

牙鲆 *17β-HSD1* 基因克隆及其表达调控的初步研究

梁冬冬^{1,2,3}, 范兆飞^{1,2,3}, 邹玉霞^{1,2}, 谭训刚^{1,2}, 吴志昊^{1,2}, 焦爽^{1,2},
李军^{1,2}, 尤锋^{1,2}

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室实验海洋生物学与生物技术实验室, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: *17β*-羟类固醇脱氢酶 1(*17β*-HSD1)的主要作用是将雌酮(E1)转化为发挥功能的雌二醇(E2)。作者从牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)性腺转录组数据库获得该基因的开放阅读框(ORF)序列, 对其进行了验证, 并分析了该基因在高温、外源性激素处理条件下性腺分化期性腺组织中的差异表达以及 cAMP 和转录因子(NR5a2 和 NR0b1)在精巢原代细胞中对该基因表达的作用。结果显示, 牙鲆 *17β*-HSD1 基因的 ORF 为 873bp, 编码 290 个氨基酸, 与其他鱼类的有很高的相似性。半定量 RT-PCR 结果表明, 该基因在卵巢中高表达, 精巢有少量表达, 并且在雌性个体的鳃、头肾、肾、脾、胃和肠中也有表达。实时定量 RT-PCR 结果显示, 该基因在卵巢或精巢分化的关键时期表达量较高; 在精巢原代培养细胞中, 外源信号分子 cAMP 及转录因子 NR5a2 可以显著下调 *17β*-HSD1 基因的表达($P < 0.05$), 且呈现剂量效应, 转录因子 NR0b1 对该基因的调控也与剂量有关。作者推测牙鲆 *17β*-HSD1 基因在性腺分化中起一定的作用, 其表达受到调控因子的作用, 这些结果将有助于增加对鱼类性腺分化和发育的认识。

关键词: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*); *17β*-羟类固醇脱氢酶 1; ORF 克隆; 表达; 调控

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)09-0065-09

DOI: 10.11759//hyxk 20170303001

性类固醇激素在鱼类性腺分化过程中非常重要。*17β*-羟类固醇脱氢酶 1(*17β*-HSD1)作为性激素合成途径中关键酶之一, 在很多物种中的主要作用是将雌酮(E1)转化为雌二醇(E2)^[1]。*17β*-HSD1 在关于人的研究中较为深入, 其在卵巢或胎盘等产类固醇激素的组织中高表达^[2], 该基因在乳腺癌患者中表达上调, 导致产生过多的 E2, 进而刺激肿瘤内的细胞增殖^[3]。*17β*-HSD1 在鱼类研究中有一些报道, 如鲶鱼(*Clarias batrachus*)的 *17β*-HSD1 主要在卵巢中表达; 有些鱼类也有关于其催化雄激素合成的报道, 如在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中就可以将雄烯二酮转化成睾酮(T), 尽管效率不高^[4-5]。因而, *17β*-HSD1 参与了 E2 和 T 的合成, 在硬骨鱼类的性腺分化和配子形成中起非常重要的作用。*17β*-HSD1 在除性腺外的其他组织中也表达并发挥作用, 如该基因在斑马鱼(*Danio rerio*)的皮肤、肌肉和眼等其他组织中有少量表达^[6]。

促性腺激素可通过环腺苷单核苷酸(cAMP)-蛋白激酶 A(PKA)途径激活或抑制转录因子, 进而调控性类固醇激素合成酶基因的表达^[7]。核受体超家族的

NR5a2 与共转录因子(如类固醇受体共调控因子 1、剂量敏感性逆转因子(NR0b1: 核受体超家族的成员)等)相互作用也能调节性类固醇激素合成酶基因的表达^[8], 如在 NR0b1 缺陷小鼠(*Mus musculus*)精巢的 Leydig 细胞中, 芳香化酶基因 *cyp19* 表达上调 4 倍^[9]。研究显示, NR5a2 和 NR0b1 两者的相互作用也可以调控性类固醇急性调节基因(*Star*)、*3β*-羟类固醇脱氢酶基因(*3β*-HSD)等性激素合成途径上游基因的表达^[10-11]。但在鱼类中, 关于 NR5a2 和 NR0b1 调控

收稿日期: 2017-03-03; 修回日期: 2017-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41276171、31502156); 青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02); 鲆鲽类产业技术体系课题(NYCYTX-50-G03); 国家水产种质资源共享服务平台(2017DKA30470)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 41276171, 31502156; Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, No. 2015ASKJ02; The National Flatfish Industry System Construction Programme, No. NYCYTX-50-G03; The National Infrastructure of Fishery Germplasm Resource, No.2017DKA30470]

作者简介: 梁冬冬(1990-), 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事海水鱼类分子细胞生物学研究, E-mail: 867171624@qq.com; 尤锋, 通信作者, 研究员, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn

17β-HSD1 基因表达的报道还几乎未见到。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是中国、日本和韩国重要的海水养殖鱼种,其雌性个体生长速度大于雄性个体^[12],因此,研究牙鲆性别决定和性腺分化机制,从而控制其性别具有很重要的实践价值。牙鲆性别由遗传和环境因素共同决定^[13]:在性腺分化期,高温或外源睾酮处理牙鲆可使其发育为雄性个体,而雌二醇处理可使其发育为雌性个体^[12, 14]。*cyp19a*及其转录因子 *Foxl2*、*Dmrt1* 和 *Sox9* 等参与性激素合成途径的下游激素的合成或调控,进而影响牙鲆性腺分化^[15-17]。*17β-HSD1* 基因在 E2 合成途径中是不可或缺的,但在牙鲆中尚未见到关于该基因的报道。作者通过牙鲆性腺转录组数据获得并验证 *17β-HSD1* 的开放阅读框(ORF)序列,拟分析其在雌雄成体组织和性腺分化期性腺中的表达以及在 cAMP 孵育和过表达 NR5a2 或 NR0b1 的精巢原代细胞中的表达,为进一步丰富对牙鲆性腺分化和发育分子生物学机制的认识提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验用鱼

成体牙鲆(全长 300 mm ± 20 mm)购于山东省青岛市南山水产市场,暂养于中国科学院海洋研究所水族楼的 3 m³ 充气海水鱼缸内,暂养时间约 30 d,每天投喂 2 次商用适口饵料,并换水 2 次。分别取 3 条雄鱼和 3 条雌鱼的性腺(精巢、卵巢)、脑、心脏、鳃、肝脏、肾、头肾、脾、肌肉、胃、肠、眼等 12 种组织,一部分置于加有 200 μL Trizol 的 1.5 mL 离心管中,冻存于液氮,以备 RNA 提取。另一部分性腺样品固定于多聚甲醛中用于切片、苏木精-伊红(HE)染色以及镜检鉴定其性别和发育时期^[18]。

雌核发育牙鲆幼鱼(遗传型为雌性)参照本实验室已建立的诱导方法诱导和培育获得^[19]。设置对照组、28℃(HT 组)、雌二醇(E2 组)和睾酮(T 组)处理实验组,随机挑选全长 12~15 mm 的 250 尾雌核发育幼鱼分别饲养于中国科学院海洋研究所水族楼实验室内的 90 L 塑料缸中,每组 2 个重复,整个实验时间约 120 d。每天换水 2~3 次,光周期维持在 14L:10D。对照组、T 组和 E2 组养殖温度为 20~22℃;HT 组的海水温度用加热棒控制,且由 18℃缓慢上升到 28℃,每天升高 2℃,最终维持在 28℃ ± 0.5℃^[20]。HT 组和对照组投喂普通饵料;T 组和 E2 组采用投喂饵料方式进行外源性激素处理,幼鱼每天分别投喂含有

5×10⁻⁶ mg/kg T 或 E2(Sigma, 美国)的饵料 2~6 次^[18, 21]。T 和 E2 分别溶解在无水乙醇中,均匀喷洒于饵料上,黑暗条件下风干。所有处理的持续时期是从幼鱼全长 15 mm 到 120 mm,之后进行常规培育。分别在幼鱼全长 30、40、60、80、110 mm 时,每组随机选取 10 尾幼鱼,立即冷冻于液氮。然后取其性腺,并每 5 尾幼鱼的样品混样进行 RNA 提取。每组各取全长 150 mm 左右的牙鲆 20 尾,通过性腺的形态观察和冷冻切片与 HE 染色进行性别鉴定。

1.2 总 RNA 提取及模板 cDNA 的合成

用 Trizol(Ambion, 美国)法提取牙鲆成鱼组织和各实验组鱼苗性腺样品的总 RNA,1%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000(Thermo, 美国)分别检测所提取 RNA 的质量和浓度。按照反转录试剂盒 EasyScript[®] one-step gDNA removal and cDNA synthesis superMix Kit(全式金,北京)操作步骤将提取的 RNA 反转录成模板 cDNA。

1.3 *17β-HSD1* 基因 ORF 序列的验证

在牙鲆性腺转录组中,经 NCBI 在线比对筛选获得含 *17β-HSD1* 基因 ORF 在内的 1312bp cDNA 序列。用 Primer Premier6.0 软件设计扩增 873bp ORF 的引物 *17β-HSD1*-oF: 5'-ATGGACAAGAGGGTGGTGCTG-3' 和 *17β-HSD1*-oR: 5'-TTAGTTTTCTCGGCTGA GAA-3', 对其进行测序验证。RT-PCR 25 μL 反应体系(含 1 μL 模板,10 μmol/L 参考 2×Pfu MasterMix(康为世纪,北京)说明书进行配制,其反应条件如下:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经纯化、连接、转化,并经蓝白斑筛选和 PCR 检测,将阳性克隆菌液送至上海桑尼生物技术有限公司进行测序。测序结果经 NCBI 在线比对进行确定。

1.4 多序列比对及系统进化树构建

根据 cDNA 序列,用 BioEdit 翻译基因的氨基酸序列,用 DNAMAN 软件进行氨基酸多序列比对,系统进化树采用软件 BioEdit 和 MEGA5.1 的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)结合 GenBank 上各物种的该基因氨基酸序列进行比对聚类分析而完成的。各物种 *17β-HSD1* 氨基酸序列的 GenBank 数据库注册序列号如下:斑马鱼(NM_205584)、尼罗罗非鱼(NM_001279795)、青鳉(*Oryzias latipes*, XM_004071297)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*, AY498620)、鲛鱼(KM034751)、

小鼠(NM_010475)、大鼠(*Rattus norvegicus*, NM_012851)、牛(*Bos taurus*, NM_001102365)和人(*Homo sapiens*, NM_000413)。

1.5 半定量 RT-PCR

通过半定量 RT-PCR 检测了 *17β-HSD1* 基因在牙鲆雌雄个体 12 种组织中的表达。用 Primer Premier 6.0 软件设计用于 *17β-HSD1* 组织表达分析的引物序列 *17β-HSD1*-qF: 5'-TGAGGCAGATTCTTGAGGTC-3' 和 *17β-HSD1*-qR: 5'-TTTCGGAAAACAGAGTCGC-3'。以牙鲆 *β-actin* 作为内参基因, 其引物序列 *β-actin*-qF: 5'-ACTACCTCATGAAGATCCTG-3' 和 *β-actin*-qR: 5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3'。RT-PCR 20 μL 反应体系(含 1 μL 模板, 10 μmol/L 参考 2× GoldStar MasterMix(康为世纪, 北京)操作说明书配制, 其反应条件如下: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。RT-PCR 产物进行 0.1% 琼脂糖凝胶电泳检测。实验进行 3 次重复。

1.6 实时定量 RT-PCR(qPCR)

通过 qPCR 方法检测了 *17β-HSD1* 在牙鲆性腺分化期性腺组织中的表达。根据 *17β-HSD1* ORF 序列用 Primer Premier 6.0 软件设计定量分析引物 qRT-*17β-HSD1*-F: 5'-CTCTTGGGCACCATCCAGACCA-3' 和 qRT-*17β-HSD1*-R: 5'-TCTCTCAACAGGTCGATACC-3'。以牙鲆 *β-actin* 作为内参基因^[22], 其引物序列 qRT-*β-actin*-F: 5'-GGAATCCACGAGACCACCTACA-3' 和 qRT-*β-actin*-R: 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'。qPCR 20 μL 反应体系(含 0.5 μL 模板, 10 μmol/L 参考 TransStart® Top Green qPCR SuperMix(全式金, 北京)操作说明书配制, 其反应条件如下: 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 变性 5 s, 55℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 40 个循环。用 Applied Biosystems QuantStudio 6 荧光定量 PCR 仪(Life technologies)进行扩增。实验进行 3 次重复。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算分析。数据用均值 ± 标准误表示。使用 SPSS 软件(IBM SPSS, Armonk, New York)中的单因素方差分析 Dunnett's 检验来对组内基因表达的显著性进行分析($P < 0.05$)。

1.7 cAMP 孵育精巢原代细胞

利用体外培养的牙鲆精巢原代细胞, 进行了 cAMP(索莱宝, 北京)对 *17β-HSD1* 基因表达的调控研究。按照本实验室已有的方法进行牙鲆精巢组织

的分离和细胞培养^[23], 待精巢原代细胞数目达到 2.6×10^5 时, 用胰酶消化液消化, 混匀, 等体积地铺到 6 孔板(NEST, 中国)中, 设置 3 个重复。待细胞长到 90% 时, 分别用含 0、75、150 和 300 μmol/L cAMP^[24] 的完全培养基对其进行孵育。72 h 后, 收集精巢细胞用于 RNA 提取, 通过 qPCR 检测 *17β-HSD1* 的表达水平。实验进行 3 次重复。RNA 提取方法同 1.2, qPCR 所需引物和反应条件以及数据分析同 1.6。

1.8 细胞转染

在 1.7 中培养的牙鲆精巢原代细胞同样用于分析转录因子 NR5a2 和 NR0b1 对 *17β-HSD1* 基因表达的调控作用。表达质粒 pcDNA3.1-NR5a2 或 pcDNA3.1-NR0b1 的构建方法参考已有研究^[25]。待 6 孔板的细胞密度达到 90% 以上, 根据 Lipofectamine 2000(Life, 美国)转染试剂的操作方法, 将 0、1、2、3 μg pcDNA3.1-NR5a2 或 pcDNA3.1-NR0b1 表达质粒分别进行细胞转染, 48h 后, 收集细胞用于 RNA 提取, 通过 qPCR 检测 *17β-HSD1* 的表达水平。实验进行 3 次重复。RNA 提取方法同 1.2, qPCR 所需引物和反应条件以及数据分析同 1.6。

2 结果

2.1 牙鲆 *17β-HSD1* 蛋白分子序列比对和系统进化分析

根据转录组数据库中的 *17β-HSD1* cDNA 序列, 对其 ORF 区进行了扩增和测序验证, 其 ORF 为 873bp, 编码 290 个氨基酸。将其氨基酸序列与 NCBI 数据库中的其他脊椎动物同源基因的氨基酸序列进行多序列比对和系统进化树构建。多序列比对结果显示牙鲆 *17β-HSD1* 氨基酸序列与其他物种的同源序列相似度均达到 83% 以上(图 1), 进化树也显示了该基因与尼罗罗非鱼和青鳉的同源基因聚为一簇(图 2)。

2.2 *17β-HSD1* 在牙鲆雌雄个体不同组织的差异表达

牙鲆 *17β-HSD1* 在雌雄成鱼 12 种组织中的表达如图 3 所示。由图 3 可知 *17β-HSD1* 在精巢、卵巢都有表达, 但呈现雌雄二态性, 卵巢表达量比精巢高。该基因也在雌性个体的鳃、肾、头肾、脾、胃和肠等组织中表达, 但在雄性个体除了精巢外的其他组织中均没有表达。

<i>Paralichthys olivaceus</i>	MDKRVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPDKFKVYATMNLAKKERLLESVK..GLHQDTLDILQMDVTDQCSILLDARDRV	78
<i>Danio rerio</i>	MEQKVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASNPAPAKYKVVATMNLKDKQRLLESVR..GLHKDTLDILQMDVTDQCSILLDARNV	78
<i>Oreochromis niloticus</i>	MDKRVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPDKFKVYATMNLAKKERLLESVK..GLHRDTLDILQMDVTDQCSILLDARDRI	78
<i>Oryzias latipes</i>	MEKRVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPKTKFKVYATMNLGKKEKRLLECVK..GLHRDTLDILQMDVTDQCSILLDAKERV	78
<i>Anguilla japonica</i>	MEQRVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPKTKFKVYATMNLAKKERLLESVK..GFHKDTLDILQMDVTDQCSILLDAKEDI	78
<i>Mus musculus</i>	MDPTVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDRSQSFVYATLRLDKAQGFLEAARTQGCPPGSEILELVDVRSKSVAAARQACV	80
<i>Rattus norvegicus</i>	MDSTVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDRSQSFVYATLRLDKSQGFLEAARAQGCPPGSEILELVDVRSKSVAAARACV	80
<i>Bos taurus</i>	MDRTVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDRSQSFVYATLRLDKSQGFLEAARQSGCLPGSELETQLVDRDADSIAAARQAV	80
<i>Homo sapiens</i>	MARTVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDRSQSFVYATLRLDKTQGRLEAARALACPPGSELETQLVDRDADSIAAARQAV	80
<i>Clarias batrachus</i>	MEWKVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPKTKFKVYATMNLKDKQRLLESVR..DLHNDTMAVLQMDITNQCITKMWQRSI	78
Consensus	m vvlitgcssgig la as kvya r l l e d n t m a v l q m d i t n q c i t k m w q r s i	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	VEKRVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPDKFKVYATMNLAKKERLLESVK..GLHQDTLDILQMDVTDQCSILLDARDRV	158
<i>Danio rerio</i>	SEGRIDILVCNAGVGLMGPLELQSLDSMRQILEVNLGTLTQTIQAFIPKPKAQQGGRILVLTGSTGGLHGLPENELYCASK	158
<i>Oreochromis niloticus</i>	VEKRVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPDKFKVYATMNLAKKERLLESVK..GLHRDTLDILQMDVTDQCSILLDARDRI	158
<i>Oryzias latipes</i>	VEKRVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPDKFKVYATMNLAKKERLLESVK..GLHRDTLDILQMDVTDQCSILLDARDRI	158
<i>Anguilla japonica</i>	TENRVVLTGCGSSGIGLSLAVRLASDPDKFKVYATMNLAKKERLLESVK..GLHRDTLDILQMDVTDQCSILLDARDRI	158
<i>Mus musculus</i>	TEGRVVDVLCNAGRGLFGPLEAHELMNAVGAVIDVNLGTLRMLQAFIPDMRRRHSGRVLTASVGGIMGLPPEHVEVCASK	160
<i>Rattus norvegicus</i>	TEGRVVDVLCNAGRGLFGPLEAHELMNAVGAVIDVNLGTLRMLQAFIPDMRRRHSGRVLTASVGGIMGLPPEHVEVCASK	160
<i>Bos taurus</i>	TEGRVVDVLCNAGRGLFGPLEAHELMNAVGAVIDVNLGTLRMLQAFIPDMRRRHSGRVLTASVGGIMGLPPEHVEVCASK	160
<i>Homo sapiens</i>	TEGRVVDVLCNAGRGLFGPLEAHELMNAVGAVIDVNLGTLRMLQAFIPDMRRRHSGRVLTASVGGIMGLPPEHVEVCASK	160
<i>Clarias batrachus</i>	TEGRVVDVLCNAGRGLFGPLEAHELMNAVGAVIDVNLGTLRMLQAFIPDMRRRHSGRVLTASVGGIMGLPPEHVEVCASK	158
Consensus	e r lvcnag gl gple l q s l d s m r q i l e v n l g t l t q t i q a f i p k p k a q q g g r i l v l t g s t g g l h g l p e n e l y c a s k	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	237
<i>Danio rerio</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	238
<i>Oreochromis niloticus</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	237
<i>Oryzias latipes</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	237
<i>Anguilla japonica</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	237
<i>Mus musculus</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	236
<i>Rattus norvegicus</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	236
<i>Bos taurus</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	237
<i>Homo sapiens</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	237
<i>Clarias batrachus</i>	FAIEGACESLAILLQHENIHVSLIECGFVNTDFLNLQKAELEDGAS..LQQVDTLHLGLYEKYLQHCDSVFRNNAQDTEDI	236
Consensus	fa i e g a c e s l a i l l q h e n i h v s l i e c g f v n t d f l n l q k a e l e d g a s . . l q q v d t l h l g l y e k y l q h c d s v f r n n a q d t e d i	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	VKVFLEAIQSPSFAFRNYT..SGVVPVLTQMKITPEPDSRCIRAMSKIIISAEN.....	290
<i>Danio rerio</i>	IQVYLEAMEAQTEFLRYYT..NRALLMSSSLKLTSMDSQYIRAMSKLIESSPGTAQK.....	295
<i>Oreochromis niloticus</i>	VKVFLEAIQSPSFAFRNYT..STTGAVTQLKVTPEDES..VISAMSKIIESTEQ.....	289
<i>Oryzias latipes</i>	VKVFLEAIQSPSFAFRNYTNSVVEPHTLKLAAQPDGVQYIKAMSEIVSSGEEQ.....	291
<i>Anguilla japonica</i>	VQVFLEAIQSPSFAFRNYT..NSALLELTSRKLAMHMDGSOYIRAMSKLIESSSGPEDP.....	293
<i>Mus musculus</i>	TELFITAMRAEQALRFYS..TNRFLRLARMRTEDPSSGSYVAMHQAESNLQTEGNA...KAGAQVPGVSDTASSALIC	312
<i>Rattus norvegicus</i>	TELFITAMRAEQALRFYS..TNRFLRLARMRTEDPSSGSYVAMHQAESNLQTEGNA...KAGAQVSGDPDTPPPALIC	312
<i>Bos taurus</i>	VEVFLQALRAPEALRFYF..TERFLELVQLRFSDPSSGSYVAMHQAESNLQTEGNA...GAGAETEAGKLEASLRAV	313
<i>Homo sapiens</i>	AEVFLTALRAPEALRFYF..TERFLELLMRLLDDPSSGSYVAMHREVFGDVPKAEAGAEAGGAGGAPGADEAGRGAV	316
<i>Clarias batrachus</i>	IQVYMEVIQAQCEVFRNYT..NSALLELSSPKLTALDGSQYIRAMSKLIESSPDENEIRAQK.....	295
Consensus	v k v f l e a i q s p s f a f r n y t . . s g v v p v l t q m k i t p e p d s r c i r a m s k i i i s a e n	
<i>Paralichthys olivaceus</i>	290
<i>Danio rerio</i>	295
<i>Oreochromis niloticus</i>	289
<i>Oryzias latipes</i>	291
<i>Anguilla japonica</i>	293
<i>Mus musculus</i>	312
<i>Rattus norvegicus</i>	312
<i>Bos taurus</i>	313
<i>Homo sapiens</i>	316
<i>Clarias batrachus</i>	295
Consensus	

图 1 牙鲈与其他脊椎动物的 17β-HSD1 氨基酸序列比对结果

Fig. 1 The multiple alignment of 17β-HSD1 amino acid sequences from vertebrates

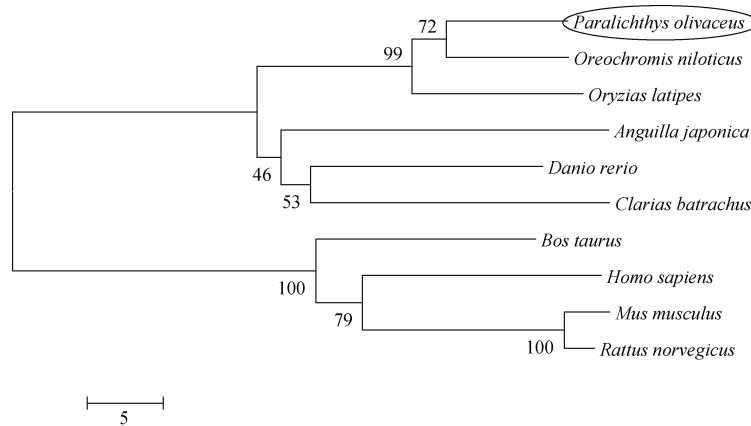


图 2 脊椎动物 17β-HSD1 氨基酸序列进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of vertebrate 17β-HSD1 proteins

数值为 1 000 次迭加后分枝的可信度，分枝的长度代表氨基酸的差异

Values of the tree represent bootstrap scores of 1000 trials and indicate the credibility of each branch; branch lengths are proportional to the number of amino acid changes

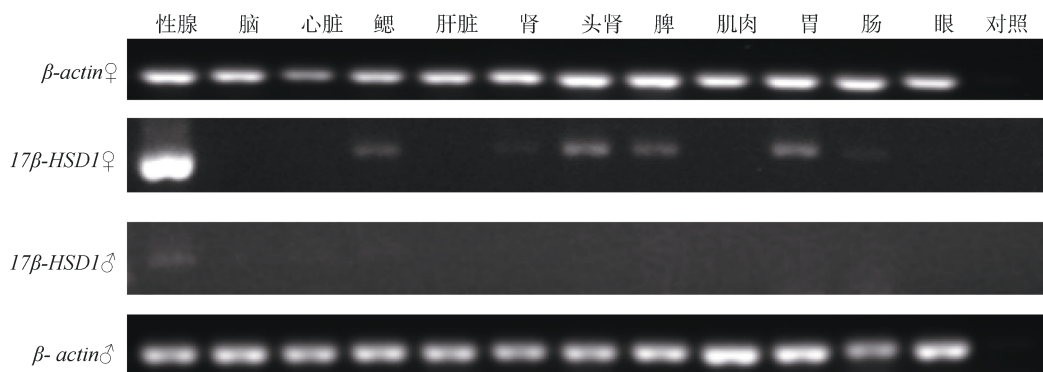


图 3 牙鲆 17β -HSD1 基因在雌雄个体各组织中表达谱

Fig. 3 The tissue distribution of 17β -HSD1 with RT-PCR in female and male flounder

2.3 17β -HSD1 在牙鲆性腺分化期的性腺组织中的表达

性别鉴定结果表明, 雌核发育对照组中雌性比率为 75%, E2 组雌性比率为 100%, 而 HT 和 T 组雄性比率为 100%。 17β -HSD1 在对照组和各处理组中的差异表达如图 4 所示。对照组中, 17β -HSD1 在卵巢分化期的表达呈下降趋势。E2 组中, 17β -HSD1 在卵巢分化时(全长 30、40 mm)的表达维持稳定, 而卵巢分化完成后(全长 >40 mm)则呈上升趋势, 随后呈下降趋势, 但在性腺分化完成后维持在较高水平。卵巢分化时该基因在 E2 组中的表达水平低于对照组,

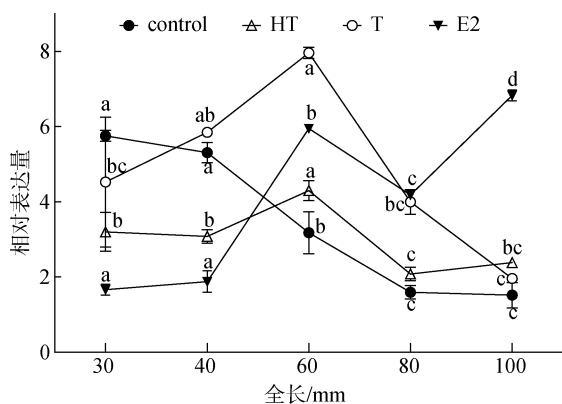


图 4 牙鲆 17β -HSD1 基因在性腺分化期的表达

Fig. 4 17β -HSD1 gene expression levels in gonads during flounder gonadal differentiation period

Control. 对照组; HT. 高温处理组; T. 睾酮处理组; E2. 雌二醇处理组。数据为 3 个样品均值±标准误, 不同字母(a, b, c, d)表示各处理组内不同时期之间的显著性($P < 0.05$)

Data are the mean \pm S.E.M. of three independent samples. Different lowercase letters (a, b, c, d) indicate significant differences between pairs of groups ($P < 0.05$). Control. control group; HT. high temperature treatment group; T. testosterone treatment group; E2. 17β -estradiol treatment group

但在卵巢分化完成后高于对照组。T 组中, 17β -HSD1 在精巢分化时(全长 60 mm)呈现高表达, 但在分化前后却都维持较低水平的表达。HT 组中 17β -HSD1 的表达与 T 组类似, 但整体水平要低于 T 组。

2.4 信号分子 cAMP 对 17β -HSD1 基因表达的调控

17β -HSD1 在 cAMP 孵育的牙鲆精巢原代细胞表达水平见图 5, 不同浓度的 cAMP 均可以显著抑制精巢原代细胞中 17β -HSD1 的表达($P < 0.05$), 但随着浓度的升高抑制效果减弱。

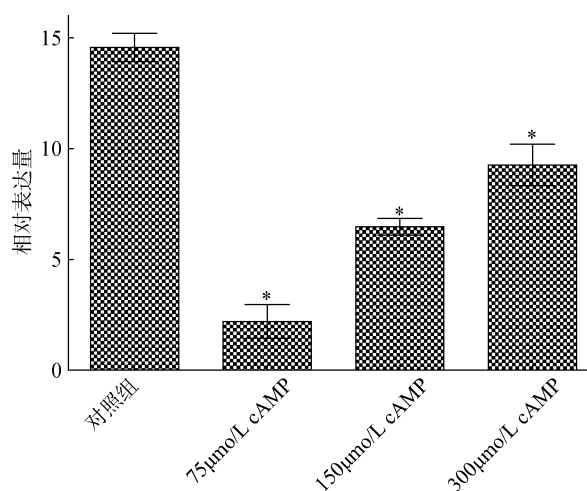


图 5 不同浓度的 cAMP 在牙鲆精巢原代细胞中对 17β -HSD1 基因表达的调控

Fig. 5 17β -HSD1 gene expression levels in flounder primary testis cells treated with 0, 75, 150, and 300 $\mu\text{mol/L}$ cAMP

对照组. 0 $\mu\text{mol/L}$ cAMP; 数据为 3 个样品均值±标准误; *. 处理组与对照组相比较有显著性($P < 0.05$)

Control. 0 $\mu\text{mol/L}$ cAMP; Data are the mean \pm S.E.M. of three independent samples; *. indicates the significant difference ($P < 0.05$)

2.5 转录因子 NR5a2 和 NR0b1 对 17β -HSD1 基因的调控作用

17β -HSD1 在过表达转录因子 NR5a2 和 NR0b1 的牙鲆精巢原代细胞中的差异表达见图 6。细胞转染低浓度(1 μ g)pcDNA3.1-NR5a2 质粒对精巢原代细胞中 17β -HSD1 的表达无作用, 而较高浓度(2 和 3 μ g)

pcDNA3.1-NR5a2 质粒可以显著抑制其表达, 且随着浓度的升高抑制效果增强(图 6 A)($P < 0.05$)。转染低浓度(1 μ g)pcDNA3.1-NR0b1 质粒可显著抑制精巢原代细胞中 17β -HSD1 的表达, 而较高浓度(2 μ g)pcDNA3.1-NR0b1 质粒可显著上调 17β -HSD1 基因表达(图 6 B)($P < 0.05$)。

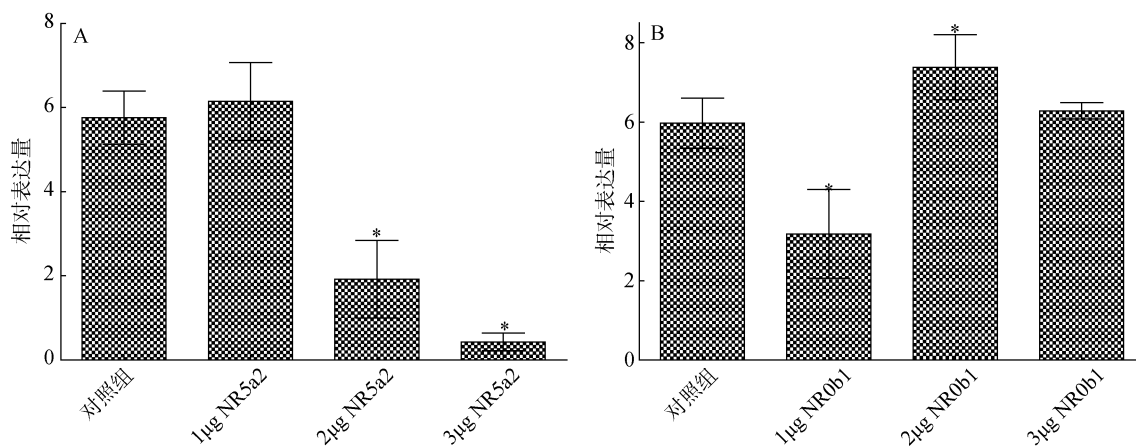


图 6 转录因子 NR5a2 (A)和 NR0b1 (B)在牙鲆精巢原代细胞中对 17β -HSD1 基因表达的调控

Fig. 6 17β -HSD1 gene expression levels in flounder primary testis cells under overexpression of NR5a2 (A) or NR0b1 (B)

对照组. 0 μ g pcDNA3.1-NR5a2 or pcDNA3.1-NR0b1 质粒; 数据为 3 样品均值 \pm 标准误; *. 处理组与对照组相比较有显著性($P < 0.05$)

Control. 0 μ g pcDNA3.1-NR5a2 or pcDNA3.1-NR0b1 plasmid; Data are the mean \pm S.E.M. of three independent samples; *. indicates the significant difference ($P < 0.05$)

3 讨论

牙鲆 17β -HSD1 基因与其他硬骨鱼类的同源基因有很高的相似性, 系统进化树表明其氨基酸序列与尼罗罗非鱼和青鳞聚为一簇, 进一步验证了从牙鲆中克隆的序列是 17β -HSD1。半定量 RT-PCR 结果显示, 牙鲆 17β -HSD1 主要在卵巢中表达, 在精巢中表达较弱, 与斑马鱼和鲶鱼的结果类似^[1, 6]。因为 17β -HSD1 主要作用是将 E1 转化为发挥功能的 E2^[1], 故牙鲆 17β -HSD1 在成体性腺中表达, 可能参与其中性类固醇激素的合成。该基因也在牙鲆雌性个体的鳃、头肾、肾、脾、胃和肠中表达, 在雌鱼鳃中的表达量相对较高, 这是因为在硬骨鱼类的鳃中也能合成 11-酮基睾酮所致^[26]。至于雌鱼其他几种组织中也表达, 是因为这些组织中也有 11-酮基睾酮或者 E2 合成, 还是该基因可能参与其他代谢途径激素合成尚不得而知。有意思的是, 该基因在牙鲆雄鱼除精巢以外的组织均不表达, 在其他鱼类中还未见到类似的报道, 其缘由仍需进一步研究。

性激素在硬骨鱼类性腺分化和配子发育中起重要作用^[27], 而性激素合成是在类固醇激素合成酶的

催化作用下完成的。 17β -HSDs 是一类重要类固醇激素合成酶, 主要参与 E2 和 T 的合成^[28], 17β -HSD1 则是 17β -HSDs 家族成员之一。报道显示, 尼罗罗非鱼 17β -HSD1 不参与早期性腺分化性类固醇激素的合成, 但在配子发生中的作用是必需的^[5]。而在鲶鱼中, 该基因却在性腺分化期的早期表达, 显示早期性腺分化和发育中该合成酶也起一定作用^[1]。雌核发育牙鲆在遗传学上的性别是雌性的, 其性别表型形成会受到性腺发育期的外源因素如水温 and 性激素的影响, 高温和外源雄激素处理可以产生雄性表型, 而外源雌激素处理则可以产生雌性表型, 故是研究鱼类性腺分化的理想材料之一^[20]。本研究对照组中, 牙鲆 17β -HSD1 在分化前的性腺表达量相对较高, 说明该基因可能在卵巢分化前起作用。E2 组, 17β -HSD1 的表达量在卵巢分化完成后显著升高, 且最后维持较高水平, 提示该基因可能参与其后卵巢的发育。HT 组, 17β -HSD1 的表达在精巢分化时显著上调, 暗示该基因可能参与精巢的分化; 精巢分化完成后该基因表达量下调, 推测它可能不参与精巢后期的发育过程。该基因在 T 组表达水平的变化趋势与 HT 组

非常类似,在精巢分化期均有高表达,进一步表明该基因参与精巢的分化。但 HT 组的表达水平比 T 组较低,其原因还不得而知。性腺分化完成后 *17β-HSD1* 在 E2 组的表达水平较对照组的高,作者推测 E2 可能通过下丘脑-垂体-性腺轴上调该基因的表达,但还需进一步研究。

促性腺激素可以通过 cAMP-PKA 信号转导途径磷酸化相应的转录因子来调控性类固醇激素合成相关基因如 *StAR*、*cyp11a1* 和 *11β-HSD* 等的表达^[29-32]。但关于 cAMP 和转录因子等对 *17β-HSD1* 表达调控的报道还很少。为探究此调控作用,作者用 cAMP 孵育牙鲆精巢原代细胞,结果显示 cAMP 可以显著抑制 *17β-HSD1* 的表达,作用效果存在剂量效应。联丁酰基 cAMP 可以穿透细胞膜进入细胞^[24],直接影响该基因启动子区 TATA 框结合位点来抑制该基因表达。cAMP 对 *17β-HSD1* 表达的调控机制很复杂,仍需进一步的验证。NR5a2 和 NR0b1 是类固醇激素合成中重要的转录因子^[32],调控较多的类固醇激素合成酶基因的表达。人的 NR5a2 可以调控类固醇激素合成酶基因 *cyp11a1* 的表达^[31],高浓度 NR5a2 可能与 *17β-HSD1* 启动子区作用位点结合来抑制其在精巢原代细胞中的表达。在小白鼠中, NR0b1 抑制 *cyp19a* 的表达,从而降低雌二醇的产生^[9]。本研究中, NR0b1 在牙鲆精巢原代细胞中也能调控 *17β-HSD1* 的表达来参与雌二醇的合成,且是剂量依赖性的调控。

综上所述, *17β-HSD1* 基因主要在牙鲆卵巢和精巢中表达,且在精巢分化和卵巢分化前期表达上调对性腺分化有一定作用。*17β-HSD1* 基因在精巢原代细胞的表达受到信号分子 cAMP 和转录因子 NR5a2 和 NR0b1 的调控。由此可以推测 *17β-HSD1* 基因在牙鲆性腺分化和发育的性类固醇激素合成中起重要的作用。

参考文献:

[1] Rajakumar A, Senthilkumaran B. Molecular cloning and expression analysis of 17β- hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 12 during gonadal development, recrudescence and after *in vivo* hCG induction in catfish, *Clarias batrachus*[J]. Steroids, 2014, 92(12): 81-89.

[2] Luu-The V, Labrie C, Simard J, et al. Structure of two in tandem human 17β-hydroxysteroid dehydrogenase genes[J]. Molecular Endocrinology, 1990, 4(2): 268-275.

[3] Day M J, Tutill J H, Newman P S, et al. 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 and Type 2: Association between mRNA expression and activity in cell lines[J].

Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 248(1): 246-249.

[4] Lukacik P, Kavanagh K L, Oppermann U. Structure and function of human 17β-hydroxysteroid dehydrogenases[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 248(1): 61-71.

[5] Zhou L Y, Wang D S, Senthilkumaran B, et al. Cloning, expression and characterization of three types of 17β-hydroxysteroid dehydrogenases from the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2005, 35(1): 103-116.

[6] Mindnich R, Deluca D, Adamski J. Identification and characterization of 17β-hydroxysteroid dehydrogenases in the zebrafish, *Danio rerio*[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004, 215(1): 19-30.

[7] Selstam G, Rosberg S, Liljekvist J, et al. Differences in action of LH and FSH on the formation of cyclic AMP in the prepubertal rat ovary[J]. Acta Endocrinologica, 1976, 81(1): 150-164.

[8] Nachtigal M W, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten D L, et al. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression[J]. Cell, 1998, 93(3): 445-454.

[9] Wang Z J, Jeffs B, Ito M, et al. Aromatase (*Cyp19*) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(14): 7988-7993.

[10] Sugawara T, Saito M, Fujimoto S. Sp1 and SF-1 interact and cooperate in the regulation of human steroidogenic acute regulatory protein gene expression 1[J]. Endocrinology, 2000, 141(8): 2895-2903.

[11] Zazopoulos E, Lalli E, Stocco D M, et al. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis[J]. Nature, 1997, 390(6657): 311-315.

[12] Yamamoto E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel)[J]. Aquaculture, 1999, 173(1): 235-246.

[13] Ospina-Alvarez N, Piferrer F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2837.

[14] Sun P, You F, Ma D, et al. Sex steroid changes during temperature-induced gonadal differentiation in *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schegel, 1846)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2013, 29(4): 886-890.

[15] Jo P G, An K W, Kim N N, et al. Induced expression of doublesex-and mab-3-related transcription factor-1 (DMRT-1) mRNA by testosterone in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* ovary[J]. Journal of Aquaculture, 2007, 20(3): 199-202.

- [16] Wen A, You F, Sun P, et al. CpG methylation of *dmrt1* and *cyp19a* promoters in relation to their sexual dimorphic expression in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2014, 84(1): 193-205.
- [17] Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, et al. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 359(4): 935-940.
- [18] 孙鹏, 尤锋, 张立敬 等. 牙鲆性腺分化的组织学研究[J]. *海洋科学*, 2009 3(3): 53-58.
Sun Peng, You Feng, Zhang Lijing, et al. Histological evaluation of gonadal differentiation in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Marine Sciences*, 2009, 3(3): 53-58.
- [19] You F, Liu J, Wang X, et al. Study on embryonic development and early growth of triploid and gynogenetic diploid left-eyed flounder, *Paralichthys olivaceus* (T. et S.)[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2001, 19(2): 147-151.
- [20] Wang L, You F, Weng S, et al. Molecular cloning and sexually dimorphic expression patterns of *nr0b1* and *nr5a2* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Development Genes and Evolution*, 2015, 225(2): 95-104.
- [21] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2003, 101(3-4): 289-294.
- [22] Zheng W, Sun L. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 638-645.
- [23] Peng L, Zheng Y, You F, et al. Establishment and characterization of a testicular Sertoli cell line from olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, 34(5): 1054-1063.
- [24] Kowalewski M P, Gram A, Boos A. The role of hypoxia and HIF1 α in the regulation of STAR-mediated steroidogenesis in granulosa cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 401(2): 35-44.
- [25] Fan Z, Zou Y, Jiao S, et al. Significant association of *cyp19a* promoter methylation with environmental factors and gonadal differentiation in olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2017, 208(6): 70-79.
- [26] Kime D E, Ebrahimi M. Synthesis of 17, 20 α -and 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-ones, 11-ketotestosterone and their conjugates by gills of teleost fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 17(1-6): 117-121.
- [27] Nagahama Y. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2005, 31(2-3): 105-109.
- [28] Guiguen Y. Implication of steroids in fish gonadal sex differentiation and sex inversion[J]. *Current Topics in Steroid Research*, 2000, 3(1): 127-143.
- [29] Rasheeda M K, Kagawa H, Kirubakaran R, et al. Cloning, expression and enzyme activity analysis of testicular 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase during seasonal cycle and after hCG induction in air-breathing catfish *Clarias gariepinus*[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 120(1): 1-10.
- [30] Liu J, Heikkilä P, Kahri A I, et al. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein mRNA in adrenal tumors and cultured adrenal cells[J]. *Journal of Endocrinology*, 1996, 150(1): 43-50.
- [31] Guo C, Chung B. Cell-type specificity of human CYP11A1 TATA box[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 69(1): 329-334.
- [32] Chen S, Zhang H, Wang F, et al. Nr0b1 (DAX1) mutation in zebrafish causes female-to-male sex reversal through abnormal gonadal proliferation and differentiation[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 433(C): 105-116.

Molecular characterization, expression, and regulation of *17β-HSD1* in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*

LIANG Dong-dong^{1, 2, 3}, FAN Zhao-fei^{1, 2, 3}, ZOU Yu-xia^{1, 2}, TAN Xun-gang^{1, 2},
WU Zhi-hao^{1, 2}, JIAO Shuang^{1, 2}, LI Jun^{1, 2}, YOU Feng^{1, 2}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China. 2. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China. 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Mar. 3, 2017

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *17β-HSD1*; ORF clone; expression; regulation

Abstract: 17β -Hydroxysteroid dehydrogenase 1 (17β -HSD1) is an important enzyme as it is involved in the synthesis of both 17β -estradiol and testosterone. In this study, *17β-HSD1* open reading frame sequence was obtained from the olive flounder *Paralichthys olivaceus* gonadal transcriptome data and verified. Phylogenetic tree analysis showed that flounder 17β -HSD1 was clustered with 17β -HSD1 proteins from fish species such as *Oreochromis niloticus* and *Oryzias latipes*. Semiquantitative RT-PCR results indicated the expression of 17β -HSD1 in the ovary was higher than that in the testis, and it was also expressed in the female gill, head kidney, kidney, spleen, stomach, and intestine. Real-time quantitative PCR analysis revealed upregulated expression patterns of *17β-HSD1* during the key phases of ovarian and testicular differentiation. *17β-HSD1* expression was significantly downregulated in the cultured primary testis cells treated with 75, 150, and 300 $\mu\text{mol/L}$ cAMP ($P < 0.05$). Moreover, transfecting the cultured primary testis cells with 2 and 3 μg NR5a2 and 1 μg NR0b1 significantly downregulated its expression, whereas it was significantly upregulated upon treatment with 2 μg NR0b1 ($P < 0.05$), and all these regulations were dose-dependent. This study indicates that *17β-HSD1* is involved in flounder gonadal differentiation, and its expression is respectively regulated by cAMP, NR5a2, and NR0b1. These results may provide useful information for the study of fish gonadal differentiation.

(本文编辑: 谭雪静)