

LIU 分类号：  
学 号：20202013007

密 级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 甘油诱导绵羊非繁殖季节发情相关代谢物筛选 及功能验证

学位申请人	谢梦婷
指导教师	赵宗胜教授
申请学位类别	农学硕士
专业名称	畜牧学
研究领域	动物遗传育种与繁殖
所在学院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2023 年 12 月

分类号：  
学号：20202013007

密级：公开  
单位代码：10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 甘油诱导绵羊非繁殖季节发情相关代谢物筛选 及功能验证

学位申请人	谢梦婷
指导教师	赵宗胜 教授
申请学位类别	农学硕士
专业名称	畜牧学
研究领域	动物遗传育种与繁殖
所在学院	动物科技学院

中国·新疆·石河子

2023年12月



**Screening and functional validation of metabolites related to glycerol-  
induced estrus in sheep during the non-breeding season**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Agriculture**

By

**Meng-ting Xie**

**(Animal Genetics, Breeding and reproductions)**

Dissertation Supervisor: Prof. Zong-sheng Zhao

December, 2023

Shihezi, Xinjiang, China



## 课题来源

国家自然科学基金

**课题名称：**补饲能量饲料诱导舍饲哈萨克羊非繁殖季节发情关键代谢物筛选及其调控发情机制研究

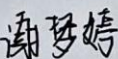
**课题编号：**32160770



# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

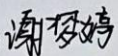
## 学位论文独创性声明

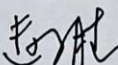
本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 时间：2023年11月8日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 时间：2023年11月8日

导师签名： 时间：2023年11月8日



## 摘要

**目的:** 季节性发情是绵羊适应生存的重要进化结果, 乏情季节绵羊卵巢的相对静止状态在实际生产中限制了羊的繁殖效率。绵羊季节性发情受很多因素的影响, 目前, 对绵羊季节性发情分子调控机制的研究主要集中在光周期上, 而其他调控机制鲜见报道, 特别是营养因素。本实验室成员前期研究发现, 在营养水平得到一定保证后, 绵羊会表现出非繁殖季节发情, 且使用能量饲料甘油诱导绵羊发情的效果较好。基于此, 本试验从补饲甘油对绵羊非繁殖季节发情的影响出发, 解析甘油及其代谢物, 对绵羊非繁殖季节发情的分子调控机制。

**方法:** (1) 于 4-6 月份乏情季节, 选择体重为  $40 \pm 0.5$  kg、年龄为 3-5 岁的经产哈萨克羊 40 只, 随机分为空白、1%、7%、12%甘油组, 每日 10:00 灌服甘油。从有绵羊发情开始, 连续颈静脉采血 18 d, ELISA (酶联免疫法) 检测  $P_4$  (孕酮),  $E_2$  (雌二醇), LH (促卵泡素) 和 FSH (促黄体素) 浓度, 结合公羊试情, 筛选出最适浓度。(2) 于 4-6 月份, 另选择 20 只母羊, 分为 GLY (7%甘油) 组和 CON (空白), 每日 10:00 灌服甘油。在甘油饲喂的第 90 d, 随机选择 GLY 和 CON 组绵羊各 6 只屠宰, 取卵巢测定卵泡数量和体积。于饲喂后 0、15、30、60、90、120 min 和 0、30、60、90 d 每组 10 只绵羊, 采集血清, ELISA 检测绵羊葡萄糖、胰岛素、NEFA、尿素、瘦素、甘油三酯浓度。(3) 于饲喂后第 90 d, 随机选取 GLY 和 CON 绵羊各 6 只, 采集血清, 采用液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 筛选并鉴定差异代谢物。(4) 采用 ELISA 试验, 检测 PC (磷脂酰胆碱) 对 GCs (卵巢颗粒细胞) 分泌  $E_2$ 、 $P_4$  的影响。利用 qRT-PCR、Western Blot 等方法, 探究 PC 对发情相关基因 mRNA 和蛋白水平的影响。

**结果:** (1) 日粮中补饲甘油, 能显著诱导绵羊非繁殖季节发情, 以 7%为宜。发情周期内, 发情母羊  $P_4$  在发情周期内呈现波动式变化,  $E_2$ 、LH 和 FSH 呈现脉冲式变化。(2) 补饲甘油促进 2.5-3 mm 卵泡的发育, 减少了 3-3.5 mm 卵泡的闭锁数。补饲甘油极显著增加了 GLY 组  $\geq 4.0$  mm 卵泡数量 ( $P < 0.01$ )。补饲甘油导致绵羊血清葡萄糖、胰岛素、瘦素、甘油三酯和尿素的浓度升高, NEFA 的浓度下降。(3) 筛选出最显著的差异代谢物为 PC, PC 与绵羊乏情期发情有关。筛选出与发情相关通路, 有嘌呤代谢; 类固醇合成; 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢和胆汁分泌通路。(4) PC 浓度为 25 ng/mL 时, 细胞活力最好, 还能促进 GCs 分泌  $E_2$ 、 $P_4$ 。PC 可能是通过上调发情相关类固醇合成基因, *CYP11A* (细胞色素 P450 家族 11 亚家族 A 成员 1)、*SCARB1* (清道夫受体 B 类成员 1) 的 mRNA 和蛋白相对表达量, 来刺激卵巢卵泡发育的。

**结论:** 日粮补饲 7%的甘油, 有助于哈萨克母羊非繁殖季节发情。其调控机制可能是: 甘油的代谢产物甘油三酯, 通过类固醇合成通路, 转化为 PC, PC 上调了类固醇生成基因 *CYP11A*、*SCARB1*, 刺激卵巢分泌  $E_2$ 、 $P_4$ , 进而促进卵泡发育, 诱导绵羊非繁殖季节发情。

**关键词：**甘油；哈萨克羊；非繁殖季节发情；生殖激素；代谢物

## Abstract

**Objective:** Seasonal estrus is an important evolutionary result of sheep adaptation to survival, and the relative quiescence of sheep ovaries in the lackluster season limits the reproductive efficiency of sheep in actual production. At present, the research on the molecular regulation mechanism of sheep seasonal estrus mainly focuses on photoperiod, while other regulatory mechanisms are rarely reported, especially nutritional factors. Previous research by members of this laboratory found that sheep will show estrus in non-breeding season after the nutritional level is guaranteed to a certain extent, and the use of energy feed glycerin to induce sheep estrus is better. Based on this, this experiment analyzes the molecular regulation mechanism of glycerol and its metabolite on estrus in sheep in non-breeding season from the effect of supplemental glycerol on estrus in sheep non-breeding season.

**Methods:** (1) In the dull season from April to June, 40 Kazakh sheep weighing  $40\pm 0.5$  kg and aged 3-5 years old were selected and randomly divided into blank, 1%, 7% and 12% glycerol groups, and glycerol was irrigated at 10:00 every day. Starting from the estrus of sheep, continuous jugular venous blood collection for 18 days, ELISA detected the concentration of P<sub>4</sub> (progesterone), E<sub>2</sub> (estradiol), LH (follicle-stimulating hormone) and FSH (luteinizing hormone), combined with the ram test, the most suitable concentration was screened. (2) From April to June, another 20 ewes were selected and divided into GLY (7% glycerol) group and CON (blank), and glycerol was filled at 10:00 daily. On the 90th day of glycerol feeding, 6 sheep in the GLY and CON groups were randomly selected and slaughtered, and the ovaries were taken to determine the follicle number and volume. After feeding, serum was collected from 10 sheep in each group at 0, 15, 30, 60, 90, 120 min and 0, 30, 60 and 90 days, and ELISA was used to detect the concentrations of glucose, insulin, NEFA, urea, leptin and triglycerides. (3) On the 90th day after feeding, 6 GLY and CON sheep were randomly selected, serum was collected, and differential metabolites were screened and identified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). (4) ELISA test was used to detect the effect of PC (phosphatidylcholine) on the secretion of E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> by GCs (ovarian granule cells). qRT-PCR, Western Blot and other methods were used to explore the effect of PC on the levels of mRNA and protein in estrus-related genes.

**Results:** (1) Supplemental feeding of glycerin in the diet can obviously induce sheep to estrus in the non-breeding season, which is suitable for 7%. During the estrus cycle, ewe in heat P<sub>4</sub> showed fluctuation changes during the estrus cycle, and E<sub>2</sub>, LH and FSH showed pulsive changes. (2) Supplemental glycerol promotion of 2.5-3 mm follicles and reduced the number of atresia of 3-3.5 mm follicles. Supplemental glycerol was very significant and increased the number of  $\geq 4.0$  mm follicles in the GLY group. Supplemental glycerol led to increased serum triglyceride, leptin, glucose and insulin concentrations in sheep and decreased serum

NEFA and urea concentrations. (3) The most significant differential metabolite was screened out as PC, which was associated with estrus in sheep. Screening of pathways related to estrus, purine metabolism; Steroid synthesis; Glycine, serine, and threonine metabolism and bile secretion pathways. (4) When the PC concentration is 25 ng/mL, cell viability is the best, and it can also promote the secretion of E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> by GCs. PC may stimulate ovarian follicle development by upregulating the relative expression of estrus-related steroid synthesis genes, mRNA and protein of *CYP11A* (cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1) and *SCARB1* (scavenger receptor class B member 1).

Conclusion: The diet is supplemented with 7% glycerol, which helps Kazakh ewes to come into heat during the non-breeding season. Its regulatory mechanism may be: triglycerides, a metabolite of glycerol, are converted into PC through the steroid synthesis pathway, and PC upregulates the steroid-producing genes *CYP11A* and *SCARB1*, stimulates the ovaries to secrete E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub>, thereby promoting follicle development and inducing estrus in sheep during the non-breeding season.

**Key words:** Glycerol; Sheep; estrus during the non-breeding season; Reproductive hormones; Metabolites

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract .....	III
目 录.....	V
主要缩略词.....	IX
第 1 章 绪 论.....	1
1.1 发情.....	1
1.1.1 发情的定义.....	1
1.1.2 季节性发情.....	1
1.1.3 发情周期.....	2
1.2 营养及能量饲料对动物非繁殖季节发情的影响.....	5
1.2.1 营养对动物非繁殖季节发情的影响.....	5
1.2.2 能量饲料对动物非繁殖季节发情的影响.....	6
1.3 甘油.....	6
1.3.1 甘油的营养价值.....	6
1.3.2 甘油作为动物能量饲料的应用.....	7
1.3.3 甘油对血液代谢物的影响.....	8
1.4 磷脂酰胆碱.....	9
1.4.1 磷脂酰胆碱的研究进展.....	9
1.5 卵巢发情相关基因研究进展.....	10
1.5.1 <i>Cyp11a1</i> 基因.....	11
1.5.2 <i>STAR</i> 基因.....	11
1.5.3 <i>SCARB1</i> 基因.....	12
1.6 研究方法和技术路线.....	12
1.6.1 研究内容.....	12
1.6.2 技术路线.....	13
第 2 章 饲料中添加不同剂量甘油对绵羊非繁殖季节发情的影响.....	14
2.1 引言.....	14
2.2 材料和方法.....	14
2.2.1 试验材料.....	14
2.2.1.3 试验仪器及试剂.....	16

2.2.2 试验方法.....	16
2.2.3 数据统计与分析.....	17
2.3 结果.....	17
2.3.1 发情母羊和乏情母羊发情周期外周血的 LH, FSH, P <sub>4</sub> 和 E <sub>2</sub> 水平..	17
2.3.2 甘油对母羊发情率的影响.....	19
2.4 讨论.....	19
2.4.1 不同浓度甘油对母羊非繁殖季节发情率的影响.....	19
2.4.2 不同浓度甘油对母羊 LH、FSH、E <sub>2</sub> 、P <sub>4</sub> 的影响.....	20
2.5 小结.....	22
第 3 章 绵羊发情相关血液生化指标变化及卵泡发育规律研究.....	23
3.1 引言.....	23
3.2 材料与方法.....	23
3.2.1 试验材料.....	23
3.2.2 试验方法.....	24
3.2.3 数据统计与分析.....	25
3.3 结果.....	25
3.3.1 不同甘油饲喂量对血清生化指标的影响.....	25
3.3.2 不同甘油饲喂量对卵泡发育的影响.....	27
3.4 讨论.....	29
3.4.1 血清中代谢物的动态变化.....	29
3.4.2 甘油对卵泡发育的影响.....	30
3.5 小结.....	30
第 4 章 绵羊非繁殖季节发情血清代谢组学研究.....	31
4.1 引言.....	31
4.2 材料与方法.....	31
4.2.1 试验材料.....	31
4.2.2 试验方法.....	32
4.3 结果.....	32
4.3.1 甘油对母羊血清代谢组学的影响.....	32
4.4 讨论.....	40
4.4.1 甘油对母羊血清差异代谢物影响.....	40
4.5 小结.....	41
第 5 章 磷脂酰胆碱对绵羊卵巢颗粒细胞的调控作用.....	42

5.1 引言 .....	42
5.2 材料与方法 .....	42
5.2.1 试验材料 .....	42
5.2.2 试验方法 .....	45
5.2.3 数据统计与分析 .....	47
5.3 结果 .....	47
5.3.1 绵羊卵巢颗粒细胞培养 .....	47
5.3.2 PC 的最适添加浓度 .....	48
5.3.3 不同浓度 PC 对绵羊卵巢颗粒细胞 E <sub>2</sub> 和 P <sub>4</sub> 分泌的影响 .....	48
5.3.4 PC 对绵羊发情相关基因及蛋白表达的影响 .....	49
5.4 讨论 .....	49
5.4.1 PC 对绵羊 GCs 类固醇激素 E <sub>2</sub> 、P <sub>4</sub> 的影响 .....	49
5.4.2 不同饲喂量对绵羊 GCs 类固醇激素合成酶基因和蛋白表达的影响 .....	50
5.5 小结 .....	51、
第 6 章 结论和创新点 .....	52
6.1 结论 .....	52
6.2 创新点 .....	52
参考文献 .....	53
致谢 .....	67
作者简介 .....	68
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表 .....	69
附录 .....	1
附录 A 代谢物提取及分析 .....	1
A.1 代谢物提取 .....	1
A.2 代谢物定性定量分析 .....	2
附录 B CCK-8 试剂盒的检测方法 .....	5
附录 C 提取总 RNA .....	5
附录 D WB 试验 .....	6
D.1 目的蛋白的 SDS-PAGE 和 WB 试验 .....	6