

# 基于转录组测序筛选不同性别 C57BL/6J 小鼠差异基因及通路

李昱昊<sup>1</sup>,李艳玲<sup>1</sup>,尹雪莉<sup>1</sup>,孙晓梅<sup>1</sup>,张军<sup>1</sup>,李名聪<sup>1,2</sup>,刘莉<sup>1,3</sup>,张素梅<sup>1</sup>,张胜权<sup>1</sup>

**摘要** 目的 通过转录组测序筛选雌性与雄性 C57BL/6J 小鼠差异基因及通路,为进一步探讨小鼠雌雄间行为学差异的分子机制奠定基础。方法 C57BL/6J 品系的 8 周龄雌性与雄性小鼠,完整分离小鼠海马体组织,提取总 RNA 后逆转录构建 cDNA 文库,并在华大基因平台上生成单端为 50 个碱基的读数进行转录组测序。测序结束后基于 GO 和 KEGG 数据库,结合 R 语言中的 phyper 函数对数据进行筛选、校正和富集分析,计算 *P* 值;然后对 *P* 值进行矫正得到 *Q* 值并基于超几何测试方法对带注释的不同基因表达情况进行了分析,筛选出不同性别小鼠海马体中的差异基因及通路。测序结束后,使用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证在雌雄小鼠海马中筛选出的差异基因并比较差异基因在不同信号通路上的表达情况。结果 通过雌雄差异比较,筛选出 325 个差异基因,其中上调基因 233 个,下调基因 92 个,这些差异基因功能主要富集于长时程增强 (LTP)、钙离子信号通路、尼古丁成瘾等过程;雌雄差异基因相互作用网络共有 362 个连接点和 1 703 个相互作用边,筛选出的 10 个核心基因分别为:赖氨酸脱甲基酶 5D (*Kdm5d*)、细胞周期蛋白依赖性激酶 5 (*Cdkl5*)、细胞输出介质 (*Cle1*)、多巴胺受体 6a3 (*Slc6a3*)、盒式转录因子 (*Fox*)、前体 mRNA 加工因子 4B (*Prpf4b*)、甘氨酸受体 4 (*Glur4*)、钙离子受体 2 (*Camk2*)、DNA 和 RNA 结合蛋白家族 (*Son*)、5-羟色胺受体 5b (*Htr5b*)。RT-qPCR 验证结果与测序结果一致。结论 从雌雄小鼠海马体中筛选出差异基因为研究不同性别小鼠行为学差异提供实验思路并为后续小鼠行为学研究做出针对性实验设计。

**关键词** 转录组测序;行为学差异;C57BL/6J 小鼠;雌雄差异

中图分类号 R 310.57

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0742-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.013

学习记忆是多个脑功能区共同协调完成的高级

脑电活动,也是神经科学研究的热点之一。目前研究最清楚的解剖部位是海马体,它位于哺乳类动物颞叶深部外侧,海马齿状回 (DG)-CA1-CA3 神经环路是记忆形成的关键解剖区域<sup>[1-2]</sup>。不同性别的 C57BL/6J 小鼠行为学存在差异,在焦虑样行为测试中,同年龄的雄性小鼠比雌性小鼠表现出更强的抗焦虑行为;在空间学习记忆测试中,如 Morris 水迷宫实验,同等条件下,雄性小鼠比雌性小鼠能更快地完成学习任务,这种效应与年龄无关<sup>[3-4]</sup>。因此,在行为学实验中,通过转录组测序技术筛选出不同性别差异基因并寻找差异信号通路进行比较,能够为后续相应行为学测试优化实验方法和进行针对性研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 8 周龄的 C57BL/6J 小鼠购自安徽医科大学实验动物中心,所有的动物实验均通过安徽医科大学动物伦理委员会的批准。

**1.2 主要试剂** 10 ml 4% 的戊巴比妥钠由安徽省立医院麻醉科提供;引物购自生工生物上海有限公司;总 RNA 提取试剂盒与逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 染料购自美国 Thermo Fisher 公司。

**1.3 主要仪器** RT-qPCR 分析仪购自瑞士 Roche 公司;脱色摇床购自上海沪析科技有限公司;恒温水浴锅购自上海冠森科技有限公司。

**1.4 海马总 RNA 提取及 cDNA 文库的构建** 不同性别的 8 周龄的 C57BL/6J 小鼠各被分为 2 组 (每组各 3 只)。使用 4% 的戊巴比妥钠麻醉小鼠,心脏抽血后处死,迅速完整取出小鼠海马体,使用液氮将组织研磨成粉末,然后借助试剂盒完成总 RNA 提取并按说明书完成 mRNA 的纯化。随后借助逆转录试剂盒完成 cDNA 文库的构建。

**1.5 有参转录组测序** 委托深圳华大基因科技有限公司对所得 cDNA 文库进行测序。

**1.6 RT-qPCR 分析** 从小鼠海马组织中提取总 RNA,按照试剂盒说明书步骤进行操作。将提取的总 RNA 和特定引物作为逆转录原料,并使用逆转录

2022-03-18 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81271748);安徽高校自然科学基金项目 (编号:KJ2017A195、KJ2020A0197);安徽医科大学博士科研资助基金 (编号:XJ201939)

作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup> 生物化学与分子生物学教研室、<sup>3</sup> 科研实验中心,合肥 230032

<sup>2</sup> 合肥市第二人民医院病理科,合肥 230012

作者简介:李昱昊,男,硕士研究生;

张胜权,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:sqz36@yahoo.com

试剂盒构建 cDNA 文库。使用 10  $\mu\text{l}$  SYBR Green 荧光染料、400 ng cDNA 和 0.4 mmol 的特定引物,用超纯水定容到体积为 20  $\mu\text{l}$  的混合体系。使用 RT-qPCR 仪进行 RT-qPCR 分析。该 PCR 步骤为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,然后在 90  $^{\circ}\text{C}$ 、20 s 的条件下进行 40 个循环的扩增,随后 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,在 72  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,最后在 95  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 s 及 60  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min 的条件下分析熔解曲线。每个反应重复进行 3 次,使用  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  方法分析 RT-qPCR 结果,然后使用  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为标准对照对所得数据进行统计分析。

**1.7 差异基因筛选与相互作用** 使用 GO 和 KEGG 数据库分析不同性别小鼠海马体转录组中显著上调与下调的基因, $Q \leq 0.05$  为存在统计学意义的阈值。HISAT(Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts)是一款用于 RNA-seq read 比对参考基因组的软件(<http://www.ccb.jhu.edu/software/hisat>)。它采用全基因组和局部基因组两种索引形式,能迅速地筛选出基于设定条件下的差异基因。Cytoscape 是将所得差异基因数据转化成网络相互作用图的一个软件,可以准确分析指定基因或基因组的相关性。每个节点代表一个基因,连线代表基因间相互作用,关键基因用红色节点(KDA)标出,蓝色节点表示初始基因。将测序所得的数据库结果导入 Cytoscape 软件进行分析并挖掘联系最为紧密的基因。

**1.8 统计学处理** 使用 SOAPnuke 软件过滤原始数据。使用 Bowtie2 软件将筛选过的数据与参考编码基因组对齐,然后通过 RSEM 软件计算基因的表达水平。结合 R 语言中的 phyper 函数进行富集分析,计算  $P$  值,然后对  $P$  值进行矫正得到  $Q$  值,通过 Bonferroni 校正方法在  $Q \leq 0.05$  的条件下分析基因的差异表达情况。并基于超几何测试方法对带注释的不同基因表达情况进行了分析。对 RT-qPCR 数据,使用 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行分析处理,全部实验数据以  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  表示,实验组与对照组采用两独立样本  $t$  检验进行结果分析,方差不齐者采用校正  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 差异表达基因** 将处理后的原始数据进行筛选后显示,与雄性组相比,雌性组小鼠共有 325 个差异基因,其中上调基因 233 个,下调基因 92 个。见图 1。

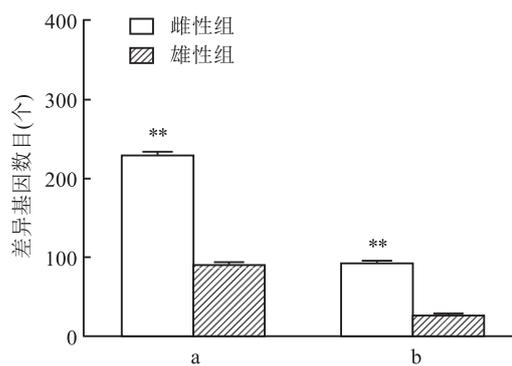


图1 不同性别 C57BL/6J 小鼠差异基因柱状统计图  
a:高表达基因;b:低表达基因;与雄性组比较:\*\* $P < 0.01$

**2.2 差异基因 GO 分析和 KEGG 分析** 通过 GO 数据库筛选,按照从大到小的顺序进行排列,分别从细胞功能(cell function)、细胞标志(cell marker)、生物功能(biological process)、疾病相关性(KEGG disease)这几个方面对差异基因进行分析并绘制表格;结果显示,差异基因主要富集在离子通道形成、蛋白质结合、突触与细胞膜稳态、神经递质传递、细胞黏附、神经递质传递、I-型胶原组成等生物学过程。见表 1。基于 KEGG 数据库绘制了不同性别组的差异基因富集气泡图,结果显示,差异基因较为明显的富集通路为尼古丁成瘾、长时程增强、前额叶皮质突触形成、谷氨酸能突触形成、GABA 氨基丁酸突触形成、多巴胺突触形成等过程。见图 2。

**2.3 差异基因相互作用网络** 通过 HISAT 数据库筛选出不同性别的小鼠海马体中的差异基因,使用 Cytoscape 软件算出每个基因的连接程度(degree),结果显示共有 362 个连接点和 1 703 个相互作用边,见图 3。连接程度表示差异基因网络中每个基因与周围基因的关联程度;连接程度越大,表示某一目的基因与之相关联的基因数量就越多。因此,通过对比得出雌性组与雄性组排名前 10 的关键基因,分别为赖氨酸脱甲基酶 5D(*Kdm5d*, degree = 135)、细胞周期蛋白依赖性激酶 5(*Cdkl5*, degree = 89)、细胞输出介质(*Cle1*, degree = 189)、多巴胺受体 6a3(*Slc6a3*, degree = 201)、盒式转录因子(*Fox*, degree = 143)、前体 mRNA 加工因子 4B(*Prpf4b*, degree = 189)、甘氨酸受体 4(*Glur4*, degree = 243)、钙离子受体 2(*Camk2*, degree = 143)、DNA 和 RNA 结合蛋白家族(*Son*, degree = 153)、5-羟色胺受体 5b(*Htr5b*, degree = 164),见表 2 和图 4。

表 1 相关基因 GO 数据库功能分析

基因 ID	基因名称	类型	条目	差异基因数	P 值	Q 值	log <sub>2</sub> (Q 值)
380728	<i>Kenh4</i>	mRNA	GO:0005887 - 尼古丁成瘾	45	4.16E-06	7.27E-04	1.26E+00
110304	<i>Glra3</i>	mRNA	GO:0005886 - 前额叶突触形成	65	1.22E-04	8.16E-03	1.22E+00
238331	<i>Zdhhc22</i>	mRNA	GO:0005783 - 多巴胺突触形成	23	2.85E-08	1.59E-05	1.21E+00
110075	<i>Bmp3</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	54	5.01E-06	8.01E-04	1.19E+00
12426	<i>Cckbr</i>	mRNA	GO:0005623 - 长时程增强	15	5.00E-06	8.01E-04	1.16E+00
67784	<i>Plxnd1</i>	mRNA	GO:0002116 - 神经受体蛋白折叠	75	1.65E-03	4.91E-02	1.13E+00
16012	<i>Igf1p6</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	34	4.26E-06	7.32E-04	1.13E+00
12404	<i>Cbln1</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	46	2.35E-04	1.31E-02	1.12E+00
212712	<i>Satb2</i>	mRNA	GO:0000118 - 细胞核受体形成	23	4.45E-06	7.47E-04	1.12E+00
667370	<i>Jfū3b</i>	mRNA	GO:0005737 - 谷氨酸离子通道调控	35	1.41E-03	4.43E-02	1.10E+00
330998	<i>Ankrd34c</i>	mRNA	GO:0005575 - 细胞组成	75	1.85E-05	2.10E-03	1.08E+00
17260	<i>Mef2c</i>	mRNA	GO:0000790 - 神经递质传递	42	7.67E-11	1.08E-07	1.08E+00
19092	<i>Prkg2</i>	mRNA	GO:0005623 - 长时程增强	45	9.53E-05	7.00E-03	1.06E+00
73032	<i>Ttc9b</i>	mRNA	GO:0005575 - 细胞组成	176	4.73E-14	4.23E-10	1.06E+00
102640722	<i>Gm36722</i>	mRNA	GO:0005663 - 长时程增强	69	3.19E-04	1.59E-02	1.06E+00
80879	<i>Slc16a3</i>	mRNA	GO:0005886 - 前额叶突触形成	45	1.67E-03	4.91E-02	1.05E+00
620246	<i>Gpr52</i>	mRNA	GO:0005886 - 前额叶突触形成	56	2.13E-04	1.22E-02	1.01E+00
12918	<i>Crh</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	75	8.26E-04	3.07E-02	1.01E+00
73737	<i>P14Rik</i>	mRNA	GO:0005575 - 细胞组成	64	9.67E-12	2.54E-08	1.00E+00
76161	<i>Lamp5</i>	mRNA	GO:0005764 - cAMP 信号通路	85	1.24E-08	8.20E-06	9.94E-01
12808	<i>Cobl</i>	mRNA	GO:0001726 - 长时程抑制	24	1.12E-05	1.40E-03	9.91E-01
11516	<i>Adcyap1</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	46	2.33E-06	4.63E-04	9.90E-01
269994	<i>Gsg11</i>	mRNA	GO:0005886 - 前额叶突触形成	75	1.10E-07	4.38E-05	9.60E-01
55983	<i>Pdzrn3</i>	mRNA	GO:0005737 - 谷氨酸离子通道调控	45	2.18E-06	4.49E-04	9.41E-01
64337	<i>Gng13</i>	mRNA	GO:0005834 - 多巴胺突触形成	75	8.30E-11	1.08E-07	9.36E-01
64378	<i>Gpr88</i>	mRNA	GO:0005634 - GABA 氨基丁酸突触形成	64	2.71E-06	5.27E-04	9.33E-01
103551	<i>Epop</i>	mRNA	GO:0005634 - GABA 氨基丁酸突触形成	75	1.23E-06	2.76E-04	9.20E-01
22353	<i>Vip</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	75	6.31E-10	7.53E-07	9.11E-01
20346	<i>Sema3a</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	73	9.71E-06	1.27E-03	9.04E-01
381489	<i>Rxfp1</i>	mRNA	GO:0005886 - 前额叶突触形成	45	2.92E-05	2.90E-03	9.03E-01
211535	<i>Ccdc114</i>	mRNA	GO:0005929 - 蛋氨酸合成	75	1.69E-03	4.92E-02	-9.11E-01
677884	<i>Pakap</i>	mRNA	GO:0005886 - 前额叶突触形成	23	2.78E-06	5.36E-04	-9.19E-01
320609	<i>Strip2</i>	mRNA	GO:0005737 - 谷氨酸离子通道调控	65	1.09E-06	2.51E-04	-9.24E-01
16776	<i>Lama5</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	13	1.30E-04	8.57E-03	-9.27E-01
268935	<i>Scube3</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	46	1.42E-03	4.44E-02	-9.56E-01
18074	<i>Nid2</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	23	1.11E-03	3.80E-02	-9.90E-01
320277	<i>Spef2</i>	mRNA	GO:0002177 - 细胞凋亡检查点	75	1.06E-03	3.72E-02	-1.00E+00
213436	<i>Rtl3</i>	mRNA	GO:0005575 - 细胞组成	123	7.54E-05	5.82E-03	-1.00E+00
235505	<i>Cd109</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	75	1.67E-04	1.01E-02	-1.01E+00
54324	<i>Arhgef5</i>	mRNA	GO:0002102 - 神经蛋白轴浆运输	34	8.10E-04	3.04E-02	-1.03E+00
26360	<i>Angptl2</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	234	7.80E-04	2.96E-02	-1.03E+00
11475	<i>Acta2</i>	mRNA	GO:0001725 - 相同配体结合	86	2.57E-05	2.61E-03	-1.03E+00
15530	<i>Hspg2</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	23	3.21E-06	6.05E-04	-1.04E+00
98845	<i>Eps8l2</i>	mRNA	GO:0001726 - 长时程抑制	64	7.12E-05	5.64E-03	-1.06E+00
330355	<i>Dnah6</i>	mRNA	GO:0030286 - 谷氨酸降解	123	1.46E-04	9.33E-03	-1.19E+00
329872	<i>Frem1</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	75	1.22E-04	8.16E-03	-1.19E+00
18542	<i>Pcolce</i>	mRNA	GO:0005576 - 细胞外基质	23	1.15E-05	1.43E-03	-1.21E+00
109620	<i>Dsp</i>	mRNA	GO:0001533 - 精氨酸加压素合成	69	1.08E-15	1.93E-11	-1.21E+00
105247050	<i>Gm42226</i>	mRNA	GO:0005681 - 长时程抑制	74	6.69E-04	2.70E-02	-1.23E+00
21345	<i>Tagln</i>	mRNA	GO:0005737 - 谷氨酸离子通道调控	35	4.92E-06	8.01E-04	-1.25E+00
226101	<i>Myof</i>	mRNA	GO:0005634 - GABA 氨基丁酸突触形成	13	4.47E-08	2.27E-05	-1.28E+00
75600	<i>Calml4</i>	mRNA	GO:0003538 - 钙离子通道受体 4	12	8.83E-04	3.22E-02	-1.45E+00

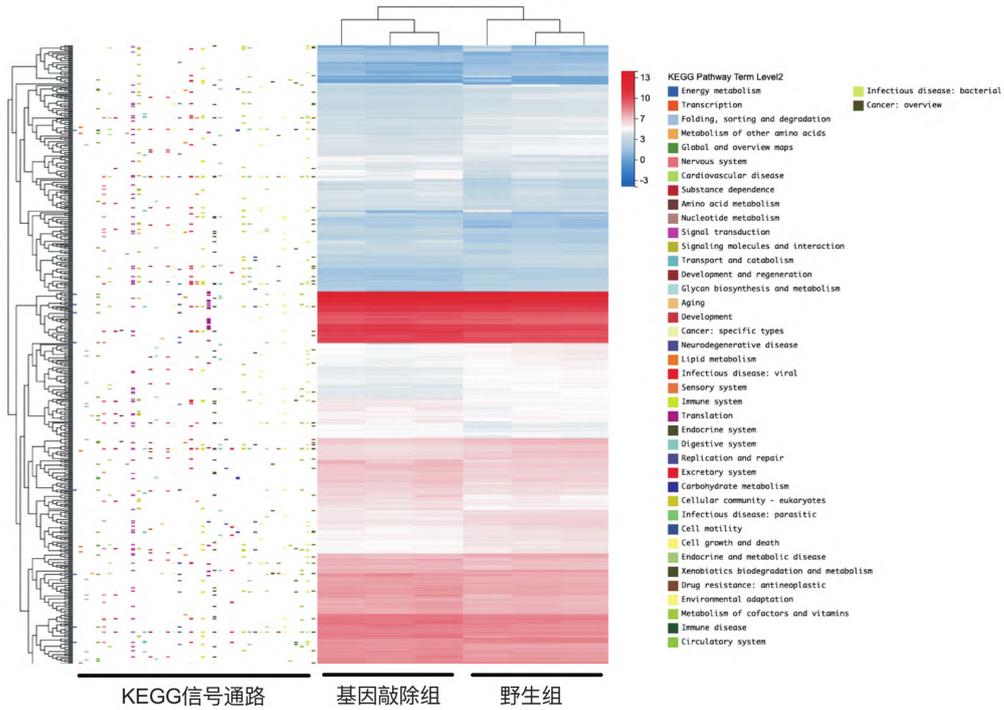


图2 不同性别组差异基因参与的KEGG信号通路聚类热图  
红色:高表达基因;蓝色:低表达基因

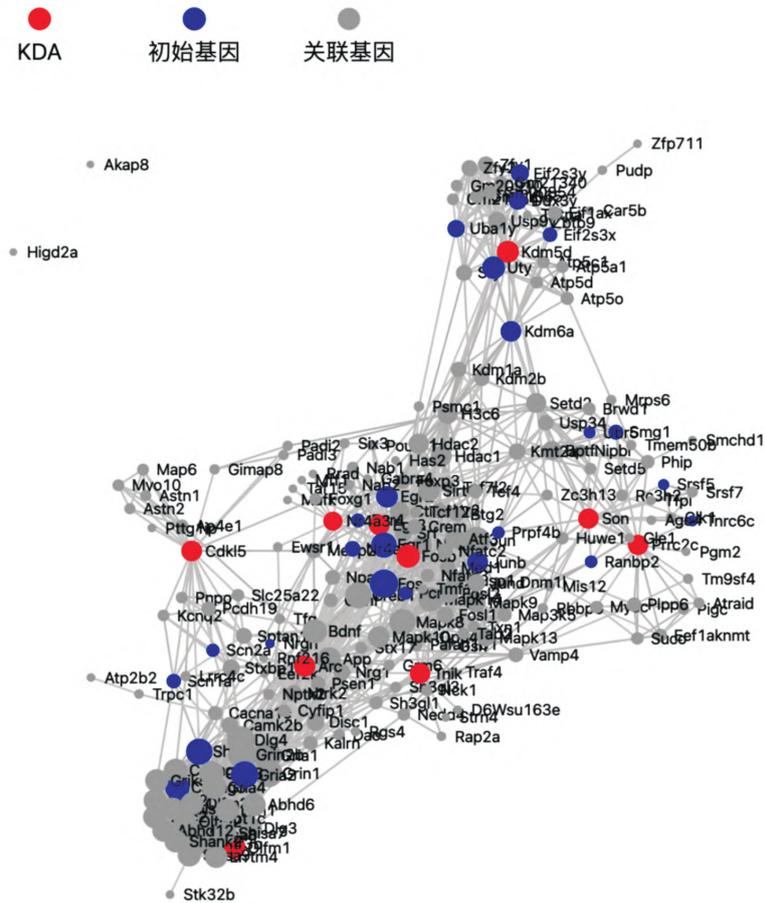


表 2 实时荧光定量 PCR 目的基因的引物

目的基因	引物序列(5'-3')
<i>Cdkl5</i>	F: CTGAAGTAGGCGCTGACGAA R: TGTGAAGTGTGCATCTCGCT
<i>Kdm5d</i>	F: CTGGACTTGCCAAAAGGCAC R: CACCAGGAATCCATGGGGAC
<i>Cle1</i>	F: CAGAGGCCACCTTGTACTCG R: TTAACATGGATGCAGCCCCA
<i>Slc6a3</i>	F: TCACCTCATCATCCTTATTCTTTCT R: TCTCTGGCACCAAGTAGGA
<i>Fox</i>	F: AGTGCAGTACGAAGGTCAC R: CATTTTTGCACGGGTAGAGG
<i>Prpf4b</i>	F: GTGAGGACATCTTTCCGGC R: GTGTCTCCCTCCTCAACAGC
<i>Glur4</i>	F: GACTGCCAGGAGAGTAGGA R: TTCCTAGAGGAACAGGCGGA
<i>Camk2</i>	F: GGGATCTCCTTCGCCTACAG R: TCAGGAGAGAGGACAACCC
<i>Son-F</i>	F: GTGATTCTTCTGCCGGTCT R: CATGAGCCGTCCGAGATGAG
<i>Htr5b</i>	F: ATGAGCTCCTAACGGCAAC R: GCCACTGAGCTCTCTCCGTA
$\beta$ -actin	F: GATACAGTCGGGGTGAGTGC R: CCTTTGCCAAGCCTCCTGTA

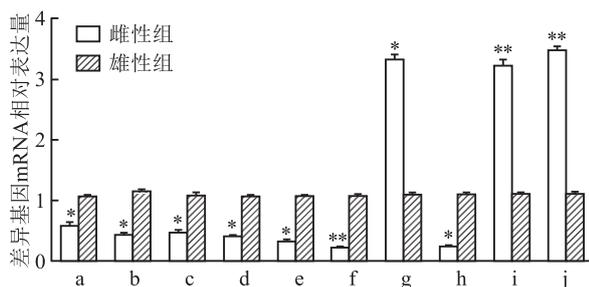


图 4 雌雄 C57BL/6J 小鼠核心基因荧光定量 PCR 分析结果

a: *kdm5d*; b: *Cdkl5*; c: *Cle1*; d: *Slc6a3*; e: *Fox*; f: *Prpf4b*; g: *Glur4*; h: *Camk2*; i: *Son*; j: *Htr5b*; 与雄性组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

本研究通过对不同性别的 C57BL/6J 小鼠海马体进行转录组测序获得相关差异基因,并通过对差异基因进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析,对使用不同性别的动物进行行为学测试优化了方法,并为神经科学的研究提供了新的研究思路。

本研究在雌雄小鼠中筛选出 325 个差异基因,其中上调基因 233 个,下调基因 92 个。由于差异基因相对过多,因此只列举了 GO 富集分析中差异最为显著的 52 个差异基因和 KEGG 中的 20 条通路;这些生物学过程主要参与了尼古丁成瘾、长时程增强、前额叶皮质突触形成、谷氨酸能突触形成、GA-BA 氨基丁酸突触形成、多巴胺突触形成等过程;在

分子功能上这些差异基因主要增强了神经递质传递、突触后电位等过程,减弱了细胞间连接、神经递质活性、钙离子信号通路和蛋白质折叠、神经元连接等过程;测序的结果还表明,这些差异基因减弱了细胞周期调控、外泌体分泌等过程,但确切的机制还需要进一步探索。

通过测序对上述基因进行分析,有 3 种编码神经递质受体相关基因与神经系统疾病密切相关。首先是 *Slc6a3*,它与多巴胺转运密切相关;多巴胺是大脑中一种儿茶酚胺类神经递质,参与调节大脑信息传递速度,提高神经元和神经胶质细胞兴奋性和高级哺乳动物情感活动;研究<sup>[4-5]</sup>表明,多巴胺减少不仅与帕金森综合征有关,还与阿尔兹海默病的发生发展密切相关。其次是 *Htr5b*,5-羟色胺参与大脑接收、加工、整合外界信息过程<sup>[6-7]</sup>。最后是 *Glur2*,该受体主要调控神经元谷氨酸门控离子渗透型通道,能改变通道传导性,尤其是电压门控的钙离子通道,该通道参与神经系统的损伤与修复过程<sup>[8-10]</sup>。

近年来,随着测序技术的发展,对于学习记忆的研究逐渐深入到基因水平<sup>[11-15]</sup>,但确切的分子机制及神经元调控网络仍然不明确;通过转录组测序找出差异基因和相关信号通路,目的在于寻找不同性别的动物大脑中与学习记忆有关的差异基因及通路。本研究得到的 10 个关键基因 *Kdm5d*、*Cdkl5*、*Cle1*、*Slc6a3*、*Fox*、*Prpf4b*、*Glur4*、*Camk2*、*Son*、*Htr5b* 或许可以成为新药开发的位点,但由于神经系统的复杂性,在神经生物学研究的过程中如何将这些基因与疾病进行联系,仍然需要进一步实验探索。

### 参考文献

- [1] Moser M B, Moser E I. Functional differentiation in the hippocampus[J]. Hippocampus,2018,8(6):608-19.
- [2] Yassa M A, Stark C E. Pattern separation in the hippocampus[J]. Trends Neurosci,2011,34(10):515-25.
- [3] Zeidman P, Maguire E A. Anterior hippocampus, the anatomy of perception, imagination and episodic memory[J]. Nat Rev Neurosci,2016,17(3):173-82.
- [4] Chang T Y, Yamauchi Y, Hasan M T, et al. Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease[J]. J Lipid Res,2017,58(12):2239-54.
- [5] Bukiya A N, Blank P S, Rosenhouse-Dantsker A, et al. Cholesterol intake and statin use regulate neuronal G protein-gated inwardly rectifying potassium channels[J]. J Lipid Res,2019,60(1):19-29.
- [6] Yang T, Li S, Xu H, et al. Large soluble oligomers of amyloid  $\beta$ -protein from Alzheimer brain are far less neuroactive than the small

- ler oligomers to which they dissociate [J]. *Neurosci*, 2017, 37(1):152 - 63.
- [7] Lee J L C, Nader K, Schiller D. An update on memory reconsolidation updating[J]. *Trends Cogn Sci*, 2017, 21(7):531 - 45.
- [8] Sekeres M J, Winocur G, Moscovitch M. The hippocampus and related neocortical structures in memory transformation[J]. *Neurosci lett*, 2018, 680: 39 - 53.
- [9] Knowles E E M, Curran J E, Meikle P J, et al. Disentangling the genetic overlap between cholesterol and suicide risk[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2018, 43(13):2556 - 63.
- [10] Kidnapillai S, Bortolasci C C, Panizzutti B, et al. Drugs used in the treatment of bipolar disorder and their effects on cholesterol biosynthesis - a possible therapeutic mechanism[J]. *World J Biol Psychiatry*, 2019, 20(10):766 - 77.
- [11] Vila-Rodriguez F, Honer W G, Innis S M, et al. ApoE and cholesterol in schizophrenia and bipolar disorder: comparison of grey and white matter and relation with APOE genotype[J]. *Psychiatry Neurosci*, 2011, 36(1):47 - 55.
- [12] Asellus P, Nordström P, Nordström A L, et al. Cholesterol and the "Cycle of Violence" in attempted suicide[J]. *Psychiatry Res*, 2014, 215(3):646 - 50.
- [13] 谭来勋, 孙圣刚. 胆固醇与脑和突触可塑性关系的研究进展[J]. *卒中与神经疾病*, 2006, 13(6):383 - 4.
- [14] Keiser A A, Wood M A. Examining the contribution of histone modification to sex differences in learning and memory[J]. *Learn Mem*, 2019, 26(9):318 - 31.
- [15] Krishnan H C, Lyons L C. Synchrony and desynchrony in circadian clocks: impacts on learning and memory[J]. *Learn Mem*, 2015, 22(9):426 - 37.

## Screening of differential genes and pathways in C57BL/6J mice of different genders based on transcriptome sequencing

Li Yuhao<sup>1</sup>, Li Yanling<sup>1</sup>, Yin Xueli<sup>1</sup>, Sun Xiaomei<sup>1</sup>, Zhang Jun<sup>1</sup>, Li Mingcong<sup>1,2</sup>,  
Liu Li<sup>1,3</sup>, Zhang Sumei<sup>1</sup>, Zhang Shengquan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Biochemistry and Molecular Biology, <sup>3</sup>Research and Experimental Center, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Pathology, The Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230012)

**Abstract Objective** To screen the differential genes and pathways of female and male C57BL/6J mice by transcriptome sequencing, and to lay a foundation for further exploring the molecular mechanism of behavioral differences between male and female mice. **Methods** 8-week-old female and male mice of the C57BL/6J strain were completely isolated from the mouse hippocampus, and total RNA was extracted and reverse transcribed to construct a cDNA library, and 50 single-ended mice were generated on the BGISEQ500 platform (BGI-Shenzhen, China) The base reads were transcriptome sequenced. After sequencing, based on GO and KEGG databases, combined with the phyper function in R language to screen, correct and enrich the data, calculate *P* value, and then perform FDR correction on *P* value to obtain *Q* value and analyze different annotated genes based on the hypergeometric test method. The expression status was analyzed, and the differential genes and pathways in the hippocampus of mice of different genders were screened out. **Results** Through the comparison of male and female differences, 325 differential genes were screened, including 233 up-regulated genes and 92 down-regulated genes. The functions of these differential genes were mainly enriched in long-term potentiation (LTP), calcium signal pathway, nicotine addiction and other processes. There were 362 junctions and 1 703 interaction edges in the female-male differential gene interaction network, and 10 core genes selected: lysine demethylase 5D (*Kdm5d*), cyclin-dependent kinase 5 (*Cdkl5*), Cell output mediator (*Cle1*), dopamine receptor 6a3 (*Slc6a3*), cassette transcription factor (*Fox*), precursor mRNA processing factor 4B (*Prpf4b*), glycine receptor 4 (*Glur4*), calcium ion receptor 2 (*Camk2*), DNA and RNA binding protein family (*Son*), serotonin receptor 5b (*Htr5b*). **Conclusion** The selected differential genes and signal pathways may lay the foundation for explaining the molecular mechanism of the differences in behavior between male and female mice.

**Key words** transcriptome sequencing; behavioral differences; C57BL/6J mice; male and female differences