论文

中华鳖 *Dmrt1* 基因在雄性性别分化中的功能分析孙伟[†], 史思瑞[†], 蔡晗, 宓猛冬, 钱国英*, 葛楚天*

浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100

[†] 同等贡献

* 联系人, E-mail: qiangy@zwu.edu.cn; cge@zwu.edu.cn

收稿日期: 2015-08-19; 接受日期: 2015-08-25; 网络版发表日期: 2015-09-16

国家自然科学基金(批准号: 31101884)、浙江省自然科学基金(批准号: LY14C190008, LQ13C190001)、浙江省公益性技术应用研究项目(批准号: 2013C32054)、浙江省农业新品种选育重大专项(批准号: 2012C12907)和宁波市科技创新团队(批准号: 2012B82016)资助项目
doi: 10.1360/N052015-00169

摘要 在大部分脊椎动物中, *Dmrt1* 基因在雄性性别决定和性腺分化中起重要的调控作用. 本文通过慢病毒-*Dmrt1*-shRNA 干扰和 *Dmrt1*-OE 过表达载体系统的构建, 成功实现了 *Dmrt1* 基因在中华鳖胚胎发育过程中的高效异常表达, 以探讨 *Dmrt1* 在中华鳖雄性性别分化中的功能. 结果显示, 经过 *Dmrt1*-shRNA 干扰处理后的 ZZ 胚胎, 32.0%发育成雌性(生理)个体, 而经过 *Dmrt1*-OE 过表达处理后, 25.5%的 ZW 胚胎发育成雄性(生理)个体. 苏木素/伊红(H&E)染色、qPCR 和免疫组化分析表明, *Dmrt1* 基因敲低后, ZZ 胚胎性腺外形和组织结构明显雌性化, 雄性特异性基因 *Amh* 和 *Sox9* 表达显著降低, 雌性特异性基因 *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 表达则显著上升, 出现雄向雌的性逆转现象; 而 *Dmrt1* 过表达后的 ZW 胚胎性腺则向睾丸分化, *Amh* 和 *Sox9* 表达急剧上调, *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 表达显著下降, 呈现雌转雄性逆转现象. 上述研究表明, *Dmrt1* 基因在中华鳖早期雄性性别形成过程中是必需的, 且它的异位表达能够单独启动雄性分化, 是中华鳖雄性性别分化的关键因子.

关键词*Dmrt1*
性别分化
雄性
中华鳖
慢病毒载体

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)隶属于爬行纲、龟鳖目、鳖科(Trionychidae)、鳖属(*Pelodiscus*), 是中国传统的名贵水产养殖品种. 在长期的养殖实践中发现雄性中华鳖生长速度快, 裙边宽厚、营养价值高, 且市场单价高于雌鳖. 鉴于此, 如果能养殖全雄鳖, 将显著提高养殖的经济效益. 现已发现中华鳖存在微小性染色体(Z/W), 性别决定方式属基因型性别决定(genetic sex determination, GSD)^[1,2], 但其性别决定和性腺分化的分子机制仍不清楚, 这很大程度上阻碍了雄性控制技术的研发, 因此中华鳖性别决定分

子机制的解析将是中华鳖全雄苗种培育的一个重要前提.

性别决定是一个复杂的、多基因精确调控的过程. 解析 GSD 分子机制关键在于挖掘并阐明性别决定的主控基因及其下游关键调控基因的作用机制. 在脊椎动物中, *Sry*(sex determining region of Y chromosome)基因是最早发现的雄性性别决定的主控基因, 该基因通过激活 *Sox9*(SRY-related high mobility group-box gene 9)基因, 启动雄性通路并诱导下游 *Amh*(anti-Mullerian hormone gene)等基因的表达, 最

引用格式: 孙伟, 史思瑞, 蔡晗, 等. 中华鳖 *Dmrt1* 基因在雄性性别分化中的功能分析. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 881–889Sun W, Shi S R, Cai H, et al. Function analysis of *Dmrt1* in male sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis*. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 881–889, 10.1360/N052015-00169

终决定哺乳动物精巢发育^[3,4]。在鱼类中, 目前已发现的性别决定基因有日本青鳉(*Oryzias latipes*) *Dmy*(the DM-domain gene on the Y chromosome)基因^[5~7]、吕宋青鳉(*Oryzias luzonensis*) *Gsdf*(gonadal soma-derived factor)基因^[8]、恒河青鳉(*Oryzias dancena*) *Sox3*(SRY-related high mobility group-box gene 3)基因^[9]、河豚(*Takifugu rubripes*) *Amhr2*(anti-Mullerian hormone receptor 2)基因^[10]、牙汉鱼(*Odontesthes hatcheri*) *Amhy*(Y-linked anti-Mullerian hormone gene)基因^[11]以及虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*) *SdY*(sexually dimorphic on the Y chromosome)基因^[12], 研究表明这些基因的缺失或过表达均会导致性反转现象, 被认为是雄性性别决定的主控基因^[5~13]。在非哺乳类脊椎动物中, *Dmrt1*(double-sex and mab-3 related transcription factor1)基因是目前已知的雄性性腺分化和精巢发育的必要基因中最保守的, 与 *Sry* 等基因相似, 其缺失会导致性逆转^[5,14~16]。除了青鳉(*Oryzias latipes*)Y 染色体上的雄性决定基因 *Dmy*, 在一些动物中 *Dmrt1* 或其同源基因同样扮演着早期性别决定主控基因的角色, 例如, 鸡(*Gallus gallus*)Z 染色体上的雄性决定基因 *Dmrt1*^[14,17]和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)W 染色体上的雌性决定基因 *Dmw*(W-linked DM-domain gene), 值得注意的是该 *Dmw* 基因是通过抑制常染色体上 *Dmrt1* 基因的表达从而决定雌性发育^[18,19]。在红耳龟(*Trachemys scripta*)和太平洋丽龟(*Lepidochelys olivacea*)等龟鳖类动物中, *Dmrt1* 基因在雄性胚胎期性腺中的表达水平显著高于雌性^[20,21]。目前, 关于龟鳖类 *Dmrt1* 的研究刚刚起步, 且主要集中于表达差异研究, 尚未涉及基因功能验证, 其深度及广度远不及哺乳动物和鸟类。鉴于中华鳖性别决定分子机制尚不明确以及性别调控在中华鳖养殖中的巨大应用价值, 本实验室前期已克隆获得了中华鳖 *Dmrt1* 基因的 cDNA 序列全长, 对该基因进行了表达分析及其在性逆转中的变化研究, 已初步确定了 *Dmrt1* 是中华鳖雄性特异性基因, 参与雄性性腺分化^[22]。基于此, 为了进一步验证 *Dmrt1* 基因的功能, 本研究首次将慢病毒-*Dmrt1*-shRNA 干扰和 *Dmrt1* 过表达系统通过鳖胚注射技术引入中华鳖胚胎, 研究 *Dmrt1* 基因沉默(ZZ 胚胎)及过表达(ZW 胚胎)后的性腺分化方向以及 *Sox9* 等其他性别分化基因的表达变化。该基因的功能解析将为中华鳖性别决定的分子机理研究及单性苗种的培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 中华鳖鳖卵孵化及胚胎收集

中华鳖受精卵采自绍兴大畈水产专业合作社, 采集时间控制在产卵后 12 h 之内, 在浙江万里学院水生动物营养生理及分子调控实验室采用全裸无接触式加湿孵化系统进行孵化。将采集的鳖卵直接裸立于孵化盘定位孔中, 设定孵化温度为 31℃, 超声波雾化加湿器控制湿度在 75%~85%。孵化 1 天后, 弃去此时还没有明显受精斑的鳖卵, 调整动物极, 使其向上发育。设置 3 个孵化箱, 每组为 600 枚, 分别为空白对照组、*Dmrt1* 干扰组和 *Dmrt1* 过表达组。孵化过程中, 按照中华鳖胚胎发育图谱^[23]收集不同发育时期的胚胎, 用于性腺分离提取。同时取每个标本的血液, 通过外周血淋巴细胞培养的方法制备染色体标本进行染色体核型分析, 以确定染色体型^[24]。

1.2 *Dmrt1* 慢病毒干扰载体和过表达载体的构建及鳖胚感染

根据本实验室前期已克隆获得的中华鳖 *Dmrt1* 基因的 cDNA 全长序列, 由上海吉玛基因公司针对其编码区设计 3 对特异性 shRNA 序列, 构建 *Dmrt1* 慢病毒干扰载体(LV-*Dmrt1*-shRNA)。同时通过 PCR 克隆获得编码区序列, 构建 *Dmrt1* 慢病毒过表达载体(LV-*Dmrt1*-overexpression(OE))。根据第 4 代慢病毒载体四质粒合成法生产高滴度慢病毒浓缩液(10^9 units/mL, 上海吉玛)。该病毒载体携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)编码序列作为报告基因。3 对 *Dmrt1*-shRNA 寡核苷酸序列分别为, shRNA#1: 5'-GGTGGCAGCTCCTGTTTATTG-3'; shRNA#2: 5'-GGATGCTCATTTCAGGACATTG-3'; shRNA#3: 5'-GCAGTCAAGACTCTGGCTTAA-3'。用以扩增 *Dmrt1* 基因编码区序列的 PCR 引物序列为 F: 5'-CCCCAAATTGTAGAGGCGAACC-3'; R: 5'-TGA-GGGCAGGGCAGAGGAGG-3'。

中华鳖鳖胚在以上恒温恒湿环境下孵化至第 15 期时向胚胎注入 10 μ L 慢病毒液(10^9 units/mL), 并通过 C-DSS230 荧光显微镜(NiKon, 日本)鉴定病毒的组织感染程度。实验组分别为 LV-*Dmrt1*-shRNA 病毒液和 LV-*Dmrt1*-OE 病毒液, 注射完毕后置于相同环境下继续孵化, 收集 15~27 期胚胎用于性腺提取, 直至孵化出壳。实验中设空白载体对照组。

1.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

按 TRIzol 试剂盒(Invitrogen, 美国)方法, 从中华鳖不同发育时期胚胎性腺中提取 RNA, 用 Recombinant DNase I (RNase Free)(TaKaRa, 日本)进行 DNase I 处理, 按照 Fermentas 反转录试剂盒(K1622, Thermo Scientific, 美国)合成 cDNA. 以合成的 cDNA 为模板, 配置 25 μ L PCR 反应液体系如下: SYBR[®] Premix (TaKaRa) 12.5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 灭菌蒸馏水 9.5 μ L. 按下列参数在 Bio-Rad iCycler 中进行 PCR 扩增: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 循环 50 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min. 采用 Primer 5.0 软件设计引物, 以 β -actin 作为内参基因, 所用引物序列如下: β -actin(F: 5'-AACTGGGATGACATGGAGA-AGA-3', R: 5'-AACATGATCTGGGTCATCTT-3'); *Dmrt1*(F: 5'-CCGCCTCGGGAAGAAGTC-3', R: 5'-TGCTGGATGCCGTAGTTGC-3'); *Amh*(F: 5'-CGGCTACTCCTCCCACACG-3', R: 5'-CCTGGCTGGAGTATTTGACGG-3'); *Sox9*(F: 5'-AGCCTCTATTCCACCTTCAC-3', R: 5'-ATGTCTGTACCGAGTTTTGC-3'); *Cyp19a1*(F: 5'-CCTCTGCTGGAGATGGTTTT-3', R: 5'-CCTCTGCTGGAGATGGTTTT-3'); *Foxl2*(F: 5'-GCGGACGTCCTTCTCTCC-3', R: 5'-GACACACACAGACGGCTGG-3').

1.4 石蜡切片和苏木素-伊红染色

将取出的胚胎性腺组织保存于 4% 多聚甲醛内, 固定 24 h 后转入 50% 乙醇. 在 EZ4 体视显微镜(Leica, 德国)下进行组织形状修正, 经过乙醇浓度由低到高梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 进行常规石蜡连续切片, 以 5~6 μ m 厚度为宜. 将切片进行二甲苯脱蜡, 乙醇浓度由高到低梯度水分渗透, 苏木素-伊红染色, 脱水, 封片. 于正置显微镜(Nikon, 日本)下观察拍照.

1.5 免疫荧光染色

经二甲苯脱蜡, 由高到低浓度乙醇渗透后切片放入 0.01 mol/L 柠檬酸钠溶液, 95 $^{\circ}$ C 抗原修复 20 min, 冷却至室温. 在封闭液(10% normal donkey serum, 3% 牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA), 0.3% Triton X-100)中室温孵育 1 h, 吸去周边多余液体, 分别加兔抗 *Dmrt1*(1:250, Millipore, 美国)、兔抗 *Sox9*(1:500, Millipore)、鼠抗 γ H2AX(1:500, Abcam, 英

国)和兔抗 GFP(1:250, Abcam), 4 $^{\circ}$ C 过夜. 用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)和洗脱液(1% normal donkey serum, 3% BSA, 0.3% Triton X-100)清洗 10 min, 重复 3 次. 在室温避光环境下, 滴加羊抗兔 IgG-488(1:250, Invitrogen)和羊抗鼠 IgG-594(1:250, Invitrogen), 孵育 1 h, 用 PBST 和洗脱液清洗 10 min, 重复 3 次. 滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(286 nmol/L, Sigma, 美国)液室温避光染色 5 min, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 5 min, 重复 3 次. 加抗荧光淬灭液封片, 于荧光正置显微镜(Nikon)下观察拍照.

1.6 数据分析

所得数据采用 SAS(6.12 版本)软件中 GLM 过程进行方差分析和 Duncan 氏多重比较, 检验误差为 5% 和 1% 水平.

2 结果

2.1 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰和 LV-*Dmrt1*-OE 过表达载体系统的有效性分析

本实验将 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰和 LV-*Dmrt1*-OE 过表达系统在中华鳖胚胎发育至第 15 期(孵化第 15 天)时通过鳖胚注射技术引入胚胎, 通过性腺表型变化观察及雌雄标记基因的表达变化分析来研究 *Dmrt1* 基因在中华鳖早期雄性性别分化中的生物学功能(图 1A 和 B). 为了验证此慢病毒载体系统能否有效感染中华鳖胚胎, 本实验首先检测了慢病毒处理后的鳖胚组织中 GFP 的表达分布, 以鉴定慢病毒的组织感染程度. 待中华鳖胚胎发育至胚胎期 25 期(孵化第 35 天), 收集胚胎性腺并置于荧光显微镜下直接观察, 发现 80% 以上的胚胎可检测到大量的绿色荧光信号, 均匀分布于各组织, 包括性腺组织(图 1C 和 D). GFP 免疫荧光染色结果进一步表明, 慢病毒载体表达系统能在中华鳖胚胎性腺组织中高度表达, 几乎充满整个性腺组织(图 1E~G).

经过 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰系统或 LV-*Dmrt1*-OE 过表达系统处理后, 本实验分析了 ZZ 或 ZW 胚胎性腺中 *Dmrt1* 的 mRNA 和蛋白表达水平变化. 实时荧光定量 PCR 结果显示, 在对照组 ZZ 胚胎中 *Dmrt1* 基因在第 15 期开始出现表达, 17 期表达急剧增加, 22 期左右达到最高表达量, 而在 3 对 LV-*Dmrt1*-shRNA

图1 中华鳖 *Dmrt1* 基因功能分析方案及慢病毒表达系统组织感染鉴定

A: RNA 干扰和过表达技术在中华鳖 *Dmrt1* 基因功能分析上的应用; B: 慢病毒胚胎注射; C: 经过慢病毒表达系统感染后, 中华鳖性腺-中肾复合体中的 GFP 蛋白的表达分布; D: 未转染慢病毒载体的胚胎性腺阴性对照。Gd: 性腺; Ms: 中肾; E: 经过 LV-*Dmrt1*-OE 过表达载体感染后, 25 期 ZW 胚胎性腺切片中的 GFP 蛋白表达分布; F: 经过 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰载体感染后, 25 期 ZZ 胚胎性腺切片中的 GFP 蛋白表达分布; G: GFP 蛋白免疫组化阴性对照

干扰处理后的 ZZ 胚胎中, *Dmrt1* 的表达明显受到抑制, 从 17 期开始表达量便显著下降, 后期均处于较低的表达水平, 平均抑制率达 83.26%(图 2A, *Dmrt1*-shRNA#1)。在整个早期胚胎发育过程中, 对照组 ZW 性腺中 *Dmrt1* 基因未见表达(或表达极微弱), 而经过 LV-*Dmrt1*-OE 过表达系统感染后的 ZW 胚胎性腺中, *Dmrt1* 基因在第 17 期开始被诱导异位表达, 18 期表达量急剧增加, 在整个胚胎发育过程中 *Dmrt1* 均维持在非常高的表达水平(图 2B)。

为了进一步明确 *Dmrt1* 经过干扰或过表达后在胚胎性腺中的表达分布情况, 本实验还通过免疫荧光染色检测了 *Dmrt1* 蛋白的表达变化。结果显示, 在 27 期对照组 ZZ 胚胎性腺中, *Dmrt1* 蛋白在性腺髓质区大量表达, 且主要定位于 Sertoli 前体细胞核中, 而在对照组 ZW 性腺中并未检测到 *Dmrt1* 蛋白表达的荧光信号。ZZ 胚胎性腺经过 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰处理后, 性腺皮质区明显雌性化且在该区域未见 *Dmrt1* 蛋白的表达, 在整个性腺中仅在髓质区检测到微弱的 *Dmrt1* 蛋白表达信号, 而在经过 LV-*Dmrt1*-

图2 经 LV-*Dmrt1*-shRNA 或 LV-*Dmrt1*-OE 过表达系统处理后胚胎性腺中 *Dmrt1* 的表达变化

A: 经过 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰处理后, 实时荧光定量 PCR 检测不同发育时期 ZZ 胚胎性腺中 *Dmrt1* mRNA 的表达变化; B: 经过 LV-*Dmrt1*-OE 处理后, 实时荧光定量 PCR 检测不同发育时期 ZW 胚胎性腺中 *Dmrt1* mRNA 的表达变化; C: 经 RNA 干扰或过表达后, 免疫荧光染色检测 27 期胚胎性腺中 *Dmrt1* 蛋白的表达分布

OE 过表达处理后的 ZW 胚胎性腺中, *Dmrt1* 蛋白在性腺髓质区被诱导表达(图 2C)。以上结果表明, 此慢病毒载体能够高效且稳定地感染中华鳖胚胎, 随着性腺的发育, 能够有效敲低 ZZ 性腺中 *Dmrt1* 的表达, 而在 ZW 性腺中 *Dmrt1* 亦能长期稳定过表达。

2.2 中华鳖 *Dmrt1* 基因功能分析

为了验证 *Dmrt1* 基因在中华鳖性别分化中的功能, 本研究首先通过组织形态学方法对 *Dmrt1* 敲低后的 ZZ 胚胎性腺和 *Dmrt1* 过表达后的 ZW 胚胎性腺进行性逆转分析。中华鳖胚胎发育至第 27 期, 胚胎性腺表面光滑、胶状透明, 雄性性腺(ZZ)短且粗圆, 而雌性性腺(ZW)长且扁平(图 3A 和 C)。 *Dmrt1* 敲低后的一部分 ZZ 胚胎性腺明显变长、呈扁平状, 与雌性性腺类似, 向雌性逆转(图 3B)。而经过 *Dmrt1* 过表达后的一部分 ZW 性腺外形则呈圆柱形且长度明显变短, 向雄性方向分化(图 3D)。同时, 本实验还通过石蜡切片观察不同处理组出壳稚鳖性腺的组织结构变化情况。苏木素/伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色结果显示, 对照组 ZZ 性腺外形呈椭圆形, 皮质区已退化为单细胞层, 髓质区高度发育形成原始性索, 其中 Sertoli 前体细胞围绕生殖细胞(图 4A~A'); 而对照组 ZW 性腺外形呈伞样扁平状, 皮质区高度发育, 髓质区明显退化并形成较大的腔隙结构, 生殖细胞分布于皮质区, 开始出现原始卵泡(图 4C~C')。 *Dmrt1* 敲低

后的 ZZ 性腺外形发生了明显的变化, 呈扁平状, 髓质区退化未见明显的性索结构, 而皮质区高度发育, 出现少量原始卵泡, 呈现明显的雌性性腺特征(图 4B~B'). 而 *Dmrt1* 过表达后的 ZW 性腺外形则呈圆状, 髓质区发育形成性索结构, 由大量 Sertoli 前体细胞围绕形成, 具有典型的雄性性腺的特征(图 4D~D'). 根据雌雄性腺的组织形态差异, 本实验对不同组别鳖胚雌雄数量及性逆转率进行了统计. 数据统计显示对照组中雌雄比例约为 1:1, *Dmrt1* 敲低处理组中雄性比例下调至 34.0%, 雄性向雌性逆转率为 32.0%(16/50), 而在 *Dmrt1* 过表达处理组中雄性比例增加至 62.0%, 雌性向雄性逆转率为 25.5%(13/51)(表 1). 以上结果表明, *Dmrt1* 敲低后的 ZZ 性腺和 *Dmrt1* 过表达后的 ZW 性腺均发生性逆转现象.

为了进一步验证 *Dmrt1* 基因敲低或过表达后性逆转现象的发生, 分析了雄性特异性基因 *Amh*, *Sox9* 以及雌性特异性基因 *Cyp19a1*(cytochrome p450 aromatase gene 1), *Foxl2*(forkhead transcription factor gene 2) mRNA 的表达变化. 实时荧光定量 PCR 结果显示, 在对照组 ZZ 性腺中 *Amh* 和 *Sox9* 基因高度表

达, *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 基因表达量较低; 而对照组 ZW 性腺中 *Amh*, *Sox9*, *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 基因的表达情况则完全相反. *Dmrt1* 基因敲低后, ZZ 性腺中 *Amh* 和 *Sox9* 的 mRNA 表达水平显著下调, *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 的 mRNA 表达则急剧上升. 而在 *Dmrt1* 过表达后的 ZW 性腺中, *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 的 mRNA 表达量明显降低, 而 *Amh* 和 *Sox9* 的 mRNA 表达量则显著增加(图 5).

同时本实验还通过免疫荧光染色检测 *Dmrt1* 敲

图 4 *Dmrt1* 敲低后 ZZ 性腺和 *Dmrt1* 过表达后 ZW 性腺的组织结构变化

A(A')~D(D'): 对照组 ZZ 性腺、*Dmrt1* 敲低后 ZZ 性腺、对照组 ZW 性腺和 *Dmrt1* 过表达后 ZW 性腺的 H&E 染色. sc: Sertoli 细胞; gc: 生殖细胞; pf: 原始卵泡

图 3 *Dmrt1* 敲低后 ZZ 性腺和 *Dmrt1* 过表达后 ZW 性腺的形态学观察

体视显微镜下观察 27 期对照组 ZZ 性腺(A)、*Dmrt1* 敲低后的 ZZ 性腺(B)、对照组 ZW 性腺(C)和 *Dmrt1* 过表达后的 ZW 性腺(D)的外观形态. Gd: 性腺; Ms: 中肾

图 5 *Dmrt1* 敲低后 ZZ 性腺和 *Dmrt1* 过表达后 ZW 性腺中雌雄特异性基因的表达变化

实时荧光定量 PCR 检测 *Dmrt1* 敲低或过表达后, *Amh*, *Sox9*, *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 的 mRNA 表达变化. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

表 1 *Dmrt1* 敲低或过表达后 27 期胚胎性腺的雌雄比例及逆转率^{a)}

组别	受精卵数	成活数	雄性数	雌性数	逆转率 ^{a)}
空白对照	104	100	51(51ZZ)	49(49ZW)	0
LV- <i>Dmrt1</i> -shRNAi	155	100	34(ZZ)	66(50ZW+16ZZ)	16/50
LV- <i>Dmrt1</i> -OE	140	100	62(49ZZ+13ZW)	38(38ZW)	13/51

a) *: 雄性向雌性逆转率为 ZZ 型生理雌鳖数/ZZ 型鳖总数; 雌性向雄性逆转率为 ZW 型生理雄鳖数/ZW 型鳖总数. 通过核型分析、性腺形态及组织学观察判断

低或过表达后 27 期胚胎性腺中 Sox9 蛋白的表达变化情况。脊椎动物性腺分化后, 雌性生殖细胞在胚胎期即进入减数分裂开始分化, 而此时雄性生殖细胞则停滞于有丝分裂 G0/G1 期直至成年性成熟才进入减数分裂。基于此, 本文以减数分裂特异性蛋白 γ H2AX 蛋白作为胚胎性腺雌性分子标记。免疫组化结果显示在对照组 ZZ 性腺中, Sox9 蛋白主要在 Sertoli 前体细胞核中大量表达, 几乎充满整个性腺髓质区, 但在生殖细胞中未见 γ H2AX 蛋白表达(图 6A~A'); 而在对照组 ZW 性腺中, γ H2AX 蛋白在皮质区生殖细胞中大量表达, 但未检测到 Sox9 蛋白的荧光信号(图 6C~C')。在 *Dmrt1* 敲低后的 ZZ 胚胎性腺中, Sox9 蛋白表达量骤减, 几乎检测不到荧光信号, 而 γ H2AX 蛋白则被大量诱导表达, 分布于皮质区生殖细胞内(图 6B~B')。而在 *Dmrt1* 过表达后的 ZW 性腺中 Sox9 蛋白表达急剧上调, 但低于雄性对照组, γ H2AX 蛋白表达量则急剧减少(图 6D~D')。以上分子研究结果进一步证明了 *Dmrt1* 敲低或过表达后, ZZ 性腺或 ZW 性腺确实出现了性逆转现象, 同时 *Dmrt1* 能激活 *Amh* 和 *Sox9* 表达, 抑制 *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 表达。

3 讨论

在脊椎动物性别决定和性腺分化中, *Dmrt1* 基因已被确认是一个高度保守的雄性决定调控因子。目前 *Dmrt1* 在哺乳动物性别决定和睾丸发育中的具体功能已被确定。而限于基因敲除及转基因技术难以在非模式生物上实现, 国际上有关龟鳖动物 *Dmrt1* 基因

功能的研究远不及哺乳动物。Itzel 等人^[25]利用 RNA 干扰和体外性腺培养技术成功使太平洋丽龟雄性性腺中 *Sox9* 基因的 mRNA 和蛋白表达量降低 70%~80%。另一方面, Shoemaker-Daly 等人^[26]则通过电穿孔方法将 GFP:Sox9 表达载体转入体外培养的巴西龟(*Trachemys scripta*)性腺中, 发现外源性 *Sox9* 能在产雌温度(female-producing temperature, FPT)性腺中高效表达, 并能够维持一定时期的异位表达效果。这些技术的探索为龟鳖类基因的功能研究奠定了一定基础, 但仅在体外实现基因的异常表达难以反映生物体内中的真实情况。本研究将 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰和 LV-*Dmrt1*-OE 过表达系统在特定发育时间点引入中华鳖胚胎, 实现了目的基因在胚胎发育过程中的异常表达。通过该慢病毒载体表达系统, *Dmrt1* 基因能在中华鳖胚胎性腺中长期高效沉默(整个胚胎期平均干扰率>80%)和高效异位表达, 说明该基因功能研究系统非常有效。

本实验室前期研究已发现, *Dmrt1* 基因参与早期雄性性别分化过程, 且可能位于雄性发育分子信号级联通路的上游位置, 作用于 *Sox9* 等下游关键基因^[22]。本研究发现在雄性 ZZ 胚胎中 *Dmrt1* 敲低后, 性腺皮质区发育, 髓质区明显退化, 此时性腺出现雄向雌性逆转现象。此外, 雄性特异性基因 *Amh* 和 *Sox9* 的表达水平显著下调, 雌性特异性基因 *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 表达则明显上升, 这说明 *Dmrt1* 基因在中华鳖早期雄性性别分化中是必需的。在鸡上, Smith 等人^[14]将 ZZ 个体中 *Dmrt1* 基因敲低后, 导致雌性化的左侧卵巢的出现以及 *Foxl2* 和 *Cyp19a1* 等雌性基因表达量的上

图 6 *Dmrt1* 敲低后 ZZ 性腺和 *Dmrt1* 过表达后 ZW 性腺中的 Sox9 和 γ H2AX 蛋白的表达变化

免疫荧光染色检测 Sox9 和 γ H2AX 蛋白在 27 期对照组 ZZ 性腺(A~A')、*Dmrt1* 敲低后 ZZ 性腺(B~B')、对照组 ZW 性腺(C~C')和 *Dmrt1* 过表达后 ZW 性腺(D~D')中的表达分布。sc: Sertoli 细胞; gc: 生殖细胞

调. *Dmy*^{-/-}XY 青鳉幼鱼中的原始生殖细胞数量较野生型 XY 幼鱼明显增多, 且与 XX 个体在同一时期进入减数分裂, 表明 *dmy* 基因的缺失诱导 XY 个体进入雌性发育路径^[27]. 另一方面, 本研究发现, *Dmrt1* 过表达后的 ZW 胚胎性腺出现典型的雄性性腺特征, 且 *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 表达骤降, 而 *Amh* 和 *Sox9* 表达则急剧上调, 表明 *Dmrt1* 基因的表达足以诱导中华鳖 ZW 性腺向雄性发育. 在青鳉中, XX 雌鱼个体中 *dmy* 基因的异位表达导致 XX 雌鱼发育为表型雄鱼^[28]. 在鸡的 ZW 性腺中强行诱导 *Dmrt1* 过表达后, 导致 ZW 性腺雄性化并促进 *Sox9* 和 *Amh* 等雄性基因的大量表达^[17]. 以上研究结果提示, 中华鳖 *Dmrt1* 基因与鸡 *Dmrt1* 及青鳉 *dmy* 这两个雄性决定基因的功能相似, 在睾丸分化中是必需的, 且能单独启动雄性分化, 是早期性别决定的关键调控因子, 位于 *Sox9*, *Amh* 等基因的上游位置. 而在哺乳动物中, *Dmrt1* 基因在早期性别决定中并不表达, 不是雄性分化主控因子, 其主要参与后期睾丸的分化和 Sertoli 细胞的功能维持^[29-31]. 这说明虽然 *Dmrt1* 在脊椎动物雄性发育中的调控作用是高度保守的, 但其在性别分化分子网络信号通路中的具体位置并不相同, 在非哺乳类中位于上游, 而在哺乳动物中则位于下游. 除了 GSD

动物外, Murdock 和 Wibbels^[32]还研究了 *Dmrt1* 基因在温度依赖型性别决定(temperature-dependent sex determination, TSD)中的作用, 结果表明, *Dmrt1* 是第一个被发现的在性别决定之前受到温度影响表达的基因, 在雄性红耳龟生殖嵴中的表达明显高于雌性, 且这种雄性特异性表达早于 *Sox9*. 本实验室前期采用 RNA 干扰手段对红耳龟 *Dmrt1* 进行功能分析, 发现在产雄温度下, *Dmrt1* 基因敲低后, 83%受精卵发育形成雌性(数据未发表), 说明 *Dmrt1* 在 TSD 动物的雄性分化中也起到重要的调控作用. 基于以上研究可以推测, 尽管脊椎动物性别决定的方式多种多样, 不断进化, 但像 *Dmrt1* 这类性别分化基础调控因子确异常保守.

综上所述, 本文通过 RNA 干扰和过表达技术对中华鳖 *Dmrt1* 基因进行了功能验证, 发现 *Dmrt1* 基因在中华鳖早期雄性性别形成过程中是必需的, 且它在 ZW 个体中的异位表达能启动雄性分化, 作用于 *Sox9*, *Amh* 基因的上游, 是雄性性别决定的关键因子. 同时本研究构建了慢病毒-shRNA 干扰和过表达系统, 成功有效感染鳖胚, 实现了目的基因的长时间异常表达, 为龟鳖类动物重要基因的功能研究提供了强有力的技术平台.

参考文献

- 1 Kawagoshi T, Uno Y, Matsubara K, et al. The ZW micro-sex chromosomes of the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*, Trionychidae, Testudines) have the same origin as chicken chromosome 15. *Cytogenet Genome Res*, 2009, 125: 125-131
- 2 Mu Y, Zhao B, Tang W Q, et al. Temperature-dependent sex determination ruled out in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) via molecular cytogenetics and incubation experiments across populations. *Sex Dev*, 2015, 9: 111-117
- 3 Pipek R P. Genetic mechanisms underlying male sex determination in mammals. *J Appl Genet*, 2009, 50: 347-360
- 4 Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M, et al. A critical time window of *Sry* action in gonadal sex determination in mice. *Development*, 2009, 136: 129-138
- 5 Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 2002, 417: 559-563
- 6 Nanda I, Kondo M, Hornung U, et al. A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 11778-11783
- 7 Otake H, Masuyama H, Mashima Y, et al. Heritable artificial sex chromosomes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Heredity*, 2010, 105: 247-256
- 8 Myosho T, Otake H, Masuyama H, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 2012, 191: 163-170
- 9 Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, et al. Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*. *Nat Commun*, 2014, 5: 4157
- 10 Kamiya T, Kai W, Tasumi S, et al. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002798
- 11 Hattori R S, Murai Y, Oura M, et al. A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, 2012, 109: 2955–2959
- 12 Yano A, Guyomard R, Nicol B, et al. An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr Biol*, 2012, 22: 1423–1428
 - 13 梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控. *中国科学 生命科学*, 2014, 44: 1198–1212
 - 14 Smith C A, Roeszler K N, Ohnesorg T, et al. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 2009, 461: 267–271
 - 15 Shibata K, Takase M, Nakamura M. The *DMRT1* expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 127: 232–241
 - 16 Koopman P. The genetics and biology of vertebrate sex determination. *Cell*, 2001, 105: 843–847
 - 17 Lambeth L S, Raymond C S, Roeszler K N, et al. Over-expression of *DMRT1* induces the male pathway in embryonic chicken gonads. *Dev Biol*, 2014, 389: 160–172
 - 18 Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, et al. A W-linked DM-domain gene, *DM-W*, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 2469–2474
 - 19 Yoshimoto S, Ikeda N, Izutsu Y, et al. Opposite roles of *DMRT1* and its W-linked paralogue, *DM-W*, in sexual dimorphism of *Xenopus laevis*: implications of a ZZ/ZW-type sex-determining system. *Development*, 2010, 137: 2519–2526
 - 20 Shoemaker C M, Queen J, Crews D. Response of candidate sex-determining genes to changes in temperature reveals their involvement in the molecular network underlying temperature-dependent sex determination. *Mol Endocrinol*, 2007, 21: 2750–2763
 - 21 Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis*, 2000, 26: 174–178
 - 22 葛楚天, 孙伟, 桑亚鹏, 等. 中华鳖 *Dmrt1* 基因的克隆、表达及在性逆转中的变化分析. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44: 1173–1182
 - 23 Tokita M, Kuratani S. Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zool Sci*, 2001, 18: 705–715
 - 24 唐伟, 洪炆飞, 汪财生, 等. 中华鳖核型与染色体 G 带分析. *上海海洋大学学报*, 2015, 24: 174–181
 - 25 Itzel S R, Horacio M L, Sarah L M, et al. RNAi-mediated gene silencing in a gonad organ culture to study sex determination mechanisms in Sea Turtle. *Genes*, 2013, 4: 293–305
 - 26 Shoemaker-Daly C M, Jackson K, Yatsu R, et al. Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads. *Dev Dyn*, 2010, 239: 1061–1075
 - 27 Paul-Prasanth B, Matsuda M, Lau E L, et al. Knock-down of *DMY* initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351: 815–819
 - 28 Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, et al. *DMY* gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 3865–3870
 - 29 Raymond C S, Murphy M W, O'Sullivan M G, et al. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*, 2000, 14: 2587–2595
 - 30 Zhao L, Svingen T, Ng E T, et al. Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of *Dmrt1*. *Development*, 2015, 142: 1083–1088
 - 31 Matson C K, Murphy M W, Sarver A L, et al. *DMRT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 2011, 476: 101–104
 - 32 Murdock C, Wibbels T. Expression of *Dmrt1* in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101: 302–308

Function Analysis of *Dmrt1* in Male Sexual Differentiation in *Pelodiscus sinensis*

SUN Wei, SHI SiRui, CAI Han, MI MengDong, QIAN GuoYing & GE ChuTian

College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

In most vertebrate species, *Dmrt1* gene is required for male sex determination and gonadal differentiation. In this study, the Lentivirus(LV)-*Dmrt1*-shRNA and LV-*Dmrt1* overexpression vector system was utilized to down-regulate or ectopically induce *Dmrt1* expression during embryonic development, exploring the role of *Dmrt1* in male sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis*. Results showed that 32.0% of genetically male (ZZ) embryos developed into female individuals after LV-*Dmrt1*-shRNA treatment, whereas 25.5% of ZW gonads differentiated to testes with treatment of LV-*Dmrt1*-OE. Hematoxylin and eosin (H&E) staining, qPCR and immunofluorescence analysis revealed that ZZ embryos with *Dmrt1* knockdown appeared male to female sex reversal, characterized by obvious feminization of gonads, downregulation of the testicular markers (*Sox9* and *Amh*), and remarkable upregulation of ovarian markers (*Cyp19a1* and *Foxl2*). Whereas, female to male sex reversal in ZW embryos overexpressing *Dmrt1* was detected based on masculinization of gonads, ectopical expression of *Sox9* and *Amh*, and downregulation of *Cyp19a1* and *Foxl2*. These data indicate that *Dmrt1* gene is essential for primary male sex determination, and its ectopic expression is sufficient to trigger male development, functioning as a key regulator in male sexual differentiation in *P. sinensis*.

***Dmrt1*, sexual differentiation, male, *Pelodiscus sinensis*, lentivirus vector**

doi: 10.1360/N052015-00169