

# 绵羊黄体期卵巢类固醇激素调节基因的表达研究

应诗家\*, 彭中友, 李燕, 蔡柳萍, 施振旦

(江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014)

**摘要:** 旨在研究黄体期后期湖羊卵巢黄体和不同大小卵泡类固醇激素调节基因表达的变化。选用体重 40 kg 左右的湖羊 10 头, 同期发情结束后第 12 天屠宰, 收集黄体和不同大小卵泡组织。采用 Real-time PCR 技术检测基因表达水平。试验结果显示, 与直径  $\leq 2.5$  mm 卵泡相比, 直径  $> 2.5$  mm 卵泡的 *CYP17A1*、*CYP19A1* 和 *VLDLR* 基因表达水平显著提高 ( $P < 0.05$ ), *ESR2* 基因表达水平极显著降低 ( $P < 0.01$ ); 不同大小卵泡内 *STAR*、*CYP11A1*、*FSHR*、*LHR*、*ESR1*、*LDLR* 和 *SR-BI* 基因表达水平差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但直径  $> 2.5$  mm 卵泡的 *ESR1* ( $P = 0.090$ ) 和 *SR-BI* ( $P = 0.093$ ) 基因表达水平高于直径  $\leq 2.5$  mm 卵泡; 与卵泡相比, 黄体几乎不表达 *CYP17A1* 和 *CYP19A1*, 但 *STAR*、*CYP11A1*、*FSHR*、*ESR2*、*LHR*、*ESR1*、*LDLR*、*SR-BI* 和 *VLDLR* 基因在黄体中高表达。试验结果表明类固醇激素调节基因参与调节湖羊黄体期卵泡生长和黄体孕酮合成功能。

**关键词:** 湖羊; 卵巢; 类固醇调节基因

中图分类号: S826; S814.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)11-1775-06

## Study on Ovarian Sterol-regulatory Genes Expression in Sheep during Luteal Phase

YING Shi-jia\*, PENG Zhong-you, LI Yan, CAI Liu-ping, SHI Zhen-dan

(Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** This study was conducted to investigate the ovine key sterol-regulatory genes expression from corpora lutea and different-sized follicles in the later luteal phase. 10 cast ages Hu sheep of proven fertility were used. After estrus synchronization, all ewes were slaughtered on day 12 of estrous cycle, and corpora lutea and different-sized follicles were collected at the same time. The gene expression was determined by real-time PCR method. Compared with follicles  $\leq 2.5$  mm in diameter, the follicular very low density lipoprotein receptor (*VLDLR*), cytochrome P450 (*CYP17A1*) and cytochrome P450 aromatase (*CYP19A1*) mRNA expression were significantly increased ( $P < 0.05$ ), however, follicular estrogen receptor 2 (*ESR2*) mRNA expression was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). There were no significant effects of follicle size on follicular steroidogenic acute regulatory protein (*STAR*), cytochrome P450scc (*CYP11A1*), FSH receptor (*FSHR*), LH receptor (*LHR*), estrogen receptor 1 (*ESR1*), low-density lipoprotein receptor (*LDLR*) and scavenger receptor-BI (*SR-BI*) mRNA expression, however, *ESR1* ( $P = 0.090$ ) and *SR-BI* ( $P = 0.093$ ) expression trended increase in follicles  $> 2.5$  mm. *CYP19A1* and *CYP17A1* were mainly, as expected, expressed in follicles, however, *STAR*, *CYP11A1*, *FSHR*, *ESR2*, *LHR*, *ESR1*, *LDLR*, *SR-BI* and *VLDLR* genes were preferentially expressed in corpora lutea. In conclusion, sterol-regulatory genes took part in mediating follicular growth and

收稿日期: 2013-06-13

基金项目: 国家科技支撑项目(2011BAD19B02-6); 江苏省双创人才项目(苏人才办[2011]32号); 省六大人才高峰项目(苏农函[2012]35号)

作者简介: 应诗家(1984-), 男, 安徽巢湖人, 博士, 助理研究员, 主要从事动物生殖生物学研究

\* 通信作者: 应诗家, Tel: 025-84390772, E-mail: ysj2009205007@yahoo.com

progesterone synthesis of corpora lutea.

**Key words:** Hu sheep; ovary; sterol-regulatory gene

卵巢内类固醇调节基因维持卵泡类固醇激素的稳态,对卵泡发育、卵泡和黄体功能维持具有重要的作用。细胞膜内胆固醇主要通过膜上高密度脂蛋白受体(SR-BI)、低密度脂蛋白受体(LDLR)和极低密度脂蛋白受体(VLDLR)转运血液脂蛋白<sup>[1-3]</sup>,再由类固醇合成急性调节蛋白(STAR)将胆固醇从线粒体外膜转运至内膜,经 CYP11A1(P450scc)催化成孕烯醇酮,经膜细胞 CYP17A1(P450c17)催化合成雄激素,生成的雄激素由颗粒细胞 CYP19A1(P450aro)催化合成雌激素<sup>[1]</sup>。随卵泡增大卵泡液雌二醇浓度增加<sup>[4]</sup>,雌激素一方面通过下丘脑-垂体轴调节 LH 和 FSH 影响卵泡类固醇激素合成,另一方面可通过雌激素受体<sup>[5]</sup>降低 CYP17A1 表达<sup>[6-7]</sup>,抑制膜细胞类固醇激素合成<sup>[8]</sup>。

黄体快速发育,孕酮大量合成,以及卵泡发育的动态变化是处于黄体期的成年母羊最大的生理特点之一<sup>[9]</sup>。在黄体期短期补饲(4~6 d)促进卵泡发育<sup>[10-11]</sup>和排卵<sup>[12]</sup>,而卵泡期补饲没有促排卵效应<sup>[13]</sup>。不同饲喂水平通过改变黄体期大卵泡内类固醇激素稳态影响卵泡发育<sup>[11]</sup>。因此,研究黄体期不同发育阶段卵泡和黄体类固醇调节基因的表达,不仅有利于了解类固醇激素调节基因在卵泡发育和黄体功能的作用,而且对进一步研究营养影响绵羊繁殖的分子调节机制具有重要的意义。本试验在样本处于同一营养水平和生理阶段下,研究湖羊黄体和不同发育卵泡芳香化酶基因、促性腺激素受体基因、脂蛋白转运载体基因表达的变化,为卵泡发育以及营养影响繁殖的分子机理提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

在徐州申宁羊业有限公司选择体重 40 kg、体况 2.5 左右<sup>[14]</sup>,3~4 岁的经产健康湖羊母羊 10 头,半封闭式羊舍单栏饲养(单栏大小:长 2.0 m,宽 1.3 m)。每天分别于 9:00 和 17:00 饲喂 2 次,自由饮水,自然光照。每天公羊试情,发情结束(发情周期第 0 天)后第 12 天屠宰,取卵巢。

### 1.2 主要试剂

D-PBS 缓冲液(Invitrogen 公司);50 bp Mark-

er、SYBR PrimeScript RT Master Mix(TaKaRa 公司);Taq PCR Master Mix(博尔迪公司);FastStart Universal SYBR Green Master(罗氏公司);其他常规试剂购自南京寿德化玻公司。

### 1.3 卵巢处理

卵巢置于冰预冷的 D-PBS 中,用眼科剪和眼科镊剥离黄体。参考 A. Somchit 等的方法<sup>[15]</sup>,分离可视大于 1.0 mm 的卵泡,放入含 D-PBS 的塑料培养皿中,培养皿下放一个方格纸栅格(精确到 1 mm)测量卵泡直径,按 R. M. Moor 等<sup>[16]</sup>的方法剔除闭锁卵泡。分离的卵泡分别按直径 < 2.0、2.0~2.5 和 > 2.5 mm 3 组放在含 1 mL D-PBS 的 24 孔培养皿中,每头羊 < 2.0 mm 卵泡放一孔,2.0~2.5 mm 卵泡放一个孔,单独 > 2.5 mm 卵泡放一个孔,眼科剪对半切开卵泡,4 ℃,13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,弃上清液。分离的黄体和卵泡组织液氮保存。每头羊卵巢在 30 min 内分离完成,且在生物冰上操作。

### 1.4 总 RNA 提取和反转录

取小块黄体组织、1.0~2.0 mm 卵泡、2.0~2.5 mm 和 > 2.5 mm 卵泡组织,按罗氏试剂盒说明提取总 RNA。RNA 质量检测合格后,参照 TaKaRa 反转录试剂盒说明,合成 cDNA 第一链,-20 ℃ 保存备用。反应体系为 10 μL:2 μL 5×PrimeScript® Buffer,8 μL RNA(<500 ng)。反转录程序:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃。

### 1.5 PCR 反应和测序

本研究中 STAR、CYP17A1、CYP19A1、ESR1 和 ESR2 基因引物序列参照文献<sup>[17]</sup>,其他特异性引物根据 GenBank 登录号,利用 Primer Premier 5.0 软件设计,引物信息见表 1,由上海英骏生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系为 10 μL:2 × Taq PCR Master Mix 5 μL,ddH<sub>2</sub>O 3.5 μL,上游和下游引物各 0.25 μL,RT 产物 1 μL。反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环;72 ℃ 延伸 7 min,4 ℃ 保存。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定,由上海英骏生物技术有限公司测序。

表 1 定量 PCR 引物信息

Table 1 Primer pairs used for Real-time PCR

目的基因 Target gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	登录号 Accession No.	产物大小 Product size	$R^2$	扩增效率 E
<i><math>\beta</math>actin</i>	GCAGTTGTGGATCAGCAAGC GGGCAATCTCATCTCGTTTTT	OAU39357	144	0.998	1.94
<i>VLDLR</i>	CTGGACTGATGCGGCTTCTA AACCATTTCATTCCTGCTTTT	NM_174489	183	0.997	1.98
<i>LDLR</i>	GCCATTCATATCCCCGACA CGCCCAGAGCACATCTTACA	EE760445	92	0.998	1.96
<i>SR-BI</i>	TCCTGTGGGGCTATGACGAC CCCTGTGAACACGGTGAAGA	GT873938	137	0.998	1.99
<i>FSHR</i>	TGTTATGTCCCTCCTTGTGCTC CGCTTGGCTATCGTGGTGTC	L36115	129	0.990	1.87
<i>LHR</i>	GGGCTCTACCTGCTACTCATTG CATTCCCTGTCTGCCAGTCTAT	L36329	88	0.994	1.88
<i>ESR1</i>	TGCCATGTTTCAAACCCATCTTC TCTATGACCAATGACCTCTCTGTG	AY033393	129	0.992	1.82
<i>ESR2</i>	TGCTGCTGGAGATGCTGAATG GGTTTCTGGGAGCCCTCTTTG	NM_001009737	112	0.992	1.84
<i>STAR</i>	ACACCATGTGGAATGTCAGGCT CACACCTTTCAACAAGCAACCC	NM_174189	263	0.993	1.85
<i>CYP11A1</i>	GTTTCGCTTTGCCTTTGAGTC ACAGTTCTGGAGGGAGGTTGA	NM_001093789	158	0.998	1.95
<i>CYP17A1</i>	CTTACCATTGACAAAGGCACAGAC GCTTAATGATGGCGAGATGAGTTG	NM_001009483	144	0.998	1.92
<i>CYP19A1</i>	TCGTCCTGGTCACCCTTCTG CGGTCTCTGGTCTCGTCTGG	AJ012153	115	0.998	1.96

## 1.6 Real-time PCR 分析

以管家基因  *$\beta$ actin* 为内参,每个样品重复 3 次,取平均 Ct 值进行计算。利用梯度稀释的 cDNA 为模板,作标准曲线。扩增效率  $E = e^{-1/\text{slope}}$  (表 1),按  $R = [E_{\beta\text{actin}}^{Ct_{\beta\text{actin}}} / E_{\text{target}}^{Ct_{\text{target}}}]$  确定定量结果<sup>[17]</sup>。

定量 PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ :1  $\mu\text{L}$  RT 产物,上游和下游引物各 0.6  $\mu\text{L}$ ,7.8  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O,10  $\mu\text{L}$  FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)。反应程序:50  $^{\circ}\text{C}$  2 min,95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;PCR 循环,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,读板,共 40 个循环。

## 1.7 统计分析

数据采用 SPSS 13.0 软件统计分析,结果以“平均值 $\pm$ 标准误”表示。 $t$  检验分析直径  $\leq 2.5$  mm 和直径  $> 2.5$  mm 卵泡基因表达差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 检测

总 RNA 检测结果看出 28S 与 18S 灰度比约为 2:1,并且无拖尾现象出现,表明提取的总 RNA 完整,质量可靠。同时所获得的总 RNA  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  为 1.8~2.0,表明 RNA 纯度高,可用于后续试验(图略)。

### 2.2 目的基因和 *$\beta$ actin* 扩增

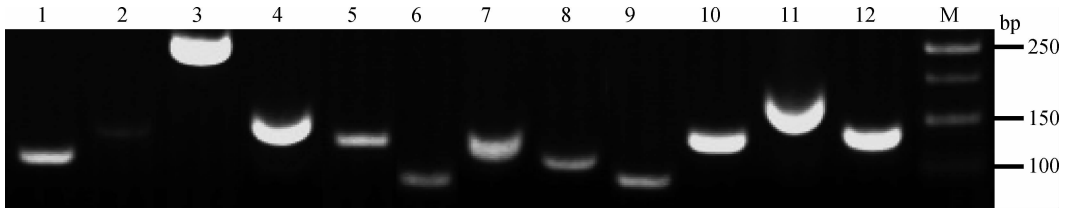
用设计的引物分别进行 RT-PCR 扩增,PCR 产物电泳检测结果见图 1,与欲扩增目的片段大小一致。通过测序,并与 GenBank 已登录(表 1)的序列比对,同源性的 100%,表明 PCR 扩增片段为湖羊特异的目的基因片段。

### 2.3 黄体期卵巢芳香化酶基因表达

黄体期卵巢芳香化酶基因表达见表 2。其中直

径 > 2.5 mm 卵泡 CYP17A1 和 CYP19A1 基因表达水平极显著高于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡 CYP17A1 和 CYP19A1 基因表达水平 ( $P < 0.01$ ); 不同大小卵泡内 STAR 和 CYP11A1 基因表达水平差异不显著

( $P > 0.05$ )。与卵泡相比, 黄体几乎不表达 CYP17A1 和 CYP19A1, 但 STAR 和 CYP11A1 基因在黄体中高表达 ( $P < 0.01$ )。



1~12. CYP19A1, CYP17A1, STAR, CYP11A1, FSHR, LHR, ESR1, ESR2, LDLR, SR-BI, VLDLR 和  $\beta$ -actin 基因扩增片段; M. DNA 相对分子质量标准  
1-12. Fragment amplified of CYP19A1, CYP17A1, STAR, CYP11A1, FSHR, LHR, ESR1, ESR2, LDLR, SR-BI, VLDLR and  $\beta$ -actin gene, respectively; M. 50 bp DNA marker

图 1 卵巢类固醇调节基因的 RT-PCR 电泳图

Fig. 1 RT-PCR of sterol-regulatory genes in ovary

2.4 黄体期卵巢促性腺激素和雌激素受体基因表达

黄体期卵巢促性腺激素和雌激素受体基因表达见表 2。其中直径 > 2.5 mm 卵泡 ESR2 基因表达水平极显著低于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡 ESR2 基因表达水平 ( $P < 0.05$ ); 不同大小卵泡内 FSHR, LHR 和 ESR1 基因表达水平差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但直径 > 2.5 mm 卵泡 ESR1 基因表达水平高于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡 ESR1 基因表达水平 ( $P = 0.090$ )。与卵泡相比, 黄体 FSHR 和 ESR2 基因表达下降 ( $P < 0.05$ ), LHR 和 ESR1 基因表达上升 ( $P < 0.05$ )。

2.5 黄体期卵巢脂蛋白受体基因表达

黄体期卵巢脂蛋白受体基因表达见表 2。其中直径 > 2.5 mm 卵泡 VLDLR 基因表达水平显著高于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡 ESR2 基因表达水平 ( $P < 0.05$ ); 不同大小卵泡内 LDLR 和 SR-BI 基因表达水平差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 但直径 > 2.5 mm 卵泡 SR-BI 基因表达水平高于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡 SR-BI 基因表达水平 ( $P = 0.093$ )。与卵泡相比, LDLR, SR-BI 和 VLDLR 基因在黄体中高表达 ( $P < 0.05$ )。

表 2 绵羊黄体期卵巢类固醇调节基因表达

Table 2 Sterol-regulatory gene expression in ovine ovary during luteal phase

项目 Item	卵泡直径 Follicles			黄体 Corpus luteum	P 值 P value
	直径 ≤ 2.5 mm 卵泡	直径 > 2.5 mm 卵泡	P 值		
	Follicles ≤ 2.5 mm in diameter	Follicles > 2.5 mm in diameter	P value		
CYP19A1	15.72 ± 4.19	174.47 ± 49.49**	0.000	0.36 ± 0.03	0.000
CYP17A1	16.47 ± 2.95	64.81 ± 13.04**	0.002	1.70 ± 0.28	0.000
STAR	61.26 ± 17.64	122.71 ± 30.15	0.127	5 838.08 ± 487.92	0.000
CYP11A1	31.26 ± 9.66	23.69 ± 4.12	0.958	154.77 ± 6.42	0.000
FSHR	80.64 ± 14.05	53.08 ± 6.69	0.090	38.11 ± 10.81	0.036
LHR	504.37 ± 74.15	535.98 ± 90.63	0.788	686.91 ± 41.69	0.022
ESR1	84.12 ± 12.06	109.69 ± 29.72	0.191	169.82 ± 11.44	0.000
ESR2	28.75 ± 3.76*	18.52 ± 2.03	0.025	5.53 ± 0.33	0.000
LDLR	32.25 ± 6.76	39.04 ± 5.81	0.454	199.09 ± 18.90	0.000
SR-BI	59.05 ± 8.38	80.03 ± 8.72	0.093	707.70 ± 49.89	0.000
VLDLR	4.79 ± 0.43	6.62 ± 0.66*	0.026	12.44 ± 0.84	0.000

\*. 差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*. 差异极显著 ( $P < 0.01$ )

\*. Indicates significant difference in the same row ( $P < 0.05$ ); \*\*. Indicates extremely significantly different ( $P < 0.01$ )

### 3 讨论

#### 3.1 类固醇激素合成酶基因表达与卵巢功能的关系

哺乳动物卵巢内 CYP19A1 是雌激素合成相关的限速酶, CYP17A1 是雄激素合成相关的限速酶, 而 STAR 和 CYP11A1 是孕酮合成相关的限速酶<sup>[17]</sup>。直径 > 2.5 mm 卵泡内雌二醇和雄烯二酮平均浓度极显著高于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡内雌二醇和雄烯二酮平均浓度<sup>[4]</sup>。随着卵泡发育, 大卵泡对 FSH 敏感性增强, 而 FSH 促进颗粒细胞 CYP19A1 表达<sup>[18-19]</sup>。本研究发现直径 > 2.5 mm 卵泡 CYP17A1 和 CYP19A1 基因表达水平极显著高于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡 CYP17A1 和 CYP19A1 基因表达水平。不同大小卵泡内 STAR 和 CYP11A1 基因表达水平差异不显著, 这与 > 2.5 mm 卵泡内孕酮平均浓度与 ≤ 2.5 mm 卵泡内孕酮平均浓度相似一致<sup>[4]</sup>。本试验中, 与卵泡相比, 黄体几乎不表达 CYP17A1 和 CYP19A1, 但 STAR 和 CYP11A1 基因在黄体中高表达, 这与黄体期高孕酮浓度密切相关。

#### 3.2 促性腺激素受体和雌激素受体基因表达与卵巢功能的关系

卵巢内雌二醇通过促进促性腺激素受体和类固醇激素合成酶基因表达调节卵泡发育<sup>[20]</sup>。在卵泡发育中, 卵泡膜细胞在 LH 刺激下合成的雄激素在 FSH 刺激下在颗粒细胞中合成雌激素<sup>[21]</sup>。雌激素一方面通过下丘脑-垂体轴调节 LH 和 FSH 影响卵泡类固醇激素合成<sup>[8]</sup>。本试验发现不同大小卵泡内 FSHR 和 LHR 基因表达水平差异不显著, 虽然随着卵泡发育, 大卵泡对 FSH 敏感性增强, 引起雌二醇分泌增加, 但没有引起促性腺激素受体的变化。与卵泡相比, 黄体 FSHR 表达水平下降, LHR 表达水平升高, 说明黄体期卵巢卵泡对 FSH 敏感性更高, 而黄体对 LH 敏感性更高。

卵泡内雌二醇浓度升高, 激活雌激素受体(ER)信号, 增强 FSH 活性, 引起卵泡快速成熟和分化<sup>[21]</sup>。卵泡内通过雌激素受体<sup>[5]</sup>降低 CYP17A1 表达<sup>[6-7]</sup>, 抑制膜细胞类固醇激素合成<sup>[8]</sup>。本试验发现直径 > 2.5 mm 卵泡 ESR2 基因表达水平显著低于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡 ESR2 基因表达水平, 直径 > 2.5 mm 卵泡 ESR1 基因表达水平高于直径 ≤ 2.5 mm 卵泡 ESR1 基因表达水平 ( $P=0.090$ )。与卵泡相比, 黄体 FSHR 和 ESR2 基因表达下降 ( $P<0.05$ ), LHR 和 ESR1 基因表达上升 ( $P<0.05$ )。

#### 3.3 脂蛋白受体基因表达与卵巢功能的关系

胆固醇是卵泡和黄体合成类固醇激素重要的底物<sup>[22]</sup>, 血浆中脂蛋白是卵巢胆固醇主要来源<sup>[23]</sup>。高密度脂蛋白受体、低密度脂蛋白受体和极低密度脂蛋白受体是细胞膜转运胆固醇的特异性载体<sup>[1-3]</sup>。黄体快速形成并伴随大量孕酮生成是黄体期卵泡最大的生理特征<sup>[9]</sup>。哺乳动物黄体发育过程中黄体 SR-BI 表达逐渐升高<sup>[9, 24]</sup>, 表明胆固醇吸收能力逐渐增强。本试验中脂蛋白受体基因 LDLR、SR-BI 和 VLDLR mRNA 主要在黄体细胞中表达, 说明绵羊黄体期血液胆固醇主要被黄体细胞吸收, 这与黄体期高孕酮浓度相关。不同大小卵泡显著影响 VLDLR mRNA 表达水平, 表明 VLDLR 参与黄体期卵泡生长。

### 4 结论

4.1 黄体期随卵泡增大, 卵泡 CYP19A1、CYP17A1 和 VLDLR 基因表达升高, 与卵泡发育正相关, ESR2 基因表达下降, 与卵泡发育负相关。

4.2 与卵泡相比, 黄体 LDLR、SR-BI、VLDLR、STAR 和 CYP11A1 基因高表达, 与黄体期高孕酮浓度密切相关。

#### 参考文献:

- [1] MILLER W L, AUCHUS R J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders[J]. *Endocr Rev*, 2011, 32 (1): 81-151.
- [2] AZHAR S, LEERS-SUCHETA S, REAVEN E. Cholesterol uptake in adrenal and gonadal tissues; the SR-BI and 'selective' pathway connection[J]. *Front Biosci*, 2003, 8: S998-S1029.
- [3] MURPHY B D, SILAVIN S L. Luteotrophic agents and steroid substrate utilization[J]. *Oxf Rev Reprod Biol*, 1989, 11: 179-223.
- [4] 应诗家, 王昌龙, 贾若欣, 等. 湖羊不同发育阶段卵泡内代谢产物和激素含量的比较研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(2): 180-185.
- [5] BANKS P K, MEYER K, BRODIE A M. Regulation of ovarian steroid biosynthesis by estrogen during proestrus in the rat[J]. *Endocrinology*, 1991, 129 (3): 1295-1304.
- [6] SAKAUE M, ISHIMURA R, KUROSAWA S, et al. Administration of estradiol-3-benzoate down-regulates the expression of testicular steroidogenic enzyme

- genes for testosterone production in the adult rat[J]. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(2): 107-113.
- [7] GOVOROUN M, MCMEEL O M, MECHEROUKI H, et al. 17beta-estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(5): 1841-1848.
- [8] ERICKSON G F, MAGOFFIN D A, DYER C A, et al. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships [J]. *Endocr Rev*, 1985, 6(3): 371-399.
- [9] MIRANDA-JIMENEZ L, MURPHY B D. Lipoprotein receptor expression during luteinization of the ovarian follicle[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(4): E1053-E1061.
- [10] 应诗家, 聂海涛, 张国敏, 等. 不同营养水平对湖羊黄体期血液理化指标及卵泡发育的影响[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(8): 1606-1612.
- [11] YING S, WANG Z, WANG C, et al. Effect of different levels of short-term feed intake on folliculogenesis and follicular fluid and plasma concentrations of lactate dehydrogenase, glucose, and hormones in Hu sheep during the luteal phase [J]. *Reproduction*, 2011, 142(5): 699-710.
- [12] SCARAMUZZI R J, BROWN H, DUPONT M. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: a perspective[J]. *Reprod Dom Anim*, 2010, 45 (Suppl. 3): 32-41.
- [13] VIÑOLES C. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in ewe[D]. *Doctoral Thesis*, 2003: 109.
- [14] RUSSEL A J F, DONEY J M, GUNN R G. Subjective assessment of body fat in live sheep[J]. *J Agric Sci; Cambridge*, 1969, 72: 451-454.
- [15] SOMCHIT A, CAMPBELL B K, KHALID M, et al. The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid[J]. *Theriogenology*, 2007, 68(7): 1037-1046.
- [16] MOOR R M, HAY M F, DOTT H M, et al. Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep[J]. *J Endocrinol*, 1978, 77 (3): 309-318.
- [17] DROUILHET L, TARAGNAT C, FONTAINE J, et al. Endocrine characterization of the reproductive axis in highly prolific lacaune sheep homozygous for the FecLL mutation[J]. *Biol Reprod*, 2010, 82(5): 815-824.
- [18] MANI A M, FENWICK M A, CHENG Z, et al. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells[J]. *Reproduction*, 2010, 139(1): 139-151.
- [19] SEKAR N, GARMEY J C, VELDHUIS J D. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 159(1-2): 25-35.
- [20] ROSENFELD C S, WAGNER J S, ROBERTS R M, et al. Intraovarian actions of oestrogen[J]. *Reproduction*, 2001, 122(2): 215-226.
- [21] TANIGUCHI F, COUSE J F, RODRIGUEZ K F, et al. Estrogen receptor-alpha mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17a1 (cytochrome P450, steroid 17alpha-hydroxylase/17, 20 lyase) expression [J]. *FASEB J*, 2007, 21(2): 586-595.
- [22] WILTBANK M C, DISKIN M G, FLORES J A, et al. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F2 alpha[J]. *Biol Reprod*, 1990, 42(2): 239-245.
- [23] ARGOV N, SKLAN D. Expression of mRNA of lipoprotein receptor related protein 8, low density lipoprotein receptor, and very low density lipoprotein receptor in bovine ovarian cells during follicular development and corpus luteum formation and regression [J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 68(2): 169-175.
- [24] LI X, PEEGEL H, MENON K M. *In situ* hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(7): 3043-3049.