

黄体期和卵泡期小尾寒羊 *KiSS-1* 与 *RFRP-3* 组织表达研究

安雪姣^{1,2} 潘章源^{1,3} 赵生国² 李春艳¹ 田志龙¹ 狄冉¹ 刘秋月¹
胡文萍¹ 王翔宇¹ 张效生⁴ 张金龙⁴ 蔡原^{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. 甘肃农业大学 动物科学技术学院,兰州 730070;
3. 临沂大学 农林科学学院,山东 临沂 276005;
4. 天津市畜牧兽医研究所,天津 300381)

摘要 为分析 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 基因在小尾寒羊不同繁殖时期(黄体期和卵泡期)下丘脑、垂体、性腺轴各组织中的表达差异,阐明这 2 个基因在绵羊发情转换中的表达模式,以常年发情的小尾寒羊为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 技术,对比分析了 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 基因在黄体期和卵泡期的小尾寒羊下丘脑—垂体—性腺轴各组织中的表达差异。结果表明:1) *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 基因在下丘脑、垂体、卵巢等 10 种组织中均有表达;2) 黄体期和卵泡期下丘脑中 *KiSS-1* 基因表达量均显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 卵泡期下丘脑和松果体中 *KiSS-1* 基因表达量均显著高于黄体期 ($P < 0.05$); 3) 黄体期和卵泡期下丘脑和卵巢中 *RFRP-3* 基因的表达量均显著高于其他组织 ($P < 0.05$), 且卵巢中 *RFRP-3* 基因在黄体期的表达量显著高于卵泡期 ($P < 0.05$)。综上,研究发现 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 基因在绵羊发情调控中均发挥重要作用, *KiSS-1* 促进发情而 *RFRP-3* 抑制发情。

关键词 小尾寒羊; 繁殖时期; *KiSS-1*; *RFRP-3*; 组织表达

中图分类号 S86.2 文章编号 1007-4333(2019)02-0082-09 文献标志码 A

Tissue expression of *KiSS-1* and *RFRP-3* in Small Tail Han sheep at luteal and follicular periods

AN Xuejiao^{1,2}, PAN Zhangyuan^{1,3}, ZHAO Shengguo², LI Chunyan¹,
TIAN Zhilong¹, DI Ran¹, LIU Qiuyue¹, HU Wenping¹, WANG Xianguy¹,
ZHANG Xiaosheng⁴, ZHANG Jinlong⁴, CAI Yuan^{2*}, CHU Mingxing^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;
2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
3. College of Agricultural and Forestry Science, Linyi University, Linyi 276005, China;
4. Tianjin Institute of Animal Sciences, Tianjin 300381, China)

Abstract The aim of this study was to analyze the expression of *KiSS-1* and *RFRP-3* genes in the tissues of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis in Small Tail Han sheep during different reproductive periods (luteal and follicular periods), and to elucidate the expression pattern of these two genes in estrus conversion of sheep. Small Tail Han ewes at one year-round estrous breed were selected in the study, and Real-time PCR method was used to detect the expression of *KiSS-1* and *RFRP-3*.

收稿日期: 2018-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31472078); 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); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS13); 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

第一作者: 安雪姣, 硕士研究生, E-mail: 18393811056@163.com

通讯作者: 蔡原, 博士, 副教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: caiyuan@gsau.edu.cn;

储明星, 博士, 研究员, 主要从事羊优异繁殖性状分子机理研究, E-mail: mxchu@263.net

3 genes in hypothalamus-pituitary-gonadal axis' tissues during luteal and follicular periods. The results showed that *KiSS-1* and *RFRP-3* genes were all expressed in ten tissues such as hypothalamus, pituitary and ovary. The expression of *KiSS-1* in hypothalamus was significantly higher ($P<0.05$) than that in other tissues at both luteal and follicular periods. The expression of *KiSS-1* in hypothalamus and pineal gland was significantly higher ($P<0.05$) in follicular period than that in luteal period. The expression of *RFRP-3* in hypothalamus and ovary was significantly higher ($P<0.05$) than that in other tissues both luteal and follicular periods. The expression of *RFRP-3* in ovary was significantly higher ($P<0.05$) in luteal period than that in follicular period. In conclusion, the *KiSS-1* and *RFRP-3* genes played important roles in sheep estrus regulation. *KiSS-1* promoted estrus while *RFRP-3* inhibited estrus.

Keywords Small Tail Han sheep; reproductive period; *KiSS-1*; *RFRP-3*; tissue expression

动物的季节性繁殖是由内分泌系统和中枢神经系统调控的复杂生理过程, 主要依靠下丘脑—垂体—性腺轴 (HPG) 的相互调节来实现^[1]。研究发现编码 RFamide 家族神经肽类的基因 *KiSS-1* 与 *RFRP-3* 可能是动物季节性繁殖活动的重要调控因子。*KiSS-1* 基因是 Lee 等^[2] 从人黑色素瘤细胞中分离得到, 其翻译产物 Kisspeptin 是由 145 个氨基酸组成的亲水性蛋白, 具有分泌神经肽的特点^[3]; *KiSS-1*/GPR54 系统对哺乳动物的繁殖起中枢调控作用, 它通过调节下丘脑促性腺激素释放激素 (GnRH) 的释放, 来影响促卵泡素 (FSH) 和促黄体素 (LH) 的分泌^[4-5]。Kisspeptin 通过下丘脑通路激活 GnRH 神经元来促进促性腺激素的分泌^[6], 也可诱导体外培养的大鼠下丘脑中 GnRH 的释放^[7]。Kisspeptin 直接作用于下丘脑—垂体—性腺轴, 能促进 GnRH 释放和 LH 含量上升, 从而调控绵羊的季节性繁殖^[8-9]。*RFRP* 是在 2000 年从鹌鹑大脑中提取出来的可抑制垂体 GnRH 分泌的十二肽, 并命名为促性腺激素抑制激素 (GnIH)^[10]。在哺乳动物中 *RFRP* 基因由 2 条编码生物活性的短肽 RF 酰胺相关肽-1 (*RFRP-1*) 和 RF 酰胺相关肽-3 (*RFRP-3*), 其中, *RFRP-3* 对生殖系统的调控有抑制作用^[11]。小鼠的 *RFRP-3* 细胞纤维体与大部分 GnRH 细胞直接接触, 对 GnRH 神经元有直接的抑制作用^[12-13]。在哺乳动物中, *RFRP-3* 也能抑制 LH 的合成与分泌。虽然 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 都是 RFamide 家族神经肽, 但它们在动物季节性发情中的作用却相反, 并且相互协调共同控制动物的季节性繁殖活动^[14]。目前, 对于不同繁殖状态下小尾寒羊下丘脑—垂体—卵巢生殖轴上各组织表达规律的研究很少。本研究以常年发情的小尾寒羊为研究对象, 分别采集其卵泡期和黄体期生殖轴上的 10 种组织, 用荧光定量 PCR 方法检测 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 在不同繁殖状态下小尾寒羊不同组织中的表达差异, 初步分析

这 2 个基因在小尾寒羊发情状态转换中的作用, 有助于进一步揭示绵羊季节性发情分子调控机制。

1 材料与方法

1.1 试验样品及主要试剂

随机选择来自山东郓城的身体健康、营养状况良好、体重一致的 2~3 岁经产空怀小尾寒羊母羊 6 只, 饲养于天津市畜牧兽医研究所试验羊场, 保证所有羊只的饲养管理方式、饲料配方和环境一致。放置孕酮阴道栓 (CIDR) 并注射 5~6 mL 维生素 AD 以保护阴道内膜。放栓 12 d 后撤栓, 撤栓当天记为 1 d, 撤栓时刻记为 0 h。撤栓后用腹腔镜观察卵泡发育和排卵情况来确定卵泡期采样时间, 用公羊试情确定母羊发情状态及时间。连续试验 2 个情期后在撤栓后 45 h (卵泡期) 和 10 d (黄体期) 进行屠宰, 每个时期各 3 只, 屠宰后迅速采集下丘脑、垂体、松果体、大脑、小脑、卵巢、子宫、输卵管、肾脏、肾上腺共 10 种组织。分别装入 2 mL 的 RNase-Free 冻存管中, 并立即放入液氮中, 带回实验室转移到 -80 °C 冰箱保存备用。

动物组织总 RNA 提取试剂盒 (天根生化有限公司, 北京), 反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Reagent Kit, TaKaRa 公司, 大连), 荧光定量染料 (SYBR® Premix Ex Taq™ II, TaKaRa 公司, 大连), EP 管、96 孔板、枪头等耗材均为 RNase-Free 产品。

1.2 总 RNA 提取

利用 Trizol (Invitrogen, 美国) 和动物组织总 RNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 提取各组织总 RNA。用 NanoDrop2000 检测所提取 RNA 的浓度和 OD 值 (A260/A280 为 1.8~2.1), 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 检测合格后暂存于 -80 °C 冰箱。

1.3 定量引物设计

根据 GenBank 公布的绵羊 *KiSS-1* 和 *RFRP-3*

基因 mRNA 序列(登录号分别为:NM_001306104.1 和 NM_001127268.1),利用 Primer Premier 5.0 软件进行跨外显子引物设计,以 $\beta actin$ (登录号:

NM_001009784)为内参基因。引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成。引物具体信息见表 1。

表 1 荧光定量引物信息
Table1 Information of primers for Real-time PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度/°C Annealing temperature	产物长度/bp Product length
<i>RFRP-3</i>	F:GCAGCCAAAAGCATCACCAA R:TGGAATCCCAGTCTCCTTAGGT	60	149
<i>KiSS-1</i>	F:TCATTTGGAGACCCCTCAGGA R:ATCCTGGTGAGAAGATGCCG	60	70
$\beta actin$	F:CCAACCGTGAGAAGATGACC R:CCCAGGGCGTACAGGGACAG	62	97

1.4 cDNA 合成

使用反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit)反转录合成 cDNA,反应总体积为 20 μL 。反应条件为:37 °C 15 min,85 °C 5 s。全程在冰上操作。反转录产物进行 5 倍稀释后,用内参基因 $\beta actin$ 进行 PCR 检测,符合标准后-20 °C 保存。

1.5 实时荧光定量 PCR

1.5.1 标准曲线建立

取每个组织的 cDNA 样品 2 μL 混匀,按 1:2 浓度梯度稀释,分别获得 8 个浓度梯度(1、1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128)的 cDNA 样品。用这些 cDNA 作为模板对目的基因和内参基因进行荧光定量 PCR,以浓度梯度的对数值(10 为底数)为横坐标,以检测所得 Ct 值为纵坐标,绘制目的基因和内参基因标准曲线,确保引物扩增效率为 95%~105%。

1.5.2 实时荧光定量 PCR 体系和程序

利用罗氏 480 II 型荧光定量 PCR 仪检测不同时期小尾寒羊在繁殖相关组织中 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 基因的表达, $\beta actin$ 作为内参基因,每个样品做 3 个重复。反应体系总体积为 20.0 μL ,其中 SYBR Premix Ex Taq II 2.0 μL ,上下游引物各 0.8 μL ,cDNA 2.0 μL ,RNase-Free ddH₂O 6.4 μL 。qPCR 程序:95 °C 预变性 5 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 30 s,45 个循环。

1.5.3 数据统计

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[15, 16] 计算目的基因的相对表达量,用统计学软件 SPSS 19.0 进行单因素方差分析,最终结果用平均值±标准误(X±SEM)来表示。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,发现 RNA 电泳条带明亮清晰、完整、无拖尾(图 1)。用 Nanodrop 2000 检测各组织 RNA 的提取结果,发现浓度均在 100 mg/ μL 以上, A_{260}/A_{280} 均为 1.80~2.10。经反转录合成的 cDNA 通过 $\beta actin$ 内参基因检测后发现,产物干净单一,表明 RNA 没有基因组 DNA 污染(图 2)。说明提取的 RNA 和反转录后的 cDNA 可用于后续的荧光定量 PCR 反应。

2.2 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 在不同时期小尾寒羊各组织中的表达

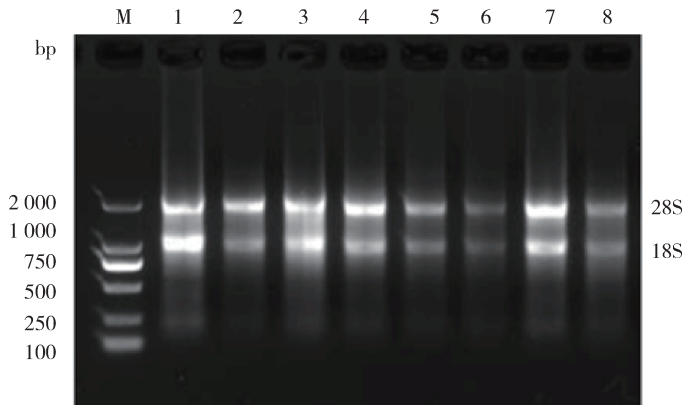
使用荧光定量 PCR 技术对卵泡期和黄体期的小尾寒羊 10 种组织 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 基因的表达水平进行了研究,结果见图 3 和图 4。

KiSS-1 基因在 2 个时期小尾寒羊的 10 种组织均有一定表达,但在卵泡期子宫中的表达量很低。黄体期和卵泡期下丘脑 *KiSS-1* 基因表达量显著高于其他组织($P < 0.05$);卵泡期下丘脑和松果体 *KiSS-1* 基因表达量显著高于黄体期

($P < 0.05$)。

RFRP-3 基因在 2 个时期小尾寒羊的 10 种组织中均有一定表达,但在黄体期子宫及卵泡期垂体和松果体中表达量很低。黄体期和卵泡期下丘脑和

卵巢 *RFRP-3* 基因的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$);卵泡期 *RFRP-3* 基因在下丘脑和卵巢之间表达差异显著 ($P < 0.05$);黄体期卵巢 *RFRP-3* 基因表达量显著高于卵泡期 ($P < 0.05$)。

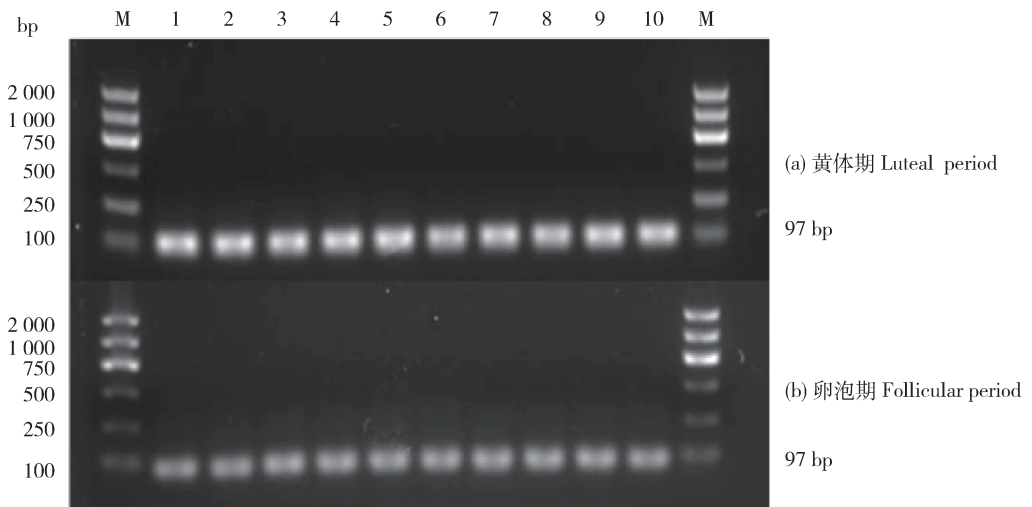


1~8:大脑、小脑、下丘脑、垂体、松果体、子宫、卵巢和输卵管。M:DL2000 DNA 分子标记。

1-8, brain, cerebellum, hypothalamus, pituitary, pineal body, uterus, ovary and oviduct. M,DL2000 DNA Marker.

图 1 小尾寒羊 RNA 电泳检测

Fig.1 Electrophoresis of the RNA in Small Tail Han sheep

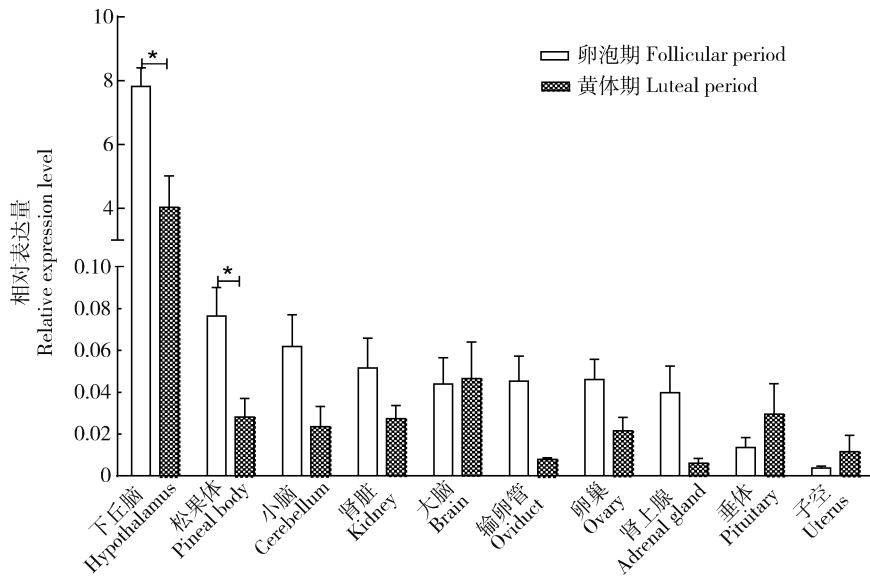


1~10: 大脑、小脑、下丘脑、垂体、松果体、子宫、卵巢、输卵管、肾脏和肾上腺。M:DL2000 DNA 分子标记。

1-10: Brain, cerebellum, hypothalamus, pituitary, pineal body, uterus, ovary, oviduct, kidney and adrenal gland. M;DL2000 DNA Marker.

图 2 小尾寒羊 10 种组织中 β -actin 持家基因 RT-PCR 扩增产物

Fig.2 RT-PCR amplification products of housekeeping gene β -actin in Small Tail Han sheep 10 different tissues



* 表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

* represents significant difference at $P < 0.05$. The same below.

图3 *KiSS-1* 基因在小尾寒羊不同时期各组织中的表达

Fig. 3 Expression of *KiSS-1* gene in Small Tail Han sheep at different periods

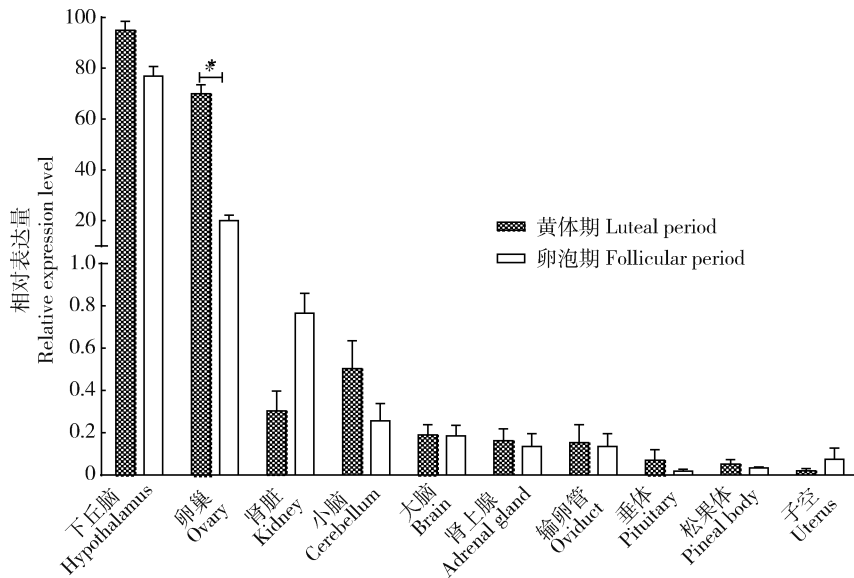


图4 *RFRP-3* 基因在小尾寒羊不同时期各组织中的表达

Fig. 4 Expression of *RFRP-3* gene in Small Tail Han sheep at different periods

3 讨论

3.1 *KiSS-1* 基因表达

KiSS-1 基因在动物季节性发情调控中起着关键的作用,在阿勒泰羊下丘脑、垂体、卵巢和甲状腺等组织中均检测到了 *KiSS-1* 基因的表达,其中下丘脑的表达量最高^[17]。在济宁青山羊和辽宁绒山

羊下丘脑、垂体、松果体、肾、卵巢、脂肪和甲状腺等组织中均检测到了 *KiSS-1* 基因的表达,下丘脑与垂体的表达量显著高于卵巢 ($P < 0.01$)^[18]。梅山猪和长大二元母猪下丘脑 *KiSS-1* 基因的表达量极显著高于垂体和卵巢 ($P < 0.01$)^[19]。在初情期母猪下丘脑中成功克隆 *KiSS-1* 基因并检测到该部位有高水平表达^[20]。本研究对 *KiSS-1* 基因在小尾寒

羊上的表达情况进行了研究,在下丘脑、垂体、卵巢、松果体等组织中均检测到了 *KiSS-1* 基因的表达,下丘脑中的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$),这与已有研究结果一致。但是,本研究中小尾寒羊垂体和卵巢中 *KiSS-1* 基因的表达量很低,与黄冬维等^[18]和朱碧泉等^[19]的研究结果不同,可能是由于不同物种在垂体中的表达存在差异所致。

哺乳动物促性腺激素的释放完全依赖于 GnRH 的分泌,在繁殖季节或者发情期绵羊下丘脑的 GnRH 神经元会急剧增加^[21],而 Kisspeptin 的繁殖激活功能主要作用在 GnRH 神经元上。动物下丘脑弓状核以及视前区的 *KiSS-1* 神经元轴突末梢可直接投射到 GnRH 神经元胞体上,建立突触连接^[22-23],并且其受体 GPR54 在大多数 GnRH 神经元上表达^[24]。因此,Kisspeptin 被认为是 GnRH 最有力的激活者。研究发现小尾寒羊下丘脑 *KiSS-1* 基因的表达量在不同的发情阶段存在显著差异,其中发情盛期最高,极显著高于发情前期、后期和间情期 ($P < 0.01$)^[25]。发情启动后阿勒泰羊下丘脑中 *KiSS-1* 基因的表达量逐渐下降,其中发情盛期高于发情末期,都显著高于间情期 ($P < 0.05$),极显著高于乏情期 ($P < 0.01$)^[17]。季节性繁殖动物绵羊在短日照时(发情) *KiSS-1* 基因 mRNA 表达量高于长日照时(休情),其 *KiSS-1* 基因主要在情期表达^[26-29]。Abadeh 母山羊在繁殖季节卵泡期下丘脑上的 Kisspeptin 神经元明显多于黄体期和休情季节^[30]。与本研究发现小尾寒羊下丘脑卵泡期表达量显著高于黄体期的结果一致。

松果体是动物机体“生物钟”的调控中心,能将昼夜明暗循环和季节性温度变化等周期信号转导成激素信号,从而调整机体的生理机能^[31],其中褪黑素是松果体中最重要的产物。褪黑素可能通过 Kisspeptin 和 RF 酰胺相关肽参与调控动物的季节性繁殖^[32]。在发情期前对母鹿埋植褪黑素,可使其体内 FSH 的浓度提高,促进卵泡的发育;同时能显著提高 LH 的浓度,进一步促进排卵,从而达到使母鹿超排的效果^[33]。本研究中卵泡期小尾寒羊松果体 *KiSS-1* 的表达量显著高于黄体期。上述结果表明 Kisspeptin 在小尾寒羊卵泡期和黄体期中的差异可能是由于褪黑素分泌模式的改变而引起的,并且松果体分泌的褪黑素对短日照繁殖动物的生殖活动起促进作用,通过 Kisspeptin 参与调控黄体期到卵泡期的发情状态转换。

3.2 *RFRP-3* 基因表达

RFRP-3 基因在母猪子宫、卵巢及眼等组织中度表达,在下丘脑高表达^[34]。*RFRP-3* 基因在母绵羊下丘脑等中枢神经系统和卵巢等生殖系统的表达量较高^[35]。在幼龄绵羊延髓、眼、卵巢、子宫、下丘脑等组织中均检测到了 *RFRP-3* 基因的表达,其中延髓表达量最高,眼、卵巢、脊髓、子宫和下丘脑等组织次之,内脏组织最低^[36]。天府肉鹅和新西兰白兔 GnRH 前体基因主要表达于下丘脑^[37-38]。济宁青山羊和辽宁绒山羊 *RFRP* 基因主要在下丘脑、大脑皮层、小脑和卵巢中表达^[18]。本研究用荧光定量 PCR 的方法检测到 *RFRP-3* 基因在小尾寒羊下丘脑、卵巢、肾脏、大脑、小脑、肾上腺、输卵管中均表达,且在下丘脑和卵巢中高表达。不同物种之间 *RFRP-3* 基因的表达存在一定的差异,这可能是由于物种的特异性引起的。但是 *RFRP-3* 基因在小尾寒羊下丘脑和卵巢中高表达说明该基因在绵羊发情和繁殖中都发挥着重要作用。

不同动物 *RFRP-3* 基因在季节性繁殖中的作用有所不同。注射 *RFRP-3* 可以抑制绵羊 GnRH 神经元的活性^[39];在褪黑素的控制下 *RFRP-3* 可以促进叙利亚仓鼠 GnRH 的释放^[40]。*RFRP-3* 基因在处于长光照(16L:8D)绵羊下丘脑的表达要高于短光照的绵羊^[41]。繁殖期的绵羊 *RFRP-3* 基因在 PVN 和 DMH 中的表达量下降,与 GnRH 神经元接触的细胞数量也减少^[42];同时发现,长日照下的季节性繁殖绵羊与短日照的个体相比其 *RFRP* 的表达和投射增加^[41];Abadeh 母山羊在繁殖季节卵泡期下丘脑中的 *RFRP* 神经元明显低于黄体期和休情季节^[30]。这些研究结果支持了本试验中小尾寒羊下丘脑 *RFRP-3* 基因表达量黄体期高于卵泡期的研究结果,表明 *RFRP-3* 基因对绵羊的生殖活动起抑制作用。

本研究还发现 *RFRP-3* 基因在小尾寒羊卵巢中表达很高,黄体期显著高于卵泡期 ($P < 0.05$)。猪 *RFRP-3* 主要在发情前期和发情期的颗粒细胞以及发情后期和间情期的黄体细胞中表达^[35]。研究表明 *RFRP-3* 基因在卵巢水平发挥局部作用,因为该基因在人的颗粒细胞中表达,同时能够减少促性腺激素的释放和孕激素的合成^[43-44]。小鼠卵巢中的 *RFRP-3* 与 GnRH 的表达密切相关, GnRH-*RFRP-3* 系统对整个排卵周期中的卵泡发育和闭锁起着重要作用^[45]; *RFRP-3* 在一定程度上影响促卵

泡素的分泌与合成,参与调控卵泡的发育和闭锁^[46]。本研究中 *RFRP-3* 基因在黄体期显著高于卵泡期,说明该基因在调控发情的时候主要在卵巢中实现功能,可能直接作用于卵泡的发育和闭锁。但其在卵巢中具体的功能和调节机制还需进一步研究。

4 结 论

KiSS-1 基因在小尾寒羊卵泡期下丘脑和松果体的表达量均显著高于黄体期,提示其可能在小尾寒羊黄体期到卵泡期发情状态转换中起促进作用。*RFRP-3* 基因在黄体期下丘脑表达量高于卵泡期,说明其可能在小尾寒羊发情状态转换中起抑制作用。*RFRP-3* 基因在不同时期卵巢差异表达的研究结果暗示,*RFRP-3* 基因在调控发情的时候主要在卵巢中实现功能,可能直接作用于卵泡的发育和闭锁。本试验结果为深入研究 *KiSS-1* 和 *RFRP-3* 基因在绵羊季节性发情方面的作用奠定了基础。

参考文献 References

[1] Greives T J, Mason A O, Scotti M A L, Levine J, Ketterson E D, Kriegsfeld L J, Demas G E. Environmental control of kisspeptin: Implications for seasonal reproduction [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(3): 1158-1166

[2] Lee J H, Miele M E, Hicks D J, Phillips K K, Trent J M, Weissman B E, Welch D R. *KiSS-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996, 88(23): 1731-1737

[3] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Ohtaki T L, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor [J]. *Nature*, 2001, 411(6837): 613-617

[4] Novaira H J, Ng Y, Wolfe A, Radovick S. Kisspeptin increases GnRH mRNA expression and secretion in GnRH secreting neuronal cell lines [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 311(1-2): 126-134

[5] Papaiconomou E, Msaouel P, Makri A, Diamanti-Kandarakis E, Koutsilieris M. The role of kisspeptin/GPR54 in the reproductive system [J]. *In Vivo*, 2011, 25(3): 343-354

[6] 郭若婷, 鲁慧文, 欧科鹏, 王颖, 刘乙, 顾真真, 刘小军. 绵羊 *Otx-2* 基因的分子克隆、组织表达及其与季节性繁殖关系的研究

究 [J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(5): 696-703

Guo R T, Lu H W, Ou K P, Wang Y, Liu Y, Gu Z Z, Liu X J. Molecular cloning, tissue expression and its relationship with seasonal reproduction of *Otx-2* gene in sheep [J]. *Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2015, 46(5): 696-703 (in Chinese)

[7] Thompson E L, Patterson M, Murphy K G, Smith K L, Dhillo W S, Todd J F, Ghatei M A, Bloom S R. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2004, 16(10): 850-858

[8] Messenger S, Chatzidakis E E, Ma D, Hendrick A G, Zahn D, Dixon J, Thresher R R, Malinge I, Lomet D, Carlton M B L, Colledge W H, Caraty A C, Aparicio S A J R. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(5): 1761-1766

[9] Caraty A, Smith J T, Lomet D, Ben Said S, Morrissey A, Cognie J, Doughton G, Baril C B, Clarke I J. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(11): 5258-5267

[10] Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp P J. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275(2): 661-667.

[11] 向伟, 赖平, 张宝云, 王凭青, 储明星, 樊奇, 刘雪旭, 谭颖. *RFRP-3* 对哺乳动物生殖功能和能量平衡的影响 [J]. 遗传, 2012, 34(8): 969-976

Xiang W, Lai P, Zhang B Y, Wang P Q, Chu M X, Fan Q, Liu C X, Tan Y. Effects of *RFRP-3* on reproductive function and energy balance in mammals [J]. *Genetics*, 2012, 34(8): 969-976 (in Chinese)

[12] Ducret E, Anderson G M, Herbison A E. RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(6): 2799-2804

[13] Wu M, Dumalska I, Morozova E, Van Den Pol A N, Alreja M. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain ν GluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism [J]. *The Journal of Physiology*, 2009, 587(7): 1401-1411

[14] Smith J T. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2012, 43(2): 75-84

[15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408

- [16] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108
- [17] 张伟, 刘晓娜, 邓双义, 王世银, 石国庆, 阿勒泰羊不同繁殖状态下下丘脑 *Kiss1* 基因表达规律与其季节性繁殖的关联性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(1): 45-52
Zhang W, Liu X N, Deng S Y, Wang S Y, Shi G Q. Correlation analysis of *Kiss1* gene expression and seasonal reproduction in the hypothalamus of Altay sheep [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(1): 45-52 (in Chinese)
- [18] 黄冬维, 储明星, 狄冉, 刘秋月, 胡文萍, 王翔宇, 潘章源, 郭晓飞. 山羊繁殖季节性相关基因 *KiSS-1* 与 *RFRP* 的表达研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 46(6): 924-931
Huang D W, Chu M X, Di R, Liu Q Y, Hu W P, Wang X Y, Pan Z Y, Guo X F. Study on expression of *KiSS-1* and *RFRP* in seasonal goat breeding[J]. *Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2014, 46(6): 924-931 (in Chinese)
- [19] 朱碧泉, 李卓昭, 吴德, 方正锋, 林燕, 车炼强. 梅山与长大母猪下丘脑—垂体—卵巢轴 *Kiss1* 和 *GPR54* 基因的表达差异[D]. *中国畜牧杂志*, 2011, 47(13): 21-25
Zhu B C, Li Z Z, Wu D, Fang Z F, Lin Y, Che L Q. Differences in expression of *Kiss1* and *GPR54* genes in Meishan and growing sows' hypothalamus-pituitary-ovary axis [D]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2011, 47(13): 21-25 (in Chinese)
- [20] Tomikawa J, Homma T, Tajima S, Shibata T, Inamoto Y, Takase K, Inoue N, Ohkura S, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. Molecular characterization and estrogen regulation of hypothalamic *KiSS1* gene in the pig [J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 82(2): 313-319
- [21] Xiong J, Karsch F J, Lehman M N. Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: Changes in synaptic inputs onto GnRH neurons[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(3): 1240-1250
- [22] Merkley C M, Coolen L M, Goodman R L, Lehman M N. Evidence for changes in numbers of synaptic inputs onto KNDy and GnRH neurones during the preovulatory LH surge in the ewe[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2015, 27(7): 624-635
- [23] El-Tarabany M S, Zagloul A W, El-Tarabany A A, Awad A. Association analysis of polymorphism in *KiSS1* gene with reproductive traits in goats [J]. *Animal Reproduction Science*, 2017, 180: 92-99
- [24] Messenger S, Chatzidakis E E, Ma D, Hendrick A G, Zahn D, Dixon J, Thresher R R, Malinge I, Lomet D, Carlton M B L, Colledge W H, Caraty A, Colledge W H. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(5): 1761-1766
- [25] 王军, 孙蕾, 吕文发, 姜玉杰. *KiSS-1*/*GPR54* 系统在不同发情周期母羊下丘脑中的表达规律[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2011, 39(12): 49-52
Wang J, Sun L, Lu W F, Qi Y J. Expression patterns of *KiSS-1*/*GPR54* system in different hypothalamus of estrous cycle in ewe[J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2011, 39(12): 49-52 (in Chinese)
- [26] Robert L. Goodman R L, Lehman M N, Smith J T, Coolen L M, De Oliveira C V, Jafarzadehshirazi M R, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Clarke I J. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(12): 5752-5760
- [27] Wagner G C, Johnston J D, Clarke I J, Lincoln G A, Hazlerigg D G. Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal [J]. *Endocrinology*, 2007, 149(1): 32-39
- [28] Luridiana S, Mura M C, Daga C, Cosso G, Bodano S, Farci F, Zidda F, Carcangiu V. Influences of melatonin treatment, melatonin receptor 1A (MTNR1A) and kisspeptin (*KiSS-1*) gene polymorphisms on first conception in Sarda ewe lambs [J]. *Reproduction Fertility and Development*, 2016, 28(6): 750-756
- [29] Smith J T, Clarke I J. Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 324(1-2): 102-109
- [30] Jafarzadeh Shirazi M R, Zamiri M J, Salehi M S, Moradi S, Tamadon A, Namavar M R, Akhlaghi A, Tsutsui K, Caraty A. Differential expression of RFamide-related peptide, a mammalian gonadotrophin-inhibitory hormone orthologue, and kisspeptin in the hypothalamus of Abadeh ecotype does during breeding and anoestrous seasons [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2014, 26(3): 186-194
- [31] Beskonakli E, Palaoglu S, Aksaray S, Alanoglu G, Turhan T, Taskin Y. Effect of pinealectomy on immune parameters in rats with *Staphylococcus aureus* infection [J]. *Neurosurgical Review*, 2001, 24(1): 26-30
- [32] Tsutsui K, Bentley G E, Kriegsfeld L J, Osugi T, Seong J Y, Vaudry H. Discovery and evolutionary history of gonadotrophin-inhibitory hormone and kisspeptin: New key neuropeptides controlling reproduction [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2010, 22(7): 716-727
- [33] 王梁, 刘国世, 史文清, 史建民, 高超, 田秀芝, 张璐, 赵广华, 商业, 于鹏, 朱世恩. 外源褪黑激素对梅花鹿超数排卵及体内促性腺激素的影响[J]. *中国鹿业进展*, 2011
Wang L, Liu G S, Shi W Q, Shi J M, Gao C, Tian X Z, Zhang L, Zhao G H, Shang Y, Yun P, Zhu S E. Effects of exogenous melatonin on superovulation and gonadotropin in Sika deer [J]. *China Deer Industry Progress*, 2011 (in Chinese)
- [34] Li X, Su J, Lei Z, Zhao Y, Jin M, Fang R, Zheng L C, Jiao Y. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its receptor

- in the female pig: cDNA cloning, expression in tissues and expression pattern in the reproductive axis during the estrous cycle[J]. *Peptides*, 2012, 36(2): 176-185
- [35] Li H, Song H, Huang M, Nie H, Wang Z, Wang F. Impact of food restriction on ovarian development, RFamide-related peptide-3 and the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in prepubertal ewes[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2014, 49(5): 831-838.
- [36] 李卉. *RFRP-3* 在幼龄绵羊组织中的表达及其参与繁殖营养调控的研究[D]. 江苏:南京农业大学, 2014
- Li H. Expression of *RFRP-3* in young sheep tissues and its participation in reproductive regulation[D]. Jiangsu: Nanjing Agricultural University, 2014(in Chinese)
- [37] 甘超,胡深强,苟华,袁鑫,王继文,李亮. 鹅 GnIH 受体基因的克隆及组织表达特性研究[J]. 中国家禽, 2014, 36(1): 4
- Gan C, Hu S Q, Yan H, Yuan X, Wang J W, Li L. Cloning and characterization of GnIH receptor genes in geese[J]. *Chinese Poultry*, 2014, 36(1): 4(in Chinese)
- [38] 侯玉晶,雷治海,苏娟,姚远,李月勤,于晓磊,刘倩. 兔神经肽 S 及其受体基因的克隆,组织表达及热应激对其表达的影响[J]. 中国农业科学, 2011, 44(12): 2589-2600
- Hou Y J, Lei Z H, Su J, Yao Y, Li Y Q, Yu X L, Liu Q. Cloning, tissue expression and effect of heat stress on expression of rabbit neuropeptide S and its receptors[J]. *Chinese Agricultural Science*, 2011, 44(12): 2589-2600(in Chinese)
- [39] Clarke I J, Sari I P, Qi Y, Smith J T, Parkington H C, Ubuka T, Iqbal J, Li Q, Tilbrook A, Morgan K, Pawson A J, Tsutsui K, Millar R P, Bentley G E. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(11): 5811-5821
- [40] Ancel C, Bentsen A H, Sébert M E, Tena-Sempere M, Mikkelsen J D, Simonneaux V. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: The exception proves the rule[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(3): 1352-1363
- [41] Dardente H, Birnie M, Lincoln G A, Hazlerigg D G. RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod[J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2008, 20(11): 1252-1259
- [42] Smith J T, Coolen L M, Kriegsfeld L J, Sari I P, Jaafarzadehshirazi M R, Maltby M, Bateman K, Goodman R L, Tilbrook A J, Ubuka T, Bentley G E, Clarke I J, Lehman M N. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: A novel medium for seasonal breeding in the sheep [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(11): 5770-5782
- [43] Oishi H, Klausen C, Bentley G E, Osugi T, Tsutsui K, Gilks C B, Yano T, Leung P C K. The human gonadotropin-inhibitory hormone ortholog RFamide-related peptide-3 suppresses gonadotropin-induced progesterone production in human granulosa cells[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(7): 3435-3445
- [44] Beymer M, Henningsen J, Bahougne T, Simonneaux V. The role of kisspeptin and RFRP in the circadian control of female reproduction[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 438(15): 89-99
- [45] Singh P, Krishna A, Sridaran R, Tsutsui K. Immunohistochemical localization of GnRH and RFamide-related peptide-3 in the ovaries of mice during the estrous cycle[J]. *Journal of Molecular Histology*, 2011, 42(5): 371
- [46] 龚金秋,阳美霞,唐娇美,曾杰,王水莲. *RFRP-3* 对哺乳动物生殖激素的调节作用[J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36(4): 31-33
- Gong J Q, Yang M X, Tang J M, Zeng J, Wang S L. Regulatory effects of *RFRP-3* on reproductive hormones in mammals[J]. *Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 36(4): 31-33(in Chinese)

责任编辑:杨爱东