

# *Lep* 和 *LEPR* 基因在不同脂尾型绵羊脂肪组织中的 mRNA 表达研究

刘宝凤, 周沙沙, 王景霖, 魏琳琳, 乔利英, 刘建华, 梁琛, 刘文忠\*

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

**摘要:** 本研究利用 Real-time PCR 技术研究 *Lep* 和 *LEPR* 2 个基因在 2 个具有显著尾型差异的绵羊品种(广灵大尾羊和小尾寒羊)不同脂肪组织中的发育性表达规律, 以探讨这 2 个基因与绵羊脂肪代谢的关系。采集 2 个品种 2、4、6、8、10 和 12 月龄时共计 96 个个体(每品种公、母各半)7 个部位(大网膜、小网膜、肠系膜、腹膜后、皮下、肾周和尾部)的脂肪组织进行 mRNA 表达研究。结果表明, *Lep* 和 *LEPR* 在广灵大尾羊和小尾寒羊脂肪组织中的表达存在时空差异性。作为主效应, 品种和性别基本不影响 *Lep* 和 *LEPR* mRNA 的表达, 但品种与月龄间的交互对这 2 个基因的表达均有所影响。尽管这 2 个基因协同调节脂肪沉积和能量代谢, 但是存在反向调节。有关结果为深入研究绵羊脂肪代谢的遗传机制提供了重要的科学依据。

**关键词:** 绵羊; *Lep*; *LEPR*; mRNA 表达; 脂肪组织

中图分类号: S826; S813.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)07-1014-09

## Differential Expression of *Lep* and *LEPR* mRNA in Adipose Tissues of Sheep with Divergent Fat-tails

LIU Bao-feng, ZHOU Sha-sha, WANG Jing-lin, WEI Lin-lin, QIAO Li-ying,

LIU Jian-hua, LIANG Chen, LIU Wen-zhong\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

**Abstract:** Real-time PCR technique was used to study the ontogenetic mRNA expression of *Lep* and *LEPR* genes in two sheep breeds with distinct tail types (Guangling Large Tailed and Small Tailed Han Sheep), so that to discuss the probable relationship between the *Lep* and *LEPR* mRNA expression and fat metabolism. Adipose tissues from seven parts of the body (great and small omentum, tail, subcutaneous, mesenterium, perirenal and retroperitoneum) were collected from 96 animals (48 for each breed with equal sex ratios) from 2- to 12- month old at the interval of two months to study the mRNA expression. The results showed that both *Lep* and *LEPR* expressed spatiotemporally in the two breeds. As the main effects, sex and breed did not basically influence the expression of *Lep* and *LEPR*, but the breed  $\times$  age interaction affected the expression of the two genes to different extents. Although the two genes had a synergistic effect on the regulation of fat deposition and energy metabolism, their expressions were inversely regulated. These results provide the important scientific bases for further research on the genetic mechanism of fat metabolism in sheep.

**Key words:** sheep; *Lep*; *LEPR*; mRNA expression; adipose tissue

收稿日期: 2012-12-10

基金项目: 国家自然科学基金(30972084); 山西省科技攻关项目(0111029)

作者简介: 刘宝凤(1987-), 女, 山西太原人, 硕士生, 主要从事肉用绵羊的分子遗传育种研究, E-mail: shengjiliubaofeng@163.com

\* 通信作者: 刘文忠, 教授, E-mail: tglwzyc@yahoo.com.cn

瘦素(Leptin)是由瘦素基因(*Lep*)编码,脂肪细胞分泌的分子量为 16 ku 的蛋白质类激素,对机体脂肪沉积、体重生长和能量代谢等生理活动具有重要调节作用<sup>[1]</sup>。瘦素基因又称肥胖基因(*Obesity, ob*),首次发现于小鼠<sup>[2]</sup>。A. Perucatti 等用原位杂交技术将绵羊的 *Lep* 基因定位于 OAR4q32<sup>[3]</sup>。瘦素受体(Leptin receptor, *LEPR*)属 I 类细胞因子受体家族,由瘦素受体基因(*LEPR*)编码,广泛分布于机体各组织和器官中,是瘦素发挥作用的重要中介物<sup>[4]</sup>。*LEPR* 也称为糖尿病基因(*Diabetes, db*),首次在小鼠的脉络丛中克隆成功<sup>[5]</sup>。瘦素的主要生理功能是作用于下丘脑体重调节中枢,降低食欲、增加耗能来抑制脂肪沉积和体重增加<sup>[6]</sup>。作为一种自分泌和旁分泌因子,瘦素通过靶细胞膜上的受体介导,还可以调节家畜的生殖发育<sup>[7]</sup>、泌乳性能<sup>[8]</sup>、免疫功能<sup>[9]</sup>和保护消化系统<sup>[10]</sup>。近年来,该基因已经被作为研究家畜生长发育和肉质等经济性状的重要候选基因。

*Lep* 的表达具有脂肪组织特异性,除白色脂肪组织中有较高表达外,棕色脂肪、骨骼肌、胃上皮、胎盘、卵巢、乳腺和成骨组织等也有少量合成<sup>[11]</sup>。*Lep* mRNA 高表达于啮齿类动物和人类的皮下脂肪<sup>[12]</sup>,哺乳动物的乳腺组织中也有表达<sup>[13]</sup>,且青春期的表达量显著高于妊娠期和泌乳期<sup>[14]</sup>。小尾寒羊的脑垂体、子宫和卵巢内均有 *LEPR* 蛋白的表达<sup>[15]</sup>。*Lep* 和 *LEPR* 还表达于垂体和下丘脑<sup>[16]</sup>,尤以动物发情期及妊娠早期表达量高<sup>[17]</sup>。对绵羊 *Lep* 和 *LEPR* mRNA 的表达已有研究,如激素分泌<sup>[18]</sup>和营养水平<sup>[19]</sup>对其表达的影响研究,但对其 mRNA 的时空表达研究未见报道。

本研究旨在通过对长脂尾型广灵大尾羊和短脂尾型小尾寒羊不同脂肪组织中 *Lep* 和 *LEPR* 基因的 mRNA 水平进行检测,了解该基因的表达规律,探讨

品种、性别、月龄和组织等因素对这 2 个基因表达的影响,为绵羊肉质性状的遗传改良提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验样本

试验材料采自 2 个具有显著尾型差异的脂尾型绵羊品种:小尾寒羊(山东省济宁市)和广灵大尾羊(山西省大同市)。在同样的条件下对 2 个品种绵羊进行饲养管理,分别在 2、4、6、8、10 和 12 月龄时,每品种屠宰 8 只,公母各半。屠宰程序按中华人民共和国国家标准(GB 13078-2001 和 GB/T 17237-1998)和农业行业标准(NY 5148-2002-NY 5151-2002)进行。屠宰后,采集皮下、尾部、大网膜、小网膜、肠系膜、腹膜后和肾周等 7 个部位的脂肪组织,用铝箔包裹置于液氮中速冻,之后放入 -70 ℃ 保存备用。

### 1.2 主要试剂及仪器

Trizol 试剂及 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒购自 TaKaRa 公司;DEPC、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇等试剂购自北京天根。Stratagene Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪(Stratagene, 美国);BCM-1000 型超净工作台(安泰,苏州);QL-901 型漩涡混合器(海门,江苏)等。

### 1.3 引物设计与合成

根据绵羊 *Lep* 基因 mRNA 序列(GenBank 登录号:HE605296.1)和 *LEPR* 基因 mRNA 序列(GenBank 登录号:NM\_001009763.1)设计引物,选用 18S rRNA 基因作为看家基因。采用 Primer3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)在线软件设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列、退火温度及 PCR 产物长度见表 1。

表 1 引物序列、退火温度及 PCR 产物长度

Table 1 Primer sequence, annealing temperature and PCR product size

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	产物长度/bp Products length
<i>Lep</i>	F: ACAGAGGGTCACTGTTTGG R: GGCGAGGATCTGTTGGTAGA	60	100
<i>LEPR</i>	F: TGTTGCTTTTGGAGTGAGGA R: TCCAGTGTGCACCTGTTTGT	60	118
18S rRNA	F: CAGACAAATCACTCCACCAA R: GAAGGGCACCACCAGGAGT	60	159

F. 上游引物; R. 下游引物

F. Forward primers; R. Reverse primers

1.4 RNA 的提取和反转录

按 Trizol 试剂盒建议的方法提取组织样总 RNA,检测总 RNA 的浓度和纯度。按照 Prime-Script® RT reagent kit 反转录试剂盒进行反转录。反转录体系 10 μL,包括 1 μL 总 RNA,2 μL 5 × PrimeScript, 0.5 μL PrimerScript RT Enzyme Mix,0.5 μL Oligo dT Primer,0.5 μL Random 6 Primers,5.5 μL RNase Free dH<sub>2</sub>O。PCR 过程为: 37 °C 15 min,85 °C 5 s。反转录产物 4 °C 保存备用。

1.5 实时荧光定量 PCR 反应

参照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行荧光定量 PCR。反应体系由 10 μL SYBR®Premix Ex Taq™ II、0.8 μL Forward Primer、0.8 μL Reverse Primer、0.4 μL ROX Reference Dye II、2 μL DNA 模板和 6 μL 灭菌双蒸水组成,共 20 μL。PCR 循环条件为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 预变性 5 s,60 °C 退火/延伸 34 s,50 个循环。熔解曲线分析: 95 °C 10 s,60 °C 1 min,然后以 0.5 °C/10 s 的速率从 60 °C 缓慢升温到 95 °C。每个样品做 3 个重复。

1.6 数据统计与分析

采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。运用 SPSS17.0 软件(SPSS Science, Chica-

go, IL, USA)的 GLM 过程进行单变量方差分析。考虑的影响因素包括品种、性别、组织和月龄。配合的模型如下:

$$y_{ijklm} = \mu + B_i + S_j + T_k + M_l + BS_{ij} + BT_{ik} + BM_{il} + ST_{jk} + SM_{jl} + TM_{kl} + e_{ijklm}$$

式中,y<sub>ijklm</sub>为 *Lep* 或 *LEPR* 的 mRNA 表达量, B<sub>i</sub> 为第 i 个品种效应(i=1, 2), S<sub>j</sub> 为第 j 个性别效应(j=1, 2), T<sub>k</sub> 为第 k 种脂肪组织效应(k=1, 2, ..., 7), M<sub>l</sub> 为第 l 个月龄效应(l=1, 2, ..., 6), BS<sub>ij</sub>、BT<sub>ik</sub>、BM<sub>il</sub>、ST<sub>jk</sub>、SM<sub>jl</sub> 和 TM<sub>kl</sub> 表示互作效应, e<sub>ijklm</sub> 为残差。数据表示为“ $\bar{X} \pm S_x$ ”,各因素不同水平间的差异采用 Duncan's 法进行多重比较。

2 结果

2.1 影响 *Lep* mRNA 表达的因素

对 *Lep* mRNA 表达的方差分析表明,*Lep* 在不同脂肪组织中的表达差异显著(P<0.05),月龄间的差异虽在 0.05 水平上不显著,但在 0.1 水平上显著(P<0.1)。品种和性别对其表达无显著影响。品种与月龄间的互作对 *Lep* 的表达有所影响(P<0.1),但其他互作对其表达无显著影响(表 2)。

表 2 *Lep* 基因 mRNA 表达丰度的方差分析

Table 2 Analysis of variance for the mRNA abundance of *Lep* gene

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 df	F-值 F-value	显著性 Significance
校正模型 Corrected model	912.46	66	1.28	NS
截距 Intercept	3 103.90	1	286.98	* * *
品种 Breed	14.12	1	1.31	NS
性别 Sex	9.68	1	0.90	NS
月龄 MOA	118.17	5	2.19	NS
组织 Tissue	175.51	6	2.71	*
品种×月龄 Breed×MOA	113.15	5	2.09	NS
性别×月龄 Sex×MOA	49.08	5	0.91	NS
组织×月龄 Tissue×MOA	288.15	30	0.89	NS
品种×性别 Breed×Sex	2.58	1	0.24	NS
品种×组织 Breed×Tissue	110.39	6	1.70	NS
性别×组织 Sex×Tissue	80.88	6	1.25	NS
误差 Error	5 981.10	553		
总和 Total	11 686.84	620		
校正总和 Corrected total	6 893.55	619		

NS. Not significant, P>0.05; \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001. MOA = Month of age. The same as Table 4

## 2.2 *Lep* mRNA 的表达丰度

皮下脂肪中 *Lep* mRNA 表达量最高(3.71), 显著高于其他部位脂肪组织中的表达量( $P < 0.05$ )。肠系膜中的表达量最低(1.95), 且显著( $P < 0.05$ )低于其他部位脂肪组织中的表达量见表 3。

表 3 绵羊 *Lep* 基因 mRNA 的表达丰度

Table 3 Abundance of ovine *Lep* mRNA

因素	水平	mRNA 表达丰度	因素	水平	mRNA 表达丰度	
Factor	Level	Abundance of mRNA	Factor	Level	Abundance of mRNA	
品种 Breed	小尾寒羊 Small Tailed Han sheep (STH)	2.65 ± 0.23 <sup>a</sup>	性别 Sex	公 Male	2.65 ± 0.28 <sup>a</sup>	
	广灵大尾羊 Guangling Large Tailed sheep (GLT)	2.97 ± 0.20 <sup>a</sup>		母 Female	2.96 ± 0.19 <sup>a</sup>	
脂肪组织 Adipose tissue	大网膜 Great omental fat (GO)	2.56 ± 0.34 <sup>abc</sup>	月龄 Month of age	2	2.91 ± 0.30 <sup>ab</sup>	
	小网膜 Small omental fat (SO)	2.44 ± 0.34 <sup>bc</sup>		4	3.54 ± 0.32 <sup>a</sup>	
	皮下 Subcutaneous fat (SC)	3.71 ± 0.38 <sup>a</sup>		6	2.10 ± 0.32 <sup>b</sup>	
	腹膜后 Retroperitoneal fat (RP)	3.34 ± 0.41 <sup>ab</sup>		8	2.70 ± 0.31 <sup>ab</sup>	
	肾周 Perirenal fat (PR)	2.66 ± 0.33 <sup>abc</sup>		10	2.64 ± 0.31 <sup>ab</sup>	
	肠系膜 Mesenteric fat (MT)	1.95 ± 0.32 <sup>c</sup>		12	2.97 ± 0.71 <sup>ab</sup>	
	尾部 Tail fat (TA)	2.98 ± 0.34 <sup>abc</sup>				

不同字母表示同一因素不同水平间差异显著( $P < 0.05$ )。表 5 同

Values with different superscripts within the same factor differ significantly ( $P < 0.05$ ). The same as Table 5

图 1 给出了 *Lep* 基因在 2 个品种各月龄的 mRNA 表达丰度, 以说明品种与月龄的近似互作原因。可见, 这一互作主要来源于小尾寒羊较广灵大尾羊 2 月龄时的表达量低, 但 8 和 12 月龄时的表达量高。其他月龄时, 2 个品种中的表达量基本没有差异。

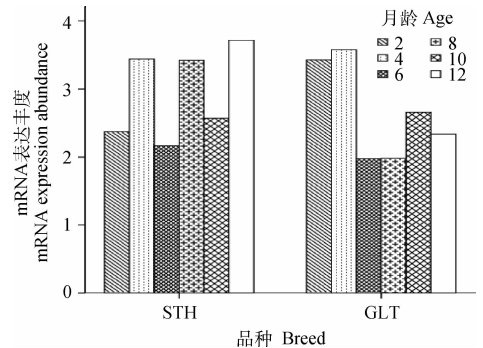
## 2.3 影响 *LEPR* 表达的因素

月龄和组织极显著( $P < 0.001$ )地影响 *LEPR* 基因的表达, 但品种与性别对其表达无显著影响。品种与月龄间的互作效应极显著( $P < 0.001$ ), 但其他互作均不影响 *LEPR* 的表达(表 4)。

## 2.4 *LEPR* mRNA 的表达丰度

各因素不同水平下 *LEPR* 基因 mRNA 的表达

尽管差异不显著, 但 *Lep* mRNA 的表达量, 广灵大尾羊(2.97)高于小尾寒羊(2.65); 母羊(2.96)高于公羊(2.65)。从月龄来看, 4 月龄时的表达量最高(3.54), 6 月龄时表达量最低(2.10), 二者差异显著( $P < 0.05$ ), 其他月龄间无显著差异。



GLT. 广灵大尾羊; STH. 小尾寒羊。图 2 同  
GLT. Guangling Large Tailed sheep; STH. Small Tailed Han sheep. The same as Figure 2

图 1 绵羊 *Lep* mRNA 表达中品种与月龄间的互作  
Fig. 1 Interaction between breed and months of age in ovine *Lep* mRNA expression

丰度列于表 5。大网膜脂肪中 *LEPR* mRNA 表达量最高(1.022),其次为尾脂(0.531),二者差异显著( $P<0.05$ )。腹膜后脂肪中的表达量最低(0.274),其次为小网膜脂肪(0.333),二者差异不显著。其他

3 个部位脂肪组织中 *LEPR* 的表达量居中,且相互间差异不显著。月龄的显著性影响表现在,12 月龄时表达量最高(0.764),2 月龄时次之(0.681)。其他月龄时的表达量较低,且相互间差异不显著。

表 4 *LEPR* 基因 mRNA 表达丰度的方差分析

Table 4 Analysis of variance for the mRNA abundance of *LEPR*

变异来源	平方和	自由度	F-值	显著性
Source of variation	Sum of squares	df	F-value	Significance
校正模型 Model	102.87	66	3.09	***
截距 Intercept	91.51	1	181.55	***
品种 Breed	0.00	1	0.00	NS
性别 Sex	1.34	1	2.66	NS
月龄 MOA	11.75	5	4.66	***
组织 Tissue	30.86	6	10.20	***
品种×月龄 Breed×MOA	25.19	5	10.00	***
性别×月龄 Sex×MOA	2.33	5	0.92	NS
组织×月龄 Tissue×MOA	20.47	30	1.35	NS
品种×性别 Breed×sex	0.31	1	0.61	NS
品种×组织 Breed×tissue	4.04	6	1.34	NS
性别×组织 Sex×tissue	3.09	6	1.02	NS
误差 Error	277.74	551		
总和 Total	505.49	618		
校正总和 Corrected total	380.62	617		

表 5 绵羊 *LEPR* 基因 mRNA 的表达丰度

Table 5 Abundance of ovine *LEPR* mRNA

因素	水平	mRNA 表达丰度	因素	水平	mRNA 表达丰度	
Factor	Level	Abundance of mRNA	Factor	Level	Abundance of mRNA	
品种 Breed	小尾寒羊 Small Tailed Han sheep(STH)	0.483±0.050 <sup>a</sup>	性别 Sex	公 Male	0.542±0.060 <sup>a</sup>	
	广灵大尾羊 Guangling Large Tailed sheep(GLT)	0.483±0.043 <sup>a</sup>		母 Female	0.424±0.040 <sup>a</sup>	
脂肪组织 Adipose tissue	大网膜 Great omental fat (GO)	1.022±0.082 <sup>a</sup>	月龄 Month of age	2	0.681±0.066 <sup>ab</sup>	
	小网膜 Small omental fat (SO)	0.333±0.081 <sup>c</sup>		4	0.386±0.070 <sup>b</sup>	
	皮下 Subcutaneous fat (SC)	0.428±0.080 <sup>bc</sup>		6	0.339±0.068 <sup>b</sup>	
	腹膜后 Retroperitoneal fat (RP)	0.274±0.080 <sup>c</sup>		8	0.388±0.067 <sup>b</sup>	
	肾周 Perirenal fat (PR)	0.355±0.080 <sup>bc</sup>		10	0.339±0.068 <sup>b</sup>	
	肠系膜 Mesenteric fat (MT)	0.439±0.081 <sup>bc</sup>		12	0.764±0.154 <sup>a</sup>	
	尾部 Tail fat (TA)	0.531±0.080 <sup>b</sup>				

2 个品种 *LEPR* 的表达量相同,只是变异稍许不同。尽管性别对 *LEPR* 的表达无显著影响,但公羊(0.542)的 mRNA 表达量高于母羊(0.424)。

图 2 给出了 *LEPR* 基因在 2 个品种各月龄的 mRNA 表达丰度,以说明品种与月龄的互作原因。可见,品种与月龄的显著互作主要来源于小尾寒羊较广灵大尾羊 2、4、6 月龄时的表达量低,但 8、10、12 月龄时的表达量高。

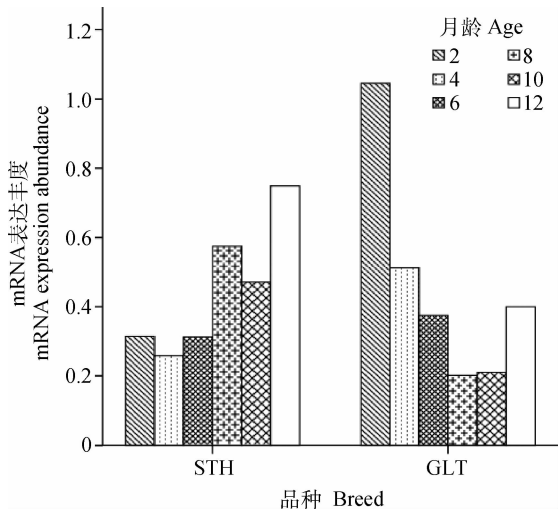


图 2 绵羊 *LEPR* mRNA 表达中品种与月龄间的互作  
Fig. 2 Interaction between breed and months of age in ovine *LEPR* mRNA expression

### 3 讨论

#### 3.1 关于 *Lep* mRNA 的表达

作为来自脂肪组织的一种代谢信号,瘦素通常高表达于脂肪组织中。T. G. Ramsay<sup>[20]</sup>研究表明,随着猪前体脂肪细胞的增殖和脂肪细胞的肥大,脂肪细胞中 *Lep* mRNA 的表达量也随之升高。陈赞谋等<sup>[21]</sup>发现,瘦肉型猪种 *Lep* 基因的表达量低于脂肪型猪种。可见,猪的脂肪沉积能力越强,脂肪组织表达和分泌的瘦素就越多。对绵羊 *Lep* 基因在脂肪组织中的表达也已有文献报道。B. S. Muhlhauster 等<sup>[22]</sup>发现 *Lep* mRNA 表达于羔羊的皮下和肾周脂肪组织,其表达量与母羊的营养水平有关。M. Altmann 等<sup>[23]</sup>研究表明,在羔羊生长后期,胴体的脂肪沉积和瘦素表达水平呈正相关。然而, *Lep* 基因在不同部位脂肪组织中的表达是否存在差异,未见报道。本研究发现, *Lep* 在绵羊皮下、尾部、大网膜、小网膜、腹膜后、肾周和肠系膜的脂肪组织中都有 mRNA 的表达,且存在组织表达差异。皮下脂

肪 *Lep* mRNA 的表达量最高,腹膜后次之,说明了绵羊的皮下和腹膜后有较高的脂肪沉积能力。

广灵大尾羊和小尾寒羊都起源于蒙古绵羊<sup>[24-25]</sup>,因自然生态条件和社会需求不同,2 个品种在体型外貌、生产性能、繁殖性能等方面也存在明显差异。广灵大尾羊属于长脂尾绵羊,采食量低,肉用性能好;小尾寒羊属于短脂尾绵羊,采食量高,繁殖性能好。尽管差异不显著,广灵大尾羊 *Lep* mRNA 表达量高于小尾寒羊。瘦素的主要功能是通过调节采食量和耗能参与体脂调节<sup>[6]</sup>。其 *Lep* mRNA 表达量高意味着蓄脂力强,有利于肉用性能的发挥。这也在一定程度上阐明了广灵大尾羊肉用性能好的遗传机制。

瘦素的表达和分泌受多种因素影响,其中包括激素因素的调节。研究发现,雌激素能促进瘦素表达和分泌,而雄激素水平和瘦素表达呈负相关<sup>[26]</sup>。本研究结果中,虽然性别对 *Lep* mRNA 表达影响不显著,但母羊高于公羊,这可能与激素影响有关。

季节是影响绵羊体重的一个重要的非遗传因素。放牧条件下绵羊的体重,夏秋季节通常高于冬春季节。K. Kirsz 等<sup>[27]</sup>研究发现绵羊瘦素分泌水平呈季节性变化。本研究中,6~10 月份对应于夏秋季节,绵羊体重增加,脂肪沉积。脂肪沉积可刺激瘦素表达分泌<sup>[28]</sup>,因此至 12 月份时,瘦素分泌增加,且 4 月份时达最高值。瘦素与其受体结合,可对食欲产生长期抑制,即产生主动性食欲抑制;同时本研究中的 12~4 月份对应于冬春季节,绵羊处于枯草期,饲草的适口性和营养水平降低,即产生被动性食欲抑制。这相当于家畜或其他动物饲养试验中的限饲。研究表明,限饲或禁食导致的饥饿刺激可降低瘦素分泌<sup>[29]</sup>,而且,相对于过饲导致瘦素水平提高,瘦素表达对饥饿刺激更为敏感<sup>[30]</sup>,可导致瘦素水平快速降低。本研究中, *Lep* 表达量 4 月龄(对应于 3 月份)后急剧下降,至 6 月龄(对应于 5 月份)时达最低,这一表达量的变化与上述 2 种食欲抑制密切相关。

季节性变化不仅包括营养条件的变化,还包括日照时长。在哺乳动物中,褪黑激素的分泌受日照长短影响。有研究表明,褪黑激素分泌增加可下调瘦素表达<sup>[31]</sup>,但 M. I. Alonso-Vale 等<sup>[32]</sup>发现,当胰岛素存在时,褪黑激素与瘦素水平呈正相关。本研究中 12~4 月份时为冬春季节,昼短夜长,褪黑激素分泌增多,6~10 月份时为夏秋季节,昼长夜短,褪

黑激素分泌减少。本研究结果中,12~4月份时瘦素表达处于高水平,6~10月份时处于低水平,与M. I. Alonso-Vale等的结果相符。同时也说明 *Lep* 基因夏秋季节的低表达和冬春季节的高表达与由日照引起的褪黑激素的分泌变化有关。

绵羊是季节性发情动物,其繁殖活动主要受光照周期的调控。不同绵羊品种的发情周期不同,广灵大尾羊一般为6~8月龄发情,小尾寒羊发情常在5~6月龄。B. Malpoux等<sup>[33]</sup>发现,光照周期通过褪黑激素来影响机体的生殖内分泌活动。本研究发现,瘦素表达与褪黑素的分泌相关,且呈季节性变化。因此,在瘦素表达中,品种和月龄的互作可能与不同品种发情周期有关,但其机理有待进一步研究。

### 3.2 关于 *LEPR* mRNA 的表达

瘦素受体是瘦素发挥生物学功能的重要媒介。由于 *LEPR* mRNA 剪接方式的不同,形成至少6种异构体的受体亚型 LepRa-f。LepRe 又称可溶性瘦素受体(Soluble leptin receptor, SLR),是瘦素受体的一种亚型。SLR能够结合血浆中的瘦素蛋白,调节血液循环中的 leptin 含量,并反映瘦素受体基因在组织中的表达<sup>[34]</sup>。N. Lahlou等<sup>[35]</sup>发现,SLR的表达水平与体重呈负相关。本研究中2和12月龄对应于1和11月份,为寒冷季节,绵羊体重降低,导致这些月龄期间 *LEPR* 表达量显著高于其他月龄。

激素分泌对瘦素受体的表达也有影响。J. L. Chan<sup>[36]</sup>等研究表明,性别是影响SLR水平的重要因素之一,睾酮可提高SLR的表达分泌。本文研究发现,公羊的 *LEPR* 表达量高于母羊,可能是由性激素分泌影响所致。

如 *Lep* 基因的多组织表达,*LEPR* 也表达于多种组织。A. Abavisani等<sup>[37]</sup>研究发现,*LEPR* mRNA 表达于绵羊的脂肪组织、肝脏、瘤胃和肺部。在人类脂肪细胞中 *LEPR* 基因也有表达<sup>[38]</sup>。本研究发现,*LEPR* 在所检测的各脂肪组织中均有表达,且存在极显著的组织表达差异。一般而言,瘦素受体与瘦素的表达水平呈负相关。在体内, *Lep* 和 *LEPR* 存在着反向调控机制。瘦素可下调 *LEPR* 基因的表达,这是肥胖症发生瘦素抵抗的机制之一<sup>[39]</sup>; *LEPR* 可直接或通过影响脂肪代谢产物间接调节 *Lep* 的表达<sup>[40]</sup>。本研究中,大网膜脂肪组织中 *LEPR* mRNA 表达量最高,腹膜后中最低,这与上述 *Lep* 的 mRNA 表达趋势相反,可能是由于瘦素和瘦素受体的反向调节机制所引起的。

品种与月龄间的互作对 *Lep* 和 *LEPR* 基因表达均有所影响。小尾寒羊较广灵大尾羊 *Lep* mRNA 在2月龄时的表达低,8和12月龄时的高表达导致该互作对瘦素基因的表达有所影响;小尾寒羊较广灵大尾羊 *LEPR* mRNA 在2、4、6月龄时的表达低,8、10、12月龄时的高表达导致该互作达极显著水平。这一结果到底是真实规律还是试验误差有待进一步研究。

## 4 结 论

*Lep* 及其受体 *LEPR* 基因在广灵大尾羊和小尾寒羊脂肪组织中的表达都具有时空差异性。这2个基因的表达均受性激素和季节变化的影响。尽管二者协同调节脂肪沉积和维持机体能量平衡,但是其表达存在反向调节。

## 参考文献:

- [1] HAVEL P J. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance[J]. *Proc Nutr Soc*, 2000, 59(3): 359-371.
- [2] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional Cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. *Nature*, 1994, 372(6505): 425-432.
- [3] PERUCATTI A, DI MEO G P, VALLINOTO M, et al. FISH-mapping of *LEP* and *SLC26A2* genes in sheep, goat and cattle R-banded chromosomes: comparison between bovine, ovine and caprine chromosome 4 (BTA4/OAR4/CHI4) and human chromosome 7 (HSA7)[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2006, 115(1): 7-9.
- [4] WANG F, LU L, YUAN H, et al. Molecular cloning, expression, and regulation of goose leptin receptor gene in adipocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 353(1-2): 267-274.
- [5] TARTAGLIA L A, DEMBSKI M, WENG X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R[J]. *Cell*, 1995, 83(7): 1263-1271.
- [6] OSWAL A, YEO G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in pathogenesis of obesity[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2010, 18(2): 221-229.
- [7] ZIEBA D A, SZCZESNA M, KLOCEK-GORKA B, et al. Leptin as a nutritional signal regulating appetite and reproductive processes in seasonally-breeding rumi-

- nants[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2008, 59(9): 7-18.
- [8] FEUEMANN Y, MABIEESH S J, SHAMAY A. Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in bovine mammary gland[J]. *J Dairy Sci*, 2004, 87(9): 2941-2946.
- [9] FEMADEZ-RIEIOS P, NAJIB S, SANTOS-ALVAREZ J, et al. Role of leptin in the activation of immune cells[J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 568343. doi:10.1155/2010/568343.
- [10] BADO A, LEVASSEUR S, ATTOUB S, et al. The stomach is a source of leptin[J]. *Nature*, 1998, 394(6695): 790-793.
- [11] CHICUREL M. Whatever happened to leptin? [J]. *Nature*, 2000, 404(6778): 538-540.
- [12] MASUZAKI H, OQAWA Y, ISSE N, et al. Human obese gene expression; adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue[J]. *Diabetes*, 1995, 44(7): 855-858.
- [13] 李 萌, 李庆章. 奶山羊乳腺中瘦素及其受体的表达与作用[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(12): 4187-4193.
- [14] WANG Y Y, WANG Y L, ZHU H S, et al. Leptin mRNA expression in the rat mammary gland at different activation stages[J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(4): 3657-3663.
- [15] 肖 欢, 崔亚利, 成玉宝. 瘦素受体在小尾寒羊神经内分泌和生殖器官的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(11): 1472-1477.
- [16] YONEKURA S, SENOO T, KOBAYASHI Y, et al. Effects of acetate and butyrate on the expression of leptin and short-form leptin receptor in bovine and rat anterior pituitary cells[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 133(2): 165-172.
- [17] SHIMIZU F, MATSUZAKI T, IWASA T, et al. Transition of leptin receptor expression during pubertal development in female rat pituitary [J]. *Endocrine*, 2008, 55(1): 191-198.
- [18] KOSIOR-KORZECKA U, BOBOWIEC R. Leptin effect on nitric oxide and GnRH-induced FSH secretion from ovine pituitary cells *in vitro* [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57(4): 637-647.
- [19] TSIPLAKOU E, CHADIO S, ZERVAS G. The effect of long term under-and over-feeding of sheep on milk and plasma fatty acid profiles and on insulin and leptin concentrations[J]. *J Dairy Res*, 2012, 79(2): 192-200.
- [20] RAMSAY T G. Porcine leptin alters insulin inhibition of lipolysis in porcine adipocytes *in vitro* [J]. *J Anim Sci*, 2001, 79(3): 653-657.
- [21] 陈赞谋, 戚晓鸿, 张 豪, 等. 蓝塘猪和长白猪 leptin 和 leptin 受体基因表达的变化[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(1): 67-70.
- [22] MUHLHAUSTER B S, DUFFIELD J A, MC-MILLEN I C. Increased maternal nutrition increases leptin expression in perirenal and subcutaneous adipose tissue in the postnatal lamb[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(12): 6157-6163.
- [23] ALTMANN M, SAUERWEIN H, VON BORELL E. Plasma leptin in growing lambs as a potential predictor for carcass composition and daily gain [J]. *Meat Sci*, 2006, 74(3): 600-604.
- [24] 郑丕留. 中国羊品种志 [M]. 上海: 科技出版社, 1988.
- [25] 吕效吾. 山西省家畜家禽品种志 [M]. 上海: 华东师范大学出版社, 1984.
- [26] MACHINAL Q F, DIEUDONNE M N, PECQUERY R, et al. Direct *in vitro* effect of androgens and estrogens on ob gene expression and leptin secretion in human adipose tissue [J]. *Endocrine*, 2002, 18(2): 179-184.
- [27] KIRSZ K, SZCZESNA M, MOLIŁK E, et al. Seasonal change in the interactions among leptin, ghrelin, and orexin in sheep [J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(8): 2524-2531.
- [28] FRIEDMAN J M. Leptin and the regulating body weight [J]. *Keio J Med*, 2011, 60(1): 1-9.
- [29] WEIQLE D S, DUELL P B, CONNOR W E, et al. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(2): 561-565.
- [30] CHIN-CHANCE C, POLONSKY K S, SCHOLLER D A. Twenty-four-hour leptin levels respond to cumulative short-term energy imbalance and predict subsequent intake [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(8): 2685-2691.
- [31] KUS I, SARSILMAZ M, COLAKOQLU N, et al. Pinealectomy increases and exogenous melatonin decreases leptin production in rat anterior pituitary cells: an immunohistochemical study [J]. *Physiol Res*, 2004, 53(4): 403-408.
- [32] ALONSO-VALE M I, ANDREOTTI S, PERES S B, et al. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(4): E805-812.
- [33] MALPAUX B, THIERY J C, CHEMINEAU P, et



- al. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin[J]. *Anim Reprod Res Prac*, 1996, 42: 109-117.
- [34] YANG G, GE H, BOUCHER A, et al. Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor [J]. *Mol Endocrinol*, 2004, 18(6): 1354-1362.
- [35] LAHLOU N, ISSAD T, LEBOUY Y, et al. Mutations in the human leptin and receptor genes as models of serum leptin receptor regulation[J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1980-1985.
- [36] CHAN J L, BLUHER S, YIANNAKOURIS N, et al. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans [J]. *Diabetes*, 2002, 51(7): 2105-2112.
- [37] ABAVISANI A, DEGHANI H, ZAHEDI M. Expression of functional leptin receptor (OB-Rb) mRNA in the sheep tissues[J]. *Res Opin Anim Vet Sci*, 2012, 2(7): 449-453.
- [38] BORNSTEIN S R, ABU-ASAB M, GLASOW A, et al. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture[J]. *Diabetes*, 2000, 49(4): 532-538.
- [39] LIU Z J, BIAN J, LIU J, et al. Obesity reduced the gene expression of leptin receptors in hypothalamus and liver[J]. *Horm Metab Res*, 2007, 39(7): 489-494.
- [40] ZHANG Y, HUFNAGEL C, EIDEN S, et al. Mechanisms for LEPR-mediated regulation of leptin expression in brown and white adipocytes in rat pups [J]. *Physiol Genomics*, 2001, 4(3): 189-199.

(编辑 郭云雁)