

小尾寒羊黄体期和卵泡期生殖轴凋亡基因的表达研究及其与发情的关系

曹晓涵^{1,2#}, 刘秋月^{1#}, 王翔宇¹, 狄冉¹, 胡文萍¹,
张效生³, 张金龙³, 曾宪垠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. 四川农业大学生命科学院, 雅安 625014; 3. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300381)

摘要:旨在分析 *Bad*、*Bax*、*Bcl-2* 和 *Bcl-xL* 基因在小尾寒羊黄体期和卵泡期下丘脑-垂体-性腺轴各组织中的表达差异, 并探究这些基因与绵羊常年发情性状的关系。以常年发情小尾寒羊为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术, 对比分析了 *Bad*、*Bax*、*Bcl-2* 和 *Bcl-xL* 4 个基因在不同繁殖状态下(黄体期和卵泡期)小尾寒羊下丘脑-垂体-性腺轴各组织中的表达特征, 采用放射免疫法(RIA)检测相应时期血清雌二醇和孕酮含量。结果表明, *Bad*、*Bax*、*Bcl-2* 和 *Bcl-xL* 4 个基因在下丘脑、垂体、卵巢均有表达, *Bad* 和 *Bcl-2* 在黄体期的垂体和卵巢中的表达量均显著高于卵泡期($P < 0.05$), 在下丘脑中 2 个时期表达量都没有显著差异($P > 0.05$); *Bax* 和 *Bcl-xL* 在黄体期下丘脑、垂体和卵巢中的表达量与卵泡期均无显著差异($P > 0.05$)。黄体期血清中孕酮含量显著高于卵泡期($P < 0.05$), 而 2 个时期血清中雌二醇含量没有显著差异($P > 0.05$)。 *Bad* 和 *Bcl-2* 基因在小尾寒羊黄体期和卵泡期的垂体和卵巢中差异表达, 可能参与调控黄体期到卵泡期的发情状态转换, 从而启动小尾寒羊发情。

关键词: 绵羊; 凋亡相关基因; 生殖轴; 组织表达; 发情

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)11-2091-07

Expression Levels of Apoptotic Genes in HPG Axis during Luteal and Follicular Periods and Their Association with Estrus in Small Tail Han Sheep

CAO Xiao-han^{1,2#}, LIU Qiu-yue^{1#}, WANG Xiang-yu¹, DI Ran¹, HU Wen-ping¹,
ZHANG Xiao-sheng³, ZHANG Jin-long³, ZENG Xian-yin², CHU Ming-xing^{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 Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
3. Tianjin Institute of Animal Sciences, Tianjin 300381, China)

Abstract: In order to identify the differential expression levels of *Bad*, *Bax*, *Bcl-2* and *Bcl-xL* in hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis tissues during luteal and follicular periods, and to study the association of these genes with year-round estrus in Small Tail Han sheep. Year-round

收稿日期: 2017-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501926); 国家转基因科技重大专项(2016ZX08009-003-006; 2016ZX08010-005-003); 中国博士后科学基金面上项目(2016M591308); 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; 2013ywf-zd-1; 2015ywf-zd-2; 2015ywf-zd-8); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS13; CAAS-XTCX2016010-01-03; CAAS-XTCX2016010-03-03; CAAS-XTCX2016011-02-02); 宁夏农林科学院科技创新先导资金项目(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: 曹晓涵(1984-), 女, 四川成都人, 讲师, 博士, 主要从事绵羊四季发情分子机制研究, E-mail: caoxiaohan2007@hotmail.com; 刘秋月(1983-), 女, 云南丽江人, 博士, 副研究员, E-mail: liuqiuyue@caas.cn, Tel: 010-62816001。# 曹晓涵和刘秋月为并列第一作者

* 通信作者: 储明星, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事羊优异繁殖性状的分子机理研究, E-mail: mxchu@263.net

estrous Small Tail Han ewes were selected as tested subjects, and real-time PCR method was used to detect *Bad*, *Bax*, *Bcl-2* and *Bcl-xL* mRNA expression by using 18S RNA as reference gene in hypothalamus-pituitary-gonadal axis tissues during luteal and follicular periods. The serum estradiol and progesterone contents were measured by RIA at the corresponding time points. The results showed that *Bad*, *Bax*, *Bcl-2* and *Bcl-xL* genes were all expressed in hypothalamus, pituitary and ovary tissues. The expression levels of *Bad* and *Bcl-2* genes in pituitary and ovary tissues in the luteal phase were higher than those in the follicular phase ($P < 0.05$). The expression levels of *Bad* and *Bcl-2* genes in hypothalamus had no significant differences between the luteal phase and the follicular phase ($P > 0.05$). The expression levels of *Bax* and *Bcl-xL* genes in hypothalamus, pituitary and ovary tissues had no significant differences between the luteal phase and the follicular phase ($P > 0.05$). The concentration of progesterone in the luteal phase was significantly higher than that in the follicular phase ($P < 0.05$), while the estradiol concentration had no significant difference between the 2 stages ($P > 0.05$). The results indicated that the expression levels of *Bad* and *Bcl-2* genes had great differences during the luteal and follicular periods of Small Tail Han sheep, which might regulate the stage transition from luteal to follicular periods, and the 2 genes were associated with estrus onset in Small Tail Han sheep.

Key words: sheep; apoptosis-related genes; reproductive axis; tissue expression; estrus

大多数绵羊为季节性发情动物,但季节性发情的分子机制目前尚不明晰。近年研究发现细胞凋亡与发情有密切关系。而细胞凋亡主要由 Bcl-2 家族的凋亡相关基因(*Bad*、*Bax*、*Bcl-2* 和 *Bcl-xL*)调控。绵羊季节性发情的特点严重影响了其生产能力。其发情调控受到多种因素的影响,而 *Bad* 基因(Bcl-2 associated agonist of cell death gene,与 Bcl-2 相关的促凋亡基因)可能是影响发情启动的调节因素之一。*Bad* 是第一个被发现的与卵泡闭锁相关的促凋亡因子^[1],属于 Bcl-2 家族。Bcl-2 家族成员包括抑制凋亡(促生存)的 Bcl-2(B-cell lymphoma-2, B 淋巴细胞瘤-2)、Bcl-xL(Bcl2 样因子 1, Bcl2-like 1 或 Bcl2l1)、多结构域促凋亡的 Bax(与 Bcl2 相关的促凋亡调节因子 X, Bcl2 associated X, apoptosis regulator)以及仅含 BH-3 结构域的 Bad 成员等^[2-3],它们对雌性和雄性生殖细胞的凋亡都起到重要作用^[4]。*Bad* 基因与以上家族成员相互作用,调节黄体的形成与退化,从而影响生殖激素分泌,参与发情启动过程。Bcl-2 家族蛋白介导的细胞凋亡对雌性动物的卵泡闭锁起重要作用,而卵泡闭锁与颗粒细胞凋亡有密切关系。目前,关于凋亡相关基因在绵羊组织表达图谱的研究还不多,少量的研究主要集中在外环境刺激后相关基因 mRNA 表达量变化^[5]。关于小尾寒羊四季发情性状调控的分子机理,尤其是生殖轴各组织表达规律的研究鲜有报道。本研究选取常年发情的小尾寒羊为研究对象,分别采集黄

体和卵泡期的下丘脑-垂体-卵巢这一生殖调控轴上的 3 个组织以及血液,采用荧光定量 PCR 方法检测促凋亡基因 *Bad*、*Bax* 和抑制凋亡基因 *Bcl-2*、*Bcl-xL* 在各组织中的表达特征;采用放射免疫方法检测血清孕酮(Progesterone, P_4)和雌二醇(Estradiol, E_2)的含量,比较小尾寒羊不同繁殖状态下基因表达和激素含量的差异,初步分析细胞凋亡调控与发情状态的关系,为进一步揭示小尾寒羊常年发情的分子机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与样品采集

小尾寒羊饲养于天津市畜牧兽医研究所试验羊场,正常饲喂,自由饮水。适应性饲养两周后进行试验。选取身体健康、营养状况良好、体重一致的小尾寒羊母羊 6 只,放置阴道孕酮栓(CIDR),同时注射 5 mL 维生素 AD 以保护阴道内膜。12 d 后撤栓,撤栓当天记为 1 d,撤栓时刻记为 0 h。撤栓后使用腹腔镜观察卵泡发育和排卵情况以确定卵泡期采样时间;使用公羊试情以确定发情时间。连续进行两个情期,确定在撤栓后 45 h(卵泡期)和 10 d(黄体期)屠宰采样,每组各 3 只($n=3$)。

屠宰前颈静脉采血,离心,血清存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。屠宰后立即取下丘脑、垂体和卵巢 3 个组织,用锡箔纸包好迅速投入液氮速冻,带回实验室后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂(盒) RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京),反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit, TaKaRa, 大连), 荧光定量染料(Kapa SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix, Kapa Biosystems, USA), EP 管、八联管、枪头等耗材均为 RNase free 产品。

1.2.2 主要仪器 凝胶成像系统(ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD, USA), Nano Drop2000 微量分光光度计(Nano Drop Technologies, USA), 荧光定量 PCR 系统(Roche Light Cycler™ 480 II real-time PCR system, Roche, USA)。

1.3 总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

采集的小尾寒羊各组织总 RNA 提取按照试剂

盒说明进行,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanp Drop 2000 检测提取 RNA 的质量和浓度。使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 反转录合成 cDNA 第一链,按照说明书操作要求,反应体系为 1 μg RNA,总体积 20 μL,程序为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s,反转录的 cDNA 第一链-20 °C 保存备用。

1.4 荧光定量引物设计及目的基因表达量检测

根据 GenBank 中绵羊 *Bad* 基因序列(XM_004019650.3),用 Primer3.0 在线软件(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计引物;根据文献中已报道的绵羊 *Bax*^[6]、*Bcl-2*^[6]、*Bcl-xL*^[7] 和 18S^[8] 基因序列合成引物,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列和产物大小见表 1。

表 1 绵羊 *Bad*、*Bax*、*Bcl-2*、*Bcl-xL* 和 18S 基因的引物序列和产物大小

Table 1 Primer sequence and product size of ovine *Bad*, *Bax*, *Bcl-2*, *Bcl-xL* and 18S genes

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物大小/bp Product size
<i>Bad</i>	F:CGAAGGATGAGCGACGAG, R:GACTGGAGGAAGCGCGTC	118
<i>Bax</i>	F:CCTGGGATCTTGAACTCTCCTT, R:CTGAGCCAGGCTGAAATCAAAA	99
<i>Bcl-2</i>	F:GCCGAGTGAGCAGGAAGAC, R:GTTAGCCAGTGCTTGCTGAGA	96
<i>Bcl-xL</i>	F:CAGGCGATGAGTTTGAAGT, R:TCCCAGGAAGAGTTCATTCAC	121
18S	F:CGGCTACCACATCCAAGGAA, R:GCTGGAATTACCGCGGCT	187

采用 Real-time PCR 技术,以各组织 cDNA 为模板,定量检测目的基因 *Bad*、*Bax*、*Bcl-2*、*Bcl-xL* 在卵泡期和黄体期小尾寒羊各组织中的相对表达量,比较这些基因在不同发情状态下的表达差异。反应体系:cDNA 模板 2 μL,2×KAPA 染料 Buffer 10 μL,上下游引物各 0.4 μL,ddH₂O 补足 20 μL。每孔 3 个重复。反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 10 s,60 °C 20 s,72 °C 10 s,40 个循环。扩增反应结束后进行熔解曲线分析。

1.5 激素测定

将离心得到的血清送至北京北方生物技术研究所,使用 RIA 放射免疫激素检测试剂盒检测血清 P₄ 和 E₂ 含量。

1.6 数据分析

采用 Excel 进行数据处理,利用 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因相对表达量,使用 SPSS Statistics 24 软件 ANOVA 分析比较基因表达量差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 总 RNA 的质量检测和 Real-time PCR 熔解曲线

取 RNA 2 μL 点样,以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和浓度。检测结果如图 1 所示,提取各组织的总 RNA 质量良好,无降解,28S 和 18S 条带清晰明亮,且 28S 条带亮度大于 18S,5S 处无特异条带。OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 为 1.8~2.0, RNA 质量合格,符合后续进行 Real-time PCR 的要求。

本研究以 18S 为内参基因,*Bad*、*Bax*、*Bcl-2*、*Bcl-xL* 为目的基因,各阳性样品模板在反应后期可得单峰、峰型锐利的熔解曲线,引物特异性良好,符合荧光定量 PCR 数据分析的要求。

2.2 *Bad*、*Bax*、*Bcl-2*、*Bcl-xL* 基因在卵泡期和黄体期小尾寒羊下丘脑-垂体-性腺轴组织中的表达

通过 Real-time PCR 检测凋亡相关基因 *Bad*、*Bax*、*Bcl-2*、*Bcl-xL* 在小尾寒羊卵泡期和黄体期下

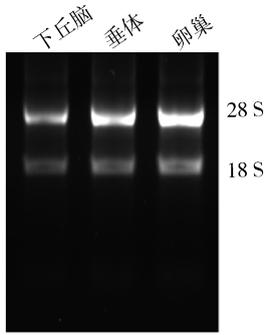
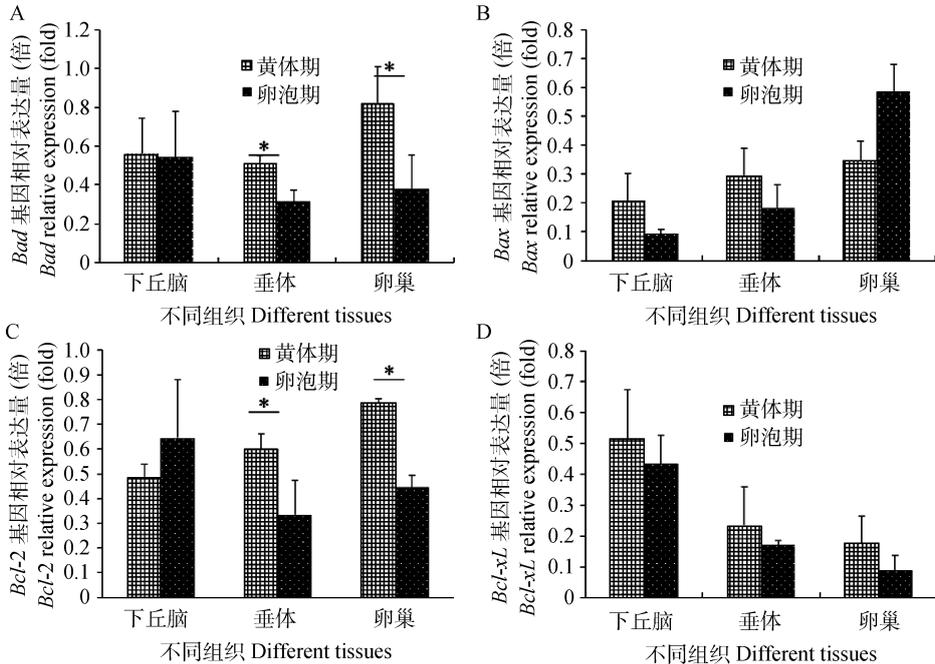


图 1 3 个组织 RNA 电泳结果
Fig. 1 RNA electrophoretogram of the 3 tissues

丘脑、垂体和卵巢组织中的表达情况(图 2)。结果显示,这 4 个凋亡相关基因在下丘脑、垂体、卵巢组织中均有表达,在不同的组织表达规律不同。*Bad* 在黄体期的垂体和卵巢组织的表达量显著高于卵泡

期($P < 0.05$),在下丘脑组织中 2 个时期表达量没有显著差异($P > 0.05$)。*Bax* 在黄体期下丘脑、垂体和卵巢组织的表达量与卵泡期均无显著差异($P > 0.05$);无论在黄体期还是卵泡期,*Bax* 基因的表达量均呈现卵巢 $>$ 垂体 $>$ 下丘脑的规律。基因 *Bcl-2* 表现出与 *Bad* 基因同样的规律,即黄体期的垂体和卵巢组织的表达量显著高于卵泡期($P < 0.05$),但在下丘脑组织中 2 个时期表达量没有显著差异($P > 0.05$)。*Bcl-xL* 基因在黄体期和卵泡期各组织中的表达量均无显著差异($P > 0.05$);无论在黄体期还是卵泡期,*Bcl-xL* 基因的表达规律与 *Bax* 相反,呈现下丘脑 $>$ 垂体 $>$ 卵巢的规律。可见,在小尾寒羊不同繁殖状态下,这 4 个凋亡相关基因表达量的主要差异存在于垂体和卵巢,在上游中枢下丘脑组织无显著差异。



同一个组织不同时期比较, * . $P < 0.05$

Compared with the same organization at different periods, * . $P < 0.05$

图 2 *Bad*、*Bax*、*Bcl-2*、*Bcl-xL* 基因在小尾寒羊卵泡期和黄体期下丘脑、垂体、卵巢的表达情况

Fig. 2 Relative expression of *Bad*, *Bax*, *Bcl-2* and *Bcl-xL* genes in follicular and luteal phases in hypothalamus, pituitary, ovary of Small Tail Han sheep

2.3 卵泡期和黄体期小尾寒羊生殖相关激素变化情况

使用 RIA 方法检测血清中 P_4 和 E_2 含量,结果如图 3 所示。 P_4 在黄体期和卵泡期的浓度分别为 (0.173 ± 0.017) 和 $(0.070 \pm 0.005) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, E_2 在黄体期和卵泡期的浓度分别为 (8.025 ± 2.965) 和

$(13.277 \pm 3.900) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,黄体期 P_4 含量显著高于卵泡期($P < 0.05$),而 E_2 含量在 2 个时期没有显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

发情是指雌性动物初情期后,受下丘脑-垂体-

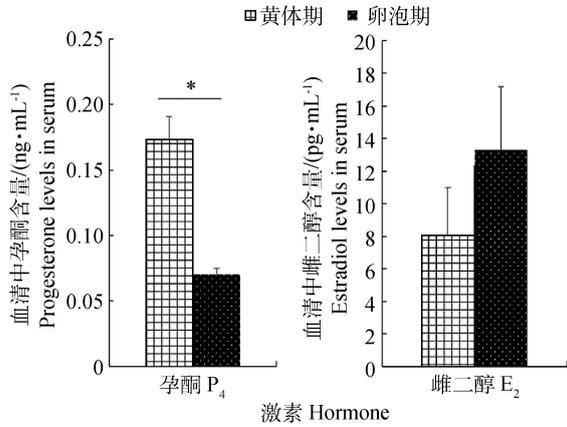


图3 小尾寒羊卵泡期和黄体期的血清中孕酮和雌二醇含量

Fig. 3 Progesterone and estradiol levels in the follicular phase and luteal phase of Small Tail Han sheep

卵巢轴系调控的卵泡发育并分泌雌激素,雌激素进而作用于大脑皮质使雌性动物在生理和行为上发生变化的一种生理现象^[9-10]。在动物的发情周期中,整个机体特别是生殖器官会出现一系列的形态和机能的变化。在小鼠^[11]、猪^[12]和狗^[13]的研究表明,这些变化与细胞凋亡密切相关。生殖细胞的凋亡是繁殖过程中正常发育的一部分,生殖细胞在这些生物体中的死亡是一个创造性而不是破坏性的过程。尤其在卵子发生和排卵过程中细胞凋亡是重要环节^[14],这一过程中许多不合格的生殖细胞被清除,同时产生了发育良好的卵母细胞^[15]。

细胞凋亡存在两种调控途径:死亡受体介导的“外源性凋亡通路”和线粒体介导的“内源性凋亡通路”。其中,线粒体内源凋亡通路发生在卵母细胞颗粒细胞,在细胞凋亡过程中占主导地位^[16]。这个过程是由 Bcl-2 蛋白家族介导的。而卵泡闭锁与颗粒细胞凋亡有密切关系。影响颗粒细胞凋亡的因素主要有两大类:内在的促凋亡或抗凋亡因子的调控以及外在的凋亡诱发因素(如激素刺激等)。

Bcl-2 原癌基因是与细胞凋亡关系极为密切的基因之一,它能阻断引起细胞凋亡的最后通路,起到保护细胞的作用;Bcl-2 的表达还可以缓解由外伤引起的神经细胞凋亡^[17],而 Bcl-2 家族的成员 Bax 则具有对抗 Bcl-2 的作用,可促进细胞的凋亡^[18]。在本研究中,Bax 和 Bcl-2 在卵巢中的表达量刚好呈现相反的特征,与这一研究成果相符,说明在发情和不发情这 2 个不同生理状态下,细胞凋亡是重要的参与者,可能参与了发情状态的转换过程。基因

敲除法研究证明,Bax 能引起卵泡发生闭锁,若敲除 Bax,卵泡数量增加^[19],说明生殖细胞凋亡受到抑制;另有研究表明,在敲除 Bcl-2 的小鼠体内,初级卵泡数量减少^[20],若 Bcl-2 过度表达,可导致出生后小鼠体内卵泡数目增加^[21],说明 Bcl-2 有促进细胞存活作用。本研究出现相类似的规律:Bax 的表达量在两个时期的卵巢中没有显著性差异,但可以看出卵泡期有高于黄体期的趋势;Bcl-2 的表达量在黄体期显著高于卵泡期($P < 0.05$)。由于 Bad 的促凋亡作用依赖于与 Bcl-2 或 Bcl-xl 结合^[22],其中 Bax 和 Bcl-2 的比值是细胞的“凋亡开关”,二者的平衡决定了卵泡发育或是闭锁^[23]。黄体期 Bcl-2/Bax 比值高于卵泡期,而 Bcl-2/Bax 比值高时,形成 Bcl-2/Bax 异源二聚体,抑制凋亡;Bcl-2/Bax 比值低时,或者当 Bcl-2/Bax 之间的作用被破坏时,形成 Bax/Bax 同源二聚体,诱导凋亡^[24]。而卵泡期正是卵泡经历发育-募集-凋亡-优势卵泡成熟的时期,这一系列生理活动伴随着颗粒细胞凋亡引起的非优势卵泡闭锁。所以在卵泡期 Bcl-2/Bax 比值是低于黄体期的。而 V. Praveen Chakravarthi 等^[6]的研究发现,体内生长和体外培养的卵巢颗粒细胞和卵母细胞中,Bcl-2/Bax 比值差别很大,提示人们在进行体外培养试验时需考虑环境因素对基因表达的影响。而为了使细胞凋亡与发情的关系更加明晰,颗粒细胞和黄体中相应蛋白的表达情况需要进一步深入研究。

雌性动物进入卵泡期后,E₂ 水平会出现波峰^[25]进而引起排卵前 LH 峰;此时 P₄ 的含量也会增加,刺激卵泡壁中胶原纤维酶的活性以溶解卵泡壁。而在黄体期,由于分泌 P₄ 的黄体体积达到最大,所以产生的孕酮也达到最大值^[25]。本研究中,卵泡期和黄体期 E₂ 的含量没有显著性差异,原因可能是采样时间并不是标准的 E₂ 的峰值时间;黄体期 P₄ 含量显著高于卵泡期,符合黄体期的生理特征。

颗粒细胞凋亡是导致卵泡闭锁的根本原因^[26]。E₂ 可以抑制多种细胞的凋亡^[27-28],它能抑制 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 依赖性的核酸内切酶的活性,该酶一旦激活,细胞的 DNA 核小体间发生不可逆的裂解。有研究表明,正常组 E₂ 水平显著高于凋亡组,E₂ 很可能通过上述途径发挥它对颗粒细胞的保护作用^[29]。本研究中,血清中 E₂ 含量在黄体期和卵泡期没有显著性差异,但是黄体期血清 E₂ 含量有高于卵泡期的趋势,而促凋亡基因 Bax 和抑制凋亡基因 Bcl-2 在黄体期卵巢中的表达量都高显著于卵泡期($P <$

0.05),所以本研究的结果也可以得到推论:在雌激素含量相对较低的卵泡期,细胞凋亡增加,而这种看似无用的细胞凋亡,促使了优势卵泡的发育,启动发情。另一方面,孕激素可能通过作用于孕激素受体对外分离培养的颗粒细胞凋亡发挥抑制作用^[30]。本研究是体内试验,黄体期血清 P₄ 含量显著高于卵泡期($P < 0.05$),而黄体期是凋亡受到抑制的时期,与以上研究结果一致。

随着优势卵泡的进一步发育,卵泡抑制素和雌激素分泌增加,进而降低 FSH 的分泌水平,并且优势卵泡还会分泌抑制素,以旁分泌方式作用于周围卵泡,使得未被优势化的卵泡成熟发育受阻,以此参与卵泡选择^[31]。试验证明,雌激素在决定优势卵泡的形成过程中起决定性作用,雌激素与 FSH 协同,一方面增加颗粒细胞中 LH 受体分化,同时它又促进颗粒细胞芳香化酶的合成,后者进一步促进颗粒细胞雌激素的合成,形成良性循环。故如果同时启动的一组原始卵泡,其中有一个卵泡分泌比其他卵泡较多的雌激素,这个卵泡将进入良性循环状态,也只有这个卵泡的颗粒细胞能分泌出足够的 LH 受体,应答垂体 LH 分泌峰的作用而排卵;而与其一同生长的其他卵泡由于分泌较少的雌激素,在卵泡发育不同阶段走向闭锁,卵泡闭锁有两种类型:一种起始于颗粒细胞一种起始于卵母细胞^[32],而起源于颗粒细胞的卵泡闭锁中,Bcl-2 家族成员的相互作用而引起的颗粒细胞凋亡起到了很大作用,进而促进了发情启动。

4 结 论

Bad、*Bax*、*Bcl-2*、*Bcl-xL* 4 个凋亡相关基因在不同组织、不同时期表达存在差异,*Bad* 和 *Bcl-2* 在黄体期垂体和卵巢组织的表达量均显著高于卵泡期,黄体期孕酮含量显著高于卵泡期,表明凋亡相关基因在调控小尾寒羊常年发情性状中起到一定作用,其中 *Bad* 和 *Bcl-2* 基因可能调控黄体期到卵泡期发情状态的转换,与小尾寒羊发情启动有关。

参考文献(References):

- [1] KAIPIA A, HSU S Y, HSUEH A J W. Expression and function of a proapoptotic Bcl-2 family member Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter (BAD) in rat ovary[J]. *Endocrinology*, 1997, 138(12): 5497-5504.
- [2] KIM E M, JUNG C H, KIM J, et al. The p53/p21

complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(11): 3092-3100, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2098.

- [3] ASHKENAZI A, FAIRBROTHER W J, LEVERSON J D, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(4): 273-284.
- [4] FAN X R, XI H M, ZHANG Z, et al. Germ cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in porcine testis under normal and heat stress conditions[J]. *Acta Histochem*, 2017, 119(3): 198-204.
- [5] 李鹏飞,岳文斌,庞钰莹,等. FSH 和胰岛素对绵羊卵巢卵泡颗粒细胞体外培养的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(9): 1386-1391.
LI P F, YUE W B, PANG Y Y, et al. Effects of FSH and insulin on sheep ovarian follicular granulosa cells *in vitro* culture[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(9): 1386-1391. (in Chinese)
- [6] PRAVEEN CHAKRAVARTHI V, KONA S S R, SIVA KUMAR A V N, et al. Quantitative expression of antiapoptotic and proapoptotic genes in sheep ovarian follicles grown *in vivo* or cultured *in vitro* [J]. *Theriogenology*, 2015, 83(4): 590-595.
- [7] LYAHYAI J, GOLDAMMER T, BEATTIE A E, et al. Positional and functional characterisation of apoptosis related genes belonging to the BCL2 family in sheep[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 109(4): 519-526.
- [8] SUN W, SU R, LI D, et al. Developmental changes in IGF-I and MyoG gene expression and their association with meat traits in sheep[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 2772-2783.
- [9] 周 虚. 动物繁殖学[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 112-113.
ZHOU X. Animal reproduction[M]. Beijing: Science Press, 2015: 112-113. (in Chinese)
- [10] 杨利国. 动物繁殖学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2010: 124.
YANG L G. Animal reproduction[M]. 2nd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 124. (in Chinese)
- [11] DHARMA S J, KHOLKUTE S D, NANDEDKAR T D. Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle[J]. *Indian J Exp Biol*, 2001, 39(3): 218-222.
- [12] WASOWSKA B, LUDKIEWICZ B, STEFANCZYK-KRZYMOWSKA S, et al. Apoptotic cell death in the porcine endometrium during the oestrous cycle[J].

- Acta Vet Hung*, 2001, 49(1): 71-79.
- [13] VAN CRUCHTEN S, VAN DEN BROECK W, DUCHATEAU L, et al. Apoptosis in the canine endometrium during the estrous cycle[J]. *Theriogenology*, 2003, 60(9): 1595-1608.
- [14] LIU Y, WANG Y L, HE S W, et al. Protective effects of resveratrol against mancozeb induced apoptosis damage in mouse oocytes [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 6233-6245.
- [15] 杨佐娟, 何建平. 哺乳动物卵子发生过程中细胞凋亡的研究进展[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2006, 34(S): 141-144.
YANG Z J, HE J P. Advances on cell apoptosis during mammals oogenesis [J]. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2006, 34(S): 141-144. (in Chinese)
- [16] ZHU C C, ZHANG Y, DUAN X, et al. Toxic effects of HT-2 toxin on mouse oocytes and its possible mechanisms [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(6): 1495-1505.
- [17] ZHANG Z L, QIN P, LIU Y H, et al. Alleviation of ischaemia-reperfusion injury by endogenous estrogen involves maintaining Bcl-2 expression via the ER α signalling pathway[J]. *Brain Res*, 2017, 1661: 15-23.
- [18] REED J C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family[J]. *Nature*, 1997, 387(6635): 773-776.
- [19] PEREZ G I, ROBLES R, KNUDSON C M, et al. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency[J]. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 200-203.
- [20] RATTS V S, FLAWS J A, KOLP R, et al. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad[J]. *Endocrinology*, 1995, 136(8): 3665-3668.
- [21] FLAWS J A, HIRSHFIELD A N, HEWITT J A, et al. Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary[J]. *Biol Reprod*, 2001, 64(4): 1153-1159.
- [22] 闫庆国, 师建国, 王文勇, 等. 促凋亡基因 Bad 的表达与肝胆管细胞癌分化的关系[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2003, 10(3): 253-255.
YAN Q G, SHI J G, WANG W Y, et al. The expression of pro-apoptosis gene Bad in intrahepatic cholangiocarcinoma and its relationship to differentiation of the tumor[J]. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2003, 10(3): 253-255. (in Chinese)
- [23] FIGUEROA F, MOTTA A, ACOSTA M, et al. Role of macrophage secretions on rat polycystic ovary: its effect on apoptosis[J]. *Reproduction*, 2015, 150(5): 437-448.
- [24] VARTAK S V, IYER D, SANTHOSHKUMAR T R, et al. Novel BCL2 inhibitor, Disarib induces apoptosis by disruption of BCL2-BAK interaction[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 131: 16-28, doi: 10.1016/j.bcp.2017.02.015.
- [25] 周 虚. 动物繁殖学[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 107-109.
ZHOU X. Animal reproduction[M]. Beijing: Science Press, 2015: 107-109. (in Chinese)
- [26] 张 昊, 陈 芳, 梁振华, 等. 家禽卵泡闭锁研究进展[J]. 湖北畜牧兽医, 2014(10): 61-65.
ZHANG H, CHEN F, LIANG Z H, et al. Advances on follicular atresia in poultry[J]. *Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2014(10): 61-65. (in Chinese)
- [27] HILL R A, POMPOLO S, JONES M E E, et al. Estrogen deficiency leads to apoptosis in dopaminergic neurons in the medial preoptic area and arcuate nucleus of male mice[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27(4): 466-476.
- [28] SUR P, SRIBNICK E A, WINGRAVE J M, et al. Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells[J]. *Brain Res*, 2003, 971(2): 178-188.
- [29] 陈秀萍, 姜勋平, 丁家桐. 鹅卵泡颗粒细胞凋亡及其与生殖激素间的关系[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(10): 982-986.
CHEN X P, JIANG X P, DING J T. Apoptosis of goose granulosa cells and its relationship between reproductive hormones[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2006, 37(10): 982-986. (in Chinese)
- [30] PELUSO J J, LIU X, GAWKOWSKA A, et al. Progesterone inhibits apoptosis in part by PGRMC1-regulated gene expression[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 320(1-2): 153-161.
- [31] VITALE A M, GONZALEZ O M, PARBORELL F, et al. Inhibin a increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated Rats1[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(6): 1989-1995.
- [32] ERICKSON G F. An analysis of follicle development and ovum maturation[J]. *Semin Reprod Med*, 1986, 4(3): 233-254.