

绵羊季节性繁殖分子机制及休情季节诱导绵羊发情配种技术

夏青, 刘秋月, 王翔宇, 胡文萍, 李春艳, 贺小云, 储明星, 狄冉

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

摘要: 季节性繁殖是限制绵羊生产效率的重要因素。季节性繁殖分子机制的深入解析是提高绵羊休情季节发情配种率的前提。研究发现, 长光照与短光照条件下绵羊季节性繁殖通路中出现一系列相关信号分子变化及细胞形态学改变。基于季节性繁殖分子机制, 研究者已研发出若干休情季节诱导母羊发情配种的技术或方法。本文从季节性繁殖分子机制方面总结了上述光照信号分子及垂体和下丘脑组织中细胞形态学的变化特征, 及休情季节诱导母羊发情配种技术的应用效果及其利弊, 并提出解决问题的关键在于寻找能够提高休情季节配种率的绿色高效的新型技术。

关键词: 绵羊; 季节性繁殖; 光照信号分子; 休情期; 人工调控

The molecular mechanism of sheep seasonal breeding and artificial regulatory techniques for estrus and mating in anestrus

Qing Xia, Qiuyue Liu, Xiangyu Wang, Wenping Hu, Chunyan Li, Xiaoyun He, Mingxing Chu, Ran Di

Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Seasonal breeding is an important factor limiting sheep production efficiency. Detailed analysis on the molec-

收稿日期: 2017-12-23; 修回日期: 2018-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31572371), 转基因科技重大专项(编号: 2016ZX08009-003-006, 2016ZX08010-005-003), 中国博士后科学基金面上项目(编号: 2016M591308), 国家肉羊产业技术体系专项(编号: CARS-38), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: Y2017JC24, 2017ywf-zd-13, 2013ywf-zd-1), 中国农业科学院科技创新工程项目(编号: ASTIP-IAS13), 农业科研杰出人才及其创新团队项目和万人计划科技创新领军人才项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31572371), Genetically Modified Organisms Breeding Major Program of China (No.2016ZX08009-003-006, 2016ZX08010-005-003), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2016M591308), Earmarked Fund for China Agriculture Research System (No.CARS-38), Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (Nos.Y2017JC24, 2017ywf-zd-13, 2013ywf-zd-1), Agricultural Science and Technology Innovation Program of China (No. ASTIP-IAS13), China Agricultural Scientific Research Outstanding Talents and Their Innovative Teams Program, and China High-level Talents Special Support Plan Scientific and Technological Innovation Leading Talents Program]

作者简介: 夏青, 硕士研究生, 专业方向: 动物分子育种。E-mail: 1833457068@qq.com

通讯作者: 储明星, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 羊优异繁殖性状分子机理解析。E-mail: mxchu@263.net

狄冉, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 羊优异繁殖性状分子机理解析。E-mail: dirangirl@163.com

DOI: 10.16288/j.yczs.17-423

网络出版时间: 2018/4/17 10:38:47

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180417.1038.006.html>

ular mechanisms of seasonal breeding is the premise for improving estrus and mating rate of sheep during anestrus. Recent research showed that under long-photoperiod and short-photoperiod conditions, a series of changes in signaling molecules and cell morphology could be observed in ovine seasonal reproduction pathway. Based on the molecular mechanisms of seasonal reproduction, several technologies or methods for inducing estrus and mating of ewes in anestrus have been developed. In this review, photoperiod-induced changes in signaling molecules and cell morphology in pituitary and hypothalamic tissue are first summarized in terms of the molecular mechanisms and characteristics of seasonal reproduction. The application effect, advantages and disadvantages for applying these technologies for inducing estrus and mating of ewes in anestrus are then discussed, thereby providing the critical insights in identifying a new technology, which is environmentally friendly and efficient, to improve breeding rate in anestrus.

Keywords: sheep; seasonal reproduction; photoperiod-induced signaling molecules; anestrus; artificial regulation

地球的自转和公转致使地球环境出现了昼夜间以及季节的变化,这种周期性变化导致动物逐渐进化出与外界环境相适应的生理机制。例如在温带地区,季节性繁殖是动物顺应环境进化出的一种重要生理行为,这一性状受外界光照调控,最终保障幼畜在最适宜的季节出生^[1]。按照繁殖季节光照时间长短可将季节性繁殖动物分为长光照繁殖动物和短光照繁殖动物,其中绵羊(*Ovis aries*)为短光照繁殖动物,主要在秋季和冬季进行繁殖^[2]。目前已有许多关于哺乳动物的季节性繁殖分子机制方面的研究报道,其大致通路是:视交叉上核神经将接收的外界光照信号传至垂体,垂体内的光照信号因子可探测外界光照时长,并通过神经内分泌通路调控动物机体的繁殖生理活动以适应外界环境的季节性变化^[3~5]。已有科研人员利用季节性繁殖分子机制研制出几种在休情季节诱导母羊发情的配种技术,但是实践证明这些技术应用效率低,并存在环境安全隐患^[6]。因此,本文重点总结了长光照与短光照条件下绵羊季节性繁殖通路中一系列相关信号分子及细胞形态学的变化特征,分析了肉羊生产中几种休情季节诱导母羊发情配种常用方法的利弊,有助于生产者在养殖场中根据实际情况对以上技术进行单独或联合应用,可提高母羊繁殖率,对促进农业动物生产具有重要意义。为了避免某些弊端,近几年研究发现的新型神经肽在提高休情季节母羊繁殖效率方面具有广泛的应用前景。同时,本文深入解析了绵羊季节性繁殖的分子调控机制,为开发可提高母羊繁殖效率的新方法提供了科学依据和新思路。

1 绵羊季节性繁殖分子调控机制

自然环境的季节性改变通过不同时长的光照信号刺激动物,最终使动物表现出季节性繁殖的特征。在绵羊中,光照信号由视网膜接收,经视交叉上核(hypothalamic suprachiasmatic nuclei, SCN)传至松果体(pineal gland),引起夜间松果体中褪黑素(melatonin, MEL)分泌时长的改变。垂体结节部(pars tuberalis, PT)表达的褪黑素受体(melatonin receptor 1, MT1)感知到 MEL 的变化后,PT 区一系列光照信号分子发生改变,导致下丘脑中四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T4)与三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3)发生相互转化^[7],从而对下丘脑中 GnRH 的释放进行调控。在上述过程中,外界不同的光照条件可导致绵羊 PT 的促甲状腺细胞表现出两元状态,这种不同状态致使机体分泌截然不同的光照信号分子。例如长光照条件下,PT 中促甲状腺细胞(thyrotroph)分泌长光照信号分子,如眼缺失基因 3(eyes absent 3, *EYA3*)与促甲状腺激素 β 亚基(thyrotrophin β subunit, *TSH β*);短光照条件下,促甲状腺细胞分泌短光照信号分子,如嗜铬粒蛋白 A 基因(chromogranin A, *CGA*)。不同的光照信号分子导致通路下游信号分子变化的差异^[8]。

长光照信号分子的作用机制主要由 *EYA3* 和 *TSH β* 介导,两种分子的作用机制如下:(1) *EYA3* 作用机制。在长光照下, *EYA3* 在红头白颊鸟(*Pene-
lopides exarhatus*)和绵羊垂体中表达上调,下丘脑中

T3 表达量也随之升高^[9-11]; 对日本鹌鹑(*Coturnix japonica*)的研究发现, *EYA3* 是长光照第一天首先被激活诱导表达的分子^[5]。以上结果表明, *EYA3* 在鸟类与绵羊等季节性繁殖动物中对长光照响应强烈, 暗示该分子属于长光照信号分子, 其感应外界光照时长的分子机制是: 在短光照和长光照下 *EYA3* 均在天黑后 12 h 达到表达高峰, MEL 在天黑时开始分泌, 在短光照下, *EYA3* 峰值出现在夜晚, 受 MEL 抑制其峰值较小; 在长光照下, *EYA3* 峰值出现在早上, 而 MEL 浓度低无法抑制, 因此 *EYA3* 峰值较高^[7]。综上所述, *EYA3* 是长光照信号分子, 外界不同光照时长导致其表达水平出现差异, 进而调控下游基因 *TSHβ* 的变化。(2) *TSHβ* 作用机制。鸟类在由短光照转至长光照后 *EYA3* 与 *TSHβ* 的表达水平平行增加, 在同样的光照转换过程中, 绵羊 PT 中的 *EYA3* 早于 *TSHβ* 4 h 达到表达高峰, 暗示绵羊中 *EYA3* 可能是 *TSHβ* 上游的转录激活因子^[12]。*TSHβ* 基因的启动子包括一个高度保守的 D 元件及 MEF3 位点两部分。在长光照下, *EYA3* 可与促甲状腺细胞胚胎因子(thyrotroph embryonic factor, TEF) 及 Six1(sine oculis-related homeobox 1)形成复合体, 与 *TSHβ* 启动子 D 元件结合后协同促进 *TSHβ* 的转录^[12]。由上述过程产生的 *TSHβ* 与下丘脑基底部(mediobasal hypothalamus, MBH)室管膜细胞(ependymal cells, EC)中的促甲状腺激素受体(thyroid-stimulating hormone receptor, TSHR)结合, 使 PT 中的第二信使环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水平升高, TSHR 与 cAMP 藕联形成正反馈循环, 同样使长光照下 *TSHβ* 转录水平升高^[13, 14]。因此, *TSHβ* 表现为长光照信号分子特征。在长光照下, 高水平的 *TSHβ* 与 TSHR 结合后通过 cAMP 信号通路使 EC 中的Ⅲ型脱碘酶(type Ⅲ thyroid hormone deiodinase, DIO3)转化为Ⅱ型脱碘酶(type Ⅱ thyroid hormone deiodinase, DIO2)^[11, 13, 15, 16]。此时, 高水平的 DIO2 促进无活性的 T4 转化为有活性的 T3, T3 浓度升高并且作用于下丘脑基底部的 GnRH 神经元, GnRH 神经元末梢被室管膜细胞包围, 无法与 PT 细胞接触, 阻碍了 GnRH 的释放, 最终绵羊进入休情状态^[17, 18]。

短光照信号分子的作用机制主要由 CGA 介导。

绵羊 PT 可表达短光照信号分子 CGA。CGA 是神经肽类家族中的一种分泌蛋白, 广泛存在于神经内分泌细胞的分泌颗粒中, 与粗面内质网、高尔基体中的分泌颗粒协同表达^[19]。研究发现, 绵羊 PT 中的促甲状腺细胞节律性表达 CGA。在短光照下, CGA 在前 4 周的表达水平逐渐升高, 高水平的 CGA 导致促甲状腺细胞被星形滤泡细胞(folliculostellate)包围, 因而促甲状腺细胞无法分泌 *EYA3* 与 *TSHβ*; 在长光照下, CGA 在前 4 周的表达水平逐渐下降, 低水平的 CGA 引起星形滤泡细胞排布分散, 而促甲状腺细胞间出现紧密连接, 因而促甲状腺细胞中 *EYA3* 与 *TSHβ* 表达水平升高^[5]。上述结果暗示 CGA 为短光照信号分子, 可通过绵羊 PT 中促甲状腺细胞的形态学变化来调控季节性繁殖通路下游生理机制。在短光照下, 高浓度的 CGA 使促甲状腺细胞分泌的 *EYA3* 与 *TSHβ* 水平下降, 进而导致下丘脑中 T3 浓度下降, 低浓度的 T3 解除室管膜细胞对 GnRH 神经元末梢的包围, 下丘脑释放的 GnRH 增多, 引起腺垂体中 FSH 和 LH 的释放, 进而影响卵泡发育和排卵, 绵羊进入发情状态^[20, 21]。

下丘脑中 T3 除了直接驱动 GnRH 神经元, 还可以通过下丘脑中的亲吻促动素 1(Kisspeptin-1, KISS1)与 RF 氨基酸相关肽(RFamide-related peptides, RFRP)作用于 GnRH 神经元从而影响季节性发情。*KISS1* 与 *RFRP* 参与哺乳动物中性腺轴的调控。在繁殖季节, 绵羊下丘脑中的 *KISS1* 表达水平升高^[22], *KISS1* 与 G 蛋白藕联受体 54(G protein-coupled receptor 54, GPR54)结合后刺激 GnRH 神经元释放 GnRH, 从而激活 HPG 轴^[23]。*RFRP* 与促性腺激素抑制激素(GnIH)同源, 包括 *RFRP1*、*RFRP2* 和 *RFRP3*, 其中 *RFRP3* 发挥主要调控作用。该神经肽对不同物种繁殖的调控作用是不同的, 它在两种不同季节繁殖的动物(如: 短光照繁殖动物—绵羊与长光照繁殖动物—仓鼠)中, 均表现为长光照下表达水平高: 即在休情季节, 绵羊下丘脑中 *RFRP3* 表达水平升高, 抑制 GnRH 的释放, 关闭 HPG 轴^[24, 25]; 而仓鼠刚好相反。研究发现, 休情状态下的仓鼠经 *TSHβ* 处理可转变为发情状态^[26], 且用外源 T3 注射休情状态仓鼠会使 *KISS1* 与 *RFRP* 免疫反应发生改变^[27]。因此, 我们推测在绵羊中 *KISS1* 与 *RFRP* 可能受 MEL-*TSHβ*-T3 的调

控, 从而影响动物的季节性发情性状。KISS1 与 RFRP 作为可调控季节性繁殖的神经肽, 在畜牧生产中具有良好的应用前景。综上所述, 长光照与短光照诱导信号分子调控通路见图 1。

2 休情季节诱导母羊发情配种技术

动物季节性繁殖是养殖业高效发展的一大瓶颈, 为了解决这一问题, 近些年来人们开发了几项诱导动物在休情季节发情配种的技术并将其应用在

生产实践中, 旨在提高休情季节的繁殖率。目前, 在休情季节激活绵羊 HPG 轴、提高产羔率的技术有以下几种: 公羊效应利用、激素处理技术、光照处理技术和新型分子技术。在生产中根据实际情况对上述方法进行单独或联合使用, 联合使用这些方法有许多优点: 可实现母羊同期发情, 集中产羔, 方便生产管理; 缩短母羊休情季节时间(如: 青春期、季节性乏情、产后乏情); 根据特定需求, 可在特定时间有计划地实施人工繁育方法; 可充分利用人工授精技术。

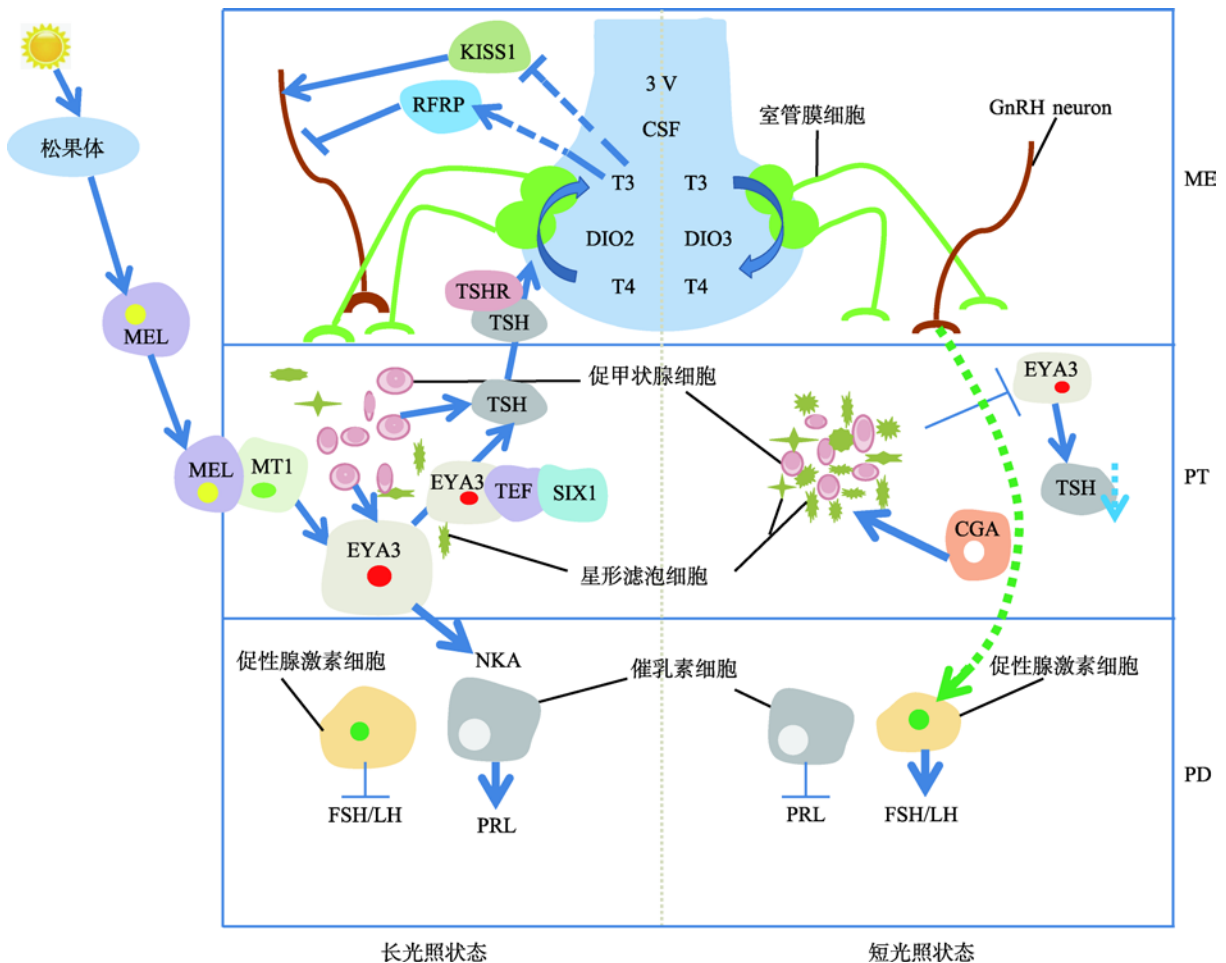


图 1 绵羊季节性繁殖分子机制示意图

Fig. 1 A schematic diagram of molecular mechanism for sheep seasonal reproduction

视交叉上核神经接收光照信号并传至垂体, 垂体结节部的光照信号因子及细胞形态学发生转变, 导致下丘脑 GnRH 神经元形态学变化, 最终垂体远侧部分泌的性腺激素水平发生改变。MEL: 褪黑素; MT1: 褪黑素受体; EYA3: 眼缺失基因 3; TEF: 促甲状腺细胞胚胎因子; SIX1: sine oculis-related homeobox 1; TSH: 促甲状腺激素; DIO2: 脱碘酶 2; DIO3: 脱碘酶 3; T3: 三碘原氨酸; T4: 四碘原氨酸; KISS1: 亲吻促动素 1; RFRP: RF 氨酸相关肽; NKA: 神经激肽; PRL: 催乳素; FSH: 促卵泡素; LH: 促黄体素; CGA: 嗜铬粒蛋白; GnRH neuron: GnRH 神经元; 3 V-CSF: 第三脑室; ME: 正中隆起; PT: 垂体结节部; PD: 垂体远侧部。

参考文献[8, 9, 26, 27]修改并绘制。

2.1 公羊效应

将性欲旺盛的公羊赶入母羊圈舍,可刺激休情季节母羊分泌 LH,并且引起母羊群同步排卵,这种现象称为公羊效应^[28]。用性欲旺盛的公羊刺激母羊,激活母羊 HPG 轴,提高排卵率。该技术不仅使母羊从休情状态转换为发情状态,还可以使青春期母羊提前进入性成熟期^[28, 29]。公羊效应的效果受品种、季节等因素影响^[6],该技术可诱导休情季节任意时刻的 Ile de France 母羊、阿尔勒美利奴母羊、克里奥山羊、西班牙 Murciano-Granadina 山羊排卵^[30, 31],但难以诱导休情季节中期的澳大利亚、阿尔派和墨西哥克里奥山羊产生发情行为,但是能够使它们在休情季节后期提前进入繁殖状态^[32, 33]。

公羊效应不使用孕激素,通过休情季节的自然交配使绵羊或山羊同步产羔。在人工授精(artificial insemination, AI)中使用公羊效应可刺激母羊首先产生一个不能繁殖的排卵周期,接着产生第二个正常的排卵周期,导致母畜在两周内出现两次受精峰。因此使用 AI 技术需要提前检查母羊是否处于发情期,并且需要在几天内多次重复运用 AI。用雌激素或黄体酮预处理母畜是公羊效应中获得单个可受精排卵高峰的唯一方法,这种预处理方法在山羊上得到了很好发展,不需提前检查发情期仅进行单次 AI 即可获得高妊娠率(60%~70%)。

2.2 光照处理技术单独或联合使用

光照处理技术可应用于 AI 中心和休情季节养殖场公羊精液的生产中。精液生产方法主要是:使公羊先暴露在长光照下 1~2 个月,之后转移至短光照下饲养 1~2 个月,如此交替循环处理,可使公羊全年显示出高性欲并生产出高质量的精液^[34]。此外,还可以在晚春或初夏前使用褪黑素(模拟短光照条件)使公羊提前进入繁殖状态,为公羊效应技术提供性活跃的公羊^[6]。

单独用光照处理技术还可以缩短母羊的休情时间。在休情季节前将拉卡恩母羊长光照(16 h 光照 8 h 黑暗)处理 77 天后转为自然光照(3 月初)或用孕酮栓塞处理,发现自然光照组中产羔母羊的比率比孕酮处理组更高^[35]。将法国 Ile de France 母羊在休

情季节开始后的第二个月(15 h 光照 9 h 黑暗)用短光照(8 h 光照 16 h 黑暗)处理,40 天后血液中促黄体素(luteinizing hormone, LH)水平升高^[36]。在绵羊休情季节可以采用光照处理与激素联合技术:首先进行先长后短的光照处理,之后用前列烯醇激素注射母羊,结果表明两种技术联合使用能显著提高试验组绵羊发情率(91.7%)及排卵效果(90.9%)($P<0.05$)^[37]。综上所述,仅通过光照处理技术不能使绵羊集中发情,单独使用该方案对提高绵羊繁殖率意义不大,但联合激素处理技术效果得到明显增强。

2.3 激素处理技术

使用激素处理动物提高繁殖率的方法开始于 20 世纪 70 年代,激素处理技术可促使母羊同期发情,便于大规模配种,大幅度增加产羔数。目前生产中应用的激素主要是孕激素(如醋酸氟孕酮),可使母羊进入黄体期,并联合 eCG(又称 PMSG)刺激卵泡成熟。尤其对山羊使用氯前列醇(F2a 前列腺素类似物)可诱导其黄体溶解^[38]。在繁殖季节或休情季节使用该技术均能高度同步绵羊排卵。由此,AI 中的单次受精技术效率也得到提高,产羔率达到 60%^[39]。激素处理技术最适用于休情季节配种及同期产羔。

3 休情季节诱导反刍动物发情配种传统方法存在的问题

公羊效应和光照处理等方法在提高动物繁殖率方面有一定的作用,但总体效率不高。而目前最有效的外源激素方法对环境和人类存在安全隐患:eCG 是从动物组织中纯化的,因此商业 eCG 提取物中可能存在动物病原体;另外,若反复使用 eCG 会使动物产生 eCG 抗体,导致母畜生育能力下降。例如欧洲已有相关法律规定“在农场养殖中,禁止使用外源性激素如雌激素等”^[40],此外,使用孕激素处理过的肉类和牛奶也被禁止销售。因此,亟待研究者研发一种新型方法或技术,在增加动物产品产量的同时,具有生态友好、可持续等优点。因此,了解动物季节性繁殖的分子机制不仅是基础研究面临的挑战,而且对提高动物繁殖率也有重大意义。

4 新型繁殖调控方法

目前使用的外源激素作用的靶标位置主要集中在卵巢(如 eCG)或者垂体(如 LH)部位。但是,下丘脑神经元可分泌多种神经递质(如多巴胺、谷氨酸、GABA)和神经肽(如强啡肽和神经激肽 B),参与调控 HPG 轴,对季节性繁殖有重要调控作用。最近已发现两种调控动物季节性繁殖的新型神经肽——KISS1 和 RFRP3。

有研究发现,使用 RFRP3 受体拮抗剂同时也是 KISS1 受体(KISS 1 receptor, KISS1R)激活剂的 RF9 处理母羊,可引起 LH 分泌上升^[41]。若使用仅对 RFRP3 受体拮抗但不激活 KISS1R 的选择特异性拮抗剂 GJ14 处理母羊,LH 分泌未发生显著变化^[42, 43],这暗示 LH 的释放主要通过 KISS1R 介导。因此,RFRP3 在季节性繁殖性状中的作用有待进一步评估。

与 RFRP3 相反,KISS1 是哺乳动物 HPG 轴的一种有效刺激剂^[44]。目前,KISS1 在绵羊和山羊季节性繁殖中的调控作用研究的最为深入。用 KISS1 处理繁殖季节母羊可实现同步排卵;对休情季节母羊持续 24 h 灌注 KISS1 可使 75% 的母羊排卵^[45];24 h 内每小时注射一次 KISS1 可刺激青春期前母羊出现 LH 脉冲,并且在 LH 峰后黄体酮短暂性增加^[46]。KISS1 也可刺激保姆山羊和雄鹿分泌 LH/FSH。在母马中,KISS1 虽然可刺激 LH 和 FSH 的分泌,但用它诱发排卵的实验并未成功^[47]。在其他非季节性繁殖动物(如牛和猪)中,KISS1 也能够促进 LH 和 FSH 的分泌^[48]。

综上所述,KISS1 是休情季节诱导母羊发情配种的重要靶标分子之一。但是,也存在限制其广泛应用的障碍,如内源性 KISS1 在体内会被迅速降解并排出体外,长时间静脉灌注才可产生引起排卵所需的 LH 峰。因此,有必要开发一种新型 KISS1 类似物,进行单次肌肉注射即可发挥作用。内源性 KISS1(Kp10)的主要降解位点已经被鉴定,在此基础上有研究者设计了一系列 Kp10 类似物以治疗激素依赖性前列腺癌^[49]。KISS1 类似物的主要研究对象是啮齿类动物和人,同时也有关于对山羊的研究,如对山羊静脉注射 Kp10 类似物 TAK-683 12 h 后,LH 和 FSH 分泌水平上升,但第一个排卵期不正常,

第二个排卵期卵泡直径小于正常山羊卵泡直径,这暗示处理的山羊会过早排卵^[50]。此外,PGF2a 和氟尿酸醋酸盐混合后制成的海绵栓处理母羊,并在海绵栓插入后第 3 天或去除海绵栓 12 h 后分别注射 TAK-683 均有 LH 峰和排卵出现^[51]。以上研究表明,KISS1 类似物可以发挥预期的作用。

近来有学者研究出新型 KISS1 类似物,专用于诱导休情季节反刍动物发情配种。肌肉注射该 KISS1 类似物后可促进休情季节母羊分泌 LH 和 FSH^[52]。KISS1 类似物与醋酸氟孕酮海绵栓联合处理母羊可刺激 LH 分泌,绝大多数母羊实现同期发情。最重要的是,由此产生的 LH 峰可引起正常排卵^[44]。之后该学者及其课题组计划进一步评估这些类似物是否能够引发休情季节母羊排卵。综上所述,KISS1 类似物诱发母羊同期发情效果可能优于 eCG,且用 KISS1 类似物替代 eCG 将消除相关的安全隐患。新型 KISS1 类似物存在一个半衰期,当其实现所需效果后会自动降解。一旦降解,它们的基础构架及天然氨基酸会被迅速回收再利用,不产生废弃物。总之,KISS1 对于有效提高休情季节反刍动物发情配种效率前景较为乐观,是一种具有潜力的新型神经肽。除了季节性繁殖的反刍动物外,还需对马、猪等动物展开 KISS1 类似物效果测试实验,可辅助人们管理哺乳动物繁育体系,其中对治疗人类不孕症同样具有很大的应用价值。

综上所述,本文对休情季节几种诱导母羊发情配种技术的应用效果及优缺点进行了总结(表 1)。从表 1 中可以看出,新型技术的繁殖效率最高,在繁殖季节和休情季节均适用。

5 结语与展望

哺乳动物为适应外界环境的季节性变化逐渐进化出季节性繁殖性状,绵羊通过长光照与短光照信号分子调控下游因子发生改变,导致下丘脑中 T3 浓度出现季节性差异,最终 T3 通过直接驱动 GnRH 或经 KISS1 间接驱动 GnRH 来激活或关闭 HPG 轴,从而调控绵羊季节性繁殖行为。目前,基于绵羊季节性繁殖的分子机制,已开发出多种人工诱导休情季节母羊发情配种的技术。从实际应用来看,公羊效

表 1 休情季节几种诱导母羊发情配种技术的应用效果及优缺点

Table 1 The effects, advantages and disadvantages for several techniques inducing estrus and mating of ewes in anestrus

繁育技术	应用效果				优点	缺点
	过渡时期 (9 ~10 月)	繁殖季节 (11 ~2 月)	过渡时期 (3 ~4 月)	休情期 (5 ~8 月)		
自然繁育	繁殖性能中， 分散出生	繁殖性能中， 分散出生	繁殖性能低	不繁殖	环保	效率不高
公羊效应	繁殖性能优， 同期出生		繁殖性能低	不繁殖	可促进发情；环保	不可控因素多， 效率不高
光照处理			繁殖性能优， 分散出生	繁殖性能优， 分散出生	可提高发情率；环保	发情时间不集中
公羊效应+ 光照处理			繁殖性能优， 同期出生	繁殖性能优， 同期出生	提高发情率， 可实现同期发情	操作复杂，非 繁殖状态时间长
激素处理	繁殖性能优， 同期出生	繁殖性能优， 同期出生	繁殖性能优， 同期出生	繁殖性能优， 同期出生	提高排卵率， 可实现同期发情	不利于环保
激素处理+ 光照处理			繁殖性能优， 同期出生	繁殖性能优， 同期出生	提高同期发情率， 便于集约化管理	不利于环保
新型技术	繁殖性能优， 同期出生	繁殖性能优， 同期出生	繁殖性能优， 同期出生	繁殖性能优， 同期出生	提高同期发情率， 提高排卵率，环保	

应与光照处理技术操作简单，成本低，安全环保，但这些环保方法整体效率不高。因此，外源激素的使用目前十分普遍，但绝大多数外源激素对环境存在安全隐患，亟需开发新型技术。目前，KISS1 类似物单次肌肉注射即可发挥作用，诱导母羊发情效果好，操作简便，发挥效应后立刻被降解并重新回收利用。与传统外源激素相比更加安全环保，提高繁殖率效果更优，是休情季节诱导反刍动物发情配种最具潜力的分子工具。

参考文献(References):

[1] Thimonier J. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. *J Reprod Fertil Suppl*, 1981, 30: 33–45. [\[DOI\]](#)

[2] Hut RA, Dardente H, Riede SJ. Seasonal timing: how does a hibernator know when to stop hibernating? *Curr Biol*, 2014, 24(13): R602–R605. [\[DOI\]](#)

[3] Bünning E. The importance of circadian leaf movements for the precision of day-length measurement. *Planta*, 1969, 86(3): 209–217. [\[DOI\]](#)

[4] Masumoto KH, Ukai-Tadenuma M, Kasukawa T, Nagano M, Uno KD, Tsujino K, Horikawa K, Shigeyoshi Y, Ueda HR. Acute induction of *Eya3* by late-night light stimulation triggers *TSHβ* expression in photoperiodism. *Curr Biol*, 2010, 20(24): 2199–2206. [\[DOI\]](#)

[5] Nakao N, Ono H, Yamamura T, Anraku T, Takagi T, Higashi K, Yasuo S, Katou Y, Kageyama S, Uno Y, Kasukawa T, Iigo M, Sharp PJ, Iwasawa A, Suzuki Y, Sugano S, Niimi T, Mizutani M, Namikawa T, Ebihara S, Ueda HR, Yoshimura T. Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature*, 2008, 452(7185): 317–322. [\[DOI\]](#)

[6] Dardente H, Lomet D, Robert V, Decourt C, Beltramo M, Pellicer-Rubio MT. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*, 2016, 86(1): 324–332. [\[DOI\]](#)

[7] Iurilli G, Ghezzi D, Olcese U, Lassi G, Nazzaro C, Tonini R, Tucci V, Benfenati F, Medini P. Sound-driven synaptic inhibition in primary visual cortex. *Neuron*, 2011, 73(4): 814–828. [\[DOI\]](#)

[8] Wood SH, Christian HC, Miedzinska K, Sear BR, Johnson M, Paton B, Yu L, McNeilly J, Davis JRE, McNeilly AS, Burt DW, Loudon AS. Binary switching of calendar cells in the pituitary defines the phase of the circannual cycle in mammals. *Curr Biol*, 2015, 25(20): 2651–2662. [\[DOI\]](#)

[9] Dardente H, Wyse CA, Birnie MJ, Dupré SM, Loudon ASI, Lincoln GA, Hazlerigg DG. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol*, 2010, 20(24): 2193–2198. [\[DOI\]](#)

[10] Mishra I, Bhardwaj SK, Malik S, Kumar V. Concurrent

- hypothalamic gene expression under acute and chronic long days: Implications for initiation and maintenance of photoperiodic response in migratory songbirds. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 439: 81–94. [DOI]
- [11] Wang YH, Tadjuidje E, Pandey RN, Stefater III JA, Smith LEH, Lang RA, Hegde RS. The eyes absent proteins in developmental and pathological angiogenesis. *Am J Pathol*, 2016, 186(3): 568–578. [DOI]
- [12] Dupré SM, Miedzinska K, Duval CV, Yu L, Goodman RL, Lincoln GA, Davis JRE, McNeilly AS, Burt DD, Loudon ASI. Identification of *Eya3* and *TAC1* as long-day signals in the sheep pituitary. *Curr Biol*, 2010, 20(9): 829–835. [DOI]
- [13] Hanon EA, Lincoln GA, Fustin JM, Dardente H, Masson-Pévet M, Morgan PJ, Hazlerigg DG. Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol*, 2008, 18(15): 1147–1152. [DOI]
- [14] Radwańska P, Kosior-Korzecka U. Relationships between leptin, KiSS-1/GPR54 expression and TSH secretion from pituitary cells of pubertal ewes *in vitro*. *Res Vet Sci*, 2016, 105: 180–187. [DOI]
- [15] Bolborea M, Helfer G, Ebling FJP, Barrett P. Dual signal transduction pathways activated by TSH receptors in rat primary tanycyte cultures. *J Mol Endocrinol*, 2015, 54(3): 241–250. [DOI]
- [16] Ono H, Hoshino Y, Yasuo S, Watanabe M, Nakane Y, Murai A, Ebihara S, Korf HW, Yoshimura T. Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(47): 18238–18242. [DOI]
- [17] De Miera CS, Hanon EA, Dardente H, Birnie M, Simonneaux V, Lincoln GA, Hazlerigg DG. Circannual variation in thyroid hormone deiodinases in a short-day breeder. *J Neuroendocrinol*, 2013, 25(4): 412–421. [DOI]
- [18] Adib A, Freret S, Touze JL, Lomet D, Lardic L, Chesneau D, Estienne A, Papillier P, Monniaux D, Pellicer-Rubio MT. Progesterone improves the maturation of male-induced preovulatory follicles in anoestrous ewes. *Reproduction*, 2014, 148(4): 403–416. [DOI]
- [19] Proudman JA, Clerens S, Van Den Bergh G, Garrett WM, Verhaert PD, Vandesande F, Berghman LR. Immunohistochemical localization of chromogranin A in gonadotrophs and somatotrophs of the turkey and chicken pituitary. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, 132(2): 293–303. [DOI]
- [20] Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S, Yoshimura T. Seasonal morphological changes in the neuro-glial interaction between gonadotropin-releasing hormone nerve terminals and glial endfeet in Japanese quail. *Endocrinology*, 2004, 145(9): 4264–4267. [DOI]
- [21] Dardente H, Hazlerigg DG, Ebling FJ. Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5: 19. [DOI]
- [22] Caraty A, Lomet D, Sébert ME, Guillaume D, Beltramo M, Evans NP. Gonadotrophin-releasing hormone release into the hypophyseal portal blood of the ewe mirrors both pulsatile and continuous intravenous infusion of kisspeptin: an insight into kisspeptin's mechanism of action. *J Neuroendocrinol*, 2013, 25(6): 537–546. [DOI]
- [23] Abdoli R, Zamani P, Mirhoseini SZ, Ghavi Hossein-Zadeh N, Nadri S. A review on prolificacy genes in sheep. *Reprod Domes Anim*, 2016, 51(5): 631–637. [DOI]
- [24] Huang DW, Chu MX. Research progress in molecular mechanism of animal seasonal reproduction. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(7): 695–706.
黄冬维, 储明星. 动物季节性繁殖分子调控机理研究进展. *遗传*, 2011, 33(7): 695–706. [DOI]
- [25] Ciechanowska M, Łapot M, Paruszevska E, Radawiec W, Przekop F. The influence of dopaminergic system inhibition on biosynthesis of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in anoestrous sheep; Hierarchical role of kisspeptin and RFamide-related peptide-3 (RFRP-3). *Reprod Fertil Dev*, 2017, 30(4): 672–680. [DOI]
- [26] Klosen P, Sébert ME, Rasri K, Laran-Chich MP, Simonneaux V. TSH restores a summer phenotype in photo-inhibited mammals *via* the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J*, 2013, 27(7): 2677–2686. [DOI]
- [27] Henson JR, Carter SN, Freeman DA. Exogenous T₃ elicits long day-like alterations in testis size and the RFamides Kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone in short-day Siberian hamsters. *J Biol Rhythms*, 2013, 28(3): 193–200. [DOI]
- [28] Fabre-Nys C, Kendrick KM, Scaramuzzi RJ. The "ram effect": new insights into neural modulation of the gonadotropic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Front Neurosci*, 2015, 9: 111. [DOI]
- [29] Zarazaga LA, Gatica MC, Hernández H, Gallego-Calvo L, Delgadillo JA, Guzmán JL. The isolation of females from males to promote a later male effect is unnecessary if the bucks used are sexually active. *Theriogenology*, 2017, 95: 42–47. [DOI]
- [30] Chanvallon A, Sagot L, Pottier E, Debus N, François D, Fassier T, Scaramuzzi RJ, Fabre-Nys C. New insights into the influence of breed and time of the year on the response of ewes to the 'ram effect'. *Animal*, 2011, 5(10): 1594–1604. [DOI]
- [31] Meza-Herrera CA, Cano-Villegas O, Flores-Hernandez A, Veliz-Deras FG, Calderon-Leyva G, Guillen-Muñoz JM, De La Peña CG, Rosales-Nieto CA, Macias-Cruz U, Avendaño-Reyes L. Reproductive outcomes of anestrus goats supplemented with spineless *Opuntia megacantha* *Salm-Dyck* protein-enriched cladodes and exposed to the male effect. *Trop Anim Health Prod*, 2017, 49(7): 1511–1516. [DOI]

- [32] Delgadillo JA, Flores JA, Hernández H, Poindron P, Keller M, Fitz-Rodríguez G, Duarte G, Vielma J, Fernández IG, Chemineau P. Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats. *Horm Behav*, 2015, 69: 8–15. [DOI]
- [33] Martinez-Royo A, Alabart JL, Sarto P, Serrano M, Lahoz B, Folch J, Calvo JH. Genome-wide association studies for reproductive seasonality traits in Rasa Aragonesa sheep breed. *Theriogenology*, 2017, 99: 21–29. [DOI]
- [34] Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod Nutr Dev*, 1993, 33(6): 609–617. [DOI]
- [35] Fleisch A, Bollwein H, Piechotta M, Janett F. Reproductive performance of Lacaune dairy sheep exposed to artificial long days followed by natural photoperiod without and with additional progestagen treatment during the non-breeding season. *Theriogenology*, 2015, 83(3): 320–325. [DOI]
- [36] Menassol JB, Collet A, Chesneau D, Malpoux B, Scaramuzzi RJ. The interaction between photoperiod and nutrition and its effects on seasonal rhythms of reproduction in the ewe. *Biol Reprod*, 2012, 86(2): 52. [DOI]
- [37] 王忻, 刘月琴, 张英杰, 郭婷婷. 光照控制诱导非繁殖季节蒙古羊发情排卵效果研究. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(7): 55–57. [DOI]
- [38] Corteel JM, Leboeuf B, Baril G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rumin Res*, 1988, 1(1): 19–35. [DOI]
- [39] Leboeuf B, Forgerit Y, Bernelas D, Pougnaud JL, Senty E, Driancourt MA. Efficacy of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus, time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology*, 2003, 60(7): 1371–1378. [DOI]
- [40] Martin GB, Milton JT, Davidson RH, Banchero Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82–83: 231–245. [DOI]
- [41] Caraty A, Blumenröhr M, Vogel GMT, Lomet D, Briant C, Beltramo M. RF9 powerfully stimulates gonadotrophin secretion in the ewe: evidence for a seasonal threshold of sensitivity. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24(5): 725–736. [DOI]
- [42] Kim JS, Brownjohn PW, Dyer BS, Beltramo M, Walker CS, Hay DL, Painter GF, Tyndall JDA, Anderson GM. Anxiogenic and stressor effects of the hypothalamic neuropeptide RFRP-3 are overcome by the NPFFR antagonist GJ14. *Endocrinology*, 2015, 156(11): 4152–4162. [DOI]
- [43] Pellicer-Rubio MT, Boissard K, Forgerit Y, Pougnaud JL, Bonnè JL, Leboeuf B. Evaluation of hormone-free protocols based on the "male effect" for artificial insemination in lactating goats during seasonal anestrus. *Theriogenology*, 2016, 85(5): 960–969. [DOI]
- [44] Beltramo M, Dardente H, Cayla X, Caraty A. Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1): 387–399. [DOI]
- [45] Sébert ME, Lomet D, Saïd SB, Monget P, Briant C, Scaramuzzi RJ, Caraty A. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: potential role of estradiol. *Domest Anim Endocrinol*, 2010, 38(4): 289–298. [DOI]
- [46] Redmond JS, Macedo GG, Velez IC, Caraty A, Williams GL, Amstalden M. Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction*, 2011, 141(4): 541–548. [DOI]
- [47] Decourt C, Caraty A, Briant C, Guillaume D, Lomet D, Chesneau D, Lardic L, Duchamp G, Reigner F, Monget P, Dufourny L, Beltramo M, Dardente H. Acute injection and chronic perfusion of kisspeptin elicit gonadotropins release but fail to trigger ovulation in the mare. *Biol Reprod*, 2014, 90(2): 36. [DOI]
- [48] Whitlock BK, Daniel JA, Wilborn RR, Rodning SP, Maxwell HS, Steele BP, Sartin JL. Interaction of estrogen and progesterone on kisspeptin-10-stimulated luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Neuroendocrinology*, 2008, 88(3): 212–215. [DOI]
- [49] Asami T, Nishizawa N, Matsui H, Nishibori K, Ishibashi Y, Horikoshi Y, Nakayama M, Matsumoto SI, Tarui N, Yamaguchi M, Matsumoto H, Ohtaki T, Kitada C. Design, synthesis, and biological evaluation of novel investigational nonapeptide KISS1R agonists with testosterone-suppressive activity. *J Med Chem*, 2013, 56(21): 8298–8307. [DOI]
- [50] Goto Y, Endo N, Nagai K, Ohkura S, Wakabayashi Y, Tanaka A, Matsui H, Kusaka M, Okamura H, Tanaka T. Ovarian and hormonal responses to follicular phase administration of investigational metastin/kisspeptin analog, TAK-683, in goats. *Reprod Domest Anim*, 2014, 49(2): 338–342. [DOI]
- [51] Endo N, Tamesaki C, Ohkura S, Wakabayashi Y, Matsui H, Tanaka A, Watanabe T, Okamura H, Tanaka T. Differential changes in luteinizing hormone secretion after administration of the investigational metastin/kisspeptin analog TAK-683 in goats. *Anim Reprod Sci*, 2015, 159: 87–93. [DOI]
- [52] Beltramo M, Robert V, Galibert M, Madinier JB, Marceau P, Dardente H, Decourt C, De Roux N, Lomet D, Delmas AF, Caraty A, Aucagne V. Rational design of triazololipopeptides analogs of kisspeptin inducing a long-lasting increase of gonadotropins. *J Med Chem*, 2015, 58(8): 3459–3470. [DOI]