

## 发情相关基因在小尾寒羊性腺轴组织中的表达分析

陈玉林<sup>1,2</sup>, 贺小云<sup>1</sup>, 刘玉芳<sup>1,2\*</sup>, 储明星<sup>1\*</sup> (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]探究绵羊繁殖性状相关候选基因 *ATF4*、*CCNG1*、*KDM3B*、*NPTX1*、*PLCB3* 和 *RASD1* 在小尾寒羊性腺轴组织(大脑、小脑、下丘脑、垂体、子宫、卵巢、输卵管)的表达差异,为阐明绵羊发情期调控分子机理提供理论依据。[方法]以 *FecB* BB 型小尾寒羊为研究对象,利用实时荧光定量 PCR 检测上述 6 个基因在小尾寒羊黄体期和卵泡期与性腺轴相关的 7 种组织中的表达差异。[结果]*ATF4* 在小尾寒羊黄体期卵巢组织中的表达量最高且极显著高于卵泡期( $P < 0.01$ );*CCNG1* 在小尾寒羊黄体期卵巢组织中的表达量最高,在卵泡期大脑组织中的表达量极显著高于黄体期( $P < 0.01$ );*KDM3B* 在小尾寒羊黄体期小脑中的表达量最高,且黄体期小脑和下丘脑中的表达量均显著高于卵泡期( $P < 0.05$ );*NPTX1* 在小尾寒羊黄体期小脑中的表达量最高且显著高于卵泡期( $P < 0.05$ );*PLCB3* 在小尾寒羊黄体期卵巢中的表达量显著高于卵泡期( $P < 0.05$ );*RASD1* 在小尾寒羊卵泡期垂体组织中的表达量最高,在黄体期大脑、小脑、子宫中的表达量显著高于卵泡期( $P < 0.05$ )。[结论]*ATF4*、*CCNG1*、*KDM3B*、*NPTX1*、*PLCB3* 和 *RASD1* 基因可能对绵羊的发情期转换起到一定的调控作用,为进一步阐明绵羊发情期转换过程的分子机理提供了新思路,为进一步研究上述 6 种基因的功能奠定了理论基础。

**关键词** 绵羊;发情期;性腺轴;候选基因;组织表达

中图分类号 S826 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)21-0105-05

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.21.026

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### Expression Analysis of Genes Related with Estrus in the Gonadal Axis of Small Tail Han Sheep

CHEN Yu-lin<sup>1,2</sup>, HE Xiao-yun<sup>1</sup>, LIU Yu-fang<sup>1,2</sup> 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 differences of candidate genes (*ATF4*, *CCNG1*, *KDM3B*, *NPTX1*, *PLCB3* and *RASD1*) related with the reproduction traits in the gonadal axis tissues (cerebrum, cerebellum, hypothalamus, pituitary, uterus, ovary, fallopian tube) of Small Tail Han Sheep, so as to provide references for elucidating the molecular mechanism of sheep's estrus regulation. [Method] Taking *FecB* BB Small Tail Han Sheep as the research object, real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression differences of the above 6 genes in 7 kinds of tissues related with gonadal axis of Small Tail Han Sheep in follicular phase and luteal phase, respectively. [Result] The expression of *ATF4* in ovarian tissue of Small Tail Han Sheep in luteal phase was the highest and significantly higher than that in follicular phase ( $P < 0.01$ ). The expression of *CCNG1* in the ovarian tissue of Small Tail Han Sheep was the highest in luteal phase of Small Tail Han Sheep, and its expression in the brain tissue in the luteal phase was significantly higher than that in the follicular phase ( $P < 0.01$ ). The expression of *KDM3B* in cerebellum of Small Tail Han Sheep in luteal phase was the highest, its expression in the cerebellum and hypothalamus in the luteal phase were both significantly higher than that in the follicular phase ( $P < 0.05$ ). The expression of *NPTX1* in cerebellum in luteal phase was the highest and significantly higher than that in follicular phase ( $P < 0.05$ ). The expression of *PLCB3* in ovary of Small Tail Han Sheep in luteal phase was significantly higher than that in follicular phase ( $P < 0.05$ ). The expression of *RASD1* in the pituitary of Small Tail Han Sheep was the highest in the follicular phase, and the expression in the brain, cerebellum and uterus in the luteal phase was significantly higher than that in the follicular phase ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] *ATF4*, *CCNG1*, *KDM3B*, *NPTX1*, *PLCB3* and *RASD1* genes might play a certain role in regulating the estrus conversion of sheep, which provided a new idea for further elucidating the molecular mechanism of estrus conversion process in sheep, and laid the theoretical basis for further research on the functions of the 6 above genes.

**Key words** Sheep; Estrus; Gonadal axis; Candidate genes; Tissue expression

排卵数和产羔数是决定绵羊繁殖力高低的重要因素。一般情况下绵羊排卵数为 1~2 个,但其数量不绝对,研究表明一些羊的排卵数在 10 个左右<sup>[1]</sup>。绵羊繁殖力受到复杂因素的调控,包括营养物质、遗传因子以及羊群中的性别比例等,其中遗传因素对绵羊繁殖力的影响较大<sup>[2]</sup>。通过对 *FecB* 基因的研究发现,携带该基因的母羊在排卵数方面存在剂量效应,即每增加一个拷贝数,其排卵数可增加 1.5 个,产羔数可增加 1.0~1.5 个<sup>[3-4]</sup>。该基因的发现为选育高繁殖力母羊提供了研究方向。发情期作为动物繁殖过

程中的重要时期,具有研究遗传因素对绵羊繁殖力作用机制的重大意义。近些年研究发现,发情相关基因 *ATF4*、*CCNG1*、*KDM3B*、*NPTX1*、*PLCB3* 和 *RASD1* 都对绵羊的繁殖力有一定的影响,探究这些基因在多羔绵羊发情期性腺轴相关组织中的表达差异对于阐明绵羊多羔分子机理具有重要意义。

前人研究发现,激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, *ATF4*) 结合基序存在于多种时钟基因中,包括 *PER2*、*PER3*、*Cry1*、*Cry2* 和 *Clock*。*ATF4* 与 *PER2* 启动子结合并激活其转录,参与动物发情周期的调控过程<sup>[5]</sup>。大鼠卵巢 *ATF4* 敲除会导致卵母细胞数量减少,表明 *ATF4* 在排卵中有着以前未知的作用<sup>[6]</sup>。细胞周期蛋白 G1 (Cyclin G1, *CCNG1*) 是一种细胞周期蛋白 G 家族蛋白,参与哺乳动物颗粒细胞增殖、卵母细胞成熟等繁殖生物学过程<sup>[7]</sup>。研究表明,*CCNG1* 可能通过参与卵泡的生长发育,继而达到对绵羊发情和季节性繁殖的调控<sup>[8]</sup>。组蛋白去甲基化酶 3B (lysine demethylase 3B, *KDM3B*) 基因敲除雌性小鼠发情周期延长,

**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** 陈玉林(1997—),男,河南驻马店人,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,从事羊优异繁殖性状分子机理研究。

**收稿日期** 2021-01-30

排卵能力下降,受精率下降,且在子宫中的胚胎植入位置也显著减少,这可能是排卵和受精减少的结果<sup>[9]</sup>。*KDM3B* 基因敲除雄性小鼠存在精子发生缺陷,并且由于生殖细胞中 CREM 介导的基因表达受损而导致不育<sup>[10]</sup>。因此,*KDM3B* 是维持正常发情周期、排卵能力和受精效率所必需的。神经元五聚蛋白 1 (neuronal pentraxin 1, NPTX1) 是神经元发育的重要分泌蛋白,编码神经五肽 1,研究发现在 GnRH 神经元的诱导下 NPTX1 是最早激活的细胞外信号之一,该基因已被发现在松果体中存在昼夜差异表达(夜间表达量增加 3.5 倍),因此被认为是与生殖季节性表型相关的候选基因<sup>[11-12]</sup>。磷脂酶 C  $\beta$ 3 (phospholipase C beta 3, PLCB3) 是一种磷脂酶,在调节母体排卵、黄体生成、卵泡生长等方面发挥重要作用<sup>[13]</sup>。地塞米松诱导的 Ras 相关蛋白 1 (Ras related dexamethasone induced 1, RASD1) 是 Ras 家族单体 G 蛋白的成员,在多种细胞功能中发挥核心作用,包括细胞增殖、分化、转化、分泌和凋亡,另外研究表明其在下丘脑对神经元激活的反应中起重要作用<sup>[14]</sup>。此外, RASD1 是一个雌激素反应的即刻早期基因 (immediate-early genes), 它还调控垂体雌激素反应晚期基因的表达<sup>[15]</sup>。笔者利用实时荧光定量 PCR 技术对上述繁殖相关候选基因在绵羊不同繁殖时期(卵泡期和黄体期)性腺轴组织中的表达情况进行检测,旨在为进一步揭示 *ATF4*、*CCNG1*、*KDM3B*、*NPTX1*、*PLCB3* 和 *RASD1* 基因的功能和解析绵羊繁殖机制提供理论基础。

表 1 引物的序列、扩增片段大小及退火温度

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

| 基因名称<br>Gene name | 引物序列<br>Primer sequence                                            | 产物大小<br>Product length//bp | 退火温度<br>Annealing temperature<br>( $T_m$ )// $^{\circ}\text{C}$ |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <i>ATF4</i>       | F 为 5'-GTTTCTCAGACAACAGCACGGA-3', R 为 5'-TTGGGTTCATCTCTCGGGG-3'    | 219                        | 60                                                              |
| <i>CCNG1</i>      | F 为 5'-CTGTCTAAAATGAAGGTACAGCC-3', R 为 5'-CCTTTCATGTGGCAGCTTCTC-3' | 270                        | 60                                                              |
| <i>KDM3B</i>      | F 为 5'-CACCAGGTGCACAATCTATAACA-3', R 为 5'-CTCATGGTGTGTGAGTGTAG-3'  | 129                        | 60                                                              |
| <i>NPTX1</i>      | F 为 5'-ACAGTGTGCATGTGGCTCAAGT-3', R 为 5'-GCAGCTTAGCCACCTTGTGC-3'   | 151                        | 60                                                              |
| <i>PLCB3</i>      | F 为 5'-AGGACGATACAGCCAAGGTC-3', R 为 5'-ACTCGCTTCGGTTGAAATTG-3'     | 201                        | 60                                                              |
| <i>RASD1</i>      | F 为 5'-TCCATCCTTACCGGAGACGT-3', R 为 5'-CTTGTGCCACAGATGACCAG-3'     | 165                        | 60                                                              |
| <i>RPL19</i>      | F 为 5'-ATCGCCAATGCCAACTC-3', R 为 5'-CCTTTCGCTTACTTATACC-3'         | 154                        | 60                                                              |

**1.4 cDNA 的合成** 利用 TaKaRa 反转录试剂盒 (PK0445) 合成 cDNA, 反转录体系如下: 1.0  $\mu\text{L}$  反转录混合引物, 1.0  $\mu\text{L}$  Oligo dT 引物, 1.0  $\mu\text{L}$  随机引物, 4.0  $\mu\text{L}$  荧光定量缓冲液, 1.0  $\mu\text{L}$  RNA, 12.0  $\mu\text{L}$  双蒸水, 全程在冰上操作。RT-PCR 反应程序如下: 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 将反转录完成后的 cDNA 产物稀释后, 用持家基因 *RPL19* 进行 PCR 检测, 质量检验合格后于 -20  $^{\circ}\text{C}$  下保存, 以备检测基因 mRNA 表达<sup>[16]</sup>。

### 1.5 实时荧光定量 PCR

**1.5.1 实时荧光定量 PCR 体系及反应程序。** PCR 反应体系 (总体积为 20  $\mu\text{L}$ ): 10.0  $\mu\text{L}$  荧光定量 Ex *Taq* 引物 II, 0.8  $\mu\text{L}$  上游引物, 0.8  $\mu\text{L}$  下游引物, 2.0  $\mu\text{L}$  cDNA 模板, 6.4  $\mu\text{L}$  双蒸水。PCR 反应程序如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环; 反应结束后进行熔解曲线分析<sup>[17]</sup>。

**1.5.2 标准曲线的建立。** 将 cDNA 样本 5 倍稀释后, 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。用这些 cDNA 作为模板, 对目的基因和持家基

## 1 材料与方法

**1.1 样品的收集** 随机选取 2~3 周岁健康、经产的空怀小尾寒羊卵泡期和黄体期母羊各 3 只, 于 2017 年 10 月饲养于天津市畜牧兽医研究所试验羊场, 所有试验羊的饲养环境和饲料均相同, 2017 年 11 月进行屠宰, 取其大脑、小脑、下丘脑、垂体、子宫、卵巢、输卵管, 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 2/3), 所有样品采集要在 30 min 内完成, 样品采集完迅速放入液氮中冷冻保存, 用干冰带回实验室, 放入 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻保存, 备用。

**1.2 RNA 的提取及质量检测** 将采集的小尾寒羊卵泡期和黄体期性腺轴 7 种组织研磨后, 用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国) 进行裂解, 此后按照动物组织 RNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 的说明书进行总 RNA 的提取, 最后利用 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  $^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

**1.3 引物设计** 根据 GenBank 数据库提供的绵羊 *ATF4*、*CCNG1*、*KDM3B*、*NPTX1*、*PLCB3*、*RASD1*、*RPL19* 基因序列 (登录号分别为 NM\_001142518.1、NM\_001287473.1、XM\_027970282.1、XM\_004013084.4、XM\_027959899.1、NM\_001161872.1、XM\_012186026.1) 信息, 并利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 以 *RPL19* 为内参基因。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  $\mu\text{mol/L}$ , 引物序列详细信息见表 1。

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  $C_t$  值为纵坐标, 绘制目的基因和持家基因的标准曲线。

**1.5.3 实时荧光定量检测与数据分析。** 使用 Roche Light Cycler<sup>®</sup>480 II 型荧光定量 PCR 仪进行荧光定量检测, 采用 Excel 软件进行数据处理, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的方法计算基因的相对表达量。获得的表达量数据使用 SPSS 19.0 软件进行独立样本 *T* 检验。

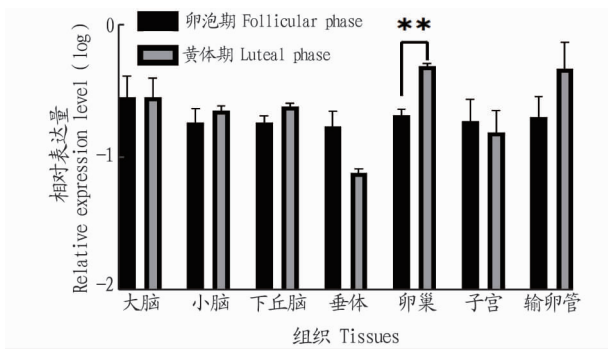
## 2 结果与分析

**2.1 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 条带明显亮于 18S 条带, 条带完整性较好, 表明该 RNA 质量合格, 可用于后续试验。

**2.2 *ATF4*、*CCNG1*、*KDM3B*、*NPTX1*、*PLCB3*、*RASD1* 基因组织表达分析**

**2.2.1 *ATF4* 基因组织表达检测。** 实时荧光定量 PCR 结果显示, *ATF4* 基因在 7 种组织中均有表达, 其中在小尾寒羊黄

体期的卵巢组织中的表达量最高且极显著高于卵泡期 ( $P < 0.01$ ); *ATF4* 基因在其他组织中的表达量差异均不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 1)。

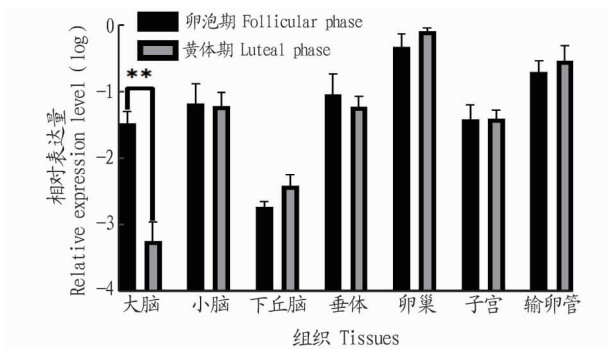


注: \*\* 表示同一组织不同时期间差异极显著 ( $P < 0.01$ )  
 Note: \*\* indicated extremely significant differences between different phases of the same tissue ( $P < 0.01$ )

图 1 *ATF4* 基因在小尾寒羊各组织中的相对表达量

Fig. 1 Relative expression level of *ATF4* gene in tissues of Small Tail Han Sheep

2.2.2 *CCNG1* 基因组织表达检测。小尾寒羊 2 个繁殖时期的 7 种组织中, *CCNG1* 基因在小尾寒羊黄体期卵巢组织中的表达量最高; *CCNG1* 基因在卵泡期大脑组织中的表达量极显著高于黄体期 ( $P < 0.01$ ), 但在其他组织中的表达量差异均不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 2)。



注: \*\* 表示同一组织不同时期间差异极显著 ( $P < 0.01$ )  
 Note: \*\* indicated extremely significant differences between different phases of the same tissue ( $P < 0.01$ )

图 2 *CCNG1* 在小尾寒羊各组织中的相对表达量

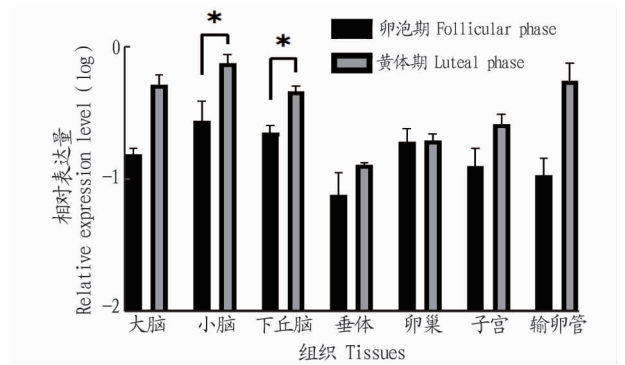
Fig. 2 Relative expression level of *CCNG1* gene in tissues of Small Tail Han Sheep

2.2.3 *KDM3B* 基因组织表达检测。如图 3 所示, *KDM3B* 基因在小尾寒羊黄体期小脑组织中的表达量最高; *KDM3B* 基因在黄体期小脑和下丘脑组织中的表达量显著高于卵泡期 ( $P < 0.05$ ); *KDM3B* 基因在其他组织中的表达量差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。

2.2.4 *NPTX1* 基因组织表达检测。如图 4 所示, *NPTX1* 基因在小尾寒羊黄体期小脑组织中的表达量最高且显著高于卵泡期 ( $P < 0.05$ ); *NPTX1* 基因在其他组织中的表达量均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

2.2.5 *PLCB3* 基因组织表达检测。如图 5 所示, *PLCB3* 基因在小尾寒羊 2 个繁殖时期卵巢组织中的表达量均最高, 黄

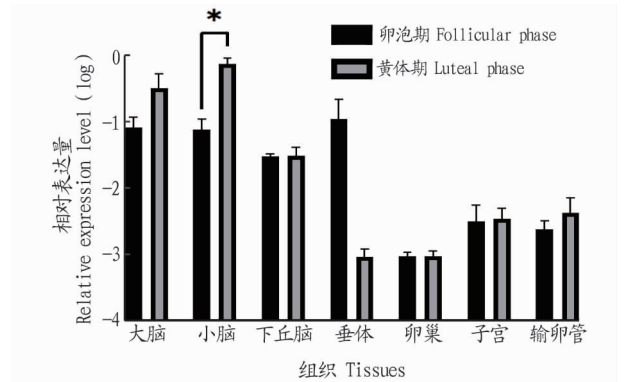
体期卵巢组织中该基因的表达量显著高于卵泡期 ( $P < 0.05$ ), 在其他组织中的表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。



注: \* 表示同一组织不同时期间差异显著 ( $P < 0.05$ )  
 Note: \* indicated significant differences between different phases of the same tissue ( $P < 0.05$ )

图 3 *KDM3B* 基因在小尾寒羊各组织中的相对表达量

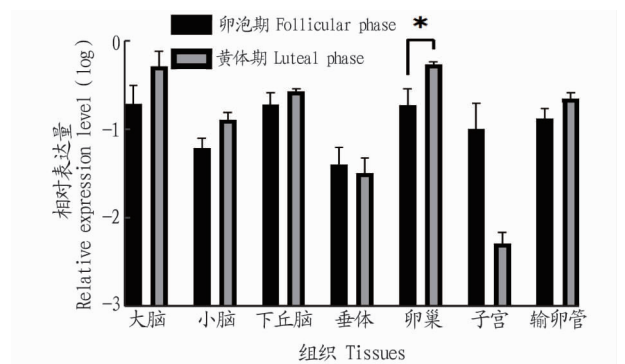
Fig. 3 Relative expression level of *KDM3B* gene in tissues of Small Tail Han Sheep



注: \* 表示同一组织不同时期间差异显著 ( $P < 0.05$ )  
 Note: \* indicated significant differences between different phases of the same tissue ( $P < 0.05$ )

图 4 *NPTX1* 基因在小尾寒羊各组织中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of *NPTX1* gene in tissues of Small Tail Han Sheep

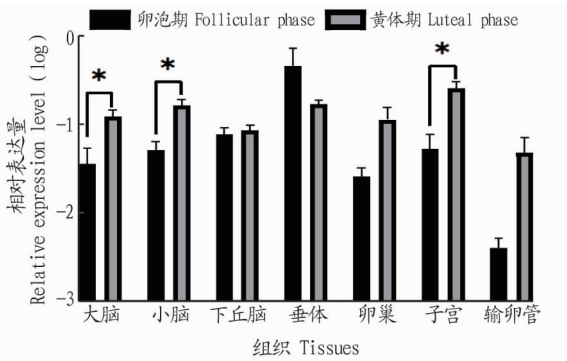


注: \* 表示同一组织不同时期间差异显著 ( $P < 0.05$ )  
 Note: \* indicated significant differences between different phases of the same tissue ( $P < 0.05$ )

图 5 *PLCB3* 基因在小尾寒羊各组织中的相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of *PLCB3* gene in tissues of Small Tail Han Sheep

**2.2.6 RASD1 基因组织表达分析。**如图 6 所示, *RASD1* 基因在小尾寒羊卵泡期垂体组织中的表达量最高; 在黄体期大脑、小脑、子宫中该基因的表达量显著高于卵泡期 ( $P < 0.05$ ), 而其在卵泡期卵巢、子宫、输卵管呈痕量表达。



注: \* 表示同一组织不同时期差异显著 ( $P < 0.05$ )

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

图 6 *RASD1* 基因在小尾寒羊各组织中的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of *RASD1* gene in tissues of Small Tail Han Sheep

### 3 讨论

哺乳动物的繁殖性能受到复杂的激素和分子网络的调节, 其中下丘脑-垂体-性腺 (HPG) 轴是最基本和最重要的调节途径, 也起到调节生殖功能的关键作用<sup>[18]</sup>。研究表明, 对小鼠、绵羊、斑马鱼和三穗鸭等的研究发现相关基因能够影响性腺轴, 从而参与到繁殖的调控之中<sup>[19-22]</sup>。发情期是动物繁殖的重要环节, 研究动物发情期的调控机制对于动物繁殖力的提高具有重要意义, 因此探究发情相关候选基因在性腺轴组织中的表达差异对于阐明小尾寒羊高繁殖力的机理具有一定的促进作用。

ATF4 是一种应激性转录因子, 又称环腺苷酸 (cAMP) 连接效应元件 2 (cREB2), 与氨基酸转运和代谢、抗氧化应激、蛋白质稳态和钙释放密切相关, 也可以诱导细胞凋亡、细胞周期阻滞和衰老, 是内质网重要的调节因子, 且在早期胚胎发育中起着十分重要的作用<sup>[23]</sup>。研究发现, ATF4 可以结合 *VEGF* 启动子中发现的 4 种氨基酸反应元件来上调 *VEGF* 表达, 增加新生血管的形成<sup>[24]</sup>。该试验发现 ATF4 在小尾寒羊性腺轴的 7 种组织中均有表达, 且黄体期卵巢中的表达量显著高于卵泡期, 由于黄体形成过程中伴有血管生长, 因此推测其通过促进卵泡膜内层毛细血管的生长, 从而促进小尾寒羊黄体的形成, 在黄体期至卵泡期的转变中起到调控作用。

细胞周期蛋白 G1 (CCNG1) 是细胞周期蛋白 G1/MDM2/p53 轴的关键组成部分, 其表达与促进生长和细胞周期进程相关<sup>[25-26]</sup>。研究发现, 该基因在发情期和发情后期卵巢中的表达量存在显著的品种间差异, 因此推断其可能通过参与卵泡的生长发育, 继而达到对绵羊发情和季节性繁殖的调控<sup>[8]</sup>。该试验中 *CCNG1* 基因在小尾寒羊性腺轴 7 种组织中均有表达, 与前人研究结果相符合, 且 2 种时期大脑组织中的表达量存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 而其在其他组织中的

表达量均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 初步推测其参与卵泡期大脑神经元细胞的生长增殖, 从而调控性腺轴中下丘脑以及垂体活性, 以此参与小尾寒羊卵泡期与黄体期的转换过程, 该基因的具体作用机制值得进一步探究。

KDM3B 是组蛋白赖氨酸去甲基酶 (KDMs) 中 KDM3 家族的重要成员<sup>[9]</sup>。组蛋白赖氨酸去甲基酶 (KDM) 首次在哺乳动物中被发现, 能去除组蛋白底物上的甲基, 并通过赖氨酸去甲基化的作用在细胞增殖中发挥作用<sup>[27]</sup>。目前已在多种肿瘤相关的疾病中发现 KDM3B 的调控作用, 如前列腺癌、肝癌、肺癌、乳腺癌<sup>[28-31]</sup>, 这些结果表明 KDM3B 在细胞周期调控中是一个关键的表现遗传因子。该试验发现 *KDM3B* 基因在小尾寒羊性腺轴 7 种组织中均有表达, 表明该基因可能与繁殖相关, 且在黄体期下丘脑中的表达量显著高于卵泡期, 初步推测其通过促进下丘脑细胞 GnRH 的分泌来动态调节 FSH 和 LH 的含量, 进而参与小尾寒羊卵泡期至黄体期的激素调控。

NPTX1 属于神经元正五聚体蛋白 (neuronal pentraxins, NPTX/NPs), 它是正五聚蛋白 (pentraxins, PTX) 的一个超家族成员。正五聚蛋白主要为促炎或抗炎细胞因子, *NPTX1* 主要在大脑皮质、海马、小脑中表达<sup>[32]</sup>, 属于以钙依赖性方式与多种蛋白质相互作用的 *NPTX* 家族成员, 在突触可塑性中发挥一定的作用<sup>[33]</sup>。研究发现, *NPTX1* 与 *KDM3B* 一样都属于表观遗传调控基因, 并通过过表达抑制细胞的生长增殖、侵袭和血管生成, 在许多癌症中起到抑制作用<sup>[33-36]</sup>。该试验中该基因在性腺轴 7 种组织中均有表达, 小脑中表达最高且黄体期显著高于卵泡期, 与预期结果相一致, 推测其通过调控小脑中神经元的活性对小尾寒羊的生殖活动起抑制作用, 参与黄体期到卵泡期发情状态的转换。

PLCB3 是由 2 个 G 蛋白  $\alpha$  亚基 ( $\alpha$ -Q 和  $\alpha$ -11) 以及 G 蛋白  $\beta$  和  $\gamma$  亚基激活的, 在启动受体介导的信号转导中起重要作用<sup>[37]</sup>。磷脂酶 (PLC) 是一大类酶, 能将磷脂水解成脂肪酸和其他亲脂性物质, 在炎症、细胞生长、信号转导、细胞死亡和维持细胞膜磷脂等过程中起重要作用<sup>[38]</sup>。研究发现, 该基因在排卵期大小的卵泡细胞中高表达, 具有激活 LH/LHR 信号的作用<sup>[39]</sup>, 并在芬兰绵羊中鉴定出该基因与产羔数相关<sup>[40]</sup>。该试验中 *PLCB3* 基因在性腺轴 7 种组织中均检测到表达, 其在卵巢中的表达量最高且黄体期显著高于卵泡期, 与前人结果相符, 推测其在小尾寒羊从黄体期向卵泡期的转换过程中激活 LH/LHR 信号, 促进小尾寒羊发情启动的过程。

RAS 超家族具有信号转导调节功能, 其信号通路在细胞增殖调控中起着关键作用<sup>[41]</sup>, *RASD1* 是 RAS 超家族中编码小 GTP 酶的 30 ku 的 G 蛋白成员<sup>[42]</sup>, 可作为受体非依赖性的鸟嘌呤核苷酸交换因子发挥作用<sup>[43]</sup>。在视交叉上核 (SCN) 中, *RASD1* 在夜间表达较高水平的昼夜节律性, 下丘脑中 *RASD1* 的表达则主要受到糖皮质激素以及血浆渗透压的影响<sup>[15, 44]</sup>。研究发现, *RASD1* 是垂体前叶细胞中雌激素反应的即刻早期基因, 调控垂体雌激素反应晚期基因的表达<sup>[14]</sup>。该试验中 *RASD1* 基因在卵泡期垂体组织中表达量最

多,与预期结果相一致,说明该基因在垂体水平经由雌激素的调控发挥局部作用,且黄体期大脑、小脑、子宫中的表达量均显著大于卵泡期,推测其在黄体期受到黄体分泌雌激素的影响,然后通过参与垂体 GnRH 神经元的激活,从而诱导小尾寒羊卵泡期的启动,调控小尾寒羊繁殖活动。

该试验利用实时荧光定量 PCR 探究了 *ATF4*、*CCNG1*、*KDM3B*、*NPTX1*、*PLCB3* 和 *RASD1* 在卵泡期和黄体期的小尾寒羊性腺轴 7 种组织中的表达量差异,结果表明 *ATF4*、*CCNG1*、*KDM3B*、*NPTX1*、*PLCB3* 和 *RASD1* 基因在卵泡期、黄体期性腺轴相关组织中的表达有较大差异,表明这 6 个基因可能对绵羊繁殖力具有一定的调控作用,可为进一步阐明绵羊高繁殖力的分子机理提供参考。

## 参考文献

- JUENGL J L, FRENCH M C, QUIRKE L D, et al. Differential expression of CART in ewes with differing ovulation rates[J]. *Reproduction*, 2017, 153(4): 471-479.
- GEBRESELASSIE G, BERIHULAY H, JIANG L, et al. Review on genomic regions and candidate genes associated with economically important production and reproduction traits in sheep (*Ovis aries*) [J]. *Animals*, 2019, 10(1): 1-12.
- 郭晓飞. *FecB* 基因影响小尾寒羊繁殖力的分子机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- 潘章源, 狄冉, 刘秋月, 等. 绵羊多羔主效基因 *BMP1B* 的研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2015, 36(5): 1-6.
- BOHLEN J, HARBRECHT L, BLANCO S, et al. DENR promotes translation reinitiation via ribosome recycling to drive expression of oncogenes including *ATF4* [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1-15.
- DI F F, LIU J S, LI S, et al. *ATF4* contributes to ovulation via regulating *COX2*/*PGE2* expression: A potential role of *ATF4* in PCOS [J]. *Front Endocrinol*, 2018, 9: 1-12.
- 柳朝华, 张惠, 何亚平, 等. Cyclin G1 在小鼠卵巢的表达及其与卵泡发育的关系[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2006, 37(6): 893-897.
- 高磊, 沈敏, 甘尚权, 等. 绵羊 *CCNG1* 基因克隆及表达分析[J]. *遗传*, 2015, 37(4): 374-381.
- LIU Z L, CHEN X, ZHOU S L, et al. The histone H3K9 demethylase *Kdm3b* is required for somatic growth and female reproductive function [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(5): 494-507.
- LIU Z L, OYOLA M G, ZHOU S L, et al. Knockout of the histone demethylase *Kdm3b* decreases spermatogenesis and impairs male sexual behaviors [J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(12): 1447-1457.
- MARTINEZ-ROYO A, ALABART J L, SARTO P, et al. Genome-wide association studies for reproductive seasonality traits in Rasa Aragonesa sheep breed [J]. *Theriogenology*, 2017, 99: 21-29.
- E G X, ZHAO Y J, HUANG Y F. Selection signatures of litter size in Dazu black goats based on a whole genome sequencing mixed pools strategy [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(5): 5517-5523.
- CASTILHO A C S, NOGUEIRA M F G, FONTES P K, et al. Ovarian superstimulation using FSH combined with equine chorionic gonadotropin (eCG) upregulates mRNA-encoding proteins involved with LH receptor intracellular signaling in granulosa cells from Nelore cows [J]. *Theriogenology*, 2014, 82(9): 1199-1205.
- GREENWOOD M P, GREENWOOD M, MECAWI A S, et al. *Rasd1*, a small G protein with a big role in the hypothalamic response to neuronal activation [J]. *Mol Brain*, 2016, 9(1): 1-17.
- WANG L H, MITSUI T, ISHIDA M, et al. *Rasd1* is an estrogen-responsive immediate early gene and modulates expression of late genes in rat anterior pituitary cells [J]. *Endocr J*, 2017, 64(11): 1063-1071.
- 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.
- 钟英杰, 向光明, 贺小云, 等. *FBXL3* 和 *FBXL21* 基因表达与苏尼特羊季节性发情关系初探[J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56(12): 40-44.
- CAO C Y, DING Y F, KONG X J, et al. Reproductive role of miRNA in the hypothalamic-pituitary axis [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2018, 88: 130-137.
- LIU X Y, LIU S Y, XU C L. Effects of leptin on HPG axis and reproductive function in male rat in simulated altitude of 5500 m hypoxia environment [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 529(1): 104-111.
- 曹晓涵, 刘秋月, 王翔宇, 等. 小尾寒羊黄体期和卵泡期生殖轴凋亡基因的表达研究及其与发情的关系[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(11): 2091-2097.
- LIU X S, JI K, JO A, et al. Effects of TDCPP or TPP on gene transcriptions and hormones of HPG axis, and their consequences on reproduction in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat toxicol*, 2013, 134/135: 104-111.
- 张伟, 张尧, 张君胜, 等. *Lrh-1* 基因在湖羊 HPG 轴中表达量变化研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(19): 10175-10177.
- 熊燊源. *ATF4* 在绵羊早期妊娠子宫和体外受精胚胎的表达及功能研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2017.
- 汤丽红, 马宇耶, 王岩, 等. *ATF4* 与 *RPL41* 在输卵管癌组织中的表达及其临床意义[J]. *现代肿瘤学*, 2019, 27(20): 3690-3694.
- AGUILERA-ROJAS M, SHARBAIT S, STEIN T, et al. Deregulation of miR-27a may contribute to canine fibroblast activation after coculture with a mast cell tumour cell line [J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(5): 802-816.
- GORDON E M, RAVICZ J R, LIU S, et al. Cell cycle checkpoint control: The cyclin G1/Mdm2/p53 axis emerges as a strategic target for broad-spectrum cancer gene therapy—A review of molecular mechanisms for oncologists [J]. *Mol Clin Oncol*, 2018, 9(2): 115-134.
- PAOLICCHI E, CREA F, FARRAR W L, et al. Histone lysine demethylases in breast cancer [J]. *Crit Rev Oncol*, 2013, 86(2): 97-103.
- SARAÇ H, MOROVA T, PIRES E, et al. Systematic characterization of chromatin modifying enzymes identifies *KDM3B* as a critical regulator in castration resistant prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2020, 39(10): 2187-2201.
- AN M J, KIM D H, KIM C H, et al. Histone demethylase *KDM3B* regulates the transcriptional network of cell-cycle genes in hepatocarcinoma HepG2 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(2): 576-582.
- DALVI M P, WANG L, ZHONG R, et al. Taxane-platin-resistant lung cancers co-develop hypersensitivity to JumoniC demethylase inhibitors [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(8): 1669-1684.
- PAOLICCHI E, CREA F, FARRAR W L, et al. Histone lysine demethylases in breast cancer [J]. *Crit Rev Oncol*, 2013, 86(2): 97-103.
- SCHLIMGEN A K, HELMS J A, VOGEL H, et al. Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system [J]. *Neuron*, 1995, 14(3): 519-526.
- LI H J, YAN R Y, CHEN W Q, et al. Long non coding RNA *SLC26A4-AS1* exerts antiangiogenic effects in human glioma by upregulating *NPTX1* via *NFKB1* transcriptional factor [J]. *FEBS J*, 2021, 288(1): 212-228.
- WANG J, DING Y R, WU Y Y, et al. Identification of the complex regulatory relationships related to gastric cancer from lncRNA-miRNA-mRNA network [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 876-887.
- LU S, ZHOU C, ZOU B W, et al. MiR-4295 facilitates cell proliferation and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma by targeting *NPTX1* [J]. *Genes Immun*, 2020, 21(1): 4-12.
- PENG X F, PAN K M, ZHAO W L, et al. *NPTX1* inhibits colon cancer cell proliferation through down-regulating cyclin A2 and CDK2 expression [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(5): 589-597.
- LAGERCRANTZ J, CARSON E, PHELAN C, et al. Genomic organization and complete cDNA sequence of the human phosphoinositide-specific phospholipase C  $\beta 3$  gene (*PLCB3*) [J]. *Genomics*, 1995, 26(3): 467-472.
- BEN-SALEM S, ROBBINS S M, LM SOBREIRA N, et al. Defect in phosphoinositide signalling through a homozygous variant in *PLCB3* causes a new form of spondylometaphyseal dysplasia with corneal dystrophy [J]. *J Med Genet*, 2018, 55(2): 122-130.
- CASTILHO A C S, NOGUEIRA M F G, FONTES P K, et al. Ovarian superstimulation using FSH combined with equine chorionic gonadotropin (eCG) upregulates mRNA-encoding proteins involved with LH receptor intracellular signaling in granulosa cells from Nelore cows [J]. *Theriogenology*, 2014, 82(9): 1199-1205.
- XU S S, GAO L, XIE X L, et al. Genome-wide association analyses highlight the potential for different genetic mechanisms for litter size among sheep breeds [J]. *Front Genet*, 2018, 9: 1-14.
- MOLL H P, PRANZ K, MUSTEANU M, et al. Afatinib restrains K-RAS-driven lung tumorigenesis [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(446): eaa02301.
- 王士玉, 王小云, 靳成娟, 等. 萝卜硫素诱导 *RASD1* 的表达促进宫颈鳞癌 HELA 细胞凋亡及周期阻滞的机制研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, 19(20): 3801-3806.

藻类为主要群落,浮游植物丰度与生物量总体呈上升趋势。

在该研究中,溶解氧对于浮游植物群落结构及其变化也具有重要影响。水体中溶解氧 90%以上源自藻类光合作用的释放,该研究中的 1#、2#池塘的浮游植物丰度以及 1#池塘浮游植物的生物量与溶解氧呈显著正相关。但 4#池塘浮游植物丰度和生物量却与溶解氧呈显著负相关,这可能是水体溶解氧受到了温度的影响,使得浮游植物的产氧量对水体溶解氧的含量作用效果不显著。

此外,2#池塘浮游植物的丰度与碱度呈显著负相关,这可能是由于 2#池塘碱度达 20 mmol/L 以上,一些不耐高碱的浮游植物增殖受到抑制。而 1#、4#池塘处于低碱度水平,不仅不会阻碍浮游植物的增殖,还会让某些在偏碱性水体中占优势的蓝藻类和绿藻类获得更好的生长条件<sup>[34]</sup>。

氮磷营养盐是影响浮游植物群落的重要影响因子,在该研究中,2#池塘浮游植物的丰度与总磷呈显著正相关,蓝藻类的生物量与总氮呈显著正相关,表明 2#池塘中丰富的营养水平促进池塘中浮游植物尤其是蓝藻类的繁殖。

该研究中,蓝藻类主要受到总氮、溶解氧、温度、总氮的影响,绿藻类主要受到亚硝酸盐、溶解氧、温度的影响,硅藻类主要受到 pH、温度的影响,裸藻类主要受到溶解氧和温度的影响。

浮游植物的优势种群通常决定了藻类生态功能的发挥,其变动亦与生态系统的稳定、养殖动物的健康密切相关。因此,尝试在中高碱度养殖池塘中构建以有益藻类为基础的稳定、优良的藻相结构,必将使养殖环境向着良性方向转化。而筛选出环境适应性强的优良藻株,如小球藻、小环藻、新月菱形藻等,结合其密度、生长特性及养殖环境要求,可用于中高碱度池塘养殖生产,以期达到改善养殖环境的同时提高生产效率,也将是促进盐碱养殖业安全、健康发展的必由之路。

## 参考文献

[1] 梁利群,任波,常玉梅,等. 中国内陆咸(盐碱)水资源及渔业综合利用[J]. 中国渔业经济,2013,31(4):138-145.

[2] 董双林. 多维视角下的新时代水产养殖业发展[J]. 水产学报,2019,43(1):105-115.

[3] 刘永新,方辉,来琦芳,等. 我国盐碱水渔业现状与发展对策[J]. 中国工程科学,2016,18(3):74-78.

[4] 雷衍之,董双林,沈成钢. 碳酸盐碱度对鱼类毒性作用的研究[J]. 水产学报,1985,9(2):171-183.

[5] 王慧,来琦芳,房文红,等. 不同类型咸水的水产养殖研究[C]//王衍亮. 可持续水产养殖——资源、环境、质量——2003 水产科技论坛论文集. 北京:海洋出版社,2003:123-127.

[6] 王萍,刘济源,么宗利,等. 水生动物盐碱适应生理学研究进展[J]. 长江大学学报(自科版),2015,12(15):44-47.

[7] 何志辉,姜宏,毕凤山. 达里湖水化学和水生生物学再调研[J]. 大连水产学院学报,1996,11(2):1-13.

[8] 林更铭,杨清良,王雨,等. 福建北部海域浙闽沿岸流消亡期浮游植物的种类组成与分布特征[J]. 应用与环境生物学报,2012,18(3):411-420.

[9] 岳强,黄成,史元康,等. 广东南水水库富营养化与浮游植物群落动态[J]. 环境科学与技术,2012,35(8):112-116.

[10] BOYD C E. The chemical oxygen demand of waters and biological materials from ponds[J]. Transactions of the American fisheries society, 1973, 102(3):606-611.

[11] BOYD C E,ROMAIRE R P,JOHNSTON E. Predicting early morning dissolved oxygen concentrations in channel catfish ponds[J]. Transactions of the American fisheries society,1978,107(3):484-492.

[12] BARICA J. Collapses of *Aphanizomenon flos-aquae* blooms resulting in massive fish kills in eutrophic lakes:Effect of weather[J]. SIL Proceedings, 1978,20(1):208-213.

[13] BOYD C E,PRATHER E E,PARKS R W. Sudden mortality of a massive phytoplankton bloom[J]. Weed science,1975,23(1):61-67.

[14] TUCKER C S,LLOYD S W,BUSCH R L. Relationships between phytoplankton periodicity and the concentrations of total and unionized ammonia in channel catfish ponds[J]. Hydrobiologia,1984,111(1):75-79.

[15] MULLER-FEUGA A. The role of microalgae in aquaculture:Situation and trends[J]. Journal of applied phycoogy,2000,12(3/4/5):527-534.

[16] 彭聪聪,李卓佳,曹煜成,等. 虾池浮游微藻与养殖水环境调控的研究概况[J]. 南方水产,2010,6(5):74-80.

[17] REN J S,SCHIEL D R. A dynamic energy budget model:Parameterisation and application to the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand waters[J]. Journal of experimental marine biology & ecology,2008,361(1):42-48.

[18] 姜敬龙,吴云海. 底泥磷释放的影响因素[J]. 环境科学与管理,2008,33(6):43-46.

[19] 王资生. 海水营养盐及其对浮游植物的影响[J]. 盐城工学院学报,2001,14(2):40-43,49.

[20] 赵旭斌,王广军,郁二蒙,等. 两种深度养殖池塘水质和浮游藻类多样性分析[J]. 上海海洋大学学报,2010,19(4):535-539.

[21] 高京,曹晶,储召升,等. 丝状藻响应温度变化的生长及功能特性[J]. 土木与环境工程学报,2020,42(6):196-204.

[22] 杨威,孙凌,袁有才,等. 碱度水平对铜绿微囊藻和四尾栅藻生长和竞争的影响[J]. 农业环境科学学报,2007,26(4):1264-1268.

[23] 孙雪梅,夏斌,过峰,等. 青岛崂山近岸海域浮游植物群落结构及其与环境因子的关系[J]. 渔业科学进展,2013,34(3):46-53.

[24] 张瑜斌,章洁香,詹晓燕,等. 高位虾池养殖过程主要理化因子的变化及水质评价[J]. 水产科学,2009,28(11):628-634.

[25] 王旭娜,江敏,钟锐,等. 凡纳滨对虾养殖池塘中浮游植物群落结构与水质因子的关系[J]. 水产学报,2018,42(11):1787-1803.

[26] 吴利,唐会元,龚云,等. 三峡水库正常运行下库区干流浮游动物群落特征研究[J]. 水生态学杂志,2021,42(1):58-65.

[27] 石晓丹,阮晓红,邢雅因,等. 苏州平原河网区浅水湖泊冬季浮游植物群落与环境因子的典范对应分析[J]. 环境科学,2008,29(11):2999-3008.

[28] 刘存歧,孔祥玲,张治荣,等. 基于 RDA 的白洋淀浮游植物群落动态特征分析[J]. 河北大学学报(自然科学版),2016,36(3):278-285.

[29] PINILLA G A. Vertical distribution of phytoplankton in a clear water lake of Colombian Amazon (Lake Boa, Middle Caquetá) [J]. Hydrobiologia, 2006,568(1):79-90.

[30] 曾茹,李亚军,何金曼,等. 清澜港近岸海湾春秋两季浮游植物群落结构特征及其与环境因子的关系[J]. 安徽农业科学,2021,49(10):77-82,100.

[31] WANG Z H,YUAN M L,LIANG Y,et al. Effects of temperature and organic and inorganic nutrients on the growth of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) from the Daya Bay, South China Sea [J]. Acta oceanologica sinica,2011,30(3):124-131.

[32] SUZUKI Y,MARUYAMA T,NUMATA H,et al. Performance of a closed recirculating system with foam separation,nitrification and denitrification units for intensive culture of eel:Towards zero emission[J]. Aquacultural engineering,2003,29(3/4):165-182.

[33] 刘艳. 额尔齐斯河及邻近内陆河流域浮游植物生态学研究[D]. 上海:上海海洋大学,2011.

[34] AGRAWAL S C. Factors controlling induction of reproduction in algae-review: The text [J]. Folia microbiologica,2012,57(5):387-407.

(上接第 109 页)

[43] SPIŠSKÁ V,PAČESOVÁ D,MÍKOVÁ H,et al. Prenatal exposure to lipopolysaccharide induces changes in the circadian clock in the SCN and AA-NAT activity in the pineal gland[J/OL]. Brain Res,2020,1743[2021

-01-05]. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146952>.

[44] HAHNOVÁ K,PAČESOVÁ D,VOLFOVÁ B,et al. Circadian Dexas1 in rats:Development,location and responsiveness to light [J]. Chronobiol Int,2016,33(2):141-150.