

不同繁殖期牦牛主要生殖器官中 Uhrf1 的表达与定位分析

杨小耿^{1,2,3}, 陈平⁴, 汪丸淑¹, 贾鸿羽¹, 李钰浚¹, 张慧珠¹, 兰道亮¹, 李键¹, 何翊阔^{1,2,3*}

- 1 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川 成都 610041
- 2 四川省畜牧科学研究院, 四川 成都 610066
- 3 动物遗传育种四川省重点实验室, 四川 成都 610066
- 4 甘肃省农业科学院畜草与绿色农业研究所, 甘肃 兰州 730070

杨小耿, 陈平, 汪丸淑, 贾鸿羽, 李钰浚, 张慧珠, 兰道亮, 李键, 何翊阔. 不同繁殖期牦牛主要生殖器官中 Uhrf1 的表达与定位分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3833-3843.

YANG Xiaogeng, CHEN Ping, WANG Wanshu, JIA Hongyu, LI Yujun, ZHANG Huizhu, LAN Daoliang, LI Jian, HE Honghong. Expression and localization of Uhrf1 in the major reproductive organs of yaks during different reproductive cycles[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3833-3843.

摘要: Uhrf1 是一种有多结构域和功能的表观遗传因子, 在 DNA 甲基化、细胞代谢及细胞增殖中发挥关键作用。为探究 Uhrf1 在母牦牛生殖生理过程中的作用, 本研究采集 3 种繁殖期(卵泡期、黄体期和妊娠期)健康牦牛的 3 种生殖器官(卵巢、输卵管和子宫), 共 9 组, 采用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)、蛋白免疫印迹技术(Western blotting)和免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)法检测 Uhrf1 的表达和定位情况。RT-qPCR 和 Western blotting 结果显示, Uhrf1 在卵泡期输卵管中的表达量最高, 妊娠期子宫次之, 黄体期子宫最低 ($P < 0.05$)。IHC 结果显示, Uhrf1 主要在卵巢生殖上皮、卵泡膜、卵泡颗粒层、黄体细胞、输卵管黏膜上皮细胞、子宫腺(uterine glands, UG)中表达。本研究表明 Uhrf1 在不同繁殖期母牦牛主要生殖器官中的表达存在差异, 提示其在牦牛生殖生理过程中的调控作用具有重要意义。

关键词: Uhrf1; 牦牛; 繁殖周期; 卵巢; 输卵管; 子宫

资助项目: 动物遗传育种四川省重点实验室开放基金(SASA202301); 国家重点研发计划(2023YFD1801305); 西南民族大学中央高校基本科研业务费(ZYN2023095); 国家现代农业产业技术体系(CARS-37)

This work was supported by the Open Fund of Sichuan Key Laboratory of Animal Breeding and Genetics (SASA202301), the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801305), the Fundamental Research Funds for the Central Universities of Southwest Minzu University (ZYN2023095), and the China Modern Agriculture Research System (CARS-37).

*Corresponding author. E-mail: honghong3h@126.com

Received: 2024-04-27; Accepted: 2024-08-30; Published online: 2024-09-05

Expression and localization of Uhrf1 in the major reproductive organs of yaks during different reproductive cycles

YANG Xiaogeng^{1,2,3}, CHEN Ping⁴, WANG Wanshu¹, JIA Hongyu¹, LI Yujun¹, ZHANG Huizhu¹, LAN Daoliang¹, LI Jian¹, HE Honghong^{1,2,3*}

1 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization of Ministry of Education, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 Sichuan Academy of Animal Husbandry Sciences, Chengdu 610066, Sichuan, China

3 Animal Breeding and Genetics Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu 610066, Sichuan, China

4 Animal Husbandry-Pasture and Green Agricultural Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: Uhrf1 is a multi-domain and multifunctional epigenetic regulator playing key roles in DNA methylation, cell metabolism, and cell proliferation. To investigate the role of Uhrf1 in the reproductive physiology of female yaks, we collected three reproductive organs (ovaries, oviducts, and uteri) from healthy yaks during three reproductive phases (follicular, luteal, and gestational phases), with a total of nine groups. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR), Western blotting, and immunohistochemistry (IHC) were employed to determine the expression levels of Uhrf1 and the subcellular localization of this protein. RT-qPCR and Western blotting results showed that Uhrf1 was expressed highest in the oviduct during the follicular phase, moderate expression in the uterus during the gestational phase, and the lowest expression in the uterus during the luteal phase ($P < 0.05$). IHC results showed that Uhrf1 was mainly expressed in the ovarian germinal epithelium, theca follicular, follicular granulosa, luteal cells, oviduct mucosal epithelial cells, and uterine glands (UG) of yaks. In conclusion, Uhrf1 was differentially expressed in the major reproductive organs during the reproductive cycle of female yaks, indicating its important regulatory role in the reproductive physiology of yaks.

Keywords: Uhrf1; yak; reproductive cycle; ovary; oviduct; uterus

牦牛是唯一生活在低氧高寒地区的大型反刍动物^[1-3]。由于对高寒低氧和营养缺乏等恶劣环境具有极强的适应性^[4], 牦牛一直是高原牧区的宝贵资源, 是牧民赖以生存的生产生活资料, 对高原地区的畜牧业发展和历史文化遗产至关重要。然而, 在恶劣的自然环境下, 牦牛性成熟晚、繁殖率较低^[5], 通常每两年产一胎或三年产两胎^[6-7], 并且超过 90%的母牦牛在分娩后的首

个发情季节无法正常发情^[8], 这严重制约了牧区的经济发展。因此, 研究牦牛繁殖调控机制对于提高其繁殖效率具有重要意义。

泛素样植物同源结构域和环指结构域 1 (ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1, Uhrf1)是一种表观遗传修饰蛋白, 最早发现于小鼠细胞核中, 又被称为核蛋白 95(nuclear protein of 95 kDa, NP95)^[9], 主要存在

于细胞周期 S 期, 可调控细胞增殖和肿瘤生长, 在结直肠癌、肾细胞癌和肝内胆管细胞癌等多种类型的肿瘤中高度表达^[10-11]。Uhrf1 是一种 E3 泛素连接酶, 参与 DNA 甲基化和组蛋白修饰, 可靶向组蛋白 H3 上的多个赖氨酸, 使其被 DNA 甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, Dnmt1) 的复制位点靶向序列(replication foci targeting sequence, RFTS)结构域进一步识别, 从而促进 Dnmt1 的正确定位与激活, 并稳定泛素标记酶 E2-E3 复合物以促进 Uhrf1 发挥泛素化修饰作用^[12]。

Uhrf1 是具有多结构域和功能的表观遗传因子^[13-14], 参与多种生物学过程, 在早期胚胎发育、DNA 甲基化、细胞代谢、细胞增殖分化、细胞周期调控以及维持基因组的稳定性中发挥着关键作用^[10, 15-16]。有研究发现, 哺乳动物出生后生殖细胞中 Uhrf1 的条件性缺失可导致雄性完全不育^[17]。还有研究发现, 母体 *uhrf1* 可决定小鼠卵母细胞的质量, 小鼠卵母细胞特异性敲除 *uhrf1* 基因, 可导致雌性不育, *uhrf1* 基因敲除(knockout, KO)的大部分胚胎在达到囊胚阶段之前死亡^[18]。小鼠睾丸支持细胞特异性 *uhrf1* 基因敲除后表现为完全不育, 并伴有睾丸支持细胞增殖和分化异常、血睾屏障破坏和未成熟生殖细胞脱落的情况^[19]。

综上所述, Uhrf1 在哺乳动物的繁殖过程中发挥着关键作用。然而, 尚未见 Uhrf1 在不同繁殖期母牦牛主要生殖器官中表达的研究报道。因此, 本研究应用 RT-qPCR、Western blotting 及 IHC 法检测 Uhrf1 在不同繁殖期母牦牛主要生殖器官中的表达及定位, 为进一步探究 Uhrf1 在牦牛繁育过程中发挥的功能及机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

试验样品于 2023 年 9 月在四川省红原县某

牦牛屠宰场采集。从卵泡期(卵巢上有优势卵泡)、黄体期(卵巢上有多个黄体)和妊娠期(妊娠 2 个月)的健康母牦牛中各选 3 头, 在处死后立即取其同侧的卵巢、输卵管和子宫组织样品^[3, 20-21], 在 -80 °C 冰箱中储存备用。本试验由西南民族大学学术道德与伦理委员会审核批准(批准号: SMU-202401108)。

1.2 主要试剂及仪器设备

试剂: RNA 提取试剂盒(ET111-01-V2, 北京全式金生物技术有限公司); 2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix(Q311-02, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 蛋白裂解液(R0010, 北京索莱宝科技有限公司); 兔多克隆抗体 β -actin(AF7018, 江苏亲科生物研究中心有限公司); 牦牛源兔多克隆抗体 Uhrf1 (本实验室制备并保存); HRP 标记山羊抗兔 IgG(SA00001-2, 武汉三鹰生物技术有限公司); 免疫组化 SP 试剂盒(KIT-9720, 福州迈新生物技术开发有限公司提供)。

仪器: 电泳仪、转膜仪、荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司); Win20-数字切片扫描仪(山东志盈医学科技有限公司)。

1.3 组织 mRNA 的提取与反转录及 PCR 扩增

TransZol Up 法提取牦牛组织的总 RNA, 按反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 保存于 -20 °C 备用。根据 GenBank 数据库中牦牛 *uhrf1* 基因设计特异性引物(表 1), 由生工生物工程(上海)有限责任公司进行引物的最终合成。PCR 扩增 *uhrf1* 和 β -actin 基因, 并用琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.4 牦牛 *uhrf1* 基因的 RT-qPCR 检测

将牦牛 3 种繁殖期、3 种生殖器官分为 9 组, 每组样本 3 个复孔, 进行 *uhrf1* 基因的 RT-qPCR 检测, β -actin 为内参基因, 进行 3 次重复实验。反应体系(20 μ L): 2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer sequence (5'→3')	T_m (°C)	Product size (bp)	GenBank Accession number
<i>uhrfl</i>	F: TCCTGGCTGGAGGGTATG	58	181	XM_010806982.3
	R: CCTTTGAGGTCGTTGATGG			
β -actin	F: GCAATGAGCGGTTCC	52	141	NM_173979.3
	R: CCGTGTGCGTAGAG			

10 μ L、cDNA (10 μ mol/L) 1 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L)各 0.5 μ L、无菌去离子水 8 μ L。反应程序设定为: 95 °C预变性 30 s; 95 °C变性 10 s, 60 °C退火延伸 30 s, 进行 40 个循环; 最后检测熔解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 C_t 值进行相对定量分析^[22]。

1.5 牦牛 Uhrfl 蛋白的 Western blotting 检测

取 0.1 g 牦牛组织, 研磨成粉后, 加入 1 mL 裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)及 10 μ L 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), 在冰盒里裂解 30 min 后, 离心取上清液, 加入 4 \times 上样缓冲液(蛋白样品: 上样缓冲液=3:1), 混匀后, 在 100 °C条件下变性 5 min。经 10%的分离胶电泳后, 将分离的目的蛋白湿转至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene difluoride, PVDF)上, 用 5%脱脂牛奶对膜进行 2 h 的封闭处理, 使用一抗 Uhrfl (1:1 000)及 β -actin (1:10 000)在 4 °C条件下孵育过夜。次日, 用三羟甲基氨基甲烷缓冲液(tris buffered saline with Tween-20, TBST)洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后室温环境下将膜与二抗(1:8 000)孵育 2 h, 再经 TBST 洗膜 3 次后, 滴加增强型化学发光液(enhanced chemiluminescence, ECL)检测蛋白条带, 并用 Image J 软件分析灰度值^[23]。

1.6 免疫组织化学法检测牦牛 Uhrfl 蛋白定位

将 4%多聚甲醛充分固定的牦牛组织修剪成 (1 \times 1 \times 1) cm³ 大小, 在自来水下冲洗 24 h 后, 进行脱水、浸蜡、包埋、切片(厚度为 4 μ m), 切片干燥后再 64 °C烘烤 2 h, 然后进行酒精脱蜡并水化, 再用柠檬酸盐修复液(0.1 mol/L)微波修复抗

原。采用免疫组化试剂盒染色, 其中实验组滴加一抗 Uhrfl(1:500), 阴性对照组采用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)作为一抗的替代物, 4 °C过夜孵育。次日, 37 °C恒温箱中孵育二抗 15 min, 再用二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色, 苏木精复染, 脱水、透明、封片^[24]。

1.7 统计方法

采用 GraphPad Prism 8.4.3 软件对实验数据进行双因素方差分析, 分析牦牛 3 种繁殖期、3 种生殖器官中 *uhrfl* 基因和蛋白的表达差异, 每组实验至少重复 3 次。结果以“平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)”表示, $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 牦牛 *uhrfl* 基因表达情况

PCR 结果表明, 目的基因 *uhrfl* 和内参基因 β -actin 分别在 181 bp 和 141 bp 处具有单一条带(图 1), 符合预期大小, 说明引物特异性良好, 反转录的 cDNA 模板可用于后续的 RT-qPCR 实验。RT-qPCR 结果显示, *uhrfl* 基因在卵巢和输卵管中卵泡期的表达量均显著高于其在黄体期和妊娠期的表达量, 而在子宫中则是妊娠期的 *uhrfl* 表达量最高(图 2)。

2.2 牦牛 Uhrfl 蛋白表达

Western blotting 结果显示, Uhrfl 在卵巢和输卵管中卵泡期的表达量均显著高于其在黄体期和妊娠期的表达量, 而在子宫中则是妊娠期的 Uhrfl 表达量最高(图 3A、3B)。

2.3 牦牛 Uhrfl 蛋白定位

Uhrfl 蛋白阳性表达时在切片中显示为棕褐

色(图 4)。IHC 结果显示, Uhrf1 在牦牛不同繁殖期相同生殖器官中的定位差异不明显, 主要分布在卵巢的颗粒细胞、卵泡膜、卵巢生殖上皮细胞、黄体细胞和输卵管的黏膜上皮细胞、分泌细胞以及纤毛细胞和子宫腺中。

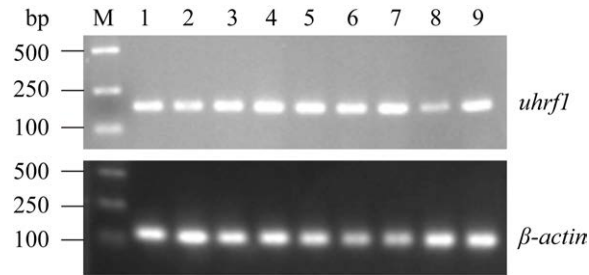


图 1 *β-actin* 和 *uhrf1* 基因的 PCR 扩增结果 M: 2 000 bp ladder; 1: 卵泡期卵巢; 2: 黄体期卵巢; 3: 妊娠期卵巢; 4: 卵泡期输卵管; 5: 黄体期输卵管; 6: 妊娠期输卵管; 7: 卵泡期子宫; 8: 黄体期子宫; 9: 妊娠期子宫

Figure 1 PCR amplification results for *β-actin* and *uhrf1* genes. M: 2 000 bp ladder; Lane 1: Ovary in follicular phase; Lane 2: Ovary in luteal phase; Lane 3: Ovary in gestational phase; Lane 4: Oviduct in follicular phase; Lane 5: Oviduct in luteal phase; Lane 6: Oviduct in gestational phase; Lane 7: Uterus in follicular phase; Lane 8: Uterus in luteal phase; Lane 9: Uterus in gestational phase

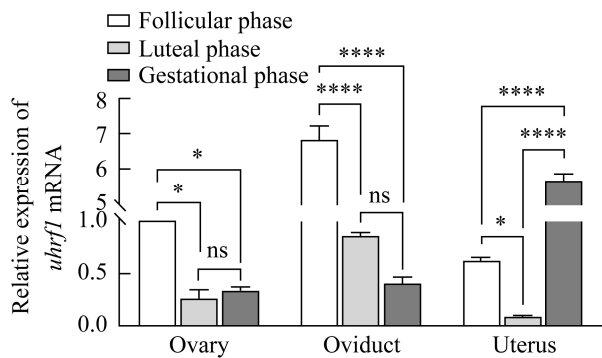


图 2 牦牛 *uhrf1* mRNA 的相对表达量 **Figure 2** Relative expressions of *uhrf1* mRNA in yak. Error lines in the figure refer to standard deviation. Statistical analysis using two-way ANOVA. ****: $P < 0.0001$; *: $P < 0.05$; ns: Not significant.

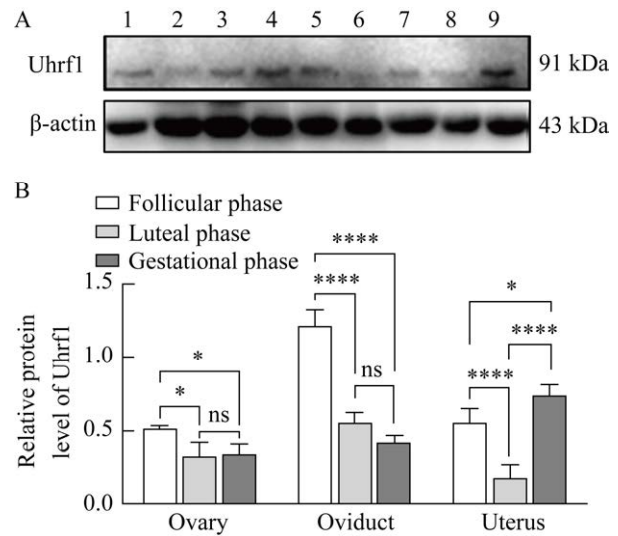


图 3 牦牛 Uhrf1 蛋白的相对表达量 1: 卵泡期卵巢; 2: 黄体期卵巢; 3: 妊娠期卵巢; 4: 卵泡期输卵管; 5: 黄体期输卵管; 6: 妊娠期输卵管; 7: 卵泡期子宫; 8: 黄体期子宫; 9: 妊娠期子宫 **Figure 3** Relative expression of Uhrf1 protein in yak. Lane 1: Ovary in follicular phase; Lane 2: Ovary in luteal phase; Lane 3: Ovary in gestational phase; Lane 4: Oviduct in follicular phase; Lane 5: Oviduct in luteal phase; Lane 6: Oviduct in gestational phase; Lane 7: Uterus in follicular phase; Lane 8: Uterus in luteal phase; Lane 9: Uterus in gestational phase. ****: $P < 0.0001$; *: $P < 0.05$; ns: Not significant.

3 讨论

表观遗传修饰在妊娠期间动态变化, 表观遗传修饰因子 Uhrf1 缺失会显著降低小鼠卵母细胞质量, 引起早期胚胎停滞。uhrf1 基因的多态性也与中国男性少精子症密切相关^[25]。此外, Uhrf1 作为一种关键的表观遗传修饰剂, 参与 DNA 甲基化和异染色质形成, 在众多生理和病理过程中具有至关重要的作用^[16,26]。由于 Uhrf1 大量存在于卵母细胞中, 并在整个附植前发育过程中持续存在, Cao 等^[18]通过构建卵母细胞特异性敲除小鼠来研究 Uhrf1 的作用, 当这些雌性与野生型雄

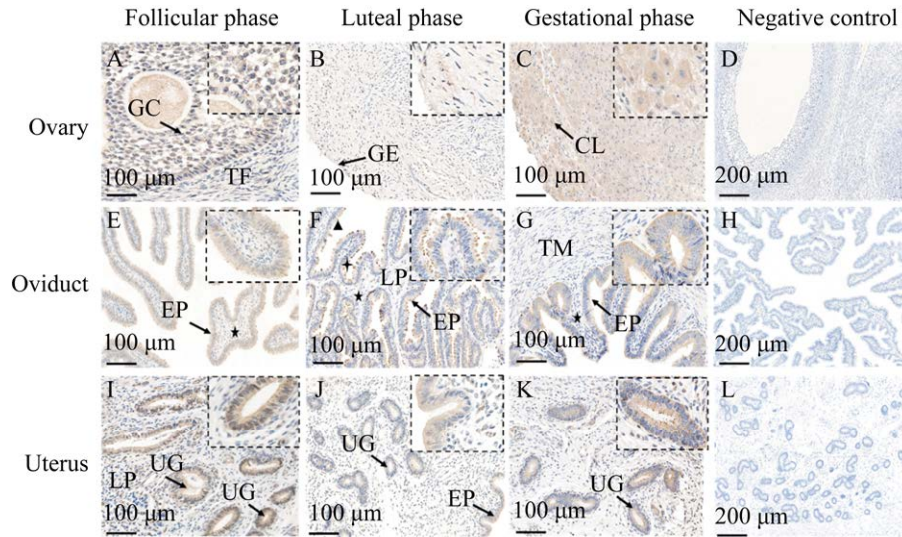


图 4 牦牛 *Uhrf1* 蛋白的分布 A: 卵泡期卵巢. B: 黄体期卵巢. C: 妊娠期卵巢. D: 卵巢阴性对照. E: 卵泡期输卵管. F: 黄体期输卵管. G: 妊娠期输卵管. H: 输卵管阴性对照. I: 卵泡期子宫. J: 黄体期子宫. K: 妊娠期子宫. L: 子宫阴性对照. GC: 颗粒细胞; TF: 卵泡膜; GE: 生殖上皮; CL: 黄体细胞; EP: 黏膜上皮; UG: 子宫腺; TM: 肌层; LP: 固有层; ▲: 分泌细胞; ✦: 纤毛细胞; ★: 基细胞.

Figure 4 Distribution of *Uhrf1* protein in yak. A: Ovary during follicular phase. B: Ovary in luteal phase. C: Ovary in gestational phase. D: Ovarian negative control. E: Oviduct in follicular phase. F: Oviduct in luteal phase. G: Oviduct in gestational phase. H: Oviduct negative control. I: Uterus in follicular phase. J: Uterus in luteal phase. K: Uterus in gestational phase. L: Uterine negative control. GC: Granulosa cells; TF: Theca follicular; GE: Germinal epithelium; CL: Luteal cells; EP: Epithelium mucosae; UG: Uterine glands; TM: Muscle layer; LP: Lamina propria; ▲: Secretory cell; ✦: Ciliated cell; ★: Basal cell.

性杂交时,在衍生的囊胚基因组中,其甲基化水平显著降低;这一结果表明母体 *Uhrf1* 在附植前胚胎中维持甲基化是必要的^[27],进一步证明 *Uhrf1* 在哺乳动物生殖过程中发挥着重要作用。

卵泡期出现在发情周期的早期,其主要特征是卵泡的发育和成熟。在卵泡期,卵巢中的卵泡细胞代谢活动增强,卵泡数量明显增加,合成的激素也随之增多^[28]。卵巢分泌的雌激素和孕激素等可调控子宫和输卵管的生长发育^[29]。有研究表明, *Uhrf1* 在成年哺乳动物及胎儿的胸腺、胎儿的肝脏、睾丸以及骨髓等含有高比例增殖细胞的组织中均高水平表达,而相比之下,大脑皮层、小脑和脊髓等非增殖细胞组成的组织中则几乎没有表达^[30]。此外, *Uhrf1* 通过将 DNMT 招

募到半甲基化位点来维持细胞分裂后的 DNA 甲基化状态,这表明 *Uhrf1* 可能参与细胞增殖^[31-32]。还有研究发现,成年小鼠腔上皮和腺上皮的增殖受到雌激素的调节,雌激素与孕酮共同作用刺激基质细胞的增殖^[33]。金鑫等^[34]给卵巢切除的小鼠注射雌激素后,发现 *uhrf1* 基因和蛋白的表达都有所上调,这表明 *Uhrf1* 表达的上调可能与雌激素刺激下的上皮细胞增殖有关。本研究结果表明, *Uhrf1* 主要定位于牦牛卵巢的颗粒细胞、生殖上皮细胞、黄体细胞和输卵管的分泌细胞、黏膜上皮细胞以及纤毛细胞等增殖细胞中。生殖上皮是卵母细胞形成的关键因素之一,卵巢颗粒细胞的增殖与卵泡发育紧密相关^[35],黄体细胞在妊娠建立及黄体维持与发育中发挥重要作用^[36],这

表明 Uhrf1 可能参与牦牛主要生殖器官中细胞的增殖, 推测 Uhrf1 在牦牛卵泡发育和成熟^[37]以及维持妊娠方面具有重要作用。

输卵管是卵母细胞成熟、精子获能、受精和胚胎运输发生的最佳微环境^[38-39]。输卵管分泌的细胞因子和趋化因子是子宫内膜细胞增殖和着床的化学信使, 有助于维持环境稳态^[40]。此外, 输卵管微环境提供了稳定的温度、最佳的 pH 值和动态的液体分泌物, 对卵子捕获和运输以及早期胚胎营养、发育和向子宫腔运输的过程至关重要^[41-42]。与卵巢和子宫类似, 输卵管也会经历激素调节的周期性形态变化, 这些变化主要导致了上皮细胞高度和纤毛搏动频率的变化。例如, 上皮细胞在月经期最短, 随后在增殖期高度增加, 在排卵期达到最大高度。在排卵后的时期, 分泌细胞最活跃, 纤毛搏动频率最高^[43]。在本研究中, *uhrf1* 基因和蛋白在牦牛卵泡期输卵管中以较高水平表达, 并且 Uhrf1 主要定位于输卵管黏膜上皮、分泌细胞、纤毛细胞中, 因此推测 *uhrf1* 基因和蛋白可能与黏膜上皮细胞的增殖及雌激素的分泌相关^[44]。

子宫是孕育胎儿的地方, 胚胎经输卵管进入子宫后^[45], 受到子宫内环境的影响, 启动胚胎基因, 激发胚胎发育^[46]。有研究发现, *uhrf1* 基因敲除的滋养层细胞株的侵袭力和细胞存活率显著降低^[47]。本研究发现 *uhrf1* 基因和蛋白在牦牛妊娠期子宫中高表达, 这表明 *uhrf1* 基因和蛋白可能在牦牛胚胎发育、调控细胞的生长与发育中发挥着重要的作用。还有研究发现, Uhrf1 主要定位于小鼠卵母细胞和附植前胚胎的细胞质中^[48], 只有小部分存在于细胞核中; 而在小鼠附植后胚胎(E11.5)中, Uhrf1 广泛存在于胎儿多个组织器官中^[49]。本研究中, Uhrf1 主要定位于牦牛卵泡期、黄体期和妊娠期的卵巢、输卵管和子宫组织细胞质中, 这与前人的研究结果相一

致。CHU 等^[50]通过在斑马鱼中注射吗啉以耗尽胚胎中的 Uhrf1, 最终导致原肠形成前停滞和早期胚胎死亡; 而这种表型可以被野生型的 Uhrf1 挽救, 但不能被磷酸化受体突变的 Uhrf1 挽救, 这表明 Uhrf1 的磷酸化是胚胎发生所必需的; 另外研究还发现, Uhrf1 定位于胞核和胞浆, 而非磷酸化的 Uhrf1 不能定位于胞浆, 提示这种磷酸化可能会改变 Uhrf1 的定位, 促使 Uhrf1 向细胞核外运输。此外, 外源 Uhrf1 在受精卵时期主要位于细胞核内, 在卵裂后胚胎中则均匀分布于细胞核和细胞质中, 使 Uhrf1 蛋白向胞质中的运输增多, 早期胚胎中内源 Uhrf1 蛋白的分布模式可能也受到类似机制的调节, 使 Uhrf1 蛋白主要定位于胞质中, 这表明早期胚胎中 Uhrf1 蛋白向胞质内转运, 避免细胞核内含量过高, 以维持胚胎发育的正常进行^[49]。但 Uhrf1 在牦牛 3 种繁殖期、3 种生殖器官中是否也受到相关机制的调节以及其具体调节机制还需要进一步研究。

4 结论

本研究发现, Uhrf1 在牦牛卵巢、输卵管和子宫中均有表达, 且具有显著性差异, 但在不同繁殖期相同生殖器官中的定位差异不明显, 主要定位于卵巢的颗粒细胞、卵泡膜、生殖上皮、黄体细胞和输卵管的黏膜上皮、分泌细胞、纤毛细胞及子宫腺中。本研究表明 *uhrf1* 基因和蛋白可能参与了牦牛卵母细胞的运输以及胚胎的生长发育等过程, 为进一步探究 *uhrf1* 基因和蛋白在牦牛生殖过程中发挥的作用及其机制提供了参考。

REFERENCES

- [1] HE HH, ZHANG HZ, LI Q, FAN JF, PAN YY, ZHANG TX, ROBERT N, ZHAO L, HU XQ, HAN XH, YANG SS, CUI Y, YU SJ. Low oxygen concentrations improve yak oocyte maturation and enhance the developmental competence of preimplantation

- embryos[J]. *Theriogenology*, 2020, 156: 46-58.
- [2] ZHANG TJ, BASANG WD, CHANG WH, HUO SD, MA XB, JU XH, YU SJ, CUI S. Dynamics of apoptosis-related gene expression during follicular development in yak[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2021, 105(6): 1002-1013.
- [3] 韩小红, 何翎阁, 王靖雷, 张慧珠, 马悦, 马进彪, 赵生贤, 余四九, 崔燕, 樊江峰. 牦牛 p38MAPK 在雌性主要生殖器官中的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50(9): 1802-1812.
- HAN XH, HE HH, WANG JL, ZHANG HZ, MA Y, MA JB, ZHAO SX, YU SJ, CUI Y, FAN JF. Expression of p38MAPK in the main reproductive organs of female yaks (*Bos grunniens*)[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(9): 1802-1812 (in Chinese).
- [4] FAN JF, YU YT, HAN XH, HE HH, LUO YZ, YU SJ, CUI Y, XU GQ, WANG LB, PAN YY. The expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in primary reproductive organs of the female yak (*Bos grunniens*) at different reproductive stages[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2020, 55(10): 1371-1382.
- [5] PAN YY, WANG M, BALOCH AR, ZHANG Q, WANG JL, MA R, XU GQ, KASHIF J, WANG LB, FAN JF, CUI Y, YU SJ. FGF10 enhances yak oocyte fertilization competence and subsequent blastocyst quality and regulates the levels of CD9, CD81, DNMT1, and DNMT3B[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(10): 17677-17689.
- [6] ZI XD. Reproduction in female yaks (*Bos grunniens*) and opportunities for improvement[J]. *Theriogenology*, 2003, 59(5-6): 1303-1312.
- [7] 毛进彬, 毛旭东, 涂永强, 王俊杰, 刘明刚, 杨甲呷. 亚丁牦牛繁殖性能调查[J]. *中国牛业科学*, 2020, 46(2): 81-83.
- MAO JB, MAO XD, TU YQ, WANG JJ, LIU MG, YANG JG. Investigation on reproductive performance of Yading yak[J]. *China Cattle Science*, 2020, 46(2): 81-83 (in Chinese).
- [8] XIAO X, ZI XD, NIU HR, XIONG XR, ZHONG JC, LI J, WANG L, WANG Y. Effect of addition of FSH, LH and proteasome inhibitor MG132 to *in vitro* maturation medium on the developmental competence of yak (*Bos grunniens*) oocytes[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, 12: 30.
- [9] FUJIMORI A, MATSUDA Y, TAKEMOTO Y, HASHIMOTO Y, KUBO E, ARAKI R, FUKUMURA R, MITA K, TATSUMI K, MUTO M. Cloning and mapping of Np95 gene which encodes a novel nuclear protein associated with cell proliferation[J]. *Mammalian Genome*, 1998, 9(12): 1032-1035.
- [10] 郭梓, 莫朝晖. *UHRF1* 基因在甲基化调控与血管新生中的作用[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(2): 200-204.
- GUO Z, MO ZH. Role of *UHRF1* in methylation regulation and angiogenesis[J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2020, 37(2): 200-204 (in Chinese).
- [11] HONG YJ, PARK J, HAHM JY, KIM SH, LEE DH, PARK KS, SEO SB. Regulation of UHRF1 acetylation by TIP60 is important for colon cancer cell proliferation[J]. *Genes & Genomics*, 2022, 44(11): 1353-1361.
- [12] LI T, WANG LS, DU YM, XIE S, YANG X, LIAN FM, ZHOU ZJ, QIAN CM. Structural and mechanistic insights into UHRF1-mediated DNMT1 activation in the maintenance DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(6): 3218-3231.
- [13] MANCINI M, MAGNANI E, MACCHI F, BONAPACE IM. The multi-functionality of UHRF1: epigenome maintenance and preservation of genome integrity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(11): 6053-6068.
- [14] 王迪, 高超, 王孟冬, 肖成路, 唐军. UHRF1 依赖自身的甲基化修饰调控 HIF-1 α 的蛋白水平[J]. *中国细胞生物学学报*, 2023, 45(7): 1009-1019.
- WANG D, GAO C, WANG MD, XIAO CL, TANG J. UHRF1 regulates the protein level of HIF-1 α dependents on its own methylation modification[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2023, 45(7): 1009-1019 (in Chinese).
- [15] XU X, DING GJ, LIU CZ, DING YH, CHEN XX, HUANG XL, ZHANG CS, LU SX, ZHANG YP, HUANG YY, CHEN ZS, WEI W, LIAO LJ, LIN SH, LI JY, LIU W, LI JW, LIN SC, MA XR, WONG J. Nuclear UHRF1 is a gate-keeper of cellular AMPK activity and function[J]. *Cell Research*, 2022, 32(1): 54-71.
- [16] HU QS, QIN Y, JI SR, XU WY, LIU WS, SUN QQ, ZHANG Z, LIU MQ, NI QX, YU XJ, XU XW. UHRF1 promotes aerobic glycolysis and proliferation *via*

- suppression of SIRT4 in pancreatic cancer[J]. *Cancer Letters*, 2019, 452: 226-236.
- [17] DONG J, WANG XL, CAO CC, WEN YJ, SAKASHITA A, CHEN S, ZHANG J, ZHANG Y, ZHOU LQ, LUO MC, LIU MX, LIAO AH, NAMEKAWA SH, YUAN SQ. UHRF1 suppresses retrotransposons and cooperates with PRMT5 and PIWI proteins in male germ cells[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4705.
- [18] CAO YM, LI MR, LIU F, NI XB, WANG S, ZHANG H, SUI XS, HUO R. Deletion of maternal UHRF1 severely reduces mouse oocyte quality and causes developmental defects in preimplantation embryos[J]. *The FASEB Journal*, 2019, 33(7): 8294-8305.
- [19] WU YQ, DUAN P, WEN YJ, ZHANG J, WANG XL, DONG J, ZHAO Q, FENG SL, LV CY, GUO Y, NAMEKAWA SH, YUAN SQ. UHRF1 establishes crosstalk between somatic and germ cells in male reproduction[J]. *Cell Death & Disease*, 2022, 13(4): 377.
- [20] 马文斌, 王萌, 潘阳阳, 王靖雷, 张燕燕, 高丽青, 张晖, 王军乾, 余四九, 王立斌. *Enpp2* 基因的分子特征及其在雌性牦牛不同繁殖阶段生殖器官中的表达[J]. *动物医学进展*, 2022, 43(1): 58-64.
- MA WB, WANG M, PAN YY, WANG JL, ZHANG YY, GAO LQ, ZHANG H, WANG JQ, YU SJ, WANG LB. Molecular characterization of *Enpp2* gene and its expressions in reproductive organs of female yaks (*Bos grunniens*)[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(1): 58-64 (in Chinese).
- [21] 张晖, 潘阳阳, 王靖雷, 张瑞, 黄嘉馨, 余四九, 崔燕. 牦牛 *RBM3* 的基因克隆及其在不同繁殖时期卵巢、输卵管、子宫中的表达定位[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(7): 2202-2214.
- ZHANG H, PAN YY, WANG JL, ZHANG R, HUANG JX, YU SJ, CUI Y. *RBM3* gene cloning and its expression, localization in ovary, fallopian tube and uterus at different reproductive stages of yak (*Bos grunniens*)[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(7): 2202-2214 (in Chinese).
- [22] 何翊闯. *HSP27* 基因的克隆及其在母牦牛生殖器官和孤雌激活胚胎的表达[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2016.
- HE HH. Cloning of *Bos grunniens HSP27* gene and its expression both in the female yak reproductive organs and parthenogenetic embryos[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [23] 王静瑜, 王萌, 潘阳阳, 王靖雷, 张瑞, 马睿, 胡学权, 仇晓飞, 崔燕, 余四九, 徐庚全. 牦牛 *FAFI* 基因的分子特征及其在不同阶段卵巢、输卵管、子宫中的表达[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(7): 80-89.
- WANG JY, WANG M, PAN YY, WANG JL, ZHANG R, MA R, HU XQ, QIU XF, CUI Y, YU SJ, XU GQ. Molecular characteristics of *Bos grunniens FAFI* gene and its expression in ovaries, fallopian tubes and uterus at different stages[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(7): 80-89 (in Chinese).
- [24] 张瑞, 王靖雷, 潘阳阳, 王静瑜, 胡学权, 马睿, 崔燕, 余四九. 牦牛 *CAVI* 基因克隆及其在雌性生殖系统主要器官中的表达定位[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(4): 681-692.
- ZHANG R, WANG JL, PAN YY, WANG JY, HU XQ, MA R, CUI Y, YU SJ. Cloning of yak (*Bos grunniens*) *CAVI* gene and its expression in major organs of female reproductive system[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(4): 681-692 (in Chinese).
- [25] ZHU WQ, DU J, CHEN Q, ZHANG ZF, WU B, XU JH, LI TQ, BI Y, SHI HJ, LI RS. Association of *UHRF1* gene polymorphisms with oligospermia in Chinese males[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2019, 36(12): 2563-2573.
- [26] ZHAO JY, CHEN XF, SONG GR, ZHANG JL, LIU HF, LIU XL. *Uhrf1* controls the self-renewal versus differentiation of hematopoietic stem cells by epigenetically regulating the cell-division modes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(2): E142-E151.
- [27] MAENOHARA S, UNOKI M, TOH H, OHISHI H, SHARIF J, KOSEKI H, SASAKI H. Role of UHRF1 in *de novo* DNA methylation in oocytes and maintenance methylation in preimplantation embryos[J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(10): e1007042.
- [28] MOOREY SE, HESSOCK EA, EDWARDS JL. Preovulatory follicle contributions to oocyte competence in cattle: importance of the ever-evolving intrafollicular environment leading up to the luteinizing hormone surge[J]. *Journal of Animal Science*, 2022, 100(7): skac153.

- [29] CHEN H, YU SJ, CUI Y. Label-free proteomic analysis reveals an estrous cycle transition between the follicular phase and the luteal phase in yak ovary[J]. *Animal Science Journal*, 2023, 94(1): e13855.
- [30] UNOKI M, SASAKI H. The UHRF protein family in epigenetics, development, and carcinogenesis[J]. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences*, 2022, 98(8): 401-415.
- [31] 杨小耿, 张慧珠, 李键, 向华, 何翊阔. DNA 甲基化在哺乳动物卵母细胞和早期胚胎发育中的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(2): 443-450.
YANG XG, ZHANG HZ, LI J, XIANG H, HE HH. Research progress of the DNA methylation in mammalian oocyte and early embryo development[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(2): 443-450 (in Chinese).
- [32] GE TT, YANG M, CHEN Z, LOU G, GU T. *UHRF1* gene silencing inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis in human cervical squamous cell carcinoma CaSki cells[J]. *Journal of Ovarian Research*, 2016, 9(1): 42.
- [33] WANG HB, GUO Y, WANG DZ, KINGSLEY PJ, MARNETT LJ, DAS SK, DuBOIS RN, DEY SK. Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(10): 1074-1080.
- [34] 金鑫, 王静, 孙宇, 李世杰, 马兴红. UHRF1 在小鼠早期妊娠子宫中的表达与激素调节[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(8): 1691-1696.
JIN X, WANG J, SUN Y, LI SJ, MA XH. Expression and hormone regulation of UHRF1 in mouse uterus during early pregnancy[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(8): 1691-1696 (in Chinese).
- [35] WANG HL, FU Y. NR1D1 suppressed the growth of ovarian cancer by abrogating the JAK/STAT3 signaling pathway[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 871.
- [36] LUO XY, CHANG HM, YI YY, SUN YP, LEUNG PCK. Bone morphogenetic protein 2 inhibits growth differentiation factor 8-induced cell signaling *via* upregulation of gremlin2 expression in human granulosa-lutein cells[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2021, 19(1): 173.
- [37] PEREGO MC, MORRELL BC, ZHANG LN, SCHÜTZ LF, SPICER LJ. Developmental and hormonal regulation of ubiquitin-like with plant homeodomain and really interesting new gene finger domains 1 gene expression in ovarian granulosa and theca cells of cattle[J]. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(7): skaa205.
- [38] WANG JL, PAN YY, WANG M, XU RH, HAN XH, MA R, ZHAO L, ZHANG TX, WANG YY, ZHAO T, DING TY, BALOCH AR, WANG LB, CUI Y, YU SJ. Follicular fluid exosomes regulate OVGP1 secretion in yak oviduct epithelial cells *via* autophagy *in vitro*[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2023, 238(5): 1020-1035.
- [39] 蒋旭东, 刘宇, 邬建飞, 胡双阁, 卢建远, 字向东. 牦牛 FGG 组织表达与雌性生殖器官中定位分析[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(11): 286-294.
JIANG XD, LIU Y, WU JF, HU SG, LU JY, ZI XD. Tissue expression and localization analysis of FGG in female reproductive organs of *Bos grunniens*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(11): 286-294 (in Chinese).
- [40] MOUSAVI SO, MOHAMMADI R, AMJADI F, ZANDIEH Z, AGHAJANPOUR S, AFLATOONIAN K, SABBAGHIAN M, ESLAMI M, MADANI T, AFLATOONIAN R. Immunological response of fallopian tube epithelial cells to spermatozoa through modulating cytokines and chemokines[J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 2021, 146: 103327.
- [41] LI S, WINUTHAYANON W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development[J]. *The Journal of Endocrinology*, 2017, 232(1): R1-R26.
- [42] XU T, LI X, YANG L, ZHANG YQ, ZHANG L, GUO Z, CHENG XD, ZHENG XT, CHEN BD, HOU ZD, YANG DF. Impact of cold exposure on the reproductive function in female rats[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 3674906.
- [43] VARGA I, CSÖBÖNYEIOVÁ M, VISNYAIOVÁ K, ZÁHUMENSKÝ J, PAVLÍKOVÁ L, FEITSCHEROVÁ C, KLEIN M. Functional morphology of the human uterine tubes in the 21st century: anatomical novelties and their possible clinical applications[J]. *Physiological Research*, 2022, 71(Suppl 1): S151-S159.
- [44] PINTO-BRAVO P, GALVÃO A, REBORDÃO MR, AMARAL A, RAMILO D, SILVA E, SZÓSTEK-MIODUCHOWSKA A, ALEXANDRE-

- PIRES G, ROBERTO Da COSTA R, SKARZYNSKI DJ, FERREIRA-DIAS G. Ovarian steroids, oxytocin, and tumor necrosis factor modulate equine oviduct function[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2017, 61: 84-99.
- [45] 王楠, 张瑞, 潘阳阳, 何翊囡, 王靖雷, 崔燕, 余四九. 牦牛 *TGF- β 1* 基因克隆及在雌性生殖系统主要器官中的表达定位[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(6): 279-290.
- WANG N, ZHANG R, PAN YY, HE HH, WANG JL, CUI Y, YU SJ. Cloning of *Bos grunniens TGF- β 1* gene and its expression in major organs of female reproductive system[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(6): 279-290 (in Chinese).
- [46] MUTER J, LYNCH VJ, McCOY RC, BROSENS JJ. Human embryo implantation[J]. *Development*, 2023, 150(10): dev201507.
- [47] LIU H, WANG LL, XU QH, WANG J, ZHANG YJ, LUO J, LIAO AH. UHRF1 shapes both the trophoblast invasion and decidual macrophage differentiation in early pregnancy[J]. *The FASEB Journal*, 2022, 36(4): e22247.
- [48] UEMURA S, MAENOHARA S, INOUE K, OGONUKI N, MATOBA S, OGURA A, KURUMIZAKA M, YAMAGATA K, SHARIF J, KOSEKI H, UEDA K, UNOKI M, SASAKI H. UHRF1 is essential for proper cytoplasmic architecture and function of mouse oocytes and derived embryos[J]. *Life Science Alliance*, 2023, 6(8): e202301904.
- [49] 张磊. *UHRF1* 基因调节小鼠早期胚胎发育的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2019.
- ZHANG L. *UHRF1* gene regulates early embryo development in mouse[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A & F University, 2019 (in Chinese).
- [50] CHU J, LOUGHLIN EA, GAUR NA, SenBANERJEE S, JACOB V, MONSON C, KENT B, ORANU A, DING YY, UKOMADU C, SADLER KC. UHRF1 phosphorylation by cyclin A2/cyclin-dependent kinase 2 is required for zebrafish embryogenesis[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2012, 23(1): 59-70.

(本文责编 郝丽芳)