



王源朗, 丁海生, 齐平平, 赵辉玲, 黄冬维. 长毛兔粗、细毛毛囊转录组比较分析[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(01): 142-152.

WANG Yuanlang, DING Haisheng, QI Pingping, ZHAO Huiling, HUANG Dongwei. Comparative analysis of transcriptomes between coarse and fine hair follicles in Angora rabbits. [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(01): 142-152.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.01.12

长毛兔粗、细毛毛囊转录组比较分析

王源朗 丁海生 齐平平 赵辉玲 黄冬维*

(安徽省农业科学院 畜牧兽医研究所/畜禽产品安全工程安徽省重点实验室, 合肥 230031)

摘要 为筛选出影响兔毛纤维直径的相关基因及调控通路,本研究采用RNA测序(RNA-seq)鉴定长毛兔粗、细毛毛囊中差异表达的基因,并进行差异基因(DEGs)功能富集分析。通过Cytoscape构建蛋白互作网络,筛选出核心基因,最后采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)对差异表达基因进行验证。结果表明:1)RNA-seq共鉴定了412个DEGs,相比粗毛毛囊,160个DEGs在细毛毛囊上调表达,252个DEGs下调表达。2)GO功能富集分析显示,差异基因显著富集到330个条目中,包括蜕皮周期、发周期、毛发周期的调节、超分子纤维等与粗、细毛生长相关的条目;KEGG富集分析表明差异表达基因显著富集在雌激素信号通路、蛋白质消化和吸收、内质网中的蛋白质加工途径、PPAR信号通路、FoxO信号通路和基底细胞癌等与长毛兔粗、细毛生长分化有关的信号通路中。3)蛋白互作网络分析表明SHH、LGR5、CTSB、ACTA2和CRNN等是调控毛纤维结构的重要功能基因。综上,本研究鉴定了调控兔毛直径的差异表达基因,挖掘出5个与长毛兔粗、细毛分化相关的候选基因,为细毛型长毛兔的选育提供理论依据和数据支撑。

关键词 长毛兔; 毛囊; 纤维直径; RNA-seq; 蛋白互作

中图分类号 S829.1

文章编号 1007-4333(2025)01-0142-11

文献标志码 A

Comparative analysis of transcriptomes between coarse and fine hair follicles in Angora rabbits.

WANG Yuanlang, DING Haisheng, QI Pingping, ZHAO Huiling, HUANG Dongwei*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine/Anhui Key Laboratory of Livestock and Poultry Product Safety Engineering, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract To screen for genes and regulatory pathways that affect the diameter of Angora rabbit hair fibers, RNA sequencing (RNA-Seq) was used to identify expressed genes in the coarse and fine hair follicles of Angora rabbits, and differentially expressed genes (DEGs) functional enrichment was performed. Additionally, a protein-protein interaction (PPI) network was constructed using Cytoscape to identify hub genes involved in regulating the diameter of rabbit hair fibers. Finally, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was employed for validation of the DEGs. The results showed that: 1) A total of 412 DEGs were identified by RNA-seq. Compared to coarse hair follicles, 160 DEGs were up-regulated in fine hair follicles and 252 DEGs were down-regulated. 2) GO functional analysis showed that differentially expressed genes were significantly enriched in 330 biological processes, including molting cycle hair cycle, hair cycle regulation, supramolecular fiber formation, and other articles related to the growth of coarse and fine hair.

收稿日期: 2024-02-02

基金项目: 国家兔产业技术体系(CARS-43-A-4);安徽省重点研究与开发计划项目(202104a06020032);安徽省农业科学院第一批学科领军人才计划(LJRC-202107);安徽省特色农业产业技术体系

第一作者: 王源朗(ORCID: 0000-0001-9245-2554),助理研究员,主要从事草食动物育种与生产研究, E-mail: wangyuanlang@126.com

通讯作者: 黄冬维(ORCID: 0000-0001-6639-9438),副研究员,主要从事草食动物育种与生产研究, E-mail: hdwscience@163.com

Additionally, KEGG enrichment analysis demonstrated that differentially expressed genes were significantly enrichment in the estrogen signaling pathway, protein digestion and absorption pathway, endoplasmic reticulum protein processing pathway, PPAR signaling pathway, FoxO signaling pathway, and basal cell carcinoma pathway, which were related to the growth and differentiation of coarse and fine hair in Angora rabbits. 3) Protein interaction network analysis highlighted *SHH*, *LGR5*, *CTSB*, *ACTA2*, and *CRNN* as important functional genes regulating the structure of hair fibers. In conclusion, this study elucidated the molecular mechanism underlying the regulation of rabbit hair fineness, identified DEGs involved in controlling rabbit hair diameter, and discovered 5 potential candidate genes associated with coarse and fine hair differentiation in Angora rabbits. These findings provide a solid theoretical foundation and empirical evidence to support the breeding program of fine-haired Angora rabbits.

Keywords Angora rabbit; fiber diameter; RNA-seq; protein-protein interaction

近年来,在乡村振兴的政策背景下,各地政府积极引导兔毛加工企业在新产品开发上的加大投入、加强市场推广、开拓产品市场,已取得初步成效。据调查,2022年我国兔毛制品的出口量为12.53万件,相较于2021年,同比增长20.63%;与此同时,兔毛原料出口总量为138.71 t,同比下降5%^[1],具有高附加值的兔毛制品受到越来越多的关注。这一转变,增加了高品质兔毛的需求量,也对兔毛品种改良提出更高的要求。兔毛以长、白、松、净、细、软成为纺织工业中最受欢迎的天然纤维之一,兔毛纤维细度在13~14 μm 左右为细毛,适合作为精纺原料,更受市场欢迎^[1]。细度是影响兔毛纺织性能、决定兔毛市场价格等经济价值的重要指标^[2]。然而目前细毛产量及品质难以满足市场需要,为进一步改善兔毛品质,深入了解研究调控兔毛细度相关分子机制必不可少。

转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)技术能够对基因结构与功能进行深层次地挖掘和分析,探索各种经济性状与基因表达之间的内在联系^[4]。研究表明,兔毛的生长受到营养、环境及遗传等诸多因素的影响,与角质形成细胞增殖、表皮发育及毛囊形态发生密切相关^[3]。目前,利用RNA-seq技术,部分与兔毛生长密切相关通路已被报道,如Wnt信号通路^[5]、TGF- β 信号通路^[6]、MAPK信号通路等^[7]。同时,鉴定出了大量与兔毛生长过程相关的基因,包括*TYR*、*TYRP1*、*ASIP*、*WNT2*、*CREB1*、*Oca2*、*Dct*、*Slc24a5*、*Slc7a11*、*Bcl2*等与兔毛生长相关^[8-10]; *SFRP2*、*FRZB*、*CACNG1*、*PTPLA*、*TTN*、*DUSP26*等与家兔毛囊和皮肤发育相关^[11]; *FGF5*、*WNT5A*、*BMP4*和*BMP7*等参与调控兔毛长度^[12]。

兔皮肤有2种不同类型的毛囊,即产生粗毛的初级毛囊和产生细毛的次级毛囊。毛囊是毛发生

长的基础^[14],毛囊底部的真皮状细胞提供信号来调控毛发的平均纤维直径和特性^[15]。毛纤维由角质形成细胞形成,而角质形成细胞来源于毛囊上皮中角质形成细胞干细胞^[16]。因此,毛囊在毛发纤维生长和形态发生过程起决定性作用^[17]。兔毛是由毛囊产生的重要纺织原料,不同类型毛囊的发育过程决定了兔毛产量和品质。毛囊结构功能和形态发生是一个复杂的生物学过程,解析影响不同类型毛囊发育的分子调控机制对于长毛兔种质资源创新利用及兔毛品质的改善,提供有价值的参考。然而,目前大多数与毛发纤维直径的研究都集中在羊毛上,对兔毛的研究有限。因此,本研究利用RNA-seq技术对长毛兔粗、细毛毛囊的转录组进行分析比较,鉴定调控兔毛直径的差异表达基因,了解调控兔毛细度的分子机制,为细毛型长毛兔的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验在安徽省农业科学院长毛兔育种基地开展,所有试验兔饲养条件相同,单笼饲养,自然采光、通风,定时定量采食,自动饮水。

1.2 样品采集

试验选取5只皖系长毛兔作为试验动物,同时进行拔毛处理,经过73 d养毛期后,选取体侧部皮肤采样。采样前通过耳静脉注射0.7%戊巴比妥钠(6 mL/kg)对试验群体进行麻醉,于每只毛兔体侧分别采集粗毛及细毛样本并从毛根部拔出,剪取毛根保存于2.0 mL冻存管,立即置于液氮保存备用。

1.3 cDNA文库构建及测序

使用Trizol试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)从毛根样品中提取总RNA。使用

NanoPhotometer 分光光度计 (Implen, Westlake Village, CA, USA) 和 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 测定 RNA 的纯度、浓度和完整性。对 RNA 样品进行质量控制, 获得构建 cDNA 文库所需的高质量 RNA。使用 NEBNext®Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, Ipswich, MA, USA) 构建粗毛毛囊和细毛毛囊文库, 并使用 Qubit2.0 荧光仪进行定量。使用 Agilent 2100 生物分析仪确定文库插入物的大小, 并使用 Illumina NovaSeq 6000 平台 (Illumina, USA) 进行测序。

1.4 差异基因表达分析

使用 fastp (版本 0.19.7) 从原始测序 reads 中去除低质量的 reads, 包含接头 (adaptor) 和包含 N 过多的 reads。使用 HISAT2^[18] 将粗毛和细毛毛囊样本的 clean reads 与 OryCun2.0 数据库^[19] 进行比对。转录本使用 stringtie (v1.3.3b) 进行组装, 基因表达使用 RSEM^[20] 进行量化。利用 FPKM 的值来估计组织样本中的基因表达水平。采用 DESeq2 进行差

异表达分析^[21]。采用标准 $|\log_2(FC)| > 1, FDR < 0.05$ 筛选差异表达基因。并使用 GO (Gene Ontology) (<http://geneontology.org>) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 对差异基因进行功能富集分析。

1.5 蛋白互作网络的构建

蛋白互作网络图 (PPI, Protein-Protein Interaction Networks) 采用 string 数据库 (版本 11.0), 以中等置信度 0.4 为参数构建。通过 Cytoscape 软件中 cytoHubba 插件的 Degree 中心性算法筛选出蛋白互作网络中 Degree 数值前 10 的中心基因。

1.6 实时荧光定量 qRT-PCR

引物设计与合成: 试验选择 CW (粗毛)、FW (细毛) 各 5 个样本, 挑选 8 个差异表达基因, 利用 Oligo 6.0 设计引物, 引物序列见表 1, 内参基因为 GAPDH, 采用 SYBR Green I 法实时荧光定量 PCR (相对定量) 进行 mRNA 表达量分析, 退火温度为 61℃, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达量计算。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table1 Primers for quantitative real-time PCR

基因 Gene	引物序列 (5' → 3') Primer sequence (5'→3')	产物长度/bp Product size
CRNN	F:GCATGGAGGACAAGAATCGG	121
	R:TGGGTGTGAGTTGCAGTTCC	
TCHHL1	F:CGAGCTTGCGGACTCTATCC	87
	R:ATGGTGTGCGCACTGTCAAT	
FABP9	F:TGAGCCTTTCTTGGAACCT	116
	R:CGCTTGGCTTCACTAACCCCT	
KRT27	F:GATGCAGGTTTCGCAGTGACA	107
	R:CCAGAAGCAGGCGGTAAGTA	
KRT32	F:GGTGATGGTGCAGATCGACA	145
	R:CGACTTGCACAGGGTCAGA	
KRT36	F:GGGCTGCACTGTGTGGATAA	126
	R:TGGGCGACATCGGAGAAGAT	
KRT71	F:GCCGGTGCCAGTGATTACAA	90
	R:AGGGCAGCTTCTCTACCGAC	
KRT82	F:ACACGCTGGAAGCCTACAAG	145
	R:ACAAGGGCCTCCATGTTGGT	
GAPDH	F:AGGTCGGAGTGAACGGATTT	93
	R:GATCATTGATGGCGACAACA	

1.7 数据处理分析

使用 Excel 2010 软件将试验中 qRT-PCR 的结果进行整理,试验数据使用 SPSS 27.0 软件进行统计分析,数据以“平均值±标准差”表示。采用 *t* 检验法和单因素方差分析(One-way ANOVA)进行差异显著性检验。其中, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 毛囊 RNA-Seq 结果分析

本研究对长毛兔粗、细毛毛囊组织进行转录组

测序,表 2 为转录组数据质控信息。共获得了 484 990 274 条 Raw Data。对测序原始数据进行质量控制(去除含有 adapter、poly-N 及低质量 reads)。获得 482 530 874 条高质量的 Clean Data,其中粗毛(CW)组和细毛(FW)组得到的 Clean Data 分别为 241 922 552 和 240 608 322 条。所有样本过滤后的 Q20 均在 97% 以上,Q30 均在 94% 以上,GC 含量在 50%~54%。所有的样本 reads 比对到参考基因组上的总映射比率(Total mapped ratio)均在 82% 以上,唯一比对率(Unique mapped ratio)均在 76% 以上。

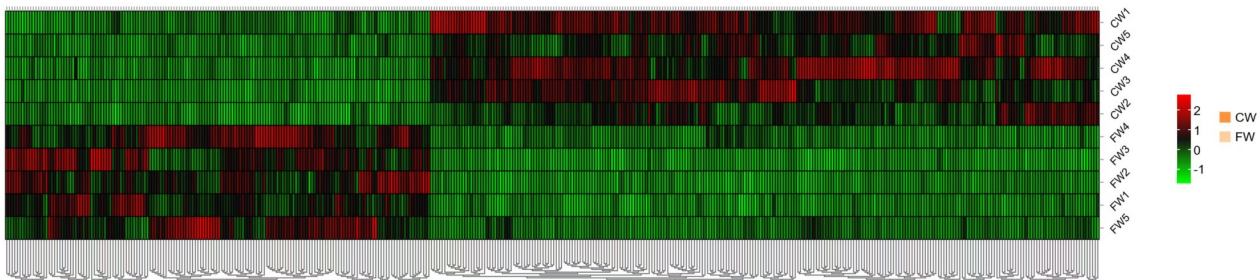
表 2 测序数据质量评估
Table 2 Quality evaluation of RNA sequencing data

样本 Sample	原始数据 Raw data	高质量数据 Clean data	唯一比对率/% Unique_mapped	全部数量/% Total_mapped	Q20/%	Q30/%	GC/%
CW1	46 831 946	46 592 452	79.14	83.51	97.95	94.17	51.52
CW2	44 593 658	44 365 132	380.73	85.88	98.10	94.51	51.95
CW3	45 901 754	45 678 284	80.12	84.94	98.03	94.34	51.40
CW4	56 645 160	56 345 956	79.04	83.78	97.90	94.03	50.97
CW5	49 184 246	48 940 728	77.50	83.45	98.11	94.52	52.39
FW1	48 862 232	48 608 250	79.79	84.80	98.07	94.37	51.37
FW2	53 036 724	52 769 940	76.15	82.82	98.12	94.57	53.36
FW3	49 465 202	49 233 484	78.42	84.36	98.25	94.92	52.27
FW4	43 245 060	43 025 338	77.88	82.69	98.05	94.37	51.43
FW5	47 224 292	46 971 310	78.18	82.84	98.04	94.32	50.42

2.2 差异表达基因筛选

本研究共检测到 412 个差异表达基因,其中,160 个基因在细毛毛囊组中上调表达,252 个基因下

调表达。对样本和差异表达基因进行聚类分析(图 1),粗细毛样本间聚类情况良好,呈现不同的基因表达模式。



红色表示基因上调,绿色基因下调;CW:粗毛毛囊;FW:细毛毛囊。
Red indicates up-regulated genes and green genes indicated down-regulated genes;CW: coarse hair follicle;FW: fine hair follicle.

图 1 兔毛囊中粗、细毛差异表达基因的热图分析

Fig. 1 Heatmap analysis of the DEGs in hair follicles between coarse and fine wool from rabbits

本研究也检测到14个角蛋白(*KRT*)基因及4个角蛋白相关蛋白(*KAP*)基因在两组间显著差异表达,如:*KRT38*、*KRT77*、*KRT82*、*KRT36*、*KRT32*、*KRT72*、*KRT15*、*KRT79*和*KRT40*在细毛毛囊组织中上调表

达,*KRT16*、*KRT25*、*KRT27*、*KRT21*和*KRT6A*在细毛毛囊组织中下调表达, 4个角蛋白相关蛋白基因*KRTAP26-1*、*KRTAP24-1*、*KRTAP16-1*和*KRTAP13-2*均在细毛毛囊组织中高表达(表3)。

表3 长毛兔粗、细毛毛囊部分差异表达基因

Table 3 Some differentially expressed genes in hair follicles between coarse and fine wool of Angora rabbits

基因名称 Gene name	差异倍数 log ₂ (FC)	P值 P value	调控 Regulation
<i>KRT38</i>	4.741 8	1.61×10^{-36}	Up
<i>KRT77</i>	2.180 2	2.6×10^{-6}	Up
<i>KRT82</i>	1.573 9	2.8×10^{-10}	Up
<i>KRT36</i>	1.327 6	6.2×10^{-7}	Up
<i>KRT32</i>	1.203 3	1.1×10^{-8}	Up
<i>KRT72</i>	1.192 0	1.5×10^{-7}	Up
<i>KRT15</i>	1.087 3	3.96×10^{-3}	Up
<i>KRT79</i>	1.047 5	3.02×10^{-3}	Up
<i>KRT40</i>	1.028 5	1.3×10^{-4}	Up
<i>KRT16</i>	-1.334 0	1.1×10^{-6}	Down
<i>KRT25</i>	-1.378 0	7.4×10^{-18}	Down
<i>KRT27</i>	-1.425 4	1×10^{-14}	Down
<i>KRT71</i>	-1.579 5	1.2×10^{-17}	Down
<i>KRT6A</i>	-2.333 0	5.6×10^{-32}	Down
<i>KRTAP26-1</i>	1.274 6	3.5×10^{-6}	Up
<i>KRTAP24-1</i>	1.030 8	8.4×10^{-6}	Up
<i>KRTAP16-1</i>	1.278 4	1.1×10^{-5}	Up
<i>KRTAP13-2</i>	1.575 3	5.3×10^{-5}	Up

2.3 差异表达基因的富集分析

对筛选到的412个差异表达基因进行GO富集和KEGG通路分析。

2.3.1 差异表达基因GO功能分析

GO富集分析主要分为细胞组分(Cellular component, CC)、分子功能(Molecular function, MF)及生物过程(Biological process, BP)。如图2所示,GO富集分析发现,差异表达基因显著富集($P<0.05$)在330个GO条目,其中生物过程共富集到264个GO条目,细胞组分共富集到39个GO term,分子功能27个GO条目。其中生物过程显著富集的前10个GO条目为发育过程(GO:0032502)、解剖结构发育(GO:0048856)、蜕皮周期(GO:0042303)、细胞分化(GO:0030154)、中间丝

为基础的工艺(GO:0045103)、中间丝细胞骨架组织(GO:0045104)、药物反应(GO:0042493)、细胞发育过程(GO:0048869)、解剖结构形态发生(GO:009653)、神经元投射发育(GO:0031175);在细胞组分中以面上泡(GO:0031988)、囊泡(GO:0031982)、细胞外区域(GO:0005576)、细胞外区部分(GO:0044421)、中间丝(GO:0005882)5个类别占比最高;分子功能中最显著富集的条目是钠离子跨膜转运活性(GO:0015081)。

2.3.2 差异基因KEGG通路分析

KEGG通路分析发现,差异基因显著富集($P<0.05$)在雌激素信号通路(Ko04915)、蛋白质消化和吸收(Ko04974)、内质网中的蛋白质加工途径(Ko04141)、PPAR信号通路(Ko03320)、FoxO信号

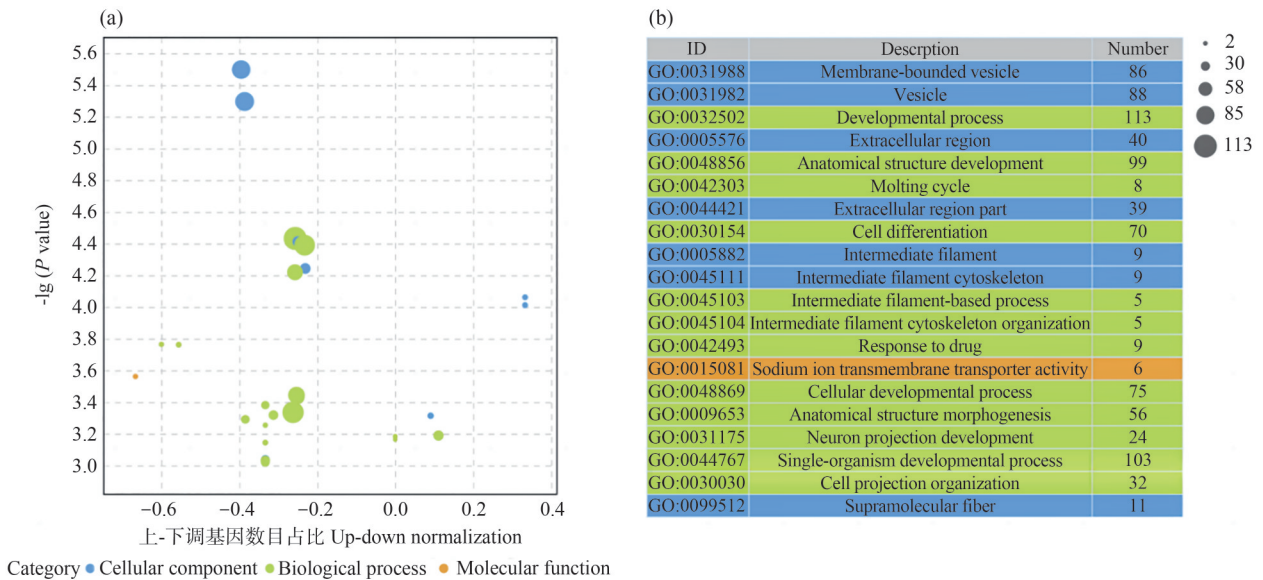


图 2 差异表达基因的 GO 功能注释图
(a) Enrichment difference bubble plot; (b) Top 20 GO significantly enriched items.

图 2 差异表达基因的 GO 功能注释图
Fig. 2 GO functional annotation of differentially expressed genes

通路(Ko04068)及基底细胞癌(Ko05217),富集结果如图 3 所示。此外,差异表达基因 *KRT38*、*KRT32*、*KRT16*、*KRT25*、*KRT27*、*KRT15* 和 *KRT36* 参与雌激素信号通路;*COL15A1* 参与蛋白

质消化和吸收通路;*TGFBR2*、*CAT* 参与 FoxO 信号通路;*SHH*、*Fzd2* 参与基底细胞癌通路。*COL15A1*、*TGFBR2* 和 *Fzd2* 在细毛组的毛囊中上调表达, *CAT* 在细毛组的毛囊中下调表达。

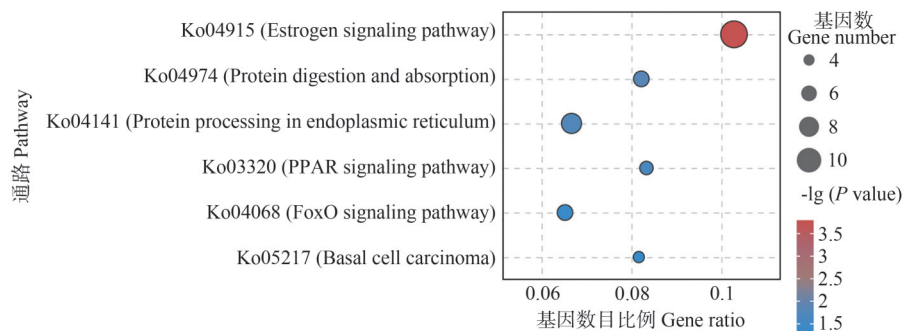


图 3 差异表达基因的 KEGG 功能注释图
Fig. 3 KEGG functional annotation of differentially expressed genes

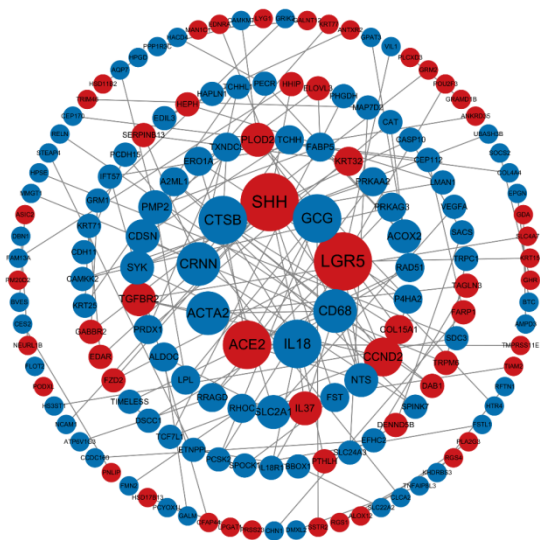
2.4 蛋白互作网络的构建

为进一步探讨兔毛细度的分子调控机制,建立差异表达基因互作网络(图 4)。构建 162 个差异基因点及 173 条互作关系线的蛋白互作网络图。其中 *SHH*、*LGR5*、*ACE2*、*IL18*、*GCG*、*CTSB*、*CD68* 和 *CRNN* 为主要核心基因,且 *SHH*、*LGR5* 基因 Degree 分数为 9,连接网络最多, *ACE2*、*IL18*、*GCG*、*CTSB* 和 *CD68* 基因次之, Degree 分数为 7。 *SHH*、*LGR5* 和 *ACE2* 在长毛兔细毛毛囊组织中上调表达, *IL18*、

GCG、*CTSB*、*CD68* 和 *CRNN* 下调表达。

2.5 qRT-PCR 结果验证

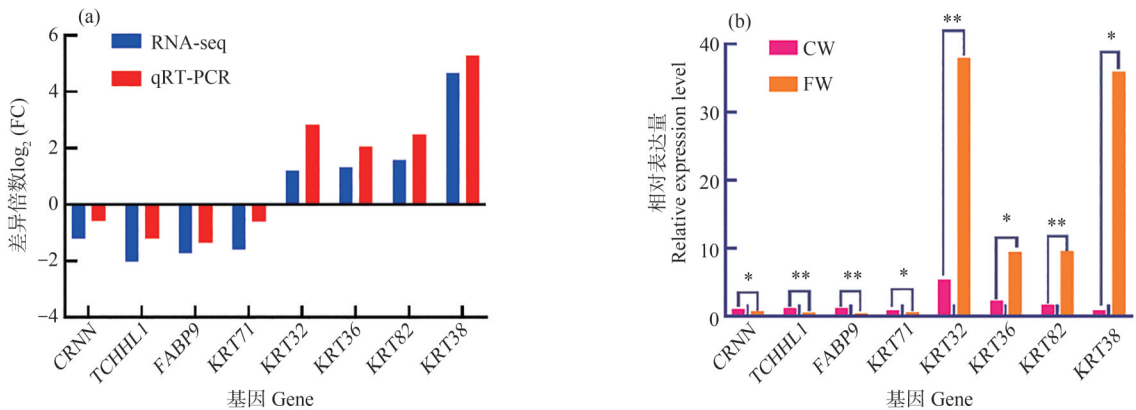
为验证 RNA-seq 数据的可靠性,8 个差异表达基因 *CRNN*、*TCHHL1*、*FABP9*、*KRT71*、*KRT32*、*KRT36*、*KRT82* 和 *KRT38* 进行 qRT-PCR 验证(图 5)。 *CRNN*、*TCHHL1*、*FABP9* 和 *KRT71* 基因在粗毛毛囊组中上调表达, *KRT32*、*KRT36*、*KRT82* 和 *KRT38* 在粗毛毛囊组中下调表达,且其 qRT-PCR 结果与测序结果趋势基本一致。



共识别 162 个节点和 173 个连接线。红色节点表示在细毛组上调基因,蓝色色节点表示在细毛组下调,基因节点大小表示每个基因 Degree 分数大小。
There are 162 nodes and 173 connecting lines. Red nodes indicate up-regulated genes in the fine hair group, blue nodes indicate down-regulated genes in the fine hair group, and the size of gene nodes indicates the Degree fraction size of each gene.

图 4 差异表达基因的蛋白互作网络图

Fig. 4 Protein-protein interaction network of differentially



* 表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$ 。
(a) qRT-PCR法测定的结果同测序获得的结果之间的对比;(b)qRT-PCR 验证 8 个随机挑选的差异表达基因的表达情况。
* indicates significant difference $P<0.05$ between CW and FW groups; ** indicates a highly significant difference $P<0.01$ between CW and FW groups.
(a) Comparison between the results measured by qRT-PCR and those obtained by sequencing; (b) qRT-PCR was used to verify the expression of 8 randomly selected differentially expressed genes.

图 5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 5 qRT-PCR verification of differentially expressed genes

3 讨 论

本研究通过对长毛兔粗细毛毛囊的转录组进行分析,比较粗毛和细毛毛囊 mRNA 表达谱,共鉴定 412 个差异表达基因,其中 78 个差异表达基因在参考基因组未被注释,另外 334 个差异基因为已知

基因,相比粗毛毛囊组,160 个基因在细毛毛囊组中上调表达,252 个基因下调表达。GO 功能富集分析结果显示差异表达基因主要显著富集在蜕皮周期 (GO:0042303)、发周期 (GO:0042633)、毛发周期的调节 (GO:0042634)、超分子纤维 (GO:0099512) 等与毛发生长有关的条目中,同时本研究发现了甘

油三酯代谢(GO:0006641)、中性脂质代谢过程(GO:0006638)、酰基甘油代谢过程(GO:0006639)等与脂类代谢相关的条目。已有研究指出,脂质代谢对毛发的生长有影响^[22]且脂质组成的变化,可导致毛囊发育的改变^[23],此外,还有对雌激素的反应(GO:0043627)与雌激素代谢有关的条目,雌激素代谢对毛囊发育周期的影响已有报道,雌激素受体反应的变化,导致毛囊发育周期的变化^[24]。这些条目所富集到的基因作用于2组样本间,导致粗、细毛生长分化的差异。进一步分析差异基因的KEGG通路发现,差异基因显著富集在雌激素信号通路(Ko04915)、蛋白质消化吸收等通路(Ko04974)中。有研究指出,雌激素信号通路(Ko04915)与毛囊生长发育的周期相关^[25-26],*KRT38*、*KRT32*、*KRT16*、*KRT25*、*KRT27*、*KRT15*和*KRT36*等角蛋白基因也参与雌激素信号通路的调控过程中。已有大量研究证明,KRTs和KRTAPs基因富集于毛发角蛋白及其相关蛋白质,是毛发纤维的主要结构蛋白^[17],与毛囊的发育和分化有关,决定毛发纤维的生长过程^[27],且KRTAPs基因在决定绒毛纤维结构方面可能更为重要^[28]。本研究总共检测到14个KRTs基因和4个KRTAPs基因,其中*KRT40*、*KRT79*、*KRT15*、*Krt72*、*KRT32*、*Krt36*、*Krt82*、*KRT77*和*KRT38*; *KRTAP24-1*、*Krtap26-1*、*Krtap16-1*和*KRTAP13-2*基因在细毛毛囊中高表达,表明这些基因或与长毛兔细毛的生长和分化有关,该研究结果也佐证了上述结论。蛋白质消化和吸收(Ko04974)被报道与山羊粗、细毛的生长有关^[29],该通路的调控因子*COL15A1*可抑制真皮细胞衰老并诱导球状体形成^[30]。同样的内质网中的蛋白质加工途径(Ko04141)也与山羊粗、细毛的生长有关^[31]。PPAR信号通路(Ko03320)与纤维卵泡、纤维毛囊发育相关^[32]。FoxO信号通路(Ko04068)的调控因子*TGFBR2*是毛囊即将发生的标志物^[33],调控因子*CAT*其毛囊中的活性水平与羊毛生长速率相关,是影响羊毛生产或性能的因素^[34],可用来衡量毛发的生长^[35],在转基因小鼠中也与毛发生过程中的调控相关^[36]。*CAT*在细毛组的毛囊中下调表达,这可能与*CAT*仅在毛发生长的活跃阶段才在其毛囊中合成有关。基底细胞癌(Ko05217)通路也被认为与毛发生长有关^[37],该通路的调控因子*SHH*是初级和次级毛发向下生长和

完全次生毛发长度所必需的基因^[38],*Fzd2*是毛囊功能和维持过程中的关键基因^[39]。在本研究中,与毛囊发育相关的基因*COL15A1*、*TGFBR2*和*Fzd2*在细毛组的毛囊中上调表达,表明它们在细毛的纤维结构中具有重要作用。

为进一步探究DEGs的功能,进行了PPI分析,过滤了关键通路中高度连接的枢纽节点和基因,根据Degree分数的大小确定核心基因。其中*SHH*基因可改善毛发生长周期显著性抑制剂成纤维细胞生长因子的功能^[40]是基底细胞癌通路的重要调控因子。G蛋白偶联受体5(*LGR5*)在活跃增殖和多能干细胞群中存在,是毛囊干细胞表面标志物^[41-42],能够产生新的毛囊^[43]。有研究表明,敲除小鼠毛囊细胞中的*LGR5*时,抑制了毛发再生过程^[44]。*SHH*和*LGR5*基因在细毛毛囊中上调表达,表明它们在决定长毛兔细毛纤维结构中具有重要作用。组织蛋白酶B(*CTSB*)活性在控制毛囊形态发生中必不可少^[45],缺乏时对小鼠皮肤蛋白质组和脱皮都有影响^[46]。*CRNN*是调控山羊毛囊和羊毛弯曲的发育的关键候选基因^[29]。*CTSB*和*CRNN*基因在粗毛毛囊中上调表达,表明它们可能与粗毛的生长分化有关。肌动蛋白 $\alpha 2$ (*ACTA2*)主要在生产细毛的次级毛囊真皮细胞中表达^[47],在本研究中*ACTA2*基因在粗毛毛囊中上调表达,与前人的研究结果相悖。差异基因的上下调表达是一种高度组织依赖性的瞬时表达结果,可能由于本研究与先前的研究在品种、采样方式及时间的选择上不同所导致。综上所述,在Degree分数靠前的核心基因中*SHH*、*LGR5*、*CTSB*、*ACTA2*和*CRNN*基因与粗、细毛生长有关,可能是与粗、细毛生长有关的关键候选基因。此外,本研究使用qRT-PCR选择了8个基因进行验证,结果与RNA-seq数据相匹配,证明了测序数据的可靠性。

4 结 论

本研究通过长毛兔粗、细毛毛囊的转录组谱,结合生物信息学方法分析筛选出了与粗、细毛生长分化相关的潜在功能基因,“雌激素信号通路,蛋白质消化吸收和代谢通路”、“内质网中的蛋白质加工”、“FoxO信号通路”、“基底细胞癌”等通路是可能影响长毛兔粗、细毛生长的关键通路;*SHH*、*LGR5*、*CTSB*、*ACTA2*和*CRNN*基因可能是与粗、

细毛生长分化有关的关键候选基因。本研究鉴定并筛选出调控兔毛直径的潜在功能基因及通路,但仍需进一步的研究来验证此发现,以期为细毛型长毛兔的分子育种研究提供重要参考。

参考文献 References

- [1] 武拉平,王建勋,秦应和. 2022年兔产业生产概况、2023年发展趋势及政策建议[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(3): 348-352
- Wu L P, Wang J X, Qin Y H. General situation of rabbit industry production in 2022, development trend in 2023 and policy suggestions [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2023, 59(3): 348-352 (in Chinese)
- [2] Yue Y J, Guo T T, Liu J B, Guo J, Yuan C, Feng R L, Niu C E, Sun X P, Yang B H. Exploring differentially expressed genes and natural antisense transcripts in sheep (*Ovis aries*) skin with different wool fiber diameters by digital gene expression profiling [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129249
- [3] Danilenko D M, Ring B D, Yanagihara D, Benson W, Wiemann B, Starnes C O, Pierce G F. Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. Normalization of the nu/nu follicular differentiation defect and amelioration of chemotherapy-induced alopecia [J]. *The American Journal of Pathology* 1995, 147(1): 145-154
- [4] 李祥翔,夏茂华,普天春,卢岩,张成林. 转录组测序: RNA-Seq 技术在动物疾病检测中的应用研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2022(1): 14-16
- Li X X, Xia M H, Pu T C, Lu Y, Zhang C L. Progress in the application of transcriptome sequencing-RNA-SEQ technology in animal disease detection [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2022(1): 14-16 (in Chinese)
- [5] Stoick-Cooper C L, Moon R T, Weidinger G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(11): 1292-1315
- [6] Kahata K, Dadras M S, Moustakas A. TGF- β family signaling in epithelial differentiation and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology Biol*, 2018, 10(1): a022194
- [7] Eckert R L, Welter J F. Transcription factor regulation of epidermal keratinocyte gene expression [J]. *Molecular Biology Reports*, 1996, 23(1): 59-70
- [8] 牛晓艳,任克良,曹亮,李燕平,郑建婷,冯国亮,黄淑芳. 利用转录组测序方法研究獭兔毛色相关基因[J]. 中国草食动物科学, 2016, 36(2): 1-6
- Niu X Y, Ren K L, Cao L, Li Y P, Zheng J T, Feng G L, Huang S F. Transcriptome analysis on coat color related genes in rex rabbits [J]. *China Herbivore Science*, 2016, 36(2): 1-6 (in Chinese)
- [9] 施丽娟. 獭兔青紫蓝毛色候选基因筛选的初步研究[D]. 扬州:扬州大学, 2015
- Shi L J. Preliminary study of genes related to fur color in chinchilla rex rabbit [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2015 (in Chinese)
- [10] Zhao B, Chen Y, Hao Y, Yang N, Wang M, Mei M, Wang J, Qiu X, Wu X. Transcriptomic analysis reveals differentially expressed genes associated with wool length in rabbit [J]. *Animal Genetics*, 2018, 49(5): 428-437
- [11] Zhao B H, Chen Y, Yan X R, Hao Y, Zhu J, Weng Q Q, Wu X S. Gene expression profiling analysis reveals fur development in rex rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) [J]. *Genome*, 2017, 60(12): 1060-1067
- [12] Zhao B, Chen Y, Hao Y, Yang N, Wang M, Mei M, Wang J, Qiu X, Wu X. Transcriptomic analysis reveals differentially expressed genes associated with wool length in rabbit [J]. *Animal Genetics*, 2018, 49(5): 428-437
- [13] Huang D W, Ding H S, Wang Y L, Cheng G L, Wang X F, Leng T S, Zhao H L. Hair follicle transcriptome analysis reveals differentially expressed genes that regulate wool fiber diameter in angora rabbits [J]. *Biology*, 2023, 12(3): 445
- [14] Fuchs E. Scratching the surface of skin development [J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 834-842
- [15] Driskell R R, Clavel C, Rendl M, Watt F M. Hair follicle dermal papilla cells at a glance [J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(Pt 8): 1179-1182
- [16] Chi W, Wu E, Morgan B A. Dermal papilla cell number specifies hair size, shape and cycling and its reduction causes follicular decline [J]. *Development*, 2013, 140(8): 1676-1683
- [17] Dong Y, Xie M, Jiang Y, Xiao N Q, Du X Y, Zhang W G, Tosser-Klopp G, Wang J H, Yang S, Liang J, Chen W B, Chen J, Zeng P, Hou Y, Bian C, Pan S K, Li Y, Liu Y X, Wang W L, Servin B, Sayre B, Zhu B, Sweeney D, Moore R, Nie W H, Shen Y Y, Zhao R P, Zhang G J, Li J Q, Faraut T, Womack J, Zhang Y P, Kijas J, Cockett N, Xu X, Zhao S H, Wang J, Wang W. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*) [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 135-141
- [18] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 2015, 12: 357-360
- [19] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, Chang T C, Mendell J T, Salzberg S L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33: 290-295
- [20] Li B, Dewey C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323
- [21] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- [22] Stenn K S, Karnik P. Lipids to the top of hair biology [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2010, 130(5): 1205-1207
- [23] Zhang D W, Tomisato W, Su L J, Sun L, Choi J H, Zhang Z, Wang K W, Zhan X M, Choi M, Li X H, Tang M, Castro-Perez J M, Hildebrand S, Murray A R, Moresco E M Y, Beutler B. Skin-specific regulation of SREBP processing and lipid biosynthesis by glycerol kinase 5 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*, 2017, 114(26): E5197-E5206
- [24] Rinaldi F, Trink A, Mondadori G, Giuliani G, Pinto D. The menopausal transition: Is the hair follicle “going through menopause” [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(11): 3041
- [25] Sun H R, Meng K, Wang Y F, Wang Y Y, Yuan X C, Li X H. LncRNAs regulate the cyclic growth and development of hair follicles in Dorper sheep[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1186294
- [26] Wang J F, Sui J, Mao C, Li X R, Chen X Y, Liang C C, Wang X H, Wang S H, Jia C L. Identification of key pathways and genes related to the development of hair follicle cycle in Cashmere goats[J]. *Gene*, 2021, 12(2): 180
- [27] Rogers M A, Langbein L, Praetzel-Wunder S, Winter H, Schweizer J. Human hair keratin-associated proteins (KAPs) [J]. *International Review of Cytology*, 2006, 251: 209-263
- [28] Wu D D, Irwin D M. Evolution of trichocyte keratin associated proteins [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2018, 1054: 47-56
- [29] Liu Y, Ding Y Y, Liu Z F, Chen Q, Li X, B Xue X L, Pu Y B, Ma Y H, Zhao Q J. Integration analysis of transcriptome and proteome reveal the mechanisms of goat wool bending [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10: 836913
- [30] Kim H, Choi N, Kim D Y, Kim S Y, Song S Y, Sung J H. TGF- β 2 and collagen play pivotal roles in the spheroid formation and anti-aging of human dermal papilla cells[J]. *Aging*, 2021, 13(16): 19978-19995
- [31] Ji D J, Yang B, Li Y J, Cai M Y, Zhang W, Cheng G H, Guo H Y. Transcriptomic inspection revealed a possible pathway regulating the formation of the high-quality brush hair in Chinese Haimen goat (*Capra hircus*)[J]. *Royal Society Open Science*, 2018, 5(1): 170907
- [32] Wu X M, Gu Y H, Li S Q, Guo S W, Wang J Q, Luo Y Z, Hu J, Liu X, Li S B, Hao Z Y, Li M N, Shi B G. RNA-seq reveals the roles of long non-coding rnaRNAs (lncRNAs) in Cashmere fiber production performance of Cashmere goats in China[J]. *Genes*, 2023, 14(2): 384
- [33] Paus R, Foitzik K, Welker P, Bulfone-Paus S, Eichmüller S. Transforming growth factor-beta receptor type I and type II expression during murine hair follicle development and cycling [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 1997, 109(4): 518-526
- [34] Damak S, Jay N P, Barrell G K, Bullock D W. Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep[J]. *Bio/Technology*, 1996, 14: 181-184
- [35] Vogeli G, Wood L, McNab A R, Kaytes P, Wagner T E, Rea T J, Groppi V, Waldon D J, Kawabe T T, Buhl A E. High-sulfur protein gene expression in a transgenic mouse[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991, 642: 21-30
- [36] McNab A R, Andrus P, Wagner T E, Buhl A E, Waldon D J, Kawabe T T, Rea T J, Groppi V, Vogeli G. Hair-specific expression of chloramphenicol acetyltransferase in transgenic mice under the control of an ultra-high-sulfur keratin promoter [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(17): 6848-6852
- [37] Ding H S, Zhao H L, Cheng G L, Yang Y X, Wang X F, Zhao X W, Qi Y X, Huang D W. Analyses of histological and transcriptome differences in the skin of short-hair and long-hair rabbits[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 140
- [38] Cui C Y, Kunisada M, Childress V, Michel M, Schlessinger D. Shh is required for Tabby hair follicle development[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(19): 3379-3386
- [39] Brennan-Crispi D M, Frankfurter M, Murphy C, Sheng E, Xu M G, Morrissey E E, Millar S E, Leung T H. FZD2 regulates murine hair follicle function and maintenance[J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2022, 142(8): 2260-2263. e2
- [40] Zhang R, Li Y, Jia K, Xu X L, Li Y, Zhao Y, Zhang X S, Zhang J L, Liu G S, Deng S L, Lian Z X. Crosstalk between androgen and Wnt/ β -catenin leads to changes of wool density in FGF5-knockout sheep [J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11: 407
- [41] Polkoff K M, Gupta N K, Green A J, Murphy Y, Chung J, Gleason K L, Simpson S G, Walker D M, Collins B, Piedrahita J A. LGR5 is a conserved marker of hair follicle stem cells in multiple species and is present early and throughout follicle morphogenesis[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 9104
- [42] Yan W, Hao F, Zhe X S, Wang Y M, Liu D J. Neural, adipocyte and hepatic differentiation potential of primary and secondary hair follicle stem cells isolated from Arbas Cashmere goats[J]. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18(1): 313
- [43] Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es J H, Snippert H J, Clevers H, Toftgård R. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells[J]. *Nature Genetics*, 2008, 40: 1291-1299
- [44] Hoeck J D, Biehs B, Kurtova A V, Kljavin N M, de Sousa e Melo F, Aliche B, Koeppen H, Modrusan Z, Piskol R, de Sauvage F J. Stem cell plasticity enables hair regeneration following Lgr5⁺ cell loss[J]. *Nature Cell Biology*, 2017, 19: 666-676
- [45] Oortveld M A W, van Vlijmen-Willems I M J J, Kersten F F J, Cheng T, Verdoes M, van Erp P E J, Verbeek S, Reinheckel T, Hendriks W J A J, Schalkwijk J, Zeeuwen P L J M. Cathepsin B as a potential cystatin M/E target in the mouse hair follicle[J]. *FASEB Journal; Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2017, 31(10): 4286-4294
- [46] Tholen S, Biniossek M L, Gansz M, Gomez-Auli A, Bengsch F, Noel A, Kizhakkedathu J N, Boerries M, Busch H, Reinheckel T, Schilling O. Deletion of cysteine cathepsins B or L yields differential impacts on murine skin proteome and degradome[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2013, 12(3): 611-625
- [47] Wang Z Y, Wang Y R, Hui T Y, Chen R, Xu Y N, Zhang Y, Tian H, Wang W, Cong Y Y, Guo S P, Zhu Y X, Zhang X H, Guo D, Bai M, Fan Y X, Yue C, Bai Z X, Sun J M, Cai W D, Zhang X J, Gu M, Qin Y T, Sun Y G, Wu Y Z, Wu R N, Dou X T, Bai W L, Zheng Y Y. Single-cell sequencing reveals differential cell types in skin tissues of Liaoning Cashmere goats and key genes related potentially to the fineness of Cashmere fiber[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 726670



第一作者简介:王源朗,中共党员,博士,助理研究员,安徽省级科技特派员,池州市“322”产业创新团队带头人助理。主要从事家兔遗传育种及健康养殖方面的科技创新和乡村振兴工作。曾参与完成省自然科学基金、省农科院引才、国家自然科学基金、国家兔产业技术体系岗位、农业农村部公益性行业专项、省科技攻关等项目。



通讯作者简介:黄冬维,中共党员,博士,副研究员,现任安徽省农业科学院畜牧兽医研究所草食室副主任。中国畜牧业协会兔业分会理事,安徽省级科技特派员,安徽省“115”产业创新团队带头人助理,池州市“322”产业创新团队带头人。主要从事草食动物育种及健康养殖方面的科技创新和乡村振兴工作,曾主持完成省自然科学基金、省农科院引才项目等,参与完成国家自然科学基金、国家兔产业技术体系岗位、农业部公益性行业专项、省科技攻关等项目。