*Cyp19a1*基因在中华鳖早期卵巢分化中的功能研究

包海声^{1,2}, 蔡晗¹, 韩伟¹, 张海艳¹, 孙伟¹, 葛楚天^{1*}, 钱国英^{1,2*}

1. 浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

* 联系人, E-mail: cgc@zww.edu.cn; qiangy@zww.edu.cn

收稿日期: 2016-03-13; 接受日期: 2017-03-30; 网络版发表日期: 2017-05-24

浙江省自然科学基金(批准号: LY14C190008)、浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(批准号: 2016C02055-4-1)和浙江省重中之重学科“生物工程”开发基金(批准号: ZS2016007)资助

摘要 芳香化酶是雌激素合成的关键酶, 在非哺乳类脊椎动物的早期雌性性腺分化中起重要的调控作用. 本研究首先分析了中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)芳香化酶编码基因*Cyp19a1*在不同组织及不同发育时期雌雄胚胎性腺中的表达情况; 其次, 利用芳香化酶抑制剂(AI)和慢病毒RNA干扰及过表达技术, 进行*Cyp19a1*基因的功能验证研究. 研究表明, *Cyp19a1*基因在中华鳖成体卵巢组织中高度特异性表达, 睾丸和心、肝、脾、肺、肾、肌、肠中未见表达. 同时发现, *Cyp19a1*基因在第18期就呈现雌性性腺特异性表达, 早于性腺分化启动时间(第19期). 功能缺失实验表明, 经过AI及*Cyp19a1*-shRNA处理后, ZW胚胎性腺皮质区退化, 髓质区高度发育, 形成原始性索结构, 呈现雌性向雄性性逆转现象; 同时雌性标记基因*Foxl2*的表达量下调, 雄性标记基因*Amh*的表达量则显著上调. 功能获得实验则表明, *Cyp19a1*过表达后的ZZ型性腺皮质区高度发育, 髓质区退化, 形成空洞结构, 呈典型雌性特征, 同时*Foxl2*基因的表达量上升, *Amh*的表达量显著降低. 综上所述, 本文证明了*Cyp19a1*是中华鳖早期卵巢分化的关键调控因子, 为中华鳖性别分化机制研究奠定了基础.

关键词 *Cyp19a1*, 性腺分化, 雌性, 中华鳖

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)是我国传统名特养殖品种, 隶属于爬行纲、龟鳖目. 雄鳖以生长速度快、抗逆性强、裙边宽厚等优质性状, 较雌鳖更受市场欢迎, 同比单价高30%~50%. 因此, 提高中华鳖养殖生产中的雄性比例, 对中华鳖养殖产业的发展有着重要的意义. 目前, 研究已确认中华鳖性别决定方式为基因型性别决定(genetic sex determination, GSD)^[1,2], 但其性别决定和性腺分化的分子机制目前尚未研究清楚, 已成为阻碍中华鳖单性苗种培育的关键因素. 因此, 挖

掘参与性别决定和性腺分化的关键基因并阐明其生物学功能是解析中华鳖性别决定分子机制和实现高(或全)雄养殖的必要前提.

在大部分脊椎动物中, 芳香化酶是促使雄性激素生成雌性激素的限制酶, 在维持体内激素水平上扮演重要角色, 更是性别分化时期性腺形成的重要参与者. *Cyp19a1*(cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1)是芳香化酶的编码基因, 作为雌激素合成的关键基因, 其参与调控了鸟类^[3]、鱼类^[4]、两栖类^[5]、爬

引用格式: 包海声, 蔡晗, 韩伟, 等. *Cyp19a1*基因在中华鳖早期卵巢分化中的功能研究. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 640–649

Bao H S, Cai H, Han W, et al. Functional characterization of *Cyp19a1* in female sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis*. *Sci Sin Vitae*, 2017, 47: 640–649, doi: [10.1360/N052017-00051](https://doi.org/10.1360/N052017-00051)

行类^[6]等动物的性别分化过程, 在较低等的非哺乳类脊椎动物中 *Cyp19a1* 基因的缺失甚至可以导致性逆转^[7,8]. 研究表明, 在鸡(*Gallus domesticus*)早期胚胎性腺分化阶段, *Cyp19a1* 呈雌性特异性表达, 且芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitor, AI)可以诱导鸡胚由雌性向雄性逆转, 而 *Cyp19a1* 的过表达使左侧性腺发育增大, 卵巢结构出现, 同时雄性标记基因 *Dmrt1*, *Sox9* 和 *Amh* 的表达受到抑制^[3,9]. 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)上, 对基因型雌鱼进行AI(tamoxifen, 三苯氧胺)处理, 可以诱导性逆转的发生, 并使芳香化酶的表达量显著下调^[10]. 在龟鳖类上, 研究者们发现, 红耳龟(*Trachemys scripta*) *Cyp19a1* 在性腺分化关键时期的雌性性腺中大量特异性表达, 同时转录因子结合位点分析显示, 该基因可能受 *Dmrt1* 和 *Foxl2* 的直接调控^[11,12]. 目前, *Cyp19a1* 在龟鳖类性别分化上的作用研究主要集中在基因克隆和表达分析上, 功能研究尚属空白.

为了阐明 *Cyp19a1* 基因在中华鳖雌性性腺分化通路中的具体功能和调控位置, 本研究首先分析了 *Cyp19a1* 基因在中华鳖不同发育时期胚胎性腺中的表达情况, 发现 *Cyp19a1* 在性腺分化前及分化过程中的雌性性腺中高度特异性表达. 并且通过AI和慢病毒RNA干扰、过表达技术, 在龟鳖类动物上首次进行了 *Cyp19a1* 基因的功能鉴定, 确定了该基因是中华鳖早期卵巢分化的必需关键基因. 本研究为中华鳖性别决定与性腺分化分子机制的解析和中华鳖单性苗种培育技术的研发奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所需中华鳖采自绍兴大畈水产专业合作社, 分别取成年中华鳖睾丸、卵巢、心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉及小肠组织, 于-80℃冰箱保存备用. 中华鳖受精卵采集时间控制在产卵后12h之内, 采用全裸无接触式加湿孵化系统进行孵化, 孵化温度为31℃, 湿度控制在75%~85%. 设置3个孵化箱, 每组500枚, 分别为空白对照组、*Cyp19a1*-RNAi与*Cyp19a1*过表达组. 胚胎发育过程中, 按照中华鳖胚胎发育图谱^[13]收集不同发育时期的胚胎, 分离性腺用于RNA提取, 或分离性腺-中肾复合体用于石蜡切片. 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, 确定染色体型.

1.2 AI处理

中华鳖受精卵在恒温恒湿培养箱孵化至15天时, 在正对胚胎的卵壳位置上滴加10 μL 95%乙醇(对照组)或20 μg/μL的AI(Sigma, 美国); 第二天, 重新滴加相同剂量的药物, 置于相同环境下继续孵化, 孵化至25期收集胚胎性腺用于总RNA提取和组织形态学分析.

1.3 *Cyp19a1*慢病毒干扰载体的构建及鳖胚侵染

根据NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 基因登录号: XM_006135075)获得的中华鳖*Cyp19a1*基因的编码区序列, 由上海吉玛基因公司针对其编码区设计一对特异性shRNA序列, 构建*Cyp19a1*慢病毒干扰载体(LV-*Cyp19a1*-shRNA). 根据第四代慢病毒载体四质粒合成法生产高滴度病毒浓缩液(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)的编码序列作为报告基因. 所用*Cyp19a1*-shRNA寡核苷酸序列为shRNA: 5'-GCAAG-CACCTCTTATTGAAACC-3'. 实验中设空白载体对照组(LV-NC-shRNA). 中华鳖在以上恒温恒湿环境下孵化至15期时, 利用微量进样器向胚胎注入5 μL慢病毒液(10^9 units/mL), 并通过C-DSS230荧光显微镜(Nikon, 日本)鉴定病毒组织感染程度. 注射完毕后置于相同环境下继续孵化, 收集25期胚胎, 分离性腺用于RNA提取, 分离性腺-中肾复合体用于组织形态学分析.

1.4 *Cyp19a1*慢病毒过表达载体的构建及鳖胚侵染

根据已知的*Cyp19a1*基因序列, 选取可读框(open reading frame, ORF)部分, 由上海吉玛基因公司设计制备*Cyp19a1*慢病毒过表达载体(LV-*Cyp19a1*-OE), 设空白载体对照组(LV-empty). 使用上述方法对鳖胚进行处理.

1.5 RNA提取和cDNA合成

按TRIzol试剂盒(Invitrogen, 美国)操作方法, 分别从中华鳖不同成体组织及不同发育时期的胚胎性腺中提取总RNA, 用Recombinant Dnase I (Rnase Free)(TaKaRa, 日本)去除其中的DNA杂质, 采用微量核酸测定仪(Nanodrop 2000, Thermo Scientific, 美国)测定浓度和纯度, 并用1%琼脂糖凝胶电泳检测质量. 使

用Fermentas反转录试剂盒(K1622, Thermo Scientific)合成cDNA, 用于*Cyp19a1*基因mRNA水平表达分析。

1.6 实时荧光定量PCR

根据已知的*Cyp19a1*, *Gapdh*(基因登录号: NM_001286927)、*Foxl2*(基因登录号: XM_006124992)和*Amh*(基因登录号: XM_006128999)基因的cDNA序列设计特异性引物, 以合成的cDNA为模板, 使用SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)配制12.5 μL反应液体体系: SYBR® Premix 6.25 μL, 正向引物0.5 μL, 反向引物0.5 μL, cDNA模板1 μL, 灭菌蒸馏水dH₂O 4.25 μL, 利用ABI 7500 Real-time PCR仪(Applied Biosystems, 美国)按照下列参数进行荧光定量PCR反应: 95℃预变性30s; 95℃变性5s; 58℃退火30s; 40个循环。实验中每个样品设置3个重复及空白对照, 以*Gapdh*作为内参基因, 利用2^{-ΔΔC_t}方法计算*Cyp19a1*等基因在中华鳖组织中的相对表达量。引物列表见表1。

1.7 石蜡切片和苏木素-伊红染色

将刚分离的性腺组织保存于4%多聚甲醛内, 于4℃环境下固定24h后转入50%乙醇, 浸泡2h后转入70%乙醇长期保存。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(80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II)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 μm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)下观察拍照。

1.8 免疫组织化学染色

经二甲苯脱蜡, 由高到低浓度乙醇水分渗透

后, 切片放入0.01 mol/L柠檬酸钠溶液, 95℃抗原修复20min后, 冷却至室温。在封闭液(10%正常驴血清, 3%牛血清白蛋白, 0.1%Triton X-100, 0.01 mol/L PBS)中室温孵育1h, 吸去组织周边多余液体, 分别加兔抗Sox9(1:500, AB5535, Millipore, 美国)和鼠抗CTNNB1(1:250, C7207, Sigma), 4℃过夜。用磷酸盐曲拉通缓冲液(PBST)(0.1%Triton X-100, 0.01 mol/L PBS)清洗10min, 重复3次, 在室温避光环境下, 滴加驴抗兔IgG594(1:500, A21207, Invitrogen)和驴抗鼠IgG488(1:500, A21202, Invitrogen), 孵育1h, 用PBST清洗10min, 重复3次。滴加DAPI(286 nmol/L, Sigma)液室温避光染色5min, 用0.01 mol/L PBS清洗5min, 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 中华鳖*Cyp19a1*的表达分析

本研究首先对*Cyp19a1*基因在中华鳖成体不同组织中的表达进行检测, 半定量PCR及荧光定量PCR结果表明, 中华鳖*Cyp19a1*基因在卵巢中高度表达, 在其他组织(睾丸、心、肝、脾、肺、肾、肌、肠)中微量表达或未见表达(图1)。

同时, 还分析了*Cyp19a1*在不同胚胎发育时期雌雄性腺中的表达情况。荧光定量PCR结果显示, *Cyp19a1*在第18期雌性性腺中开始出现特异性表达, 早于性腺分化启动时间(第19期)。随着胚胎发育, *Cyp19a1*在之后各期雌性性腺中的表达量大幅增加, 而在雄性性腺中的表达量始终维持极低水平, 呈现显著的性别二态性表达分布(图2)。

表1 实验所用引物列表

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>Gapdh</i> -F	GGCTTTCCGTGTTCCAACCTC
<i>Gapdh</i> -R	GACAACCTGGTCCTCCGTGTATC
<i>Cyp19a1</i> -F	TCGTGGCTGTACAAGAAATACGAA
<i>Cyp19a1</i> -R	CCAGTCATATCTCCACGGCTCT
<i>Amh</i> -F	CGGCTACTCCTCCCACACG
<i>Amh</i> -R	CCTGGCTGGAGTATTTGACGG
<i>Foxl2</i> -F	GCTCGAAGGCAGCGTAAGT
<i>Foxl2</i> -R	CCCCTCGTATCAAATCAGACAG

图 1 中华鳖 *Cyp19a1* 基因的组织表达分析
半定量RT-PCR(A)、实时荧光定量PCR(B)检测 *Cyp19a1* 基因在不同成体组织中的mRNA表达水平

图 2 中华鳖 *Cyp19a1* 基因在胚胎性腺中的表达模式
实时荧光定量PCR检测 *Cyp19a1* 基因在第16~21期雌雄胚胎性腺中的mRNA表达情况

2.2 药物介导的 *Cyp19a1* 功能分析

为了阐明芳香化酶基因 *Cyp19a1* 在中华鳖性腺分化中的调控作用, 首先对性腺分化前的鳖卵进行AI处理, 从蛋白酶活性水平进行 *Cyp19a1* 的功能分析. 结果显示, 对照组雄性(ZZ)出壳稚鳖尾巴长且直, 超出裙边; 对照组雌性(ZW)稚鳖尾巴较短且直, 未露出裙边(图3A)^[14]. 经过AI处理后, 稚鳖尾巴呈明显弯曲状, 超出裙边(图3A). 同时, 性腺切片H&E染色显示, 对照组ZW胚胎性腺皮质区(cortex, cor)高度发育, 生殖细胞分布于皮质区, 髓质区(medulla, med)明显退化; 对照组ZZ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雄性性索, 生殖细胞位于其中(图3A); 经

过AI处理的ZW性腺内部结构发生明显的变化, 髓质区发育形成原始性索, 皮质区彻底退化, 呈现雌性向雄性性逆转现象(图3A). 数据统计显示, 对照组中雌雄比约为1:1, 雄性稚鳖占51.0%(99/194), 而AI处理组中, 雄性比例显著增加, 达91.9%(182/198)(表2).

为了验证AI处理后性逆转现象的发生, 本文还分析了睾丸标记基因 *Sox9*, *Amh* 和卵巢分化标记基因 *Foxl2* 的表达变化. 荧光定量PCR结果表明, 经过AI处理后, ZW胚胎性腺中 *Foxl2* 的表达量显著降低, *Amh* 和 *Sox9* 的表达则显著上调(图3B). 免疫组化结果显示, 在对照组雄性(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, 而在对照组雌性(ZW)性腺中未检测到 *Sox9* 蛋白的荧光信号. 经过AI处理后的ZW胚胎性腺中, *Sox9* 蛋白表达显著增加, 大量分布于雄性化的性索中(图3C). 以上结果表明, 经过AI处理后, ZW性腺确实出现了性逆转, 芳香化酶在中华鳖早期雌性性别分化过程中是必需的.

表 2 AI对中华鳖胚胎雌雄比例的影响^{a)}

组别	孵化数	雌性数	雄性数	雄性比例 (%)
1	194	95	99	51.0
2	198	16	182	91.9

a) 组1: 滴加95%乙醇; 组2: 滴加AI

图3 AI处理后的ZW性腺表型分析

A: AI处理后, ZW个体(27期)和性腺内部结构(25期)的组织学观察, 标尺: 整体5mm, 内部50 μ m; B: 实时荧光定量PCR检测*Sox9*, *Amh*和*Foxl2*基因在AI处理后25期ZW胚胎性腺中的表达变化. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; C: 免疫组化染色检测*Sox9*蛋白在AI处理后25期ZW性腺中的表达分布. sc: sertoli细胞; gc: 生殖细胞; pf: 原始卵泡; cor: 皮质区; med: 髓质区. 标尺: 50 μ m

2.3 慢病毒载体介导的*Cyp19a1*功能鉴定

为了进一步验证*Cyp19a1*在中华鳖雌性性腺分化过程中的调控作用, 本课题组还通过慢病毒介导的RNA干扰与过表达技术, 从基因操纵水平进行*Cyp19a1*的功能研究. 首先, 通过检测GFP蛋白的表达对慢病毒表达载体LV-*Cyp19a1*-shRNA/OE的感染效率进行了检测, 在15期注射的胚胎, 发育至16期80%以上胚胎检测到大量的绿色荧光信号, 且充满整个胚胎(图4A和B); 在25期的性腺中肾复合体中, 依然可检测到大量并均匀分布的绿色荧光信号(图4C和D). 荧光定量PCR结果表明, 经过LV-*Cyp19a1*-shRNA处理后, 25期ZW性腺中*Cyp19a1*的表达显著下调; 经过LV-*Cyp19a1*-OE过表达处理后, 25期ZZ性腺中*Cyp19a1*的表达急剧增加(图4E和F). 以上结果表明, 该慢病毒载体系统可以高效稳定地感染中华鳖胚胎, 并显著敲低或过表达*Cyp19a1*.

本研究首先从组织形态学分别对*Cyp19a1*敲低后的ZW性腺和*Cyp19a1*过表达后的ZZ性腺进行表型鉴定分析. 功能缺失实验显示, 27期雌性(ZW)对照组胚胎尾巴短、未露出裙边(图5A), 25期性腺细长, 呈扁平状(图5E); 而*Cyp19a1*敲低后的ZW胚胎尾巴变长且超出裙边(图5B), 性腺则变得粗短, 呈管状(图5F), 出现雌性向雄性性逆转现象. 相反, 功能获得实验显示, 27期

雄性(ZZ)对照组胚胎尾巴长且露出裙边(图5C), 25期性腺粗短呈圆柱形(图5G); 而*Cyp19a1*过表达后的ZZ胚胎尾巴变弯且隐于裙边(图5D), 性腺则变细(甚至比雌性对照组更细), 与雌性性腺外形类似(图5H). 此外, 25期胚胎性腺切片的H&E染色结果表明, 雌性(ZW)对照组性腺髓质区退化, 形成空洞结构, 皮质区高度发育, 出现原始卵泡(图5I); 雄性(ZZ)对照组性腺皮质区退化为单细胞层, 髓质区高度发育, 形成由Sertoli细胞围绕生殖细胞组成的性索结构(图5K). 处理组则显示, *Cyp19a1*敲低后, ZW性腺皮质区出现退化, 未见原始卵泡或生殖细胞, 髓质区高度发育, 出现了雄性性索, 呈现典型的雄性特征, 彻底向雄性逆转(图5J). 相反, 在*Cyp19a1*过表达后的ZZ性腺中, 髓质区退化, 性索消失并出现空洞结构, 皮质区发育, 可见少量生殖细胞, 但未见原始卵泡, 且比对照组雌性性腺皮质区薄, 呈现部分性逆转(图5L).

本研究还分析了*Cyp19a1*敲低与过表达后雄性标记基因*Amh*和雌性标记基因*Foxl2*的表达变化情况. 荧光定量PCR结果表明, *Amh*在对照组雄性(ZZ)性腺中高度表达, 且显著高于对照组雌性(ZW)性腺; *Foxl2*在对照组雌性(ZW)大量表达, ZZ性腺中表达量极低(图6A). 而在*Cyp19a1*敲低后的ZW性腺中, *Amh*表达量显著上

图 4 慢病毒载体*Cyp19a1*-RNAi/OE的有效性鉴定

A和B: 经过慢病毒空载体侵染后, 16期整体胚胎明场(A)和其GFP表达分布(B), 标尺: 1 mm; C: 经过慢病毒载体LV-*Cyp19a1*-OE侵染后, 25期胚胎性腺-中肾复合物中GFP蛋白的表达情况, 标尺: 1 mm; D: 经过慢病毒载体LV-*Cyp19a1*-shRNA侵染后, 25期胚胎性腺-中肾复合物的表达分布。Gd: 性腺, Ms: 中肾, 标尺: 1 mm; E: 实时荧光定量PCR检测经过LV-*Cyp19a1*-shRNA处理后, 25期ZW性腺中*Cyp19a1*基因的mRNA表达情况。***: $P < 0.001$; F: 经过LV-*Cyp19a1*-OE处理后, 25期ZZ性腺中*Cyp19a1*基因的mRNA表达情况。***: $P < 0.001$

图 5 *Cyp19a1*敲低和过表达后的性腺表型观察

A~D: 27期对照组ZW(A)、ZW+*Cyp19a1*-RNAi(B)、对照组ZZ(C)和ZZ+*Cyp19a1*-OE(D)个体的尾巴形态, 标尺: 5 mm; E~H: 体视显微镜下观察第25期对照组ZW(E)、ZW+*Cyp19a1*-RNAi(F)、对照组ZZ(G)和ZZ+*Cyp19a1*-OE(H)个体性腺-中肾复合物的外观形态, Gd: 性腺; Ms: 中肾, 标尺: 1 mm; I~L: H&E染色显示ZW(I), ZW+*Cyp19a1*-RNAi(J), ZZ(K)和ZZ+*Cyp19a1*-OE(L)性腺的内部结构。标尺: 50 μ m

升, *Foxl2*表达量则显著下调。相反, 在*Cyp19a1*过表达后的ZZ性腺中, *Amh*表达降低, *Foxl2*则显著上调(图6B)。同时, 还通过免疫组化检测了*Cyp19a1*敲低和过表达后

25期性腺中雄性因子Sox9蛋白的表达变化。如图7所示, Sox9蛋白在对照组ZZ性腺中表达, 定位于髓质区且主要表达于Sertoli细胞的细胞核中, 在雌性性腺中

图6 *Cyp19a1*敲低和过表达后*Amh*和*Foxl2*的mRNA表达变化

A: 实时荧光定量PCR检测*Cyp19a1*基因敲低后, 第25期ZW性腺中*Amh*和*Foxl2*的mRNA表达变化; B: *Cyp19a1*基因过表达后, 第25期ZZ性腺中*Amh*和*Foxl2*的mRNA表达变化. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

未见表达信号. 在*Cyp19a1*敲低后的ZW性腺中, Sox9蛋白被诱导表达, 主要分布在髓质区. 相反, ZZ性腺经过*Cyp19a1*过表达后, Sox9蛋白表达量急剧下降, 几乎检测不到其表达信号.

以上组织形态学和分子水平的研究结果表明, 敲

低*Cyp19a1*能够导致中华鳖ZW性腺向雄性逆转, 抑制*Foxl2*表达, 促进*Amh*和*Sox9*表达. 关键的功能获得实验则表明, 尽管性逆转并不彻底, 过表达*Cyp19a1*已经能诱导ZZ胚胎向雌性方向分化, 同时上调*Foxl2*表达, 下调*Amh*和*Sox9*表达.

3 讨论

性别决定是一个复杂、多基因调控的过程, 解析其分子机制的关键在于关键调控基因的挖掘和鉴定. 目前已经在哺乳动物、鸟类、两栖类、鱼类上发现和鉴定了一系列参与性别决定和性腺分化的调控基因, 基于有效基因操纵手段的缺乏, 龟鳖类性别分化相关基因的功能鉴定研究较为薄弱. 本课题组前期已在中华鳖上建立了一种慢病毒介导的基因功能研究方法, 成功鉴定了*Dmrt1*和*Amh*为中华鳖雄性分化关键基因^[15,16], 但雌性分化通路上的调控基因尚未筛选鉴定. 本研究通过化学药物抑制剂和慢病毒介导的基因敲低和过表达系统, 对*Cyp19a1*进行功能鉴定分析, 明确了其在中华鳖早期卵巢分化中的调控作用, 为中华鳖性别决定分子机制的解析奠定基础.

图7 *Cyp19a1*敲低和过表达后Sox9蛋白的表达变化

免疫荧光染色显示, Sox9蛋白在25期ZW, ZW+Cyp19a1-RNAi, ZZ和ZZ+Cyp19a1-OE中的表达分布. 标尺: 50μm

本研究首先对中华鳖 *Cyp19a1* 的表达情况进行分析, 发现 *Cyp19a1* 在中华鳖成体卵巢中的表达量显著高于睾丸等其他组织, 且在性腺分化前和分化后的雌性性腺中大量特异性表达, 提示 *Cyp19a1* 可能参与中华鳖早期卵巢分化或功能维持. 这与在鲇鱼 (*Heteropneustes fossilis*)、粗皮蛙 (*Rana rugosa*)、黄鳝 (*Monopterus albus*) 中的研究结果相一致. Chaube 等人^[17]研究发现, 鲇鱼体内芳香化酶存在两种形式且在雌性鲇鱼中大量表达, 卵巢特异性基因 *Cyp19a1a* 大量表达于雌鱼卵巢, *Cyp19a1b* 大量表达于雌鱼脑部. Kato 等人^[18]对粗皮蛙的研究发现, 在蝌蚪发育阶段芳香化酶在卵巢分化时期表达, 且在未成熟卵泡出现时芳香化酶的表达急剧上调, 在注射睾酮后, 雌转雄性逆转性腺中芳香化酶的表达急剧下调. 在对黄鳝的研究中, Zhang 等人^[19]发现, *Cyp19a1a* 在卵巢中大量表达, 显著高于在精巢中的表达, 在雌性向雄性的性转变阶段, *Cyp19a1a* 的表达显著下调. 在龟鳖类上, 张一等人^[20]发现, 芳香化酶在红耳龟雌性胚胎性腺中大量表达, 而在雄性胚胎性腺中未见表达. 本研究还发现了 AI 处理胚胎能导致中华鳖 ZW 胚胎向雄性逆转, 这说明了芳香化酶在中华鳖雌性性腺分化中是必需的. 在其他物种中也得到了相似的研究结果, Ruksana 等人^[21]发现, 在性别分化时期对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 使用 AI 处理, 导致了精巢的发育. Takatsu 等人^[22]对斑马鱼 (*Danio rerio*) 的研究表明, 利用 AI 处理成年斑马鱼, 发生了雌性转变为雄性的性逆转现象. 以上研究表明, *Cyp19a1* 在中华鳖性腺分化前的第 18 期就呈现雌性特异性表达, 而且像其他非哺乳类脊椎动物一样, AI 处理能导致基因型雌性胚胎向雄性个体分化, 表明

了 *Cyp19a1* 在中华鳖早期雌性性别分化过程中发挥重要的调控作用.

为了明确 *Cyp19a1* 在中华鳖雌性性别分化中的调控作用, 重点对 *Cyp19a1* 进行了功能缺失和获得实验研究, 发现了 *Cyp19a1* 敲低后的 ZW 性腺组织形态明显雄性化, 雄性基因 *Amh* 和 *Sox9* 的表达上调, 雌性基因 *Foxl2* 的表达下调; *Cyp19a1* 过表达后的 ZZ 性腺组织形态明显雌性化, *Amh* 和 *Sox9* 的表达下调, *Foxl2* 的表达上调. 该研究结果必要且充分地证明了 *Cyp19a1* 在中华鳖雌性性腺分化中是必需的, 且能单独启动 ZZ 性腺向卵巢分化. Lambeth 等人^[9]发现, 在鸡胚中过表达 *Cyp19a1*, 能促进基因型雄性 (ZZ) 个体的卵巢发育, 导致雄性向雌性性逆转. 而利用基因编辑技术对斑马鱼卵进行 *Cyp19a1* 敲除, 则可培育出了全雄子代, 说明 *Cyp19a1* 亦是斑马鱼雌性性腺分化的关键调控因子^[23]. 以上研究结果表明, 非哺乳类脊椎动物之间, *Cyp19a1* 在早期卵巢分化中的调控作用可能高度保守.

综上所述, 本文通过基因表达分析和功能验证研究发现, *Cyp19a1* 在中华鳖性腺分化前呈现雌性特异性表达, AI 处理能诱导 ZW 性腺向睾丸分化; *Cyp19a1* 敲低导致了 ZW 性腺的雄性化, 而 *Cyp19a1* 过表达则能启动 ZZ 性腺向雌性发育. 本研究结果证明, *Cyp19a1* 是中华鳖早期卵巢分化必需的关键调控因子, 在雌性分化通路启动过程中起重要调控作用. 本研究不仅为中华鳖性别分化机制研究奠定了基础, 而且还建立了一种以 AI 为诱导剂的胚胎期雄性诱导方法, 同时也为中华鳖全雄苗种培育提供了一个新策略, 即通过过表达 *Cyp19a1* 获得 ZZ 型雌性个体, ZZ 假雌与 ZZ 雄性个体进行交配产生全雄子代.

参考文献

- 1 Kawai A, Nishida-Umehara C, Ishijima J, et al. Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 117: 92–102
- 2 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
- 3 Elbrecht A, Smith R G. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*, 1992, 255: 467–470
- 4 Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, et al. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Reprod Dev*, 2000, 56: 1–5
- 5 Sakata N, Tamori Y, Wakahara M. P450 aromatase expression in the temperature-sensitive sexual differentiation of salamander (*Hynobius retardatus*) gonads. *Int J Dev Biol*, 2005, 49: 417–425
- 6 Crews D, Bergeron J M. Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with tempera-

- ture-dependent sex determination. *J Endocrinol*, 1994, 143: 279–289
- 7 Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*, 1994, 15: 342–355
- 8 Ramsey M, Shoemaker C, Crews D. Gonadal expression of *Sfl* and aromatase during sex determination in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*), a reptile with temperature-dependent sex determination. *Differentiation*, 2007, 75: 978–991
- 9 Lambeth L S, Cummins D M, Doran T J, et al. Overexpression of aromatase alone is sufficient for ovarian development in genetically male chicken embryos. *PLoS ONE*, 2013, 8: e68362
- 10 Kitano T, Yoshinaga N, Shiraishi E, et al. Tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and müllerian inhibiting substance mRNA expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol Reprod Dev*, 2007, 74: 1171–1177
- 11 Matsumoto Y, Buemio A, Chu R, et al. Epigenetic control of gonadal aromatase (*cyp19a1*) in temperature-dependent sex determination of red-eared slider turtles. *PLoS ONE*, 2013, 8: e63599
- 12 Matsumoto Y, Hannigan B, Crews D. Temperature shift alters DNA methylation and histone modification patterns in gonadal aromatase (*cyp19a1*) gene in species with temperature-dependent sex determination. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0167362
- 13 Tokita M, Kuratani S. Normal embryonic stages of the Chinese soft shelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoologicalence*, 2001, 18: 705–715
- 14 朱道玉. 稚鳖的性别鉴定. 河北大学学报(自然科学版), 2007, 27: 76–78
- 15 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
- 16 蔡晗, 孙伟, 刘豪彬, 等. 中华鳖 *Amh* 基因的克隆、表达及在雄性分化中的功能初探. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1423–1433
- 17 Chaube R, Rawat A, Joy K P. Molecular cloning and characterization of brain and ovarian cytochrome P450 aromatase genes in the catfish *Heteropneustes fossilis*: sex, tissue and seasonal variation in, and effects of gonadotropin on gene expression. *Gen Comp Endocrinol*, 2015, 221: 120–133
- 18 Kato T, Matsui K, Takase M, et al. Expression of P450 aromatase protein in developing and in sex-reversed gonads of the XX/XY type of the frog *Rana rugosa*. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 137: 227–236
- 19 Zhang Y, Zhang W, Yang H, et al. Two cytochrome P450 aromatase genes in the hermaphrodite ricefield eel *Monopterus albus*: mRNA expression during ovarian development and sex change. *J Endocrinol*, 2008, 199: 317–331
- 20 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
- 21 Ruksana S, Pandit N P, Nakamura M. Efficacy of exemestane, a new generation of aromatase inhibitor, on sex differentiation in a gonochoristic fish. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol*, 2010, 152: 69–74
- 22 Takatsu K, Miyaoku K, Roy S R, et al. Induction of female-to-male sex change in adult zebrafish by aromatase inhibitor treatment. *Sci Rep*, 2013, 3: 3400
- 23 Lau E S W, Zhang Z, Qin M, et al. Knockout of zebrafish ovarian aromatase gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 leads to all-male offspring due to failed ovarian differentiation. *Sci Rep*, 2016, 6: 37357

Functional characterization of *Cyp19a1* in female sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis*

BAO HaiSheng^{1,2}, CAI Han¹, HAN Wei¹, ZHANG HaiYan¹, SUN Wei¹, GE ChuTian¹ & QIAN GuoYing^{1,2}

¹ College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

² College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Aromatase is the key enzyme for estrogen synthesis, and functions as a key regulator in early female sexual differentiation in non-mammalian vertebrates. In this study, the expression pattern of *Cyp19a1* was examined in tissues and its functional role in ovarian differentiation was investigated through lentivirus-mediated RNA interference and over-expression systems. Results showed that *Cyp19a1* was robustly expressed in adult ovary, and was not or weakly detected in testis, heart, liver, spleen, lung, kidney, muscle and intestine. Moreover, *Cyp19a1* exhibited female sexual dimorphic expression pattern in embryonic gonads early at stage 18, preceding the onset time of gonadal differentiation (stage 19). Loss-of-function analysis revealed that ZW embryos with AI treatment or *Cyp19a1* knockdown exhibited female to male sex reversal, characterized by obviously masculinized gonads with well-organized testis cord structure in the medulla and a degenerated cortex, an upregulation of testicular marker *Sox9* and *Amh*, and a decline in ovarian marker *Foxl2*. Gain-of-function analysis showed that ZZ gonads overexpressing *Cyp19a1* were feminized, determined by a thickened outer cortex with a number of germ cells and a vacuolated medulla, as well as upregulation of *Foxl2* and downregulation of *Sox9* and *Amh*. In summary, *Cyp19a1* is both necessary and sufficient to initiate ovarian development, thereby functioning as a key regulator of female sexual differentiation. This study provides a foundation for understanding the mechanism of sex determination in *Pelodiscus sinensis*.

Cyp19a1*, gonadal differentiation, female, *Pelodiscus sinensis

doi: [10.1360/N052017-00051](https://doi.org/10.1360/N052017-00051)