

# LEPR 及 LEP 基因表达量对 *FecB* 不同基因型小尾寒羊产羔数的影响

于嘉瑞<sup>1</sup>, 王翔宇<sup>2</sup>, 郭晓飞<sup>2</sup>, 贺小云<sup>2</sup>, 孙庆<sup>2</sup>, 文禹梁<sup>3</sup>,  
狄冉<sup>2</sup>, 刘秋月<sup>2</sup>, 胡文萍<sup>2</sup>, 张效生<sup>4</sup>, 张金龙<sup>4</sup>, 孙伟<sup>1\*</sup>, 储明星<sup>2\*</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部动物遗传育种与繁殖重点实验室, 北京 100193; 3. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070; 4. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300381)

**摘要:** 旨在探索瘦素受体(Leptin receptor, *LEPR*)和瘦素(Leptin, *LEP*)基因与绵羊产羔数之间的关系。选择2~3岁健康母羊21只,对*FecB*野生纯合型(++) (9只)及突变纯合型(BB) (12只)小尾寒羊同期发情,通过腹腔镜记录排卵数。使用实时荧光定量PCR技术检测*LEPR*和*LEP*基因在卵泡期小尾寒羊11种组织(心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、输卵管、子宫体、垂体、下丘脑、卵巢)中的表达以及在卵泡期和黄体期、BB型和++型小尾寒羊下丘脑-垂体-卵巢性腺轴的表达。结果表明, BB型的排卵数( $P=0.0035$ )和产羔数( $P=0.0040$ )极显著高于++型。*LEPR*和*LEP*在卵泡期各个组织均有表达;其中*LEPR*基因在卵巢、子宫体、肾上腺组织高表达,*LEP*基因在下丘脑、垂体、卵巢和肾组织高表达。在卵巢中,卵泡期++型*LEPR*基因表达量高于黄体期++型,但差异不显著( $P>0.05$ );卵泡期BB型*LEPR*基因表达量极显著高于卵泡期++型( $P=0.007$ )、黄体期BB型( $P=0.003$ )和黄体期++型( $P=0.003$ )。综上表明,卵泡期*LEPR*基因高表达与小尾寒羊产羔数增加存在一定程度的正相关,这为小尾寒羊产羔性状选育提高提供了新的线索。

**关键词:** 小尾寒羊; *FecB*; 产羔数; 瘦素基因; 瘦素受体基因

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)05-0954-08

## Effects of Expression of *LEPR* and *LEP* Genes on Litter Size of Small Tail Han Sheep with Different *FecB* Genotypes

YU Jia-rui<sup>1</sup>, WANG Xiang-yu<sup>2</sup>, GUO Xiao-fei<sup>2</sup>, HE Xiao-yun<sup>2</sup>, SUN Qing<sup>2</sup>,  
WEN Yu-liang<sup>3</sup>, DI Ran<sup>2</sup>, LIU Qiu-yue<sup>2</sup>, HU Wen-ping<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-sheng<sup>4</sup>,  
ZHANG Jin-long<sup>4</sup>, SUN Wei<sup>1\*</sup>, CHU Ming-xing<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;  
2. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;  
3. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;  
4. Tianjin Institute of Animal Sciences, Tianjin 300381, China)

收稿日期: 2017-12-04

**基金项目:** 国家自然科学基金(31772580); 国家转基因科技重大专项(2016ZX08009-003-006; 2016ZX08010-005-003); 国家肉羊产业技术体系专项(CARS-38); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2017JC24; 2017ywf-zd-13); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS13; CAAS-XTXC2016010-01-03; CAAS-XTXC2016010-03-03; CAAS-XTXC2016011-02-02); 宁夏农林科学院科技创新先导资金(DWJLC-2016001); 内蒙古自治区科技重大专项; 农业科研杰出人才及其创新团队项目; 国家万人计划科技创新领军人才项目; 天津市科技计划项目(16ZXZYNC00050)

**作者简介:** 于嘉瑞(1990-), 男, 宁夏银川人, 硕士生, 主要从事动物分子遗传学研究, E-mail: 15161889913@163.com; 王翔宇(1986-), 女, 安徽淮北人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物分子遗传学研究, E-mail: wangxiangyu@caas.cn。于嘉瑞和王翔宇为共同第一作者

\* **通信作者:** 孙伟, 博士, 教授, 主要从事肉羊遗传育种研究, Tel: 0514-87990705, E-mail: dkxmsunwei@163.com; 储明星, 博士, 研究员, 主要从事羊优异繁殖性状的分子机理研究, Tel: 010-62819850, E-mail: mxchu@263.net

**Abstract:** The aim of this study was to determine if the expression of leptin receptor (*LEPR*) and leptin (*LEP*) genes was associated with litter size of Small Tail Han ewes. Twenty one healthy Small Tail Han ewes, composed of 9 *FecB* wild type (++) and 12 *FecB* mutation homozygous type (BB), about 2-3 years old, were used to investigate the ovulation rate by laparoscopy after spontaneous estrus with CIDR. Real-time PCR was used to detect the expression of *LEPR* and *LEP* genes in 11 tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney, adrenal gland, fallopian tube, uterus, hypothalamus, pituitary and ovary) of Small Tail Han ewes during follicular phase and in hypothalamus-pituitary-ovary gonadal axis of Small Tail Han ewes (++ and BB genotypes) during luteal phase and follicular phase. The results showed that both ovulation number ( $P=0.0035$ ) and litter size ( $P=0.0040$ ) of individuals with BB genotype were significantly higher than that of individuals with ++ genotype. These 2 genes were all expressed in 11 tissues during follicular phase, the expression of *LEPR* gene was high in ovary, uterus and adrenal gland, and the expression of *LEP* gene was high in hypothalamus, pituitary, ovary and kidney. In ovary, the expression of *LEPR* gene of individuals with ++ genotype during follicular phase was higher ( $P>0.05$ ) than that during luteal phase. The *LEPR* expression of individuals with BB genotype during follicular phase was significantly higher than that of individuals with ++ genotype during follicular phase ( $P=0.007$ ), BB genotype during luteal phase ( $P=0.003$ ) and ++ genotype during luteal phase ( $P=0.003$ ). Therefore, we concluded that there was a positive correlation between the high expression of *LEPR* gene during follicular phase and high litter size in Small Tail Han ewes, which provided a new clue for improving litter size in Small Tail Han sheep.

**Key words:** Small Tail Han sheep; *FecB*; litter size; *LEP*; *LEPR*

中国除小尾寒羊和湖羊等少数绵羊品种产多羔外,其余绝大部分绵羊品种均产单羔,这极大地制约了养羊业的发展。绵羊产羔数是由多个基因控制的复杂性状,且遗传力较低,通过传统表型选择很难获得较大遗传进展。因此,对影响绵羊产羔数相关基因进行研究,对于提高绵羊繁殖效率、加快绵羊育种进程、提高绵羊产业的经济效益均非常重要。*FecB* 基因是最早定位的控制绵羊产羔数的主效基因。20世纪80年代初期, G. H. Davis 等<sup>[1]</sup>和 L. R. Piper 等<sup>[2]</sup>在对 Booroola 羊高繁殖力研究时发现,一个常染色体的突变位点显著影响绵羊排卵数。1989年,该突变基因被绵、山羊遗传命名委员会正式命名为 *FecB* 基因。2001年,3个研究团队发现绵羊 *FecB* 的影响是由于骨形态发生蛋白受体 1B (Bone morphogenetic protein receptor-1B, BMPR1B) 基因编码区发生了 A746G 突变,从而引起第 249 位氨基酸由谷氨酰胺变为精氨酸 (Q249R)。*FecB* 基因存在 3 种基因型,其中 BB 型羊产羔数 > B+ 型 > ++ 型, BB 型为突变型, ++ 型为野生型<sup>[3-5]</sup>。随着对产羔性状研究的逐渐深入,多个控制绵羊产羔数的主效基因被陆续发现。*GDF9*、*BMP15* 等 TGFB 超家

族通路中的基因也是增加绵羊产羔数的主效基因<sup>[6]</sup>。对罗姆尼羊 Davisdale 品系的研究中发现, *LEPR* 突变除了可以提早该品系羊的初情期,还影响绵羊的排卵数<sup>[7-9]</sup>,然而 *LEPR* 基因不是 TGFB 超家族通路中的成员。因此,该基因对排卵数的调控方式可能与以上影响排卵数的主效基因调控方式不同。

A. M. Ingalls 等<sup>[10]</sup>通过研究一种近交繁殖的小鼠,发现其中一个基因的隐性突变可导致小鼠的肥胖,于是将该基因定名为肥胖基因 (Obese, ob)。G. C. Kennedy<sup>[11]</sup>发现脂肪组织分泌某种调节体重的激素,称为“饱感因子”。它通过下丘脑调控中枢,调节机体摄食及能量消耗,保持体重相对平衡。直到 1994 年, Y. Y. Zhang 等<sup>[12]</sup>利用基因定位克隆技术成功克隆小鼠的 ob 基因,将其编码蛋白定名为瘦素 (Leptin),之后就将 ob 基因表示为 *LEP*。在 20 世纪 90 年代末期, K. P. Hummel 等<sup>[13]</sup>发现,在患有糖尿病的近交系小鼠中,鉴定了另外一个隐性肥胖突变基因 (Diabetes, db),表型与 (ob/ob) 小鼠相似。随后, L. A. Tartaglia 等<sup>[14]</sup>证明, db 基因是 *LEP* 的受体,并从小鼠脉络丛中成功克隆 *LEPR*。

在哺乳动物中, *LEPR* 和 *LEP* 协同作用的 leptin 信号通路是维持机体能量平衡的关键因素。*LEP* 作用于下丘脑的 *LEPR*, 提高交感神经的活性, 使去甲肾上腺素的释放增加, 进而激活脂肪细胞膜上的  $\beta$ -3 受体, 使脂肪细胞内解偶联蛋白的表达增加, 于是能量转化成热能而释放<sup>[15]</sup>。瘦素促进能量消耗的作用是通过提高促甲状腺素的分泌而实现的<sup>[16]</sup>。

*LEPR* 以及 *LEP* 影响机体神经内分泌功能, 促进生殖系统功能和获得并维持生殖能力<sup>[17]</sup>。在动物机体中, 促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 由下丘脑分泌, 刺激或抑制垂体促性腺激素的分泌。尽管在下丘脑促性腺激素释放激素神经元尚未发现有 *LEPR* 表达, 但是 *LEP* 可能通过通路刺激大鼠和猪的下丘脑进而释放 GnRH<sup>[18]</sup>。缺少功能性瘦素受体以及瘦素基因的小鼠不育并且发现生殖器官萎缩, 经过体外注射瘦素治疗, 从而刺激 GnRH, 进一步刺激促卵泡素 (FSH)、促黄体生成素 (LH) 和雌激素的释放, 不仅能够恢复小鼠的生殖系统, 还能促进萎缩的生殖器得到生长<sup>[19-21]</sup>。

瘦素及瘦素受体对卵泡发育及卵母细胞成熟有重要作用。在 mice 中, *LEPR* 和 *LEP* 中任何一个基因的突变都可能造成 leptin 信号通路的失活, 出现繁殖性能的下降, 瘦素受体突变的小鼠卵巢在繁殖周期没有成熟卵泡产生<sup>[22]</sup>。在 mice 的卵泡细胞和卵母细胞中均有瘦素受体的表达, 且从初级卵泡~成熟卵泡这一生理过程中, *LEPR* 的表达量呈现上升的趋势, 说明瘦素受体可能在卵泡发育过程中起到了较为重要的作用<sup>[23]</sup>。经过瘦素受体及瘦素处理的雌性大鼠, 其卵巢功能的活性增强, 伴随着大量卵泡发育<sup>[24]</sup>。

绵羊产羔数是一个复杂性状, 在同一品种的高产绵羊中, 可能会存在多个主效基因同时控制产羔数<sup>[25]</sup>。法国的 Lacaune 绵羊中有两个主效基因 *BMP15* 和 *FecL* 同时控制产羔数<sup>[26]</sup>。小尾寒羊是中国著名的高繁殖力绵羊品种, *FecB* 突变等位基因 B 在小尾寒羊中频率较高, 且与小尾寒羊的高产羔数相关联<sup>[27]</sup>。小尾寒羊产羔数可能也受到除了 *FecB* 外其它基因的影响。本研究选取 *FecB* 野生型纯合子和突变型纯合子的小尾寒羊为研究对象, 分别采集卵泡期的不同组织以及卵泡期和黄体期的下丘脑、垂体、卵巢 3 个性腺轴组织, 采用实时荧光

定量 PCR 方法检测 *LEPR* 和 *LEP* 在各组织中以及不同时期性腺轴的表达特征, 初步分析 *FecB* 突变后 *LEPR* 和 *LEP* 对小尾寒羊排卵数的影响, 为进一步揭示小尾寒羊多羔的分子机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

选择山东省郓城县 2~3 岁健康小尾寒羊母羊 21 只, 统计其当年的产羔数数据。然后在天津市畜牧兽医研究所种羊场饲养, 采用 TaqMan 法进行多羔主效基因 *FecB* 分型, 其中 BB 型 12 只、++ 型 9 只。由于需要获得小尾寒羊发情期的排卵数据, 并采集黄体期和卵泡期多个组织样品, 所以对试验羊进行两次同期发情。第 1 次同期发情时, 对空怀小尾寒羊放置阴道孕酮栓 (CIDR), 同时注 5 mL 维生素 AD 用以保护小尾寒羊母羊阴道内膜。12 d 后撤栓, 撤栓当天记 1 d, 撤栓时刻记为 0 h。撤栓后第 7 天使用腹腔镜观察排卵情况, 并记录排卵数。间隔 14 d 后, 对羊群进行第 2 次同期发情, 试验方法与第 1 次同期发情相同, 并在撤栓后 45 h (卵泡期) 和 10 d (黄体期) 屠宰, 每组各 3 只 ( $n=3$ )。屠宰后, 立即取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、输卵管、子宫体、垂体、下丘脑、卵巢 11 个组织样品, 用冻存管保存后迅速投入液氮速冻, 带回实验室,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 组织总 RNA 的提取和检测及 cDNA 第一链的合成

采用 Trizol (Invitrogen, USA) 和动物组织总 RNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 提取各组织总 RNA, 并用 Nanodrop2000 微量分光光度计 (Nano Drop Technologies, USA) 检测提取 RNA 浓度, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 利用凝胶成像系统 (ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD, USA) 检测 RNA 完整性。

利用反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Reagent Kit, TaKaRa, Japan) 反转录合成 cDNA, 反转录体系为 20  $\mu\text{L}$ : PrimeScript RT Enzyme Mix 1.0  $\mu\text{L}$ , Oligo dT Primer 1.0  $\mu\text{L}$ , Random 6 mers 1.0  $\mu\text{L}$ , 5 $\times$  PrimeScript Buffer (for Real Time) 4.0  $\mu\text{L}$ , RNA 1.0  $\mu\text{L}$ , 再用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 将总体积补至 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 获得 cDNA 第一链。全程操作在冰上进行。将反转录产物进行 5 倍稀释, 用持家基因 *ACTB* 进行 PCR 检测。将符合标准的 cDNA 置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存, 以用于检测目的基因的表达。

### 1.3 荧光定量引物设计及目的基因表达量检测

根据绵羊 *LEPR* 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM\_001009763.1) 信息, 用 Primer3.0 在线软件 ([http://bioinfo. ut. ee/primer3-0. 4. 0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)) 设计引物, 以核糖体蛋白 L19 基因 (Ribosomal protein L19, RPL19) (其 mRNA 序列 GenBank 登录号: XM\_004012836.2) 作为内参基因; 对于绵羊 *LEP* 基因 (GenBank 登录号: XM\_004008038.3), 由于其只有 3 个外显子, 并且 3 个外显子之间的距离较长, 因此未能成功设计出用于 SYBR Green 定量 PCR 跨外显子引物, 且不进行其表达量与 *LEPR* 基因比较, 所以 *LEP* 基因用了 TaqMan 探针法进行相对定量。利用 TaqMan 探针法并由泰兴市宏润吉康

生物科技研究所合成 TaqMan 探针, 配合此方法以绵羊肌动蛋白  $\beta$  基因 (Actin beta, ACTB) (其 mRNA 序列 GenBank 登录号: NM\_001009784) 作为内参基因。引物序列和产物大小以及用途见表 1。 *LEPR* 采用 SYBR Green 染色法, 严格按照 TaKaRa 荧光定量染料 (SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, TaKaRa, Japan) 使用说明进行操作; *LEP* 采用 TaqMan 探针法, 按照 Roche (LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master, Roche, USA) 试剂使用说明书进行试验。 *LEPR* 及 *LEP* 按照 Roche LightCycler<sup>®</sup> 480II 荧光定量 PCR 仪使用说明书 (Roche Light Cycler<sup>®</sup> 480 II real-time PCR system, Roche, USA) 进行荧光定量分析。

表 1 绵羊 4 个基因的引物序列和产物大小

Table 1 Primer sequence and product size of ovine 4 genes

用途 Usage	基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Product size
SYBR Green 染料法 SYBR Green dyeing method	<i>LEPR</i>	F: CGAAGGATGAGCGACGAG R: GACTGGAGGAAGCGCGTC	118
内参基因 Reference gene	<i>RPL19</i>	F: AATGCCAATGCCAACTC R: CCCTTTCGCTACCTATACC	151
TaqMan 探针法 TaqMan probe method	<i>LEP</i>	F: CCTTCAGGGAGACCTTGAAA R: AGCTGCGAGCCTGTGGTT P(探针): FAM-CCCATGGAGAATCCTA-MGB	85
内参基因 Reference gene	<i>ACTB</i>	F: GACCCAGATCATGTTTGAGACCTT R: TCACCGGAGTCCATCACGAT P(探针): FAM-ACGTGGCCATCCAG-MGB	114

1.3.1 TaqMan 探针法 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中 LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , MGB 探针 0.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板浓度 200  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  2.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 5.9  $\mu\text{L}$ 。反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 10 s, 40 个循环; 熔解曲线获取 10 min, 降温结束。

1.3.2 SYBR Green 法 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中 SYBR Premix Ex Taq II 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板浓度 200  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  2.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu\text{L}$ 。PCR 程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环; 熔解曲线获取 10 min, 降温结束。

### 1.4 数据分析

数据用“平均数±标准误”表示。对产羔数和排卵数进行不同基因型间 *t* 检验。对基因的表达量数据采用 Excel (Microsoft Excel, USA) 进行分析, 利

用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因相对表达量<sup>[28]</sup>, 使用 SPSS Statistics 24 (IBM, USA) 软件按照下述模型进行分析。

$$y_{ij} = \mu + G_i + T_j + e_{ij}$$

其中,  $y$  为表达量;  $\mu$  为平均数;  $G$  为基因型 (BB 型、++ 型) 效应,  $i=1, 2$ ;  $T$  为卵巢的不同时期 (卵泡期、黄体期) 效应,  $j=1, 2$ ;  $e$  为随机残差效应。

## 2 结果

### 2.1 不同 *FecB* 基因型小尾寒羊的排卵数和产羔数

对 21 只小尾寒羊进行同期发情, 利用腹腔镜观察黄体, 获得不同 *FecB* 基因型小尾寒羊的排卵数, 如表 2 所示。对 ++ 型 9 只小尾寒羊、BB 型 12 只小尾寒羊的排卵数和产羔数进行 *t* 检验, 发现 BB 型小尾寒羊的排卵数 ( $P=0.0035$ ) 和产羔数 ( $P=0.0040$ ) 均极显著高于 ++ 型。

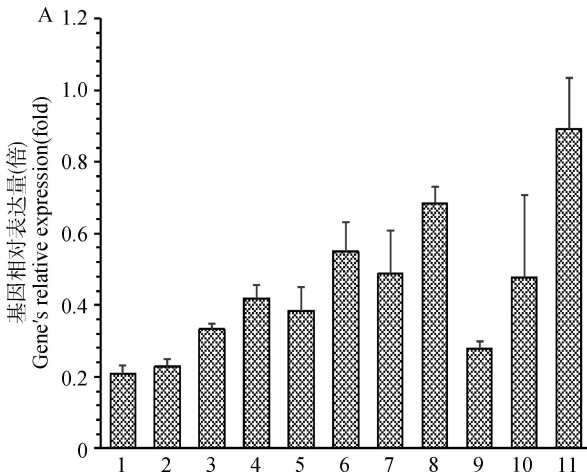
表 2 不同 *FecB* 基因型小尾寒羊排卵数和产羔数Table 2 Ovulation number and litter size of Small Tail Han ewes with different *FecB* genotypes

<i>FecB</i> 基因型	个体数	排卵数	产羔数
<i>FecB</i> genotype	Number	Ovulation No.	Litter size
++	9	1.67±0.707 <sup>B</sup>	1.04±0.14 <sup>B</sup>
BB	12	4.15±1.144 <sup>A</sup>	2.89±0.73 <sup>A</sup>

同列上标不同大写字母表示组间差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 字母相同或未标注字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。下同  
Different superscripts capital letters in the same column mean highly significant difference between groups ( $P < 0.01$ ) the same letter or without letter mean no significant difference between groups ( $P > 0.05$ ). The same as below

## 2.2 实时定量 PCR 的熔解曲线以及标准曲线

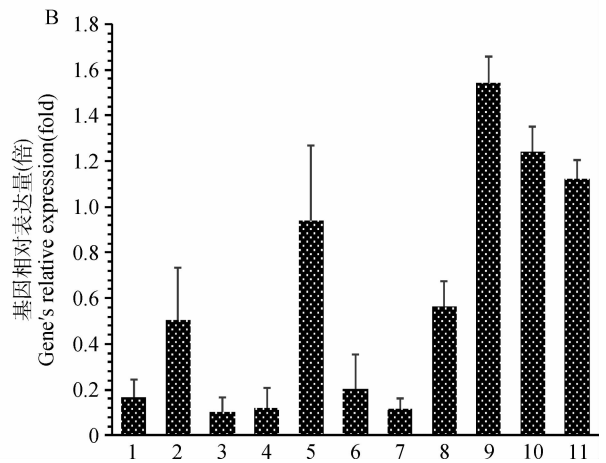
本研究以 *RPL19* 和 *ACTB* 为内参基因, *LEPR* 和 *LEP* 为目的基因, 各样品的模板在反应



后可获得 *LEPR*、*LEP*、*RPL19*、*ACTB* 的标准曲线 (图略), 适用于  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算, 并得到单峰, 且峰型锐利的熔解曲线 (图略), 说明引物特异性良好, 符合荧光定量 PCR 数据分析的要求。

## 2.3 *LEPR* 和 *LEP* 基因在卵泡期 BB 型小尾寒羊不同组织之间的表达模式

采用实时定量 PCR 检测了 *LEPR* 和 *LEP* 在 BB 型小尾寒羊卵泡期各个组织中的表达量, 对两个基因在不同组织中表达量分布只进行了定性描述, 而未进行显著性检验, 结果如图 1 所示。 *LEPR* 在 BB 型小尾寒羊各个组织中均有表达, 其中在下丘脑、心、肝中表达量较低, 在卵巢、子宫体中表达量较高。 *LEP* 在小尾寒羊各个组织中也均有表达, 其中在心、脾、肺、输卵管、肾上腺中表达量较低, 在下丘脑、垂体、卵巢性腺轴中表达量较高。



1~11. 心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、输卵管、子宫体、下丘脑、垂体和卵巢

1-11. Heart, liver, spleen, lung, kidney, adrenal gland, fallopian tube, uterus, hypothalamus, pituitary and ovary

图 1 *LEPR*(A) 和 *LEP*(B) 在 BB 型小尾寒羊卵泡期各个组织中的表达Fig. 1 Relative expression of *LEPR*(A) and *LEP*(B) genes in various tissues of Small Tail Han sheep with BB genotype in follicular phase

## 2.4 *LEPR* 和 *LEP* 在小尾寒羊不同情期和 *FecB* 不同基因型中性腺轴的表达量

本试验对不同情期 (卵泡期和黄体期)、不同 *FecB* 基因型 (BB 型和 ++ 型) 小尾寒羊的下丘脑-垂体-卵巢性腺轴组织进行了定量分析, 结果如表 3 所示。 *LEP* 在不同情期、不同基因型的下丘脑、垂体、卵巢组织的表达都没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。 *LEPR* 在不同情期、不同基因型的下丘脑和垂体组织中的表达都没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。在卵巢中, 卵泡期 ++ 型 *LEPR* 基因表达量高于黄体期

++ 型, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 卵泡期 BB 型 *LEPR* 基因表达量极显著高于卵泡期 ++ 型 ( $P = 0.007$ )、黄体期 BB 型 ( $P = 0.003$ ) 和黄体期 ++ 型 ( $P = 0.003$ )。

## 3 讨论

本试验使用实时荧光定量 PCR 技术检测了 *LEPR* 及 *LEP* 基因在卵泡期小尾寒羊 11 个组织中的表达, 分析发现, *LEPR* 及 *LEP* 的表达具有广泛性, 但存在组织差异。其中 *LEP* 在下丘脑、垂

表 3 *LEP* 和 *LEPR* 在小尾寒羊下丘脑、垂体、卵巢中的表达量Table 3 Expression of *LEP* and *LEPR* genes in hypothalamus, pituitary, ovary of Small Tail Han sheep

时期 Period	<i>FecB</i>		<i>LEP</i>			<i>LEPR</i>		
	基因型 <i>FecB</i> genotype	个体数 Number	下丘脑 Hypothalamus	垂体 Pituitary	卵巢 Ovary	下丘脑 Hypothalamus	垂体 Pituitary	卵巢 Ovary
	卵泡期 Follicular phase	BB	3	1.05±0.37	1.35±0.85	1.10±0.28	0.88±0.22	0.69±0.07
黄体期 Luteal phase	++	3	1.24±0.06	1.12±0.52	1.24±0.64	0.66±0.08	0.50±0.06	0.80±0.41 <sup>B</sup>
	BB	3	1.07±0.23	1.33±0.47	0.90±0.42	1.13±0.68	0.59±0.24	0.55±0.07 <sup>B</sup>
	++	3	0.88±0.30	1.26±0.02	0.95±0.48	0.71±0.07	0.31±0.20	0.60±0.50 <sup>B</sup>

体、卵巢呈现出极高的表达水平,而在心、脾、肺等组织中呈现较低的表达水平。刘宝凤<sup>[29]</sup>研究发现, *LEPR* 与 *LEP* 的表达水平呈负相关, *LEP* 和 *LEPR* 存在着反向调控机制。所以也解释了在本试验中,当小尾寒羊处于同一情期时, *LEP* 在肾上腺、输卵管、子宫体组织中的表达较低,而 *LEPR* 在肾上腺、输卵管、子宫体表达相对较高。下丘脑、垂体、卵巢组织中 *LEP* 和 *LEPR* 也存在着反向调控。在猪中实时荧光定量 PCR 结果显示, *LEPR* 在猪的 22 个组织中均有表达,并且相对丰度存在显著差异 ( $P < 0.05$ )<sup>[30]</sup>。在这些组织中,子宫内膜附着部位的表达量相对丰度最大 ( $P < 0.01$ ),其次是下丘脑和大部分生殖组织 ( $P < 0.05$ ),垂体组织 *LEPR* 的表达相对丰度较低,本试验结果与其相符。卢守亮等<sup>[31]</sup>检测了 *LEPR* 在中国美利奴和多浪羊的下丘脑、卵巢、子宫性腺轴组织中的表达,发现 *LEPR* 在卵巢、子宫体、输卵管组织中都有较高的表达。有研究表明, *LEPR* 在贵州白山羊广谱表达,繁殖系统表达较高<sup>[32]</sup>。本试验结果同样与其相符。在牛<sup>[33]</sup>、小鼠<sup>[34]</sup>中, *LEPR* 在卵巢、子宫等繁殖相关组织中表达并影响牛、小鼠的繁殖性状。

本试验对不同情期(卵泡期和黄体期)、不同 *FecB* 基因型(BB 型和 ++ 型)小尾寒羊的下丘脑-垂体-卵巢性腺轴组织进行了定量分析。结果显示, *LEPR* 和 *LEP* 在下丘脑和垂体的表达在不同情期(卵泡期和黄体期)和不同 *FecB* 基因型之间都没有显著差异,推测 *LEPR* 及 *LEP* 发挥主要作用的组织不是下丘脑和垂体。但在卵巢中,两种基因型卵泡期 *LEPR* 和 *LEP* 表达量都高于黄体期,卵泡期 BB 型 *LEPR* 表达量均极显著高于卵泡期 ++ 型、黄体期 BB 型、黄体期 ++ 型。肥胖雌性小鼠经 *LEP* 治疗后其卵巢重量增加,卵巢上的原始卵泡、初级卵母细胞、次级卵泡、成熟卵泡数目明显增加,

并观察到卵巢的纵切面上总的卵泡数增加,提示 *LEP* 及 *LEPR* 在一定程度上提高了卵巢的生理功能<sup>[35]</sup>。邓艳幔等<sup>[23]</sup>发现,在小鼠中,卵巢间质有 *LEPR* 蛋白表达,揭示 *LEP* 与 *LEPR* 结合,通过 JAK-STAT 通路对卵泡发育和成熟产生积极作用。N. Smolinska 等<sup>[36]</sup>通过原位杂交和半定量 PCR 研究显示,在猪的黄体期和卵巢中均有 *LEPR* 的表达,卵泡期的 *LEPR* 和其蛋白质的表达增加,伴随着黄体的退化而降低。有研究表明<sup>[37]</sup>, *LEPR* 通过直接作用于卵巢和间接作用于中枢神经系统而参与对女性生殖功能的控制。在卵泡期对母羊禁食,导致 *LEPR* 浓度降低,也导致排卵率降低<sup>[38]</sup>。综上所述, *LEPR* 基因在卵巢上发挥了重要的生理功能。

## 4 结 论

小尾寒羊 BB 型的排卵数和产羔数都极显著高于 ++ 型。 *LEPR* 基因在卵泡期小尾寒羊卵巢中表达量最高。卵泡期 BB 型小尾寒羊卵巢中 *LEPR* 表达量均极显著高于卵泡期 ++ 型、黄体期 BB 型、黄体期 ++ 型。本研究结果表明,卵泡期 *LEPR* 基因高表达与小尾寒羊产羔数增加存在一定程度的正相关,为小尾寒羊产羔性状选育提供了新的线索。

## 参考文献 (References):

- [1] DAVIS G H, MONTGOMERY G W, ALLISON A J, et al. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep[J]. *N Z J Agric Res*, 1982, 25(4): 525-529.
- [2] PIPER L R, BINDON B M. The Booroola Merino and the performance of medium Non-Peppin crosses at Armidale[J]. *Wool Technol Sheep Breed*, 1983, 31(1): 14-19, 33.
- [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]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(9): 5104-5111.
- [4] SOUZA C J, MACDOUGALL C, CAMPBELL C, et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene[J]. *J Endocrinol*, 2001, 169(2): R1-R6.
- [5] WILSON T, WU X Y, JUENGEL 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]. *Biol Reprod*, 2001, 64(4):1225-1235.
- [6] JUENGEL J L, DAVIS G H, MCNATTY K P. Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function[J]. *Reproduction*, 2013, 146(4):R111-R123.
- [7] JUENGEL J L, O'CONNELL A R, FRENCH M C, et al. Identification of a line of sheep carrying a putative autosomal gene increasing ovulation rate in sheep that does not appear to interact with mutations in the transforming growth factor beta superfamily[J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(1):113-120.
- [8] HALDAR A, FRENCH M C, BRAUNING R, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the *LEPR* gene are associated with divergent phenotypes for age at onset of puberty in Davisdale ewes[J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(2):33.
- [9] JUENGEL J L, FRENCH M C, O'CONNELL A R, et al. Mutations in the leptin receptor gene associated with delayed onset of puberty are also associated with decreased ovulation and lambing rates in prolific Davisdale sheep[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2016, 28(9): 1318-1325.
- [10] INGALLS A M, DICKIE M M, SNELL G D. OBESE, a new mutation in the house mouse[J]. *Obes Res*, 1996, 4(1):101.
- [11] KENNEDY G C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat[J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1953, 140(901):578-592.
- [12] ZHANG Y 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.
- [13] HUMMEL K P, DICKIE M M, COLEMAN D L. Diabetes, a new mutation in the mouse[J]. *Science*, 1966, 153(3740):1127-1128.
- [14] 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.
- [15] COLLINS S, KUHN C M, PETRO A E, et al. Role of leptin in fat regulation[J]. *Nature*, 1996, 380(6576): 677.
- [16] FAROOQI I S, O'RAHILLY S. Leptin: A pivotal regulator of human energy homeostasis[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89(3):980S-984S.
- [17] LEBRETHON M C, VANDERSMISSEN E, GEÉRARD A, et al. *In vitro* stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(4): 1464-1469.
- [18] ZIEBA D A, AMSTALDEN M, WILLIAMS G L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2005, 29(1):166-185.
- [19] CHEHAB F F, LIM M E, LU R H. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin[J]. *Nat Genet*, 1996, 12(3):318-320.
- [20] SWERDLOFF R S, PETERSON M, VERA A, et al. The hypothalamic-pituitary axis in genetically obese (ob/ob) mice: Response to luteinizing hormone-releasing hormone [J]. *Endocrinology*, 1978, 103(2): 542-547.
- [21] SWERDLOFF R S, BATT R A, BRAY G A. Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse [J]. *Endocrinology*, 1976, 98(6): 1359-1364.
- [22] DONATO J Jr, CRAVO R M, FRAZÃO R, et al. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction[J]. *Neuroendocrinology*, 2011, 93(1):9-18.
- [23] 邓艳幔, 崔亚利, 胡 满, 等. 瘦素及其长型瘦素受体在雌性小鼠体内的表达[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(3):414-418.
- DENG Y M, CUI Y L, HU M, et al. Expression of leptin and long-leptin receptor in the female mouse [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(3):414-418. (in Chinese)
- [24] 张 谊. 瘦素与哺乳动物繁殖活动关系的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(7):1836-1841.
- ZHANG Y. Research advance on the relationship be-

- tween leptin and reproduction activities of mammal [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42(7): 1836-1841. (in Chinese)
- [25] MCNATTY K P, HEATH D A, CLARK Z, et al. Ovarian characteristics in sheep with multiple fecundity genes[J]. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2017, 153(2): 233-240.
- [26] DROUILHET L, MANSANET C, SARRY J, et al. The highly prolific phenotype of Lacaune sheep is associated with an ectopic expression of the *B4GALNT2* gene within the ovary[J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003809.
- [27] CHU M X, LIU Z H, JIAO C L, et al. Mutations in *BMPR-1B* and *BMP-15* genes are associated with litter size in Small Tailed Han sheep (*Ovis aries*) [J]. *J Anim Sci*, 2007, 85(3): 598-603.
- [28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- [29] 刘宝凤. 绵羊瘦素及其受体基因多态性、mRNA 表达及其与性状的关联研究 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2013.
- LIU B F. Study on the polymorphism, mRNA expression of leptin and its receptor genes and their association with traits in sheep [D]. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [30] FU Y F, LI L, LI B X, et al. Long form leptin receptor and SNP effect on reproductive traits during embryo attachment in Suzhong sows [J]. *Anim Reprod Sci*, 2016, 168: 57-65.
- [31] 卢守亮, 李良远, 高磊, 等. 不同品种绵羊发情周期 *LEPRb* mRNA 表达分析 [J]. *生物技术通报*, 2017, 33(5): 139-144.
- LU S L, LI L L, GAO L, et al. The expression of *LEPRb* mRNA in the estrus cycle of different sheep strains [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(5): 139-144. (in Chinese)
- [32] 肖旭东, 杜典策, 王峰, 等. *LEPR* 基因在贵州白山羊组织中的表达 [J]. *山地农业生物学报*, 2017, 36(1): 36-39.
- XIAO X D, DU D C, WANG F, et al. Expression of *LEPR* gene in the tissues of Guizhou white goat [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2017, 36(1): 36-39. (in Chinese)
- [33] SARKAR M, SCHILFFARTH S, SCHAMS D, et al. The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary [J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(2): 174-181.
- [34] TU X Y, KUANG Z C, GONG X, et al. The influence of LepR tyrosine site mutations on mouse ovary development and related gene expression changes [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0141800.
- [35] KLEIN K O, MARTHA P M Jr, BLIZZARD R M, et al. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. II. Estrogen levels as determined by an ultrasensitive bioassay [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81 (9): 3203-3207.
- [36] SMOLINSKA N, KAMINSKI T, SIAWRYS G, et al. Long form of leptin receptor gene and protein expression in the porcine ovary during the estrous cycle and early pregnancy [J]. *Reprod Biol*, 2007, 7(7): 17-39.
- [37] CATTEAU A, CAILLON H, BARRIÈRE P, et al. Leptin and its potential interest in assisted reproduction cycles [J]. *Hum Reprod Update*, 2016, 22 (3): 320-341.
- [38] 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.

(编辑 程金华)