



foxl3 重组质粒过表达与 17 α -甲基睾酮投喂对斜带石斑鱼性腺发育的影响

张春丽¹, 何琪¹, 程慧涛¹, 李丽华¹, 阮炘贺¹, 段旭琢¹, 黄枫淇¹,
杨慧荣^{1,2}, 张海发³, 石和荣³, 王庆^{1,2*}, 赵会宏^{1*}

(1. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642;

2. 海洋生物资源保护与利用粤港澳高校联合实验室, 广东 广州 510642;

3. 广东省海洋渔业试验中心, 广东 惠州 516081)

摘要: 为了进一步证实和丰富 *foxl3* 对斜带石斑鱼性腺发育的影响, 实验通过 *foxl3* 重组质粒过表达与 17 α -甲基睾酮 (MT) 投喂对比, 探究一种新型的调控斜带石斑鱼性腺发育的方法。以 *foxl3* 重组质粒注射以及 MT 投喂 3 月龄的石斑鱼幼鱼, 观察性腺发育状态, 利用荧光定量 PCR 检测分析性腺分化相关基因的表达。结果显示, 质粒注射初期, 性腺注射组卵巢较对照组小, 体细胞较多, 存在向雄性发育的趋势 (存在间质细胞), 且质粒注射初期的雄性相关基因 (*amh*)、激素生成相关基因 (*cyp11b*、*11 β -hsd2*) 和精子发生相关基因 (*rec8*、*sycp3*) 的相对表达量显著高于对照组。MT 投喂组后期的性腺组织处于明显的兼性发育期, 而对照组仍处于 O2 期卵母细胞期。MT 投喂组, *amh*、*cyp11b*、*11 β -hsd2*、*rec8* 和 *sycp3* 基因相对表达量变化趋势与质粒注射组一致, 但投喂组与对照组之间的差异较质粒注射组更显著。在本实验条件下, MT 组投喂调控性腺雄性化的效果较 *foxl3* 质粒注射的效果明显。研究表明, *foxl3* 重组质粒过表达对斜带石斑鱼幼鱼性腺发育具有明确的雄性化调控作用, 且这种调控可能具有剂量依存效应。

关键词: 斜带石斑鱼; *foxl3* 重组质粒; 17 α -甲基睾酮 (MT) 投喂; 过表达; 性腺发育

中图分类号: Q 786; S 965.334

文献标志码: A

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 属鲈形目 (Perciformes) 鲈科 (Serranidae) 石斑鱼属 (*Epinephelus*), 具有生长快、适应性强、肉质鲜嫩、营养价值高等特点, 是东南亚地区的重要经济鱼类。斜带石斑鱼属雌雄同体雌性先熟的硬骨鱼类, 性腺先性成熟为卵巢, 之后经过性转变发育为精巢^[1], 为研究转录因子 *foxl3* 对其性腺发育和性腺成熟提

供了良好的生物模型基础。

foxl3 基因是翼状螺旋转录因子超家族的成员 (forkhead transcription factor, Fox), 研究表明, 该家族的成员对于内胚层发育和形成、生物代谢、发育分化、繁殖和凋亡等生物过程至关重要^[2]。Forkhead 基因家族进化分析表明, 在所有后生动物中都发现了 *foxl2* 及其旁系同源物基因 *foxl3*, 但

收稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-07-19

资助项目: 国家自然科学基金 (31972768, 31972769, 41806151); 广东省科技计划项目 (SDZX2020027); 河源市科技计划项目 (2019041, 2021004); 惠州市引进科技创新团队“天鹅计划” (20170214023102296); 2019 年省级促进经济发展专项资金 (粤财农 [2019] 111 号)

第一作者: 张春丽 (照片), 从事水产育种研究, E-mail: 2422929793@qq.com

通信作者: 王庆, 从事水生动物生理学及种质资源开发利用研究, E-mail: wangqing@scau.edu.cn;

赵会宏, 从事水生动物生理学及种质资源开发利用研究, E-mail: zhaohh@scau.edu.cn



它们的基因进化是复杂的, 根据基因组分析, foxl3 在四足动物中反复丢失, 被认为是鱼类中特异性存在^[3-4]的基因。后生动物中, foxl2/3 在体细胞和生殖细胞性腺中分化得到, 并且在脊椎动物中发生了一定程度的亚功能化: 海绵 (*Phylum porifera*) 中普遍存在着 foxl2/3 的表达, 而一些硬骨鱼中 foxl2 主要是在卵巢中表达, foxl3 则主要是在精巢中表达^[5]。Wu 等^[6] 研究发现, 在日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 性腺分化过程中, 两种胚系表达的 foxl3 雄性中的表达水平均高于雌性, foxl3 可能在鱼类的生殖细胞命运测定中起着重要作用。青鳉 (*Oryzias latipes*) 体内的 foxl3 在生殖细胞中表达, 参与了精子、卵子的命运决定, 且 foxl3 能中断 XX 雌性青鳉发育出功能精子, 说明 foxl3 是抑制雌性生殖细胞生精所必需的^[7]。Lyu 等^[8] 通过定量 PCR (qPCR) 检测了 foxl3 在斜带石斑鱼不同组织中的表达, 结果 foxl3 呈现出性别二态性的特点, foxl3 在斜带石斑鱼的精巢中表达量显著高于卵巢及其他组织, 且 foxl3 在卵巢中的表达量一直很低, 开始向雄性发育的间性性腺中表达量有上升的趋势, 完全发育为精巢时, 表达量显著升高 ($P<0.05$), 说明 foxl3 参与精巢的发育, 可能是潜在的雄性调节基因。

本研究以雌雄同体的斜带石斑鱼为对象, 探究激素合成的关键转录因子 foxl3 基因过表达以及 17α-甲基睾酮 (MT) 投喂对斜带石斑鱼性腺发育的影响, 并将二者进行比较, 以期有效调控斜带石斑鱼的生殖与性别分化, 为进一步探讨人工诱导斜带石斑鱼性腺发育和分化提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用斜带石斑鱼均来自广东省海洋渔业实验中心, 所有的实验鱼在实验之前都在室内循环系统暂养 2 周。实验鱼规格一致 [(30.00±5.12) g, (16.00±0.95) cm]。实验中所用引物均由擎科生物公司合成, 引物序列及名称见表 1 和表 2。

表 1 构建 p3XFLAG 表达载体所用的引物

Tab. 1 Primers used to construct p3XFLAG expression vector	
引物 primers	序列 (5'→3') sequences (5'→3')
foxl3-3flag-F	CCGGAATTCAATGGATGCAGAGGAGGAACCC
foxl3-3flag-R	CGGGGTACCTCAAACGAATATGGCAGCGGTG

表 2 性腺分化相关基因荧光定量 PCR 引物序列
Tab. 2 Primer sequence of gonadal differentiation related genes by real-time PCR

引物 primers	序列 (5'→3') sequences (5'→3')
qamh-F	TGTTGGGAGCGACGGTGAAC
qamh-R	TGCAGCGACTGACTCGTGAAA
qcyp19a1a-F	ACAGTGGAGGTCAGTGTCTC
qcyp19a1a-R	GACAGGTACATCCAGGAAGA
qrec8-F	CACTCCTGCCAGCAGATGGTC
qrec8-R	GACCTCTCCAAACCTCTGCA
q11β-hsd2-F	TCTGGGCTTTGAGGTGTTCG
q11β-hsd2-R	TGGATCTGCTGTGGTTGGGT
qsyvp3-F	GTCAGAGAGCTGTATGAGCAG
qsyvp3-R	CTGCTGTTGCGTGTCCATGAG
β-actin-F	ACCATCGGCAATGAGAGGTT
β-actin-R	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC

1.2 foxl3 重组质粒的获得

根据斜带石斑鱼 foxl3 基因的 ORF 框序列, 筛选阳性克隆并构建 p3XFLAG 表达基因载体, 获得正确的 foxl3 重组质粒。

1.3 foxl3 重组质粒注射

3 μg pcDNA3.1xflag-foxl3 重组质粒腹腔注射斜带石斑鱼, 持续 30 d。选取 300 尾日龄为 180 d 的幼鱼, 随机平均分为 2 组, 分别注射 foxl3+Liposomes 3000 (注射组), 空载 3flag+Liposomes 3000 (对照组), 每组 3 个重复。养殖实验持续 30 d。取样方式: 分别于注射实验后的第 10、20 和 30 天取样 1 次, 每组每次分别取 13 尾注射组和对照组的实验鱼性腺, 固定于 Bouin 氏液 (广州迈发生物科技有限公司, 用于组织学观察) 和 RNA 保护液 (Omega 公司, 用于 RNA 提取) 中。

1.4 MT 投喂

将 MT (Sigma 公司) 粉末溶于无水乙醇, 按 10 mg MT/kg 饲料的量处理颗粒饲料, 混匀、晾干, -20 °C 保存备用。对照组饲料仅用等量无水乙醇处理。养殖实验持续 120 d。选取 400 尾日龄 180 d 的实验鱼, 随机平均分为 2 组, 分别为投喂组 (MT 组) 和基础饲料组。MT 组: 前 30 d 进行激素投喂, 后 30 d 进行普通饲料投喂; 基础饲料组: 整个实验周期均进行普通饲料投喂。取样方式: 激素投喂第 10、20 和 30 天; 激素投喂后, 分别于普通饲料投喂第 10、20 和 30 天各取样

1 次, MT 组和基础饲料组每次分别取 13 尾的实验鱼性腺, 分别固定于 Bouin 氏液 (用于组织学观察) 和 RNA 保护液 (用于 RNA 提取)。

1.5 组织学观察

将注射组、MT 组、对照组和基础饲料组的性腺固定于 Bouin 氏液中, 分别经系列乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡及组织包埋后, 进行常规石蜡组织切片 (厚度 5 μm , Leica, RM2235), 随后进行苏木精-伊红 (H.E) 染色后封片并在显微镜 (Nikon, E200MV) 下观察拍照。

1.6 荧光定量 PCR 分析

将注射组、投喂组、对照组的性腺固定于 RNA 保护液中, 总 RNA 参照 Trizol[®] reagent (Invitrogen, 美国) 说明书进行提取, 以 RNA 为模板, 参照 Vazyme 反转录试剂盒说明书合成第一条链 cDNA, 反转录后的样品稀释 10 倍后作为荧光定量 PCR 模板, 荧光定量 PCR 反应在 Quant-Studio[™] 5 Real-Time PCR Instrument (384-Well Block) 上进行, 反应体系: 2 $\times$ SYBR Green (Vazyme) 5 μL , 引物各 0.2 μL , cDNA 模板 3 μL , ddH₂O 1.6 μL 。具体程序: 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; (95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 56 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s) 40 个循环。使用 β -actin 作为内参, 扩增完成后荧光值转变成 C_t 值, 再采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析。

1.7 数据分析

使用 SPSS 20.0 软件对基因的荧光定量表达数据进行分析, 使用 Student's *t* test 法检验同一时间点不同实验组间数值的差异, 显著性差异定义为 $P < 0.05$, 使用 GraphPad 8.0 软件作图。

2 结果

2.1 foxl3 重组质粒注射后对斜带石斑鱼的性腺发育组织学的影响

质粒注射后第 10 天的性腺切片结果显示, 注射组 (图版 I -1) 卵巢发育明显比对照组 (图版 I -4) 迟缓: 注射组性腺较对照组小, 体细胞较多, 存在向雄性发育的趋势 (注射组存在着由体细胞发育而形成的间质细胞), 注射组基本处于卵原细胞期; 而对照组则向卵母细胞期发育, 存在初级卵母细胞。质粒注射 20 d 后, 注射组 (图版 I -2) 和对照组 (图版 I -5) 基本处于卵原细胞期, 注射组和对照组无明显差别。且质粒注射 30 d 后, 注射组

(图版 I -3) 和对照组 (图版 I -6) 都处于卵母细胞期, 性腺中次级卵母细胞 (O2) 占主导地位, 注射组和对照组无明显差别。

2.2 MT 投喂对斜带石斑鱼性腺发育组织学的影响

MT 投喂实验第 10 天, MT 组中有较多生殖原细胞, 少数精原细胞 (图版 II -7); 基础饲料组处于卵原细胞期 (图版 II -13)。投喂第 20 和 30 天, MT 组中有很多精母细胞和精子细胞存在, 性腺转为雄性性腺 (图版 II -8~9); 基础饲料组一直处于卵母细胞期, 没有出现任何转雄迹象 (图版 II -14~15)。

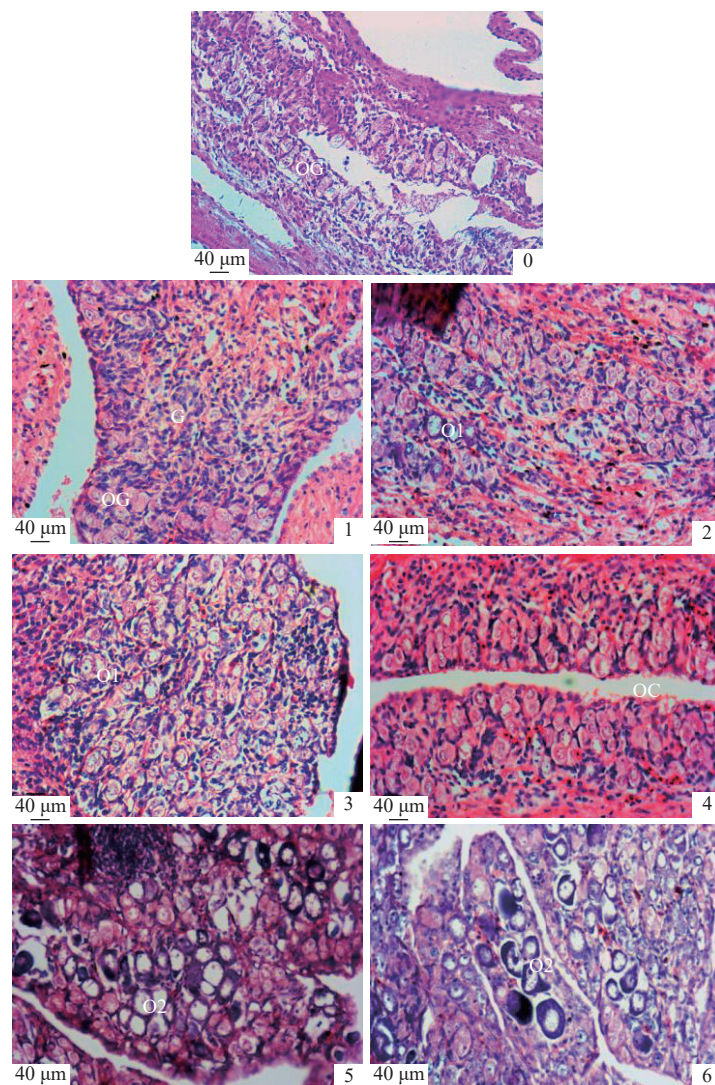
MT 投喂后第 10 天, MT 组精母细胞退化, 精巢性腺过渡到雌雄同体阶段, 处于兼性性腺 (图版 II -10); 对照组处于初级卵母细胞期 (图版 II -16)。MT 投喂后第 20 和 30 天, MT 组精巢性腺退化为卵巢性腺, 处于卵母细胞期 (图版 II -11~12); 而对照组一直处于卵母细胞期 (图版 II -17~18)。

2.3 foxl3 质粒注射斜带石斑鱼性别相关基因荧光定量表达分析

以 β -actin 为内参, 利用荧光定量 PCR 检测质粒注射后斜带石斑鱼性别相关基因 *amh*、*cyp19a1a*、*cyp11b*、*11 β -hsd2*、*rec8* 和 *sycp3* 的表达情况 (图 1)。雄性分化相关基因 *amh* 在质粒注射后第 10 天, 注射组的基因表达量较对照组高, 与对照组存在显著差异 ($P < 0.05$); 激素生成相关基因 *cyp19a1a* 在质粒注射后第 10 天, 对照组的基因表达量较注射组高, 与对照组存在显著差异 ($P < 0.05$); 而与激素生成相关的雄性发育相关基因 *cyp11b* 和 *11 β -hsd2*, 在质粒注射后第 10 天, 其基因表达量较对照组高 ($P < 0.05$); 精子发生相关基因 *rec8* 和 *sycp3* 在注射组中的基因表达量较对照组高 ($P < 0.05$)。质粒注射后第 20 和 30 天, *amh*、*cyp19a1a*、*cyp11b*、*11 β -hsd2*、*rec8* 和 *sycp3* 在注射组和对照组中的基因表达量无显著差异, 表明 *foxl3* 质粒注射对斜带石斑鱼性腺发育的调控作用可能具有剂量依存效应。

2.4 MT 投喂斜带石斑鱼性别相关基因荧光定量表达分析

以 β -actin 为内参, 利用荧光定量 PCR 检测 MT 投喂实验过程中斜带石斑鱼性别相关基因 *amh*、*cyp19a1a*、*cyp11b*、*11 β -hsd2*、*rec8* 和 *sycp3* 的基因表达情况。结果显示, 雄性分化 *amh* 基因



图版 I *foxl3* 重组质粒注射斜带石斑鱼性腺切片

图中 0 表示未注射时性腺形态；1、3、5 和 2、4、6 分别表示注射组以及对照组在质粒注射后第 10、20 和 30 天性腺组织形态变化；O1. 初级卵母细胞，O2. II 时相初级卵母细胞，G. 生殖原细胞，OC. 卵巢腔，OG. 卵原细胞；下同

Plate I Gonads slice of *foxl3* recombinant plasmid injected *E. coioides*

0 in the figure indicates the gonadal histology without injection; 1, 3, 5 and 2, 4, 6 respectively show the histology of gonad in the injection group and the control group on the 10th, 20th and 30th day after plasmid injection; O1. primary-growth stage oocyte, O2. stage II ovaries, G. gonium, OC. ovarian cavity, OG. oocyte; the same below

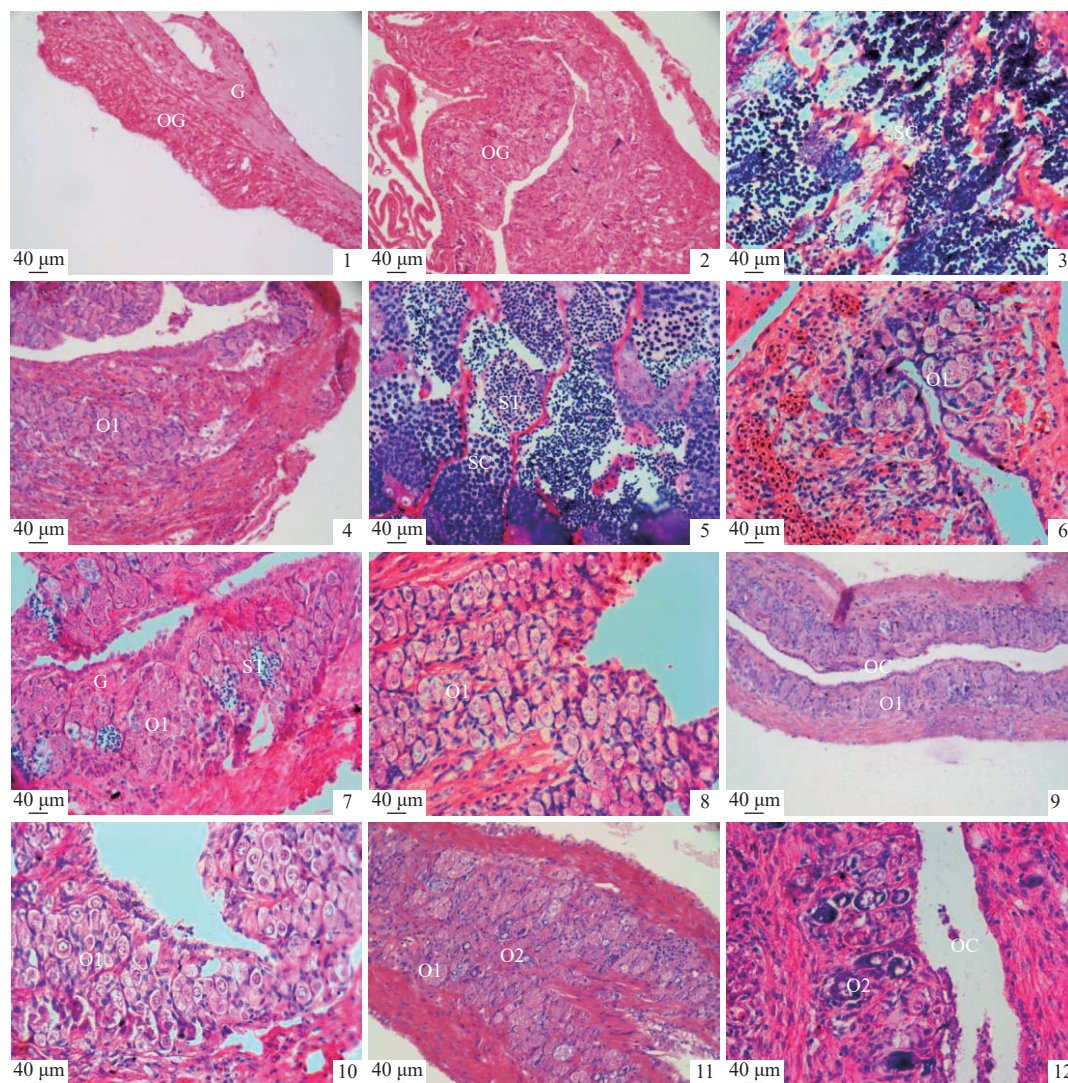
在 MT 投喂下，MT 组的表达量均高于对照组，而在停止投喂后，MT 组的基因表达量明显降低 (图 2)，说明 MT 投喂对雄性相关基因 *amh* 表达具有极显著上调作用 ($P < 0.001$)，而停止 MT 投喂后这种作用就降低了，甚至随着普通饲料的投喂而消失，对照组与 MT 组无显著差异。MT 投喂对 *cyp19a1a* 的表达具有极显著下调作用 ($P < 0.001$)，而对 *cyp11b* 和 *11 β -hsd2* 的表达具有极显著上调作用 ($P < 0.001$)。与精子减数分裂相关的基因 *sycp3* 和 *rec8* 在 MT 投喂的过程中，MT 组的基因表达量极显著高于对照组 ($P < 0.001$)，并且在停止激素

投喂后，投喂组的基因表达量明显降低，说明 MT 投喂对减数分裂相关基因 *sycp3* 和 *rec8* 的表达具有显著上调作用，当停止投喂后，这种作用就降低。

3 讨论

3.1 *foxl3* 重组质粒过表达以及 MT 投喂对性腺发育的影响

目前通过 lipo 试剂盒与质粒共转染，探究外源 DNA 体内重组的方法已被运用于小鼠 (*Mus*



图版 II MT 投喂斜带石斑鱼性腺切片

1、3、5、7、9、11 和 2、4、6、8、10、12 分别表示投喂组以及基础饲料组在激素投喂第 10、20、30 天，激素投喂后第 10、20、30 天的性腺组织形态变化

Plate II Gonads slice of MT fed *E. coioides*

1, 3, 5, 7, 9, 11 and 2, 4, 6, 8, 10, 12 respectively show the histology of gonad in the feeding group and the control group on the 10th, 20th and 30th day of MT feeding, and on the 10th, 20th and 30th day after MT feeding

musculus) 中^[9], 被证实该种质粒过表达实验是具有可行性的。脂质体包埋被多次运用于 siRNA 治疗疾病、突破血脑屏障传递药物^[10-16]等实验中, 因此, 在体注射重组载体的方式是可以将质粒转入目标细胞的。

amh 属于转化生长因子 β (TGF- β) 超家族, 参与雄性胚胎的发育。在哺乳动物中, *amh* 参与雄性性别分化、雌性卵泡的发育和性类固醇生成。Han 等^[17]研究发现, *amh* 过表达质粒投喂实验过程中, 雌性相关基因表达和血清 17 β -雌二醇水平下降, 雄性相关基因表达和血清 11-酮睾酮水平升

高, 卵巢退化, 精原细胞增殖, 说明 *amh* 过表达质粒投喂可诱导石斑鱼雌雄转换。在质粒注射后第 10 天, 注射组的 *amh* 基因相对表达量较对照组差异显著 (图 1), 且在雄激素诱导的前 30 d, MT 组的 *amh* 基因相对表达量较基础饲料组差异极显著 (图 2), 说明 *foxl3* 重组质粒的过表达以及 MT 投喂对性腺分化的表达具有调控作用。

Fan 等^[18]研究发现, 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 中, *foxl2* 表现出显著的性别二态表达模式, 对牙鲆细胞系细胞的共转染实验表明, *foxl2* 能单独或与核受体亚家族共同上调 *cyp19a1a* 的表达。

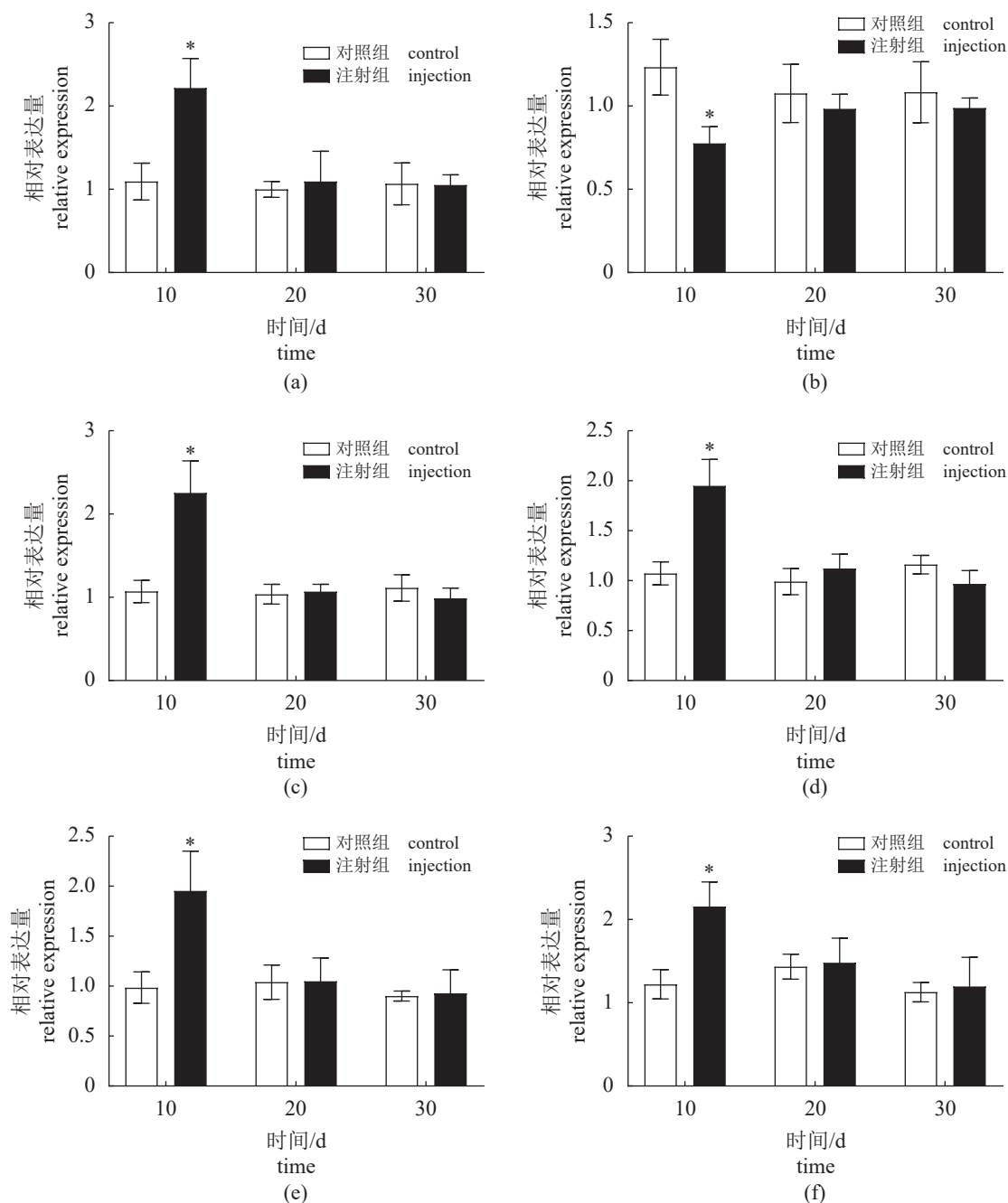


图 1 *foxB3* 重组质粒注射斜带石斑鱼性别相关基因荧光定量表达分析

图中横坐标 10、20、30 分别表示质粒注射后第 10、20 和 30 天; * $P < 0.05$, 表示同一时间点, 组间差异显著; 下同

Fig. 1 Real-time PCR expression analysis of sex related genes in *foxB3* plasmid injected *E. coioides*

(a) *amh*, (b) *cyp19a1a*, (c) *cyp11b*, (d) *11 β -hsd2*, (e) *rec8*, (f) *sycp3*; the abscissa 10, 20 and 30 in the figure represent the 10th, 20th and 30th day after *foxB3* injecting respectively; "*" represents the significant difference between groups at the same time point ($P < 0.05$); the same below

且 *foxl2* 和 *nr5a2* 抑制 *dmrt1* 的表达。此外, 黄鳍 (*Monopterus albus*) 中, 上调 *foxl2* 和 *cyp19a1a* 启动子 DNA 甲基化与性腺从卵巢到精巢的分化有关^[19]。Wang 等^[20] 研究发现, 小体鲟 (*Acipenser ruthenus*) 中, *foxl2* 在雌性中的表达较高。Zhang 等^[21] 研究发现, 纯合突变 *foxl2* 的尼罗罗非鱼 (*Oreochromis*

niloticus) 导致 XX 基因型个体性逆转, *foxl2* 通过上调 *cyp19a1a* 的表达和抑制雄性通路基因的表达而促进卵巢的发育。在质粒注射后第 10 天, 注射组的 *cyp19a1a* 基因相对表达量显著低于对照组 (图 1), 且在雄激素诱导的前 30 d 内, 投喂组的 *cyp19a1a* 基因相对表达量极显著低于基础饲料组

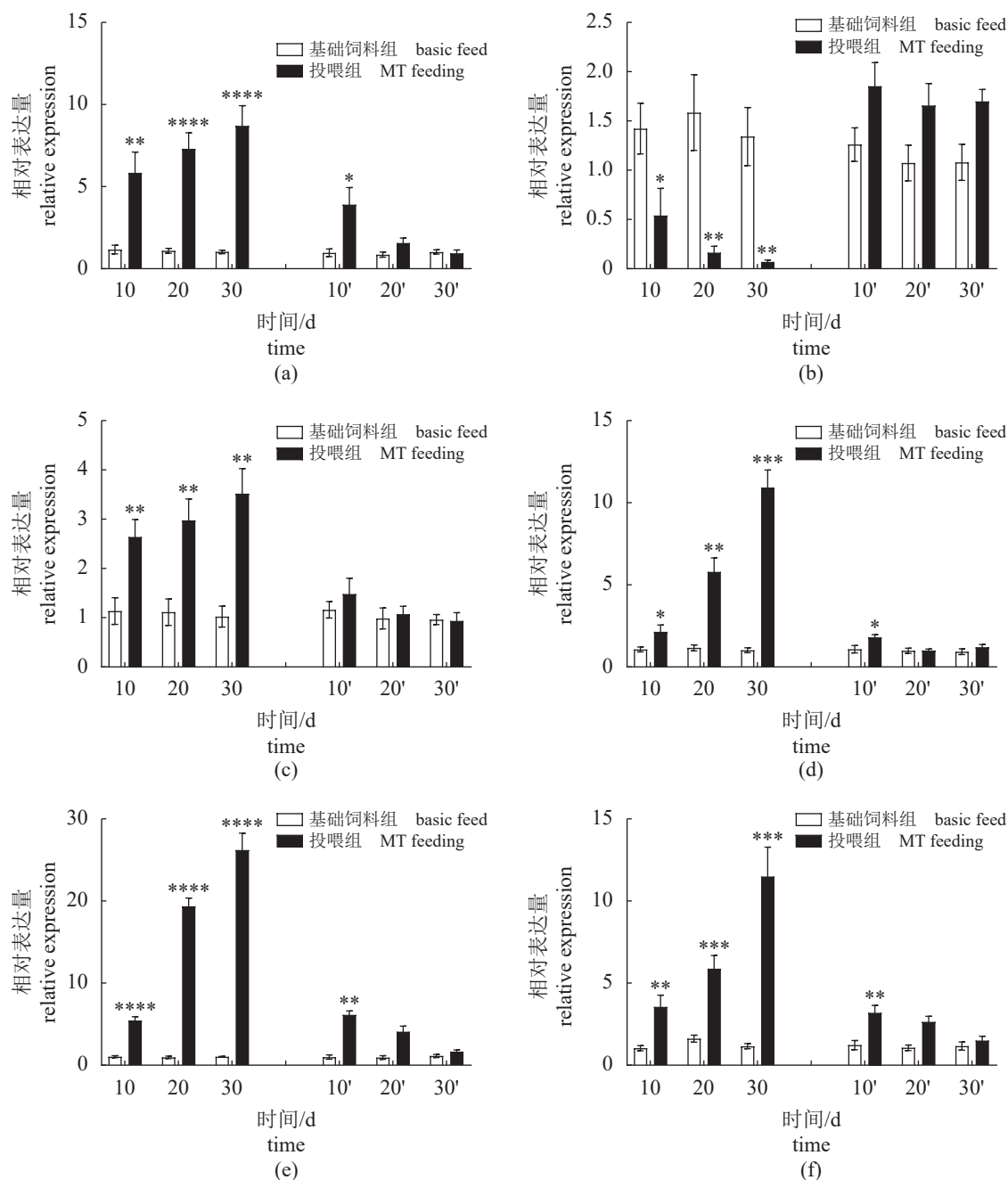


图2 雄激素(MT)投喂斜带石斑鱼性别相关基因荧光定量表达分析

图中横坐标 10、20、30 分别代表激素投喂第 10、20、30 天, 10'、20'、30' 分别代表激素投喂后第 10、20、30 天; **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$, 都表示同一时间点的组间差异显著

Fig. 2 Real-time PCR expression analysis of sex related genes in MT fed *E. coioides*

The abscissa 10, 20 and 30 in the figure represent the 10th, 20th and 30th day of MT feeding respectively, 10', 20' and 30' represent the 10th, 20th and 30th day after MT feeding respectively; **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$, all represent the significant difference between groups at the same time

(图 2), 说明 *foxl3* 重组质粒的过表达, 以及 MT 投喂导致了雌性相关基因 *foxl2* 的低表达, 从而下调了 *cyp19a1a* 的表达量, 证明 *foxl3* 重组质粒的过表达以及 MT 投喂对性腺分化的影响。

鱼类性腺发育受内源性激素的影响, 而外源

激素 MT 则会影响卵巢的进一步发育^[22-23]。11 β -羟化酶是由 *cyp11b* 催化合成皮质醇(图 3), 同时 11 β -羟化酶在硬骨鱼体内, 是精巢中催化 T 合成鱼类特有的雄激素 11-KT 的关键限速酶^[24-25]。近期, 一项研究表明, 通过去甲酮对斑马鱼 (*Danio rerio*)

下丘脑-垂体-肾上腺和下丘脑-垂体-性腺轴基因表达的影响发现, 皮质醇(*cyp11b*)基因的转录表达被抑制, 而孕酮途径的基因表达不受影响^[26]。在质粒注射后第 10 天, 注射组的 *cyp11b* 基因相对表达量较对照组差异显著 ($P<0.05$) (图 1), 且在 MT 诱导的前 30 d 内, 投喂组的 *cyp11b* 基因相对表达量较基础饲料组差异极显著 ($P<0.01$) (图 2)。

β -羟基类固醇脱氢酶 (β -HSD) 是一类参与甾体生物合成和代谢的甾体生成酶, 在哺乳动物的生理和发育过程中起着性别决定和分化的重要的作用^[27]。在质粒注射后第 10 天, 注射组的 11 β -*hsd2* 基因相对表达量显著高于对照组 (图 1), 且在 MT 诱导的前 30 d 内, 投喂组的 11 β -*hsd2* 基因相对表达量极显著高于基础饲料组 ($P<0.01$) (图 2)。

减数分裂是真核细胞分裂所特有的, 产生单倍体配子, 而 *rec8* 是减数分裂黏连蛋白复合物的关键组成成分, 在减数分裂过程中, 它是建立和维持姐妹染色单体凝聚力和形成联会以及同源染色体之间重组所必需的, 而且已被确定为雄育基因^[28-29]。减数分裂开始的特征是 *sycp3* 的表达, *sycp3* 是一种编码突触复合体蛋白的基因, 被认为是早期减数分裂的标志物^[30]。*sycp3* 基因敲除的纯合子雄性小鼠不育, 其睾丸体积明显变小并伴有大量生精细胞凋亡^[31]。减数分裂标记基因 *dmc1* 和 *sycp3* 在黄河鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus*) 孵化后 55 d 的雌性性腺中的表达量显著增加, 而 *sycp3* 在孵化后 100 d 的雄性性腺中的表达显著增加^[32]。Peng 等^[33] 研究显示, 日龄 180 d 的幼龄斜带石斑鱼性腺中减数分裂基因 *sycp3* 表达上调, 表明斜带石斑鱼生殖细胞大约在 180 d 进行减数分裂。本研究所用的实验鱼都是 180 d 的幼鱼, 且质粒注射后第 10 天, 注射组 *rec8* 和 *sycp3* 基因的相对表达量显著高于对照组 (图 1), 充分说明 *foxl3* 重组质粒过表达、MT 投喂促进了幼龄斜带石斑鱼性转变, 对幼龄斜带石斑鱼的性腺发育具有调控作用。

3.2 *foxl3* 重组质粒过表达与 MT 投喂对性腺分化的影响

目前, *foxl3* 重组质粒过表达的研究尚未被报道, 雄激素 (MT) 投喂实验曾被多次用于验证外源激素诱导斜带石斑鱼性转变实验中^[34], 但本研究不仅观察了雄激素诱导石斑鱼性转变过程, 而且也观察了雄激素退出后, 斜带石斑鱼由雄性性

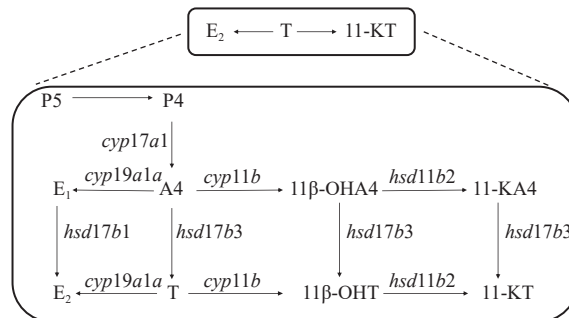


图 3 硬骨鱼类性类固醇激素变化关系^[23]

P5. 孕烯醇酮, P4. 黄体酮, 11-KA4. 11-酮基雄烯二酮, 11 β -OHT. 11 β -羟基睾酮, 11 β -OHA4. 11 β -羟基雄烯二酮, 11-KT. 11-酮基睾酮, T. 睾酮, 11 β -OHT. 11 β -羟基睾酮, E1. 雌酮, E2. 17 β -雌二醇

Fig. 3 Regulation of sex steroid hormones in teleost^[23]

P5. pregnenolone, P4. progesterone, 11-KA4. 11-ketoandrostenedione, 11 β -OHT. 11 β -hydroxytestosterone, 11 β -OHA4. 11 β -hydroxyandrostenedione, 11-KT. 11-ketotestosterone, T. testosterone, 11 β -OHT. 11 β -hydroxytestosterone, E1. estrone, E2. 17 β -estradiol

腺退化为雌性性腺, 并且用来与 *foxl3* 重组质粒在体过表达实验进行比较, 对人工诱导斜带石斑鱼性腺分化和发育更具有指导意义。

精子的发生依赖于支持细胞、间质细胞、肾小管周围肌样细胞和血管平滑肌细胞之间的自分泌和旁分泌通讯。而本研究中, 在质粒注射后第 10 天的注射组性腺切片中可以看到较多的体细胞, 而对照组的性腺基本都处于卵原细胞或卵母细胞期, 且间质细胞就是由体细胞发育而来的。花斑溪鱂 (*Rivulus marmoratus*) 中, *foxl3* 被发现在配子发生和性腺结构中起着至关重要的作用^[35]。黄鳝中, 在精巢中检测到强烈的 *Foxl3* 蛋白阳性信号, 且 *foxl3* 在兼性性腺中可以促进卵母细胞的退化, 刺激精子的产生^[36]。同时, 有研究表明, *foxl3* 可以诱导卵巢发育为精巢^[37]。此外, Lin 等^[38]通过体外细胞转染双荧光素酶实验分析, 发现外源雄激素可增强 *foxl3* 启动子活性, 而且 *foxl3* 可上调 *rec8* 启动子活性, 表明 *foxl3* 在精巢发育中起着决定性的作用, 同时本研究更进一步证明了在体实验过程中 *foxl3* 对于斜带石斑鱼精巢发育的关键作用, 表明其对斜带石斑鱼性腺发育具有重要影响。

本研究将利用 *foxl3* 重组质粒注射与 MT 投喂斜带石斑鱼幼鱼的方法进行对比, 发现质粒注射对斜带石斑鱼性腺发育具有雄性化的调控作用, 且这种作用可能具有剂量依存效应, 为探究调控斜带石斑鱼性腺发育的方法提供新的思路。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Ordyniec J, Czerski P, Sioch R. Case of ovarian tumor in a 10-year-old girl with gonadal dysgenesis, illustrating the need for evaluation of sexual development in the course of diagnostic procedures[J]. *Ginekologia Polska*, 1978, 49(9): 801-803.
- [2] Carlsson P, Mahlapuu M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism[J]. *Developmental Biology*, 2002, 250(1): 1-23.
- [3] Baron D, Cocquet J, Xia X H, *et al.* An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 33(3): 705-715.
- [4] Crespo B, Lan-Chow-Wing O, Rocha A, *et al.* *Foxl2* and *foxl3* are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 194: 81-93.
- [5] Bertho S, Pasquier J, Pan Q W, *et al.* *Foxl2* and its relatives are evolutionary conserved players in gonadal sex differentiation[J]. *Sexual Development*, 2016, 10(3): 111-129.
- [6] Wu G C, Jeng S R, Pan Y T, *et al.* The germline-specific expression of *Foxl3a* and its paralogous *Foxl3b* are associated with male gonadal differentiation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 277: 56-65.
- [7] Nishimura T, Sato T, Yamamoto Y, *et al.* *Foxl3* is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka[J]. *Science*, 2015, 349(6245): 328-331.
- [8] Lyu Q J, Hu J, Yang X K, *et al.* Expression profiles of *dmrts* and *foxls* during gonadal development and sex reversal induced by 17 α -methyltestosterone in the orange-spotted grouper[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 274: 26-36.
- [9] Wang Q X, Liu X, Zhou J H, *et al.* The CRISPR - Cas13a gene-editing system induces collateral cleavage of RNA in glioma cells[J]. *Advanced Science*, 2019, 6(20): 1901299.
- [10] Nikpoor A R, Jaafari M R, Zamani P, *et al.* Cell cytotoxicity, immunostimulatory and antitumor effects of lipid content of liposomal delivery platforms in cancer immunotherapies. a comprehensive *in-vivo* and *in-vitro* study[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 567: 118492.
- [11] Yuan B, Zhao Y R, Dong S Y, *et al.* Cell-penetrating peptide-coated liposomes for drug delivery across the blood-brain barrier[J]. *Anticancer Research*, 2018, 39(1): 237-243.
- [12] Yan H Y, Guo W H, Li K, *et al.* Combination of DESI2 and endostatin gene therapy significantly improves anti-tumor efficacy by accumulating DNA Lesions, inducing apoptosis and inhibiting angiogenesis[J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 371(1): 50-62.
- [13] Hemati M, Haghirsadat F, Yazdian F, *et al.* Development and characterization of a novel cationic PEGylated niosome-encapsulated forms of doxorubicin, quercetin and siRNA for the treatment of cancer by using combination therapy[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 1295-1311.
- [14] Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, *et al.* Effect of cationic lipid in cationic liposomes on siRNA delivery into the lung by intravenous injection of cationic Lipoplex[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2019, 27(2): 217-227.
- [15] Sethuraman S N, Singh M P, Patil G, *et al.* Novel calreticulin-nanoparticle in combination with focused ultrasound induces immunogenic cell death in melanoma to enhance antitumor immunity[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3397-3412.
- [16] Walunj M, Doppalapudi S, Bulbake U, *et al.* Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation of cyclosporine cationic liposomes for the treatment of psoriasis[J]. *Journal of Liposome Research*, 2020, 30(1): 68-79.
- [17] Han Y L, Peng C, Wang L, *et al.* Female-to-male sex reversal in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) caused by overexpressing of *Amh in vivo*[J]. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(6): 1205-1215.
- [18] Fan Z F, Zou Y X, Liang D D, *et al.* Roles of forkhead box protein L2 (*foxl2*) during gonad differentiation and maintenance in a fish, the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2019, 31(11): 1742-1752.
- [19] Wang X, Lai F L, Xiong J, *et al.* DNA methylation modification is associated with gonadal differentiation in *Monopterus albus*[J]. *Cell & Bioscience*, 2020, 10(1): 129.
- [20] Wang W, Zhu H, Dong Y, *et al.* Dimorphic expression

- of sex-related genes in different gonadal development stages of sterlet, *Acipenser ruthenus*, a primitive fish species[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(6): 1557-1569.
- [21] Zhang X B, Li M R, Ma H, *et al.* Mutation of *foxl2* or *cyp19a1a* results in female to male sex reversal in XX Nile tilapia[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(8): 2634-2647.
- [22] 姚文励, 姜鹏, 白俊杰. 17 α -甲基睾酮对草鱼性腺发育及性类固醇激素水平的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 801-809.
- Yao W L, Jiang P, Bai J J. Effects of 17 α -methyl-testosterone on gonadal development and hormone levels in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 801-809 (in Chinese).
- [23] Liu H, Todd E V, Lokman P M, *et al.* Sexual plasticity: a fishy tale[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2017, 84(2): 171-194.
- [24] 郑巧园. 11 β -羟化酶 (Cyp11b2) 在罗非鱼配子发生中的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- Zheng Q Y. Function of 11 β -hydroxylase (Cyp11b2) in gametogenesis of tilapia[D]. Chongqing: Southwest University, 2019 (in Chinese).
- [25] 赵会宏, 何琪, 张春丽, 等. 雌雄同体鱼类性别分化及性转变研究进展[J]. *水产学报*, 2022, 46(4): 644-656.
- Zhao H H, He Q, Zhang C L, *et al.* Research progress on sex differentiation and sexual transformation of hermaphroditic fishes[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(4): 644-656 (in Chinese).
- [26] Luo Y X, Chen H X, Li D, *et al.* The effects of norethindrone on the ontogeny of gene expression along the hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 747: 141554.
- [27] Xiao L, Guo Y, Wang D D, *et al.* Beta-hydroxysteroid dehydrogenase genes in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): genome-wide identification and expression analysis during sex reversal[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 161.
- [28] Bannister L A, Reinholdt L G, Munroe R J, *et al.* Positional cloning and characterization of mouse *mei8*, a disrupted allele of the meiotic cohesin *rec8*[J]. *Genesis*, 2004, 40(3): 184-194.
- [29] Griffin J, Emery B R, Christensen G L, *et al.* Analysis of the meiotic recombination gene *rec8* for sequence variations in a population with severe male factor infertility[J]. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2008, 54(3): 163-165.
- [30] Reynolds N, Collier B, Bingham V, *et al.* Translation of the synaptonemal complex component sycp3 is enhanced *in vivo* by the germ cell specific regulator Dazl[J]. *RNA*, 2007, 13(7): 974-981.
- [31] Yuan L, Liu J G, Zhao J, *et al.* The murine *SCP3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(1): 73-83.
- [32] Jiang M Y, Jia S T, Chen J, *et al.* Timing of gonadal development and dimorphic expression of sex-related genes in gonads during early sex differentiation in the Yellow River carp[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734825.
- [33] Peng C, Wang Q, Chen J X, *et al.* Retinoic acid and androgen influence germ cells development and meiotic initiation in juvenile orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 289: 113379.
- [34] Wang Q, Huang M W, Peng C, *et al.* MT-feeding-induced impermanent sex reversal in the orange-spotted grouper during sex differentiation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(9): 2828.
- [35] Qu M, Ding S X, Scharl M, *et al.* Spatial and temporal expression pattern of sex-related genes in ovo-testis of the self-fertilizing mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*)[J]. *Gene*, 2020, 742: 144581.
- [36] Gao Y, Jia D, Hu Q, *et al.* Foxl3, a target of mir-9, stimulates spermatogenesis in spermatogonia during natural sex change in *Monopterus albus*[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(11): 4388-4399.
- [37] Nishimura T, Nakamura S, Tanaka M. A structurally and functionally common unit in testes and ovaries of medaka (*Oryzias latipes*), a teleost fish[J]. *Sexual Development*, 2016, 10(3): 159-165.
- [38] Lin F M, Tong F, He Q, *et al.* *In vitro* effects of androgen on testicular development by the AR-foxl3-rec8/fbxo47 axis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 292: 113435.

Comparative study on the effect of over-expression of *foxl3* recombinant plasmid and 17 α -methyltestosterone (MT) feeding on gonadal development of *Epinephelus coioides*

ZHANG Chunli¹, HE Qi¹, CHENG Huitao¹, LI Lihua¹, RUAN Xinhe¹, DUAN Xuzhuo¹,
HUANG Fengqi¹, YANG Huirong^{1,2}, ZHANG Haifa³, SHI Herong³,
WANG Qing^{1,2*}, ZHAO Huihong^{1*}

(1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. University Joint Laboratory of Guangdong Province, Hong Kong and Macao Region on Marine Bioresource
Conservation and Exploitation, Guangzhou 510642, China;

3. Guangdong Marine Fishery Experiment Center, Huizhou 516081, China)

Abstract: In *Epinephelus coioides*, *foxl3* showed the expression characteristics of gender dimorphism, and the expression level of *foxl3* in testis of *E. coioides* was significantly higher than that in ovary and other tissues. In addition, *foxl3* is considered to play an important role in ovarian and testis development. In this study, by comparing the over-expression of *foxl3* gene in *E. coioides* with 17 α -methyltestosterone (MT) feeding, explored a new method of regulating gonad development in *E. coioides*. The gonadal development status was observed and the genes related to gonadal differentiation were detected and analyzed by real-time PCR after the injection of *foxl3* recombinant plasmid and MT feeding to three-month-old *E. coioides*. The results showed that the ovary of the injection group is smaller than that of the control group, and there are more somatic cells in the early stage of plasmid injection, and there is a trend of development in the male direction (there were testicular interstitial cells). The relative expression levels of male-related gene—*amh*, hormone-producing genes—*cyp11b*, *11 β -hsd2*, and spermatogenesis-related genes—*rec8*, *sycp3* genes in the early injection group after plasmid injection are significantly higher than those in the control group. In particular, gene expression in *amh*, *cyp11b* and *sycp3* injection groups was twice as high as that in control group. The gonads in the late MT feeding stage are in the obvious facultative stage, and the control group is still in the O2 oocyte stage. The relative expression trend of *amh*, *cyp11b*, *11 β -hsd2*, *rec8* and *sycp3* genes in MT feeding group is consistent with plasmid injection, but the difference between the feeding group and the control group is more significant than that of plasmid injection. Under the experimental conditions, the effect of MT feeding on the regulation of gonad masculinization is more obvious than that of *foxl3* plasmid injection. In conclusion, the above results showed that the over-expression of *foxl3* recombinant plasmid has a clear male regulatory effect on gonadal development of juvenile *E. coioides*, and this regulation may have a dose-dependent effect. The results laid the foundation for further study on testis development of *E. coioides*.

Key words: *Epinephelus coioides*; *foxl3* recombinant plasmid; 17 α -methyltestosterone (MT) feeding; over-expression; gonadal development

Corresponding authors: WANG Qing. E-mail: wangqing@scau.edu.cn;
ZHAO Huihong. E-mail: zhaohh@scau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31972768, 31972769, 41806151); Guangdong Province Science and Technology Plan Project (SDZX2020027); Heyuan Science and Technology Plan Project (2019041, 2021004); “Swan Plan” of Huizhou Science and Technology Innovation Team (20170214023102296); Provincial Special Fund for Promoting Economic Development in 2019 [YCN (2019) No. 111]