

7个基因在小尾寒羊性腺轴相关组织中的表达差异分析

周祖阳^{1,2}, 贺小云¹, 刘玉芳^{1,2*}, 储明星^{1*} (1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部动物遗传育种与繁殖重点实验室, 北京 100193; 2. 河北工程大学生命科学与食品工程学院, 河北邯郸 056001)

摘要 [目的]探究绵羊多羔性状候选基因 *CLSTN2*、*CCNB2*、*SRD5A2*、*HBEGF*、*FGFR1*、*GRIA2* 和 *FTH1* 在小尾寒羊性腺轴 7 种组织(大脑、小脑、下丘脑、垂体、子宫、卵巢、输卵管)中的表达情况,为阐明绵羊高繁殖力分子机理提供参考。[方法]以 *FecB* BB 型和 ++ 型小尾寒羊为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 7 个基因在性腺轴相关组织中的表达差异。[结果]*CLSTN2* 基因在 ++ 型小尾寒羊卵巢中的表达量显著高于 BB 型小尾寒羊 ($P < 0.05$), *SRD5A2* 基因在 BB 型小尾寒羊卵巢中的表达量显著高于 ++ 型小尾寒羊 ($P < 0.05$), *FGFR1* 和 *FTH1* 基因在 ++ 型小尾寒羊子宫中的表达量显著高于 BB 型小尾寒羊 ($P < 0.05$), *CCNB2*、*HBEGF* 和 *GRIA2* 基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊性腺轴各组织中的表达量差异不显著 ($P > 0.05$)。[结论]*CLSTN2*、*FGFR1* 和 *SRD5A2* 基因对小尾寒羊繁殖力具有一定的调控作用,其中 *SRD5A2* 基因对小尾寒羊的多羔性状具有一定的正向调节功能,而 *CLSTN2* 和 *FGFR1* 基因则呈现相反的调控作用。

关键词 绵羊;多羔;候选基因;性腺轴;表达差异

中图分类号 S826 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)21-0118-06

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.21.029

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Expression Difference Analysis of 7 Genes in the Related Tissues of Gonadal Axis of Small Tail Han Sheep

ZHOU Zu-yang^{1,2}, HE Xiao-yun¹, LIU Yu-fang^{1,2} et al (1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193; 2. College of Life Science and Food Engineering, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056001)

Abstract [Objective] To explore the expression of multi-lamb candidate genes *CLSTN2*, *CCNB2*, *SRD5A2*, *HBEGF*, *FGFR1*, *GRIA2* and *FTH1* in 7 kinds of tissues (brain, cerebellum, hypothalamus, pituitary, uterus, ovary, fallopian tube) in the gonadal axis of Small Tail Han Sheep, and provide references for clarifying the molecular mechanism of sheep's high fertility. [Method] Using *FecB* BB type and ++ type Small Tail Han Sheep as the research objects, real-time fluorescent quantitative PCR method was used to detect the expression differences of 7 genes in the related tissues of the gonadal axis. [Result] The relative expression level of *CLSTN2* gene in ovary of ++ type Small Tail Han Sheep was significantly higher than that of BB type Small Tail Han Sheep ($P < 0.05$), the relative expression level of *SRD5A2* gene in ovary of BB type Small Tail Han Sheep was significantly higher than that of ++ type Small Tail Han Sheep ($P < 0.05$), and the relative expression levels of *FGFR1* gene and *FTH1* gene in uterus of ++ type Small Tail Han Sheep were significantly higher than those of BB type Small Tail Han Sheep ($P < 0.05$), while the relative expression levels of *CCNB2* gene, *HBEGF* gene and *GRIA2* gene had no significant difference in different tissues of the gonadal axis of ++ type and BB type Small Tail Han Sheep ($P > 0.05$). [Conclusion] *CLSTN2*, *FGFR1* and *SRD5A2* genes might have some regulations on the fecundity of Small Tail Han Sheep. Among them, *SRD5A2* gene might have some positive regulation functions on multi-lambing traits of Small Tail Han Sheep, while *CLSTN2* gene and *FGFR1* gene showed an opposite regulation effect.

Key words Sheep; Multiple lambs; Candidate gene; Gonadal axis; Expression difference

多羔性状是绵羊重要的繁殖性状之一,提高每胎的产羔数是提升绵羊养殖经济效益的有效方法^[1],因此对绵羊多羔性状候选基因的研究具有重要意义。大量研究表明,雌性动物繁殖性能主要受下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPGA)的调控,HPGA的相关基因是研究动物繁殖性状的重要候选基因^[2]。近年来,随着分子实验技术的不断发展,绵羊多羔性状主效基因也陆续被发现,利用分子标记对绵羊多羔性状相关候选基因进行基因型选择,取得了重大进展。首先,通过对绵羊多羔主效控制基因 *FecB* 的研究发现,携带该基因的母羊在排卵数方面存在剂量效应,表现为每增加一个拷贝数,其排卵数可增加 1.5 个,产羔数可增加 1.0~1.5 个^[3-4],该基因的发现为选育高繁殖力母羊提供了研究方向。随着研究的不断深入,研究人员发现钙同线蛋白 2(calsyntenin 2, *CLSTN2*)、细胞周期蛋白 B2(cyclin

B2, *CCNB2*)、类固醇 5 α -还原酶 2(steroid 5 α -reductase 2, *SRD5A2*)、肝素结合表皮生长因子(heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, *HBEGF*)、成纤维细胞生长因子受体 1(fibroblast growth factor receptor 1, *FGFR1*)、谷氨酸 AMPA 离子通道受体 2 亚基(glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2, *GRIA2*)和铁蛋白重链多肽 1(ferritin heavy polypeptide1, *FTH1*)等基因均能影响绵羊的繁殖力。探究这些基因在野生型、突变型绵羊性腺轴相关组织中的表达量变化对于阐明绵羊多羔性状的分子机理具有重要意义。

Calsyntenins (CLSTNs) 蛋白家族是一类跨膜胞转运蛋白,主要分布在兴奋性神经元突触后膜。在脊椎动物中,CLSTNs 家族包括 *CLSTN1*、*CLSTN2* 和 *CLSTN3* 三个成员^[5]。Hernández-montiel 等^[6]对 2 组佩利布伊绵羊进行了全基因组关联分析(GWAS)研究,基于 GWAS 结果的功能分析筛选出参与母羊卵巢发育过程的候选基因 *CLSTN2*,表明该基因可能参与了对该品种绵羊的繁殖力调控。*CCNB2* 是细胞周期蛋白家族的一个成员,在细胞周期调控中起着重要作用^[7]。Wang 等^[8]研究表明,在繁殖性状上,*CCNB2* 能影响卵母细胞的发育;Mourot 等^[9]研究表明,*CCNB2* 与牛卵母细胞的发育能力显著相关,推测该基因可能通过参与卵母细胞的发育调

基金项目 国家自然科学基金项目(31772580);国家肉羊产业技术体系专项(CARS-38);中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IAS13)。

作者简介 周祖阳(1994—),男,湖北鄂州人,硕士研究生,研究方向:动物遗传育种。*通信作者,刘玉芳,讲师,博士,从事动物遗传育种研究;储明星,研究员,博士,从事肉羊遗传育种研究。

收稿日期 2021-01-31

控绵羊的繁殖力。类固醇 5 α 还原酶(SRD5A)包括 1 型和 2 型 5 α 还原酶,催化睾酮生成二氢睾酮,在性别分化和雄激素介导的生理过程中起重要作用,在筛选单羔和多羔的安徽白山羊(AWG)卵巢差异表达基因的基础上,确定了 SRD5A2 基因是单羔和多羔 AWG 中差异表达最显著的基因,表明这个基因可能与山羊高繁殖力有关^[10]。肝素结合性表皮生长因子(HBEGF)是最早发现的胚着床的分子介质之一,它在子宫内膜和植入滋养层细胞之间传递信号,以同步它们相应的发育进程。Jessmon 等^[11]认为该基因可以促进人和小鼠胚着床,有望在整个妊娠过程中作为生存因素发挥重要作用。成纤维细胞生长因子(FGF)对于促性腺激素释放激素(GnRH)系统的发育至关重要^[12],已有研究表明人类和啮齿动物都依赖 FGF 受体 1(FGFR1)和 FGF8 来支持 GnRH 神经元的发育^[13-15],而 GnRH 水平的增加激活了下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴,启动了雌激素依赖性变化,如阴道开放(VO)和发情周期的开始^[16]。GRIA2 是谷氨酸 AMPA 受体的一种亚型,也是中枢神经系统中丰富的谷氨酸受体^[17]。Vastagh 等^[18]研究发现,GRIA2 基因参与调节促性腺激素释放激素(GnRH)的谷氨酸能途径,这是随后的激素级联反应诱发小鼠排卵的已知先决条件。铁蛋白重链多肽 1(FTH1)为铁蛋白复合物,编码铁蛋白重链亚基^[19]。杨宏星^[20]通过对猪卵泡腔形成的分子筛选研究发现,FTH1 基因可能与卵泡囊腔的形成密切相关。

目前关于以上 7 个基因在小尾寒羊性腺轴相关组织中的表达分析尚未见报道。笔者以 *FecB* BB 型(突变型)和 ++ 型(野生型)卵泡期的小尾寒羊为研究对象,通过实时荧光定量 PCR 技术检测 *CLSTN2*、*CCNB2*、*SRD5A2*、*HBEGF*、*FGFR1*、*GRIA2* 和 *FTH1* 基因在绵羊性腺轴上相关组织中的表达量差异,旨在为进一步研究这 7 个基因对绵羊多羔性状的影响提供理论依据,为阐明绵羊高繁殖力机理提供参考。

1 材料与与方法

1.1 试验动物和组织样的采集

所有试验用羊均于 2017

年 10 月饲养于天津市畜牧兽医研究所试验羊场。选取 2~3 周岁经产且健康状况良好的小尾寒羊母羊 6 只[*FecB* BB 型(突变型)和 ++ 型(野生型)卵泡期各 3 只],所有试验羊的饲料水平和饲养环境均相同。2017 年 11 月进行屠宰试验,取其大脑、小脑、下丘脑、垂体、子宫、卵巢、输卵管等组织,取样后迅速装入 1.8 mL RNase-Free 冻存管中(最大样品量为冻存管体积的 67%)。所有羊的组织样品采集均在 30 min 内完成,样品采完后迅速放入液氮中冷冻保存,然后置于干冰中带回实验室,放入 -80 °C 冰箱中冷冻保存,备用。

1.2 RNA 的提取及质量检测 将采集的小尾寒羊性腺轴 7 种相关组织在液氮中进行研磨,然后用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)进行裂解,并根据动物组织总 RNA 提取试剂盒(天根,北京)的说明书进行总 RNA 的提取,最后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 检测提取 RNA 的质量和浓度。经检验合格的组织总 RNA 置于 -80 °C 下保存备用。

1.3 cDNA 合成 用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒反转录合成 cDNA,反转录体系(总体积为 20 μ L)如下:5 \times PrimeScript Buffer 4.0 μ L,PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μ L,Oligo dT Primer 1.0 μ L,Random 6 mers 1.0 μ L,RNA 1.0 μ g,用 RNase-Free ddH₂O 补足至 20 μ L。反转录反应条件如下:37 °C 15 min,85 °C 5 s,以获得 cDNA 第一链,试验操作全程在冰上进行,对反转录获得的 cDNA 进行 5 倍稀释,用持家基因 *RPL-19* 进行 PCR 检测,将符合标准的 cDNA 置于 -20 °C 下保存,以用于检测目的基因的表达^[2]。

1.4 荧光定量 PCR 引物设计 根据 GenBank 数据库提供的绵羊 *CLSTN2*、*CCNB2*、*SRD5A2*、*HBEGF*、*FGFR1*、*GRIA2*、*FTH1* 和 *RPL-19* 基因序列(登录号分别为 XM_027963951.1、XM_004010560.4、XM_027966967.1、XM_004008863.4、XM_027962633.1、XM_004017287.4、NM_001009786.2)信息,用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计,其中 *RPL-19* 作为持家基因。引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成。各引物浓度均为 10 μ mol/L,其他详细信息见表 1。

表 1 引物的序列、扩增片段大小及退火温度

Table 1 The sequences, amplified fragment length and annealing temperature of primers

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence	片段大小 Fragment length//bp	退火温度 Annealing tem- perature(Tm)//°C
<i>CLSTN2</i>	F 为 5'-AAGACCGAAATGAACCGGC-3', R 为 5'-CAGCTTCCAGTGGAACTCCG-3'	123	60
<i>CCNB2</i>	F 为 5'-GACGGTGTCCACCGATTAG-3', R 为 5'-ACTGTCTCTGGGCTTTCTTAGCT-3'	148	60
<i>SRD5A2</i>	F 为 5'-CGCATTACTTCCACAGGACATT-3', R 为 5'-ACCCAGGCTAAACCGTATGTCT-3'	182	60
<i>HBEGF</i>	F 为 5'-TTCTTGCTGCAGTCTTTTCG-3' R 为 5'-AAGCAGCTCTGAAAAGTCCA-3'	192	60
<i>FGFR1</i>	F 为 5'-CAACGTCTCAGATGCGCTC-3', R 为 5'-GGCATTTGAACCTTCACTGTC-3'	183	60
<i>GRIA2</i>	F 为 5'-ACAGGTGCAGGTTGAAGGTC-3', R 为 5'-CCAATATCCGATCTTCCGG-3'	121	60
<i>FTH1</i>	F 为 5'-GCCAGATCAACCTGGAGCT-3', R 为 5'-CGGTCTGGTTTCTTGATATCC-3'	205	60
<i>RPL-19</i>	F 为 5'-ATCGCCAATGCCAACTC-3', R 为 5'-CCTTTCGCTTACCTATACC-3'	154	60

1.5 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 检测使用 Roche Light Cycler @480 II 型荧光定量 PCR 仪进行。以 *RPL-19* 基因为持家基因,每个样品重复检测 3 次。反应体系(总体积为 20 μ L)如下:SYBR Premix Ex Taq II

10.0 μ L,上、下游引物各 0.8 μ L,cDNA 模板 2.0 μ L,RNase-Free ddH₂O 6.4 μ L。PCR 反应程序如下:95 °C 预变性 5 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 30 s,45 个循环;反应结束后,对熔解曲线进行分析。

1.6 标准曲线的建立 将 cDNA 样本稀释 5 倍,然后进行 2 倍梯度稀释后获得 5 个浓度梯度(1、1/2、1/4、1/8、1/16)的 cDNA 样品。以这些 cDNA 为模板,对目的基因和持家基因进行荧光定量 PCR,以浓度梯度的对数值(以 10 为底数)为横坐标,以检测所得 Ct 值为纵坐标,绘制目的基因和持家基因的标准曲线^[2]。

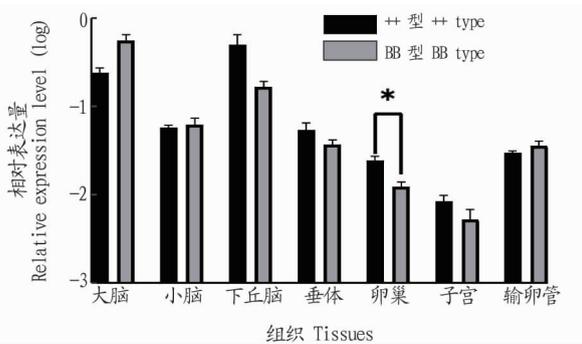
1.7 数据统计与分析 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量,数据差异显著性用 SPSS 19.0 软件进行统计与分析,组间比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),用最小显著差异法(LSD)进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取 提取后的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果发现 28S 条带明显比 18S 条带更亮,条带完整性较好,表明该 RNA 质量合格,可用于后续试验。

2.2 *CLSTN2*、*CCNB2*、*SRD5A2*、*HBEFG*、*FGFR1*、*GRIA2* 和 *FTH1* 组织表达分析

2.2.1 *CLSTN2* 组织表达分析。 实时荧光定量 PCR 结果表明,*CLSTN2* 基因在 BB 型小尾寒羊大脑中的相对表达量最高,其在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊子宫中低表达。*CLSTN2* 基因在 ++ 型小尾寒羊卵巢中的表达量显著高于 BB 型小尾寒羊($P < 0.05$) (图 1)。



注: * 代表同一组织不同基因型间差异显著($P < 0.05$)

Note: * indicated significant differences of the same tissue between different genotypes($P < 0.05$)

图 1 *CLSTN2* 基因在不同基因型小尾寒羊各组织中的表达差异分析

Fig. 1 The expression difference analysis of *CLSTN2* in tissues of Small Tail Han Sheep with different genotypes

2.2.2 *CCNB2* 组织表达分析。 不同组织中 *CCNB2* 基因的实时荧光定量 PCR 结果显示,*CCNB2* 基因在 ++ 型小尾寒羊卵巢中的相对表达量最高,在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊垂体中的相对表达量较低。*CCNB2* 基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊性腺轴各组织中的表达差异均不显著(图 2)。

2.2.3 *SRD5A2* 组织表达分析。 *SRD5A2* 基因在 BB 型小尾寒羊下丘脑中的相对表达量最高,在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊大脑、小脑、垂体、子宫、输卵管中均低表达。*SRD5A2* 基因在 BB 型小尾寒羊卵巢中的相对表达量显著高于 ++ 型小尾寒羊($P < 0.05$) (图 3)。

2.2.4 *HBEFG* 组织表达分析。 *HBEFG* 基因在 BB 型小尾寒羊小脑中的相对表达量最高,而在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊垂体、卵巢、子宫、输卵管中的相对表达量较低。*HBEFG* 基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊性腺轴各组织中的表达差异均不显著(图 4)。

2.2.5 *FGFR1* 组织表达分析。 *FGFR1* 基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊小脑中的相对表达量较高,在 BB 型小尾寒羊子宫中的相对表达量较低,且该基因在 ++ 型小尾寒羊子宫中的相对表达量显著高于 BB 型小尾寒羊($P < 0.05$) (图 5)。

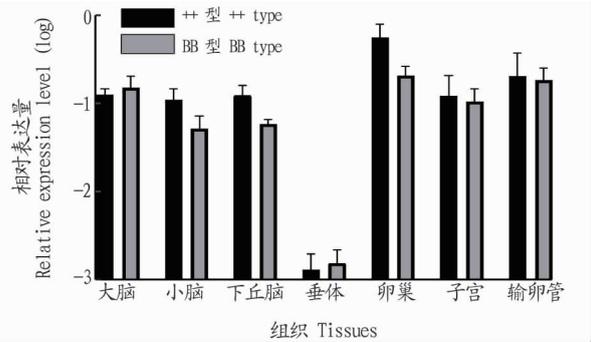
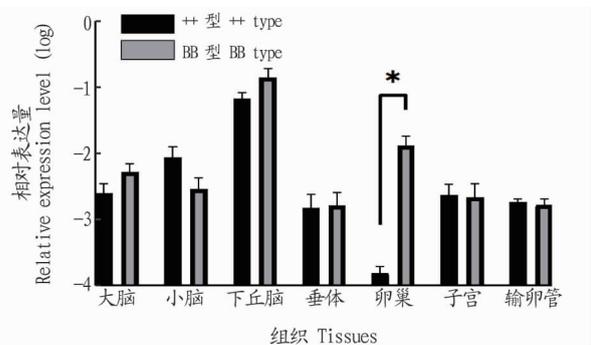


图 2 *CCNB2* 基因在不同基因型小尾寒羊各组织中表达差异分析

Fig. 2 The expression difference analysis of *CCNB2* gene in tissues of Small Tail Han Sheep with different genotypes



注: * 表示同一组织不同基因型间存在显著差异($P < 0.05$)

Note: * indicated significant differences of the same tissue between different genotypes($P < 0.05$)

图 3 *SRD5A2* 基因在不同基因型小尾寒羊各组织中的表达差异分析

Fig. 3 The expression difference analysis of *SRD5A2* gene in tissues of Small Tail Han Sheep with different genotypes

2.2.6 *GRIA2* 组织表达分析。 *GRIA2* 基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊大脑中的相对表达量最高,在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊卵巢、子宫、输卵管中的相对表达量较低。*GRIA2* 基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊性腺轴各组织中的表达差异均不显著(图 6)。

2.2.7 *FTH1* 组织表达分析。 *FTH1* 基因在 ++ 型小尾寒羊下丘脑中的相对表达量最高,在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊垂体、子宫、卵巢、输卵管中的相对表达量较低。*FTH1* 基因在 ++ 型小尾寒羊子宫中的相对表达量极显著高于 BB 型小尾寒羊($P < 0.01$) (图 7)。

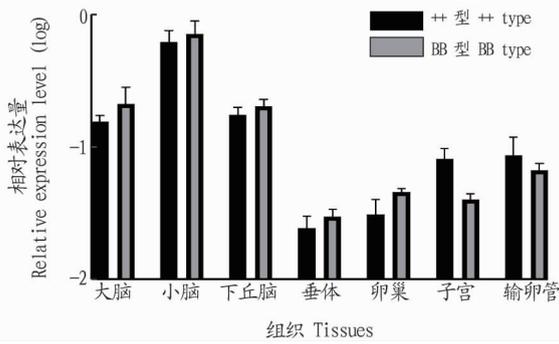
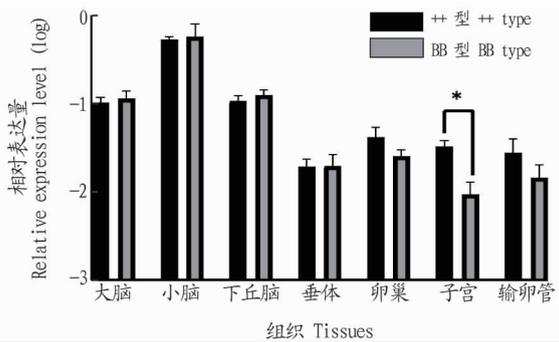


图 4 *HBEFG* 基因在不同基因型小尾寒羊各组织中的表达差异分析

Fig. 4 The expression difference analysis of *HBEFG* gene in tissues of Small Tail Han Sheep with different genotypes



注: * 表示同一组织不同基因型间存在显著差异 ($P < 0.05$)

Note: * indicated significant differences of the same tissue between different genotypes ($P < 0.05$)

图 5 *FGFR1* 基因在不同基因型小尾寒羊各组织中的表达差异分析

Fig. 5 The expression difference analysis of *FGFR1* gene in tissues of Small Tail Han Sheep with different genotypes

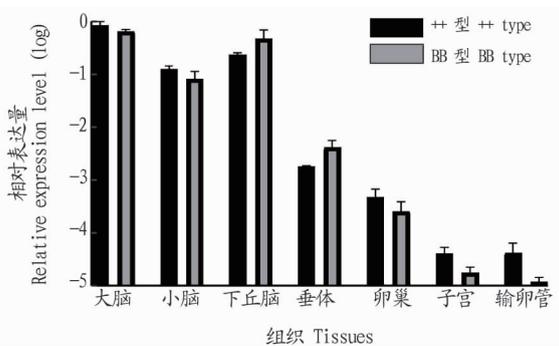
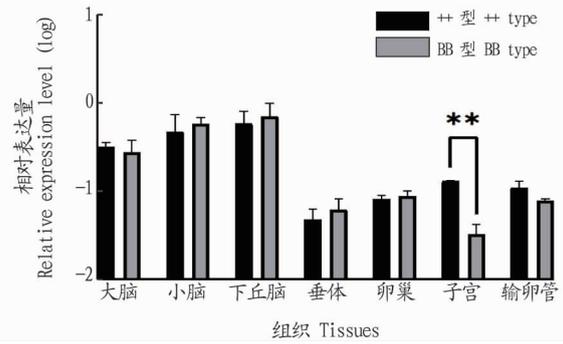


图 6 *GRIA2* 基因在不同基因型小尾寒羊各组织中的表达差异分析

Fig. 6 The expression difference analysis of *GRIA2* gene in tissues of Small Tail Han Sheep with different genotypes

3 讨论

卵巢、子宫等是动物最重要的繁殖器官,探究影响繁殖相关基因在这些组织中的表达差异可为阐明其产羔数和繁殖力提供理论基础^[21]。*CLSTN2* (Calsyntenin2), 也被称为 alcadein- γ , 是一种神经细胞表面突触蛋白。研究发现,在未成熟的大鼠子宫中,当 17β -雌二醇 (E_2) 水平在发情周期中升高时 *CLSTN2* 基因在卵泡期的表达量有所增加^[22]。该试验



注: ** 表示同一组织不同基因型间差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: ** indicated extremely significant differences of the same tissue between different genotypes ($P < 0.01$)

图 7 *FTH1* 基因在不同基因型小尾寒羊各组织中的表达差异分析

Fig. 7 The expression difference analysis of *FTH1* gene in tissues of Small Tail Han Sheep with different genotypes

中 *CLSTN2* 在 BB 型小尾寒羊大脑中的相对表达量最高,与 ++ 型小尾寒羊相比差异不显著 ($P > 0.05$)。Hernández-montiel 等^[6]通过染色体全基因组关联分析、性状和与繁殖力相关的生物学通路来鉴定 SNPs, 结果发现 *CLSTN2* 基因 s09883.1 处的突变在佩利布伊绵羊中表现出非季节性繁殖的特点,而在该试验中 *CLSTN2* 基因在 ++ 型小尾寒羊卵巢组织中的相对表达量显著高于 BB 型小尾寒羊 ($P < 0.05$), 推测该基因可能对 *FecB* 基因型小尾寒羊的产羔性状有一定的负调控作用,而这种差异可能是由于物种不同所致。*CCNB2* 是一种细胞周期蛋白,它可以在减数分裂调节中发挥作用^[23]。Daldello 等^[24]研究了 *CCNB2* 基因在小鼠卵母细胞减数分裂过程中的作用, 结果发现缺乏 *CCNB2* 的卵母细胞成熟受到影响,导致了这些小鼠的不育,因此 *CCNB2* 在小鼠卵母细胞减数分裂过程中起着重要作用。Wang 等^[8]研究发现,在生殖性状上 *CCNB2* 能影响卵母细胞的发育。该试验中 *CCNB2* 基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊卵巢中的相对表达量较高,其在 ++ 型小尾寒羊卵巢中的相对表达量略高于 BB 型小尾寒羊,二者差异不显著 ($P > 0.05$), 推测该基因可能对小尾寒羊多羔性状的影响并不明显。*SRD5A2* 基因编码生成 $5-\alpha$ 还原酶 2, 其生物学功能是特异性催化睾酮转化为双氢睾酮^[25]。Lian 等^[26]采用高通量 RNA 测序技术,筛选出高繁殖力和低繁殖力山羊卵巢中差异表达的长非编码 RNA (lncRNAs) 和 mRNAs, KEGG 通路分析表明差异表达的 *SRD5A2* 显著富集于类固醇激素的生物合成途径, 而该途径与动物繁殖有关。Ling 等^[10]研究发现, *SRD5A2* 在安徽白山羊和波尔山羊的卵巢中均有表达,但在心脏、肺脏、子宫和小肠中几乎没有表达,且 *SRD5A2* 基因是单产和多产安徽白山羊中差异表达最显著的基因,据此推测该基因可能与山羊的繁殖力有关。该试验中 *SRD5A2* 在 BB 型小尾寒羊卵巢中的相对表达量高于 ++ 型小尾寒羊,且二者差异显著 ($P < 0.05$), 推测该基因对 *FecB* 基因型小尾寒羊单羔、多羔繁殖性状具有一定的正向调控作用。肝素结合性表皮生长因子 (heparin binding EGF like

growth factor, HBEGF) 是表皮生长因子家族中的一员^[27], *HBEGF* 基因参与了卵泡的发育。研究发现, 大小卵泡中均有 sHB-EGF 和 proHB-EGF 的表达, 但小卵泡中二者的比值明显高于大卵泡^[28]。潘伯臣等^[29]研究发现女性不孕患者在接受体外受精-胚胎移植过程中取得的黄素化颗粒细胞在体外培养条件下表达 *HBEGF*, 说明 *HBEGF* 基因在卵泡发育及分化中发挥了一定的作用。该研究中 *HBEGF* 在 BB 型小尾寒羊小脑中的相对表达量最高, 而在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊垂体、卵巢、子宫中的相对表达量较低, 推测该基因可能对小尾寒羊多羔性状的影响不大。

FGF 信号在胎盘发育过程中起着重要作用, 是滋养层干细胞 (TSCs) 从滋养外胚层分化所必需的^[30], 而成纤维细胞生长因子 (FGFs) 通过 4 种成纤维细胞生长因子受体酪氨酸激酶 (FGFR1-FGFR4) 传递信号, 并参与许多信号通路, 包括 ERK1/2、PLC 和 PI3K^[31]。成纤维细胞生长因子 (FGF) 对于促性腺激素释放激素 (GnRH) 系统的发育至关重要^[13-15]。Tata 等^[12]研究发现, 相比于具有可见的、更有害的生殖缺陷的复合胚体, *FGF8* 缺失型或 *FGFR1* 缺失型小鼠在第一个发情期仅表现出轻微延迟, 并在第一个发情期后开始正常的周期, 这表明 GnRH 神经元 30%~40% 的减少主要影响第一个发情周期的启动, 但不影响其开始后的周期性。这与许多研究结果相一致, 即只需要少数促性腺激素释放激素神经元来支持女性的青春期和持续生育能力^[32-34]。据此推测 FGF 信号缺陷可能在不同程度上改变了雌性的发情周期和生育能力^[12]。该试验中 *FGFR1* 基因在 BB 型小尾寒羊小脑中的相对表达量最高, 且在 ++ 型小尾寒羊子宫中的相对表达量显著高于 BB 型小尾寒羊 ($P < 0.05$), 推测 *FGFR1* 可能对小尾寒羊的产羔性状具有负调节的作用。GRIA2 是谷氨酸 AMPA 受体的一种亚型, GRIA2 亚基在控制异构体 AMPAR 通道的电流-电压关系和 Ca^{2+} 渗透性等方面发挥着主导作用^[35]。Wenthold 等^[36]的免疫沉淀研究表明, 与 GRIA1 或 GRIA3 相关的含有 GRIA2 的复合物是成人海马体中存在的主要 AMPAR 群体。Vastagh 等^[18]研究了神经递质信号转导相关基因 mRNA 表达的变化, 发现谷氨酸能 (GRIA1、GRIA2) 等基因中的差异最为明显, 这也导致了受体下游的 G 蛋白、腺苷酸环化酶和某些转运蛋白 (SLC1A4、SLC17A6、SLC6A17) 的基因表达也发生了变化。在卵巢周期的发情前期和发情后期, GnRH 神经元神经递质信号转导相关基因表达的显著差异表明, 这些神经递质系统对排卵前 GnRH 峰的诱导有不同的贡献, 而排卵前 GnRH 峰是随后激素级联诱导排卵的已知前提。该试验中 *GRIA2* 基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊的大脑中的相对表达量较高, 推测该基因可能参与 GnRH 的分泌, 从而促进小尾寒羊的排卵, 进而调节繁殖活动, 但该基因在 2 种基因型小尾寒羊性腺轴各组织中的表达差异并不显著 ($P > 0.05$), 推测其对 *FecB* 基因型小尾寒羊的多羔性状无显著影响。铁蛋白重链多肽 (FTH1) 为铁蛋白复合物, 它除了调节铁代谢外, 还参与细胞增殖和胚胎发育, 对动物的生长和繁殖产生影响。王丽等^[19]研究表明 *FTH1* 基因 g. 163-

5G>A 位点的突变与湖羊产羔数显著相关, 推测 *FTH1* 基因可作为影响绵羊繁殖力的候选基因。Feng 等^[37]通过抑制性消减杂交技术筛选出与济宁青山羊多胎性有关的基因 *FTH1*, 且该基因在成年济宁青山羊下丘脑组织中高表达, 与该研究结果相一致, 但该基因在 ++ 型和 BB 型小尾寒羊中的表达差异并不显著, 此外 *FTH1* 基因在 ++ 型小尾寒羊子宫中的相对表达量极显著高于 BB 型小尾寒羊 ($P < 0.01$), 在 BB 型小尾寒羊卵巢中的相对表达量高于 ++ 型小尾寒羊, 但二者差异不显著, 这可能是由于物种不同所造成的, 因此推测该基因对 *FecB* 基因型小尾寒羊的多羔性状具有一定的影响。

4 结论

CLSTN2 基因在 ++ 型小尾寒羊卵巢中的相对表达量显著高于 BB 型小尾寒羊 ($P < 0.05$), *FGFR1* 基因在 ++ 型小尾寒羊子宫中的相对表达量显著高于 BB 型小尾寒羊 ($P < 0.05$), 推测这些基因可能对小尾寒羊的多羔性状具有负调节的作用; *SRD5A2* 基因在 BB 型小尾寒羊卵巢中的相对表达量显著高于 ++ 型小尾寒羊 ($P < 0.05$), 推测该基因可能对绵羊的多羔性状具有一定的正向调节作用; *FTH1* 基因在 ++ 型小尾寒羊子宫中的相对表达量极显著高于 BB 型小尾寒羊 ($P < 0.01$), 而有关该基因对绵羊繁殖力的影响则有待进一步探究。该研究结果可为阐明绵羊高繁殖力的分子机制提供一定参考。

参考文献

- [1] 张兴国, 徐相亭, 寇鑫. 寒细杂交肉羊高繁殖力基因研究[J]. 中国动物保健, 2017, 19(9): 90-91.
- [2] 寸静宇, 刘秋月, 王翔宇, 等. 小尾寒羊 *FSHB* 和 *LHB* 基因在生殖轴的表达研究[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(1): 37-41.
- [3] MULSANT P, LECERF F, FABRE S, et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérimo ewes[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2001, 98(9): 5104-5109.
- [4] WILSON T, WU X Y, JUENGL J L, et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells[J]. Biology of reproduction, 2001, 64(4): 1225-1235.
- [5] 程柯, 田青, 曾燕. Calsyntenins 家族在学习记忆和阿尔茨海默病发病中的作用研究[J]. 生命科学, 2017, 29(2): 131-137.
- [6] HERNÁNDEZ-MONTIEL W, MARTÍNEZ-NÚÑEZ M A, RAMÓN-UGALDE J P, et al. Genome-wide association study reveals candidate genes for litter size traits in pelibuey sheep[J]. Animals, 2020, 10(3): 1-17.
- [7] 袁艺标, 吴晓燕, 程献, 等. 转录因子 *MKL1* 通过激活 *CCNB2* 转录促进肺癌转移[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(12): 1422-1425, 1509.
- [8] WANG H H, ZHANG L, CAO J X, et al. Genome-wide specific selection in three domestic sheep breeds[J]. PLoS One, 2015, 10(6): 1-21.
- [9] MOUROT M, DUFORT I, GRAVEL C, et al. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels[J]. Molecular reproduction and development, 2006, 73(11): 1367-1379.
- [10] LING Y H, QUAN Q, XIANG H, et al. Expression profiles of differentially expressed genes affecting fecundity in goat ovarian tissues[J]. Genetics and molecular research, 2015, 14(4): 18743-18752.
- [11] JESSMON P, LEACH R E, ARMANT D R. Diverse functions of HBEGF during pregnancy[J]. Genetics and molecular research, 2009, 76(12): 1116-1127.
- [12] TATA B K, CHUNG W C J, BROOKS L R, et al. Fibroblast growth factor signaling deficiencies impact female reproduction and kisspeptin neurons in mice[J]. Biology of reproduction, 2012, 86(4): 1-7.
- [13] CHUNG W C J, MOYLE S S, TSAI P S. Fibroblast growth factor 8 signaling through fibroblast growth factor receptor 1 is required for the emer-

- gence of gonadotropin-releasing hormone neurons [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(10):4997–5003.
- [14] DODÉ C, LEVILLIERS J, DUPONT J M, et al. Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome [J]. *Nature genetics*, 2003, 33(4):463–465.
- [15] FALARDEAU J, CHUNG W C J, BEENKEN A, et al. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice [J]. *Journal of clinical investigation*, 2008, 118(8):2822–2831.
- [16] MILLAR R P, ROSEWEIR A K, TELLO J A, et al. Kisspeptin antagonists: Unraveling the role of kisspeptin in reproductive physiology [J]. *Brain research*, 2010, 1364:81–89.
- [17] ZHANG K, WANG Q Z, JING X X, et al. miR-181a is a negative regulator of GRIA2 in methamphetamine-use disorder [J]. *Scientific reports*, 2016, 6:1–6.
- [18] VASTAGH C, RODOLOSSE A, SOLYMOSI N, et al. Altered expression of genes encoding neurotransmitter receptors in GnRH neurons of proestrous mice [J]. *Frontiers in cellular neuroscience*, 2016, 10:1–16.
- [19] 王丽, 李万宏, 李发弟, 等. *FTH1* 基因多态性与湖羊和小尾寒羊产羔数的关联分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(4):1529–1534.
- [20] 杨宏星. 猪腔前卵泡体外培养体系优化及参与卵泡腔形成的分子筛选 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- [21] 张壮彪, 狄冉, 刘秋月, 等. 5 个基因在小尾寒羊和苏尼特羊性腺轴相关组织中表达分析 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(24):4710–4719.
- [22] HONG E J, PARK S H, CHOI K C, et al. Identification of estrogen-regulated genes by microarray analysis of the uterus of immature rats exposed to endocrine disrupting chemicals [J]. *Reproductive biology and endocrinology*, 2006, 4:1–12.
- [23] LI J, QIAN W P, SUN Q Y. Cyclins regulating oocyte meiotic cell cycle progression [J]. *Biology of reproduction*, 2019, 101(5):878–881.
- [24] DALDELLO E M, LUONG X G, YANG C R, et al. Cyclin B2 is required for progression through meiosis in mouse oocytes [J]. *Development*, 2019, 146(8):1–12.
- [25] THAREJA S. Steroidal 5 α -reductase inhibitors: A comparative 3D-QSAR study review [J]. *Chemical reviews*, 2015, 115(8):2883–2894.
- [26] LIAN Z Q, ZOU X, HAN Y R, et al. Role of mRNAs and long non-coding RNAs in regulating the litter size trait in Chuanzhong black goats [J]. *Reproduction in domestic animals*, 2020, 55(4):486–495.
- [27] 李明杨. 猪 *HBEGF*, *KPNA7*, *FOXA2* 和 *PTGS2* 基因 SNPs 检测及其与繁殖性状的关联分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [28] 潘伯臣, 冯翼飞, 叶莹心. 卵泡中肝素结合表皮生长因子样生长因子的表达及其与卵泡发育的关系 [J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(11):1034–1036, 1049.
- [29] 潘伯臣, 叶莹心, 王秀霞, 等. 肝素结合表皮生长因子在人黄素化颗粒细胞中的表达 [J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(5):594–597.
- [30] TANAKA S, KUNATH T, HADJANTONAKIS A K, et al. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4 [J]. *Science*, 1998, 282(5396):2072–2075.
- [31] BREWER J R, MAZOT P, SORIANO P. Genetic insights into the mechanisms of Fgf signaling [J]. *Genes development*, 2016, 30(7):751–771.
- [32] GIBSON M J, CHARLTON H M, PERLOW M J, et al. Preoptic area brain grafts in hypogonadal (hpg) female mice abolish effects of congenital hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency [J]. *Endocrinology*, 1984, 114(5):1938–1940.
- [33] GIBSON M J, KRIEGER D T, CHARLTON H M, et al. Mating and pregnancy can occur in genetically hypogonadal mice with preoptic area brain grafts [J]. *Science*, 1984, 225(4665):949–951.
- [34] HERBISON A E, PORTEOUS R, PAPE J R, et al. Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation, and fertility [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(2):597–604.
- [35] SOMMER B, KÖHLER M, SPRENGEL R, et al. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels [J]. *Cell*, 1991, 67(1):11–19.
- [36] WENTHOLD R J, PETRALIA R S, BLAHOS J II, et al. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons [J]. *The journal of neuroscience*, 1996, 16(6):1982–1989.
- [37] FENG T, CAO G L, CHU M X, et al. Identification and verification of differentially expressed genes in the caprine hypothalamic-pituitary-gonadal axis that are associated with litter size [J]. *Molecular reproduction and development*, 2015, 82(2):132–138.

(上接第 117 页)

笔者基于性别不同就圈养林麝的日常行为进行研究, 其影响因素相对于野生环境比较不够充分^[21], 且在圈养条件下干扰因素较多(如海拔、温湿度、生理阶段等), 导致林麝行为差异不显著, 因此有待深入研究野外生境中林麝的自然行为, 并与饲养环境下的行为进行比较。

参考文献

- [1] 盛和林. 麝资源的兴衰及拯救对策 [J]. *野生动物*, 1987(3):3–4.
- [2] 姜海瑞, 薛文杰, 徐宏发. 林麝的生物学特性、资源现状及保护对策 [J]. *生物学教学*, 2012, 37(5):7–10.
- [3] 胡忠军, 王涪, 薛文杰, 等. 紫柏山自然保护区林麝冬季生境选择 [J]. *河南大学学报(自然科学版)*, 2006, 36(1):70–74.
- [4] 刘嘉辉, 王艳, 边坤, 等. 重引入林麝的家域利用与个体迁移 [J]. *兽类学报*, 2020, 40(2):109–119.
- [5] SINGH P B, SAUD P, CRAM D, et al. Ecological correlates of Himalayan musk deer *Moschus leucogaster* [J]. *Ecology and evolution*, 2019, 9(1):4–18.
- [6] 查穆哈, 谌利民, 杨双, 等. 唐家河国家级自然保护区林麝排便点偏好 [J]. *动物学杂志*, 2019, 54(4):484–492.
- [7] 查穆哈. 唐家河自然保护区林麝 (*Moschus berezovskii*) 的栖息地及活动节律研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [8] 卫宁. 圈养雄性林麝发情期与非发情期主要行为的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- [9] 刘洋. 山西翼城家养林麝繁殖行为研究 [D]. 北京: 中央民族大学, 2014.
- [10] 冯达勇, 王建明, 郑程莉, 等. 林麝半散养模式下行为初报 [J]. *农业与技术*, 2015, 35(7):118–121.
- [11] 孟庆辉. 圈养马麝行为综合征研究 [D]. 北京: 中央民族大学, 2014.
- [12] 戚文华, 汪小方, 杨承忠, 等. 圈养林麝夏季昼夜活动节律及时间分配 [J]. *四川动物*, 2013, 32(1):19–22.
- [13] 孟秀祥, 杨奇森, 冯祥建, 等. 圈养马麝夏秋冬活动格局的比较 [J]. *兽类学报*, 2002, 22(2):87–97.
- [14] AGRESTI A. An introduction to categorical data analysis [M]. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 2007.
- [15] 薛程. 崇明圈养林麝 (*Moschus berezovskii*) 的行为学研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2008.
- [16] 汪国海, 施泽攀, 李生强, 等. 基于红外相机技术对帚尾豪猪活动节律和时间分配初步观察 [J]. *兽类学报*, 2019, 39(1):62–68.
- [17] 薛文杰. 近五十年陕西凤县林麝分布区缩小的模式及原因研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [18] LAMSAL P, KUMAR L, ARYAL A, et al. Future climate and habitat distribution of Himalayan Musk Deer (*Moschus chrysogaster*) [J]. *Ecological informatics*, 2018, 44:101–108.
- [19] 韩联宪, 刘尚莲, 梁惠娟, 等. 圈养黄麝春季行为及活动规律的初步观察 [J]. *西南林学院学报*, 1999, 19(3):192–195.
- [20] 蒋纯海, 贾宝林, 曹静. 圈养雌性原麝的初步研究 [J]. *农民致富之友*, 2017(24):178.
- [21] 肖晨瑶, 赵玉娇, 蔡永华, 等. 迁地保育林麝的侵犯性、等级序位及相互关系 [J]. *动物学杂志*, 2020, 55(2):134–140.
- [22] 姜海瑞. 陕西凤县林麝 (*Moschus berezovskii*) 种群生态学研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [23] 韩红金, 蔡永华, 程建国, 等. 圈养林麝 (*Moschus berezovskii*) 行为特征及影响因素 [J]. *四川农业大学学报*, 2019, 37(1):116–121.
- [24] 房璇, 孙太福, 蔡永华, 等. 圈养林麝的活跃性及与社会亲和度的关系 [J]. *兽类学报*, 2019, 39(5):531–536.
- [25] 孟秀祥, 杨奇森, 冯祥建, 等. 圈养马麝 (*Moschus sifanicus*) 非繁殖季节行为特征及行为节律的性别间差异 [J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(3):349–352.