

# 高原鼠兔褪黑素受体在下丘脑-垂体-性腺轴中的表达分析

张晓茜<sup>①②</sup> 贾功雪<sup>②③\*</sup> 王玉军<sup>②③</sup> 宋玉坤<sup>①</sup> 阿布力孜·吾斯曼<sup>①\*</sup>

① 新疆农业大学动物科学学院 乌鲁木齐 830052; ② 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 青海省动物生态基因组学重点实验室 西宁 810008; ③ 中国科学院大学 北京 100049

**摘要:** 褪黑素在季节性繁殖动物的生殖细胞发育与性腺功能调控中发挥重要作用, 然而褪黑素如何通过下丘脑-垂体-性腺 (HPG) 轴实现其调控功能目前仍不清楚。因此, 本研究选取典型的长日照动物——高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) 作为研究对象, 使用酶联免疫吸附法测定繁殖期与非繁殖期雌雄鼠兔的血清褪黑素水平昼夜变化, 利用实时荧光定量 PCR 分析褪黑素受体基因 *Mtnr1a* 与 *Mtnr1b* 在下丘脑、垂体与性腺中的表达水平, 并通过免疫荧光染色进一步确认两种受体在性腺不同类型细胞中的定位。结果显示, 非繁殖期雄性鼠兔的血清褪黑素含量始终高于繁殖期, 且呈现不同的昼夜变化模式; 雌性鼠兔的血清褪黑素含量远低于雄性鼠兔, 且在繁殖期与非繁殖期并不存在显著差异。*Mtnr1a* 与 *Mtnr1b* 在下丘脑、垂体与性腺中均有表达, 雄性鼠兔在下丘脑与垂体中表现出繁殖期与非繁殖期基因表达的显著差异, 而雌性鼠兔基因表达的差异主要出现在垂体与性腺中。两种受体蛋白在雄性性腺生殖细胞和支持细胞中均有分布, 但 MTNR1A 更局限于精原细胞内, MTNR1B 则在管腔内生殖细胞中表达。雌性性腺中 MTNR1A 在卵母细胞胞质内有表达, 但更集中表达于颗粒细胞; MTNR1B 在颗粒细胞以及卵母细胞核质内均有表达, 且在生长卵泡的卵泡膜细胞中呈现高表达。以上结果表明, 褪黑素调控雌雄高原鼠兔季节性繁殖的模式并不相同, 其作用不仅限于通过下丘脑-垂体-性腺轴的间接调控, 也可能通过性腺内靶向受体直接影响生殖细胞与体细胞命运。

**关键词:** 高原鼠兔; 下丘脑-垂体-性腺轴; 季节性繁殖; MTNR1A; MTNR1B

**中图分类号:** Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 03-350-09

## Expression of Melatonin Receptors in Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis of Plateau Pika *Ochotona curzoniae*

ZHANG Xiao-Qian<sup>①②</sup> JIA Gong-Xue<sup>②③\*</sup> WANG Yu-Jun<sup>②③</sup>  
SONG Yu-Kun<sup>①</sup> Wusiman Abulizi<sup>①\*</sup>

① College of Animal Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052; ② Key Laboratory of Adaptation and

**基金项目** 中国科学院战略性先导科技专项 (No. XDA2005010406), 青海省重大科技专项 (三江源国家公园研究院专项资金), 中国科学院青年创新促进会项目 (No. 2021432), 青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”项目;

\* 通讯作者, E-mail: abulizi68@126.com; jiagongxue@nwipb.cas.cn;

**第一作者介绍** 张晓茜, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物繁殖学; E-mail: qianvet@126.com。

收稿日期: 2021-12-22, 修回日期: 2022-03-28 DOI: 10.13859/j.cjz.202203003

*Evolution of Plateau Biota, Qinghai Provincial Key Laboratory of Animal Ecological Genomics, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; ③ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*

**Abstract: [Objectives]** Melatonin is an important neuroendocrine amine hormone that plays a critical role in regulating gonadal function and germ cell development in seasonal breeding animals. However, the regulatory pathway of melatonin affecting seasonal reproduction through hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis is still unclear. **[Methods]** In the present study, Plateau Pika (*Ochotona curzoniae*), a representative long-day animal, was used. Adult Pikas from reproductive and non-reproductive stages were captured in May and November, respectively, and assigned to four groups: reproductive male, reproductive female, non-reproductive male and non-reproductive female. Blood samples were collected from Plateau Pikas by posterior orbital venous plexus approach every 2 h within 24 h, and serum melatonin concentrations were detected by enzyme linked immunosorbent assay. Quantitative real-time PCR was used to determine relative expression levels of *Mtnr1a* and *Mtnr1b* with reference to *Gapdh* in hypothalamus, pituitary and gonad of Plateau Pika. The expression and location of MTNR1A and MTNR1B in pika's gonad were confirmed by immunofluorescence staining with a germ cell specific marker DDX4 and a DNA specific dye Hoechst 33342. The concentration of melatonin and relative expression levels of *Mtnr1a* and *Mtnr1b* were compared among groups by one-way ANOVA. **[Results]** Results showed that serum melatonin concentration of non-reproductive male Pikas was always higher than that of reproductive males ( $P < 0.05$ ), and the two groups showed distinct diurnal dynamics. Serum melatonin concentration of female pikas was lower than that of males all the time ( $P < 0.05$ ), although there was no significant difference in female pikas between reproductive and non-reproductive stages (Fig. 1). The mRNA expressions of *Mtnr1a* and *Mtnr1b* were detected with similar changing pattern. There were significant seasonal differences in *Mtnr1a* and *Mtnr1b* expressions in male hypothalami and pituitaries ( $P < 0.05$ ), and seasonal differences were also found in *Mtnr1a* and *Mtnr1b* expressions in female pituitaries and ovaries ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3). Immunostaining indicated that the two receptors were widely distributed in germ cells and Sertoli cells of testis. Nevertheless, MTNR1A was more extensively expressed in spermatogonia, while more expression of MTNR1B was observed in advanced germ cells at reproductive stage. In the ovary, MTNR1A was found in oocyte cytoplasm and granulosa cells preferentially. MTNR1B expression was observed in both oocyte nucleus and cytoplasm as well as in granulosa cells. Strikingly, distinct high expression of MTNR1B was found in theca cells of growing follicles (Fig. 4). **[Conclusion]** In conclusion, melatonin showed gender difference effects on seasonal reproduction in Plateau Pikas, implying that its control pattern is not limited to indirect regulation through HPG axis, but it also acts directly on melatonin receptors in gonad to control the fate of germ cells and somatic cells.

**Key words:** Plateau Pika (*Ochotona curzoniae*); Hypothalamic-pituitary-gonadal axis; Seasonal reproduction; MTNR1A; MTNR1B

生活在温带和寒带地区的哺乳动物长期适应于光照、降水、温度、食物等环境因子的年度变化, 进化出一套与外界同步的内源性节律特征, 其中最具代表性的就是季节性繁殖(姚

蔚等 2017)。季节性繁殖动物将性腺发育与交配行为限制在一年内的特定时间段发生, 以保证幼仔在春、夏季节出生和成长, 提高种群存活率(Lincoln et al. 1980)。小毛足鼠(*Phodopus*

*roborovskii*) (Zhang et al. 2015)、高原鼠兔 (*Ochotona curzoniae*) (Wang et al. 2019)、牦牛 (*Bos grunniens*) (Xu et al. 2020) 及灰短角鹿 (*Mazama gouazoubira*) (Tanaka et al. 2021) 等小型和大型哺乳动物会根据妊娠期长短表现出不同的季节性繁殖特征。

高原鼠兔属兔形目 (Lagomorpha) 鼠兔科 (Ochotonidae), 是青藏高原特有的小型草食类哺乳动物, 主要分布在海拔 3 200 ~ 5 400 m 的高寒草甸区域。在繁殖性能上, 高原鼠兔表现出典型的长日照繁殖特征, 繁殖期集中于 4 ~ 6 月 (潘璇等 2016)。目前研究表明, 高原鼠兔受光周期-褪黑素信号控制, 调节体内促性腺激素释放激素 (gonadotrophin releasing hormone, GnRH) 与促黄体素 (luteinizing hormone, LH) 水平, 影响其繁殖功能 (王玉军等 2020)。由于光周期具有恒定性和规律性, 因此是许多动物繁殖活动的直接触发因子 (Bünning 1969)。在接收到外界的光信号后, 光控神经会作用于松果体以调控褪黑素的周期性分泌 (杨颖等 2017)。褪黑素对于动物繁殖功能的调节主要分为两种方式: 一方面, 可通过脑部褪黑素受体作用于下丘脑-垂体-性腺 (hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG) 轴, 调控性腺内激素水平与生殖细胞发育 (Henningsen et al. 2016); 另一方面, 也可以直接靶向作用于性腺内的褪黑素受体, 影响生殖细胞和性腺体细胞的发育及功能。无论是何种方式, 都需要经由褪黑素的两种 G 蛋白偶联膜受体——褪黑素受体 1A (melatonin receptor 1A, MTNR1A) 和褪黑素受体 1B (melatonin receptor 1B, MTNR1B) 来实现, 二者在哺乳动物脑、肾、性腺和胚胎等多种组织中广泛表达 (梁锦萍等 2021)。MTNR1A 参与机体的代谢、血管收缩及生殖调控等功能, 而 MTNR1B 则主要与昼夜节律、免疫反应和多巴胺释放等有关 (Dubocovich et al. 2005)。

本研究通过比较繁殖期与非繁殖期雌雄高原鼠兔的褪黑素分泌及其受体 MTNR1A 和

MTNR1B 在下丘脑、垂体与性腺中的表达与分布, 为探讨下丘脑-垂体-性腺轴途径与性腺发育调控通路间的关联提供科学依据, 为进一步研究哺乳动物生殖细胞发育与繁殖活动的分子调控机制提供新的线索和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

高原鼠兔捕捉于青海海北高寒草地生态系统国家野外科学观测研究站附近 (北纬 37°29' ~ 37°45', 东经 101°12' ~ 101°23')。繁殖期与非繁殖期鼠兔分别于 5 月和 11 月捕获, 确认当天日照充足, 无异常天气。参考文献 (Qu et al. 2013), 依据动物体重估计年龄。选择年龄接近的成年鼠兔, 于捕获当天完成下丘脑、垂体、性腺和血清的采集。雌性鼠兔于解剖取样后确认无妊娠个体。动物实验由中国科学院西北高原生物研究所动物伦理委员会许可。

### 1.2 血清褪黑素水平检测

血液使用眼球采血法收集, 每隔 2 h 一次, 持续 24 h。静置后的血液 4 000 r/min 离心 30 min, 将血清转移至冻存管内于 -80 °C 保存。使用兔褪黑素酶联免疫吸附检测 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (江莱生物, JL47683), 测定血清褪黑素含量。空白孔加入 100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液, 标准品孔和待测样品孔分别加入 50  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液稀释的标准品或血清与 50  $\mu$ l 辣根过氧化物酶偶联剂。37 °C 孵育 30 min, 使用磷酸盐缓冲液洗涤后, 加入显色液 37 °C 避光孵育 15 min, 再加入终止液结束反应。以空白孔调零, 在 450 nm 微孔板检测仪上测定各孔吸光度值。使用标准品浓度和对应吸光度值绘制标准回归曲线, 按曲线方程 ( $R^2 > 0.99$ ) 计算褪黑素含量。

### 1.3 总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

脱颈法处死动物后, 采集下丘脑、垂体与性腺, 液氮速冻后于 -80 °C 保存。冻存组织经液氮研磨, 使用 TRIzol 法抽提总 RNA, 用微

量分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。使用 Honor™ II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (诺禾致源, NHR004S) 将 RNA 反转录为 cDNA, 使用  $2 \times$  RealStar Green Fast Mixture (康润生物, A304) 进行 qRT-PCR。反应条件为,  $95^{\circ}\text{C}$  2 min;  $95^{\circ}\text{C}$  15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环;  $95^{\circ}\text{C}$  15s,  $60^{\circ}\text{C}$  15s,  $95^{\circ}\text{C}$  15 s。以 *Gapdh* 为内参, 使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 相对表达量, 引物信息见表 1。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因名 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物长度 (bp) Production size
<i>Mtnr1a</i>	F: CTCTGCTATGTTCCTGAT	231
	R: TACTCTCCTTCTGACCTGAA	
<i>Mtnr1b</i>	F: ATTAACCGCTACTGCTACAT	229
	R: GGAGGAGGAAGTGGATGA	
<i>Gapdh</i>	F: TGACATCAAGAAGGTGGTGAAGC	117
	R: AAGGTGGAAGAGTGGGAGTTGCTG	

#### 1.4 免疫荧光染色

性腺使用 4%多聚甲醛固定, 经乙醇梯度脱水与二甲苯透明后, 放入石蜡包埋。切取  $4\ \mu\text{m}$  厚的组织切片, 经二甲苯脱蜡与乙醇梯度复水后, 使用柠檬酸缓冲液加热处理 20 min。经磷酸盐缓冲液清洗后, 使用 3%过氧化氢室温处理 10 min。再次清洗后, 加入 10%驴血清室温封闭 1 h。分别加入 1:200 稀释的 MTNR1A 兔源多克隆抗体 (睿瀛生物, RLT2726) 或 MTNR1B 兔源多克隆抗体 (睿瀛生物, RLT2727) 与生殖细胞特异性标记蛋白 DDX4 鼠源单克隆抗体 (Abcam, ab27591),  $4^{\circ}\text{C}$  孵育 14 h。磷酸盐缓冲液清洗后, 加入 1:1 000 稀释的 CoraLite488 标记驴抗兔 IgG (Proteintech, SA00013-6) 与 CoraLite594 标记驴抗鼠 IgG (Proteintech, SA00013-7), 室温孵育 1 h。再次清洗后, 加入细胞核 DNA 特异性染料 Hoechst33342 复染, 使用甘油封片并在荧光显微镜下观察拍照。

#### 1.5 数据分析

采用 SPSS20.0 统计软件中的单因素方差分析和多重比较对数据进行分析, 结果数据以平均值  $\pm$  标准误的形式表示,  $P < 0.05$  时为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 高原鼠兔血清褪黑素的节律性变化

血清 ELISA 结果显示, 雄性高原鼠兔的褪黑素分泌水平整体高于雌性。雄性鼠兔血清褪黑素含量在繁殖期为  $(85.48 \pm 2.94) \sim (168.20 \pm 64.15)$  ng/L, 在非繁殖期为  $(278.60 \pm 3.28) \sim (342.34 \pm 9.52)$  ng/L, 两个时期差异显著 ( $P < 0.05$ ), 且呈现相反的变化模式。雌性鼠兔血清褪黑素含量在繁殖期为  $(55.80 \pm 4.88) \sim (71.55 \pm 9.09)$  ng/L, 在非繁殖期为  $(55.98 \pm 4.54) \sim (72.03 \pm 3.41)$  ng/L, 并不存在明显差异 (图 1)。

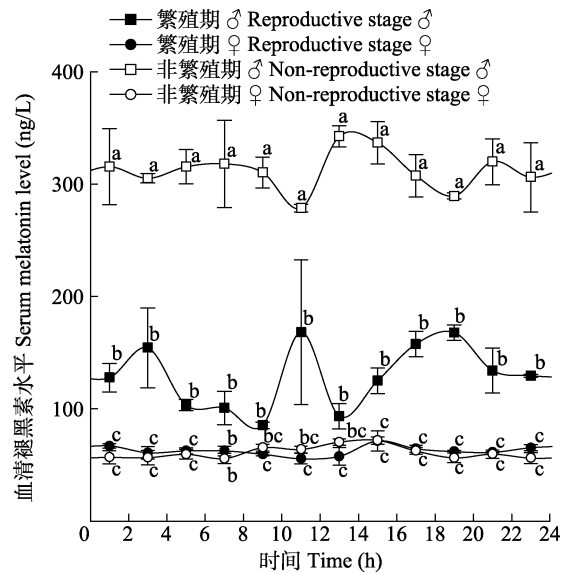


图 1 繁殖期和非繁殖期高原鼠兔 24 h 的血清褪黑素含量变化

Fig. 1 Dynamics of serum melatonin in Plateau Pikas within 24 hours at reproductive and non-reproductive stages

四个组每个取样时间点  $n = 3$ 。同一时间点标注不同字母, 表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

$n = 3$  for all four groups at each timepoint. Different letters at the same timepoint indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

## 2.2 高原鼠兔褪黑素受体基因表达差异分析

为检测 RNA 和引物的有效性,使用高原鼠兔性腺 RNA 进行反转录与 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,所得目的条带长度均与设计引物相符(图 2)。

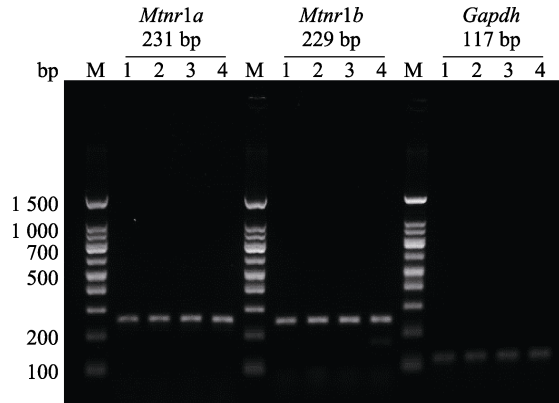


图 2 高原鼠兔性腺 *Mtnr1a*、*Mtnr1b* 和 *Gapdh* 扩增片段

Fig. 2 Amplified fragments of *Mtnr1a*, *Mtnr1b* and *Gapdh* in gonads of Plateau Pikas

M. 100 ~ 1 500 bp DNA 分子量标准; 1~4 分别为繁殖期雄性、非繁殖期雄性、繁殖期雌性、非繁殖期雌性高原鼠兔性腺的基因扩增产物。

M. 100 - 1 500 bp DNA marker; 1 - 4: gene amplification products of gonads from reproductive male, non-reproductive male, reproductive female and non-reproductive female plateau pikas respectively.

qRT-PCR 结果见图 3。*Mtnr1a* 与 *Mtnr1b* 在下丘脑、垂体与性腺中均有表达,且两种褪黑素受体基因在同一组织内的表达变化趋势一致。下丘脑中,非繁殖期雄性鼠兔 *Mtnr1a* 与 *Mtnr1b* 相对表达量( $25.84 \pm 5.24$  与  $2.89 \pm 0.27$ ) 相比于繁殖期 ( $1.00 \pm 0.73$  与  $1.00 \pm 0.55$ ) 均显著升高 ( $P < 0.05$ ),而雌性鼠兔 *Mtnr1a* 与 *Mtnr1b* 的相对表达量在非繁殖期 ( $1.80 \pm 1.11$  与  $0.99 \pm 0.07$ ) 与繁殖期 ( $5.71 \pm 4.12$  与  $1.49 \pm 0.32$ ) 无显著差异;垂体中,非繁殖期雄、雌鼠兔 *Mtnr1a* 与 *Mtnr1b* 相对表达量(雄性  $17.49 \pm 10.89$  与  $19.35 \pm 10.87$ , 雌性  $72.22 \pm 19.61$  与  $932.94 \pm 195.05$ ) 均远高于繁殖期(雄性  $1.00 \pm$

$0.29$  与  $1.00 \pm 0.07$ , 雌性  $5.19 \pm 0.39$  与  $3.16 \pm 0.37$ , 均  $P < 0.05$ );在非繁殖期雄性鼠兔性腺中, *Mtnr1a* 的相对表达量 ( $2.13 \pm 0.28$ ) 略高于繁殖期 ( $1.00 \pm 0.13$ ,  $P < 0.05$ ),而 *Mtnr1b* 相对表达量 ( $2.23 \pm 1.12$ ) 与繁殖期 ( $1.00 \pm 0.09$ ) 无显著差异;在非繁殖期雌性鼠兔性腺中, *Mtnr1a* 与 *Mtnr1b* 相对表达量 ( $1 160.34 \pm 97.66$  与  $1 490.68 \pm 164.96$ ) 均远高于繁殖期 ( $44.31 \pm 4.65$  与  $8.70 \pm 2.21$ ,  $P < 0.05$ )。

## 2.3 高原鼠兔褪黑素受体蛋白在性腺中的定位与表达

考虑到性腺中褪黑素受体基因表达的特殊性,进一步通过免疫荧光染色检测了雄性与雌性性腺中两种受体蛋白的分布情况。雄性中,MTNR1A 和 MTNR1B 在生殖细胞和支持细胞内均有表达,二者在非繁殖期的分布模式并无差异,但在繁殖期 MTNR1A 更多地集中于基底层的精原细胞内,而 MTNR1B 则倾向于在管腔内的生殖细胞中表达。雌性中,MTNR1A 与 MTNR1B 的表达表现出更为明显的差异。繁殖期 MTNR1A 在卵母细胞中的表达集中于胞质内,但在卵泡颗粒细胞中的表达量更高;MTNR1B 则在卵母细胞的核、质内均有分布,除了在颗粒细胞中存在外,在卵泡膜细胞中也呈现出独特的高表达。非繁殖期 MTNR1A 与 MTNR1B 的表达在静止期卵泡内都有发现,但 MTNR1B 的表达更为明显(图 4)。

## 3 讨论

褪黑素作为一种主要由哺乳动物松果体产生的胺类激素,参与了昼夜节律调控、免疫功能调节、抗氧化反应等诸多生理事件,其在动物繁殖功能中的关键作用更是受到了广泛关注(Cipolla-Neto et al. 2022, Jiang et al. 2021, Li et al. 2021, Markus et al. 2021)。先前研究证实,褪黑素通过介导光周期信号能够调控雄性高原鼠兔的精原细胞分化,进而影响其繁殖功能(王玉军等 2020)。本研究进一步发现,雌雄高原鼠兔体内褪黑素分泌对于光周期变化的

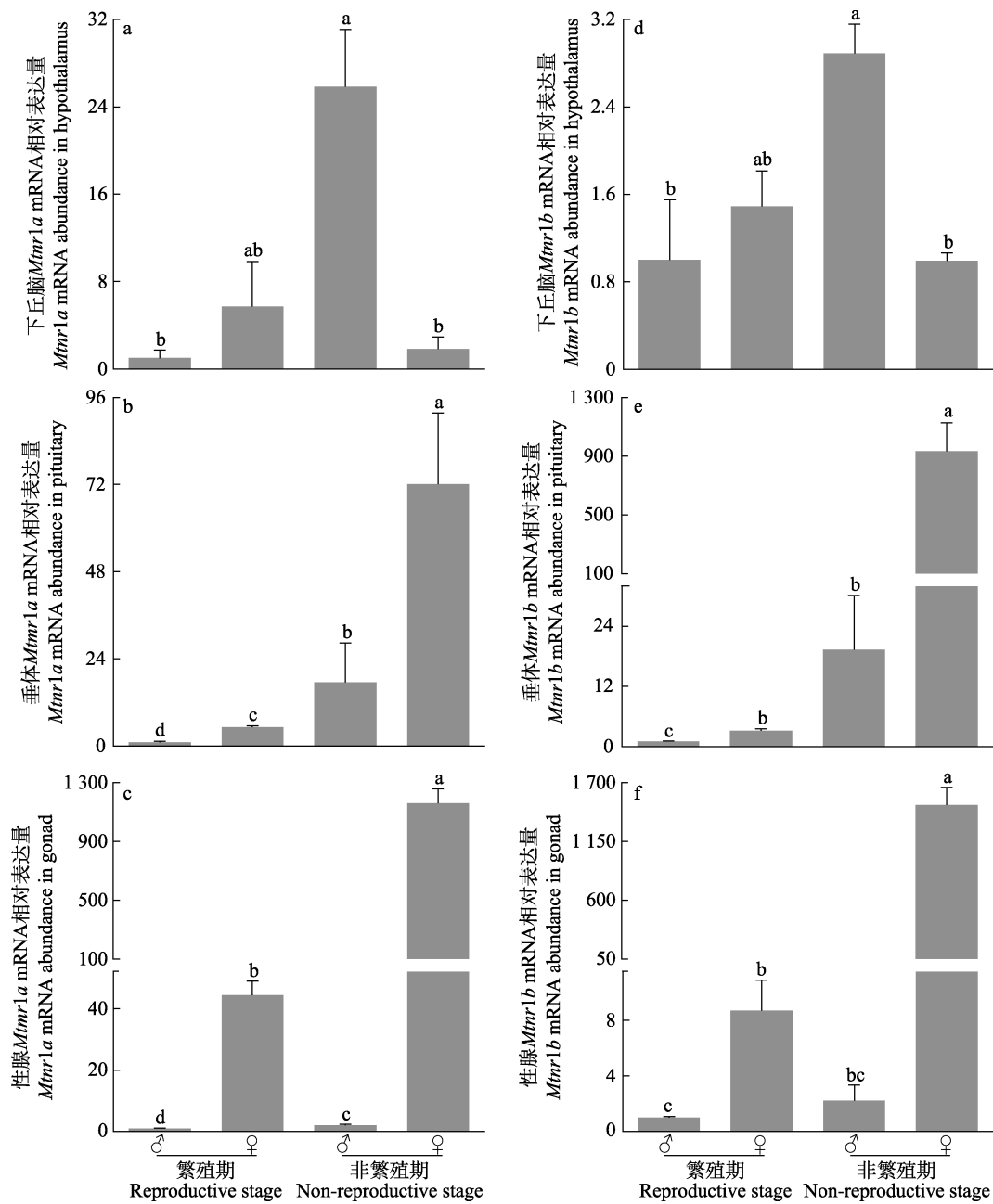


图3 繁殖期和非繁殖期高原鼠兔下丘脑、垂体与性腺中 *Mtnr1a* 与 *Mtnr1b* 的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *Mtnr1a* and *Mtnr1b* in hypothalamus, pituitary and gonad of Plateau Pikas at reproductive and non-reproductive stages

a ~ c. *Mtnr1a* 的 mRNA 相对表达量: a. 下丘脑 ( $n = 3$ ); b. 垂体 ( $n = 4$ ); c. 性腺 (雄性  $n = 3$ 、雌性  $n = 4$ )。d ~ f. *Mtnr1b* 的 mRNA 相对表达量: d. 下丘脑 ( $n = 3$ ); e. 垂体 ( $n = 4$ ); f. 性腺 (雄性  $n = 3$ 、雌性  $n = 4$ )。内参基因为 *Gapdh*。同一图中标注不同字母, 表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

a - c. *Mtnr1a* mRNA abundance: a. hypothalamus ( $n = 3$ ); b. pituitary ( $n = 4$ ); c. gonad ( $n = 3$  for males and  $n = 4$  for females). d - f. *Mtnr1b* mRNA abundance: d. hypothalamus ( $n = 3$ ); e. pituitary ( $n = 4$ ); f. gonad ( $n = 3$  for males and  $n = 4$  for females). Reference gene is *Gapdh*. Different letters in the same column chart indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

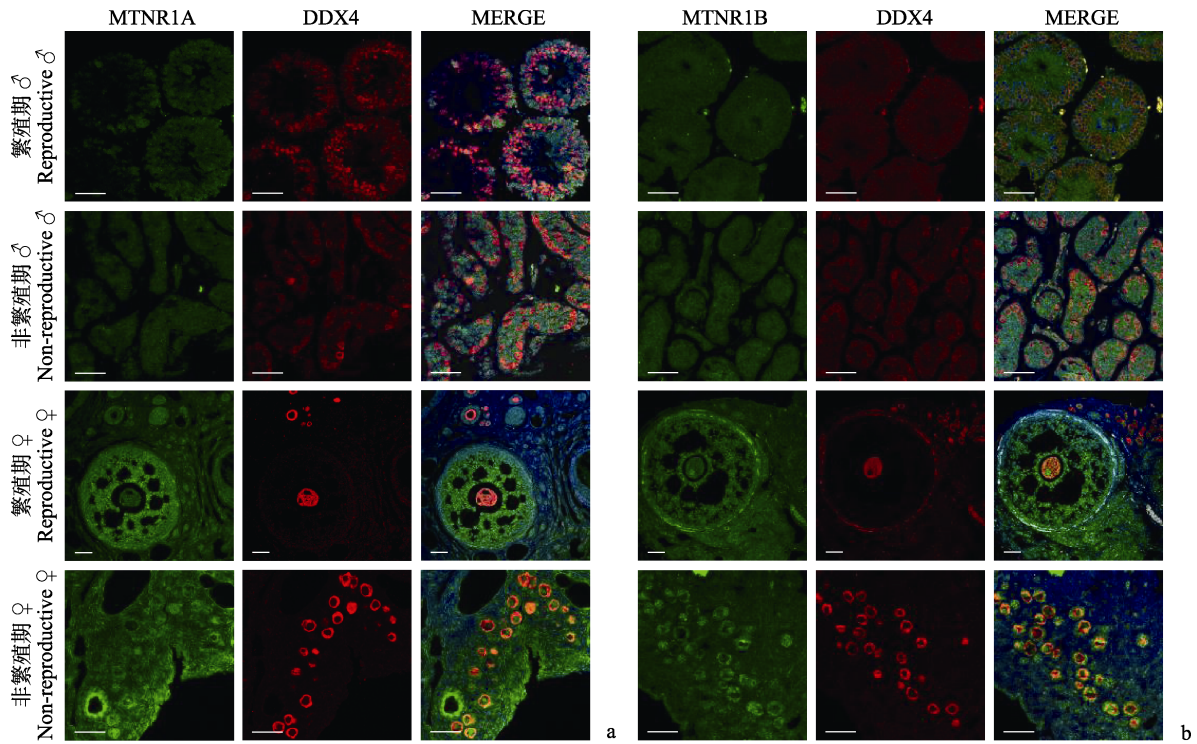


图 4 繁殖期和非繁殖期高原鼠兔性腺中 MTNR1A (a) 与 MTNR1B (b) 的免疫荧光染色

Fig.4 Fluorescence staining of MTNR1A (a) and MTNR1B (b) in gonads of Plateau Pikas at reproductive and non-reproductive stages

MTNR1A 和 MTNR1B 均使用特异性抗体标记为绿色; DDX4. 特异表达蛋白抗体 DDX4 将生殖细胞标记为红色; MERGE. 绿色为 MTNR1A (a) 或 MTNR1B (b), 红色标记为生殖细胞, 蓝色为使用 Hoechst33342 标记为蓝色的 DNA; 标尺. 50  $\mu$ m.

MTNR1A and MTNR1B are labelled as green by specific antibodies; DDX4. Germ cell is labelled as red by antibody of specific expression protein DDX4; MERGE. MTNR1A (a) or MTNR1B (b) is labelled as green, germ cell is labelled as red, DNA is labelled as blue by Hoechst 33342; Bar. 50  $\mu$ m.

响应并不一致, 雄性的血清褪黑素含量始终高于雌性, 且在繁殖期与非繁殖期间存在显著差异。类似现象在黑线仓鼠 (*Cricetulus barabensis*) 中也被发现, 被认为与 RF 酰胺相关肽 3 (rfamide-related peptide 3, RFRP3) 在下丘脑-垂体-性腺轴中的功能有关 (Xue et al. 2021)。这一现象可能涉及雌雄鼠兔体内褪黑素受体的分布差异, 褪黑素在雄性鼠兔中更多地作用于下丘脑内受体, 通过影响下丘脑-垂体-性腺轴, 调控睾酮分泌与生殖细胞发育; 而在雌性鼠兔中则倾向于直接作用于靶器官内受体, 发挥相应的调控功能。

作为褪黑素最重要的两个受体, MTNR1A 和 MTNR1B 已被多项研究证实参与了褪黑素对动物繁殖功能的调控。二者在中枢神经系统及多个外周靶组织中均有表达, 且与褪黑素在各个组织中不同功能实现有关 (Dubocovich et al. 2005)。在下丘脑-垂体-性腺轴中, 褪黑素主要通过褪黑素受体来实现对生殖激素分泌的负调控。本研究证实 *Mtnr1a* 和 *Mtnr1b* 在下丘脑、垂体与性腺中均有表达, 且下丘脑中受体基因表达与血清褪黑素分泌的变化一致。雄性鼠兔在非繁殖期的褪黑素分泌水平高于繁殖期, 而雌性鼠兔在繁殖期与非繁殖期并不存在明显差

异, 进一步证实了松果体褪黑素对光周期响应的性别差异。下丘脑内的 MTNR1A 与 MTNR1B 直接由松果体褪黑素激活, 抑制促性腺激素释放激素 (Roy et al. 2001), 从而干扰下游垂体内卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 和促黄体素的释放。垂体内 MTNR1A 的表达在受到 GnRH 负调控的同时, 也会抑制卵泡刺激素和促黄体素的释放, 以扩大褪黑素的负调控效应 (Johnston et al. 2003)。本研究发现, 高原鼠兔垂体内的 MTNR1B 呈现与 MTNR1A 一致的变化趋势, 意味着 MTNR1B 可能也参与了垂体内的激素调控。

与下丘脑和垂体不同, 褪黑素在性腺内的调控机制更为复杂。除了通过下丘脑-垂体-性腺轴间接调控, 褪黑素也能直接作用于性腺内褪黑素受体 (杨颖等 2017)。与下丘脑不同, 雌性鼠兔性腺内 *Mtnr1a* 和 *Mtnr1b* 表达高于雄性, 且非繁殖期比繁殖期又有显著升高, 这与发情周期不同时期藏羊 (*Ovis aries*) 卵巢的研究结论一致 (杨大鹏等 2019)。褪黑素能够通过下丘脑-垂体-性腺轴, 激活或抑制季节性繁殖动物的生殖系统及生殖细胞发育 (Lerchl et al. 1992, Wang et al. 2019)。同时, 褪黑素也可以直接在性腺中发挥作用。褪黑素作用于睾丸可以维持精原干细胞和精母细胞功能, 保证精子发生的进行, 用来处理精子也可以改善精子活率并减少 DNA 损伤 (Monllor et al. 2017, Zhang et al. 2018); 通过卵巢褪黑素受体的调控, 褪黑素可以上调卵丘扩展相关基因表达, 促进卵母细胞成熟, 还可以经酪氨酸磷酸酶 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) /蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) /叉头型转录因子 O3 (forkhead box O3, FOXO3) 信号通路防止卵巢内原始卵泡的丢失 (Berlinguer et al. 2009, Barberino et al. 2021)。因此, 高原鼠兔雌雄性腺内褪黑素受体不同的分布与表达模式揭示了褪黑素对卵巢功能的直接调控作用。

## 参 考 文 献

- Barberino R S, Lins T L B G, Monte A P O, et al. 2021. Melatonin attenuates cyclophosphamide-induced primordial follicle loss by interaction with MT1 receptor and modulation of PTEN/Akt/FOXO3a proteins in the mouse ovary. *Reproductive Science*, [J/OL]. [2021-10-12]. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00768-z>.
- Berlinguer F, Leoni G G, Succu S, et al. 2009. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. *Journal of Pineal Research*, 46(4): 383–391.
- Bünning E. 1969. Common features of photoperiodism in plants and animals. *Photochemistry and Photobiology*, 9(3): 219–228.
- Cipolla-Neto J, Amaral F G, Soares J M Jr, et al. 2022. The crosstalk between melatonin and sex steroid hormones. *Neuroendocrinology*, 112(2): 115–129.
- Dubocovich M L, Markowska M. 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27(2): 101–110.
- Henningsen J B, Gauer F, Simonneaux V. 2016. RFRP neurons - the doorway to understanding seasonal reproduction in mammals. *Frontiers in Endocrinology*, 7: 36.
- Jiang Y H, Shi H C, Liu Y, et al. 2021. Applications of melatonin in female reproduction in the context of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021: 6668365.
- Johnston J D, Messenger S, Ebling F J P, et al. 2003. Gonadotrophin-releasing hormone drives melatonin receptor down-regulation in the developing pituitary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5): 2831–2835.
- Lerchl A, Nieschlag E. 1992. Interruption of nocturnal pineal melatonin synthesis in spontaneous recrudescing Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of Pineal Research*, 13(1): 36–41.
- Li H, Li K Q, Zhang K X, et al. 2021. The circadian physiology: implications in livestock health. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4): 2111.
- Lincoln G A, Short R V. 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research*, 36: 1–52.
- Markus R P, Sousa K S, Cruz-Machado S S, et al. 2021. Possible role of pineal and extra-pineal melatonin in surveillance, immunity,



- and first-line defense. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22): 12143.
- Monllor F, Espino J, Marchena A M, et al. 2017. Melatonin diminishes oxidative damage in sperm cells, improving assisted reproductive techniques. *Turkish Journal of Biology*, 41(6): 881–889.
- Qu J P, Li W J, Yang M, et al. 2013. Life history of the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) in alpine meadows of the Tibetan Plateau. *Mammal Biology*, 78(1): 68–72.
- Roy D, Angelini N L, Fujieda H, et al. 2001. Cyclical regulation of GnRH gene expression in GT1-7 GnRH-secreting neurons by melatonin. *Endocrinology*, 142(11): 4711–4720.
- Tanaka Y, Herédias-Ribas C M, Baldini M H M, et al. 2021. Evaluation of potential reproductive seasonality in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) bucks. *Theriogenology*, 171: 104–112.
- Wang Y J, Jia G X, Yan R G, et al. 2019. Testosterone-retinoic acid signaling directs spermatogonial differentiation and seasonal spermatogenesis in the Plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Theriogenology*, 123: 74–82.
- Xu S R, Peng W, Yang Q L, et al. 2020. Transcriptome analysis revealed key signaling networks regulating ovarian activities in the domestic yak. *Theriogenology*, 147: 50–56.
- Xue H L, Xu J H, Chen L, et al. 2021. RFRP-3 synchronized with photoperiods regulates the seasonal reproduction of striped hamsters. *Zygote*, [J/OL]. [2021-10-12]. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000496>.
- Zhang T, Zhou Y, Li L, et al. 2018. Melatonin protects prepuberal testis from deleterious effects of bisphenol A or diethylhexyl phthalate by preserving H3K9 methylation. *Journal of Pineal Research*, 65(2): e12497.
- Zhang X Y, Zhao Z J, Vasilieva N, et al. 2015. Effects of short photoperiod on energy intake, thermogenesis, and reproduction in desert hamsters (*Phodopus roborovskii*). *Integrative Zoology*, 10(2): 207–215.
- 梁锦萍, 字向东. 2021. 褪黑素对动物繁殖的调控作用机制研究进展. *中国畜牧杂志*, 57(5): 53–58.
- 潘璇, 米玛旺堆. 2016. 高原鼠兔生态学研究进展. *生态学杂志*, 35(9): 2537–2543.
- 王玉军, 贾功雪, 王婷, 等. 2020. 光周期-褪黑素信号调控高原鼠兔精原细胞分化和季节性精子发生. *兽类学报*, 40(1): 54–63.
- 杨大鹏, 何玉琴, 葛闻博, 等. 2019. 甘加藏羊发情周期下丘脑-垂体-卵巢轴中 MTR1a 基因的表达分析. *农业生物技术学报*, 27(3): 457–463.
- 杨颖, 陈黎, 卢立志. 2017. 松果体调控动物季节性繁殖概述. *农业生物技术学报*, 25(7): 1086–1101.
- 姚蔚, 王德华, 张学英. 2017. 哺乳动物季节性繁殖的内源年生物钟及光敏神经环路研究进展. *动物学杂志*, 52(4): 717–725.