

doi:10.11920/xnmdzk.2025.03.002

# 牦牛 *INSL3* 基因生物信息学及睾丸组织表达分析

谢钰冕<sup>1,2</sup>, 杨勤慧<sup>1,2</sup>, 李旭鹏<sup>1,3</sup>, 陈卓<sup>1,2</sup>, 余俊<sup>1,3</sup>, 熊燕<sup>2,3</sup>, 何翎阔<sup>1,3</sup>, 殷实<sup>1,2</sup>, 付伟<sup>1,2</sup>, 李键<sup>1,3</sup>, 熊显荣<sup>2,3</sup>  
(1. 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川成都610041; 2. 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川成都610041;  
3. 动物科学国家民委重点实验室, 四川成都610041)

**摘要:**旨在探究牦牛 *INSL3* 基因的序列特征及组织表达模式, 为解析其在雄性生殖中的功能机制提供理论依据。通过 RT-PCR 技术扩增牦牛 *INSL3* 基因 CDS 区序列, 并对其进行生物信息学分析。利用实时荧光定量 PCR 技术, 检测 *INSL3* 在牦牛心、肝、脾、肺、肾、小肠、肌肉和睾丸中的 mRNA 表达水平。利用免疫组织化学技术分析 *INSL3* 蛋白的细胞定位和表达情况。结果显示, 牦牛 *INSL3* 基因 CDS 区全长 399 bp, 共编码 132 个氨基酸; 系统进化树分析结果表明牦牛与黄牛的亲缘关系最近, 与狒狒最远; 生物信息学分析表明牦牛 *INSL3* 蛋白存在信号肽序列及跨膜结构域, 属于亲水蛋白, 主要存在于细胞外, 且该蛋白含有胰岛素样生长因子 (ILGF) 结构域, 具有 7 个磷酸化位点; 该蛋白预测二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋 (38.85%) 和无规卷曲 (52.27%) 组成; RT-qPCR 结果显示, *INSL3* 在牦牛睾丸中表达最高, 极显著高于其他组织 ( $P < 0.01$ ); 免疫组织化学染色显示, *INSL3* 蛋白主要在睾丸间质细胞表达, 在精原细胞以及支持细胞有少量表达。综上所述, 研究成功扩增了牦牛 *INSL3* 基因, 并获得其序列特征及组织表达模式, 为进一步探究 *INSL3* 基因在雄性牦牛生殖功能中的作用机制提供理论参考。

**关键词:** 牦牛; *INSL3* 基因; 生物信息学分析; 组织表达

中图分类号: S823.85

文献标志码: A

文章编号: 2095-4271(2025)03-0245-08

## Bioinformatics analysis of the *INSL3* gene and its expression profile in yak testicular tissues

XIE Yumian<sup>1,2</sup>, YANG Qinhuai<sup>1,2</sup>, LI Xupeng<sup>1,3</sup>, CHEN Zhuo<sup>1,2</sup>, YU Jun<sup>1,3</sup>, XIONG Yan<sup>2,3</sup>,  
HE Honghong<sup>1,3</sup>, YIN Shi<sup>1,2</sup>, FU Wei<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>1,3</sup>, XIONG Xianrong<sup>2,3</sup>

(1. School of Animal Science and Veterinary Medicine, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China; 2. Ministry of Education Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Reservation and Exploitation, Chengdu 610041, China; 3. State Ethnic Affairs Commission Key Laboratory of Animal Science, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the sequence characteristics and tissue expression patterns of the *INSL3* gene in yak to provide a theoretical basis for understanding its functional mechanisms in male reproduction. The CDS region of the yak *INSL3* gene was specifically amplified using RT-PCR, and bioinformatics analysis was performed by online softwares. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to detect the mRNA expression levels of *INSL3* in the heart, liver, spleen, lung, kidney, small intestine, muscle, and testis tissues of yak. Immunohistochemical technique was used to analyze the cellular localization and expression of the *INSL3* protein. The results showed that the CDS region of yak *INSL3* gene was 399 bp, which encoded 132 amino acids. The phylogenetic analysis in some mammals indicated that yak was most closely related to cattle, and most distantly related to baboons. Bioinformatics analysis revealed that the *INSL3* protein of yak contained a signal peptide sequence and a

收稿日期: 2024-09-08

通信作者: 熊显荣 (1984-), 男, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 动物繁殖与胚胎工程. E-mail: xianrongxiong@163.com

基金项目: 国家“十四五”重点研发计划专项 (2023YFD1300603); 国家重点研发与转化项目 (2022YFD1601601); 国家农业产业技术体系四川肉牛创新团队专项项目 (SCCXTD-2024-13); 中央高校基本科研业务费专项资助项目 (ZYN2025248)

transmembrane domain, and possessed an insulin-like growth factor (ILGF) domain with seven phosphorylation sites. The predicted secondary structure of the INSL3 protein consisted primarily of  $\alpha$ -helices (38.85%) and random coils (52.27%). RT-qPCR results showed that the expression of *INSL3* was significantly higher in the testis than that in other tissues ( $P < 0.01$ ). Immunohistochemical staining revealed that *INSL3* was predominantly expressed in Leydig cells in the testis, and showed weak expression in spermatogonia and Sertoli cells. In summary, this study specifically amplified the yak *INSL3* gene, and revealed its sequence characteristics and tissue expression patterns, which provided a theoretical reference for further exploration of the role of *INSL3* in the reproductive function of male yaks.

**Keywords:** yak; *INSL3* gene; bioinformatics analysis; tissue expression

牦牛 (*Bos grunniens*) 是青藏高原牛亚科的代表种, 是目前已知在高寒牧场及其周边地区繁衍生息的牛亚科之一. 牦牛能充分利用高寒草甸的牧草资源, 对当地生态条件和恶劣环境(低温、低氧、强紫外线)有较强的适应性<sup>[1-2]</sup>. 作为在该地区可以生存和繁殖的牲畜之一, 牦牛已成为当地牧民的主要生活资料, 提供肉、奶和皮毛<sup>[3-4]</sup>. 由于牦牛种质退化以及恶劣的生存环境和饲养管理水平低下, 牦牛的繁殖力和生产力显著低于平原牛, 成为当地经济和畜牧业发展的主要瓶颈之一<sup>[5]</sup>. 牦牛作为高原畜牧业的重要经济动物, 具有独特的生理特性, 其繁殖能力低下值得深入探讨.

在雄性哺乳动物的生殖系统中, 胰岛素样生长因子 3 (Insulin-like 3, *INSL3*) 被认为是调控睾丸发育及功能的重要因子. *INSL3* 主要由睾丸间质细胞分泌, 并对间质细胞的功能维持和雄性激素的产生具有重要影响. 诸多研究推测 *INSL3* 与睾丸引带发育、睾丸下降<sup>[6]</sup>、睾丸生殖细胞存活<sup>[7]</sup>、生育能力<sup>[8]</sup>以及骨代谢调控密切相关<sup>[9]</sup>. 胎儿期间质细胞分泌 *INSL3* 激活位于生殖韧带上的松弛素家族肽受体 2 (relaxin family peptide receptor 2, *RXFP2*), 促使引带的松弛和延展, 推动睾丸从腹腔下降到阴囊<sup>[10]</sup>. *INSL3* 也是雄性睾丸间质细胞功能的循环生物标志物, 血液中的 *INSL3* 浓度可以被视为睾丸中间质细胞功能的准确度量, 即间质细胞的数量以及分化状态可以反映它们产生类固醇的能力<sup>[11]</sup>. 前期研究报道 *INSL3* 有望作为功能性性腺功能减退症的鉴别因子<sup>[12]</sup>, 且 *INSL3* 通过调节间质细胞的功能, 间接影响睾酮的合成和分泌, 从而影响雄性生殖器官的发育和维持, 以及第二性征的表现. 近年研究表明 *INSL3* 可能在调节雄性生殖细胞的凋亡和更新中发挥作用, 尤其是当精子发生处于应激

条件时<sup>[13]</sup>. 尽管 *INSL3* 基因在猪、羊等家畜以及其他物种中已有相关研究, 但牦牛尚未见相关研究报道.

本研究以牦牛为对象, 扩增了 *INSL3* 基因的编码区序列, 并对其进行生物信息学分析. 同时, 采用 RT-qPCR 技术, 分析 *INSL3* 基因在牦牛各组织中 mRNA 的表达模式, 并通过免疫组化染色检测该基因编码蛋白在睾丸组织中的定位. 本研究为解析 *INSL3* 在雄性牦牛中的生物学作用提供依据, 为研究牦牛生殖生物学奠定基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 试验动物与样本采集

牦牛样本采自四川省阿坝州红原县. 随机选取健康的成年牦牛 3 头(样本 1、样本 2、样本 3), 宰杀后立即用灭菌剪子采集心、肝、脾、肺、肾、小肠、肌肉和睾丸, 无菌生理盐水冲洗. 使用无菌剪子将样本剪成 0.4×0.4×0.4 cm 大小的组织块, 将一部分组织迅速装入无菌冻存管投入液氮, 另一部分置于多聚甲醛中固定备用.

### 1.2 总 RNA 提取与反转

参照 TRIzol 试剂盒(南京 Vazyme)的说明书, 提取牦牛心、肝、脾、肺、肾、小肠、肌肉和睾丸总 RNA. 采用日本 Biospec-nano 微量紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度及纯度. 经检测质量合格的 RNA 使用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(美国 Thermo Scientific)合成 cDNA.

### 1.3 引物合成与基因扩增

从 NCBI 数据库中获取牦牛 *INSL3* 基因的预测序列(登录号: XM\_005897890), 采用 NCBI Primer-BLAST 在线工具设计特异性引物(表 1), 引物由擎科生物合成.

以样本1牦牛睾丸cDNA为模板,采用RT-PCR扩增牦牛 *INSL3* 基因CDS区序列.采用25  $\mu$ L扩增体系(上游引物1  $\mu$ L,下游引物1  $\mu$ L,2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 12.5  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L).扩增程序为:95  $^{\circ}$ C预变性3 min;95  $^{\circ}$ C变性15 s,63  $^{\circ}$ C退火

15 s,72  $^{\circ}$ C延伸13 s,33个循环;72  $^{\circ}$ C彻底延伸5 min,4  $^{\circ}$ C保存.参照潘帮婷<sup>[14]</sup>等方法对PCR产物进行回收,并将PCR产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序.

表1 目的基因和内参基因引物信息

Table 1 Primer information for target and house-keeping genes

基因	引物序列(5'-3')	产物长度	退火温度	用途
<i>INSL3-C</i>	F:AGGCGCCTATAAGGGGGAT R:AACTGGACTCCTGTCGGTCT	502 bp	63 $^{\circ}$ C	RT-PCR
<i>INSL3-Q</i>	F:CCTCTGTCCCACTGAATCC R:GTTTCATGGTGCTGTGTGGC	103 bp	60 $^{\circ}$ C	RT-qPCR
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F:GATGATATTTGCTGCGCTCCTG R:CTTGCTCTGAGCCTCATCCC	177 bp	60 $^{\circ}$ C	RT-qPCR

#### 1.4 *INSL3* 生物信息学分析

使用多种生物信息学工具对牦牛 *INSL3* 基因及其编码的蛋白质进行全面系统分析.首先通过NCBI的ORF Finder程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找 *INSL3* 基因的开放阅读框(ORF),以确定其编码区序列.通过NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)预测牦牛 *INSL3* 基因氨基酸序列,并对不同物种 *INSL3* 氨基酸序列进行同源性比较.为了进一步探讨其遗传进化,通过MEGA11分析生成进化树<sup>[15]</sup>.利用在线软件ExPASy ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)对 *INSL3* 蛋白的分子量、等电点(pI)、氨基酸组成以及不稳定指数等相关参数进行详细分析.信号肽的检测则通过在线软件SignalP 5.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)完成,预测该蛋白是否具有分泌信号.通过NetPhos-3.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPho>)预测分析蛋白质磷酸化位点.蛋白质结构域将通过NCBI的cdd数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)进行分析,以确定其功能性结构域.为了更全面地了解 *INSL3* 蛋白的结构特征,使用在线工具SOPMA(<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>)和SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)对 *INSL3* 蛋白的二级结构和三级结构进行预测.

#### 1.5 牦牛 *INSL3* 基因组织表达谱

以  $\beta$ -actin 为内参基因,通过CFX96<sup>TM</sup>(美国Bio-Rad)实时荧光定量系统检测 *INSL3* 在心、肝、脾、肺、肾、小肠、肌肉和睾丸中的mRNA表达模式.反应体系

10  $\mu$ L:5  $\mu$ L 2 $\times$ NovoStart<sup>®</sup>SYBR qPCR SuperMix Plus(苏州Novoprotein),1.5  $\mu$ L cDNA,正向和反向引物各0.5  $\mu$ L,2.5  $\mu$ L无酶水.

#### 1.6 免疫组织化学染色

免疫组化染色参照杨勤慧<sup>[16]</sup>等的方案进行.简言之,将固定的睾丸组织进行石蜡包埋后切片,置于二甲苯脱蜡.酒精洗涤后,采用EDTA进行抗原修复.随后用PBS进行洗涤,以阻断内源性过氧化物酶的活性.封闭30 min后进行一抗(兔抗 *INSL3*,1:300稀释,博奥森)孵育时间为12 h.二抗(山羊抗兔IgG,辣根过氧化物酶标记)在室温条件下孵育1 h后滴加DAB显色液进行显色反应.显色反应终止后对细胞核进行复染,中性树胶封片.使用激光共聚焦显微镜采集图像.

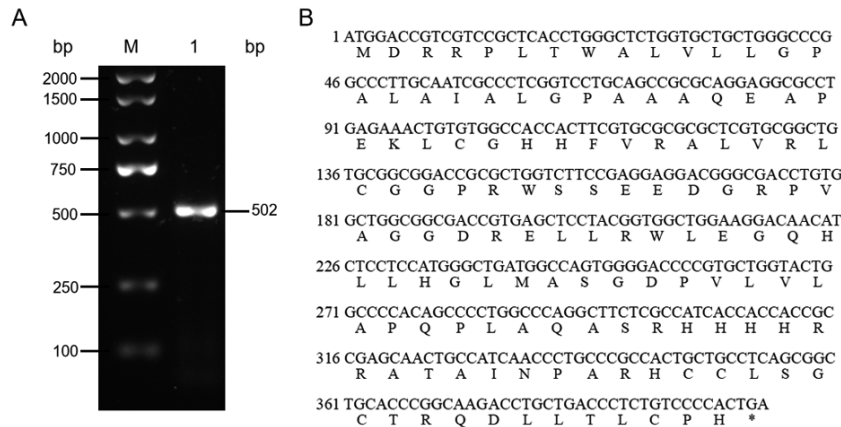
#### 1.7 统计分析

RT-qPCR结果采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法进行分析,所有试验数据以“平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)”的形式表示,每组试验至少重复3次.使用GraphPad Prism10软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著.

## 2 结果

### 2.1 牦牛 *INSL3* 基因的扩增

以牦牛睾丸cDNA为模板,扩增 *INSL3* 编码序列.以2%琼脂糖凝胶电泳检测显示目的条带清晰无明显杂带,与预期结果一致(图1A).扩增产物经测序得到502 bp核酸序列,其中CDS区为399 bp,共编码132个氨基酸,如图1B所示.



A: *INSL3* 基因 PCR 扩增电泳图; B: 氨基酸序列

图 1 牦牛 *INSL3* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of yak *INSL3* gene

注: M. DNA 相对分子质量标准 DL 2000; 1. 扩增产物

### 2.2 牦牛 *INSL3* 同源性比对与系统进化树

对不同物种 *INSL3* 基因编码蛋白氨基酸序列进行同源性比对发现, 牦牛和黄牛同源性最高 (99.89%), 其次为山羊 (96.97%)、绵羊 (96.97%)、猪 (86.36%)、蓝鲸 (85.07%)、黑蝙蝠 (78.79%)、大

熊猫 (82.71%)、家猫 (78.95%)、鬣狗 (75%), 与狒狒 (70.45%) 同源性最低. 利用 MEGA11 软件对上述 9 个不同物种的 *INSL3* 蛋白氨基酸序列构建系统进化树, 结果见图 2. 牦牛与黄牛聚为一支, 表明牦牛和黄牛的亲缘关系最近.

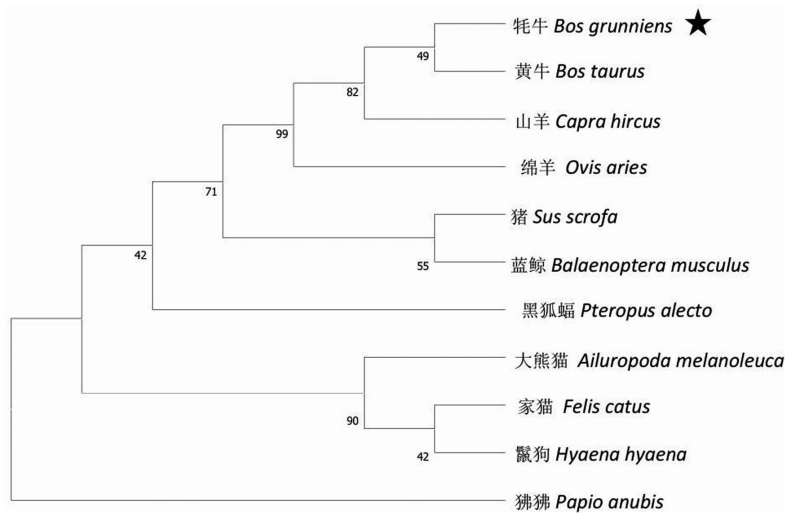


图 2 *INSL3* 蛋白氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of *INSL3* amino acid sequences

### 2.3 生物信息学分析

#### 2.3.1 牦牛 *INSL3* 蛋白理化性质

牦牛 *INSL3* 蛋白的分子量为 14 351.64 Da, 等电点为 8.69, 表明其在中性 pH 条件下可能带正电荷. 分析其氨基酸组成后发现, 带负电荷的残基总数 (Asp+Glu) 为 11, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 为 14. 氨基酸组成成分中亮氨酸最高 (16.7%), 酪氨酸最低

(0), 说明亮氨酸可能在该蛋白结构和功能中发挥重要作用. 脂肪系数 (AI) 为 96.97, 表明该蛋白具有较高的热稳定性. 然而, 该蛋白的不稳定指数为 64.41, 意味着该蛋白在体内可能处于不稳定状态, 易降解. 总平均亲水指数为 -0.120 (图 3), 表明该蛋白在整体上属于亲水性蛋白.

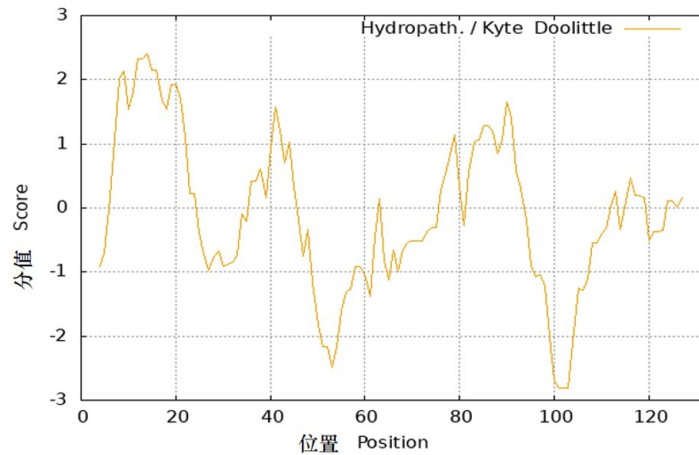


图 3 牦牛 *INSL3* 蛋白的亲疏水性预测

Fig. 3 Prediction of hydrophobicity of yak *INSL3* protein

2. 3. 2 *INSL3* 信号肽和结构域以及磷酸化位点分析

信号肽预测结果见图 4, 有信号肽的概率为 97. 77%, 切割位点在第 26~27 位氨基酸处, 信号肽序列为 MDRRPLTWALVLLGPALAIALGPAAA. 利用 Euk-mPLoc 2. 0 在线软件预测 *INSL3* 蛋白的亚细胞定位, 结果显示, 该蛋白主要分布在细胞外. 这些结果表明该蛋白可能作为分泌性蛋白经过分泌途径导向细胞外, 且该蛋白在 31~131 位氨基酸处有胰岛素样生长

因子 (insulin-like growth factor, *ILGF*) 结构域, 提示 *INSL3* 蛋白可能在调节生长和发育过程中发挥重要作用.

利用 NetPhos- 3. 1 在线软件对牦牛 *INSL3* 蛋白进行磷酸化位点预测. 结果显示 (图 5), *INSL3* 蛋白有 7 个潜在的磷酸化位点, 其中丝氨酸磷酸化位点 4 个, 苏氨酸磷酸化位点 3 个. 这些磷酸化位点的存在暗示 *INSL3* 蛋白可能通过磷酸化调节其生物活性.

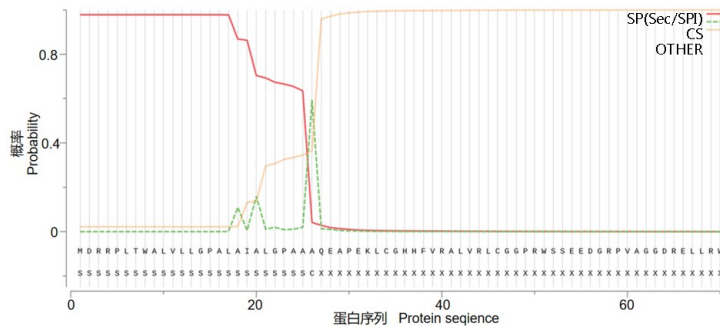


图 4 牦牛 *INSL3* 基因编码蛋白信号肽预测

Fig. 4 Prediction of protein signal peptides encoded by yak *INSL3* gene

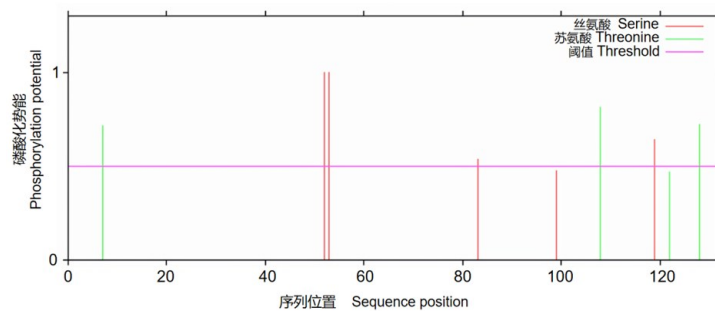


图 5 牦牛 *INSL3* 蛋白磷酸化位点分析

Fig. 5 Phosphorylation site prediction of yak *INSL3* protein



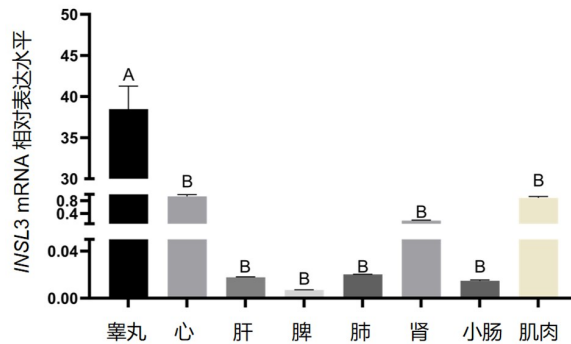


图 8 牦牛 *INSL3* 基因的组织表达

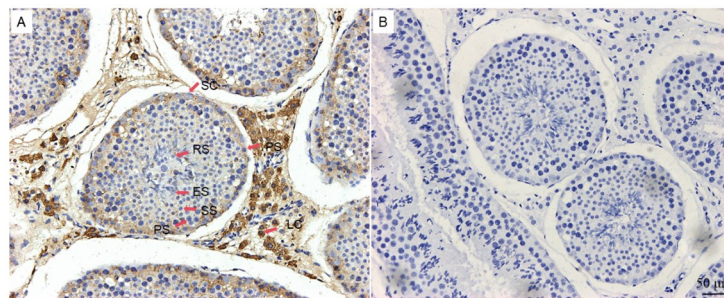
Fig. 8 Tissue expression of *INSL3* gene in yak

注:不同的字母表示差异极显著,  $P < 0.01$

### 2.5 牦牛 *INSL3* 蛋白细胞定位

免疫组织化学技术检测 *INSL3* 在成年牦牛睾丸组织中的定位和表达,结果如图 9,阳性信号为棕色或黄色,颜色越深表明表达越高.结果显示 *INSL3* 主

要在间质细胞中表达,推测其可能在睾丸的间质细胞功能中发挥重要作用.在精原细胞、支持细胞以及初级精母细胞也有少量阳性信号,提示 *INSL3* 参与了生殖细胞的发生及相关生理过程.



A. 牦牛睾丸 *INSL3* 蛋白定位; B. 牦牛睾丸(阴性对照)

图 9 雄性牦牛睾丸 *INSL3* 蛋白定位

Fig. 9 Localization of *INSL3* protein in yak testis

注:SP.精原细胞;PS.初级精母细胞;SS.次级精母细胞;SC.支持细胞;LC.间质细胞;RS.圆形精子细胞;ES.长形精子细胞

## 3 讨论

*INSL3* 基因编码的激素主要由间质细胞分泌,在雄性生殖系统的发育和功能维护中扮演着至关重要的角色,不仅参与了早期睾丸的正确定位,还在成年后通过维持间质细胞的功能,维持正常的雄性激素水平和生殖能力.研究表明,*INSL3* 的表达和功能异常可能直接影响雄性生殖能力,包括睾丸正常发育和精子生成过程.通过对 *INSL3* 基因的研究,不仅有助于理解雄性生殖系统的正常发育和功能,还能够为改善牦牛生育力、提高种群繁殖效率提供理论依据和实践指导.

本研究扩增了牦牛 *INSL3* 基因的 CDS 区序列,测序结果与 NCBI 中牦牛的预测序列一致.进一步生物信息学分析结果显示,牦牛和黄牛的 *INSL3* 蛋白序列具有高度同源性,这表明该基因在进化过程中具有较

高保守性.*INSL3* 蛋白中发现的胰岛素样生长因子(ILGF)结构域也支持了这一结论<sup>[17]</sup>,作为胰岛素样生长因子家族中的重要成员,其在控制代谢、生长和分化以及繁殖等过程中发挥着多种作用.该蛋白含有多个潜在的磷酸化修饰位点,提示其可能受到磷酸化的调控.信号肽会被识别并导入到内质网腔,通过信号肽酶识别特定序列将信号肽切除,之后在内质网中进行进一步折叠和修饰从而释放成熟蛋白.信号肽预测结果显示 *INSL3* 蛋白含有明显的信号肽序列,这是蛋白质被分泌到细胞外的典型特征.先前的研究表明 *INSL3* 是一种分泌性蛋白<sup>[18]</sup>,亚细胞定位结果也显示该蛋白主要分布于细胞外.组织表达谱结果显示,*INSL3* 主要在睾丸表达,在其他组织表达微量,与现有研究一致,已报道在绵羊心、肌肉、肾等器官中表达微

量,在睾丸表达较高<sup>[19]</sup>.这表明 *INSL3* 在雄性生殖系统中具有特异性高表达,特别是在睾丸中可能发挥重要作用.免疫组织化学染色结果显示,在牦牛睾丸间质细胞中有强烈的阳性信号,暗示 *INSL3* 是由睾丸间质细胞产生的,这与前期在其他哺乳动物上的研究结果一致<sup>[20]</sup>.值得注意的是在精原细胞、支持细胞以及初级精母细胞也有少量表达,先前的研究发现初生滩羊的生殖母细胞以及支持细胞也有少量 *INSL3* 阳性信号<sup>[21]</sup>,可能是因为精原细胞和支持细胞可能摄取了间质细胞分泌的 *INSL3* 蛋白,或是精原细胞和支持细胞表达 *INSL3* 的受体,从而间接导致 *INSL3* 的富集.

综上所述,*INSL3* 蛋白在牦牛睾丸间质细胞中高度表达,可能参与调节睾丸的发育和功能.然而,*INSL3* 与牦牛繁殖力低下之间的潜在联系仍需进一步研究.

## 4 结论

本试验扩增了牦牛 *INSL3* 基因,通过生物信息学分析探究该基因的序列特征,表明其在遗传进化中相对保守.组织表达谱揭示 *INSL3* 在牦牛各组织中广泛表达,其在睾丸中富集表达,提示其在雄性生殖系统中的关键作用.免疫组织化学染色分析进一步证实,*INSL3* 蛋白主要分布于睾丸间质细胞.推测 *INSL3* 基因与雄性牦牛的繁殖密切相关,其具体作用机制有待进一步研究.

### 参考文献

- [1] ZHANG J, LONG K, WANG J, et al. Yak miR-2285o-3p attenuates hypoxia-induced apoptosis by targeting caspase-3 [J]. *Animal Genetics*, 2022, 53(1): 49-57.
- [2] QIU Q, ZHANG G J, MA T, et al. The yak genome and adaptation to life at highaltitude [J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(8): 946-949.
- [3] ZHU Y J, PAN B T, FEI XX, et al. The biological characteristics and differential expression patterns of *TSSK1B* gene in yak and its infertile hybrid offspring [J]. *Animals*, 2023, 13(2): 320.
- [4] DAS PP, KRISHNAN G, DOLEY J, et al. Establishing gene *Amelogenin* as sex-specific marker in yak by genomic approach [J]. *Journal of Genetics*, 2019, 98(1): 7.
- [5] CAO M L, WANG X D, GUO S K, et al. F1 male sterility in cattle-yak examined through changes in testis tissue and transcriptome profiles [J]. *Animals*, 2022, 12(19): 2711.
- [6] HUANG Z H, KAFTANOVSKAYA E M, RIVAS B, et al. Mechanisms of *INSL3* signaling in male reproductive organs [J]. *Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia*, 2013, 118(1 Suppl): 32-33.
- [7] SAGATA D, MINAGAWA I, KOHRIKI H, et al. The insulin-like factor 3 (*INSL3*)-receptor (*RXFP2*) network functions as a germ cell survival/anti-apoptotic factor in boar testes [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(4): 1523-1539.
- [8] MINAGAWA I, MURATA Y, TERADA K, et al. Evidence for the role of *INSL3* on sperm production in boars by passive immunisation [J]. *Andrologia*, 2018, 50(6): e13010.
- [9] DE TONI L, AGOULNIK A I, SANDRI M, et al. *INSL3* in the musculoskeletal system [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2019, 487: 12-17.
- [10] IVELL R, MAMSEN L S, ANDERSEN C Y, et al. Expression and role of *INSL3* in the fetal testis [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13: 868313.
- [11] IVELL R, WADE J D, ANAND-IVELL R. *INSL3* as a biomarker of Leydig cell functionality [J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 88(6): 147.
- [12] ANAND-IVELL R, HENG K E, ANTONIO L, et al. Insulin-like peptide 3 (*INSL3*) as an indicator of Leydig cell insufficiency (LCI) in Middle-aged and older men with hypogonadism: Reference range and threshold [J]. *The Aging Male*, 2024, 27(1): 2346322.
- [13] ESTEBAN-LOPEZ M, AGOULNIK A I. Diverse functions of insulin-like 3 peptide [J]. *Journal of Endocrinology*, 2020, 247(1): 1-12.
- [14] 潘帮婷,熊显荣,于海玲,等.牦牛 *GSTK1* 基因序列特征分析及其组织表达谱构建 [J]. *西南民族大学学报(自然科学版)*, 2022, 48(6): 598-605.
- [15] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [16] YANG Q H, XIE Y M, PAN B T, et al. The expression and epigenetic characteristics of the *HSF2* gene in cattle-yak and the correlation with its male sterility [J]. *Animals*, 2024, 14(10): 1410.
- [17] WANG J Y, CHITSAZ F, DERBYSHIRE M K, et al. The conserved domain database in 2023 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D384-D388.
- [18] FACONDO P, DELBARBA A, MAFFEZZONI F, et al. *INSL3*: A marker of Leydig cell function and testis-bone-skeletal muscle network [J]. *Protein & Peptide Letters*, 2020, 27(12): 1246-1252.
- [19] 潘章源,张自杰,季久秀,等.绵羊 *INSL3* 基因组织表达规律与潜在功能位点分析研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(4): 679-687.
- [20] KAWATE n. Insulin-like peptide 3 in domestic animals with normal and abnormal reproductive functions, in comparison to rodents and humans [J]. *Reproductive Medicine and Biology*, 2022, 21(1): e12485.
- [21] 陈少宇,袁莉刚,杨洪早,等.初生及 35 日龄滩羊睾丸组织化学特征及 *INSL3* 表达比较 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2022, 57(6): 10-18.

(责任编辑:和力新,殷锋,付强,张阳,肖丽;英文编辑:周序林,郑玉才)