

鱼类原始生殖细胞与鱼类性别分化的关系

詹冰津, 池丽影, 张军玲, 张会会 (福建师范大学生命科学学院, 福建福州 350108)

摘要 在鱼类的性别分化中, 原始生殖细胞在雌雄二性中的增殖方式不同, 而且在部分鱼类中原始生殖细胞的缺失能导致其发育为单一雄性表型。在此过程中, 生殖细胞的特有基因 *vasa* 的剪接变体的二态性分布与鱼类原始生殖细胞的分化关系密切。

关键词 原始生殖细胞(PGCs); 性别分化; *vasa*

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)02-00622-03

Role of Fish Primordial Germ Cells in Sex Differentiation

ZHAN Bing-jin et al (College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108)

Abstract In fish sex differentiation, the proliferation ways of primordial germ cells in male and female are different, and some fish which lack primordial germ cells will develop into a single male phenotype. In this process, sexual dimorphic expression of a splice variant of germ cell specific gene *vasa* is close with primordial germ cell differentiation.

Key words Primordial germ cells(PGCs); Sex differentiation; *vasa*

鱼类的性别分化与性别决定机制相对于哺乳动物来说更为多样化。在哺乳动物中, 雄性性别决定主要是由 Y 染色体上的 *SRY* 基因决定, 而在鱼类中, 则涉及到多种影响因素: ①外源性激素; ②外界环境: 温度、种群密度、pH 和含氧量都能够影响鱼类的性别分化, 尤其是温度; ③遗传因素: 鱼类具有多种染色体组型, 同时在鱼类(除青鳉外)中很难找到与哺乳动物 *SRY* 对应的基因^[1]。目前, 对鱼类的性别决定及性别分分外侧重于环境因素的影响和遗传因素的分子机制, 而对原始生殖细胞在鱼类的性别分化的作用的研究相对较少。

原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)是指在生物胚胎发育过程中迁移至生殖腺原基前的生殖细胞, 其在迁移入生殖腺原基后具有 2 种发育潜能, 即发育为卵子或精子^[2]。该过程涉及到 2 种决定: ①决定 PGCs 是进入减数分裂进行配子发生或是进行有丝分裂形成成生殖干细胞; ②决定进行减数分裂的细胞是发育成卵子或是精子。在哺乳动物中, PGCs 发育为精子或卵子并不是由 PGCs 本身的基因型决定, 而是由胚胎性腺体细胞产生的信号决定分子作用决定^[3]: XY 型生殖细胞可在雌性生殖系嵌合体胚胎中发育为卵子; XX 型生殖细胞可在雄性生殖系嵌合体胚胎中发育为精原细胞^[4-5]。同时, PGCs 的缺失对哺乳动物卵巢发生和早期分化没有影响^[6-7]。然而, 在成熟的个体中缺失卵子细胞的卵泡能够抑制粒层细胞的成熟并诱使它们转化为 Sertoli 细胞, Sertoli 细胞为雄性性腺特有的类固醇激素合成细胞^[8]。这说明生殖细胞对于哺乳动物的性别分化或维持哺乳动物的性别分化具有一定作用。

目前的文献报道中, 在某些特定的鱼种中, 其 PGCs 对于性别分化尤其是卵巢的分化起到关键作用。另外, 在部分鱼类中生殖系特有基因 *vasa* 在个体性别分化过程中的二态性分布。笔者提供了几种模式鱼中的 PGCs 与其性别分化的关系。

1 PGCs 的增殖与鱼类的性别分化

鱼类的 PGCs 在进入生殖脊前先进行一波短暂的有丝分裂, 在随后的迁移过程中呈现有丝分裂惰性(即不增长)。在进入生殖脊后, 原始生殖细胞开始第 2 次有丝分裂, 以供减数分裂形成生殖细胞。

在青鳉中, 2 种基因型的幼鱼的 PGCs 迁移至生殖脊的数目一致, 但在 2 d 后基因型为雌性的性腺中的生殖细胞数目多于基因型为雄性的性腺^[9]。随后的研究发现, 青鳉 PGCs 的增长在基因型为雄性的性腺中受到抑制^[10]。同时, 对青鳉的 PGCs 在雌雄性腺的增殖方式的研究表明, 在雌性性腺中 PGCs 的增殖是持续的指数增长, 而在雄性性腺中 PGCs 的增殖是以间歇的线性增长^[11]。

PGCs 在雌雄性腺中的增殖方式不同, 导致了在 PGCs 的数量在雌、雄性腺中出现了差异, 这种差异对于鱼类的性别分化具有一定的影响。对青鳉的 *hotei*^[12] 突变体研究表明, 在这些突变体的成体中, 无论基因型为雄性还是雌性, 都在体型上表现为腹部膨大且充满性腺组织, 特别的是一半左右的基因型为雄性的鱼雌性化。与正常个体相比, 这些突变体在孵化后 PGCs 显著性增长。这说明 PGCs 数量的增加能诱使未分化的性腺向雌性性腺分化。

2 PGCs 的缺失在鱼类的性别分化过程造成的影响

鱼类的原始生殖细胞分化为精子或卵子, 通常被认为是由体内的微环境即性腺体细胞的影响决定的, 但在相关报道中却有不同的发现, 原始细胞的缺失会造成部分鱼类的表型二态化失败。

2.1 PGCs 的缺失造成青鳉性别分化失败^[13] *cxcr4* 基因在青鳉中参与 PGCs 在原肠胚时期的迁移, 同时对这一过程具有关键性作用。在青鳉胚胎发育早期注射 *cxcr4* Morholino 抗体使得 PGCs 在原肠胚时期迁移失败, 从而使性腺体细胞独立发育而不受生殖细胞的影响。对注射 *cxcr4* Morholino 抗体发育为成熟的青鳉个体进行观察, 发现基因型为雌性的个体出现雌性转为雄性的第二性征的性逆转, 即与正常个体相比, *cxcr4* Morphant 少了雌性第二性征的泌尿生殖乳突, 但多了雄性第二性征的臀鳍与背鳍。

作者简介 詹冰津(1987-), 女, 福建龙岩人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

收稿日期 2012-11-23

同时对这些个体进行组织学研究,结果表明无论 *cxcr4* Morpants 基因型为雄性或是雌性,都表现为一个半透明的单一管型缺失生殖细胞的性腺,这种性腺可认为是卵巢和精巢的前体。然而,在这些成体中未检测到芳香化酶的表达,即在 2 种基因型的成体中没有雌激素的生成。另外,在对这些个体的性腺的支持细胞的分析中发现,雌性粒层细胞标志基因 *Foxl2* 没有表达,同时基因型为雌性的 *cxcr4* Morpants 与正常的个体相比, *dmrt* 的表达更强。这说明在雌性 *cxcr4* morphants 中,无论是产生雌性固醇激素的细胞系还是雌性性腺特有的支持细胞系都已雄性化,即证明 PGCs 的缺失导致了青鳉鱼发生了雌性转为雄性的性逆转。

2.2 PGCs 对斑马鱼的卵巢分化具有关键性作用 利用多种基因敲除的方法消除了 PGCs 的鱼的成体在表型都显现为雄性,而且能够诱使正常雌性排卵^[14]。另外,对斑马鱼敲除 *dnd* 基因而导致 PGCs 缺失的成体的组织学研究表明,这些鱼体内存在缺失了生殖细胞的雄性性腺。对其 *amh*、*sox9a*、*cyp11b*、*3βHSD* 和 *cyp19a1a* 的基因表达进行分析,结果与组织学研究结果吻合^[15]。

在这些鱼中,检测不到 *cyp19a1a* 的表达^[15], *cyp19a1a* 编码能催化雄激素转换为雌激素的芳香化酶蛋白,在成体内主要在卵巢的卵泡细胞中表达^[16-17],也侧面说明在这些鱼种中卵泡细胞已经消失。

amh 为抗缪勒氏激素基因,在雄性性腺分化中期抑制缪勒氏管的形成,阻止雌性生殖器官的发育。*sox9a* 则是 *sox* 家族基因中的一员,在斑马鱼的性别分化中具有一定作用。在斑马鱼中, *amh* 和 *sox9a* 都在 Sertoli 细胞中表达^[18-19]。*cyp11b* 隶属细胞色素 P450 家族,编码 11β-羟化酶,能够激活 3β-羟脱氢酶(3β-hydroxysteroid dehydrogenase, 3βHSD),这 2 种酶参与睾酮的合成并在 Leydig 细胞中表达^[20-21]。而在经过 *dnd* 基因敲除后的斑马鱼种,其 *amh* 和 *sox9a* 的表达与正常雄性的表达一致^[15],说明 *dnd* Morpants 的 Sertoli 细胞和 Leydig 细胞都存在。这也证实了在 *dnd* Morpants 中存在雄性性腺。

在青鳉和斑马鱼中,性腺体细胞能够自主地分化为具有雄性性腺特征的性腺,而雌性性腺的分化则依赖于 PGCs 的存在。

3 鱼类原始生殖细胞特有基因与鱼类性别分化

鱼类性别分化的顶点,PGCs 分化为精原细胞或卵原细胞。在这个过程中,生殖系特有基因(如 *vasa*)对于配子发生的作用机制,仍不明确。然而,生殖系基因对于配子发生的作用与 PGCs 和性腺体细胞的作用密不可分。

vasa 基因属于 DEAD-box 家族基因,其最早发现于果蝇中,在随后的研究发现 *vasa* 基因特定表达于生殖系中。最近研究表明, *vasa* 基因不仅表达于生殖系中,还能表达在多功能细胞系中^[22]。对 *vasa* 基因在雌雄性腺中的研究及其在原始生殖细胞的迁移开展较为深入,而对 *vasa* 基因在鱼类的性别分化过程的雌雄二态化表达的研究则涉及不多。

在现有关于鱼类的文献报道中,在罗非鱼^[23]、在斑马

鱼^[24]、南方鲇^[25]中均发现 *vasa* 基因存在剪接变体,这些剪接变体即 *vasa* 基因转录为 RNA 后再经剪接形成。这些变体在鱼类的性别分化中作用未知,但其分布的性别二态性值得关注。

3.1 罗非鱼的 *vasa* 变体在性腺发育中的表达^[23] 在罗非鱼中, *vasa* 基因存在 2 种变体:一种编码 645 个氨基酸蛋白(*vas*),另一种编码 621 个氨基酸蛋白(*vas-s*)。 *vas-s* 与 *vas* 相比,其 N-端缺少了 2 个片段。 *vas-s* 在卵巢内的表达量强于 *vas*,相反地 *vas* 在精巢的表达量强于 *vas-s*。在罗非鱼胚胎发育过程中, *vas* 和 *vas-s* 在 2 细胞时期到原肠胚时期内都能被检测到。而当 PGCs 迁移至生殖脊后,仅有 *vas-s* 能检测出。这种现象在 2 种基因型都存在。在完成性别分化后的配子发生时期,2 种变体的表达量发生了变化, *vas* 再次出现雌雄性腺中,而 *vas-s* 则表达减弱。

3.2 斑马鱼的 *vasa* 变体的二态性分化^[24] 在斑马鱼中发现 *vasa* 基因具有二剪接变体,一种为 *vasa* 原有基因转录序列(即 *vas-l*),另一种则是缺失了第 4 个外显子(即 *vas-δ4*)。 *vas-l* 在卵巢的表达丰度约为在精巢中的 10 倍, *vas-δ4* 的分布则正好相反。

在斑马鱼个体发育过程中,从受精卵开始直至孵化后 2 d, *vas-l* 和 *vas-δ4* 都有表达,但孵化后 5~24 d 内, *vas-l* 几乎看不见明显条带,而 *vas-δ4* 能检测到。孵化后 25 d,可以明显检测到 *vas-l* 和 *vas-δ4*。而在第 25 天,根据形态学上的特征,斑马鱼的性别分化开始,紧接着 *vas-l* 重新在性腺组织中出现之后。在孵化 28 d 后, *vas-l* 表达量上升,同时出现二态性分布,即在部分鱼类中存在 *vas-δ4* 也存在 *vas-l*,而其他幼鱼样本中则只能单纯发现 *vas-δ4* 的表达。对 *vas-l* 和 *vas-δ4* 的进一步研究表明,体内存在 *vas-l* 和 *vas-δ42* 剪接变体的孵化后第 28 天及 28 d 后的个体为雌性,只表达 *vas-δ4* 变体的个体为雄性。

4 小结

鱼类的性别分化与哺乳动物相比更为复杂,具有不定性,导致了 PGCs 在不同的鱼种的性别分化中的影响的差异性。在以前的文献报道中,生殖细胞的第 2 次增殖时期在许多硬骨鱼中雌性分化的加速快于雄性分化。在三刺鱼^[26]中,原始生殖细胞的雌性特殊增殖代表了性别分化的开始。对青鳉的研究中代表了一种可能性,即原始生殖细胞的增殖可能诱导未分化的性腺朝卵巢分化。另外,PGCs 在青鳉、斑马鱼等部分鱼类的性别分化过程中对其卵巢分化具有决定性作用。在泥鳅^[27]与金鱼^[28]等鱼种中,PGCs 的缺失并未造成其表型二态化分化失败,对其卵巢体细胞的分化不产生影响。

目前,仍无法确定 PGCs 对于鱼类的性别分化的作用。在鱼类的性别分化中,体细胞能不受原始生殖细胞的影响自主分化为雄性性腺体细胞,而雌性性腺分化机制则相对复杂,在部分鱼类(如斑马鱼和青鳉)中,体细胞自治倾向于雄性化,而 PGCs 的存在改造了这个进程,使得性腺体细胞发育成雌性性腺。这说明在 PGCs 在参与鱼类的性别分化过程

中,可能存在有2种机制:①原始生殖细胞迁移入生殖脊后受周遭环境决定分化为精子或卵子;②原始生殖细胞与性腺体细胞之间的相互作用决定了鱼类的性别。

在性别分化中,*vasa*等生殖系特有基因的二态性表达。*vasa*基因在鱼类成体中对卵子发生和精子发生都具有重要作用,而在个体发育早期时对PGCs的分化作用也具有特殊的作用。斑马鱼与罗非鱼中存在的*vasa*剪接变体在其性别分化过程中的特殊性表达,证明*vasa*在这2种鱼的性别分化中具有一定的作用。而这种作用是否具有普遍性及其具体的机制,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 田佳,陈芸,王艺磊,等. 鱼类性别决定的影响因素[J]. 生命科学,2010(10):4.
- [2] YAMAHA E, GOTO-KAZETO R, SAITO T, et al. Primordial germ cell in teleost fish with special references to its specification and migration[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2010, 26(5): 816-822.
- [3] KOCER A, REICHMANN J, BEST D, et al. Germ cell sex determination in mammals[J]. Molecular Human Reproduction, 2009, 15(4): 205-213.
- [4] FORD C, EVANS E, BURTONSHAW M, et al. A functional sex-reversed oocyte in the mouse[J]. Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences, 1975, 190(1099): 187-197.
- [5] PALMER S J, BURGOYNE P S. In situ analysis of fetal, prepubertal and adult XX-XY chimaeric mouse testes; Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY[J]. Development, 1991, 112(1): 265-268.
- [6] MERCHANT-LARIOS H, CENTENO B. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/Wv mouse[J]. Progress in Clinical and Biological Research, 1981, 59: 383.
- [7] MERCHANT H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study[J]. Developmental Biology, 1975, 44(1): 1-21.
- [8] VAINIO S, HEIKKILÄ M, KISPERT A, et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling[J]. Nature, 1999, 397(6718): 405-409.
- [9] QUIRK J G, HAMILTON J B. Number of germ cells in known male and known female genotypes of vertebrate embryos (*Oryzias latipes*) [J]. Science, 1973, 180(89): 963.
- [10] KONDO M, NANDA I, HORNUNG U, et al. Evolutionary origin of the medaka Y chromosome[J]. Current Biology, 2004, 14(18): 1664-1669.
- [11] MORINAGA C, TOMONAGA T, SASADO T, et al. Mutations affecting gonadal development in Medaka, *Oryzias latipes* [J]. Mechanisms of Development, 2004, 121(7): 829-839.
- [12] MORINAGA C, SAITO D, NAKAMURA S, et al. The hotei mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(23): 9691-9696.
- [13] KUROKAWA H, SAITO D, NAKAMURA S, et al. Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(43): 16958-16963.
- [14] SLANCHEV K. From the Cover: Development without germ cells; The role of the germ line in zebrafish sex differentiation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(11): 4074-4079.
- [15] SIEGFRIED K R, NÜSSELIN-VOLHARD C. Germ line control of female sex determination in zebrafish[J]. Developmental Biology, 2008, 324(2): 277-287.
- [16] CHIANG E F L, YAN Y L, GUIGUEN Y, et al. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain[J]. Molecular Biology and Evolution, 2001, 18(4): 542-550.
- [17] KISHIDA M, CALLARD G V. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development[J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 740-750.
- [18] RODRIGUEZ-MARI A, YAN Y L, BREMILLER R A, et al. Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Müllerian hormone (Amh) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development[J]. Gene Expr Patterns, 2005, 5: 655-667.
- [19] CHIANG E F L, PAI C I, WYATT M, et al. Two Sox9 Genes on Duplicated Zebrafish Chromosomes: Expression of Similar Transcription Activators in Distinct Sites[J]. Developmental Biology, 2001, 231(1): 149-163.
- [20] NORDQVIST K, TÖHÖNEN V. An mRNA differential display strategy for cloning genes expressed during mouse gonad development[J]. The International Journal of Developmental Biology, 1997, 41(4): 627.
- [21] WANG X, BARTFAI R, SLEPTSOVA-FREIDRICH I, et al. The timing and extent of juvenile ovary phase are highly variable during zebrafish testis differentiation[J]. Journal of Fish Biology, 2007, 70: 33-44.
- [22] GUSTAFSON E A, WESSEL G M. Vasa genes: Emerging roles in the germ line and in multipotent cells[J]. Bio Essays, 2010, 32(7): 626-637.
- [23] KOBAYASHI T, KAJIURA-KOBAYASHI H, NAGAHAMA Y. Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish; their differential expression during germ cell differentiation[J]. Mechanisms of Development, 2002, 111(1): 167-171.
- [24] KRØVEL A V, OLSEN L C. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development[J]. Developmental Biology, 2004, 271(1): 190-197.
- [25] 胡重江, 吴风瑞, 刘智皓, 等. 南方鲂 Vasa 基因两种亚型 cDNA 的克隆及其表达[J]. 动物学报, 2009, 54(6): 1051-1060.
- [26] LEWIS Z R, MCCLELLAN M C, POSTLETHWAIT J H, et al. Female-specific increase in primordial germ cells marks sex differentiation in threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) [J]. Journal of Morphology, 2008, 269(8): 909-921.
- [27] FUJIMOTO T, NISHIMURA T, GOTO-KAZETO R, et al. Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(40): 17211-17216.
- [28] GOTO R, SAITO T, TAKEDA T, et al. Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish[J]. Developmental Biology, 2012, 370(1): 98-10.
- [13] 张宝乐, 任晋东, 李国勤, 等. 鸭蛋壳颜色定量测定与统计学分析[J]. 浙江大学农业学报, 2010, 36(5): 573-577.
- [14] 张宝乐, 李国勤, 章鹤, 等. 鸭 BLAVR 基因 cDNA 克隆及其在输卵管子宫部的 mRNA 表达量与青壳性状的相关性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(9): 1082-1089.
- [15] 陈晖, 檀扶扶, 曾安庆. 莆田黑鸭青壳蛋遗传规律的研究[J]. 福建农业科学院学报, 1991, 6(2): 71-74.
- [16] 袁青妍, 陶争荣, 李国勤, 等. 微卫星标记 AY493302 与缙云麻鸭蛋壳颜色的相关性分析[J]. 中国农学通报, 2010, 26(8): 12-16.
- [17] 王德前, 田勇, 李进军, 等. 蛋鸭 HSP60 基因 cDNA 克隆与序列分析[J]. 浙江农业科学, 2012(3): 405-412.
- [18] 吴旭, 严美姣, 刘丽平, 等. 促性腺激素释放激素基因 (GnRH) 和生长激素基因 (GH) 对番鸭产蛋性能的遗传效应分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(3): 289-295.
- [19] SU J L, LI S, HU X D, et al. Duck Egg-Drop Syndrome Caused by BYDV Virus, a New Tembusu-Related Flavivirus[J]. Plosone, 2011, 6(3): 1-10.

(上接第 610 页)

- [6] HE J, CHEN J C, LU L Z, et al. A novel SNP of liver-type fatty acid-binding protein gene in duck and its associations with the intramuscular fat[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39: 1073-1077.
- [7] DIMITRY A C, BART H, FILIP A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics[J]. Aquaculture, 2006, 255: 1-29.
- [8] 黄银花. 鸭遗传图谱的构建及重要性状基因座的初步定位[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [9] HUANG Y H, ZHAO Y H, HALEY C S, et al. A genetic and cytogenetic map for the duck (*Anas platyrhynchos*) [J]. Genetics, 2006, 173: 287-296.
- [10] 袁青妍, 陶争荣, 李国勤, 等. 绍兴鸭微卫星 DNA 遗传多样性分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 73-75.
- [11] 龚道清, 张红, 张军, 等. 高邮鸭微卫星 DNA 标记遗传多样性的研究[J]. 中国家禽, 2005, 27(21): 9-11.
- [12] 陶争荣, 卢立志, 赵有珍, 等. 青壳鸭蛋与白壳鸭蛋蛋壳厚度及某些营养成分[J]. 中国禽业导刊, 2002, 19(9): 30.