论文

Dmrt1 基因在红耳龟温度依赖型性别决定中的功能研究

张一[†], 张海艳[†], 张辉皇, 江航, 王银瑜, 俞罗浩, 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: 2016-03-31; 接受日期: 2016-05-09; 网络版发表日期: 2016-05-31

浙江省自然科学基金(批准号: LY14C190008)和国家级大学生创新创业训练计划项目(批准号: 201510876004)资助

摘要 除了基因型性别决定(GSD)外, 温度依赖型性别决定(TSD)是另一种重要的动物性别决定方式, 但其分子机制一直是个谜团. 本文以 TSD 动物红耳龟(*Trachemys scripta*) *Dmrt1* 基因为研究对象, 分析了 *Dmrt1* 蛋白在不同发育时期胚胎性腺中的表达情况和细胞定位; 通过慢病毒-shRNA 干扰系统对 *Dmrt1* 在 TSD 中的作用进行了功能验证. 免疫荧光染色结果显示, *Dmrt1* 蛋白在性腺分化之前的第 15 期产雄温度(male-producing temperature, MPT)性腺中开始表达, 第 19 期后急剧增加, 定位于 Sertoli 前体细胞的细胞核上, 在整个产雌温度(female-producing temperature, FPT)性腺发育过程中几乎检测不到信号. RNA 干扰实验表明, MPT 胚胎经过 *Dmrt1*-shRNA 处理后, 95.34%发育成雌性或具有卵睾丸的间性(对照组 MPT 胚胎 100%发育成雄性个体, 对照组 FPT 胚胎 100%发育成雌性个体). *Dmrt1* 基因敲低后, MPT 胚胎性腺外形和组织结构明显雌性化, 生殖细胞从髓质区向皮质区转移, 雄性特异性蛋白 Sox9 表达显著降低(甚至消失), 而雌性特异性蛋白芳香化酶则开始大量表达, 呈现典型的雄性向雌性逆转现象. 上述研究结果表明, *Dmrt1* 基因在 TSD 中是必需的, 是启动未分化性腺向雄性分化的关键因子, 位于 TSD 分子信号通路上游. 本文首次对 TSD 进行了关键基因的功能分析, 为 TSD 分子机制研究开辟了一条新途径.

关键词 *Dmrt1* 基因, 温度依赖型性别决定, RNA 干扰, 性腺分化, 红耳龟

根据性别决定的主要成因, 性别决定模式主要分为两大类: 基因型性别决定(genetic sex determination, GSD)和环境依赖型性别决定(environmental sex determination, ESD). 其中温度依

赖型性别决定(temperature-dependent sex determination, TSD)是ESD中最典型的性别决定模式, 其主要特点是缺少性染色体, 胚胎孵化温度决定子代的性别^[1]. 红耳龟(*Trachemys scripta*), 俗称巴西龟, 已经

引用格式: 张一, 张海艳, 张辉皇, 等. *Dmrt1* 基因在红耳龟温度依赖型性别决定中的功能研究. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 735–743
Zhang Y, Zhang H Y, Zhang H H, et al. Functional analysis of *Dmrt1* in temperature dependent sex determination in *Trachemys scripta*. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 735–743, doi: 10.1360/N052016-00168

被证实其性别完全取决于孵化温度, 较低的孵化温度(26℃)产生 100% 的雄性子代, 较高的温度(32℃)则产生全雌子代, 是 TSD 机制研究的一个理想动物模型。性别决定是一个复杂的、多基因精确调控的过程。至今为止, TSD 的分子机制已经得到高度的解析。哺乳动物 TSD 的分子机制研究表明, 位于 Y 染色体的 *Sry* 基因是性别决定的主控基因, 启动 *Sox9*, *Sfl*, *Wtl*, *Mis* 和 *Dmrt1* 等性别相关基因参与的级联信号通路, 最后决定性器官的分化发育^[2,3]。TSD 的分子机制研究始于 20 世纪 90 年代中期, 但由于基因敲除和转基因等技术手段难以在 TSD 动物上实现, TSD 具体的分子机制目前尚不清楚, 相关研究都处于起步探索阶段。最近有研究发现, *Dmrt1*, *Sox9*, *Mis* 等哺乳动物性腺分化调控基因在红耳龟等 TSD 动物中同样存在, 并且这些基因的 mRNA 表达量在产雄温度(male-producing temperature, MPT)和产雌温度(female-producing temperature, FPT)的性腺中呈现明显的差异性^[4], 这说明这些基因在 TSD 体系中可能仍然发挥重要调控作用。

在参与性别决定和性腺分化的关键基因中, *Dmrt1* 基因是目前为止已知的唯一在动物门间保守的基因, 已在哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类到鱼类的各个进化地位的物种中都发现和克隆了该基因^[5-9]。在非哺乳类脊椎动物中, *Dmrt1* 是雄性性别决定级联中最上游的关键基因, 它与 *Sry* 基因相似, 在雄性胚胎中专一性表达, 其缺失会导致性反转现象^[6,7]。Smith 等人^[6]发现, 鸡(*Gallus domestica*)的 *Dmrt1* 基因位于 Z 染色体上, 将雄性(ZZ)个体中的 *Dmrt1* 基因敲低后, 导致雌性化的左侧卵巢的出现以及 *Foxl2* 和 *Cyp19a1* 等雌性基因的上调, 说明 *Dmrt1* 在鸡雄性性别分化中是必需的。Yoshimoto 等人^[10]在光滑爪蟾(*Xenopus laevis*)的卵巢中发现 W 染色体上存在一个特殊的 *Dmrt1* 拷贝(命名为 *Dmw* 基因), 将 *Dmw* 导入雄性(ZZ)个体后, ZZ 个体性腺呈现卵巢的结构特征, 表明 *Dmw* 对光滑爪蟾性别决定和卵巢发育起到了主导作用。在 TSD 龟鳖类中, *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, 在雄性生殖腺的表达明显高于雌性, 说明 *Dmrt1* 很可能在 TSD 动物的性别分化中起调控作用。目前, 温度对 *Dmrt1* 基因表达的调控方式, 以及 *Dmrt1* 在 TSD 分子信号级联通路上的角色定位, 国内外尚未

见研究报道。本文以红耳龟为 TSD 动物模型, 采用慢病毒载体介导的 RNA 干扰技术, 分析 *Dmrt1* 基因在 TSD 中的具体功能, 为 TSD 分子机制的解析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 红耳龟受精卵孵化

红耳龟受精卵采自湖南汉寿, 采集时间控制在产卵后 12 h 之内, 采用恒温恒湿孵化系统进行孵化。将采集的龟卵埋入蛭石中, 置于孵化盘上, 盖上海绵放入孵化箱孵化, 两个孵化箱温度设置为 26℃, 另一个温度设置为 32℃, 湿度控制在 75%~85%。孵化 5~6 天后, 弃去此时还没有明显受精斑的龟卵, 调整动物极, 使其向上发育。一共设置 3 个孵化箱, 分 3 组, 分别为阴性空白对照组、*Dmrt1* 干扰组和阳性空白对照组, 每组设 450 枚红耳龟卵。孵化过程中, 按照红耳龟胚胎发育图谱收集不同发育时期的胚胎, 用于性腺分离提取。

1.2 慢病毒-*Dmrt1*-shRNA 干扰载体的构建及龟胚感染

根据本实验室前期已克隆获得的红耳龟 *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特异性 shRNA 序列, 构建 *Dmrt1* 慢病毒干扰载体(LV-*Dmrt1*-shRNA-GFP)。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 U/mL, 上海吉玛), 该病毒载体携带绿色荧光蛋白 GFP 编码序列作为报告基因。*Dmrt1*-shRNA 寡核苷酸序列为 5'-GGTGGCAGCTCCTGTTTATTG-3'。红耳龟受精卵在以上恒温恒湿环境下孵化至第 14 期时向胚胎注入 10 μ L 慢病毒液(10^9 U/mL)。实验组分别为 26℃ 的 LV-*Dmrt1*-shRNA 病毒液和空载体病毒液及 32℃ 空载体病毒液(LV-NC-shRNA), 注射完毕后置于相同环境下继续孵化, 收集 15~25 期胚胎用于性腺提取, 至孵化出壳。

1.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

按 TRIzol 试剂盒(Invitrogen, 美国)方法, 从红耳龟不同发育时期胚胎性腺中提取 RNA, 用 Recombinant DNase I (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 *Gapdh* 作为内参基因, 所用引物序列如下: *Gapdh*(F: 5'-GGCTTTCCGTGTTCCAACCTC-3', R: 5'-GACAACCTGGTCTCCGTGTATC-3'); *Dmrt1*(F: 5'-ACTACCCTGCTGCCTCCTACCT-3', R: 5'-CTCC-TTGCTGCTTTCATTGCT-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. 在体视显微镜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, 厚度为 5~6 μ m. 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将切片放入 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% 正常驴血清, 3% 牛血清白蛋白, 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, USA)、兔抗 *Sox9*(1:500, Millipore)、兔抗 *Vasa*(1:50, Abcam, UK)、兔抗 GFP(1:250, Abcam)、鼠抗 γ H2AX(1:500, Abcam)和鼠抗 CTNNB1(1:250, Sigma, USA), 4 $^{\circ}$ C 过夜. 用磷酸盐 Triton X-100 缓冲液(PBST)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 DAPI(286 nmol/L, Sigma)稀释液, 室温避光染色 5 min, PBST 清洗 5 min, 重复 3 次. 加抗荧光淬灭液封片, 于共聚焦荧光显微镜(Nikon, A1 Plus)下观察拍照.

2 结果

2.1 *Dmrt1* 蛋白在胚胎性腺中的表达模式

为了研究 *Dmrt1* 在温度依赖型性别决定中的作用, 本研究首先通过免疫荧光染色分析了 *Dmrt1* 蛋白在产雄温度(MPT)和产雌温度(FPT)下不同发育时期胚胎性腺中表达差异和细胞定位. β -连锁蛋白(CTNNB1)是一种细胞黏附蛋白, 与细胞膜上 cadherin 蛋白结合, 参与细胞的黏附作用. 本文以 CTNNB1 免疫荧光染色来辅助显示性腺结构. 如图 1 所示, 在性腺分化之前的第 15 期 MPT 性腺中, *Dmrt1* 蛋白开始表达, 定位在体细胞核中, 生殖细胞中未见表达. 第 19 期时, MPT 性腺中的 *Dmrt1* 蛋白表达量显著增加, FPT 性腺中未见表达. 至第 21 期时, 性腺分化已经开始, MPT 性腺皮质区退化, 髓质区发育, 原始性索形成, 而 FPT 性腺皮质区发育, 髓质区退化, 大量生殖细胞分布在皮质区. 此时, *Dmrt1* 蛋白大量定位于 MPT 性腺 Sertoli 前体细胞细胞核中, 围绕原始生殖细胞. 随着胚胎进一步发育, MPT 性腺皮质区进一步退化形成单细胞层, 髓质区继续发育形成性索, *Dmrt1* 蛋白大量表达, 继续定位于 Sertoli 前体细胞上. 而 FPT 性腺皮质进一步发育, 髓质退化, 未见 *Dmrt1* 蛋白表达(图 1).

2.2 *Dmrt1* 基因在 TSD 中的功能分析

在红耳龟胚胎发育至第 14 期时, 利用龟胚注射技术将 LV-*Dmrt1*-shRNA-GFP 干扰系统引入胚胎, 通过性腺表型变化观察及雌雄特异性蛋白的表达变化分析, 对 *Dmrt1* 基因在温度依赖型性别决定(TSD)中的作用进行功能验证. 为了验证此慢病毒载体系统能否有效感染红耳龟胚胎, 本研究首先检测了慢病毒处理后的龟胚组织中绿色荧光蛋白(GFP)的表达分布, 以鉴定慢病毒的组织感染程度. 结果显示, 红耳龟胚胎发育至 16 期时, 大部分胚胎均匀呈现强烈的绿色荧光信号(图 2A-A'). 待发育至 25 期时, 发现 80% 以上的胚胎仍可检测到 GFP 信号, 均匀分布于各组织, 包括性腺组织(图 2C 和 D). 性腺切片的 GFP 免疫荧光染色结果则进一步表明, 慢病毒载体系统能在红耳龟胚胎性腺组织中高度表达, 几乎充满整个性腺组织(图 2F 和 G). 而在对照组胚胎中未检测到 GFP 信号(图 2B, E 和 H). 其次, 分析了经过 *Dmrt1*-

图1 红耳龟 *Dmrt1* 蛋白在不同发育时期 MPT 和 FPT 胚胎性腺中的表达模式

15~25 期红耳龟胚胎性腺经过切片, 进行 *Dmrt1*&CTNNB1 免疫荧光双标染色. pre-sc: sertoli 前体细胞; pgc: 原始生殖细胞. 标尺: 50 μ m

图2 经过 *Dmrt1*-RNAi 处理后的 MPT 胚胎性腺中 *Dmrt1* 蛋白的表达变化

A 和 A': 经过慢病毒系统侵染后, 第 16 期红耳龟 MPT 胚胎的 GFP 表达分布, A 为明场状态, A' 为荧光状态; B: 未转染慢病毒载体的 16 期胚胎(阴性对照), 标尺: 1 mm; C 和 D: 经过慢病毒表达系统侵染后, 第 25 期胚胎性腺-中肾复合体中的 GFP 蛋白的表达分布. Gd: 性腺; Ms: 中肾; E: 未转染慢病毒载体的 25 期胚胎性腺(阴性对照), 标尺: 1 mm; F 和 G: 经过 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰系统侵染后, 25 期 MPT 胚胎性腺切片中的 GFP 蛋白表达分布情况; H: GFP 蛋白免疫组化阴性对照, 标尺: 50 μ m; I: 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 MPT 胚胎性腺中 *Dmrt1* mRNA 的表达变化; J: 经 RNA 干扰后, 免疫荧光染色检测 25 期胚胎性腺中 *Dmrt1* 蛋白的表达分布, 标尺: 50 μ m

RNAi 处理后 MPT 性腺中 *Dmrt1* 的表达变化. 实时荧光定量 PCR 结果显示, 在对照组 MPT 胚胎中 *Dmrt1* 基因在第 16 期已出现表达, 19 期表达急剧增加, 25

期达到表达高峰; 而经过 LV-*Dmrt1*-shRNA 干扰处理后, MPT 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 76.45%(图 2I). 免疫荧光染色结果显示, 经过 *Dmrt1*-RNAi 处理后, MPT 胚胎性腺中 *Dmrt1* 蛋白表达量急剧降低, 甚至几乎检测不到其表达(图 2J).

为了验证 *Dmrt1* 基因在 TSD 中的功能, 首先通过组织形态学方法对 *Dmrt1* 敲低后的 MPT 胚胎性腺进行性逆转分析. 红耳龟胚胎发育至第 25 期, 对照组 MPT 胚胎性腺(雄性)短且粗圆(图 3A), 对照组 FPT 胚胎性腺(雌性)细长扁平(图 3D). *Dmrt1* 敲低后的 MPT 胚胎性腺明显变长且呈扁平状, 与雌性性腺类似, 甚至出现输卵管, 向雌性逆转(图 3B 和 C). 同时, 性腺切片 H&E 染色显示, 对照组 MPT 胚胎性腺的皮质区已退化为单细胞层, 髓质区高度发育形成原始性索, 生殖细胞位于其中(图 3E 和 E'); 对照组 FPT 胚胎性腺皮质区高度发育, 大量生殖细胞分布于皮质区, 髓质区明显退化(图 3H 和 H'). 大部分 *Dmrt1* 敲低后的 MPT 性腺内部结构发生明显的变化, 皮质

区开始发育并含有大量生殖细胞, 髓质区退化, 完全性逆转(图 3G 和 G'); 但有一部分性腺的髓质区并未退化, 仍存在原始性索, 性逆转不彻底(图 3F 和 F'), 成为卵睾丸. 生殖细胞特异性 Vasa 蛋白免疫组化染色表明, *Dmrt1* 敲低后, MPT 胚胎性腺中的生殖细胞从髓质区迁往皮质区, 进一步证明了性逆转的发生(图 3I~L). 数据统计显示, 100%(36/36)对照组 MPT 胚胎为雄性, 100%(37/37)对照组 FPT 胚胎为雌性, 而 *Dmrt1* 敲低后的 MPT 胚胎中, 95.34%(41/43)逆转为雌性或具有卵睾丸的间性, 性逆转率极高(表 1).

为了进一步验证 *Dmrt1* 基因敲低后性逆转现象的发生, 本文还分析了雄性特异性蛋白 Sox9 和雌性胚胎期特异性蛋白 γ H2AX、芳香化酶蛋白(aromatase, Arom)的表达变化. 免疫组化结果显示, 在对照组 MPT 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, 未见 γ H2AX 蛋白表达(图 4A 和 A'), 而在对照组 FPT 性腺中, γ H2AX

图 3 *Dmrt1* 敲低后 MPT 胚胎性腺的形态组织学变化

A~D: 体视显微镜下观察 25 期对照组 MPT 性腺(A)、*Dmrt1* 敲低后的 MPT 性腺(B 和 C)和对照组 FPT 性腺(D)的外观形态. Gd: 性腺; Ovi: 输卵管; 标尺: 1 mm; E~L: 25 期对照组 MPT 性腺、*Dmrt1* 敲低后 MPT 性腺和对照组 FPT 性腺切片的 H&E 染色(E~H)和 Vasa 免疫荧光染色(I~L). pre-sc: Sertoli 前体细胞; pgc: 原始生殖细胞; Cor: 皮质区; Med: 髓质区. 标尺: 50 μ m

表 1 *Dmrt1* 基因敲低后的 MPT 胚胎雌雄比例及逆转率^{a)}

孵化温度	处理组	总胚胎数	睾丸	卵巢	卵睾丸	逆转率
MPT(26℃)	LV-NC-shRNA	36	36	0	0	0/36
MPT(26℃)	LV- <i>Dmrt1</i> -shRNA	43	2	33	8	(33+8)/43
FPT(32℃)	LV-NC-shRNA	37	0	37	0	0/37

a) 逆转率: (卵巢数+卵睾丸数)/总胚胎数. 通过性腺形态及组织学观察判断

图 4 *Dmrt1* 敲低后 25 期 MPT 性腺中 Sox9 和芳香化酶蛋白的表达变化

经过 *Dmrt1*-RNAi 处理后, MPT 胚胎性腺的 Sox9 和 γ H2AX 蛋白的免疫双标染色(A~D)及芳香化酶蛋白&CTNNB1 免疫荧光染色(E~H), AROM: 芳香化酶. 标尺: 50 μ m

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 4D 和 D'). 在 *Dmrt1* 敲低后的 MPT 胚胎性腺中, Sox9 蛋白表达量骤减,在性逆转彻底的性腺中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 4B 和 C). 芳香化酶蛋白免疫组化分析表明,在对照组中,芳香化酶在 FPT 性腺髓质区大量特异性表达,而 MPT 胚胎经过 *Dmrt1*-RNAi 处理后,芳香化酶则开始被诱导表达,位于髓质区,甚至跟对照组 FPT 性腺中的芳香化酶表达量相当(图 4E~H). 以上结果证明了 *Dmrt1* 基因敲低后, MPT 性腺确实出现了性逆转现象,同时,敲低 *Dmrt1* 基因会抑制 Sox9 基因表达,促进芳香化酶 aromatase 的表达.

3 讨论

TSD 是一种重要的性别决定方式,主要存在于蜥蜴(*Pogona vitticeps*)、鳄鱼(*Crocodylus siamensis*)、乌龟(*Tortoise*)等爬行动物中,目前 TSD 机制研究大多集中在相关基因的克隆及 mRNA 表达分析上,研究深度和广度远不及 GSD, TSD 的功能研究更是一片空白,主要原因是缺乏有效基因操控/编辑技术. 近几年,研究人员在 TSD 动物上进行了一些基因功能研究的技术探索. Itzel 等人^[11]通过 RNA 干扰技术使体外培养的太平洋丽龟(*Lepidochelys olivacea*)MPT 性腺中的 Sox9 基因的表达量降低 70%~80%;在红耳龟上, Shoemaker-Daly 等人^[12]则采用电穿孔方法将

GFP: Sox9 表达载体转入体外培养的性腺中, 发现外源性 Sox9 能在 FPT 性腺中大量表达, 并能够维持 96 h 的异位表达效果. 尽管这些研究能够在体外实现短期基因异常表达, 却难以体现目的基因在动物体内的实际表达情况, 无法进行有效的功能验证分析. 本文将慢病毒载体介导的 RNA 干扰(LV-RNAi)系统在特定发育时间点引入红耳龟胚胎, 实现了目的基因在整个胚胎发育过程中的异常表达. 通过该慢病毒载体表达系统, 能使 *Dmrt1* 基因在红耳龟体内胚胎性腺中长期高效沉默(平均干扰率为 76.45%), 说明本研究建立的基于 LV-RNAi 的红耳龟基因功能研究技术非常有效.

TSD 的分子机制的破译主要体现在解释两个科学问题: (i) 温度信号如何传递至生物体内, 激活生物信号(基因), 启动性别分化? (ii) 哪个或哪些基因控制双向分化潜能(未分化)性腺向睾丸或卵巢分化? 系统进化分析研究表明, 在脊椎动物的进化过程中, TSD 和 GSD 两种性别决定方式之间的转换反复高频率地发生^[13~15], 甚至两种方式同时在一些物种中存在^[16~18]. 最新研究发现, 一种澳大利亚蜥蜴(鬃狮蜥(*Pogona vitticeps*), 具有 ZW 性染色体)的性别决定方式甚至能在一个世代周期内快速从 GSD 转变成 TSD^[17,19]. 相关研究表明, *Dmrt1*, *Amh*, *Sox9*, *Foxl2* 等 GSD 动物性腺分化调控基因在红耳龟性腺中同样存在, 且呈现雌雄二态性表达分布^[4]. 这说明 TSD 体系很可能有一个类似 GSD 体系的分子信号级联通路, 该级联通路最上游则是温度. 因此寻找 TSD 和 GSD 体系共同拥有的保守性基因, 研究这些基因在 TSD 中的具体功能, 成为 TSD 分子机理研究的一个突破口. *Dmrt1* 基因已被确认是一个高度保守的雄性发育调控因子, 在一些非哺乳类脊椎动物中, 它是早期雄性性别决定的启动因子(主控基因), 如鸡 *Dmrt1*^[6]和青鳉(*Oryzias latipes*)*Dmy*^[7]. 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, 主要参与后期睾丸的分化和 Sertoli 细胞的功能维持^[5,20,21]. 本研究免疫组化结果表明, 在红耳龟性腺分化之前, *Dmrt1* 蛋白在 MPT 胚胎性腺中高度

特异性表达, 定位于 Sertoli 细胞, FPT 性腺几乎不表达. 这与 Kettlewell 等人^[22]在 mRNA 水平的表达研究结果相一致, 他们还发现, 当胚胎孵化温度从 FPT 向 MPT 转换后, 性腺中 *Dmrt1* 的表达量则急剧上调. Murdock 和 Wibbels^[23]研究发现, *Dmrt1* 的在红耳龟 MPT 性腺中的特异性表达早于 *Sox9* 和 *Amh*, 而且向 MPT 红耳龟胚胎注射雌激素能显著抑制 *Dmrt1* 的表达. 以上研究结果表明, *Dmrt1* 在启动二态性性腺向睾丸分化过程中可能起重要的调控作用, 处于 TSD 分子信号级联通路的上游位置. 为了确定 *Dmrt1* 在 TSD 中的具体作用, 本文通过慢病毒介导的 RNA 干扰技术对 *Dmrt1* 基因进行功能验证, 发现经过 *Dmrt1* 敲低后的 MPT 性腺向雌性方向逆转, 出现输卵管, *Sox9* 雄性因子表达下调, 芳香化酶等雌性蛋白表达上升, 揭示了 *Dmrt1* 在红耳龟睾丸分化过程中是必需的, 在 TSD 的雄性分化启动中起重要的调控作用. 而在同属龟鳖目的中华鳖(GSD 动物)上, *Dmrt1* 基因在早期雄性性别形成过程中是必需的, 且它在雌性个体中的异位表达能够启动雄性分化, 作用于 *Sox9*, *Amh* 等基因的上游, 是雄性性别决定的关键因子^[24,25]. 由以上研究结果推测, 尽管脊椎动物性别决定的方式多种多样, 但像 *Dmrt1* 这类性别分化基础调控因子却高度保守.

本文建立了一种有效的、基于慢病毒载体介导的 RNA 干扰系统的 TSD 基因功能研究技术; 发现了 *Dmrt1* 蛋白在红耳龟性腺分化之前和性腺分化过程中的表达规律; 首次对 TSD 进行了基因功能分析, 确定了 *Dmrt1* 为启动未分化性腺向睾丸发育的关键调控因子, 作用于 *Sox9* 之前, 处于 TSD 分子信号通路上游. 为了进一步阐明 TSD 的分子机制, 下一步研究重点为温度如何调控 *Dmrt1* 表达? 继续筛选参与红耳龟早期性别决定过程中的关键因子, 尤其是早于 *Dmrt1* 呈现性别差异表达的一些基因, 研究这些关键因子是否参与温度对 *Dmrt1* 的表达调控及其具体介导方式, 以期解释温度是如何将信号传入胚胎, 激活 *Dmrt1* 表达, 最后决定性腺分化方向.

致谢 感谢孙伟、蔡晗、包海声在红耳龟卵孵化过程中的帮助和对论文撰写提出的宝贵意见.

参考文献

- 1 Warner D A, Shine R. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature*, 2008, 451: 566–568
- 2 Pipek R P. Genetic mechanisms underlying male sex determination in mammals. *J Appl Genet* 2009, 50: 347–360
- 3 Shoemaker C M, Crews D. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature dependent sex determination in reptiles. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, 20: 293–303
- 4 Shoemaker C, Ramsey M, Queen J, et al. Expression of *Sox9*, *Mis*, and *Dmrt1* in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Dev Dyn*, 2007, 236: 1055–1063
- 5 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
- 6 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
- 7 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
- 8 Shibata K, Takase M, Nakamura M. The *DMRT1* expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 127: 232–241
- 9 Murdock C, Wibbels T. Expression of *Dmrt1* in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101: 302–308
- 10 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
- 11 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
- 12 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
- 13 Sarre S D, Ezaz T, Georges A. Transitions between sex-determining systems in reptiles and amphibians. *Annu Rev Genom Hum Genet*, 2011, 12: 391–406
- 14 Bull J J. Evolution of environmental sex determination from genotypic sex determination. *Heredity*, 1981, 47: 173–184
- 15 Bulmer M G, Bull J J. Models of polygenic sex determination and sex-ratio control. *Evolution*, 1982, 36: 13–26
- 16 Radder R S, Quinn A E, Georges A, et al. Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biol Lett*, 2008, 4: 176–178
- 17 Quinn A E, Georges A, Sarre S D, et al. Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science*, 2011, 316: 411
- 18 Chen S, Zhang G, Shao C, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nat Genet*, 2014, 6: 253–260
- 19 Iley C E, O'Meally D, Sarre S D, et al. Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature*, 2015, 3: 79–82
- 20 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
- 21 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
- 22 Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis*, 2000, 26: 174–178
- 23 Murdock C, Wibbels T. *Dmrt1* expression in response to estrogen treatment in a reptile with temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2006, 306: 134–139
- 24 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
- 25 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: 881–889

Functional Analysis of *Dmrt1* in Temperature Dependent Sex Determination in *Trachemys scripta*

ZHANG Yi, ZHANG HaiYan, ZHANG HuiHuang, JIANG Hang, WANG YinYu, YU LuoHao, QIAN GuoYing & GE ChuTian

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

Besides genetic sex determination (GSD), temperature-dependent sex determination (TSD) is another major model of sex determination, however, the molecular mechanism underlying TSD has been a long-standing mystery. In this study, protein expression of *Dmrt1* and its cellular localization in embryonic gonads of different developmental stages of both sexes in *Trachemys scripta* were firstly examined, subsequently functional analysis of *Dmrt1* in TSD system was performed via lentivirus (LV)-mediated RNA interference technology. Immunofluorescence results showed that *Dmrt1* protein expression initiated in gonads of stage 15 at male-producing temperature (MPT), prior to gonadal differentiation, and was dramatically elevated at stage 19, however, no *Dmrt1* signals were detected in gonads at female-producing temperature (FPT). During the embryonic development, *Dmrt1* protein localized in the nuclei of pre-sertoli cell in MPT gonads. Loss of function analyses revealed that 95.34% of embryos at MPT developed into female or intersex individuals after LV-*Dmrt1*-shRNA treatment, whereas in control groups, all male or female offspring were generated at MPT or FPT, respectively. MPT embryos with *Dmrt1* knockdown exhibited male to female sex reversal, characterized by obvious feminization of gonads, female-styled germ cell distribution, decline in the testicular marker Sox9, and remarkable upregulation of ovarian marker aromatase. These data strongly provided for the first evidence that *Dmrt1* gene is essential for differentiation initiation of bipotential gonads into testis in *Trachemys scripta*, indicating the upstream role of *Dmrt1* in TSD system.

Dmrt1* gene, temperature-dependent sex determination (TSD), RNA interference, gonadal differentiation, *Trachemys scripta

doi: 10.1360/N052016-00168