

Sox9 在温度依赖型性别决定中的功能初探*

张海艳 孙伟 周英杰 包海声 蔡晗 钱国英** 葛楚天**

(浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100)

摘要 在一些爬行动物中, 个体的性别完全取决于胚胎发育过程中的环境温度, 称之为温度依赖型性别决定(temperature-dependent sex determination, TSD). TSD 的分子机制长期是个谜, 特别是调控早期性腺分化的分子基础仍不清楚. 本文通过表达分析和基因敲低手段研究了 Sox9 基因在红耳龟雄性性腺分化中的生物学功能, 为 TSD 动物的性别决定和性腺发育的分子机制的研究奠定了基础. qRT-PCR 显示, 从性腺分化前的 17 期起, Sox9 呈现产雄温度(male-producing temperature, MPT)性腺特异性高表达, 而在产雌温度(female-producing temperature, FPT)性腺中表达水平极低. 免疫组化进一步证实了 SOX9 蛋白的 MPT 特异性表达趋势, 其定位于 Sertoli 前体细胞核中. 温度置换实验显示, 与 MPT 性腺相比, MPT→FPT 性腺中(16 期置换)的 Sox9 表达量从 17 期起就显著降低, 表明 Sox9 能快速响应温度变化. 同时 MPT 性腺经过雌激素处理后, Sox9 表达量亦快速下调. 功能缺失研究显示, 经过 Sox9-RNAi 处理后, 90.9%(20/22)的 MPT 性腺结构明显雌性化, 皮质区高度发育, 髓质区退化, 揭示 Sox9 的敲低能导致雄性向雌性性逆转. 上述研究表明, Sox9 是红耳龟早期睾丸分化的关键调控因子, 参与 TSD 的雄性分化通路.

关键词 Sox9 基因, 性逆转, 温度依赖型性别决定, 红耳龟, RNA 干扰

学科分类号 S917.4

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0376

在一些爬行动物中, 个体的性别完全取决于胚胎发育过程中的环境温度, 称之为温度依赖型性别决定(temperature-dependent sex determination, TSD). TSD 动物包含所有鳄鱼和大部分蜥蜴和龟类等(包括红耳龟, *Trachemys scripta*), 其主要特征是缺少性染色体, 较小孵化温度的改变能够决定子代是雄性或雌性^[1-6]. 跟哺乳类、鸟类等动物的基因型性别决定(genetic sex determination, GSD)相比, TSD 的分子机制更为复杂, 长期是个谜. 主要体现在两个科学问题的解析: a. 温度信号如何传递至生物体内, 转换成生物信号, 激活性腺分化的关键调控因子(基因)? b. 哪些(个)基因调控二态性(未分化)性腺向睾丸或卵巢分化? TSD 分子机理研究始于上世纪 90 年代, 主要集中在性激素介导调控和一些相关基因的克隆和表达分析研究, 但由于基因敲除和转基因等技术手段难以在 TSD 动物(如红耳龟)上实现的缘故, 并没有涉及基因的功能研究. 最近, 本实验室建立了一种红耳龟体内 RNA 干扰

和过表达方法, 并通过 *Dmrt1* 基因进行了有效性验证^[7], 这为 TSD 分子机理研究提供了一个至关重要的技术支持.

鳄鱼和红耳龟的最新转录组数据表明, 许多参与 GSD 调控的关键基因(如 *Dmrt1*、*Sox9*、*Amh* 和 *Foxl2* 等)在 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^[8-9],

* 浙江省自然科学基金(LY14C190008)、浙江省农业(水产)新品种选育重大科技专项(2016C02055-4-1)、宁波市农业重大项目(2017C110012)和浙江省重中之重学科“生物工程”开发基金(ZS2016007, ZS20170011)资助项目.

** 通讯联系人.

钱国英. Tel: 0574-88223277, E-mail: qianguy@zwu.edu.cn

葛楚天. Tel: 0574-88223277, E-mail: cge@zwu.edu.cn

收稿日期: 2017-09-28, 接受日期: 2018-04-17

这提示这些基因在性别决定方式的进化过程中是保守的. 在参与性别决定和性腺分化的关键基因中, *Sox9*(SRY-related HMG box gene 9)基因是在动物间高度保守的基因, 具有 SOX 家族高度保守的 HMG 结构域. 小鼠中, 在缺乏 *Sry* 基因时, *Sox9* 的表达将开启雄性性别决定通路, 且 *Sox9* 的缺失将会引起雄性向雌性的逆转^[10]. 在鸟类中, *Sox9* 在雄性性腺中表达显著高于雌性性腺, 参与睾丸分化过程^[11]. 西伯利亚鲟鱼 *Sox9* 则参与后期精巢的分化^[12]. 在 TSD 动物中, 乌龟 *Sox9* 在早期 MPT 性腺中的表达量高于 FPT 性腺, 但鳄鱼 *Sox9* 则是睾丸决定后才出现上调. 最近研究发现, FPT 红耳龟胚胎进行芳香化酶抑制剂处理后, 向雄性性逆转, *Sox9* 的表达则显著上调^[13-15]. 以上研究表明, *Sox9* 很可能参与 TSD 动物的雄性性别分化过程, 但其具体的调控作用和生物学功能还不清楚.

为了研究 *Sox9* 在 TSD 中的具体功能, 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 *Sox9* 在红耳龟早期睾丸分化中的具体功能, 为 TSD 分子机理的解析奠定基础.

1 材料与方法

1.1 红耳龟受精卵孵化及胚胎采集

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. 将采集的受精卵埋入蛭石中, 置于孵化盘上, 盖上海绵放入孵化箱孵化, 将孵化箱温度设置为 26°C (MPT) 和 32°C (FPT), 湿度控制在 80% 左右, 并实时监测温度和湿度是否达标. 孵化 2d 后, 观察每盘边缘的受精卵是否因缺水而凹陷; 孵化 6d 后, 弃去此时还没有明显受精斑的卵, 调整动物极, 使其向上发育. 当红耳龟胚胎孵育至第 16 期 (St.16) 时, 分别将 150 枚龟卵从 MPT 或 FPT 移至 FPT 或 MPT 后继续孵化. 孵化过程中, 按照红耳龟胚胎发育图谱^[16], 收集各组不同发育时期的胚胎性腺, 用于总 RNA 提取和组织形态学分析. 实验操作程序符合国家及浙江万里学院制订的有关实验动物操作规则和制度.

1.2 雌激素(E2)处理

红耳龟胚胎在恒温恒湿培养箱孵化至 St.16 时, 对 MPT 龟卵进行雌二醇 (17 β -estradiol, E2, Sigma, 美国) 处理, 在正对胚胎的卵壳位置上滴加 10 μ l 95% 乙醇(对照组)或 20 g/L (25.64 mg/kg) E2,

每组设 150 枚龟卵; 第二天, 重新滴加相同剂量的上述药物. 置于相同环境下继续孵化, 收集 17、18、19、21、23、25 期胚胎性腺用于总 RNA 提取.

1.3 慢病毒载体 LV-*Sox9*-shRNA 的构建及龟胚感染

根据已知的红耳龟 *Sox9* 基因编码区序列, 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 *Sox9* 慢病毒干扰载体 (LV-*Sox9*-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 (10⁶ U/L, 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. *Sox9*-shRNA 寡核苷酸序列为 5' GGAGGAGAAAGTCAGTGAAGA 3'. 红耳龟受精卵在以上恒温恒湿环境下孵化至 St.15 时向 MPT 胚胎注入 10 μ l 慢病毒液 (1 \times 10⁶ U/L). 实验中分别在 MPT 及 FPT 孵化温度下设置空载体对照组 (LV-NC-shRNA), 每组设 300 枚龟卵. 注射完毕后置于相同环境下继续孵化, 收集 25 期胚胎用于性腺提取.

1.4 RNA 提取和 cDNA 合成

按 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, 美国) 操作方法, 从红耳龟不同发育时期的胚胎性腺中提取总 RNA, 用重组脱氧核糖核酸酶 I (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) 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, 美国) 合成 cDNA, 用于 *Sox9* 基因 mRNA 水平表达分析.

1.5 qRT-PCR

根据已知的红耳龟 *Sox9*、*Gapdh* 基因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 μ l 反应液体系: SYBR[®] Premix 6.25 μ l, Forward Primer 0.5 μ l, Reverse Primer 0.5 μ l, cDNA 模板 1 μ l, dH₂O 4.25 μ l, 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°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s; 58°C 退火 30 s; 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^{- $\Delta\Delta$} 方法计算 *Sox9* 在红耳龟性腺中的相对表达量, 引物见表 1.

Table 1 Primer list

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
<i>Gapdh</i> -F	GGCTTCCGTGTTCCAACCTC
<i>Gapdh</i> -R	GACAACCTGGTCTCCGTGTATC
<i>Sox9</i> -F	CAGTCCGAGCCATTACAGCG
<i>Sox9</i> -R	GCGGGTGATGGTCGGGTA

1.6 石蜡切片和苏木素-伊红染色

将取出的性腺组织保存于 4% 多聚甲醛内, 4℃ 固定 24 h 后, 转入 50% 乙醇脱水 2 h, 置于 70% 乙醇中 4℃ 长期保存. 在体视显微镜下进行组织形状修正, 经过乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、进行常规石蜡连续切片、以 5~7 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、苏木素核染、分化、伊红染色、脱水、封片. 于正置显微镜(Nikon)下观察拍照.

1.7 免疫荧光染色

将切片进行二甲苯脱蜡, 由高到低梯度乙醇渗透后, 放入 0.01 mol/L 柠檬酸钠溶液, 95℃ 抗原修复 20 min, 冷却至室温. 在封闭液(5% 正常驴血清, 3% 牛血清白蛋白, 0.3% Triton X-100)中室温孵育 1 h, 吸去组织周边多余液体, 分别加兔抗 *Sox9*(1 : 500, AB5535, Millipore, 美国)、鼠抗 GFP(1 : 250, Abcam)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 10 min, 重复 3 次, 在室温避光环境下, 滴加驴抗兔 IgG594(1 : 500, A21207, Invitrogen, 美国)和驴抗鼠 IgG488(1 : 500, A21202, Invitrogen), 孵育 1 h, 用 PBST 清洗 10 min, 重复 3 次. 滴加 DAPI(286 nmol/L, Sigma)液室温避光染色 5 min, 用 0.01 mol/L PBS 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 Sox9 的温度依赖型表达模式

为了研究 *Sox9* 基因在温度依赖型性别决定中的作用, 我们首先分析了 *Sox9* 在胚胎不同发育时期雌雄性腺中的表达情况. qRT-PCR 结果显示, 第 17 期时, *Sox9* 在产雄温度(MPT)性腺中的表达

量显著高于产雌温度(FPT)性腺, 早于性腺分化启动时间——第 19 期. 随着胚胎发育, *Sox9* 在 MPT 性腺中的表达量逐步增加, 至第 22 期达到最高值, 此后维持高水平表达. 而在 FPT 性腺中, *Sox9* 在整个胚胎发育过程中始终维持极低的表达水平(图 1).

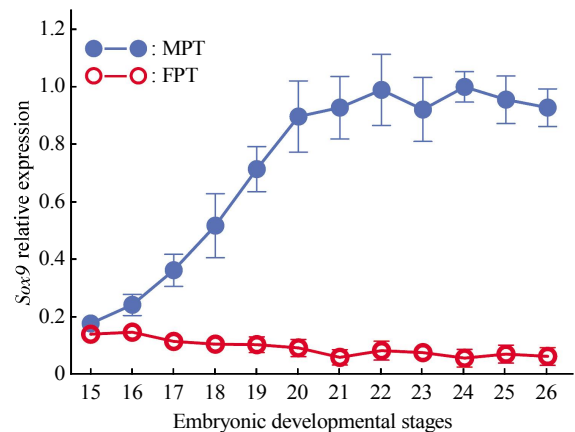


Fig. 1 The expression pattern of Sox9 gene in embryonic gonads of *T. scripta*

The mRNA expression of *Sox9* in gonads of different stages (15–26) at MPT (26℃) and FPT (32℃), determined by qRT-PCR analysis; *Gapdh* was used as a reference gene. *Sox9* exhibited a highly MPT-specific expression pattern in early embryonic gonads. Data are mean±s.d.; $n \geq 3$.

本文通过免疫荧光染色进一步分析了 SOX9 蛋白在 MPT 和 FPT 下不同发育时期胚胎性腺中表达差异和细胞定位, 以 β 联蛋白(β-catenin)免疫荧光染色来辅助显示性腺结构. 如图 2 所示, 在性腺分化之前的第 17、19 期 MPT 性腺中, SOX9 蛋白大量表达, 定位于体细胞核中, 生殖细胞中未见表达, 而此时期 FPT 性腺中并未检测到 SOX9 蛋白表达. 至第 21 期, 红耳龟性腺分化已经基本完成, MPT 性腺皮质区退化, 髓质区发育, 雄性性索形成, 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, SOX9 蛋白大量定位于 MPT 性腺支持细胞前体细胞细胞核中, 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, SOX9 蛋白大量表达. 而 FPT 性腺皮质进一步发育, 髓质退化, 始终未检测到 SOX9 蛋白表达的的信号(图 2).

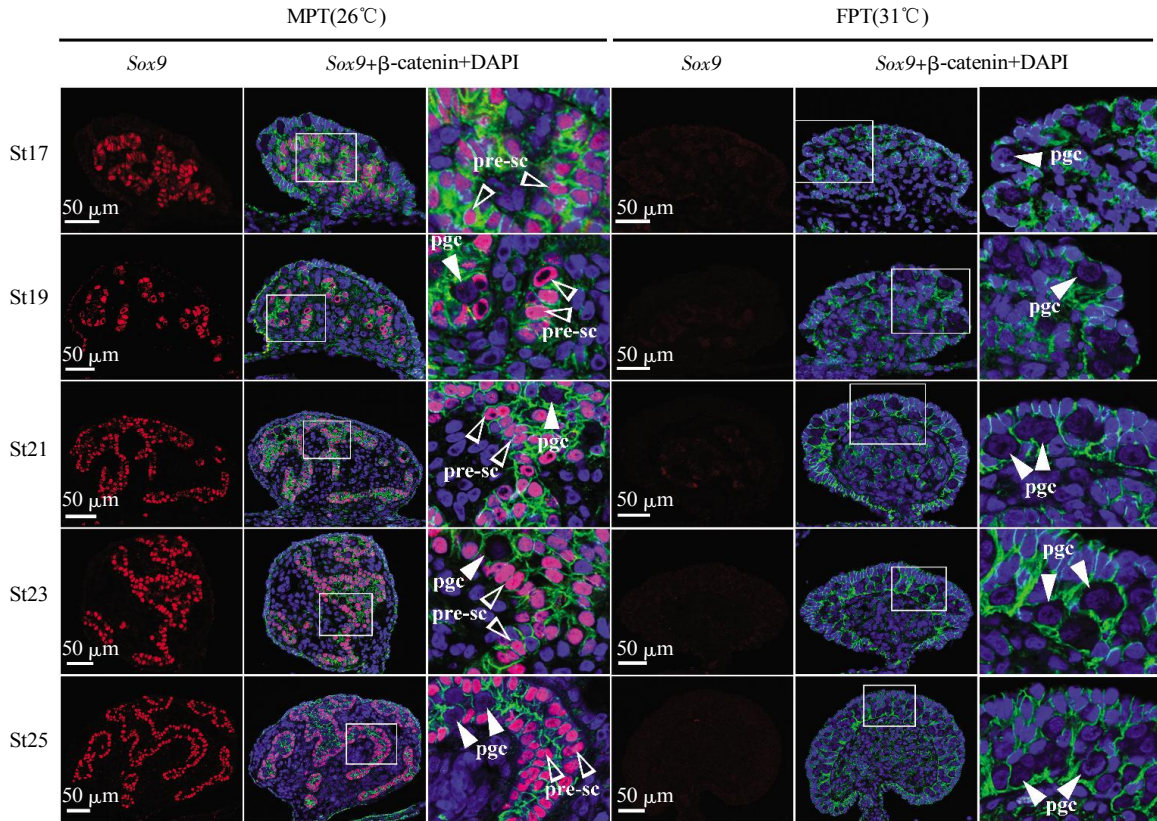


Fig. 2 The expression and cellular localization of SOX9 protein in MPT and FPT embryonic gonads of different developmental stages

Immunofluorescence detection of SOX9 protein in the gonads of different stages (17-25) at MPT and FPT. SOX9 protein was mainly localized in the nucleus of pre-Sertoli cells in the medulla of the MPT gonads. pre-sc, pre-Sertoli cells; pgc, primordial germ cells.

为了进一步研究 *Sox9* 基因在温度诱导的性别决定中的作用，我们进行了温度置换实验，探究 *Sox9* 的表达是否随着温度改变而发生改变，以及这种应激反应的速度。16 期时设置的 MPT→FPT 温度置换实验显示，与 MPT 性腺相比，MPT→FPT 性腺中 *Sox9* 的表达量在 17 期时就开始显著降低，19 期时，其表达水平已经下调至同期 FPT 性腺水平(图 3)。这说明，*Sox9* 能够迅速响应新的 FPT 孵化温度。相反，在 FPT→MPT 过程中，*Sox9* 表达显著上调，至 21 期时甚至超过了同期 MPT 水平。以上结果表明，在性腺分化之前，*Sox9* 能对温度变换做出快速响应，其表达方式属于温度依赖型，很有可能参与 TSD 早期雄性分化过程。

2.2 雌激素对 Sox9 的表达调控

在大部分脊椎动物中，外源性雌激素在性别决定和性腺分化中扮演重要的调控作用。它能掩盖温

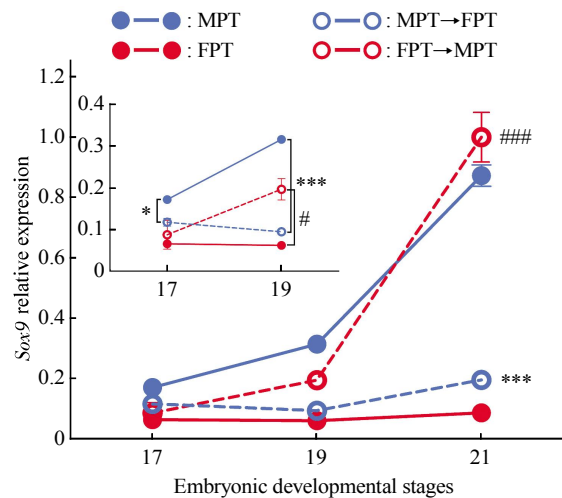


Fig. 3 The response of Sox9 to temperature shifts in *T. scripta*

qRT-PCR of *Sox9* in embryonic gonads at stage 17, 19, 21 after temperature shifts, showing the temperature-dependence of *Sox9*, prior to gonadal sexual differentiation. Data are mean±s.d.; **P* < 0.05; ***P* < 0.001; *n* ≥ 3.

度敏感时期(TSP)的温度效应, 通过调控性别决定关键基因的表达来重新确定性腺的分化方向^[17-18].

为了进一步明确 *Sox9* 在 TSD 雄性性腺分化中的调控作用, 我们分析了 E2 处理后的 MPT 性腺中 *Sox9* 的表达变化. qRT-PCR 显示, MPT 胚胎在 16 期经过 E2 处理后, *Sox9* 的表达量在 17 期就开始急剧下调(与 MPT 对照组相比), 接近于 FPT 对照组水平, 贯穿此后胚胎发育过程(图 4). 这表明, *Sox9* 的表达受雌激素调控, 且这种调控作用发生在性腺分化前的 17 期, 提示: 雌激素可能通过抑制 *Sox9*, 来抑制雄性通路.

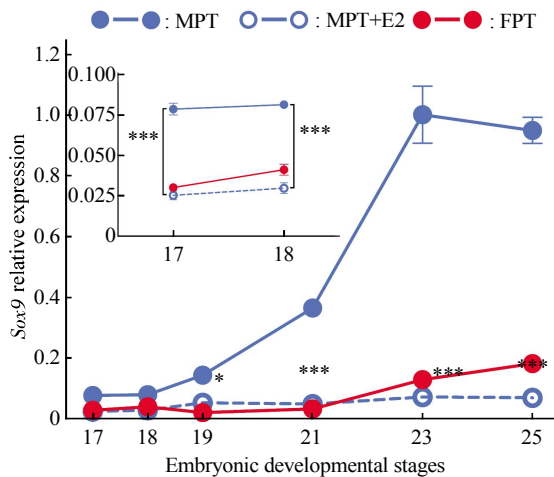


Fig. 4 Timecourse response of *Sox9* to E2 treatment in *T. scripta*

qRT-PCR analysis of *Sox9* in gonads treated with E2 at stage 17, 18, 19, 21, 23 and 25, exhibiting a rapid response to 17 β -estradiol (E2) treatment. Data are mean \pm s.d.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; $n \geq 3$.

2.3 *Sox9* 的功能缺失研究

为了研究 *Sox9* 在 TSD 中的生物学功能, 我们先前在红耳龟上建立了一种有效的基因操纵方法^[7]. 本研究中, 我们向 15 期 MPT 红耳龟胚胎注射了携带 LV-*Sox9*-shRNA-GFP 的慢病毒, 观察 *Sox9* 敲低后 MPT 胚胎能否向雌性性逆转. 为了验证此慢病毒载体系统能否有效感染红耳龟胚胎, 首先测定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, 慢病毒注射组的胚胎大部分组织均匀呈现强烈的绿色荧光信号(如图 5A~A'), 待发育至 25 期时, 发现慢病毒注

射组的胚胎性腺组织仍可检测到大量而分布均匀的 GFP 信号(如图 5C~C'). 性腺切片的 GFP 染色结果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(图 5E~F). 而在对照组胚胎中未检测到 GFP 信号(图 5B、D、G). 由此表明慢病毒载体系统能在红耳龟胚胎性腺组织中高度稳定地表达.

在进行 *Sox9* 功能验证之前, 我们检测了 LV-*Sox9*-shRNA 处理后, SOX9 蛋白的表达情况. 免疫组化结果显示, 对照组 MPT 胚胎性腺 SOX9 蛋白大量定位于 Sertoli 前体细胞细胞核中, 围绕原始生殖细胞(图 6A), FPT 胚胎性腺未见 SOX9 蛋白表达(图 6C). 而 LV-*Sox9*-shRNA 处理后的 MPT 胚胎性腺, SOX9 蛋白表达急剧下调, 几乎没有表达, 接近于 FPT 性腺中 SOX9 的表达量(图 6B), 这说明 LV-*Sox9*-shRNA 对 *Sox9* 基因的干扰效果非常强.

另外, β -catenin 是一种细胞黏附蛋白, 与细胞膜上钙黏着蛋白(cadherin)结合, 参与细胞的黏附作用. 免疫荧光染色结果显示, 在巴西龟性腺组织中, β -catenin 主要定位于雄性性腺髓质区的性索体细胞膜以及雌性性腺皮质区的体细胞膜上(图 6A'~A'', C'~C''). *Sox9* 敲低后 MPT 胚胎性腺, 其结构明显发生改变, 皮质区由单细胞层变成高度发育的多细胞层, β -catenin 在皮质区开始大量表达; 而包含原始性索的髓质区则明显退化, 其中 β -catenin 表达显著降低, 彻底向雌性性腺逆转(图 6B'~B'').

接下来, 通过组织形态学方法对 *Sox9* 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(雄性)胚胎性腺形态短且粗圆(图 7A), 对照组 FPT(雌性)胚胎性腺形态细长扁平(图 7C). 而 *Sox9* 敲低后的 MPT 胚胎性腺明显变细变长且呈扁平状, 明显雌性化(图 7B). 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层细胞, 髓质区高度发育形成原始性索, 生殖细胞位于其中(图 7D、7G); 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, 伴有空洞区的出现(图 7F、7I). *Sox9* 敲低后的 MPT 性腺内部结构发生明显的变化, 皮质区继续发育并含有大量生殖细胞, 髓质区退化, 形成空洞区, 呈现彻底的雄性向雌性性逆转(图 7E、7H).

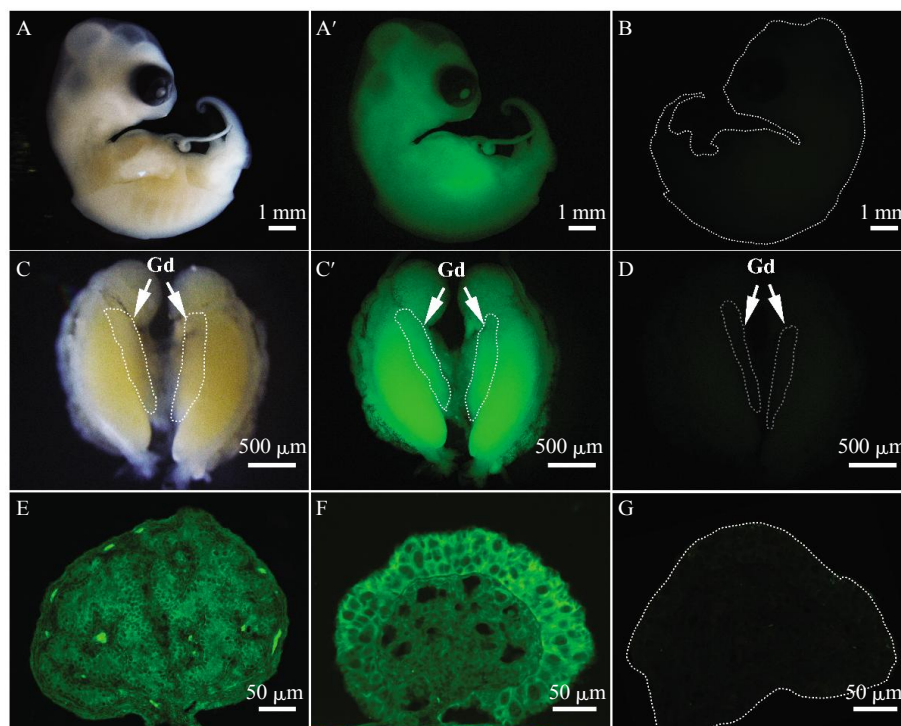


Fig. 5 GFP expression in turtle embryos following lentiviral infection

(A, A') Bright and epifluorescence images of whole embryos of stage 16 infected with scrambled lentiviral vector (LV-NC) at stage 15. (B) Epifluorescence image of embryos at stage 16 without virus injection. (C, C') Bright and epifluorescence images of GFP expression in gonad-mesonephros complexes from stage 25. (D) No GFP expression in the urogenital system of stage 25 embryos without virus treatment. Gd, gonad; Ms, mesonephros. (E) GFP expression in gonadal section from stage 25 MPT embryos treated with scrambled viral vector. (F) GFP expression in gonadal section from stage 25 MPT embryos treated with LV-*Sox9*-shRNA. (G) No GFP expression in gonadal section from stage 25 FPT embryos without virus injection.

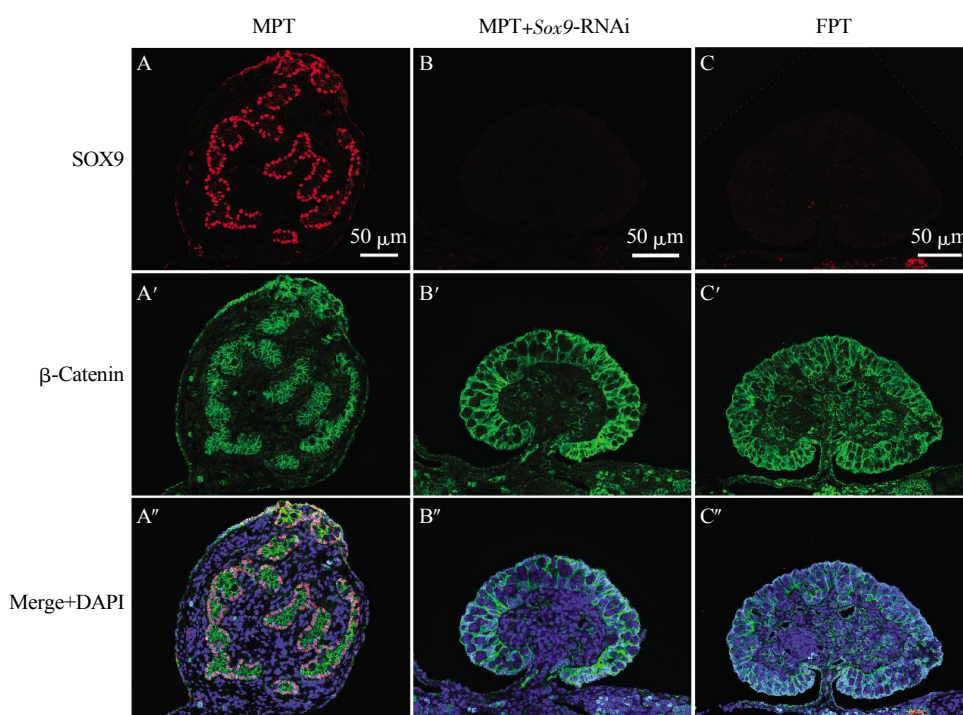


Fig. 6 The expression of SOX9 protein in MPT gonads with treatment of LV-*Sox9*-shRNA at stage 25

Double immunofluorescence of SOX9 and β -catenin in stage 25 gonads from indicated embryos.

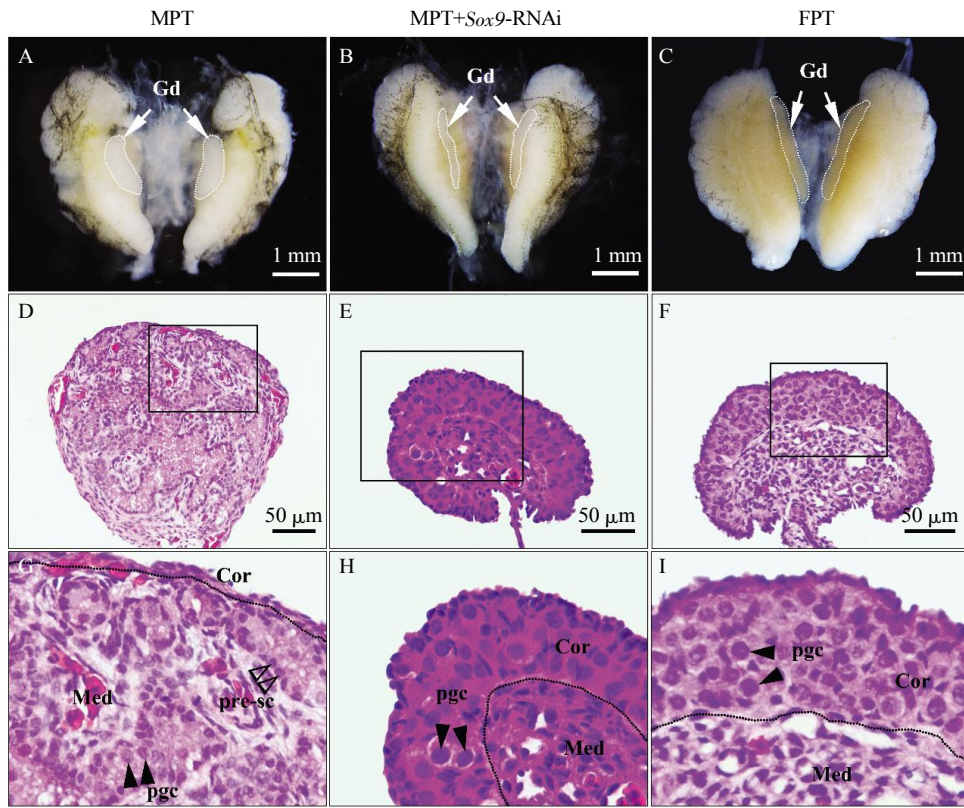


Fig. 7 Histological analysis of MPT gonads with Sox9 knockdown at stage 25

(A–C) Representative images of the gonad-mesonephros complexes from MPT, MPT+*Sox9*-RNAi and FPT embryos at stage 25. Gd, gonad. (D–F) H&E stain of gonad sections from MPT, MPT+*Sox9*-RNAi and FPT embryos at stage 25. (G–I) Enlarge images for D–F. The dashed line indicates the border between medulla and cortex. pgc, primordial germ cells; pre-sc, pre-Sertoli cells; Cor, cortex; Med, medulla.

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

Sox9-RNAi 处理的 MPT 胚胎中, 90.9%(23/25)逆转 为雌性或具有卵巢的间性, 性逆转率极高(表 2).

Table 2 Phenotypes of stage 25 embryos with Sox9 knockdown

Incubation temperature	Viral treatment	No. of embryos with high GFP expression	No. of developing testes	No. of developing ovaries	Sex reversal rate (%)
MPT(26°C)	LV-NC-shRNA	36	36	0	0/36 (0%)
MPT(26°C)	LV- <i>Sox9</i> -shRNA	22	2	20	20/22(90.9%)
FPT(32°C)	LV-NC-shRNA	37	0	37	0/37(0%)

Phenotype of embryos was assessed by gonadal histology.

3 讨 论

TSD 从发现至今, 经历了长达半世纪的研究, 但其分子机理仍然不是十分清楚, 特别哪些(个)基因调控未分化性腺向睾丸或卵巢分化? 本研究发

现, 脊椎动物雄性特异性基因 *Sox9* 在温度敏感期 (TSP) 的红耳龟性腺中呈现低温(雄性)特异性表达趋势, 且其能够快速响应温度变换和雌激素处理. 重要的是, *Sox9* 的敲低能够导致 MPT 性腺向雌性性逆转, 表明 *Sox9* 是红耳龟早期睾丸分化的关键调

控因子, 参与 TSD 的雄性分化通路。

Sox9 基因在脊椎动物性别决定和性腺分化中高度保守^[13, 19-20]。对鸡和小鼠的研究中发现, 其 SOX9 蛋白序列存在 91.3% 的相似性, 推测以鸡和小鼠为代表的脊椎动物中, *Sox9* 基因可能扮演了一个发挥类似睾丸决定因子的角色。其中, 在 XY 小鼠中, *Sry* 基因缺失后, *Sox9* 能够代替 *Sry* 通过激活雄性发育相关基因进而促进睾丸的分化; 而在 ZW/ZZ 鸡的性别决定中, *Dmrt1* 基因同哺乳动物 *Sry* 一样扮演着主控基因的角色^[21], 但不能被 *Sox9* 替代, *Sox9* 作为早期睾丸发育相关基因, 仅发挥雄性特异性转录因子的功能^[19]。另外, 在 TSD 物种美国短吻鳄(*American alligator*)的研究中 *Sox9* mRNA 在 TSP 早期(20~23 期)的 MPT 性腺中几乎没有表达, 而在 TSP 末期(24~27 期)*Sox9* 则开始上调^[22]。本研究是首次在 TSD 物种中开展 *Sox9* 基因的体内功能验证实验, 结果发现, 从性腺分化前的第 17 期起, *Sox9* 呈现 MPT 特异性高表达现象, 且敲低 MPT 性腺中 *Sox9* 的表达量能够导致雄性向雌性性逆转, 表明 *Sox9* 在红耳龟早期雄性性别分化中是必需的关键基因。以上表明 *Sox9* 的雄性分化调控作用不仅在 GSD 脊椎动物之间高度保守, 而且在 TSD 和 GSD 物种之间都异常保守。

哺乳动物 *Sox9* 是位于常染色体上的性别决定关键基因, 表达时间迟于 *Sry* 基因, 且直接受 *Sry* 基因的调控。在性别分化最初 *Sry* 还未形成时, *Sox9* 在 *Sfl* 和 *Wtl* 基因的调控下处于低表达状态^[23], 当 *Sry* 基因开始表达时, 其产物抑制 *Sox3* 的表达, 进而下调 *Sox3* 对 *Sox9* 的抑制作用, 使 *Sox9* 基因的表达上调^[24], 进而促进睾丸分化。*Sox9* 表达可激活 *Amh* 基因, 使雄性体内的牟勒氏管退化, 抑制雌性器官的发育^[13]。另外, *Sox9* 通过协同 *Fgf9* 一起拮抗 *Wnt4* 信号通路, 进而促进双向潜能的性腺发育为睾丸^[23]。与哺乳动物不同的是在鸡中, *Sox9* 的表达迟于 *Amh*, 并不能激活 *Amh* 基因的表达, 这说明 *Sox9* 基因可能位于鸟类性别决定通路的下游^[19]。TSD 通路是多基因参与的分子信号级联通路, 解析基因与基因间, 以及温度与基因间的作用关系是研究 TSD 机制的关键。最近研究发现, 能够直接感受温度的冷诱导型 RNA 结合蛋白(CIRBP)和瞬时感受器受体蛋白 4(*TRPV4*)参与调节 TSD 分子信号通路^[25-26]。鳄龟中 CIRBP 可能将感知的温度转化为分子信号, 进而确定卵巢或睾丸的发育。温度置换后 *Cirbp* 先于 *Sox9* 对温度的响

应^[27], 推测 *Sox9* 可能受 *Cirbp* 的调控。美国短吻鳄中, *Trpv4* 通道可以在 MPT 性腺的温度敏感期改变 *Sox9* 和 *Amh* 表达方式, 进而影响雄性性别决定通路^[26], 由此可推测 *Trpv4* 可调控 *Sox9* 的表达。本团队前期对 TSD 物种红耳龟 *Dmrt1* 的研究^[7]发现, *Sox9* 起始表达时间(17 期)迟于 *Dmrt1*(15 期), 且敲低 *Dmrt1* 后, *Sox9* 的表达显著降低, 说明 *Sox9* 位于 *Dmrt1* 下游, 且受 *Dmrt1* 的调控, 这种调控是直接还是间接的有待进一步研究。以上研究表明, 在不同进化地位的脊椎动物之间, *Sox9* 基因在雄性性别分化级联网络通路上的具体调控位置有所不同。

本文通过一种有效的、基于慢病毒载体介导的 RNA 干扰的基因功能研究技术, 对 TSD 物种红耳龟 *Sox9* 基因进行功能鉴定, 明确了 *Sox9* 在红耳龟早期睾丸分化中是必需的, 其缺失会导致性逆转。为了进一步解析 *Sox9* 在 TSD 体系中的作用机制, 我们下一步将重点关注温度是如何调控 *Sox9* 的差异化表达。

参 考 文 献

- [1] Bull J J, Vogt R C. Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science*, 1979, **206**(4223): 1186-1188
- [2] Charnier M. Action of temperature on the sex ratio in the Agama agama (Agamidae, Lacertilia) embryo. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1966, **160**(3): 620-622
- [3] Ferguson M W, Joanen T. Temperature of egg incubation determines sex in Alligator mississippiensis. *Nature*, 1982, **296**(5860): 850-853
- [4] Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55**(6-7): 887-900
- [5] Wibbels T, Bull J J, Crews D. Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool*, 1991, **260**(3): 371-381
- [6] Warner D A, Shine R. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature*, 2008, **451**(7178): 566-568
- [7] Ge C, Ye J, Zhang H Y, et al. *Dmrt1* induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. *Development*, 2017, **144**(12): 2222-2233
- [8] Yatsu R., Miyagawa S, Kohno S, et al. RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during Alligator mississippiensis temperature-dependent sex determination and differentiation. *BMC Genomics*, 2016, **17**(1): 77-88
- [9] Czerwinski M., Natarajan A., Barske L, et al. A timecourse analysis of systemic and gonadal effects of temperature on sexual development of the red-eared slider turtle *Trachemys scripta elegans*. *Dev Biol*, 2016, **420**(1): 166-177
- [10] Ortega E A, Ruthig V A, Ward M A. Sry-independent

- overexpression of *Sox9* supports spermatogenesis and fertility in the mouse. *Biol Reprod*, 2015, **93**(6): 141–152
- [11] Smith C A, Katz M, Sinclair A H. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol Reprod*, 2003, **68**(2): 560–570
- [12] Berbejillo J, Martinez-Bengochea A, Bedó G, *et al.* Expression of *dmrt1* and *sox9* during gonadal development in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Fish Physiol Biochem*, 2013, **39**(1): 91–94
- [13] Morais da Silva S, 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. *Nat Genet*, 1996, **14**(1): 62–68
- [14] Barske L A, Capel B. Estrogen represses SOX9 during sex determination in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta*. *Dev Biol*, 2010, **341**(1): 305–314
- [15] Matsumoto Y, Yatsu R, Taylor C, *et al.* Changes in gonadal gene network by exogenous ligands in temperature-dependent sex determination. *J Mol Endocrinol*, 2013, **50**(3): 389–400
- [16] Eli Greenbaum. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Can J Zool*, 2002, **80**(8): 1350–1370
- [17] Ramsey M, Crews D. Steroid signaling and temperature-dependent sex determination- Reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, **20**(3): 283–292
- [18] Matsumoto Y, Crews D. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, **354**(1–2): 103–110
- [19] Kent J, Wheatley S C, Andrews J E, *et al.* A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, 1996, **122**(9): 2813–2822
- [20] Adolfi M C, Carreira A C, Jesus L W, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, **13**(1): 2–16
- [21] 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**(7261): 267–271
- [22] Western P S, Harry J L, Graves J A, *et al.* Temperature-dependent sex determination: upregulation of SOX9 expression after commitment to male development. *Dev Dyn*, 1999, **214**(3): 171–177
- [23] Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, *et al.* *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *Plos Biol*, 2006, **4**(6): e187
- [24] Bagheri-Fam S, Sreenivasan R, Bernard P, *et al.* *Sox9* gene regulation and the loss of the XY/XX sex determining mechanism in the mole vole *Ellobius lutescens*. *Chromosome Res*, 2012, **20**(1): 191–199
- [25] Schroeder A L, Metzger K J, Miller A, *et al.* A novel candidate gene for temperature-dependent sex determination in the common snapping turtle. *Genetics*, 2016, **203**(1): 557–571
- [26] Yatsu R, Miyagawa S, Kohno S, *et al.* TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. *Sci Rep*, 2015, **5**(91): 18581
- [27] Parrott B B, Kohno S, Cloy-McCoy J A, *et al.* Differential incubation temperatures result in dimorphic DNA methylation patterning of the SOX9 and aromatase promoters in gonads of alligator (*Alligator mississippiensis*) embryos. *Biol Reprod*, 2014, **90**(1): 2–12

The Preliminary Functional Analysis of Sox9 in a Temperature-Dependent Sex Determination System*

ZHANG Hai-Yan, SUN Wei, ZHOU Ying-Jie, BAO Hai-Sheng, CAI Han, QIAN Guo-Ying**, GE Chu-Tian**

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

Abstract In reptiles with temperature-dependent sex determination (TSD), the individual's gender depends completely on the incubation temperature of the eggs. The molecular mechanism underlying temperature-dependent sex determination has been a long-standing mystery, in particular, the factors responsible for triggering the differentiation of biopotential gonads either into a testis or an ovary are unknown. In this study, the regulatory role of *Sox9* on male gonadal differentiation in *Trachemys scripta* was investigated through expression analysis and gene-modulating approach, providing important reference for the study of sexual differentiation and gonadal development mechanism of reptiles with TSD and an effective molecular techniques for controlling the sex of animals. Real-time PCR showed that the MPT-specific expression of *Sox9* in embryonic gonads initiated early at stage 17, preceding the onset of gonadal differentiation, however, the FPT embryonic gonads exhibited extremely low expression level of *Sox9* throughout the embryogenesis. Immunofluorescence further confirmed the SOX9 protein was abundantly expressed and mainly localized in the nuclei of precursor Sertoli cells in MPT gonads. The temperature shifts experiments showed that the expression of *Sox9* in MPT→FPT (which was shifted at stage 16) gonads was significantly reduced from the stage 17, indicating that *Sox9* can respond rapidly to the new temperature. Meanwhile, the expression of *Sox9* was also down-regulated rapidly in the MPT gonads treated with estrogen. Loss-of-function analysis showed that 90.9% MPT embryos with *Sox9* knockdown exhibited male to female sex reversal, characterized by obvious feminization gonads with well organized outer cortex and degraded medullary area. These above results indicate that *Sox9* is required for testicular differentiation in a TSD system.

Key words *Sox9* gene, sex reversal, temperature-dependent sex determination(TSD), *Trachemys scripta*, RNA interference

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0376

* This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY14C190008), the Zhejiang Provincial Project of Selective Breeding of Aquatic New Varieties (2016C02055-4-1), Ningbo Major Agricultural Projects(2017C110012) and Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Biological Engineering (ZS2016007, ZS2017011).

**Corresponding author.

QIAN Guo-Ying. Tel: 86-574-88223277, E-mail: qiangy@zwu.edu.cn

GE Chu-Tian. Tel: 86-574-88223277, E-mail: cge@zwu.edu.cn

Received: September 28, 2017 Accepted: April 17, 2018