



# 性成熟期辽宁绒山羊与子午岭黑山羊睾丸发育比较

梁维炜,李明娜\*,罗玉柱\*,王继卿,柯娜,沈继源,郝志云,金夏阳,鲁玉洁,黄兆春

(甘肃农业大学动物科学技术学院 甘肃省草食动物生物技术重点实验室,兰州 730070)

**摘要:** 本研究旨在探究性成熟期辽宁绒山羊与子午岭黑山羊睾丸发育是否存在差异,并对两品种繁殖性能进行比较。选取性成熟期健康的辽宁绒山羊和子午岭黑山羊各5只,采集睾丸组织,通过大体解剖和苏木精-伊红(HE)染色石蜡切片,比较两品种山羊睾丸组织发育及形态学差异;ELISA检测雄激素浓度;实时荧光定量PCR(real time quantitative PCR, RT-qPCR)、蛋白免疫印迹(Western blot)检测两品种山羊睾丸组织中死盒多肽4(DEAD box polypeptide 4, DDX4)和类无精症缺失基因(deleted in azoospermia-like gene, DAZL)的表达情况。结果显示,辽宁绒山羊睾丸总重和睾丸长周径极显著高于子午岭黑山羊( $P < 0.01$ ),而睾丸短周径、睾丸脏体比和睾丸胴体比均差异不显著( $P > 0.05$ );辽宁绒山羊生精上皮厚度显著高于子午岭黑山羊( $P < 0.05$ ),而两者精细管面积、直径和单位面积内精细管数量均无显著差异( $P > 0.05$ );两品种山羊睾丸中雄激素分泌无显著差异( $P > 0.05$ );辽宁绒山羊 DDX4 mRNA 及蛋白表达量均显著高于子午岭黑山羊( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),DAZL mRNA 表达量极显著高于子午岭黑山羊( $P < 0.01$ ),而蛋白表达量差异不显著( $P > 0.05$ )。以上结果表明,性成熟期辽宁绒山羊性腺发育程度与子午岭黑山羊一致,但生精上皮较子午岭黑山羊厚,生殖标记基因表达量存在差异,推测可能会影响两品种的生精能力。

**关键词:** 辽宁绒山羊;子午岭黑山羊;睾丸;DDX4;DAZL

中图分类号:S827.3

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2021)12-3461-10

## Comparison of the Testes Development between Liaoning Cashmere Goat and Ziwuling Black Goat at Sexual Maturity

LIANG Weiwei, LI Mingna\*, LUO Yuzhu\*, WANG Jiqing, KE Na,

SHEN Jiuyan, HAO Zhiyun, JIN Xiayang, LU Yujie, HUANG Zhaochun

(Gansu Key Laboratory of Herbivorous Animal Biotechnology, College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The study aimed to investigate the differences in testicular development between Liaoning cashmere goat and Ziwuling black goat at sexual maturity and to compare the reproductive performance between the two breeds. In this study, testicular tissues were collected from five healthy Liaoning cashmere goats and five healthy Ziwuling black goats at sexual maturity stage. The testicular tissue development and morphological differences between the two goat breeds were compared using anatomy and Hematoxylin-eosin (HE) stained, respectively. The concentration of androgen were detected using ELISA assay. The expression of DEAD box polypeptide 4

收稿日期:2021-04-28

基金项目:国家自然科学基金(31960664);甘肃省基础研究创新群体项目(18JR3RA190);甘肃农业大学“伏羲青年英才”培育计划项目(Gaufx-02Y02);甘肃农业大学人才专项(2017RCZX-17)

作者简介:梁维炜(1995-),女,安徽寿县人,硕士生,主要从事动物遗传育种与繁殖研究,E-mail:1015594365@qq.com

\*通信作者:李明娜,主要从事动物繁殖原理与技术应用研究,E-mail:limingnay@163.com;罗玉柱,主要从事草食动物遗传育种与繁殖研究,E-mail:luoyz@gsau.edu.cn

(*DDX4*) and Deleted in azoospermia-like gene (*DAZL*) in testis of the two breeds were detected using Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot technique. The study revealed that the total weight and length circumference of testicular in Liaoning cashmere goats were significantly higher than those in Ziwuling black goats ( $P < 0.01$ ), while the difference testicular breadth circumference, total testicular weight/pre-slaughter live weight and total testicular weight/carcass weight between the two goat breeds were not significant ( $P > 0.05$ ). The spermatogenic epithelial thickness of Liaoning cashmere goats was significantly higher than that of Ziwuling black goats ( $P < 0.05$ ), there were no significant differences in the area and diameter of the seminal tubules, number of seminal tubules per unit area between the two goat breeds ( $P > 0.05$ ). The difference of androgen secretion in testis between the two goat breeds was not significant ( $P > 0.05$ ). The expression levels of *DDX4* mRNA and *DDX4* protein in the testis of Liaoning cashmere goats were significantly higher than those of Ziwuling black goats ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The expression levels of *DAZL* mRNA in the testis of Liaoning cashmere goats was significantly higher than that of Ziwuling black goats ( $P < 0.01$ ), while the expression of *DAZL* protein between two goat breeds was not significant ( $P > 0.05$ ). In short, the degree of gonad development in Liaoning cashmere goats was identical with Ziwuling black goats, while the spermatogenic epithelium was thicker than Ziwuling black goats, there were relevant difference in the expression levels of reproductive marker genes between the two goat breeds, which might affect the spermatogenic ability between the two breeds.

**Key words:** Liaoning cashmere goat; Ziwuling black goat; testes; *DDX4*; *DAZL*

\* **Corresponding authors:** LI Mingna, E-mail: limingnay@163.com; LUO Yuzhu, E-mail: luoyz@gsau.edu.cn

辽宁绒山羊主要分布于辽宁省东部山区,是绒肉兼用型山羊品种,具有体型大、产绒量高、绒毛品质好、遗传性能稳定等优点,常被引入我国多地用于改良体型小、产绒低的地方山羊品种<sup>[1-3]</sup>。子午岭黑山羊主要分布于陕西和甘肃东部地区,体格中等偏小,被毛以黑色为主,以盛产黑猾皮和紫绒而著称,耐粗饲,适应性好,抗病力和抓膘能力强。自1965年以来,甘肃庆阳引进辽宁绒山羊对子午岭黑山羊产绒性能进行改良<sup>[4]</sup>。有研究表明,辽宁绒山羊杂交改良子午岭黑山羊,能够显著提高子午岭黑山羊的产绒量和绒纤维品质,各代杂交羊的体重、体高、体长和胸围较同龄子午岭黑山羊均显著提高<sup>[5]</sup>。近期有报道研究了两品种山羊的产肉性能和肉质,发现子午岭黑山羊的产肉性能低于辽宁绒山羊,而其肉质和营养成分高于辽宁绒山羊<sup>[6]</sup>。然而有关两品种繁殖性能的系统对比相对较少。

睾丸是雄性动物所特有的器官,在家畜的正常繁育过程中发挥着重要的作用,其能够产生精子,分泌雄激素。睾丸内含有大量的精细管,内壁衬有生精上皮,内嵌有支持细胞和各级生精细胞,各级生精

细胞从精细管上皮的基底膜向管腔迁移的过程中持续分裂和变化,最终形成精子。精细管之间为睾丸间质,其中有间质细胞,雄激素由间质细胞合成和分泌,对于雄性动物维持第二性征、产生精子及促进精子成熟具有重要作用。雄激素能够直接或间接促进生殖细胞的生长和发育<sup>[7]</sup>;浓度较高时可提高精子的数量和质量<sup>[8]</sup>,浓度较低时将会导致睾丸生殖细胞凋亡率增加<sup>[9]</sup>。因此,生精细胞数量、质量及雄激素浓度影响雄性动物精液品质,进而影响其繁殖潜力<sup>[10-11]</sup>。

死盒多肽4(Dead box polypeptide 4, *DDX4*)基因为DEAD-box基因家族成员,1986年在果蝇中被发现<sup>[12]</sup>。*DDX4*在精子发生过程中的减数分裂全过程中持续高表达,直至形成精子细胞,表达产物是精子发生的必需蛋白<sup>[13-14]</sup>。在小鼠中敲除*DDX4*后,雌鼠的生殖细胞发育正常,而雄鼠不育,其原因是雄性生殖细胞未能完成减数分裂而凋亡,不能产生精子<sup>[15]</sup>。与牦牛相比,在减数分裂阻滞、雄性不育犏牛睾丸组织中*DDX4*基因表达量较低<sup>[14]</sup>,这与小鼠等哺乳动物雄性不育个体睾丸中

*DDX4* 基因表达模式一致。

类无精症缺失基因(deleted in azoospermia-like gene, *DAZL*)为 *DAZ*(deleted in azoospermia)基因家族成员,编码 RNA 结合蛋白,在生殖细胞中高度表达,并参与调节其发育和分化,同时调控精子发生中减数分裂过程<sup>[16-17]</sup>。*DAZL* 基因在犏牛睾丸组织中表达水平低于黄牛和牦牛,参与犏牛精子发生过程中减数分裂调控<sup>[18]</sup>。*DAZL* 表达量在湖羊性成熟时达到高峰,*DAZL* 在睾丸发育中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。李讨讨等<sup>[20]</sup>发现,绵羊不同发育阶段各级生精细胞数量不同,与 *DAZL* 基因表达量高低有关。

基于以上研究背景,本研究采集性成熟、健康的纯种辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸,通过大体解剖、石蜡包埋结合 HE 染色等方法分析两品种间睾丸发育程度;同时采用 ELISA 测定雄激素含量,RT-qPCR、Western blot 方法测定生殖标记基因(*DDX4* 和 *DAZL*)在两品种山羊睾丸组织中表达水平,旨在比较两品种山羊繁殖性能是否存在差异,为将来在生产实践中辽宁绒山羊改良子午岭黑山羊繁殖性能提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物和样品采集

本试验选取相同饲养管理条件下,生长发育正常,健康的 9 月龄纯种辽宁绒山羊和子午岭黑山羊公羔(各 5 只,共 10 只)为试验动物,饲养过程中所有羊均未进行配种。相同饲养管理条件下,9 月龄辽宁绒山羊的宰前活重和胴体重分别为 31.09 和 14.10 kg,分别极显著高于同龄子午岭黑山羊的 18.21 和 7.45 kg( $P < 0.01$ )<sup>[6]</sup>,解剖分离出两侧睾丸,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗除血后称量两侧睾丸总重,右侧睾丸用于测量睾丸长、短周径,左侧睾丸用于试验指标检测的取样:沿睾丸长轴纵向剖

开,取横切面中间部位相同大小的睾丸组织分别储存于液氮和 4%多聚甲醛溶液中,用于后续试验。

### 1.2 试验方法

1.2.1 睾丸表观参数测定 参考《羊生产学》<sup>[21]</sup>,测量山羊的两侧睾丸总重。测量睾丸长周径、睾丸短周径<sup>[22]</sup>,计算睾丸脏体比和睾丸胴体比。睾丸脏体比=睾丸总重/宰前活重,睾丸胴体比=睾丸总重/胴体重。

1.2.2 雄激素浓度测定 准确称取新鲜睾丸组织,0.9%生理盐水按 1:9(*w/v*)稀释后匀浆,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,制成 10%的匀浆待测。用山羊雄激素 ELISA 试剂盒(ZC-51511,茁彩)测定睾丸组织中雄激素浓度,具体操作步骤参照试剂盒使用说明书。

1.2.3 石蜡切片的制作及 HE 染色 将固定于 4%多聚甲醛溶液溶液中的睾丸组织,经洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、贴片、烤片、脱蜡、水化、苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色、脱水和封片制成切片。采用荧光扫描显微镜(P250 Flash,丹吉尔)观察切片。

1.2.4 总 RNA 提取及 cDNA 合成 将睾丸组织分别加入液氮充分研磨后,Trizol RNA 提取试剂盒(ET101,全式金)提取睾丸组织总 RNA。采用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂盒(KR118,天根)对提取的总 RNA 进行反转录,具体操作步骤参照试剂盒使用说明书。获得的 cDNA 产物于 -80 °C 保存备用。

1.2.5 引物设计与合成 从 GenBank 数据库中检索山羊 *DDX4* 基因(XM\_005694694.3)、*DAZL* 基因(JX273761.1)和内参基因  $\beta$ -actin(NM\_001314342.1)mRNA 序列,利用 Primer Premier 3.0 软件设计引物,并进行 BLAST 检测后,将引物序列信息(表 1)发送至杨凌天润奥科生物科技有限公司进行引物合成。

表 1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequence

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product length
<i>DDX4</i>	F:CTCTGGCTTCATCGTCAGAAA R:AGGATCTCTGTTTCCCAAACCTC	101
<i>DAZL</i>	F:CGTTGGTGGAATTGATGTTAGG R:CACCAGTTCGATCCGTGATTA	104
$\beta$ -actin	F:GGAATCGTCCGTGACATCAA R:AGCTCGTAGCTCTTCTCCA	107

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术 采用实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher, USA)对睾丸组织中 *DDX4* 和 *DAZL* mRNA 表达水平进行检测,以  $\beta$ -actin 为内参。在八联管的每个孔中先加入 10  $\mu$ L 2 $\times$ SYBR<sup>®</sup> Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit(AG11720,艾科瑞),各 0.4  $\mu$ L 上、下游引物和 7.2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,最后加入 2  $\mu$ L cDNA,每个样做 3 次重复。将八联管置于实时荧光定量 PCR 仪中,先 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;再 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,60  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,进行 40 个循环;最后 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 退火 60 s,95  $^{\circ}$ C 变性 15 s。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算方法对 RT-qPCR 结果进行计算。

1.2.7 免疫印迹(Western blot)分析 采用全蛋白提取试剂盒(BC3711,索莱宝)提取睾丸组织总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0012,碧云天)检测睾丸组织总蛋白浓度,定量后按比例加入 4 $\times$ 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)上样缓冲液,煮沸 10 min 使蛋白变性,于 -20  $^{\circ}$ C 保存。每孔上样 8  $\mu$ L 变性蛋白,以 GAPDH(D110016,生工)为内参,12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacryl-

amide gel electrophoresis, SDS-PAGE)进行电泳,转膜,封闭后,分别加入兔源 DDX4 一抗(1:300)(D161611,生工)、兔源 DAZL 一抗(1:300)(bs-12245R,博奥森)和兔源 GAPDH 一抗(1:1500)(D110016,生工)4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗膜,用山羊抗兔二抗(1:5000)(D111018,生工),37  $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h, PBS 洗膜。用底物化学发光液(electrochemi-luminescence, ECL)显影曝光,并观察实验结果。

### 1.3 统计分析

使用 Image J 图像分析软件测定 Western blot 结果。采用 SPSS 20.0 软件对数据进行独立样本 T 检验和显著性分析,结果用“均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)”表示。

## 2 结果

### 2.1 两品种山羊睾丸表观参数比较

由表 2 可知,辽宁绒山羊的睾丸总重和睾丸长周径极显著高于子午岭黑山羊( $P < 0.01$ );辽宁绒山羊的睾丸短周径、睾丸脏体比和睾丸胴体比,与子午岭黑山羊差异不显著( $P > 0.05$ )。

表 2 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸表观参数测定结果

Table 2 Testicular apparent parameters of Liaoning cashmere goat and Ziwouling black goat

指标 Index	辽宁绒山羊 Liaoning cashmere goat	子午岭黑山羊 Ziwouling black goat	P 值 P value
睾丸总重/g Total testicular weight	188.98 $\pm$ 7.94	129.98 $\pm$ 8.52	0.000
睾丸长周径/cm Testicular length circumference	18.22 $\pm$ 0.61	15.87 $\pm$ 0.85	0.004
睾丸短周径/cm Testicular breadth circumference	14.13 $\pm$ 0.69	13.13 $\pm$ 0.26	0.057
睾丸脏体比/(g $\cdot$ kg <sup>-1</sup> ) Total testicular weight/pre-slaughter live weight	5.90 $\pm$ 0.43	7.67 $\pm$ 1.67	0.123
睾丸胴体比/(g $\cdot$ kg <sup>-1</sup> ) Total testicular weight/carcass weight	13.05 $\pm$ 1.36	10.37 $\pm$ 5.44	0.100

### 2.2 睾丸组织形态学观察

石蜡包埋结合 HE 染色观察两品种睾丸组织(图 1),发现精细管横切面均为中空的同轴圆状结构,辽宁绒山羊生精上皮内细胞层数较子午岭黑山羊多且排列紧密。进一步测定生精上皮厚度、精细

管的面积、直径和单位面积内精细管数量等指标(表 3),结果表明,辽宁绒山羊睾丸生精上皮厚度显著高于子午岭黑山羊( $P < 0.05$ ),而两品种间精细管的面积、直径及睾丸单位面积内精细管数量没有显著差异( $P > 0.05$ )。

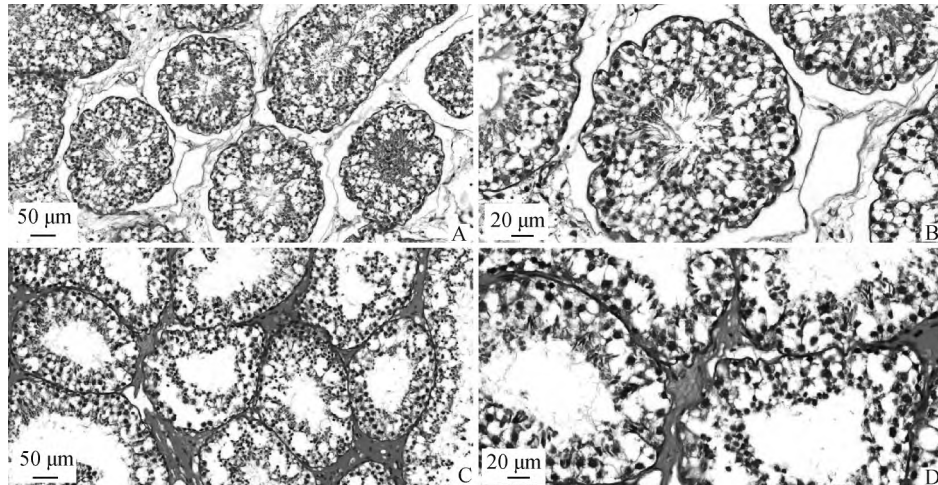


图 1 辽宁绒山羊(A、B)和子午岭黑山羊(C、D)睾丸 HE 染色石蜡切片

Fig. 1 HE staining of Liaoning cashmere goat (A, B) and Ziwouling black goat (C, D) testes

表 3 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸组织形态学比较切片结果

Table 3 Comparison of testicular histomorphology between Liaoning cashmere goat and Ziwouling black goat

指标 Index	辽宁绒山羊 Liaoning cashmere goat	子午岭黑山羊 Ziwouling black goat	P 值 P value
生精上皮厚度/ $\mu\text{m}$ Spermatogenic epithelial thickness	67.24 $\pm$ 4.62	58.34 $\pm$ 2.48	0.011
精细管面积/ $\mu\text{m}^2$ Area of the seminal tubules	43 179.29 $\pm$ 2 547.78	41 832.47 $\pm$ 4 587.30	0.591
精细管直径/ $\mu\text{m}$ Diameter of the seminal tubules	235.93 $\pm$ 4.98	226.17 $\pm$ 15.75	0.226
单位面积精细管数量/( $\text{N} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) Number of seminal tubules per unit area	8.82 $\pm$ 0.55	8.05 $\pm$ 1.46	0.462

### 2.3 两品种山羊睾丸雄激素浓度结果

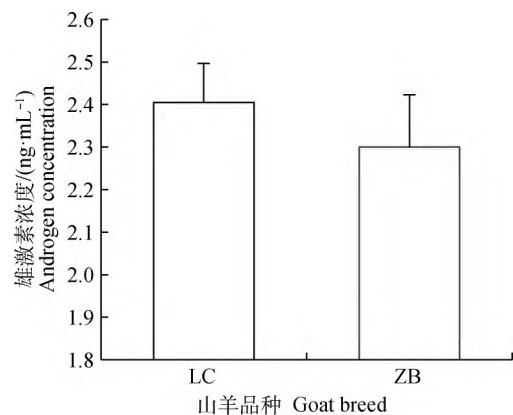
采用 ELISA 检测睾丸内雄激素浓度, 结果发现, 辽宁绒山羊睾丸内雄激素浓度高于子午岭黑山羊睾丸内雄激素浓度, 但没有显著差异 ( $P > 0.05$ , 图 2)。

### 2.4 DAZL 和 DDX4 基因表达结果分析

DAZL 和 DDX4 是重要的生殖细胞标记基因, 采用 RT-qPCR 检测辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸组织中 DDX4 和 DAZL mRNA 的相对表达量, 结果如图 3, 两基因在辽宁绒山羊中的相对表达量均极显著高于子午岭黑山羊 ( $P < 0.01$ )。

### 2.5 DDX4 和 DAZL 蛋白表达量结果分析

采用 Western blot 技术检测辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸组织中 DDX4 和 DAZL 蛋白的相对表达量, 结果如图 4A 所示, DDX4 和 DAZL 蛋白在辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸组织中均有表达, 但其表达丰度略有差异。灰度值分析结果表明, 辽

LC. 辽宁绒山羊; ZB. 子午岭黑山羊; \*\* . 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \* . 差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同

LC. Liaoning cashmere goat; ZB. Ziwouling black goat; \*\* . Extremely significant difference; \* . Significant difference. The same as below

图 2 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸中雄激素浓度

Fig. 2 Androgen concentration in testis of Liaoning cashmere goat and Ziwouling black goat

宁绒山羊睾丸组织中 DDX4 蛋白相对表达量显著高于子午岭黑山羊 ( $P < 0.05$ ), 而 DAZL 蛋白相对

表达量在两品种间无差异, 但有上调趋势 ( $P > 0.05$ ) (图 4B)。

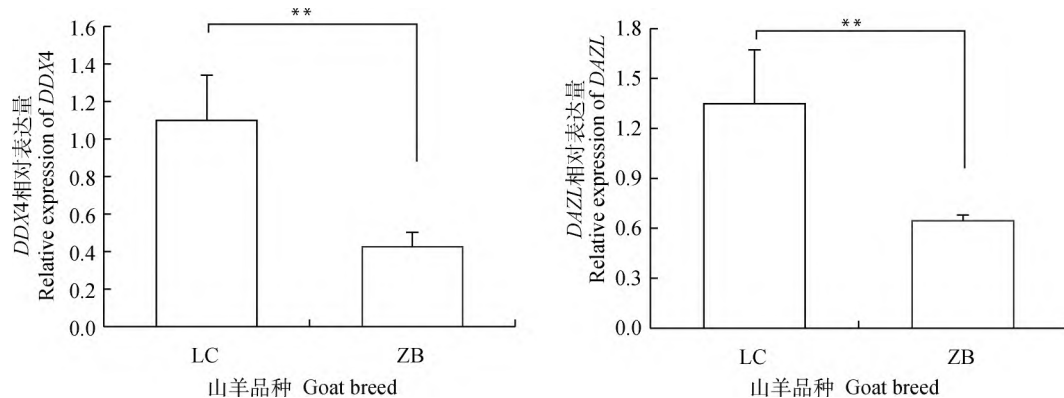
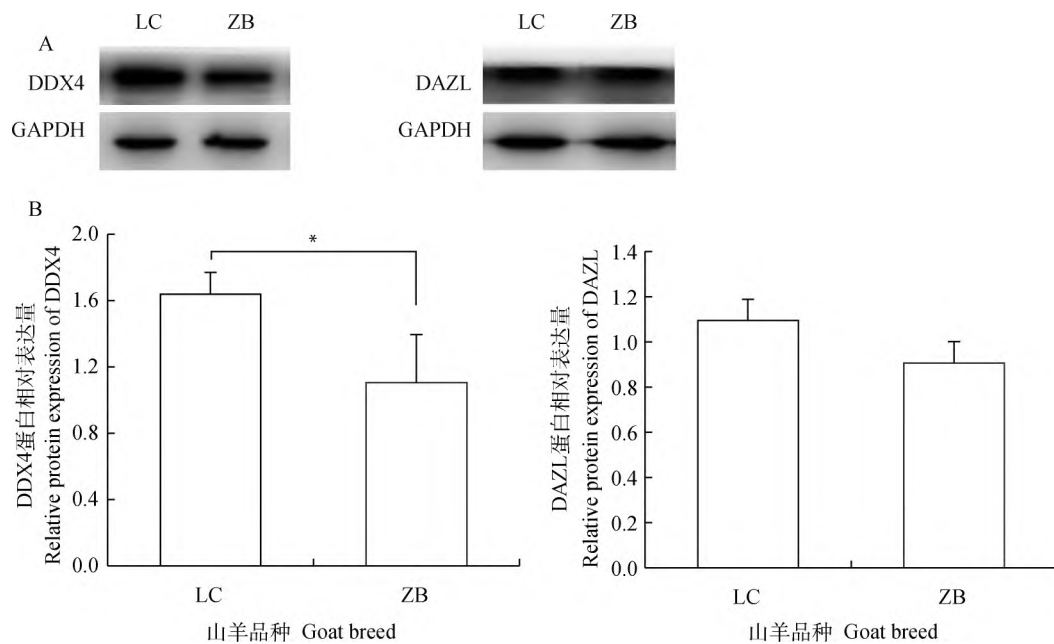


图 3 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸中 DDX4 和 DAZL mRNA 相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of DDX4 and DAZL mRNA in testis of Liaoning cashmere goat and Ziwouling black goat



A. DDX4 和 DAZL 蛋白的 Western blot 分析; B. DDX4 和 DAZL 蛋白的相对表达量

A. Western blot analysis for DDX4 and DAZL protein; B. The relative level of DDX4 and DAZL protein expression

图 4 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸组织中 DDX4 和 DAZL 蛋白的表达结果

Fig. 4 Expression of DDX4 and DAZL protein in testicular tissue of Liaoning cashmere goat and Ziwouling black goat

### 3 讨论

#### 3.1 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸发育程度分析

据《羊志》<sup>[23]</sup>记载, 辽宁绒山羊公、母羊 5~7 月龄性成熟, 15~18 月龄进行初配; 子午岭黑山羊公、母羊均 6 月龄左右性成熟, 8 月龄配种。本研究选取 9 月龄辽宁绒山羊和子午岭黑山羊作为研究对

象, 此时两品种均已达到性成熟, 生殖器官已发育成熟, 表明两品种的繁殖性能基本趋于稳定, 可用于睾丸发育程度分析。同时比较两品种睾丸发育, 可作为将来评定其繁殖潜力的基础资料。

宰前活重和胴体重等指标因动物品种不同而存在显著差异<sup>[24]</sup>。辽宁绒山羊的宰前活重和胴体重均极显著高于子午岭黑山羊 ( $P < 0.01$ )<sup>[6]</sup>, 表明辽宁绒山羊生长发育较子午岭黑山羊快, 这与其他文

献中的报道相一致,即辽宁绒山羊生长发育比当地山羊快<sup>[25-26]</sup>。不同品种猪睾丸重量和大小存在显著差异<sup>[27]</sup>,本研究发现,辽宁绒山羊双侧睾丸较子午岭黑山羊重,睾丸长周径较子午岭黑山羊长,而睾丸短周径、睾丸脏体比和睾丸胴体比无差异,表明辽宁绒山羊生长发育快,性腺也相应较大且重,但从睾丸器官指数相关指标来看,9月龄的辽宁绒山羊和子午岭黑山羊性腺发育程度基本一致。

### 3.2 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸组织形态学比较

精子发生是一个高度复杂的生物学过程,涉及一系列细胞增殖和分化,如精原细胞有丝分裂、精母细胞减数分裂、功能精子的形成等<sup>[28-29]</sup>。精细管是精子发生的主要场所,精子发生始于精细管上皮的基底膜处,逐渐向管腔移动,最终形成蝌蚪状的精子,头部嵌于支持细胞近腔端,尾部游离于管腔中。本研究中对睾丸组织形态学的检测发现,辽宁绒山羊精细管面积、直径和单位面积精细管数量与子午岭黑山羊无显著差异;然而辽宁绒山羊睾丸生精上皮厚度显著高于子午岭黑山羊。生精上皮中嵌合各级生精细胞,由此推测,两品种生殖上皮厚度的差异可能是由生精细胞数量差异引起的,这有待于进一步通过分子生物学方法验证。

睾丸间质细胞合成和分泌雄激素<sup>[30]</sup>,对雄性生殖器官的生长、精子发生和雄性第二性征的维持有着促进作用<sup>[31]</sup>。有研究表明,雄激素水平与睾丸生殖细胞凋亡密切相关<sup>[9]</sup>;同时,雄激素又参与调控间质细胞的发育和分化<sup>[32]</sup>。因此,为进一步分析两品种睾丸间质细胞的数量是否有差异,本研究采集相同部位的睾丸组织测定雄激素浓度。结果发现,辽宁绒山羊睾丸组织中雄激素浓度与子午岭黑山羊无显著差异,表明两品种山羊睾丸间质细胞数量及细胞分泌激素的能力差异不显著,且雄激素对睾丸生殖细胞凋亡的影响也不显著。

### 3.3 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊睾丸内生生殖标记基因的表达分析

精子发生过程中生殖细胞的发育受 *DAZL* 基因调控,该基因是提高雄性动物繁殖能力所必需的<sup>[33]</sup>。*DAZL* 在湖羊不同发育阶段睾丸中的表达量不同,特别是在性成熟后睾丸中的表达最高<sup>[34]</sup>。付永<sup>[18]</sup>发现,犏牛雄性不育,与 *DAZL* 在犏牛睾丸组织中低表达有关。*DDX4* 表达的开始与精原细胞的形成有关<sup>[13]</sup>,*DDX4* 基因特异表达于生殖细胞

系<sup>[35]</sup>,是调控哺乳动物生殖细胞增殖和分化必不可少的<sup>[36]</sup>,同时,哺乳动物生殖细胞的形成可能取决于其与性腺体细胞的相互作用<sup>[37]</sup>。本研究发现,*DAZL* 和 *DDX4* mRNA 在辽宁绒山羊睾丸中表达量显著高于子午岭黑山羊。*DDX4* 蛋白在辽宁绒山羊睾丸中的表达量高于子午岭黑山羊,这与 *DDX4* mRNA 的表达趋势一致。*DAZL* 蛋白在两品种间表达无差异,但呈上调趋势,这与 Yuan 等<sup>[19]</sup>研究结果一致,即大睾丸中 *DAZL* 丰度高于小睾丸,但差异不显著。因此生殖细胞标记基因在精子发生过程中发挥重要作用,生殖细胞标记基因的差异表达能够反映出辽宁绒山羊的生殖细胞数量可能较子午岭黑山羊多,进而影响生精能力,这也印证了两品种生精上皮厚度存在显著差异。然而,本研究未针对两品种山羊精液品质及精子活率等指标做详细对比,下一步本课题组将采集适配公羊的精液进行比对分析,深入剖析两品种公羊的繁殖力。

### 3.4 辽宁绒山羊和子午岭黑山羊繁殖潜力比较

辽宁绒山羊成年母羊产羔率 110%~120%,断奶羔羊成活率 95%以上<sup>[38]</sup>,产双羔率 21.28%<sup>[39]</sup>;子午岭黑山羊产羔率 103.57%<sup>[40]</sup>,产双羔率 2%~4%<sup>[41]</sup>。同时,根据《羊志》<sup>[23]</sup>中关于辽宁绒山羊和子午岭黑山羊性成熟月龄及初配年龄的记载,推测辽宁绒山羊繁殖性能较子午岭黑山羊高。生产实践中利用辽宁绒山羊改良子午岭黑山羊,不仅对子午岭黑山羊的产绒性能和生长性能有所提升,推测杂交后代的繁殖性能也会得到改良。

## 4 结 论

性成熟的辽宁绒山羊生长发育速度较子午岭黑山羊快,睾丸器官指数无显著差异。组织形态学研究发现,辽宁绒山羊精细管上皮厚度较子午岭黑山羊厚,生殖标记基因表达量存在显著差异。推测性成熟后辽宁绒山羊生精能力较子午岭黑山羊高,生产实践中引进辽宁绒山羊杂交改良子午岭黑山羊,对其繁殖性能可能会有所提升。

### 参考文献 (References):

- [1] 刘欣. 辽宁绒山羊的繁殖特点及提高繁殖成活率的有效方法[J]. 畜禽业, 2020, 31(9): 38, 40.  
LIU X. The reproductive characteristics of Liaoning cashmere goat and effective methods to increase the survival rate of reproduction [J]. *Livestock and*

- Poultry Industry*, 2020, 31(9): 38, 40. (in Chinese)
- [2] 杨术环, 邹丽娜. 加快推进辽宁绒山羊产业发展的探索[J]. 现代畜牧兽医, 2020(7): 52-54.  
YANG S H, ZOU L N. Explorations on accelerating development of Liaoning cashmere goat industry[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2020(7): 52-54. (in Chinese)
- [3] JIN M, ZHANG J Y, CHU M X, et al. Cashmere growth control in Liaoning cashmere goat by ovarian carcinoma immunoreactive antigen-like protein 2 and decorin genes[J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2018, 31(5): 650-657.
- [4] 杨德智. 陇东绒山羊改良历史、现状及发展方略探讨[J]. 畜牧兽医杂志, 2017, 36(6): 87-90.  
YANG D Z. Discussion on the history, present situation and development strategy of Longdong cashmere goat[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017, 36(6): 87-90. (in Chinese)
- [5] 马月辉, 蒋英. 辽宁绒山羊杂交改良子午岭黑山羊的效果及遗传分析[J]. 畜牧兽医学报, 1992, 23(1): 39-43.  
MA Y H, JIANG Y. The effects of improvement and genetic analyses on Ziwouling goat crossed with Liaoning cashmere goat [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1992, 23(1): 39-43. (in Chinese)
- [6] 王继卿, 沈继源, 刘秀, 等. 子午岭黑山羊与辽宁绒山羊产肉性能、肉品质、肌肉营养成分和脂肪酸含量比较[J]. 草业学报, 2021, 30(2): 166-177.  
WANG J Q, SHEN J Y, LIU X, et al. Comparative analysis of meat production traits, meat quality, and muscle nutrient and fatty acid contents between Ziwouling black goats and Liaoning cashmere goats [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(2): 166-177. (in Chinese)
- [7] 黄健红, 黄乘光, 林飞鸿. 少精子症患者性激素水平与生殖细胞凋亡的关系[J]. 广东医学, 2008, 29(5): 771-772.  
HUANG J H, HUANG C G, LIN F H. The relationship between sex hormone levels and germ cell apoptosis in patients with oligospermia [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2008, 29(5): 771-772. (in Chinese)
- [8] 吴剑锋. 男性基础性激素水平与精子质量参数的相关性探讨[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(3): 69-71, 77.  
WU J F. Correlation between male basic sex hormones and sperm quality parameters[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2020, 35(3): 69-71, 77. (in Chinese)
- [9] 杨麦贵, 杨阳, 黄萍, 等. 精液中性激素水平与生殖细胞凋亡的关系[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(5): 432-434.  
YANG M G, YANG Y, HUANG P, et al. Sexual hormone levels in semen and germ cell apoptosis[J]. *National Journal of Andrology*, 2006, 12(5): 432-434. (in Chinese)
- [10] 白曼. 小尾寒羊公羊繁殖性能研究及其睾丸发育 miRNA-mRNA 表达谱联合分析[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.  
BAI M. Investigation of ram reproductive performance of Small Tail Han sheep and integrative analysis of miRNA-mRNA expression profiles in their testis development [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [11] 薛茂云, 高玉时, 唐修君. 文昌鸡血清雄激素水平对精液品质的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(9): 184-185.  
XUE M Y, GAO Y S, TANG X J. The impact of the level of androgen on the quality of sperm in mature roosters[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 36(9): 184-185. (in Chinese)
- [12] SCHUPBACH T, WIESCHAUS E. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*[J]. *Dev Biol*, 1986, 113(2): 443-448.
- [13] ANDERSON R A, FULTON N, COWAN G, et al. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis [J]. *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 136.
- [14] 周阳, 骆骅, 李伯江, 等. 牦牛和犏牛睾丸组织 DDX4 基因 mRNA 表达水平与启动子区甲基化[J]. 中国农业科学, 2013, 46(3): 630-638.  
ZHOU Y, LUO H, LI B J, et al. mRNA expression level and promoter methylation of DDX4 gene in testes of yak and cattle-yak[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(3): 630-638. (in Chinese)
- [15] TANAKA S S, TOYOOKA T, AKASU R, et al. The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(7): 841-853.
- [16] ELLIOTT D J, BOURGEOIS C F, KLINK A, et al. A mammalian germ cell-specific RNA-binding protein



- interacts with ubiquitously expressed proteins involved in splice site selection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(11):5717-5722.
- [17] VANGOMPEL M J W, XU E Y. The roles of the DAZ family in spermatogenesis: More than just translation? [J]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(1):36-46.
- [18] 付永. *Dazl* 基因 mRNA 表达水平与牦牛雄性不育关系的研究[J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2012, 42(6):9-11.
- FU Y. The Study on the relationship between the expression level of *Dazl* gene mRNA and the infertility of cattle-yak[J]. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2012, 42(6):9-11. (in Chinese)
- [19] YUAN Z H, LUO J, WANG L, et al. Expression of DAZL gene in selected tissues and association of its polymorphisms with testicular size in Hu sheep[J]. *Animals*, 2020, 10(4):740.
- [20] 李讨讨, 马友记, 赵兴绪, 等. *Dazl* 基因在绵羊不同发育期睾丸组织中的表达与细胞定位[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(3):421-428.
- LI T T, MA Y J, ZHAO X X, et al. Expression and cellular localization of *Dazl* gene in testis of sheep (*Ovis aries*) at different developmental stages [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(3):421-428. (in Chinese)
- [21] 赵有璋. 羊生产学[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- ZHAO Y Z. Production science of sheep and goat [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2010. (in Chinese)
- [22] KHAN H, RIND M M, MEHMOOD M U, et al. Biometric assessment of the testis in pakistani adult male goats (*Capra hircus*) [J]. *Pak J Zool*, 2014, 46(3):880-884.
- [23] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志-羊志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- China National Commission of Animal Genetic Resources. Animal genetic resources in China-sheep and goats [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011. (in Chinese)
- [24] 周文静, 袁泽湖, 李熙成, 等. 3 种不同类型藏羊的屠宰性能和肉品质的比较分析[J]. *草业科学*, 2019, 36(7):1869-1878.
- ZHOU W J, YUAN Z H, LI X C, et al. Comparison of carcass and meat quality among three different types of Tibetan sheep[J]. *Pratacultural Science*, 2019, 36(7):1869-1878. (in Chinese)
- [25] 李长存, 韩存魁, 杜燕红. 辽宁绒山羊与当地山羊杂交改良效果调查[J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2008, 38(1):31-32.
- LI C C, HAN C K, DU Y H, et al. Investigation on the effect of hybrid improvement between Liaoning cashmere goats and local goats [J]. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2008, 38(1):31-32. (in Chinese)
- [26] 杨冲, 李进, 徐振国, 等. 辽宁绒山羊杂交改良本地山羊肉用性能的测定[J]. *中国畜牧杂志*, 2001, 37(4):38.
- YANG C, LI J, XU Z G, et al. Determination of meat performance of Liaoning cashmere goats crossed and improved local goats [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2001, 37(4):38. (in Chinese)
- [27] 赵云翔, 高广雄, 方程, 等. 不同品种公猪睾丸、精液品质发育规律及相关性研究[J]. *中国农业科技导报*, 2020, 22(7):61-68.
- ZHAO Y X, GAO G X, FANG C, et al. Developmental Rule and correlation of testicular and semen quality in different breeds of boars [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2020, 22(7):61-68. (in Chinese)
- [28] MACLEOD G, VARMUZA S. The application of proteomic approaches to the study of mammalian spermatogenesis and sperm function [J]. *FEBS J*, 2013, 280(22):5635-5651.
- [29] ZHOU R, WU J R Z, LIU B, et al. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(14):2681-2695.
- [30] TREMBLAY J J. Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells [J]. *Steroids*, 2015, 103:3-10.
- [31] 彭占威. 关于用保持适度低量雄性激素来延长男性寿命的研究[J]. *医药前沿*, 2013(1):115.
- PENG Z W. Research on prolonging male lifespan by keeping moderately low levels of male hormones [J]. *Journal of Frontiers of Medicine*, 2013(1):115. (in Chinese)
- [32] REBOURCET D, O' SHAUGHNESSY P J, MONTEIRO A, et al. Sertoli cells maintain Leydig cell number and peritubular myoid cell activity in the adult mouse testis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e105687.
- [33] LIU Z S, LI Q F, PAN Z X, et al. Comparative

- analysis on mRNA expression level and methylation status of *DAZL* gene between cattle-yaks and their parents [J]. *Anim Reprod Sci*, 2011, 126 (3-4): 258-264.
- [34] LI T T, WANG X, ZHANG H Y, et al. Gene expression patterns and protein cellular localization suggest a novel role for *DAZL* in developing Tibetan sheep testes [J]. *Gene*, 2020, 731: 144335.
- [35] KIM K H, KANG Y J, JO J O, et al. DDX4 (DEAD box polypeptide 4) colocalizes with cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancers [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 447(2): 315-322.
- [36] HICKFORD D E, FRANKENBERG S, PASK A J, et al. DDX4 (VASA) is conserved in germ cell development in marsupials and monotremes [J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(4): 733-743.
- [37] FUJIWARA Y, KOMIYA T, KAWABATA H, et al. Isolation of a *DEAD*-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(25): 12258-12262.
- [38] 杨术环, 郭丹. 辽宁绒山羊资源保护与品种选育 [J]. *中国畜牧业*, 2014(21): 25-26.  
YANG S H, GUO D. Resource protection and breeding of liaoning cashmere goat [J]. *China Animal Industry*, 2014(21): 25-26. (in Chinese)
- [39] 张帆. 辽宁绒山羊品种资源保护与利用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.  
ZHANG F. The research of conservation and utility of Liaoning cashmere goats resource [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013. (in Chinese)
- [40] 吕永锋, 任茂源, 郭彬彬, 等. 舍饲陇东绒山羊同期发情及繁殖性状的研究 [J]. *中国草食动物科学*, 2018, 38(6): 71-72.  
LV Y F, REN M Y, GUO B B, et al. Study on synchronous estrus and reproductive traits of Longdong Cashmere goats [J]. *China Herbivore Science*, 2018, 38(6): 71-72. (in Chinese)
- [41] 杨军祥, 王珂, 郭海龙, 等. 陇东黑山羊的现状 & 保护利用 [J]. *畜牧兽医杂志*, 2010, 29(6): 55-57.  
YANG J X, WANG K, GUO H L, et al. Discussion on germplasm conservation and utilization of Longdong black goat [J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2010, 29 (6): 55-57. (in Chinese)

(编辑 范子娟)