

绵羊繁殖轴相关组织 *TPH1* 和 *TPH2* 基因表达分析及 *TPH2* 基因多态性与产羔数的关系

李华振^{1,2} 狄冉¹ 郭晓飞³ 张金龙³ 张效生³ 马琳¹ 刘武军^{2*} 储明星^{1*}

(1. 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;

2. 新疆农业大学 动物科学学院,乌鲁木齐 830052;

3. 天津市畜牧兽医研究所,天津 300381)

摘要 为探讨 *TPH1* 和 *TPH2* 基因在绵羊不同繁殖状态下的表达差异及 *TPH2* 基因多态性与小尾寒羊产羔数的关系,利用实时荧光定量 PCR 技术检测该 2 个基因在不同繁殖状态下成年苏尼特羊(短光照 3 只,长光照 3 只)和小尾寒羊(卵泡期 3 只,黄体期 3 只)的大脑、小脑、下丘脑、松果体、垂体、卵巢、输卵管、子宫、肾脏和肾上腺等 10 种组织中的相对表达量;同时采用 Sequenom MassARRAY® SNP 技术检测 *TPH2* 基因单核苷酸多态位点 SNP 在常年发情绵羊品种(小尾寒羊、湖羊和策勒黑羊)和季节性发情绵羊品种(滩羊、苏尼特羊和草原型藏羊)的多态性,并将基因多态性与小尾寒羊产羔数进行关联分析。结果表明:该 2 个基因在 2 个绵羊品种各组织广泛表达,*TPH1* 基因在苏尼特羊下丘脑和松果体中短光照表达量极显著高于长光照($P < 0.01$),在苏尼特羊垂体中短光照表达量显著高于长光照($P < 0.05$),在小尾寒羊垂体和卵巢中卵泡期显著低于黄体期($P < 0.05$);*TPH2* 基因在苏尼特羊卵巢组织长光照下的表达量显著高于短光照($P < 0.05$),*TPH2* 基因在小尾寒羊下丘脑组织中卵泡期的表达量极显著高于黄体期($P < 0.01$)。小尾寒羊中 *TPH2* 基因 g.107854166C>T 和 g.1078541669C>T 2 个 SNP 位点关联分析表明,该 2 个位点与季节性发情性状和小尾寒羊第 1、2 以及第 3 胎产羔数均无显著关联($P > 0.05$)。综上,*TPH1* 和 *TPH2* 基因在苏尼特羊绵羊下丘脑和松果体中呈季节性光照节律差异表达,暗示其可能参与季节性发情上游基因的调控,而 *TPH2* 基因可能参与调控小尾寒羊下丘脑中激素分泌和卵巢发育,但 g.107854166C>T 和 g.1078541669C>T 不是调控季节性发情和小尾寒羊产羔数的关键位点。

关键词 绵羊; *TPH* 基因; 性腺轴; 季节性繁殖; 基因表达

中图分类号 S826.9

文章编号 1007-4333(2019)03-0036-09

文献标志码 A

Expression analysis of *TPH1* and *TPH2* genes in sheep reproductive axis and the association between *TPH2* gene polymorphism and litter size

LI Huazhen^{1,2}, DI Ran¹, GUO Xiaofei³, ZHANG Jinlong³, ZHANG Xiaosheng³,
MA Lin¹, LIU Wujun^{2*}, CHU Mingxing^{1*}

(1. Institute of Animal Science/Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

3. Tianjin Institute of Animal Sciences, Tianjin 300381, China)

收稿日期: 2019-08-20

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(ASTIP-IAS13, CAAS-XTX2016010-01-03, CAAS-XTX2016010-03-03, CAAS-XTX2016011-02-02); 农业科技杰出人才及其创新团队项目(农办人[2015]62号); 国家万人计划科技创新领军人才项目(W02020274); 天津市农业科技成果转化与推广项目(201704020)

第一作者: 李华振, 硕士研究生, E-mail: 1078728382@qq.com

通讯作者: 储明星, 研究员, 博士生导师, 主要从事绵羊分子育种研究, E-mail: mxchu@263.net

刘武军, 教授, 博士生导师, 主要从事分子遗传学与反刍动物生产研究, E-mail: lwj_ws@sohu.com

Abstract In order to investigate the expression patterns of *TPH1* and *TPH2* genes in different reproductive states of sheep and the relationship between *TPH2* gene polymorphism and litter size, real-time quantitative PCR was used to detect their relative expression levels in 10 types of tissues including brain, cerebellum, hypothalamus, pineal gland, pituitary gland, ovary, fallopian tube, uterus, kidney and adrenal gland of Sunite sheep (3 in short day/3 in long day) and Small Tail Han sheep (3 in the follicular phase/3 in the luteal phase); Sequenom MassARRAY® SNP technique was used to detect single-nucleotide polymorphic SNPs of *TPH2* gene in perennial estrus sheep breeds (Small Tail Han sheep, Hu sheep and Cele black sheep) and seasonal estrus sheep breeds (Tan sheep, Sunite sheep and Tibetan sheep) and the correlations between gene polymorphism and Small Tail Han sheep litter size was analyzed. The results showed that: *TPH1* gene expression in hypothalamus and pineal gland of Sunite sheep was extremely higher in short day than that in long day ($P < 0.01$). The *TPH1* gene expression of Sunite sheep in pituitary was significantly higher ($P < 0.05$) in short day than that in long day, and the *TPH1* gene expression of Small Tail Han sheep follicular phase in pituitary and ovary was significantly lower than that in luteal phase ($P < 0.05$). The expression of *TPH2* gene was higher in pineal gland and kidney of Sunite sheep. The *TPH2* gene expression of ovarian tissue of Sunite sheep in long day was significantly higher than that in short day ($P < 0.05$). For Small Tail Han sheep, the *TPH2* gene expression of follicular phase in hypothalamic tissue was extremely higher than that in luteal phase ($P < 0.01$). Correlation analysis between the two SNP loci and the litter size of *TPH2* gene g. 107854166C>T and g. 1078541669C>T in Small Tail Han sheep showed that there was no significant correlation between the two loci and the number of litter size and seasonal estrus in Small Tail Han sheep 1, 2 and 3 ($P > 0.05$). *TPH1* and *TPH2* are differentially expressed by seasonal light rhythm, suggesting that they are involved in the regulation of upstream genes in seasonal estrus. *TPH2* gene may be involved in the regulation of hormone secretion and ovarian development in the hypothalamus of Small Tail Han sheep, but g. 107854166C>T and g. 1078541669C>T are not key sites affecting the number of Small Tail Han sheep litter size and seasonal estrus.

Keywords sheep; *TPH*; HPGA; seasonal reproduction; gene expression

大多数绵羊品种 (*Ovis aries*) 具有季节性发情的特点, 该类品种仅在秋、冬季节等短日照条件下出现发情行为。少数绵羊品种如小尾寒羊等可以四季发情配种产羔, 显著提高繁殖效率。因此, 研究绵羊季节性发情形成的生理和分子机制, 可为提高绵羊繁殖效率提供科学依据。色氨酸羟化酶 (Tryptophan hydroxylases, TPH) 属于蝶呤依赖性芳香族氨基酸羟化酶家族的成员, 作为褪黑激素 (Melatonin, MEL) 生物合成的第一个酶, 在所有脊椎动物的松果体中大量表达^[1]。已有研究表明褪黑激素是调控绵羊季节性发情的重要因子, 因此 TPH 可能通过影响褪黑激素的合成, 进而影响绵羊繁殖轴激素分泌进而调控动物发情行为^[2]。

已发现的色氨酸羟化酶有 TPH1 和 TPH2, 这 2 个基因分别位于绵羊的 15 号和 3 号染色体上。TPH1 主要在胃肠道和松果体等周围组织表达; TPH2 主要在大脑和下丘脑的 5-羟色胺能神经元以及肠神经系统的神经元中表达^[3]。TPH 能催化 L-色氨酸向 5-羟基-L-色氨酸 (5-Hydroxytryptamine, 5-HT) 的转化, 该反应是 5-HT 生物合成中的初始和限速步骤, 而 5-HT 是 MEL 的前体产物^[4]。5-HT 能神经元是胚胎最早产生的神经元之一, 参

与调节脑回路的结构和可塑性, 并且在常规突触建立之前通过发育的轴突释放 5-HT^[5]。最初药理学研究表明, 5-HT 可以调节许多发育过程, 包括细胞分裂、细胞分化、神经元迁移及突触发生^[6]。5-HT 在下丘脑内侧视前区中能神经元突出连接 GnRH 神经元, 能直接负调控 GnRH 的分泌^[2]。增加内源性局部或者外周血液中 5-HT 水平导致促黄体素 (Luteinizing hormone, LH) 分泌减少^[7], 并在母羊、大鼠^[2] 等中得到类似的结果。由于 5-HT 由 TPH 催化产生, 证实 TPH 在上游组织中可通过调控 5-HT 分泌影响繁殖轴 (Hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPGA) 轴激素表达^[2]。已有研究发现去卵巢母猴在雌激素 (E) 和孕酮 (P) 处理下, 下丘脑局部区域 *TPH2* mRNA 表达增加^[9]。人类注射雌激素后, 发现 E 能诱导 5-HT 神经元中的孕激素受体 (PR) 和雌激素受体 (ER) 表达, 表明 TPH (尤其 TPH2) 可能也受到 HPGA 中的 E 影响^[10]。

已有研究表明 TPH 能参与调控繁殖生理过程, 是繁殖通路中的重要组成部分^[10]。但对 *TPH* 基因在不同繁殖状态下绵羊性腺轴相关组织中表达差异和参与季节性发情和繁殖时期转换方面的研究

鲜有报道。因此,本试验拟以卵泡期和黄体期的成年小尾寒羊母羊(常年发情品种)和长光照和短光照条件下的苏尼特羊母羊(季节性发情品种)为研究对象,采用 qPCR 法检测 *TPH* 基因在不同繁殖状态下绵羊繁殖轴 10 种不同组织中的表达情况;并利用 MassARRAY 飞行质谱技术(Time-of-flight mass spectrometer, TOF-MS)^[1] 检测 6 个绵羊品种 *TPH2* 基因多态性,通过统计学将 *TPH2* 基因多态性与绵羊 2 个繁殖性状(季节性发情和产羔数)进行关联分析。旨在揭示或完善绵羊繁殖分子调控机制,以期提高季节性发情绵羊的繁殖效率。

1 材料与方法

1.1 试验羊选择及处理

选择 6 只健康状态良好的空怀小尾寒羊母羊(采样地点:山东省,郓城县),在其阴道内放置孕酮阴道栓(Controlled intcmal drug release device, CIDR, InterAg 公司,新西兰)进行同期发情,12 d 后撤栓,分别采集卵泡期(撤栓后第 3 天)和黄体期(撤栓后第 9 天)性腺轴相关组织备用。

选择天津市畜牧兽医研究所畜禽繁育基地人工控光条件下饲养的 6 只健康状态良好的苏尼特羊母羊,首先在短光照(Short day, SD)条件下(光照/黑暗:8 h/16 h,人工模拟发情季节)饲养 42 d 后,转至长光照(Long day, LD)条件下(光照/黑暗:16 h/8 h,人工模拟休情季节)饲养 49 d,并根据文献报道,分别在 SD 21 和 LD 492 个时间点采集性腺轴相关组织;

分型样品选择:小尾寒羊(山东省郓城县)27 只、湖羊(江苏省徐州市)101 只、策勒黑羊(新疆维

吾尔自治区和田市)52 只、苏尼特羊(内蒙古自治区乌拉特中旗)21 只、滩羊(宁夏回族自治区盐池县)22 只、草原型藏羊(西藏自治区当雄县)161 只,以及带有产羔记录的小尾寒羊(山东省郓城县)384 只。采抗凝血送北京康普森生物技术有限公司进行基因型检测。

1.2 组织样品采集

采集下丘脑、垂体、松果体、大脑、小脑、卵巢、输卵管、子宫、肾脏、肾上腺等 10 种组织样。样品要在屠宰后迅速采集完成装入 2 mL RNase-Free 冻存管中,立刻放进液氮中保存,所有样品采集并保存完成后一并转入干冰带回实验室,整理并保存于 -80 °C 专用冰箱中。

1.3 试验相关试剂及仪器

试验中相关试剂主要有 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)、反转录试剂盒(TakaRa,宝生物工程(大连)有限公司)和荧光定量染料(SYBR[®] Premix Ex TaqTM II)(TaKaRa,宝生物工程(大连)有限公司)等,相关仪器有 NanoDrop 2000 超微量分光光度(Thermo,美国)、PCR 仪(Eppendorf,德国)和罗氏荧光定量仪 480II(罗氏,美国)等。

1.4 引物设计

参考 GenBank 绵羊 *TPH1* 和 *TPH2* 基因 mRNA 序列(登录号:ENSOARG00000001345 和 ENSOARG00000014686)及公开文献发表的引物信息,采用 Premier 3.0 在线软件进行引物设计,由北京天一辉远生物科技有限公司合成。以 β ACTIN(登录号:NM_001009784.1)作为参照基因。qPCR 引物相关信息见表 1。

表 1 本研究所用 RT-PCR 引物信息

Table 1 Primers used in this study

基因名 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	长度/bp Length	退火温度/°C T _m
<i>TPH1</i>	F: TGGCTTCTCTTGGAGCTTCA R: TGGGGTCAAAGGGCTTTACT	186	60
<i>TPH2</i>	F: CGGCGGTTGTATTCTCCTTG R: CCGTTTTCCCACACTCACAG	162	60
β ACTIN	F: ACCCAGCAGATGAAGATCA R: GTAACGCAGCTAACAGTCCG	97	60

1.5 总 RNA 提取及 cDNA 合成

将采集的组织用 RNA 提取试剂盒提取总

RNA,通过 cDNA 快速合成试剂盒反转录总 RNA 获得 cDNA。反应条件为:37 °C 15 min,85 °C 5 s,

获得 cDNA 第一条链。5 倍稀释反转录产物后,用 β -*ACTIN* (qPCR 引物,见表 1) 做参照基因进行 PCR 检测,质量合格后 0 °C 保存以备检测基因 mRNA 表达。

1.6 荧光定量 PCR 体系及标准曲线建立

用罗氏 PCR 仪检测组织表达,每个样品技术重复为 3 次,用 β -*ACTIN* 作为内参基因,以模板为 H₂O 设空白对照。qPCR 反应体系和反应程序相关试剂参照使用说明,标准曲线的建立体系和步骤方法参考文禹梁等(2019),绘制 *TPH2* 基因以及 β -*ACTIN* 基因的标准曲线^[12],反应结束后进行熔解曲线分析。

1.7 基因分型

对 *TPH2* 基因 g. 107854166 C > T 和 g. 1078541669C > T 2 个 SNP 位点在不同绵羊品种中进行分型,采用 Sequenom MassARRAY® SNP 技术(康普森生物技术有限公司,北京)进行基因型检测。分型样品选择:常年发情品种(小尾寒羊、湖

羊和策勒黑羊)和季节性发情品种(苏尼特羊、滩羊和草原型藏羊)。分型样品为 DNA(绵羊抗凝血提取),每个样品 DNA 需要量为 20 μ L, DNA 浓度为 40~80 ng/ μ L。

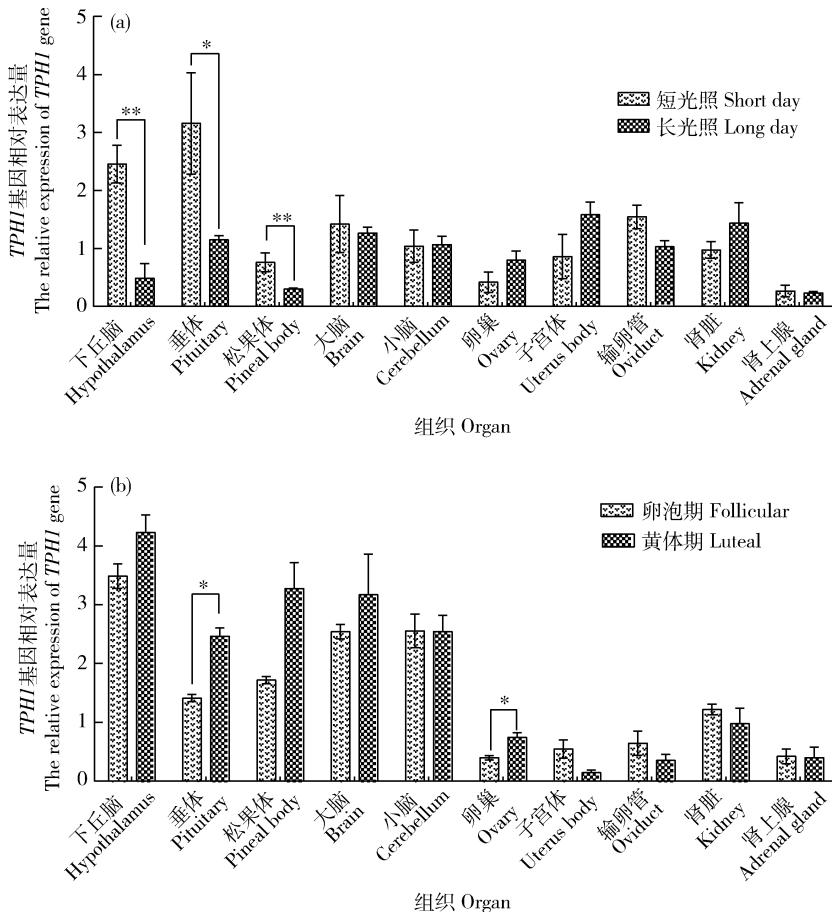
1.8 数据统计及分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[13] 计算 *TPH* 基因在各组织中的相对表达量,数据用统计学软件 SPSS 22.0 进行单因素方差分析,用最小显著差异法(Least significant difference, LSD)进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 *TPH1* 和 *TPH2* 基因在绵羊 HPGA 10 种组织中的表达分析

采用 qPCR 技术对 2 个基因在绵羊 HPGA 各组织中的差异表达情况进行定量分析,结果发现 *TPH1* 基因在 2 个绵羊品种各组织广泛表达(图 1): 图 1(a)中, *TPH1* 基因在苏尼特羊下丘脑和松



* 代表差异显著 ($P < 0.05$); ** 代表差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

* indicates the difference is significant ($P < 0.05$). ** indicates the difference is highly significant ($P < 0.01$). The same below.

图 1 *TPH1* 基因在苏尼特羊 (a) 和小尾寒羊 (b) 的相对表达量

Fig. 1 Relative expression of levels *TPH1* gene in sunite sheep (a) and Small Tail Han sheep (b)

果体中短光照表达量极显著高于长光照($P < 0.01$),在苏尼特羊垂体中短光照表达量显著高于长光照($P < 0.05$);图 1(b)中,*TPH1* 基因在小尾寒羊垂体和卵巢中卵泡期表达量显著低于黄体期($P < 0.05$)。

2.2 *TPH2* 基因的表达水平

检测 *TPH2* 基因在不同繁殖状态下苏尼特羊

和小尾寒羊性腺轴相关组织中表达量发现:*TPH2* 基因在苏尼特羊松果体以及肾脏中表达量较高,图 1(a)中卵巢组织中长光照下的表达量显著高于短光照($P < 0.05$);图 2(b)中 *TPH2* 基因在小尾寒羊下丘脑组织中卵泡期的表达量极显著高于黄体期($P < 0.01$)。

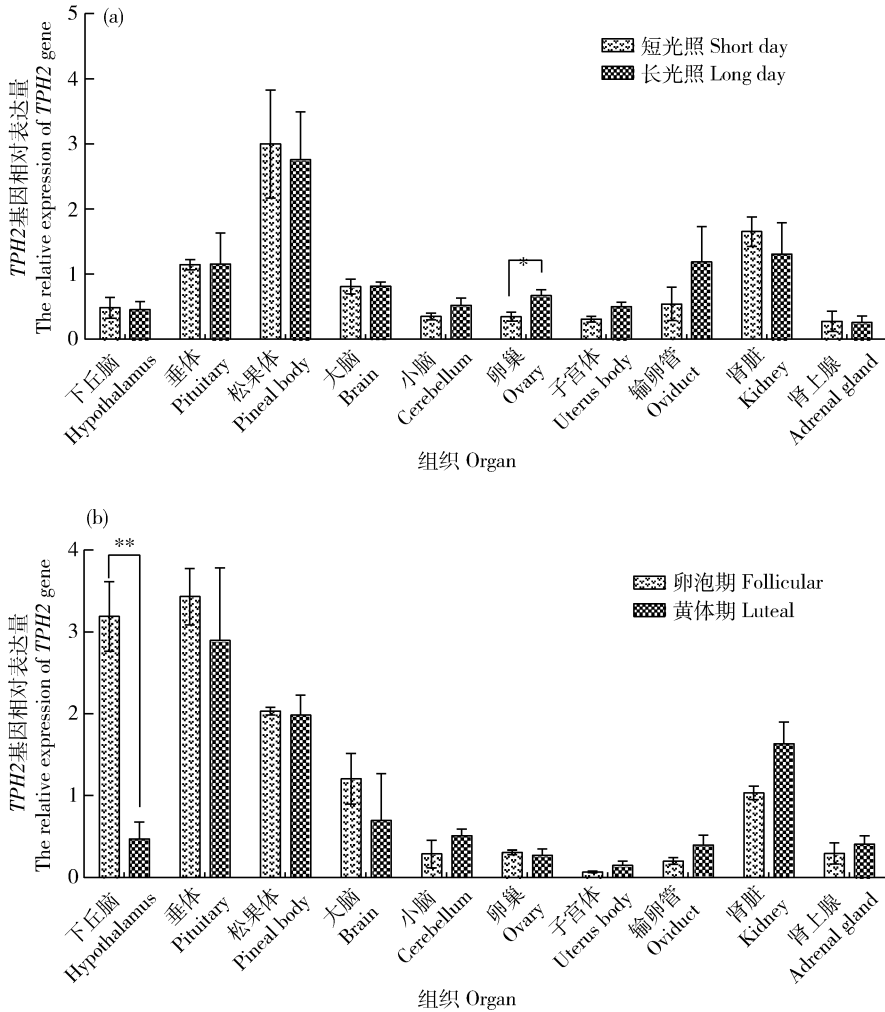


图 2 *TPH2* 基因在苏尼特羊(a)和小尾寒羊(b)的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of *TPH2* gene in sunite sheep (a) and Small Tail Han sheep (b)

2.3 *TPH2* 基因多态性分析

通过 MassARRAY 飞行质谱技术 (Time-of-flight mass spectrometer, TOF-MS)^[11] 检测 6 个绵羊品种,得到绵羊 3 号染色体 *TPH2* 基因第 1 外显子存在 2 处突变: g. 107854166C > T 和 g. 1078541669C > T, 并发现 g. 107854166C > T 为错义突变 S/L(密码子 TCG/TTG),位于 *TPH2* 基因 cDNA 的第 149 个碱基,蛋白质的第 50 个氨基酸;g. 1078541669C > T 也属于错义突变 P/L(密码

子:CCG/CTG),位于 *TPH2* 基因 cDNA 的第 152 个碱基,蛋白质的第 51 个氨基酸。同时对 6 个绵羊品种 *TPH2* 基因进行基因分型,并发现 *TPH2* 基因 2 个 SNP 位点在单羔季节性发情和多羔常年发情品种中均存在 3 种基因型,并且 g. 107854166C > T 和 g. 1078541669C > T 位点的 CC 型均为优势基因型。

通过统计学比较单羔季节性发情和多羔常年发情组间 6 个绵羊品种 g. 107854166 C > T 和

g. 1078541669C>T 的基因型和等位基因频率差异,从表 2 可知,*TPH2* 基因 g. 107854166C>T 等位基因频率在季节性、常年发情品种间差异达到显

著水平($P<0.05$),但其他的基因型频率和等位基因频率均没有达到显著差异水平。且 CC 为优势基因型,C 为优势等位基因。

表 2 *TPH2* 基因不同 SNP 位点在季节性、常年发情品种中的基因型频率和等位基因频率

Table 2 Genotype and allele frequencies of different SNPs of *TPH2* gene in seasonal and non-seasonal reproduction sheep

位点 Locus	基因型 Genotype	季节性发情 品种中基因 型频率 Genotype frequency in seasonal reproduction breeds	常年发情品种 中基因型频率 Genotype frequency in non-seasonal reproduction Breeds	卡方 检验 (<i>P</i> 值) χ^2 test (<i>P</i> value)	等位 基因 Allele	季节性发情 品种中基因 频率 Allele frequency in seasonal reproduction breeds	常年发情 品种中基因 频率 Allele frequency in non-seasonal estrous breeds	卡方检验 (<i>P</i> 值) χ^2 test (<i>P</i> value)			
g. 107854166C>T	CC	0.98(199)	1.00(180)	0.11	C	0.99	0.89	0.004			
	CT	0.02(4)	0(0)						T	0.01	0.11
	TT	0.00(0)	0(0)								
g. 107854169C>T	CC	0.96(195)	0.91(164)	0.13	C	0.99	0.94	0.05			
	CT	0.04(9)	0.09(16)						T	0.01	0.06
	TT	0(0)	0(0)								

注: $P<0.05$ 表示差异显著。

Note: $P<0.05$ indicates the difference is significant.

通过统计学分析 *TPH2* 基因不同 SNP 位点在不同绵羊品种中的群体遗传学(表 3)可知,*TPH2* 基因的 g. 107854166C>T 和 g. 107854169C>T 位点在滩羊、苏尼特羊、草原型藏羊、小尾寒羊、湖羊以及策勒黑羊 6 个品种中均表现为低度多态($PIC<0.25$)。另外,卡方适合性检验结果表明,g. 107854166C>T 在多羔常年发情品种组间均为野生型,该位点没有发生突变,单羔季节性发情品种间 g. 107854169C>T 位点均处于哈代温伯格平衡状态($P>0.05$)。

用 ANOVA 将候选基因的基因型与 384 只小尾寒羊产羔数进行关联分析,从表 4 中可知,*TPH2* 基因 g. 107854166C>T 和 g. 107854169C>T 位点不同基因型与小尾寒羊 3 个胎次产羔数关联后无显著差异。

3 讨论

3.1 季节性变化对 *TPH* 基因表达的影响

TPH1 是 MEL 生物合成第 1 个限速酶,在所有脊椎动物的松果体中大量产生^[14]。松果体细胞

中 MEL 的生物合成是多步骤反应,其起始于 *TPH* 将色氨酸羟基化为 5-HTP,并受到色氨酸羟化酶 1 (*TPH1*)的限制^[15]。本研究发现 *TPH1* 基因在苏尼特羊松果体中的差异表达(图 1),也验证了上述结果^[16]。在大鼠^[16]和鸟^[17]等动物中检测到 *TPH1* mRNA 呈昼夜节律表达。在温带鸟类的季节性发情的研究中也发现 *TPH1* mRNA 在下丘脑乳头状前核(Premammillary)表达,进而控制鸟类季节性发情^[17],本研究 *TPH1* mRNA 在苏尼特羊下丘脑和松果体中短光照表达量极显著高于长光照($P<0.01$),受到季节性信号强烈的选择,与 Kang 等^[17]的研究结果一致。

TPH2 基因的昼夜节律已经被多项研究证明:大鼠视网膜^[16]和叙利亚仓鼠(*Syrian hamster*)下丘脑^[18]中的 *TPH2* 转录本显示出明显的光周期依赖性昼夜节律变化。然而,在鸟类下丘脑 PMM 中没有检测到 *TPH2* mRNA 表达^[17]。苏尼特羊 *TPH2* 转录研究中仅在卵巢组织发现差异表达。究其原因可能是 *TPH2* mRNA 表达在苏尼特母羊中季节性节律较弱或不存在季节性节律。

表3 *TPH2* 基因不同 SNP 位点在不同绵羊品种中的群体遗传学分析
Table 3 Population genetic analysis of different SNPs at *TPH2* gene

位点 Locus	品种 Breed	基因型频率 Genotype frequency			基因频率 Allele frequency		多态信息含量 Polymorphism information content (PIC)	杂合度 Heterozygosity (HE)	有效等位 基因数 Effective number of allele (NE)	卡方检验 (<i>P</i> 值) χ^2 test (<i>P</i> value)
		CC	CT	TT	C	T				
g.107854166C>T	滩羊 Tan sheep	0.95	0.00	0.05	0.95	0.05	0.08	0.09	1.10	0.00
	苏尼特羊 Sumite sheep	0.90	0.10	0.00	0.95	0.05	0.09	0.09	1.10	0.82
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.99	0.01	0.00	0.99	0.01	0.01	0.01	1.01	0.94
	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	1	0	0	1	0	0	0	1	
	湖羊 Hu sheep	1	0	0	1	0	0	0	1	
	策勒黑羊 Cele black sheep	1	0	0	1	0	0	0	1	
g.107854169 C>T	滩羊 Tan sheep	0.91	0.09	0.00	0.95	0.05	0.08	0.09	1.10	0.82
	苏尼特羊 sumite sheep	0.95	0.05	0.00	0.98	0.02	0.05	0.05	1.05	0.91
	草原型藏羊 Prairie Tibetan sheep	0.96	0.04	0.00	0.98	0.02	0.04	0.04	1.04	0.81
	小尾寒羊 Small Tail Han sheep	0.81	0.19	0.00	0.91	0.09	0.15	0.17	1.20	0.60
	湖羊 Hu sheep	0.89	0.11	0.00	0.95	0.05	0.10	0.10	1.11	0.56
	策勒黑羊 Cele black sheep	1	0	0	1	0	0	0	1	

注: $P > 0.05$ 表示位点在该品种中处于哈代温伯格平衡状态。

Note: $P > 0.05$ indicates the locus was under Hardy-Weinberg equilibrium.

表4 *TPH2* 2 个位点不同基因型的小尾寒羊不同胎次产羔数的最小二乘均值及标准误

Table 4 Least squares means and standard error of litter size of different genotypes of SNPs at *TPH2* genes in Small Tail Han sheep

位点 Local	基因型 Genotype	第1胎产羔数 First parity litter size		第2胎产羔数 Second parity litter size		第3胎产羔数 Third parity litter size	
		number	size	number	size	number	size
g.107854166C>T	CC	340	2.13±0.05	323	2.31±0.05	125	2.82±0.10
	CT	7	2.57±0.31	6	2.67±0.37	4	3.00±0.54
	TT	5	2.60±0.38	5	2.70±0.41	2	3.00±0.76
g.107854169 C>T	CC	320	2.14±0.05	304	2.30±0.05	120	2.82±0.10
	CT	25	2.08±0.17	24	2.37±0.18	9	2.79±0.35

3.2 类固醇激素负反馈对 TPH-GnRH 通路的影响

卵巢切除后在猕猴 (*Rhesus macaques*)^[19]、恒河猴 (*Rhesus monkey*)^[9] 和大鼠^[20] 下丘脑中注射 E, 均发现丘脑局部区域 *TPH2* mRNA 表达增加。在使用 E 处理后的母猴 5-HT 神经元中 *TPH* mRNA 和 TPH 蛋白单细胞水平都显著升高, 证明 E 可诱导 5-HT 神经元中的 PR 和 ER 进而参与调控 5-HT 的分泌, 表明 TPH (尤其 *TPH2*) 可能受到 HPGA 中的 E 负反馈调控^[10]。在下丘脑内侧视前区 (Medial preoptic area) 中 5-HT 神经元突出连接 GnRH 神经元, 能直接负调控 GnRH 的分泌^[2], 在雌性大鼠的 GnRH 神经元中发现大量的 5-HT 受体, 其中 HTR2 参与调控排卵, 并介导 5-HT 间接或者直接抑制 LH 分泌^[2], 也证明了 GnRH 受到 5-HT/HTR2 影响^[21]。研究表明大鼠中存在 TPH/5-HT/5-HT 受体 2 (5-Hydroxytryptamine receptor 2)/GnRH 通路调控性腺轴激素分泌^[2]。

本研究 qPCR 检测结果暗示小尾寒羊下丘脑 *TPH* 表达受到雌激素正反馈和负反馈的影响。绵羊发情进入卵泡期后, 孕酮浓度急剧下降, 孕酮的负反馈消失, 在排卵前 (卵泡最大时) 出现平行的 LH 峰和 E 峰, 当 E 大量分泌时, 可以通过负反馈作用于下丘脑和垂体^[22]。小尾寒羊卵泡期存在 E 反馈, 作用于 HPGA, 调节 GnRH 和 LH 释放分泌^[23]。综上所述并结合本研究 (图 2) 中 *TPH2* 基因在小尾寒羊下丘脑组织中卵泡期的表达量极显著高于黄体期 ($P < 0.01$) 的研究结果, 推测绵羊下丘脑中同样存在通路 E/TPH2/5-HT/HTR2/GnRH 通路。本研究小尾寒羊卵泡期组织是在卵泡达到最大时采的样, 此时正处于雌激素峰, E 大量分泌, 反馈作用于下丘脑 5-HT 神经元的 *TPH2*, 使其表达量增加, 导致 5-HT 分泌增多, 并通过 5-HT 神经元末端突出作用于 GnRH 神经元, 从而调控 GnRH 分泌^[2]。

3.3 TPH 在垂体中的作用

已有研究表明增加内源性 5-HT 水平导致 LH 分泌减少^[2,24], 证明 TPH 可以通过 5-HT 调控 LH 水平。通过注射 5-HT 神经毒素破坏 5-HT 神经元后, 在大鼠中后发抑制 5-HT 合成对 LH 分泌的促进作用^[2]。在去势大鼠脑室注射小剂量 5-HT 后, LH 释放减少^[25], 同时也有研究报道了全身注射 5-HT 对阉割大鼠 LH 水平的抑制作用^[26]。本研究发现 *TPH1* 在小尾寒羊垂体和卵巢中卵泡期显著低于黄体期 ($P < 0.05$) 结果与上述小鼠中的研究基

本一致^[26]。

3.4 *TPH2* 基因多态性与绵羊产羔数之间的关系

TPH2 基因的 g. 107854166C > T 和 g. 107854169C > T 位点在滩羊、苏尼特羊、草原型藏羊、小尾寒羊、湖羊以及策勒黑羊 6 个品种中均表现为低度多态 ($PIC < 0.25$), 表明 2 个位点在 6 个绵羊品种中的遗传多样性较少。前者在多羔常年发情组没有突变型, 可能由于突变致死或突变型适应性差导致死亡。从表 2 可知这 2 个位点与绵羊季节性发情无关, 因此推断这 2 个位点不是影响绵羊季节性发情的关键位点。与小尾寒羊产羔数关联分析也表明, g. 57842893C > T 位点与小尾寒羊第 1、2 以及第 3 胎产羔数均无显著关联 ($P > 0.05$), 不是影响小尾寒羊产羔数的关键基因。

4 结论

本研究发现, *TPH1* 和 *TPH2* 基因在绵羊繁殖相关组织中呈中等丰度表达, 在 HPGA 各组织中的生理功能不重叠。在苏尼特羊中 *TPH1* 基因呈季节光照依赖性节律表达, 可能参与绵羊季节性发情调控和繁殖时期转换。*TPH2* 基因可能在小尾寒羊下丘脑中受到 E 的反馈调控, 参与发情时期的转换。*TPH2* 基因 g. 107854166C > T 和 g. 107854169C > T 位点不是季节性发情关键位点, 也不参与小尾寒羊产羔数调控。

参考文献 References

- [1] Zhang X, Beaulieu J M, Sotnikova T D, Gainetdinov R R, Caron M G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis[J]. *Science*, 2004, 305(5681): 217-223
- [2] Li S, Pelletier G. Involvement of serotonin in the regulation of *GnRH* gene expression in the male rat brain[J]. *Neuropeptides*, 1995, 29(1): 21-25
- [3] Amireault P, Sibon D, Cote F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2013, 4(1): 64-71
- [4] Teraoka H, Russell C, Regan J, Chandrasekhar A, Concha M L, Yokoyama R, Higashi K, Take-Uchi M, Dong W, Hiraga T, Holder N, Wilson S W. Hedgehog and Fgf signaling pathways regulate the development of *tphR*-expressing serotonergic raphe neurons in zebrafish embryos[J]. *Journal of Neurobiology*, 2004, 60(3): 275-288
- [5] Lipton S A, Kater S B. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival[J]. *Trends in*

- Neurosciences, 1989, 12(7): 265-270
- [6] Azmitia E C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis[J]. *Brain Research Bulletin*, 2001, 56(5): 413-424
- [7] Coleman C M, Neckameyer W S. Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*[J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2005, 59(1): 12-31
- [8] Walther D J, Peter J U, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform [J]. *Science*, 2003, 299(5603): 76-82
- [9] Schutzer W E, Bethea C L. Lack of ovarian steroid hormone regulation of norepinephrine transporter mRNA expression in the non-human primate locus coeruleus[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 1997, 22(5): 325-336
- [10] Sanchez R L, Reddy A P, Centeno M L, Henderson J A, Bethea C L. A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques[J]. *Molecular Brain Research*, 2005, 135(1-2): 194-203
- [11] Ortega M S, Denicol A C, Cole J B, Null D J, Hansen P J. Use of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with daughter pregnancy rate for prediction of genetic merit for reproduction in Holstein cows[J]. *Animal Genetics*, 2016, 47(3): 288-297
- [12] 文禹梁, 王翔宇, 郭晓飞, 贺小云, 赵生国, 储明星. 不同产羔数小尾寒羊 *BMP4* 基因表达及其错义突变与产羔数关联分析[J]. 农业生物技术学报. 2019, 27(1): 80-88
Wen Y L, Wang X Y, Guo X F, He X Y, Zhao S G, Chu M X. *BMP4* gene expression in Small Tail Han sheep (*Ovis aries*) with different litter size and association analysis between its missense mutation and litter size[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(1): 80-88 (in Chinese)
- [13] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108
- [14] Kirsz K, Szczesna M, Molik E, Zieba D A. Effects of ghrelin on nocturnal melatonin secretion in sheep: An *in vitro* and *in vivo* approach[J]. *Journal of Animal Science*, 2017, 95(9): 4101-4112
- [15] Huang Z, Liu T, Chattoraj A, Ahmed S, Wang M M, Deng J, Sun X, Borjigin J. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland[J]. *Journal of Pineal Research*, 2008, 45(4): 506-514
- [16] Liang J, Wessel J R, Iuvone P M, Tosini G, Fukuhara C. Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase 1 and 2 mRNA expression in the rat retina[J]. *Neuroreport*, 2004, 15(9): 1497-1500
- [17] Kang S W, Thayananuphat A, Bakken T, El H M. Dopamine-melatonin neurons in the avian hypothalamus controlling seasonal reproduction[J]. *Neuroscience*, 2007, 150(1): 223-233
- [18] Nexon L, Sage D, Pevet P, Raison S. Glucocorticoid-mediated nycthemeral and photoperiodic regulation of *tph2* expression [J]. *The European Journal of Neuroscience*, 2011, 33(7): 1308-1317
- [19] Pecins-Thompson M, Brown N A, Kohama S G, Bethea C L. Ovarian steroid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression in *Rhesus macaques*[J]. *The Journal of Neuroscience*, 1996, 16(21): 7021-7029
- [20] Hiroi R, McDevitt R A, Neumaier J F. Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: Association between gene expression and anxiety behavior in the open field [J]. *Biological Psychiatry*, 2006, 60(3): 288-295
- [21] Sumner B E, Rosie R, Fink G. Relative density of 5-hydroxytryptamine receptor subtype mRNAs in female rat neuroendocrine brain determined by *in situ* hybridization histochemistry [J]. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 1992, 3(3): 215-223
- [22] Alviggi C, Marci R, Vallone R, Conforti A, di Rella F, Strina I, Picarelli S, de Rosa P, De Laurentiis M, Yding A C, De Placido G. High progesterone levels during the luteal phase related to the use of an aromatase inhibitor in breast cancer patients[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2017, 21(13): 3134-3138
- [23] Kenealy B P, Keen K L, Garcia J P, Kohlenberg L K, Terasawa E. Obligatory role of hypothalamic neuroestradiol during the estrogen-induced LH surge in female ovariectomized *Rhesus* monkeys[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(52): 13804-13809
- [24] Diaz-Ramos J, Flores-Flores M, Ayala M E, Aragon-Martinez A. Impaired serotonin communication during juvenile development in rats diminishes adult sperm quality[J]. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2018, 64(5): 340-347
- [25] Ichiyama A, Nakamura S, Nishizuka Y, Hayaishi O. Enzymic studies on the biosynthesis of serotonin in mammalian brain [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1970, 245(7): 1699-1709
- [26] Ichiyama A, Hasegawa H, Tohyama C, Dohmoto C, Kataoka T. Some properties of bovine pineal tryptophan hydroxylase [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1976, 74: 103-117