollagen C-endopeptidase enhancer, PCOLCE) 蛋白是差异表达倍数前 10 的上调蛋白, 在皮肤真皮乳头细胞中高度表达, 并且在 BMP 信号通路中作为 BMP1 的激活剂发挥作用^[22]。表达量上调的差异蛋白中, 基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2)、分泌型卷曲相关蛋白 1 (secreted frizzled-related protein 1, SFRP1) 会阻断毛囊周期, MMP2 表达增加会降低毛发再生率, 毛囊数量和毛囊长度^[23], SFRP1 蛋白通过与 FGF10 蛋白竞争性调节 β -catenin 信号调节毛囊发育^[24]。G 蛋白偶联受体 C5 家族亚型 D (G protein-coupled receptor, family C, group 5, member D, GPRC5D)^[25]、 $\alpha 1$ -X V II 胶原蛋白 (collagen, type X V II, alpha 1, COL17A1)^[26]对毛囊发育和毛干分化起重要作用。有文献记载, 血小板反应蛋白 1 (thrombospondin 1, THBS1) 在毛发退行期诱导毛囊退化起关键作用^[27]。Won 等^[28]研究证实其作用并选择 THBS1、整合素 $\beta 1$ (integrins $\beta 1$, ITGB1) 和胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (insulin-like growth factor binding protein 3,

IGFBP3) 作为调节毛发生长的生物标志物。Li 等^[22]利用全基因组亚硫酸氢盐测序法研究了绒山羊毛生长期和退行期皮肤组织间的全基因组 DNA 甲基化谱, 通过整合 DNA 甲基化和 mRNA 表达数据, 揭示了丝氨酸棕榈酰转移酶长链碱性亚基 3 (serine palmitoyl transferase, long chain based subunit 3, SPTLC3)、 $\alpha 1$ -V 型胶原蛋白 (collagen, type V, alpha 1, COL5A1)、PCOLCE 和形成素 1 (formin-1, FMN1) 基因有助于毛发从退行期向生长期转变的表观遗传机制。另外两个酶也在毛囊生物学中起作用, 一个是羊毛甾醇合酶 (lanosterol synthase, LSS), 是胆固醇生物合成途径中的关键酶, 在毛囊的毛干和毛球中表达^[29]; 另一个为 17 β 羟类固醇脱氢酶 14 (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase X IV, HSD17B14), Brunner 等^[30]研究表明, 狗脱毛时, 该蛋白在皮肤组织中显著下调。以上结果与本研究结果相一致, 从分子水平上阐释了公羊羊毛较母羊羊毛在产量方面的优势。

毛囊的形态发生需要多种信号的协调以及上皮和间质成分之间的交流。整合素连接激酶 (integrin-linked kinase, ILK) 参与毛囊基质细胞的特异性、内根鞘形成和毛囊内陷, 对毛囊形成至关重要^[31]; 核因子 I 家族成员 C (nuclear factor I -C, NFIC)^[32]、小分子 GTP 酶超家族成员 (related to Ras superfamily, RRAS)^[33]和胞浆磷酸蛋白 1 (stathmin-1, STMN1)^[34]均对毛囊生长周期有调节作用。其中, NFIC 在毛囊生长静止期抑制 TGF- $\beta 1$ 信号转导, 导致 NFIC 缺乏, 小鼠的祖细胞增殖、毛囊再生延迟^[32]。本研究对 43 种差异蛋白进行了 GO 注释、KEGG 通路以及蛋白互作分析, GO 富集分析中生物学过程、分子功能和细胞组分类别中富集了大量细胞、代谢、发育和生物调节等类别,

说明中国美利奴公羊和母羊皮肤组织在发育、代谢和调节功能方面可能存在明显差异。KEGG 通路分析结果显示, 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、肿瘤抑制蛋白 (protein 53, P53) 信号通路等被显著富集。COL1A1 和 COL1A2 涉及磷脂酰肌醇-3-激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶 (phosphatidylinositol-3-kinases-serine/threonine kinase, PI3K-Akt) 信号通路, 该通路对毛囊再生的影响也有报道^[35]。蛋白质互作网络分析结果, COL1A1 蛋白与 MMP2、SPARC、THBS1 等差异表达蛋白联系较为紧密, 其可能在羊毛生长发育过程中起着关键作用。

4 结论

本研究应用基于 LC-MS/MS 联用技术和 DIA 策略的定量蛋白质组学技术, 结合生物信息学, 共获得 674 种差异表达蛋白。其中, 与毛囊生长发育相关的差异蛋白 43 种, 包含一些参与细胞发育、代谢和生物调节功能等重要生物过程, 具有分子信号转导和酶活性等重要分子功能的差异表达蛋白质, 其中公羊上调的有 30 种, 母羊上调的有 13 种。

REFERENCES

- [1] 关鸣轩, 李进龙, 杨存明, 等. 非遗传因素对新吉细毛羊主要经济性状的影响. 中国畜牧杂志, 2020, 56(8): 104-107, 110.
Guan MX, Li JL, Yang CM, et al. Effects of non-genetic factors on the main economic traits of Xinji fine wool sheep. *Chin J Animal Sci*, 2020, 56(8): 104-107, 110 (in Chinese).
- [2] 张敏, 赛迪古丽·赛买提, 库木斯·哈布多拉, 等. 性别、年龄因素对阿勒泰羊绒毛细度与长度的影响. 家畜生态学报, 2014, 35(8): 45-48.
Zhang M, Saidigul S, Kumus H, et al. Gender and age effect on the fineness and length of Altay sheep down hair. *Acta Ecol Animalis Domastici*, 2014, 35(8): 45-48.(in Chinese)
- [3] 张小伟, 王浩, 何军敏, 等. 影响多胎细毛羊主要经济性状的非遗传因素分析. 中国畜牧杂志, 2021, 57(3): 75-78.
Zhang XW, Wang H, He JM, et al. Analysis of non-genetic factors affecting main economic traits in multiple fetus fine wool sheep. *Chin J Animal Sci*, 2021, 57(3): 75-78 (in Chinese).
- [4] 陶卫东, 李彦飞, 田可川, 等. 影响南疆绒山羊主要性状的非遗传因素分析. 新疆农业科学, 2013, 50(2): 372-377.
Tao WD, Li YF, Tian KC, et al. Analysis of non-genetic factors of southern Xinjiang cashmere goat's primary traits. *Xinjiang Agric Sci*, 2013, 50(2): 372-377 (in Chinese).
- [5] 王鹏宇, 官却扎西, 祁全青, 等. 影响青海细毛羊早期性状非遗传因素的研究. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2011, 32(4): 29-33.
Wang PY, Guan QZX, Qi QQ, et al. The studies of non-genetic factors influence on early traits of Qinghai fine- wool sheep. *J Inner Mongolia Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 2011, 32(4): 29-33. (in Chinese)
- [6] 乔国艳, 袁超, 郭婷婷, 等. 不同数据结构和动物模型对高山美利奴羊经济性状遗传参数估计的比较. 中国畜牧兽医, 2020, 47(2): 531-543.
Qiao GY, Yuan C, Guo TT, et al. Comparison of different data structures and animal models for genetic parameter estimation of economic traits of alpine merino sheep. *China Animal Husb Vet Med*, 2020, 47(2): 531-543 (in Chinese).
- [7] Zhao MD, Liu X, Sun HD, et al. Evaluation of urinary proteome library generation methods on data-independent acquisition MS analysis and its application in normal urinary proteome analysis. *Proteomics Clin Appl*, 2019, 13(5): e1800152.
- [8] Anjo SI, Santa C, Manadas B. SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: from basic research to clinical applications. *Proteomics*, 2017, 17(3/4): 1600278.
- [9] Meyer JG, Schilling B. Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Rev Proteomics*, 2017, 14(5): 419-429.
- [10] Plowman JE, Harland DP, Campos AMO, et al. The wool proteome and fibre characteristics of three distinct genetic ovine breeds from Portugal. *J Proteomics*, 2020, 225: 103853.
- [11] Zhao JS, Qin HY, Xin JJ, et al. Discovery of genes and proteins possibly regulating mean wool fibre diameter using cDNA microarray and proteomic approaches. *Sci*

- Rep, 2020, 10(1): 7726.
- [12] Mardaryev AN, Ahmed MI, Vlahov NV, et al. Micro-RNA-31 controls hair cycle-associated changes in gene expression programs of the skin and hair follicle. *FASEB J*, 2010, 24(10): 3869-3881.
- [13] Dai B, Liang H, Guo DD, et al. The overexpression of T β 4 in the hair follicle tissue of alpas cashmere goats increases cashmere yield and promotes hair follicle development. *Animals (Basel)*, 2019, 10(1): 75.
- [14] Mesler AL, Benedeck RE, Wong SY. Preparing the hair follicle canal for hair shaft emergence. *Exp Dermatol*, 2021, 30(4): 472-478.
- [15] Yu ZD, Wildermoth JE, Wallace OAM, et al. Annotation of sheep keratin intermediate filament genes and their patterns of expression. *Exp Dermatol*, 2011, 20(7): 582-588.
- [16] Bawden CS, McLaughlan C, Rogers G, et al. A unique type I keratin intermediate filament gene family is abundantly expressed in the inner root sheaths of sheep and human hair follicles. *J Invest Dermatol*, 2001, 116(1): 157-166.
- [17] Jin M, Cao Q, Wang RL, et al. Molecular characterization and expression pattern of a novel keratin-associated protein 11.1 gene in the Liaoning cashmere goat (*Capra hircus*). *Asian-Australas J Anim Sci*, 2017, 30(3): 328-337.
- [18] Liang S, Bao ZY, Zhao BH, et al. Characterization and functional analysis of Krtap11-1 during hair follicle development in Angora rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Genes Genomics*, 2020, 42(11): 1281-1290.
- [19] Gao Y, Wang XL, Yan HL, et al. Comparative transcriptome analysis of fetal skin reveals key genes related to hair follicle morphogenesis in cashmere goats. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151118.
- [20] Wang JF, Sui J, Mao C, et al. Identification of key pathways and genes related to the development of hair follicle cycle in cashmere goats. *Genes(Basel)*, 2021, 12(2): 180.
- [21] Collins CA, Watt FM. Dynamic regulation of retinoic acid-binding proteins in developing, adult and neoplastic skin reveals roles for beta-catenin and Notch signalling. *Dev Biol*, 2008, 324(1): 55-67.
- [22] Li C, Li Y, Zhou GX, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of goat skins identifies signatures associated with hair cycling. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 638.
- [23] Hou C, Miao Y, Ji H, et al. 6-gingerol inhibits hair cycle via induction of MMP2 and MMP9 expression. *An Acad Bras Cienc*, 2017, 89(4): 2707-2717.
- [24] Zhang HH, Nan WX, Wang SY, et al. Balance between fibroblast growth factor 10 and secreted frizzled-related protein-1 controls the development of hair follicle by competitively regulating β -catenin signaling. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1531-1537.
- [25] Ahlawat S, Arora R, Sharma R, et al. Skin transcriptome profiling of Changthangi goats highlights the relevance of genes involved in Pashmina production. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 6050.
- [26] Shirai K, Obara K, Tohgi N, et al. Expression of anti-aging type-XVII collagen (COL17A1/BP180) in hair follicle-associated pluripotent (HAP) stem cells during differentiation. *Tissue Cell*, 2019, 59: 33-38.
- [27] Yano K, Brown LF, Lawler J, et al. Thrombospondin-1 plays a critical role in the induction of hair follicle involution and vascular regression during the catagen phase. *J Invest Dermatol*, 2003, 120(1): 14-19.
- [28] Won CH, Kwon OS, Kang YJ, et al. Comparative secretome analysis of human follicular dermal papilla cells and fibroblasts using shotgun proteomics. *BMB Rep*, 2012, 45(4): 253-258.
- [29] Romano MT, Tafazzoli A, Mattern M, et al. Bi-allelic mutations in LSS, encoding lanosterol synthase, cause autosomal-recessive hypotrichosis simplex. *Am J Hum Genet*, 2018, 103(5): 777-785.
- [30] Brunner MAT, Jagannathan V, Waluk DP, et al. Novel insights into the pathways regulating the canine hair cycle and their deregulation in alopecia X. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186469.
- [31] Rudkouskaya A, Welch I, Dagnino L. ILK modulates epithelial polarity and matrix formation in hair follicles. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(5): 620-632.
- [32] Plasari G, Edelmann S, Högger F, et al. Nuclear factor I-C regulates TGF- β -dependent hair follicle cycling. *J Biol Chem*, 2010, 285(44): 34115-34125.
- [33] Su R, Gong G, Zhang LT, et al. Screening the key genes of hair follicle growth cycle in Inner Mongolian cashmere goat based on RNA sequencing. *Arch Anim Breed*, 2020, 63(1): 155-164.
- [34] Zhang CY, Li YH, Qin J, et al. TMT-based quantitative proteomic analysis reveals the effect of bone marrow derived mesenchymal stem cell on hair follicle regeneration. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 658040.
- [35] Chen Y, Fan ZM, Wang XX, et al. PI3K/Akt signaling pathway is essential for *de novo* hair follicle regeneration. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 144.

(本文责编 陈宏宇)