

光照对马岗鹅卵泡发育及相关 激素 mRNA 水平的影响

刘容珍¹, 黄运茂¹, 李万利², 田允波¹, 施振旦²

(1 仲恺农业工程学院 生命科学学院, 广东 广州 510225; 2 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:研究了光照对马岗鹅卵泡发育及相关激素基因表达的影响, 试验期对照组接受短光照(11 h 光: 13 h 暗), 处理组在接受 7 d 短光照后接受长光照(16 h 光: 8 h 暗). 结果表明在整个试验期, 对照组产蛋率维持 10% 以上, 处理组则在接受长光照约 15 d 后产蛋率快速下降并于试验第 55 d 停产. 在处理组接受长光照 17 d(试验第 25 d)后, 与对照组相比, 其下丘脑血管活性肠肽(VIP)和垂体催乳素(PRL)的基因表达稍提高($P > 0.05$), 血浆 PRL 水平明显高于对照组($P < 0.05$), 而促黄体素(LH)水平和卵巢大黄卵泡(LYF)数、小黄卵泡(SYF)数则无差异, 仅大白卵泡(LWF)数显著低于后者($P < 0.01$); 在处理组接受长光照 45 d 后(试验第 53 d), 其下丘脑 VIP 和垂体 PRL 的基因表达显著提高($P < 0.01$), 且血浆 PRL 质量浓度显著高于对照组($P < 0.01$), LH 水平则明显低于对照组($P < 0.05$), 卵巢上无任何卵泡, 对照组的 LYF、SYF 和 LWF 数与试验第 25 d 时相似. 整个试验期, 长光照对下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)和垂体 LH β 的基因表达均无明显影响. 表明长光照能促进下丘脑 VIP 和垂体 PRL 的基因表达, 提高血浆 PRL 水平和抑制卵泡发育.

关键词:马岗鹅; 光照; 卵泡发育; 激素 mRNA 水平

中图分类号:S835

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)03-0076-05

Effect of Photoperiod on Follicular Development and mRNA Levels of Related Hormones in Magang Geese

LIU Rong-zhen¹, HUANG Yun-mao¹, LI Wan-li², TIAN Yun-bo¹, SHI Zhen-dan²

(1 College of Life Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To study the effects of photoperiod on developments of ovarian follicles and expression levels of related hormones in Magang geese, adult breeding geese were divided into two groups (control and treated) and subjected to different lighting schemes. Birds in control group were exposed to short photoperiod (11 h light: 13 h dark), and the treated group was subjected to long photoperiod (16 h light: 8 h dark) after 7-day treatment of short photoperiod. The laying rate remained above 10% in control geese throughout the experiment, and egg laying of treated geese quickly decreased after 15-day treatment of long photoperiod and ceased on day 55. On day 25, 17 days after treated geese were transferred from short to long photoperiod, plasma prolactin (PRL) concentration in treated geese was significantly ($P < 0.05$) higher than that in control geese, but there were no marked difference in luteinizing hormone (LH) levels between the two groups. On day 53, 45 days after onset of long photoperiod treatment in treated group, long photoperiod in treated geese significantly accelerated PRL secretion ($P < 0.01$) and decreased plasma LH level than in control geese ($P < 0.05$). On day 25, there was no marked difference in the number of large yellow follicle (LYF) and small yellow follicle (SYF) between the two groups. However, treated

收稿日期: 2008-10-27

作者简介: 刘容珍(1951—), 女, 高级兽医师; 通讯作者: 施振旦(1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: zdshi@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30671504); 广东省科技计划项目(200814649)

geese possessed significantly ($P < 0.01$) more large white follicle (LWF) than did control group. On day 53, the numbers of LYF, SYF and LWF were similar to the numbers on day 25, respectively, in control geese under short photoperiod. But there were no LYF, SYF and LWF observed on the ovary of the treated geese. 17-day treatment of long photoperiod in treated group only increased ($P > 0.05$), but 45-day treatment significantly ($P < 0.01$) increased, mRNA levels of VIP in the hypothalamus and PRL in the pituitary gland, than in control geese. However, no photoperiodic effect was observed on the expression levels of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) in hypothalamus and LH β subunit in pituitary on both occasions. These results demonstrated that long photoperiod increases expression levels of VIP in the hypothalamus and PRL in the pituitary, plasma PRL concentration and inhibites follicular developments in Magang geese.

Key words: Magang geese; photoperiod; follicular development; mRNA level of hormones

马岗鹅是南方灰鹅的典型代表,其繁殖活动呈现明显的季节性,在每年的夏至前后进入繁殖期,到次年的春分左右停产.同其他的季节性繁殖鸟(禽)类一样,在繁殖活动的调控中光是重要控制因子^[1].研究发现,光照能调控下丘脑促性腺激素释放激素(Gonadotrophin releasing hormone, GnRH)和血管活性肠肽(Vasoactive intestinal peptide, VIP)的分泌^[2],促进催乳素(Prolactin, PRL)分泌,且使PRL分泌呈季节性变化,一般在生殖功能退化时达到峰值^[3].对马岗鹅的研究发现,通过人工长短光照处理可以成功逆转其繁殖活动的季节性变化,短光照对繁殖活动具有促进作用,长光照则形成抑制,并且在繁殖活动的季节性变化中,随着光照的变化,血浆中PRL和促黄体素(Luteinizing hormone, LH)水平呈现季节性变化^[4-5].本试验在前期对光照调控马岗鹅繁殖活动的研究基础上,研究了光照对其卵泡发育及下丘脑GnRH、VIP和垂体PRL、LH β 表达水平的影响,以期增进对光照调控马岗鹅季节性繁殖活动的认识.

1 材料与方法

1.1 动物试验

试验地点为清远市博士鹅业有限公司,试验动物是从该公司反季节生产种鹅群中选的健康的马岗鹅325只(♂:♀=1:6),平均分为对照组和处理组.鹅群试验前处于产蛋期,日接受11 h光照(11 h光:13 h暗).对照组整个试验期继续每天接受11 h光照(11 h光:13 h暗)(图1 I);处理组则在试验初经7 d与对照组相同的短光照(11 h光:13 h暗)后,将日光照时间延长到16 h(16 h光:8 h暗),到试验结束(图1 II).试验中对长光照的控制是在白天日照的基础上对鹅群进行晚间人工补光(30~50 lx),对短光照的

控制是通过将鹅群限制在通风良好的棚内蔽光实现.在试验第25 d和第53 d分别从各组中随机选8只非就巢鹅进行翅下静脉采血($n=8$),肝素钠抗凝,3 h内分离血浆(2 000 r/min、20 min、4℃),于-20℃保存待激素测定;对采血后的母鹅进行解剖,检查卵巢形态及卵泡发育情况,统计卵泡类型及数量,并采集垂体和下丘脑样本,液氮速冻后于-75℃保存,留待检测基因表达水平.剖检卵泡发育状况时,卵泡类型分为大黄卵泡(Large yellow follicle, LYF, $d > 20$ mm)、小黄卵泡(Small yellow follicle, SYF, $10 \text{ mm} \leq d \leq 20 \text{ mm}$)和大白卵泡(Large white follicle, LWF, $6 \text{ mm} \leq d \leq 10 \text{ mm}$).

试验期除接受限制性光照处理时被围在鹅舍内外,鹅在白天可自由活动、采食、饮水和配种,并给予适量青草或水草.每天定时集蛋,记录各组每天总产蛋数并计算产蛋率.每3~4 d检查1次就巢,并观察换羽情况,被确认就巢的母鹅被隔离限饲7~10 d以强制终止就巢,然后重新归群.

1.2 激素测定

血浆PRL由鸡PRL放射免疫法(Radioimmunoassay, RIA)测定^[6].鸡PRL参照标准(AFP-10328B)、同位素碘标记chPRL(AFP-4444B)和兔抗chPRL抗血清(AFP-151040789)均购于美国国家卫生研究院(NIH).血浆LH由鸡LH放射免疫法测定^[7].鸡LH参照标准(USDA-cLH-K-3)、同位素碘标记LH(USDA-cLH-I-3)和兔抗鸡LH抗血清(USDA-AcLH-5)均由美国农业部 Germplasm and Gamete Physiology Laboratory 的 J. A. Proudman 博士赠送.第二抗体驴抗兔抗血清购自北京北方生物技术研究所以. PRL 和 LH 碘化标记所用同位素 Na^{125}I 为成都中核高通同位素股份有限公司产品,氯胺 T 为 Sigma 公

公司产品. PRL 放射免疫法灵敏度为 0.34 ng/mL, 标准曲线的 ED75、ED50 和 ED25 分别为 1.30、3.71 和 10.60 ng/mL, LH 放射免疫法灵敏度为 0.02 ng/mL, 两方法的批内批间变异均小于 15%, 样品连续稀释所得抑制曲线均与标准曲线平行.

1.3 基因表达检测

下丘脑 GnRH 和 VIP 及垂体 PRL 和 LH β 的 mRNA 水平用半定量 PCR 检测. 采用 Trizol 试剂盒 (为广州英韦创津生物有限公司产品) 从下丘脑和垂体样品中抽提总 RNA, 经 Dnase-I 处理后稀释为 1 μ g/ μ L 作为反转录 (RT) 模板, 以 Oligo dT18 为下游引物合成 cDNA. 根据 NCBI 基因库相关基因序列信息, 选择适当片段设计各基因片段的特异性引物 (表 1). 在摸索和优化 PCR 反应条件后, 以各样品 RT 产物为模板, 以特异性引物 PCR 扩增以上 4 基因及内标的基因片段. 将各基因及相应内标的 PCR 产物在相同条件下琼脂糖电泳, 利用 Lab Work4.0 图像分析软件 (为美国 UVP 公司产品) 对各产物电泳条带进行光密度分析, 求出与内标基因 β -actin 的光密度比值, 以此比值作为样品中各基因的相对表达水平. 所获得的马岗鹅 GnRH、VIP、PRL、LH β 和 β -actin 基因片段的序列递交至 NCBI 基因库的序列号分别为: DQ023158、DQ023161、DQ023160、DQ023159 和 DQ023157.

表 1 半定量 RT-PCR 检测马岗鹅相关基因的引物序列

Tab.1 Sequences of the primers used in semi-quantitative RT-PCR of genes in Magang geese

目的基因	引物及序列	产物位置/bp
β -actin	Sense 5'-TCCTGCGGCATCCACGAGA-3'	811 ~ 1 028
	Antisense 5'-CCGCCGATCCAGACCGAGTA-3'	
GnRH	Sense 5'-GAAGATCTTGGTCGCTGCTCCTCTGT-3'	15 ~ 276
	Antisense 5'-AATCTCCTTTCTTCTGGCTTCTCCTTC-3'	
VIP	Sense 5'-ACCAGTGTCTACAGCCATCTTTTG-3'	283 ~ 587
	Antisense 5'-AGGTGGCTCAGCAGTTCATCTACA-3'	
PRL	Sense 5'-ATGTGACAGTGGCGGTGAGAAG-3'	222 ~ 583
	Antisense 5'-GCTTGGAGTCTCATCGGCAAGTT-3'	
LH β	Sense 5'-TGCTCAGGGTCGGGCTTTC-3'	155 ~ 418
	Antisense 5'-TGCAGTCGGAGGTCGCTATGG-3'	

1.4 数据分析

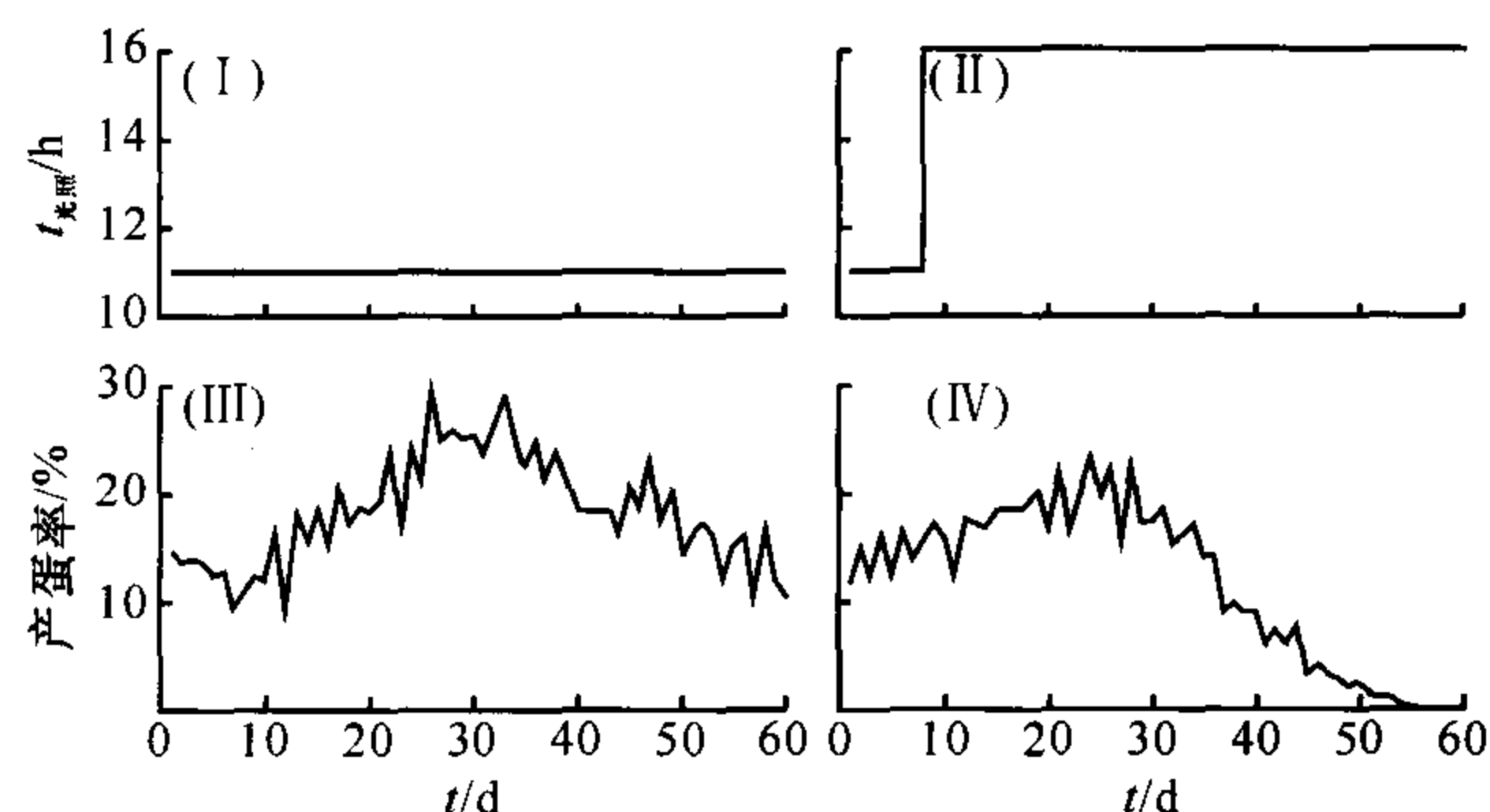
产蛋率 (即日产蛋率) = 日产蛋总数/母鹅总数 (包括就巢鹅) $\times 100\%$. 对 2 组的血浆 PRL 与 LH 质量浓度变化、各基因相对表达水平和不同类型卵泡的数量作单因子方差分析, 对各时间点上的组间差异作 t -检验; 除注明外, 各数值均用平均值 $\pm$ SE 表示. 所有

数据分析均用 SAS software version 8.01 完成.

2 结果

2.1 产蛋

在短光照 (11 h 光: 13 h 暗) 下, 对照组产蛋率在试验初期略微下降后缓缓升高, 在试验第 25 ~ 35 d 处于产蛋高峰期, 产蛋率约 30%, 之后慢慢下降, 到试验末产蛋率约为 10% (图 1 III). 整个试验期间对照组产蛋曲线呈现一个完整产蛋波, 最低产蛋率均在 10% 左右 (图 1 III). 试验初, 处理组产蛋率同对照组一样维持在 10% 左右, 延长光照 (16 h 光: 8 h 暗) 后, 产蛋率慢慢上升, 到试验第 25 d 前后达到峰值 (25%), 之后快速下降, 于第 55 d 停产 (图 1 IV).



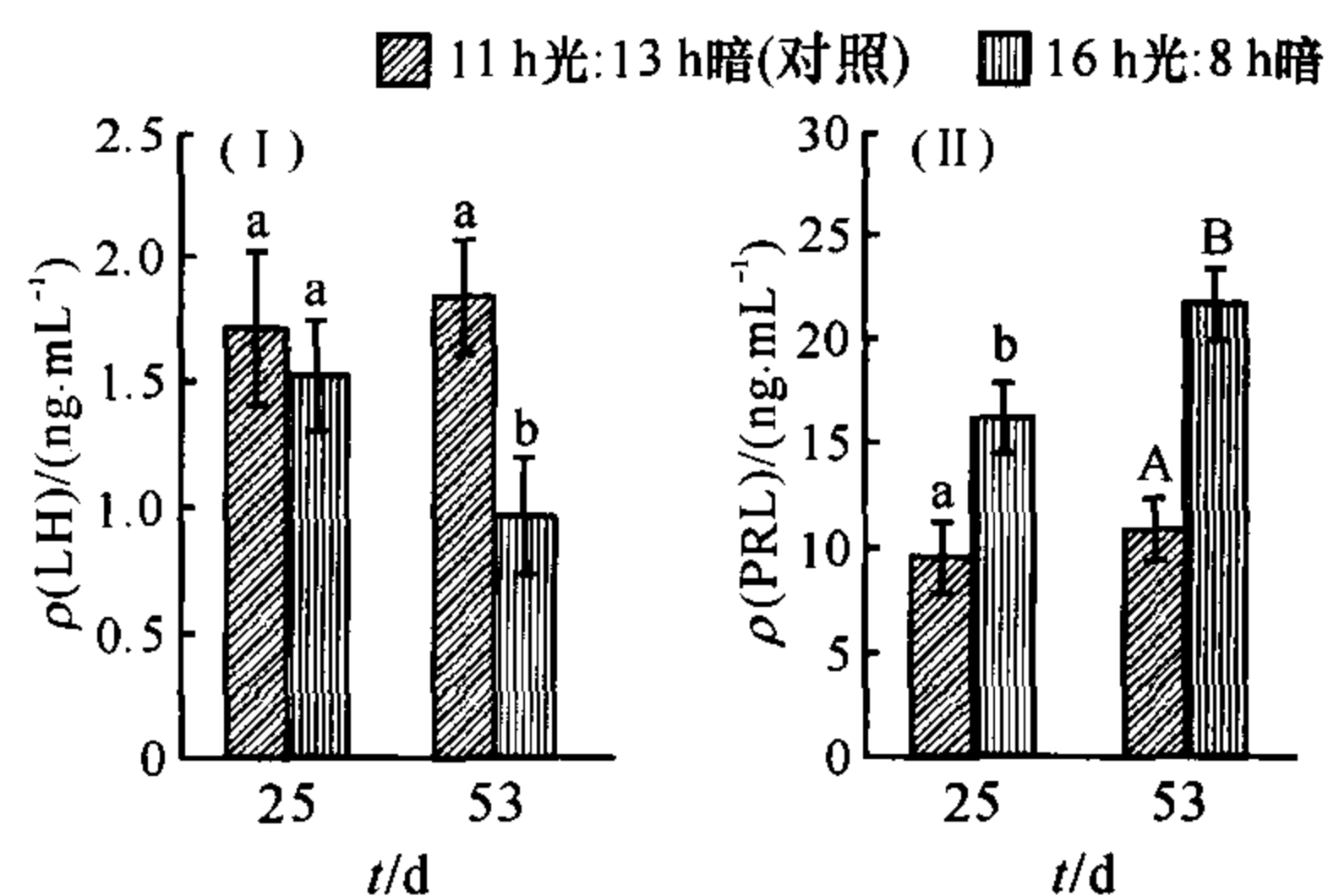
I: 对照组光照时间; II: 处理组光照时间; III: 对照组产蛋率; IV: 处理组产蛋率

图 1 光照对马岗鹅产蛋率的影响

Fig. 1 Effect of photoperiod on laying percentage of Magang geese

2.2 激素质量浓度

由图 2 可见, 在试验第 25 d, 处理组已接受长光照 (16 h 光: 8 h 暗) 17 d, 其血浆 LH 质量浓度与短光照 (11 h 光: 13 h 暗) 条件下的对照组无显著差异 ($P > 0.05$, 图 2 I); 而此时处理组的血浆 PRL 质量浓度明显高于对照组 ($P < 0.05$, 图 2 II). 在试验第 53 d, 处理组延长光照 (16 h 光: 8 h 暗) 45 d, 其血浆 PRL



不同小写字母示差异显著 ($P < 0.05$, t 检验), 不同大写字母示差异极显著 ($P < 0.01$, t 检验)

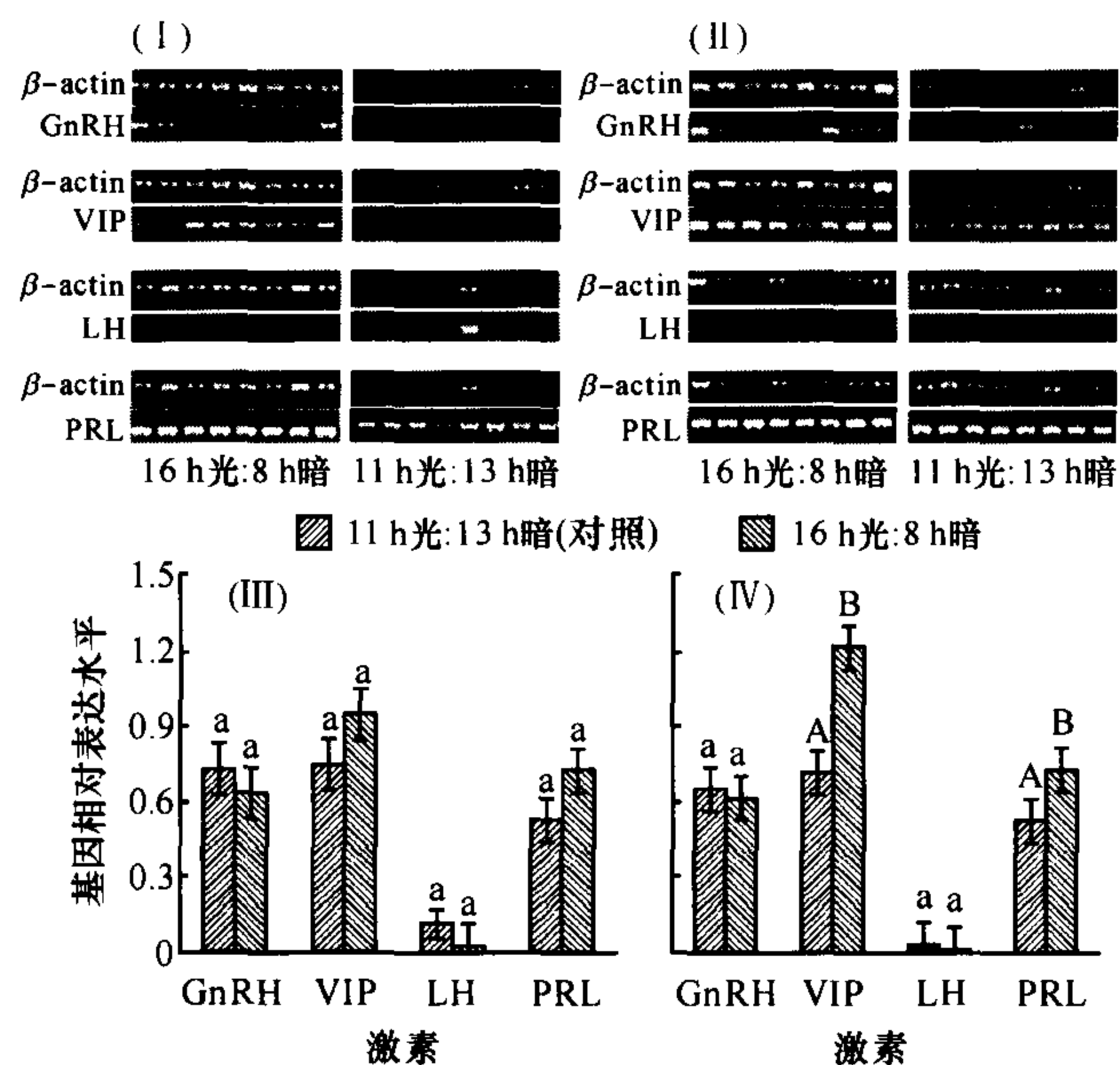
图 2 光照对马岗鹅血浆 LH (I) 和 PRL (II) 质量浓度的影响

Fig. 2 Effect of photoperiod on plasma concentrations of LH (I) and PRL (II) of Magang geese

质量浓度极显著高于对照组 ($P < 0.01$, 图 2 II); 而血浆 LH 质量浓度则明显低于对照组 ($P < 0.05$, 图 2I)。

2.3 基因表达水平

将 GnRH、VIP、PRL、LH β 和 β -actin 基因片段的 PCR 产物进行电泳 (图 3 I 和 3 II), 通过光密度分析条带亮度并求各基因片段与 β -actin 的光密度比值作为各基因的相对表达水平。在处理组延长光照 17 d 后 (试验 25 d), 其下丘脑 VIP 和垂体 PRL 的 mRNA 水平仅比对照组略高, 即延长光照仅稍稍提高下丘脑 VIP 和垂体 PRL 的基因表达水平 ($P > 0.05$, 图 3 III); 而在试验第 53 d, 处理组已接受长光照 45 d, 其下丘脑 VIP 和垂体 PRL 的 mRNA 水平要极显著高于对照组, 即此时长光照已极显著提高下丘脑 VIP 和垂体 PRL 的基因表达水平 ($P < 0.01$, 图 3 IV)。但在 2 次检测中, 长光照对下丘脑 GnRH 和垂体 LH β 的基因表达水平均无明显影响 ($P > 0.05$, 图 3 III 和图 3 IV)。



不同小写字母示差异显著 ($P < 0.05$, t 检验), 不同大写字母示差异极显著 ($P < 0.01$, t 检验)

I: 试验第 25 d 各目的基因 PCR 产物电泳图; II: 试验第 53 d 各目的基因 PCR 产物电泳图; III: 试验第 25 d 各目的基因 mRNA 表达水平; IV: 试验第 53 d 各目的基因 mRNA 表达水平

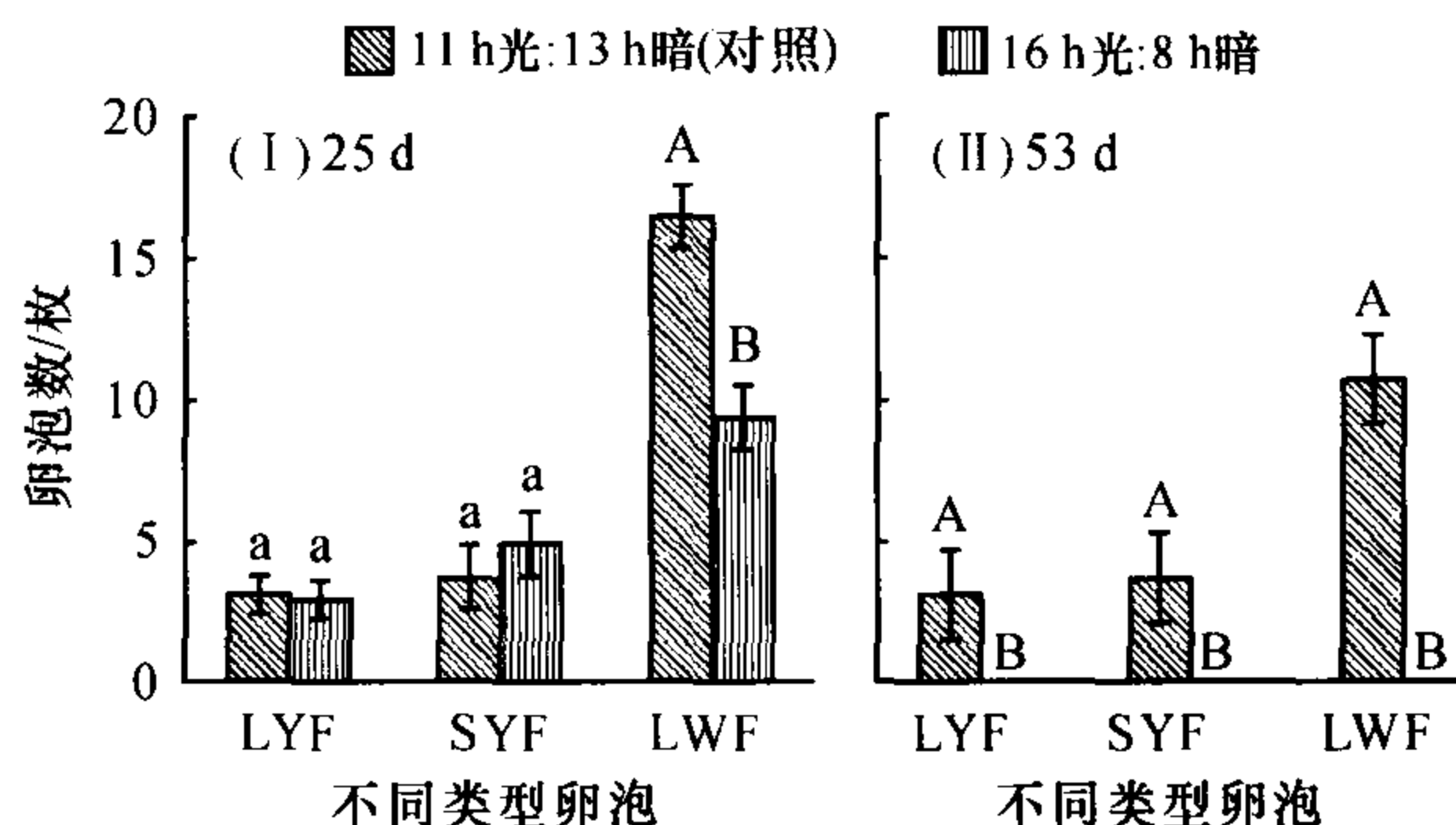
图 3 马岗鹅下丘脑 GnRH、VIP 和垂体 PRL、LH β 基因表达检测电泳图和表达水平

Fig. 3 Electrophoresis graphs and gene expression levels of GnRH, VIP in the hypothalamus and PRL, LH β in the pituitary of Magang geese

2.4 卵泡发育

在处理组接受长光照 17 d 后 (试验第 25 d), 其 LYF 和 SYF 数与对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 但 LWF 数却极显著低于对照组 ($P < 0.01$, 图 4 I)。在处理组接受长光照 45 d 后 (试验第 53 d), 对照组

LYF、SYF 和 LWF 数与试验第 25 d 时相似, 处理组则无 LYF、SYF 和 LWF (图 4 II)。



不同小写字母示差异显著 ($P < 0.05$, t 检验), 不同大写字母示差异极显著 ($P < 0.01$, t 检验)

图 4 光照对马岗鹅卵泡发育的影响

Fig. 4 Effect of photoperiod on follicular development of Magang geese

3 讨论

在本试验中, 将鹅群置于短光照 (11 h 光:13 h 暗) 下, 与置于长光照条件下的处理组相比, 其血浆 PRL 质量浓度在试验第 25 d 和第 53 d 均处于低水平, 而处理组的血浆 PRL 质量浓度在鹅群接受长光照 (16 h 光:8 h 暗) 17 d 后 (试验第 25 d) 明显高于对照组, 在接受长光照 45 d 后 (试验第 53 d) 则极显著高于对照组。长光照对 PRL 分泌的促进结果与已报道在马岗鹅的以及其他季节性繁殖鸟 (禽) 类和哺乳类上 PRL 季节性分泌的结果相一致^[3-5,8]。在短光照下, 对照组的在整个试验期维持正常产蛋, 并且整个试验期 (2 个月) 的产蛋率变化形成一个完整的产蛋波, 与正常繁殖期的产蛋率变化相同^[4,5,9-10]; 而处理组在延长光照后, 其产蛋率在出现短时间的上升之后则快速下降, 并且鹅群在接受长光照 47 d 后 (试验第 55 d) 停产, 这与之之前在马岗鹅上的研究结果相同^[4,5,9-10]。一般认为, PRL 分泌的季节性升高在抑制禽 (鸟) 类的繁殖活性上发挥着重要作用^[3,11-12], 这种观点进一步得到本试验结果的支持。本试验血浆 LH 质量浓度的变化则呈现与 PRL 相反的变化趋势。在处理组接受长光照 17 d 后 (试验第 25 d), 其血浆 LH 质量浓度要比短光照下的对照组低, 但差异不明显, 而到处理组接受长光 45 d 后 (试验第 53 d), 血浆 LH 水平则明显低于对照组。这种血浆 LH 水平的变化趋势与已报道的在马岗鹅以及匈牙利白鹅上的研究结果相一致^[4-5,13]。

试验中, 当延长光照促进 PRL 分泌时, 相应的长光照也明显促进了马岗鹅下丘脑 VIP 和垂体 PRL 基

因表达水平的上升,这与在其他禽(鸟)类上的研究结果相一致^[2,14].然而,光照在延长17 d和45 d后均没有对马岗鹅下丘脑 GnRH 和垂体 LH β 亚基的基因表达水平产生明显的影响.虽然有研究表明,在火鸡上光照能影响 GnRH 的 mRNA 水平^[15],但另一些研究却依然不能证实光照对 GnRH mRNA 水平的影响^[16].有研究提示,光照对 GnRH 水平的调控主要在其分泌上而非在合成^[16],在哺乳动物上主要影响 GnRH 分泌的脉冲^[17-18].因此,当长光照下马岗鹅血浆 LH 水平明显下降时,垂体 LH β mRNA 水平也只呈现很少的变化.

在卵泡发育方面,当处理组接受长光照17 d后(试验第25 d),其 LYF 和 SYF 数与短光照下的对照组没有明显差异,但 LWF 数却明显低于对照组;当处理组接受长光照45 d后(试验第53 d),对照组的 LYF、SYF 和 LWF 数与试验第25 d时没有区别,而处理组无任何 LYF、SYF 和 LWF.结果说明,光照对马岗鹅卵泡发育的影响是从 LWF 的发育就已经开始,并且这种影响主要是通过以上的相关激素实现的,进而影响到其繁殖活性.本研究结果进一步表明,短光照有利于促进马岗鹅的繁殖活动,长光照则对其繁殖活性具有抑制作用^[9-10].

参考文献:

- [1] ETCHES R J. Reproduction in poultry [M]. Walling UK: CAB International, 1996: 106-124; 263-278.
- [2] SHARP P J, BLACHE D. A neuroendocrine model for prolactin as the key mediator of seasonal breeding in birds under long-and short-day photoperiods [J]. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2003, 81(4): 350-358.
- [3] CURLEWIS J D. Seasonal prolactin secretion and its role in seasonal reproduction: A review [J]. Reproduction, Fertility and Development, 1992, 4(1): 1-23.
- [4] 黄运茂, 施振旦, 李孝伟, 等. 光照对马岗鹅季节性繁殖活动和内分泌的调控[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(1): 29-36.
- [5] 黄运茂, 施振旦, 李孝伟, 等. 光照对马岗鹅产蛋、PRL 和 LH 分泌季节性变化的影响[J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(3): 94-96.
- [6] 施振旦, 黄祖汉. 家鸡催乳素放射免疫测定法的建立[J]. 核农学报, 2000, 14(1): 36-39.
- [7] 施振旦. 家鸡促黄体素放射免疫测定法的建立[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(增刊): 116-119.
- [8] SHARP P J, DAWSON A, LEA R W. Control of luteinizing hormone and prolactin secretion in birds [J]. Comparative Biochemistry Physiology: Part C, 1998, 119(3): 275-282.
- [9] 施振旦, 孙爱东, 黄运茂, 等. 光照对广东灰鹅繁殖季节性的影响研究[J]. 广东农业科学, 2005, 3: 72-75.
- [10] SHI Z D, HUANG Y M, LIU Z, et al. Seasonal and photoperiodic regulation of secretion of hormones associated with reproduction in Magang goose ganders [J]. Domestic Animal Endocrinology, 2007, 32(3): 190-200.
- [11] DAWSON A, GOLDSMITH A R. Prolactin and gonadotrophin secretion in wild starlings (*Sturnus vulgaris*) during the annual cycle and in relation to nesting, incubation, and rearing young [J]. General Comparative Endocrinology, 1982, 48(1): 213-221.
- [12] BLACHE D, TALBOT R T, BLACKBENY M A, et al. Photoperiodic control of the concentration of luteinizing hormone, prolactin and testosterone in the male Emu (*Dromaius novaehollandiae*), a bird that breeds on short days [J]. Journal of Neuroendocrinology, 2001, 13(11): 998-1006.
- [13] HARGITAI C, FORG V, MEZES M, et al. Seasonal and circadian fluctuation of plasma LH level and its change in the domestic goose as an effect of GnRH treatment [J]. Acta Biologica Hungarica, 1993, 44(2-3): 255-268.
- [14] CHAISEHA Y, EL HALAWANI M E. Neuroendocrinology of the female turkey reproductive cycle [J]. Journal of Poultry Science, 2005, 42(1): 87-100.
- [15] KANG S W, THAYANANUPHAT A, ROZENBOIM I, et al. Expression of hypothalamic GnRH-I mRNA in the female turkey at different reproductive states and following photostimulation [J]. General Comparative Endocrinology, 2006, 146(2): 91-99.
- [16] MEDDLE S L, FOLLERR B K. Photoperiodically driven changes in Fos expression within the basal tuberal hypothalamus and median eminence of Japanese quail [J]. Journal of Neuroscience, 1997, 17(22): 8909-8918.
- [17] KARSCH F J, BITTMAN E L, FOSTER D L, et al. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction [J]. Recent Progress in Hormone Research, 1984, 40: 185-232.
- [18] DYER R G, ROBINSON J E. The LHRH pulse generator [J]. Journal of Endocrinology, 1989, 123(1): 1-2.

【责任编辑 柴 焰】