

栉孔扇贝 *foxl2* 基因在卵子发生中的必要性

刘晓玲, 刘 军, 王振东, 王振华, 李彦伸, 崔龙波

(烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 采用 RNAi 技术研究了栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) *foxl2* 基因在卵子发生和卵巢功能维持中的作用。使用体外合成的栉孔扇贝 *foxl2* 双链 RNA(dsRNA), 以每只 50 μg/次的剂量注射进闭壳肌中, 连续注射 2 次(第一次注射后 7 天, 再进行第二次注射); 以注射相同体积 PBS(相同注射方法)的扇贝作为阴性对照组, 以不注射扇贝作为空白对照组。qRT-PCR 检测干扰组扇贝卵巢中的 *foxl2* mRNA 表达量较空白对照组下降了 62%, Western blotting 检测该蛋白在卵巢中的含量也明显下降, 显示靶基因的表达水平被有效地敲降。组织学观察发现, 栉孔扇贝 *foxl2* 干扰后的卵巢中卵母细胞形态异常、细胞核固缩, 卵子发生明显受阻。表明该基因在栉孔扇贝卵子发生中起重要作用。

关键词: 栉孔扇贝; 卵巢; 卵子发生; *foxl2*; RNAi

中图分类号: S917 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2018)04-0127-05

DOI: 10.11759/hyxx20180323001

FOXL2 是一种转录因子, 其在脊椎动物卵巢中高表达, 并在卵巢发育和卵巢功能维持中发挥重要作用^[1-4]。Uda 等^[5]研究发现: 敲除 *foxl2* 基因的小鼠卵巢发育异常, 卵母细胞周围的体细胞无法完成形态分化, 卵泡发育受阻, 卵母细胞虽能启动分化, 但发育不正常。Unlenhaut 等^[6]发现在 *foxl2* 基因诱导缺失的成体小鼠卵巢内, *Sox9* 的转录活性被激活, 组织学观察到小鼠卵巢体细胞重编程向雄性特征细胞转化。Schmidt 等^[7]发现在 *foxl2* 基因突变的小鼠卵巢中, 颗粒细胞分化失败, 致使卵巢中卵泡池逐渐耗竭, 卵母细胞闭锁。*Foxl2* 基因在无脊椎动物中的研究报道有限^[8]。本文作者^[9]前期对 *foxl2* 在栉孔扇贝性腺中的表达进行了研究, 发现其具有卵巢特异表达特征, 但具体的功能研究尚未见报道。本研究建立了栉孔扇贝 *foxl2* 基因有效的 RNA 干扰方法, 在组织学水平确定栉孔扇贝 *foxl2* 干扰前后卵巢的组织结构变化, 分析了 *foxl2* 在栉孔扇贝卵子发生和卵巢发育中的作用, 为贝类配子发生和性腺发育研究提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

栉孔扇贝 *Chlamys farreri* (壳高为 6.02 cm±0.089 cm) 购自烟台市芝罘区红利市场, 将健康的增殖期雌性(为卵巢发育初期, 卵原细胞紧贴滤泡壁上, 细胞核透亮。此时的滤泡腔较空, 少见卵母细胞^[9])扇贝暂养

在 16℃左右的过滤海水中, 保持充气并每天更换海水。暂养期间以硅藻和绿藻为饵料进行投喂, 实验室内暂养 3 d 后进行后续实验。

1.2 RNA 干扰实验

1.2.1 双链 dsRNA 的体外合成

参照 dsRNA 设计原则^[10-11], 根据前期获得的栉孔扇贝 *foxl2* 基因序列(GenBank 注册号: JN642286)^[9], 在避免与家族基因以及其他基因序列出现连续重复的基础上, 设计合成 dsRNA 片段的一对引物 P1 和 P2(表 1)。

采用柱式动物 RNAout 试剂盒(北京天恩泽公司)提取增殖期扇贝卵巢总 RNA, 利用 cDNA 反转录试剂盒(大连宝生物公司)并按照说明将上述 RNA 反转录成为 cDNA, 以 cDNA 做为模板, P1 和 P2 为引物, 使用 MEGAscript RNAi 试剂盒(美国 Ambion 公司), 按其操作步骤合成栉孔扇贝 *foxl2* dsRNA, 利用核酸蛋白检测仪测定合成的 dsRNA 浓度, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

收稿日期: 2018-03-23; 修回日期: 2018-04-10

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目(J15LE05); 山东省现代农业产业技术体系建设专项资金(SDAIT-14)

[Foundation: Supported by A Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program (J15LE05); Special Fund for The Construction of Modern Agricultural Industry Technology System in Shandong (SDAIT-14)]

作者简介: 刘晓玲(1976-), 女, 山东莱州人, 副教授, 博士, 通信作者, 主要从事生化与分子生物学研究, 电话: 0535-6902638, E-mail: lx12008i@163.com

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of the primers used in this study

引物	引物序列(5'-3')	长度/ bp
P1	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> CGGAGGCAGTTTCAACAC	442
P2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> CTCCTCAAACCTCCGGCA	
P3	TTCTTGGGAATGGAATCTGC	303
P4	GCCAGACTCGTCGTATTCCT	
P5	CCAGTTTGCTCAACTGACGA	
P6	CTGATGTGCTGAGGCATTGT	103

注: 下划线处的序列为 T7 启动子序列。

1.2.2 dsRNA 注射和取样

将上述暂养的健康雌性栉孔扇贝分为 3 组, 空白对照组(不注射组)、阴性对照组(注射 PBS 组)、实验组(注射 dsRNA 组), 每组 25 个个体, 分别置于 200 L 水体中启动实验。于实验起始时, 使用微量注射器分别从栉孔扇贝闭壳肌处多点注射, 实验组注射 dsRNA(50 μg dsRNA 溶于 100 μL PBS 中), 阴性对照组注射 100 μL PBS, 一周后进行第二次注射。实验期间按照 1.1 的培养条件和日常管理方法培养栉孔扇贝, 于干扰后第 12 天每组取样。解剖取扇贝卵巢组织, 去除其中的消化道后, 迅速将其分成几份, 一部分于 Bouin's 液中固定 24 h, 用于后期组织切片观察, 一部分用液氮速冻, 保存于 -80℃ 冰箱用于总 RNA 和总蛋白的提取。

1.3 qRT-PCR 及其数据分析

按照 1.2.1 的方法提取上述 3 个组 RNAi 第 12 天扇贝卵巢的总 RNA 并反转录为 cDNA, 根据栉孔扇贝 *β-actin* 基因序列(GenBank 注册号: AY335441) 和 *foxl2* 基因序列分别设计内参引物 P3/P4 和特异引物 P5/P6(表 1), 以扇贝 *β-actin* 为内参基因, qRT-PCR 检测 *foxl2* 在各组织样本中的表达水平。qRT-PCR 检测体系如下: 引物(2 μmol/L)各 1 μL, ROX 0.4 μL, 2× SYBR Green Master Mix 10 μL, RNAase-free 水 6.6 μL, cDNA 模板(cDNA 母液稀释 10 倍)1 μL。每组选取 5 个样本用于检测, 每个样本设一个重复。扩增产物进行溶解曲线分析以保证其特异性, 所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法分析。

利用 SPSS 软件进行显著性分析(One-way ANOVA), 最小显著差法(Least Significant Difference, LSD)多重检验法进行统计分析($P < 0.05$ 表示显著水平)。

1.4 Western blotting(WB)检测

利用蛋白提取试剂盒(上海生工生物工程公司)

提取 3 个组 RNAi 第 12 天的栉孔扇贝卵巢总蛋白, 核酸蛋白检测仪检测蛋白浓度。选用兔抗 β -Actin 多克隆抗体(武汉博士德生物工程公司)调平各组织总蛋白的上样量, 采用 WB 技术并以本实验室自制的栉孔扇贝 FOXL2 多克隆抗体(抗性特异, 相关内容已投稿)为一抗检测各组(每组 3 个不同个体混合)卵巢中 FOXL2 蛋白的合成量。WB 流程按文献[12]进行, 其中一抗为 FOXL2 抗体, 二抗为羊抗兔 IgG, DAB 显色, 凝胶成像系统拍照。

1.5 组织学切片观察

Bouin's 液固定的各组栉孔扇贝卵巢组织经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡浸蜡、包埋处理后, 切片切片(6 μm 厚), 苏木精-伊红(H&E)染色, 中性树胶封片, Nikon E80i 显微镜观察拍照。

2 结果

2.1 dsRNA 的质量

琼脂糖凝胶电泳检测, 本实验所合成的栉孔扇贝 *foxl2* dsRNA 条带完整、无降解(图 1), 可以用于 RNAi 实验。

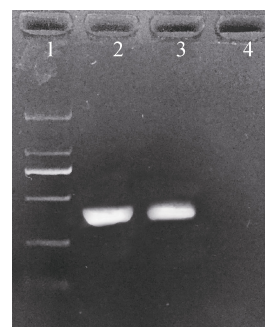


图 1 电泳检测转录合成的 dsRNA

Fig. 1 The electrophoretic detection of the synthesized dsRNA 1. DNA Marker DL2000; 2-3. dsRNA product; 4. control (transcriptase not added)

2.2 栉孔扇贝 *foxl2* mRNA 敲降效率

qRT-PCR 检测, RNAi 第 12 天实验组卵巢中的 *foxl2* mRNA 表达量显著降低(图 2), 分别较相同时间空白对照组降低了 62%, 较阴性对照组降低了 66%; 而两个对照组之间未见显著性差异。表明本实验合成的 dsRNA 可有效地降低栉孔扇贝 *foxl2* mRNA 表达水平。

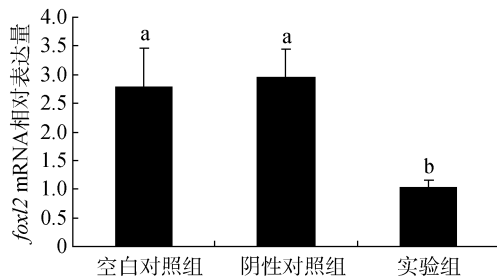


图 2 *Foxl2* mRNA 在栉孔扇贝卵巢中的相对表达量分析
Fig. 2 The level of *foxl2* mRNA detected by qRT-PCR in *C. farreri* testes after RNAi

实验组卵巢中的表达量设置为 1.00, 不同的字母(a, b)表示显著性差异($P < 0.05$)

The expression level in the ovary of the experimental group was set as 1.00; different letters (a and b) indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)

2.3 栉孔扇贝 FOXL2 蛋白在各组卵巢中的含量

WB 结果显示, RNA 干扰第 12 天的实验组卵巢中 FOXL2 蛋白含量显著低于空白对照组和阴性对照组。

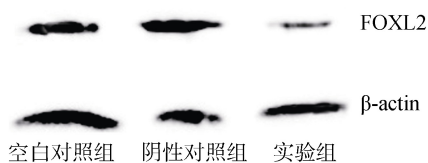


图 3 Western blot 检测 RNA 干扰后栉孔扇贝卵巢中的 FOXL2 蛋白含量

Fig. 3 The content of the FOXL2 protein detected by Western blotting in *C. farreri* testes after RNAi

2.4 栉孔扇贝 *foxl2* RNAi 后卵巢组织结构的观察

RNA 干扰后 12 天取样切片观察发现, 3 个组栉孔扇贝的卵巢均发育至生长期的初期。切片显示实验组与对照组组织结构明显不同, 光镜下观察, 第 12 天的空白对照组与阴性对照组卵巢中的卵原细胞紧贴滤泡壁, 核透亮, 胞质具有嗜碱性; 滤泡壁上的

卵母细胞胞质增多, 较卵原细胞体积变大, 其游离端向滤泡腔中突出, 随着发育, 卵母细胞体积进一步增大并进入滤泡腔中, 细胞具有更大、更透亮的细胞核并且核仁明显(图 4 A, B, a)。但实验组卵巢滤泡中生殖细胞数量减少、体细胞比例相对增加, 部分卵原和卵母细胞形态异常(图 4 C-D)。与对照组比, 实验组卵巢滤泡腔中的卵母细胞数量减少明显, 一些卵母细胞发生变形、胞质嗜碱性增强, 大而透亮的细胞核在多数卵母细胞中消失了(图 4 C, c)。此外, 实验组存在个体差异, 选取切片的 7 个个体中有 3 个

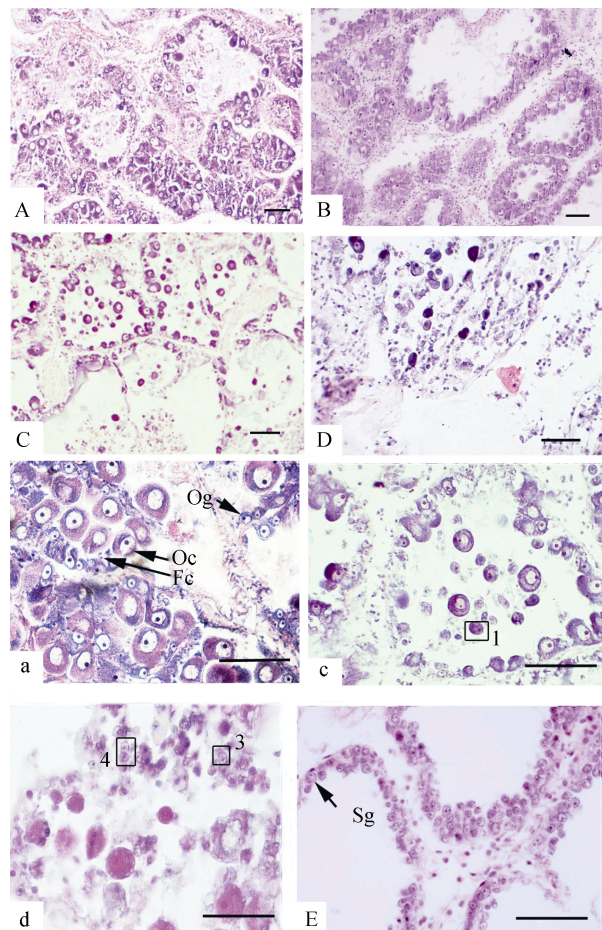


图 4 *Foxl2* RNA 干扰对栉孔扇贝卵巢影响的组织学观察
Fig. 4 Histological observation of *C. farreri* ovaries effected by the *foxl2* RNAi

A. 空白对照组卵巢; B. 阴性对照组卵巢; C, D. 实验组卵巢; E. 精巢; a, c, d. 分别为 A, C, D 的局部放大图; 1. 变形的卵母细胞; 2、3. 类似精原细胞

Og. 卵原细胞; Oc. 卵母细胞; Sg. 精原细胞; Fc. 滤泡细胞。标尺: 50 μ m

A. ovary of the vacuity control; B. ovary of the negative control; C, D. ovary of the experiment group; E. testis; a, c, d. magnified views of A, C, and D; 1. deformed oocyte; 2, 3. cells like spermatogonium. Og. oogonium; Oc. oocyte; Fc. follicular cell; Sg. spermatogonium. Scale bars: 50 μ m

干扰个体的卵巢中不仅出现卵母细胞发育变形的情况, 甚至还可见少量类似精原细胞(精巢中紧贴滤泡壁的一些着色浅、核透亮、有核仁的细胞, 其形态较卵原细胞小)样的细胞(图 4D, d, E), 它们与空白对照组卵巢中的卵原细胞形态明显不同(图 4 a)。

3 讨论

RNA 干扰是一种将外源合成的双链 RNA(dsRNA) 导入生物体内, 诱发其同源 mRNA 高效特异性降解的技术。RNA 干扰的效果与 dsRNA 选择的区段、dsRNA 的使用浓度以及导入方法有关。双链 RNA 被吸收的难易程度具有物种或者细胞的差异性, 因此不同物种导入 dsRNA 的方法不同。哺乳动物的细胞较难直接吸收 dsRNA, 这一类物种的 RNA 干扰多借助于转染方法得以实施^[13]; 而 dsRNA 似乎更容易进入无脊椎动物细胞中, 可以被细胞内吞^[14]。近年来, 许多学者采用直接注射 dsRNA 的方法执行贝类靶基因 RNA 干扰实验, 并取得明显效果^[15-18]。王芹等^[19]通过闭壳肌注射 siRNA 的方法, 成功抑制了三角帆蚌外套膜细胞中靶基因的表达水平, 说明闭壳肌注射可以使干扰在组织间传递; Fabioux 等^[15]在研究牡蛎 *vasa* 基因的功能时发现, 即使干扰后的靶基因 mRNA 表达量仅下降了 39%, 其性腺的表型变化已明显可见, 由此提出 40% 的下降水平是 *vasa* mRNA 干扰有效性的阈值; Du 等^[17]发现使用不同剂量的 dsRNA 敲降马氏珠母贝 *fam20C* 的 mRNA, 其敲降水平(30%~50%)具有 dsRNA 剂量相关性。Yang 等^[20]对栉孔扇贝成体精巢中的 *klf4* 基因进行 RNA 干扰, 结果发现干扰后的精巢出现了雌雄同体的性腺表征, 在精巢中出现了卵原和卵母细胞。本研究使用闭壳肌注射 dsRNA 的方法实施栉孔扇贝 *foxl2* RNA 干扰, 诱发其卵巢中 mRNA 水平下降了 62%, 表明注入的 dsRNA 被卵巢细胞吸收, 干扰方法有效、干扰效率高。

根据栉孔扇贝 *foxl2* RNA 干扰后卵巢结构的组织学观察, 发现滤泡中卵母细胞数量减少, 形态异常, 其细胞核发生程度不同的固缩, 卵子发生受阻, 表明 *foxl2* 是栉孔扇贝卵子发生的必需基因。Uhlenhaut 等^[6]研究发现 FOXL2 缺失的成体小鼠卵巢组织学发生改变, 出现类似精巢生精小管的结构, 大部分生殖细胞都消失了, 残留的卵母细胞也发生了形态退化, 卵巢颗粒细胞重编程转分化, 表现为类支持细胞的形态特征, 而本研究中, 在 RNA 干扰后的扇贝卵巢中也发现了类精原细胞。Uhlenhaut 等^[6]发现 FOXL2

缺失后, 小鼠体内雄性相关的基因如 *Dax1*, *Dmrt1*, *Dhh* 等, 尤其是 *Sox9* 基因的表达量都急剧上升, 认为 FOXL2 的作用机制是参与抑制雄性基因的表达来维持卵巢正常。Elzaia 等^[21]发现 FOXL2 缺失的山羊卵巢中, 有三分之二的雄性特异基因上调表达, 而雌性相关基因仅有 19 个下调表达, 认为 FOXL2 主要是抑制雄性特异基因而不是激活雌性基因表达来发挥作用。Guiguen 等^[22]认为 FOXL2 在鱼类中通过参与类固醇雌激素的生成影响雌性分化和发育。但目前 FOXL2 的功能作用机制研究在无脊椎动物中几乎不可见, 其在栉孔扇贝卵子发生中是必需的, 但具体作用机制是否与上述文献中 FOXL2 的作用机制类似, 尚需要进一步的深入研究来明确。

参考文献:

- [1] Alam M A, Kobayashi Y, Horiguchi R, et al. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 157(1): 75-85.
- [2] Govoroun M S, Pannetier M, Pailhoux E, et al. Isolation of chicken homolog of the FOXL2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development[J]. *Dev Dyn*, 2004, 231(4): 859-870.
- [3] Nakamoto M, Matsuda M, Wang D S, et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(1): 353-361.
- [4] Oshima Y, Uno Y, Matsuda Y, et al. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the frog *Rana rugosa*[J]. *Gen Comp Endocr*, 2008, 159(3): 170-177.
- [5] Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, et al. *Foxl2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(11): 1171-1181.
- [6] Uhlenhaut N H, Jakob S, Anlag K, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation[J]. *Cell*, 2009, 139(6): 1130-1142.
- [7] Schmidt D, Ovitt C E, Anlag K, et al. The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance[J]. *Developmental Disease*, 2004, 131(4): 933-942.
- [8] 刘晓玲, 刘建国, 张志峰. 基因 *foxl2* 的结构及表达调控[J]. *中国海洋大学学报*, 2012, 43(3): 38-43. Liu Xiaoling, Liu Jianguo, Zhang Zhifeng. Structure and expression regulation of gene *foxl2*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 43(3): 38-43.
- [9] Liu X L, Zhang Z F, Shao M Y, et al. Sexually dimorphic expression of *foxl2* during gametogenesis in scal-

- lop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates[J]. *Dev Genes Evol*, 2012, 222(5): 279-286.
- [10] Doench J G, Petersen C P, Sharp P A. siRNAs can function as miRNAs[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(4): 438-442.
- [11] Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, et al. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation[J]. *Science*, 2009, 325(5946): 1388-1390.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1217-1232. Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning experiment guide*[M]. Huang Peitang, Translation. Third Edition. Beijing: Science Press, 2008.
- [13] 董超华. 克氏原螯虾两种模式识别受体基因的克隆、重组表达及功能分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 37. Dong Chao-hua. *Molecular cloning, Recombinant expression and functional analysis of two pattern recognition receptor from red swamp crayfish *Procambarus clarkia**[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009: 37.
- [14] Saleh M C, van Rij R P, Hekele A, et al. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing[J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(8): 793-802.
- [15] Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, et al. In vivo RNA interference in oyster-vasa silencing inhibits germ cell development[J]. *Febs Journal*, 2009, 276(9): 2566-2573.
- [16] Huvet A, Fleury E, Corporeau C, et al. In vivo RNA interference of a gonad-specific transforming growth factor- β in the pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(4): 402-410.
- [17] Du J Z, Liu C, Xu G R. *fam20C* participates in the shell formation in the pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 23(1): 3563: 1-9.
- [18] Ma X S, Ji A C, Zhang Z F, et al. Piwi1 is essential for gametogenesis in mollusk *Chlamys farreri*[J]. *PeerJ*, 2017, 5(6): e3412: 1-14.
- [19] 王芹, 汪桂玲, 陈亚, 等. RNA 干扰沉默三角帆蚌 *HcCA3* 基因对贝类矿化作用的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(2): 741-747. Wang Qin, Wang Guiling, Chen Ya, et al. Effect of silencing *HcCA3* gene in *Hyriopsis cumingii* by RNA interference on mineralization of Shellfish[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(2): 741-747.
- [20] Yang D D, Zhang Z F, Liang S S, et al. A novel role of Krüppel-like factor 4 in Zhikong scallop *Chlamys farreri* during spermatogenesis[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(6): e0180351: 1-16.
- [21] Elzaïat M, Jouneau L, Thepot D, et al. High-throughput sequencing analyses of XX genital ridges lacking FOXL2 reveal DMRT1 up-regulation before SOX9 expression during the sex-reversal process in goats[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(6): 153: 1-14.
- [22] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish[J]. *Gen Comp Endocr*, 2010, 165: 352-366.

Necessity of *foxl2* in the oogenesis of the scallop *Chlamys farreri*

LIU Xiao-ling, LIU Jun, WANG Zhen-dong, WANG Zhen-hua, LI Yan-shen, CUI Long-bo

(College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Received: Mar. 23, 2018

Key words: scallop; *Chlamys farreri*; ovary; oogenesis; *foxl2*; RNAi

Abstract: This study elucidates the *foxl2* function in the oogenesis and ovarian maintenance of the scallop *Chlamys farreri*. We synthesized the *C. farreri foxl2* dsRNA *in vitro* and then injected into the adductor muscle with 50 μ g dsRNA for each scallop. The injection was administered two times; the second injection was on the 7th day after the first injection. The scallops injected with the PBS solution using the same volume and method were considered the negative control, and the scallops without any injection were the blank control. qRT-PCR revealed a 62% decline in the *foxl2* mRNA level in the ovaries of RNAi scallops and an apparent reduction in the FOXL2 protein content in the RNAi ovaries, suggesting the effective knockdown in the *foxl2* mRNA level. Furthermore, histologically, the abnormal oocyte morphology, enhanced eosinophilia of the cytoplasm, and nucleus pulsation were observed in the ovaries after RNAi, suggesting that oogenesis was apparently blocked. This study establishes that *foxl2* plays a vital role in *C. farreri* oogenesis.

(本文编辑: 张培新)