DOI: 10.11964/jfc.20230914168

sox9 基因在中华鳖雄性性腺分化中的功能

梁 肖^{1,2}, 金 琳^{2,3}, 李 攀³, 杨邦赛^{1,2}, 钱国英^{2,3}, 葛楚天^{2,3*} 孙 伟^{2,3*}

1. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306; 2. 浙江万里学院动物性别与 发育重点研究所,浙江宁波 315100; 3. 浙江万里学院生物与环境学院,浙江宁 波 315100

摘要:

【目的】探究 sox9 基因在中华鳖胚胎性腺性别分化中的功能。

【方法】实验通过将构建的慢病毒 sox9-shRNA 干扰和过表达载体系统 引入性别分化启动前的胚胎,从组织学和分子研究水平分析 sox9 基因 异常表达后性腺的性逆转情况。

【结果】功能缺失实验结果显示, 敲低 sox9 后的 ZZ 胚胎性腺外形和 内部结构明显雌性化, 生殖细胞呈现雌性分布模式, 雄性特异性基因 dmrt1 和 amh 的 mRNA 表达显著降低, 雌性特异性基因 foxl2 的 mRNA 表达则显著升高, DMRT1 蛋白的表达信号显著减少, 甚至消 失, FOXL2 蛋白被激活大量表达, 性腺发生了雄性向雌性完全性逆转 (逆转率: 87.9%); 功能获得实验结果显示, 42.5% 过表达 sox9 的 ZW 胚胎转向雄性分化方向, dmrt1 和 amh 表达上升, foxl2 表达下降, 在 性腺中同时检测到 DMRT1 和 FOXL2 蛋白的荧光信号, 性逆转不彻底。 【结论】sox9 是中华鳖早期睾丸形成的必需关键基因, 参与调控雄性 分化过程。

关键词:中华鳖; sox9 基因; 性别分化; 性逆转; 雄性

中华鳖 (Pelodiscus sinensis) 是我国传统的特种水产养殖动物,具 有明显的两性异形生产性状——雄性个体大、生长快、裙边宽厚、具 有更高的营养和经济价值,因此单性群体更具养殖优势。现已证实中 华鳖存在微小性染色体 (Z/W),性别决定方式为基因型性别决定 (genetic sex determination, GSD)^[1]。挖掘并鉴定早期性别决定和性腺分 化通路上的关键调控基因 (因子),为制备性逆转彻底且具有生殖能力 的 ZZ 伪雌亲本提供有效的分子靶标,已成为实现中华鳖全雄育种技 术攻关的重要举措。

在参与脊椎动物性别决定和性腺分化的关键基因中, sox9 (SRYrelated HMG box 9) 是一个高度保守的雄性性别调控因子。该基因编码 的蛋白质具有保守的 HMG 结构域——SOX 蛋白发挥转录因子调控作 用的重要结构域^[2]。在哺乳动物中, sox9 直接受 Y 染色体连锁的性别



第一作者:梁肖,从事中华鳖性别决 定和分化机制研究, E-mail: xliang0606@163.com



通信作者: 葛楚天, 从事水生动物繁 殖与发育生物学研究, E-mail: cge@zwu.edu.cn;

孙伟,从事龟鳖动物性别决定和性别 控制研究,E-mail: sunwei0802@zwu. edu.cn

资助项目:国家自然科学基金 (32325049,U22A20529);宁波市自然 科学基金(2022J193)

收稿日期: 2023-09-17 修回日期: 2024-02-02

文章编号: 1000-0615(2025)06-069605-12 中图分类号:Q78;S966.5 文献标志码:A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0) Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



https://www.china-fishery.cn

决定主控基因 srv (sex determining region of Y chromosome) 激活,从而诱导生殖嵴向睾丸分 化, 且缺失 sox9 会导致雄性向雌性性逆转^[3-6]。在 鸡(Gallus domesticus)中, Z染色体上的主控基 因 dmrt1 (double-sex and mab-3 related transcription factor1) 通过刺激 sox9 的表达诱导雄性发育 通路,在性腺分化的关键时期 sox9 呈现 ZZ 性 腺高表达^[7]。sox9基因这种性别差异性表达模 式在爬行动物中同样广泛存在。在一些性别决 定于孵化温度的 TSD (temperature- dependent sex determination, 温度依赖型性别决定) 爬行动物中, 如美洲短吻鳄 (Alligator mississippiensis)、草龟 (Mauremys reevesii)、红耳龟 (Trachemys scripta)、 太平洋丽龟 (Lepidochelvs olivacea), sox9 在雌 雄孵化温度下的早期胚胎性腺中均有表达,而 在温度敏感中后期或性别分化时期的雄性性腺 中上调表达,呈现雌雄差异^[8-12]。红耳龟 sox9 的功能鉴定实验已证实该基因是 TSD 雄性分化 的必需关键因子,其缺失或过表达均会导致性 别逆转^[13]。而 sox9 在 GSD 爬行动物睾丸分化 中的调控作用,尚未见功能验证相关报道。

本实验以中华鳖雄性高表达基因 sox9^[14] 为 操纵对象,采用慢病毒载体介导的 RNA 干扰和 过表达技术,从组织学和分子研究水平分析了 敲低和过表达 sox9 后性腺的性逆转情况,从而 对 sox9 基因在中华鳖早期睾丸分化中的功能进 行验证,为阐明中华鳖性别决定和分化的分子 机理以及建立单性育种技术提供基础。

1 材料与方法

1.1 鳖卵孵化和样品采集

中华鳖受精卵购自绍兴大畈水产专业合作 社。将产于12h内的鳖卵直接裸立在孵化盘上 的定位孔中,动物极朝上。孵化盘置于恒温恒 湿孵化箱中进行孵化,设定孵化温度为(31.5± 0.5)°C,雾化加湿器控制湿度在75%~85%。孵 化过程中定期检查孵化情况,及时丢弃未受精 以及坏死鳖卵。实验中设置3个孵化箱,分别 为空白对照组,*sox*9干扰组和*sox*9过表达组, 每组600枚鳖卵。孵化过程中,根据中华鳖胚 胎发育时期图谱^[15]在特定发育时间点进行鳖胚 处理及样品采集[性腺或性腺-中肾复合体(gonadmesonephros complexes, GMCs)],同时收集胚胎 的剩余组织,用于提取基因组 DNA 以鉴定胚胎 的遗传性别 (ZZ 或 ZW),具体的性别鉴定方法 参照 Literman 等^[16]的研究。本研究获得了浙江 万里学院实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守浙江万里学院关 于实验动物使用的伦理规范,并按照浙江万里 学院伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 sox9 慢病毒干扰和过表达载体的构建及鳖 胚感染

根据实验室克隆获得的中华鳖 sox9 cDNA 全长序列,针对其编码序列 (coding sequence, CDS)区域,设计特异性 shRNA序列,构建 sox9 干扰的慢病毒载体 (LV-U6-sox9-shRNA); 通过 PCR 克隆获得开放阅读框 (open reading frame, ORF)全长序列 (1464 bp),构建过表达 sox9 的慢病毒载体 (LV-EF1a-sox9-overexpression, OE)。由上海吉玛制药技术有限公司采用 第4代慢病毒载体四质粒合成法生产高滴度的 慢病毒浓缩液 (大于 10[°] 个/mL 的转导单位),载 体构建及病毒液合成方法参照课题组之前发表 的文章^[17-18]。

中华鳖受精卵孵化至第15期时,通过照 蛋器挑选发育良好的鳖卵,利用微量进样器向 其注入 5 μL sox9-shRNA 或 sox9-OE 慢病毒液, 实验中设置空白载体对照组。注射完毕后置于 相同环境下继续孵化,收集第16、21和27期 胚胎,分离性腺和(或)GMCs分别用于 RNA 提 取和组织切片染色。

1.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

将采集的中华鳖性腺组织浸泡于 TRIzol 试 剂 (Invitrogen, 美国) 中,根据操作说明提取性 腺 总 RNA,后使用逆转录试剂盒 (K1622, Thermo Scientific,美国) 合成 cDNA,用于基因 mRNA 水平表达分析。以合成的 cDNA 为模板, 按如下比例配制 12.5 μ L PCR反应体系: SYBR[®] Premix (TaKaRa,日本) 6.25 μ L,上下游 引物各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 4.25 μ L。在 ABI 7500 Real-time PCR 仪 (Appiled Biosystems, 美国)上设置以下参数进行 PCR反应:预变性 95 °C 2 min;变性 95 °C 5 s,退火 58 °C 30 s, 40 个循环。每个实验至少重复 3 次 (*n*≥3)。实 验中设空白对照,以 *gapdh* 为内参基因,目的 基因相对表达量利用2^{$-\Delta\Delta C_i$}法计算。所得数据均 表示为 mean±SD,使用 SPSS 软件进行单因素 方差分析及 Duncan 氏多重比较, *P* 值<0.05 被 认为具有统计学意义("*"代表*P*<0.05, "**"代表*P*< 0.01, "***"代表 *P*<0.001)。采用 Primer Premier 5 软件设计引物,所用引物序列信息见表 1。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物(5′-3′)					
gene	primer (5'-3')					
sox9	F: TTTCCGACCGCTAAAACGACAC					
	R: CTCCGCTGACCAAAACTTAGCCC					
dmrt1	F: CAAGACTCTGGCTTAATTTCCCT					
	R: TTACTTCAGCACCAGTCCA					
amh	F: CGTGCTCTCATCTTCCTTTTCT					
	R:CTGCTGCTGTTCCTCCCAT					
foxl2	F: GCTCGAAGGCAGCGTAAGT					
	R:CCCCTCGTATCAAATCAGACAG					
gapdh	F: GGCTTTCCGTGTTCCA ACTC					
	R: GACAACCTGGTCCTCCGTGTATC					

注:F为正向引物,R为反向引物。

Notes: F stands for forward primer, and R stands for reverse primer.

1.4 石蜡切片和苏木素-伊红 (H.E) 染色

将采集的中华鳖 GMCs 组织保存于 4% 多 聚甲醛溶液 (PFA)中,于4°C下固定过夜。采 用 50% 乙醇置换固定液,2h后置于 70% 乙醇 中进行组织包埋或4°C长期保存。将待包埋 GMCs 先后经 70%、80%、90%、95%和 100% 的梯度乙醇进行逐级脱水、二甲苯透明处理后, 进行石蜡包埋及连续切片,切片厚度设置 5~ 6 μm。将烘干后的切片置于二甲苯中完全脱蜡 后,依次经浓度由高到低的梯度乙醇渗透,后 经 H.E 染色,再脱水,使用中性树脂封片后于 Nikon 正置显微镜 (日本)下观察拍照。

1.5 免疫荧光染色

将烘干后的 GMCs 组织切片经二甲苯完全 脱蜡后,依次浸入由高到低的梯度乙醇后,使 用抗原修复液 (0.01 mmol/L 柠檬酸钠溶液)进行 样品修复,95 ℃以上维持 20 min。待切片冷却 至室温后,滴加足量封闭液于组织上,室温孵 育 1 h。吸去封闭液,滴加适量一抗稀释液于组 织上,4 ℃ 孵育过夜。次日,用 PBST 洗脱液 清洗切片 10 min, 重复 3 次。在室温避光环境 下,针对一抗物种来源滴加适量的荧光二抗稀 释液和 DAPI 染液 (286 nmol/L, Sigma,美国), 孵育 2 h 后,清洗 3 次,每次 10 min。洗脱干 净后加抗荧光淬灭剂封片,于共聚焦荧光显微 镜 (Nikon, A1 Plus)下观察拍照。本实验所用的一 抗信息:兔抗 VASA (1:500, Abcam,英国)、鼠 抗 CTNNB1 (1:250, Sigma,美国)、鼠抗 DMRT1 (1:100, Santa Cruz,美国)、羊抗 FOXL2 (1: 500,由杭州华安生物技术有限公司制备中华 鳖 FOXL2 抗体);对应的二抗信息:驴抗兔 IgG594 (1:250, Invitrogen,美国)、驴 抗 羊 IgG488 (1:250, Invitrogen,美国)、驴 抗 羊 IgG488 (1:250, Invitrogen,美国)和驴抗鼠 IgG-594 (1:250, Invitrogen,美国)。

2 结果

为了明确 sox9 在中华鳖早期性腺分化中的 具体作用,利用实验室在龟鳖体内建立的基因 功能鉴定技术^[17-18],向第 15 期中华鳖胚胎注入 携带 sox9-shRNA 干扰或 sox9-OE 过表达片段的 慢病毒液,在性腺分化启动前第 16 期 (处理后 约 36 h)建立了高效敲低 sox9 的 ZZ 胚胎模型 (表达量显著降低,抑制率达 80% 以上)(图 1-a) 和过表达 sox9 的 ZW 胚胎模型 (表达量提升 300% 以上)(图 1-b),通过观察性腺分化方向以 及检测雌雄基因和蛋白的表达分布,开展了 sox9 基因的功能缺失和获得研究。

2.1 sox9 基因的功能缺失研究

sox9 敲低后 ZZ 胚胎性腺的表型变化 从 组织学水平对敲低 sox9 后的 ZZ 胚胎性腺进行 性逆转分析。体视显微镜下观察发现,第 27 期 对照组 ZZ 性腺呈短粗状 (图版 I-1);对照组 ZW 性腺相对较长 (图版 I-4)。sox9 敲低后的 ZZ 性腺明显变长,与雌性性腺类似(图版 I-2, 3)。性腺切片 H.E 染色显示,第 21 期对照组 ZZ 性腺皮质区退化呈单细胞层,髓质区发达形 成原始性索 (图版 I-5);对照组 ZW 性腺皮质 区发育变厚,髓质区退化未见明显的索状结构 (图版 I-8)。这种雌雄性腺形态结构差异在第 27 期更为明显 (图版 I-9, 12, 13, 16)。sox9 敲低后的 ZZ 性腺髓质区呈现不同程度的退化,



图 1 慢病毒表达载体的有效性分析

RT-qPCR 检测经过 LV-sox9-shRNA (a) 干扰和 LV-sox9-OE (b) 过表达载体系统侵染后,第 16 期性腺中 sox9 mRNA 的表达变化情况。1. ZZ 对照组, 2. ZZ+sox9-shRNA 处理组, 3. ZW 对照组, 4. ZW+sox9-OE 处理组; **. P<0.01, ***. P<0.001。

Fig. 1 Efficacy analysis of lentivirus expression vectors

RT-qPCR analysis showed that expression changes of *sox*9 mRNA in gonads of stage 16 after LV-*sox*9-shRNA (a) and LV-*sox*9-OE (b) vector systems infection. 1. ZZ control group, 2. ZZ+*sox*9-shRNA treated group, 3. ZW control group, 4. ZW+*sox*9-OE treated group; **. *P*<0.01, ***. *P*<0.001.

至第 27 期时甚至出现空腔,而皮质区高度发育 布满生殖细胞(图版 I-6,7,10,11,14,15), 此时性腺由雄性完全逆转为雌性。

sox9 敲低后 ZZ 胚胎性腺中生殖细胞的分 布变化 通过生殖细胞特异性 VASA 蛋白的 免疫荧光染色发现、生殖细胞主要分布在对照 组 ZZ 性腺髓质区性索上 (图版 II-1, 5, 9, 13) 和 ZW 性腺的皮质区内 (图版 II-4, 8, 12, 16)。 在 sox9 敲低后第 21 期 ZZ 性腺中, 生殖细胞在 皮质区和髓质区均有分布 (图版 **Ⅱ**-2, 3, 6, 7), 至 27 期时, 生殖细胞在大部分处理性腺中呈现 完全类雌性的皮质区分布模式(图版Ⅱ-10, 11, 14, 15), 进一步证明了性逆转的发生。实验中 以 CTNNB1 (一种细胞黏附蛋白, 与膜蛋白 结合)的免疫荧光染色来辅助显示性腺的内部结 构,该蛋白主要位于中华鳖雄性性腺髓质区 性索细胞以及雌性性腺皮质区细胞的细胞膜上 (图版Ⅱ)。

sox9 敲低后 ZZ 胚胎性腺中雌雄特异性基因和蛋白的表达分布变化为了进一步验证 雄转雌性逆转现象的发生,从分子水平分析了 敲低 sox9 基因对雄性分化因子 dmrt1(图 2-a) 和 amh (anti-müllerian hormone) (图 2-b) 以及雌性分 化因子 foxl2 (forkhead box L2) (图 2-c) 表达的影响。RT-qPCR 结果显示,在第 27 期对照组 ZZ 性腺中, dmrt1 和 amh mRNA 丰富表达, foxl2 mRNA 表达较低;相反,在对照组 ZW 性腺中 dmrt1 和 amh 低 表 达, foxl2 高 表 达。 敲 低 sox9后, ZZ 性腺中 dmrt1 和 amh mRNA 水平出 现显著下调,而 foxl2 mRNA 则显著上调(图 2)。 此外,通过免疫双标染色检测了 sox9 敲低后第 21 期 (图版Ⅲ-a) 和第 27 期 (图版Ⅲ-b) 性腺中 DMRT1和FOXL2蛋白的表达分布变化。结果 显示, DMRT1 大量分布于对照组 ZZ 性腺髓质 区性锁上 sertoli 细胞的细胞核中 (图版Ⅲ-a-1, 9, 图版Ⅲ-b-1,9),而在对照组 ZW 性腺中未见其 表达信号 (图版Ⅲ-a-4, 12, 图版Ⅲ-b-4, 12); FOXL2 主要定位在 ZW 性腺体细胞的细胞核中 (图版Ⅲ-a-8, 12, 图版Ⅲ-b-8, 12), 而在 ZZ 性 腺中没有检测到其荧光信号(图版Ⅲ-a-5,9, 图版Ⅲ-b-5,9)。 敲低 sox9 后,在全部 ZZ 性腺 中 FOXL2 蛋白均被诱导且出现大量表达,而 DMRT1蛋白的表达量则急剧下调甚至几乎消 失(性逆转彻底, ZZ 卵巢)(图版Ⅲ-a-3, 7, 11, 图版Ⅲ-b-2, 3, 6, 7, 10, 11), 仅在第 21 期 少量 ZZ 性腺 (2/15) 中,同时检测到了 DMRT1 和 FOXL2 两种蛋白表达的荧光信号 (性逆转不 彻底, ZZ 卵睾丸)(图版Ⅲ-a-2, 6, 10)。

LV-sox9-shRNA 侵染 ZZ 胚胎后性腺的雌 雄数量及性逆转率 以上结果充分证明,敲 低 sox9 基因确实能够诱导中华鳖 ZZ 性腺向雌 性完全逆转。数据统计显示,在 LV-sox9-



图版 I sox9 敲低后 ZZ 胚胎性腺的表型变化

1~4. 体视显微镜下观察 sox9 敲低后,第 27 期 ZZ 性腺的外观形态变化。Gd. 性腺 (用黄色虚线圈出),Ms. 中肾;5~16. H.E 染色观察 sox9 敲低后,第 21 期 (5~8)、27 期 (9~16) ZZ 性腺的内部结构变化。gc. 生殖细胞,sc. 支持细胞,Med. 髓质区,Cor. 皮质区 (黑色虚线代表皮质和髓质的分界)。下同。

Plate I Phenotypic changes of ZZ embryonic gonads after sox9 knockdown

1-4. the morphology changes of ZZ gonads of stage 27 after *sox*9 knockdown were observed by stereomicroscope. Gd. gonads (circle it with a yellow dotted line), Ms. mesonephros; 5-16. H.E staining showed the structural changes of ZZ gonads of stage 21 (5-8) and 27 (9-16) after *sox*9 knockdown. gc. germ cells, sc. sertoli cells, Med. medullary area, Cor. cortical area (the dashed black line represents the boundary between cortex and medulla). The same below.

shRNA 处理后的 ZZ 胚胎中,第 21 期时,80.0% (12/15) 性腺向雌性方向逆转;第 25 期时,87.9% (29/33) 性腺彻底分化为雌性,性逆转率极高 (表 2)。

2.2 sox9 基因的功能获得研究

以上功能缺失实验表明, sox9 是中华鳖早 期雄性性腺形成的必需关键基因,其缺失会导 致彻底的雄转雌性逆转。相反,为了确定 sox9 基因能否单独诱导中华鳖早期睾丸的分化通路, 从组织学和分子水平分析 sox9 过表达后的 ZW 胚胎是否能够发生性逆转。

sox9 过表达后 ZW 胚胎性腺的表型变化 性腺切片 H.E 染色显示,与第 27 期对照组 ZW 性

腺 (髓质区高度退化,分布有大量的空腔结构 (图版Ⅳ-1,5)相比, sox9过表达后的 ZW 性腺 尽管皮质区未完全退化成与 ZZ 性腺类似的单 细胞层,但髓质区明显变得致密,且出现少 量雄性性腺的典型结构 (性索),上面分布有 sertoli 支持细胞 (图版Ⅳ-2~4,6~8),此时性腺 转向雄性分化方向,性逆转不彻底。

sox9 过表达后 ZW 胚胎性腺中雌雄特异性 基因和蛋白的表达分布变化 RT-qPCR 结果 显示,在过表达 sox9 后的第 27 期 ZW 性腺中, dmrt1 (图 3-a)和 amh (图 3-b) mRNA 表达水平 显著上升,而 foxl2 (图 3-c) mRNA 表达则显著 下降。DMRT1和 FOXL2 蛋白的免疫双标染色 结果显示,在 ZW 性腺中异位过表达 sox9 后,



图版 II sox9 敲低后 ZZ 胚胎性腺中生殖细胞的分布变化 VASA 免疫荧光染色观察 sox9 敲低后,第 21 (1~8)、27 期 (9~16) ZZ 性腺中生殖细胞的分布变化。

Plate II Changes in germ cell distribution in ZZ embryonic gonads after sox9 knockdown

VASA immunofluorescence showed the distribution changes of germ cells in ZZ gonads of stage 21 (1-8) and 27 (9-16) after sox9 knockdown.



图 2 sox9 敲低后 ZZ 胚胎性腺中雌雄特异性基因的表达变化

第 27 期 ZZ 性腺中 *dmrt*1 (a)、*amh* (b) 和 *foxl*2 (c) mRNA 的表达变化。1. ZZ nor, 2. ZZ control, 3. ZZ+sox9-RNAi, 4. ZW control。**. P<0.01, ***. P<0.001, n.s.. 无显著差异; 下同。

Fig. 2 Expression changes of male- and female-specific genes in ZZ embryonic gonads after sox9 knockdown

The expression changes of *dmrt*1 (a), *amh* (b) and *foxl*2 (c) mRNA in the ZZ gonads of stage 27. 1. ZZ nor, 2. ZZ control, 3. ZZ+*sox*9-RNAi, 4. ZW control. **. *P*<0.01, ***. *P*<0.001, n.s.. no significance difference; the same below.

DMRT1蛋白被诱导在性腺髓质区出现不同程度的表达,FOXL2蛋白表达下降但并未彻底消失,仍能检测到其荧光信号(图版V-2~3,6~7,

10~11)。 在 同 一 个 ZW 性 腺 中 同 时 检 出 DMRT1 和 FOXL2 的荧光信号,进一步说明此 时性腺呈现雌雄间性,性逆转并不彻底(图版V)。

https://www.china-fishery.cn



(b)

图版 III sox9 敲低后 ZZ 胚胎性腺中雌雄特异性蛋白的分布变化

免疫荧光染色检测 sox9 敲低后,第 21 期 (a) 和第 27 期 (b) ZZ 性腺中 DMRT1 和 FOXL2 蛋白的表达分布变化。

Plate III Distribution changes of male- and female-specific proteins in ZZ embryonic gonads after sox9 knockdown The expression distribution changes of DMRT1 and FOXL2 in ZZ gonads of stage 21 (a) and 27 (b) after sox9 knockdown were detected by immunofluorescence.

LV-sox9-OE 侵染 ZW 胚胎后性腺的雌雄数 量及性逆转率 以上结果表明,过表达 sox9 基因能够诱导中华鳖 ZW 性腺向雄性方向分化。 数据统计显示,LV-sox9-OE 处理后的 ZW 胚胎 发育至第 27 期时,42.5% (17/40) 胚胎性腺呈现 卵睾丸状态 (表 3)。

3 讨论

在脊椎动物性别决定和性腺分化中, sox9 基因具有高度保守性。本研究通过基因功能缺 失和功能获得实验,从正反两方面揭示了在中 华鳖中敲低和异位表达 sox9 后会导致不同程度 的性别逆转现象,表明 sox9 是中华鳖早期睾丸 分化的必需关键基因,参与调控雄性分化过程。

小鼠 (Mus musculus) sox9 受性别决定主控 基因 sry 的直接调控,并紧随 sry 表达,且被证 实在支持细胞分化和睾丸形成中是必不可少的 调控因子^[3,19-20]。研究发现, sox9 缺失 (或抑制 77% 表达量)能够导致 XY 小鼠发生雄性向雌性 的彻底性逆转,减少 sox9 基因 50% 的表达量则 会发生部分性逆转^[5-6,21];在缺失 sry 情况下,

Fab. 2	The number of male and	female gonads and i	the rate of sex reversa	l after LV-sox9-shR	NA infection with ZZ	embrvos
1 av. #	The number of male and	iomate gonaus anu	the face of sea fevelsa	I alter LIV SUAJ Shite		cmbi yos

时期 stages	组别 groups	胚胎数/个 no. of embryos	睾丸数/个 no. of testes	卵巢数/个 no.of ovaries	卵睾丸数/个 no. of ovotestes	性逆转率 sex reversal rate
第21期	对照组ZZ	34	34	0	0	
stage 21	ZZ+LV-sox9-shRNA	15	3	10	2	(10+2)/15
	对照组ZW	35	0	35	0	_
第27期	对照组ZZ	42	42	0	0	_
stage 27	ZZ+LV-sox9-shRNA	33	4	29	0	(29+0)/33
	对照组ZW	39	0	39	0	_

注: 雄性向雌性逆转率=(ZZ卵巢数+ZZ卵睾丸数)/ZZ胚胎数; 通过性腺的表型观察以及雌雄蛋白的免疫荧光染色判断; "—"表示对照组不存 在性逆转; 下同。

Notes: Male-to-female sex reversal rate=(no. of ZZ ovaries and ZZ ovotestes)/total no. of ZZ embryos; the reversed gonads were assessed by phenotypic observation of gonads and immunofluorescence staining of male and female proteins; "—" indicates that there is no sex reversal in the control group; the same below.



图版 IV sox9 过表达后第 27 期 ZW 胚胎性腺的表型变化







1. ZW nor, 2. ZW control, 3. ZW+sox9-OE, 4. ZZ control.



图版 V sox9 过表达后第 27 期 ZW 胚胎性腺中雌雄特异性蛋白的分布变化

Plate V Distribution changes of male- and female-specific proteins in ZW embryonic gonads of

stage 27 after*sox*9 overexpression

1-4. DMRT1, 5-8. FOXL2, 9-12. Merge/DAPI.

Tab. 3	The number of male and female gonads and the rate of sex reversal after
	LV-sox9-OE infection with ZW embryos

时期 stage	组别 group	胚胎数/个 no. of embryos	睾丸数/个 no. of testes	卵巢数/个 no. of ovaries	卵睾丸数/个 no. of ovotestes	性逆转率 sex reversal rate
第27期	对照组ZW	33	0	33	0	_
	ZW+LV-sox9-OE	40	0	23	17	(0+17)/40
	对照组ZZ	30	30	0	0	_

注: 雌性向雄性逆转率=(ZW睾丸数+ZW卵睾丸数)/ZW胚胎数。

Notes: Female-to-male sex reversal rate=(numbers of ZW testes and ZW ovotestes)/total numbers of ZW embryos.

sox9在XX性腺中的异位表达能够成功诱导雄 性发育^[22-23]。此外, sox9 基因增强子的复制或 删除分别会导致 XX 或 XY 个体的性别逆转^[24-25]。 以上研究表明, sox9 基因在哺乳动物的睾丸决 定和分化中发挥着关键的调控作用。在爬行类 中, TSD 动物 (如美洲短吻鳄、红耳龟等) 和 GSD 动物 (如中华鳖)的 sox9 基因均呈现雄性高 表达趋势^[8, 10-11, 14]。与小鼠类似,之前在红耳龟 TSD 分子机制的研究中发现, 敲低或异位表达 sox9均能够导致胚胎性别逆转(包含彻底的性逆 转),明确了 sox9 在 TSD 爬行动物早期雄性性 腺形成中的关键作用[13]。同样,本实验从性腺 组织学和分子研究水平证明了敲低中华鳖 sox9 后 ZZ 胚胎性腺向雌性逆转,最终分化为卵巢; dmrt1 和 amh 表达显著降低、foxl2表达明显上 升。相反,过表达 sox9 后的 ZW 胚胎则向雄性 分化; dmrt1 和 amh 表达上升、foxl2 表达下降, 这 3 个基因的变化趋势与在红耳龟 sox9 功能研 究中的发现一致^[13]。以上研究提示,与哺乳动 物类似, sox9 基因在爬行动物早期睾丸分化中 是必不可少的关键调控因子,即使是在具有不 同性别决定方式 (GSD 和 TSD) 的物种 (如龟鳖 动物)中,该基因仍高度保守。

在哺乳动物雄性发育分子级联通路中, sox9由 sry 启动表达,进而继而激活 amh (antimüllerian hormone)的转录,位于 amh 的上游^[26-28]。 而在鸡和美洲短吻鳄中, sox9 的起始表达晚于 amh,提示在非哺乳类脊椎动物中, amh 可能 不受 sox9 的调控, sox9 位于雄性分化通路的 下游位置^[8, 29-30]。在硬骨鱼的研究中发现, sox9 基因具有卵巢-睾丸转化和维持生殖细胞的作 用^[31-32]。罗非鱼 DMRT1 通过直接绑定 sox9b 启 动子上的特定顺式调控元件,激活 sox9b 的转 录^[33]。类似的,实验先前研究发现中华鳖和红 耳龟 sox9 表达晚于 dmrt1,更重要的是,分别 敲低这两个物种的 dmrt1 后,均会导致 sox9 的 迅速下调,而分别异位过表达 dmrt1 后, sox9 又均被诱导随即上调表达^[17-18],提示在龟鳖动 物中, sox9 受 dmrt1 正向调节,位于 dmrt1 的 下游。以上研究表明, sox9 在不同进化地位脊 椎动物雄性发育通路中的具体调控位置存在差 异。与哺乳类不同,非哺乳类动物 sox9 基因在 早期睾丸分化中发挥着重要的调控作用,而在 性别决定中的作用可能有限。

综上,本实验利用 RNA 干扰和过表达技 术对中华鳖 sox9 进行了功能缺失和获得研究, 明确了 sox9 在早期睾丸形成过程中是必需的关 键因子,参与调控雄性分化过程,这为揭示中 华鳖性别决定和性别分化的分子机制提供基础, 关于 sox9 在中华鳖雄性分化级联通路中的具体 调控位置有待进一步阐释。此外,鉴于雄性中 华鳖的经济优势以及营养价值,由于敲低 sox9 后能够诱导 ZZ 胚胎性腺彻底雌性化,初步形 成了一种中华鳖全雄育种策略,即通过抑制 sox9 培育 ZZ 伪雌亲本,将 ZZ 伪雌鳖与 ZZ 真 雄鳖交配,产生 ZZ 全雄子代。这避免了传统 方法上利用性激素等诱导剂带来的性逆转率无 法达到100%、性逆转个体畸形率高以及药物残 留等问题的出现。当然,以 sox9 基因为分子靶 标制备的伪雌中华鳖是否具有正常的交配及繁 殖能力,是实现上述全雄育种策略的关键,这 也是将来的观察重点。

参考文献 (References):

- [1] Kawagoshi T, Uno Y, Matsubara K, et al. The ZW micro-sex chromosomes of the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sin*ensis, Trionychidae, Testudines) have the same origin as chicken chromosome 15[J]. Cytogenetic and Genome Research, 2009, 125(2): 125-131.
- [2] Symon A, Harley V. SOX9: a genomic view of tissue specific expression and action[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2017, 87: 18-22.
- Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *Sox*9 enhancer[J]. Nature, 2008, 453(7197): 930-934.
- [4] Kashimada K, Koopman P. Sry: the master switch in mam-

malian sex determination[J]. Development, 2010, 137(23): 3921-3930.

- [5] Bagheri-Fam S, Combes A N, Ling C K, *et al.* Heterozygous deletion of *Sox9* in mouse mimics the gonadal sex reversal phenotype associated with campomelic dysplasia in humans[J]. Human Molecular Genetics, 2021, 29(23): 3781-3792.
- [6] Lavery R, Lardenois A, Ranc-Jianmotamedi F, et al. XY Sox9 embryonic loss-of-function mouse mutants show complete sex reversal and produce partially fertile XY oocytes[J]. Developmental Biology, 2011, 354(1): 111-122.
- [7] Smith C A, Katz M, Sinclair A H. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos[J]. Biology of Reproduction, 2003, 68(2): 560-570.
- [8] Western P S, Harry J L, Graves J A M, et al. Temperaturedependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression[J]. Developmental Dynamics, 1999, 216(4-5): 411-419.
- [9] Tang W Q, Mu Y, Valenzuela N, et al. Effects of incubation temperature on the expression of sex-related genes in the Chinese pond turtle, *Mauremys reevesii*[J]. Sexual Development, 2017, 11(5-6): 307-319.
- [10] Shoemaker C, Ramsey M, Queen J, et al. Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperaturedependent sex determination[J]. Developmental Dynamics, 2007, 236(4): 1055-1063.
- [11] 张海艳, 孙伟, 周英杰, 等. Sox9 在温度依赖型性别决定中的功能初探 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2018, 45(6): 653-662.
 Zhang H Y, Sun W, Zhou Y J, et al. The preliminary functional analysis of Sox9 in a temperature-dependent sex determination system[J]. Progress In Biochemistry and Biophysics, 2018, 45(6): 653-662 (in Chinese).
- [12] Moreno-Mendoza N, Harley V R, Merchant-Larios H. Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures[J]. The Journal of Experimental Zoology, 1999, 284(6): 705-710.
- [13] Hui H B, Xiao L, Sun W, et al. Sox9 is indispensable for testis differentiation in the red-eared slider turtle, a reptile with temperature-dependent sex determination[J]. Zoological Research, 2021, 42(6): 721-725.
- [14] 王莉,孙伟,储经乾,等.中华鳖 SOX9 基因在胚胎期性腺中的表达模式及在性逆转中的表达变化 [J].水产学报,2014, 38(9): 1286-1293.

Wang L, Sun W, Chu J Q, et al. The expression pattern of

SOX9 gene during embryonic development and its expression changes in sex reversal in *Pelodiscus sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1286-1293 (in Chinese).

- [15] Tokita M, Kuratani S. Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae)[J]. Zoological Science, 2001, 18(5): 705-715.
- [16] Literman R, Radhakrishnan S, Tamplin J, et al. Development of sexing primers in *Glyptemys insculpta* and *Apalone spinifera* turtles uncovers an XX/XY sex-determining system in the critically-endangered bog turtle *Glyptemys muhlenbergii*[J]. Conservation Genetics Resources, 2017, 9(4): 651-658.
- [17] Sun W, Cai H, Zhang G, et al. Dmrt1 is required for primary male sexual differentiation in Chinese soft-shelled turtle Pelodiscus sinensis[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4433.
- [18] Ge C T, Ye J, Zhang H Y, et al. Dmrt1 induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination[J]. Development, 2017, 144(12): 2222-2233.
- [19] Chaboissier M C, Kobayashi A, Vidal V I P, et al. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse[J]. Development, 2004, 131(9): 1891-1901.
- [20] Kent J, Wheatley S C, Andrews J E, *et al.* A male-specific role for *SOX*9 in vertebrate sex determination[J]. Development, 1996, 122(9): 2813-2822.
- [21] Gonen N, Quinn A, O'Neill H C, et al. Normal levels of Sox9 expression in the developing mouse testis depend on the TES/TESCO enhancer, but this does not act alone[J]. PLoS Genetics, 2017, 13(1): e1006520.
- [22] Huang B, Wang S B, Ning Y, et al. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9[J]. American Journal of Medical Genetics, 1999, 87(4): 349-353.
- [23] Vidal V P I, Chaboissier M C, De Rooij D G, et al. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice[J]. Nature

Genetics, 2001, 28(3): 216-217.

- [24] Croft B, Ohnesorg T, Hewitt J, et al. Human sex reversal is caused by duplication or deletion of core enhancers upstream of SOX9[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 5319.
- [25] Gonen N, Futtner C R, Wood S, *et al.* Sex reversal following deletion of a single distal enhancer of *Sox9*[J]. Science, 2018, 360(6396): 1469-1473.
- [26] Da Silva S M, Hacker A, Harley V, et al. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds[J]. Nature Genetics, 1996, 14(1): 62-68.
- [27] Yamashita S, Kataoka K, Yamamoto H, et al. Comparative analysis demonstrates cell type-specific conservation of SOX9 targets between mouse and chicken[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 12560.
- [28] Cutting A, Chue J, Smith C A. Just how conserved is vertebrate sex determination?[J]. Developmental Dynamics, 2013, 242(4): 380-387.
- [29] Oreal E, Pieau C, Mattei M G, *et al.* Early expression of *AMH* in chicken embryonic gonads precedes testicular *SOX*9 expression[J]. Developmental Dynamics, 1998, 212(4): 522-532.
- [30] Smith C A, Sinclair A H. Sex determination: insights from the chicken[J]. BioEssays, 2004, 26(2): 120-132.
- [31] Nakamura S, Watakabe I, Nishimura T, et al. Analysis of medaka sox9 orthologue reveals a conserved role in germ cell maintenance[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29982.
- [32] Sun D, Zhang Y, Wang C, et al. Sox9-related signaling controls zebrafish juvenile ovary-testis transformation[J]. Cell Death & Disease, 2013, 4(11): e930.
- [33] Wei L, Li X Y, Li M H, et al. Dmrt1 directly regulates the transcription of the testis-biased Sox9b gene in Nile tilapia (Oreochromis niloticus)[J]. Gene, 2019, 687: 109-115.

The role of *sox9* gene in male gonadal differentiation of *Pelodiscus sinensis*

LIANG Xiao^{1,2}, JIN Lin^{2,3}, LI Pan³, YANG Bangsai^{1,2}, QIAN Guoying^{2,3}, GE Chutian^{2,3*}, SUN Wei^{2,3*}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Institute of Animal Sex and Development, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

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

Abstract: Chinese soft-shelled turtles (Pelodiscus sinensis) possess apparent sexual dimorphism on production traits, and the realization of all-male breeding is the important measure for the improvement of the industry. In this study, the highly conserved gene sox9 in vertebrate male differentiation was chosen as manipulating object, and by injecting Lentivirus-sox9-shRNA interference and overexpression vector system into embryos before sexual differentiation, we discussed the specific function of sox9 during the early testicular differentiation of P. sinensis from the level of histology and molecular study. The results of the loss-of-function experiments showed that the appearance and internal structure of ZZ embryonic gonads with sox9 knockdown underwent significant feminization, and the germ cells presented female distribution pattern. The mRNA expression of male specific gene *dmrt*1 and *amh* significantly decreased, and that of female specific gene *foxl*2 obviously increased. Besides, the expressive signals of the DMRT1 protein almost disappeared, while FOXL2 protein was activated and abundantly expressed, indicating complete sex reversal from male to female on gonads(ratio of reversal: 87.9%). The results of the gain-of-function experiments showed that 42.5% of ZW embryos overexpressing sox9 differentiated towards male. The expression of dmrt1 and amh were upregulated while foxl2 was downregulated, and the fluorescent signals of both DMRT1 and FOXL2 were detected simultaneously in the same gonad, indicating incomplete sex reversal. These findings above demonstrate that sox9 is the necessary gene for early testicular formation in *P. sinensis*, and it does participate in the process of regulating male differentiation, which establishes theoretical foundation for the following analysis of sexual differentiation mechanism of P. sinensis and provides breeding target for realizing the sex control of *P. sinensis* at the same time.

Key words: Pelodiscus sinensis; sox9 gene; sexual differentiation; sex reversal; male

Corresponding authors: GE Chutian. E-mail: cge@zwu.edu.cn;

SUN Wei. E-mail: sunwei0802@zwu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32325049, U22A20529); Natural Science Foundation of Ningbo (2022J193)