

• 生物技术与方法 •

雌激素受体 Esr1 诱导红耳龟早期卵巢分化

郭金洪^{1,2}, 杨洪哲^{1,3}, 时翔², 胡颖², 王圣云², 汪思凡², 孙伟^{1,2*}, 葛楚天^{1,2*}

1 浙江万里学院 动物性别与发育重点研究所, 浙江 宁波 315100

2 浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

3 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266000

郭金洪, 杨洪哲, 时翔, 胡颖, 王圣云, 汪思凡, 孙伟, 葛楚天. 雌激素受体 Esr1 诱导红耳龟早期卵巢分化[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2308-2321.

GUO Jinhong, YANG Hongzhe, SHI Xiang, HU Ying, WANG Shengyun, WANG Sifan, SUN Wei, GE Chutian. Estrogen receptor Esr1 induces early ovarian differentiation in *Trachemys scripta*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2308-2321.

摘要: 为探究 3 种雌激素受体(estrogen receptor) Esr1、Esr2 和 Gper1 在红耳龟早期胚胎性腺分化中的作用, 本研究在分析受体基因表达特征的基础上, 通过向性腺分化启动前的产雄温度(male-producing temperature, MPT)龟胚分别注射 Esr1、Esr2 和 Gper1 激动剂 PPT、WAY 200070 和 G-1, 从性腺形态结构、生殖细胞分布模式、性别分化关键基因和蛋白表达分布方面对处理后的胚胎性腺进行了性逆转分析。表达分析结果显示, *esr1* 在性别分化关键时期性腺中的表达量显著高于 *esr2* 和 *gper1* (表达极低), 且呈现产雌温度(female-producing temperature, FPT)性腺高表达。功能验证实验显示, PPT 处理后的 MPT 性腺形态结构明显雌性化, 生殖细胞呈现雌性分布模式; 雄性分化关键基因 *dmrt1*、*amh* 和 *sox9* mRNA 表达明显下降, 雌性分化关键基因 *foxl2* 和 *cyp19a1* mRNA 表达则显著上升; Amh 和 Sox9 蛋白表达的荧光信号几乎消失, Foxl2 和 Arom 蛋白被激活出现大量表达, 表明性腺由雄性逆转为雌性(性逆转率: 70.27%)。而 WAY 200070 和 G-1 处理后的 MPT 性腺仍分化为睾丸, 雌雄基因和蛋白的表达及分布与雄性性腺类似。结果表明在红耳龟中, 单独激活 Esr1 能够充分启动早期性腺的雌性分化过程, 提示雌激素可能通过其受体 1 (Esr1)诱导早期卵巢分化。本研究为进一步解析雌激素在龟性别决定和分化中的调控机制提供了参考。

关键词: 雌激素受体; 性腺分化; 雌激素; 性逆转; 红耳龟

资助项目: 国家自然科学基金(32325049, U22A20529); 宁波市自然科学基金(2022J193)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32325049, U22A20529) and the Natural Science Foundation of Ningbo (2022J193).

*Corresponding authors. E-mail: GE Chutian, cge@zwu.edu.cn; SUN Wei, sunwei0802@zwu.edu.cn

Received: 2023-11-09; Accepted: 2024-04-01; Published online: 2024-04-03

Estrogen receptor *Esr1* induces early ovarian differentiation in *Trachemys scripta*

GUO Jinhong^{1,2}, YANG Hongzhe^{1,3}, SHI Xiang², HU Ying², WANG Shengyun²,
WANG Sifan², SUN Wei^{1,2*}, GE Chutian^{1,2*}

1 Institute of Animal Sex and Development, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

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

3 College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266000, Shandong, China

Abstract: This study aims to explore the roles of three estrogen receptors (*Esr1*, *Esr2*, and *Gper1*) in early differentiation of embryonic gonads of *Trachemys scripta*. The expression characteristics of the receptor genes were studied first. The *Esr1*, *Esr2*, and *Gper1* agonists PPT, WAY 200070, and G-1 were respectively injected into the embryos at the male-producing temperature (MPT) before initiation of gonadal differentiation. The sex reversal of the treated embryonic gonads was analyzed in terms of morphological structure of gonads, distribution pattern of germ cells, and expression of key genes and proteins involved in sex differentiation. The expression level of *esr1* during the critical stage of sex differentiation was higher than those of *esr2* and *gper1* (very low expression) and was particularly high in the gonads at the female-producing temperature (FPT). After treatment with PPT, the MPT gonads presented obviously feminized morphology and structure, with the germ cells exhibiting a female distribution pattern. Furthermore, the mRNA expression levels of the key genes (*dmrt1*, *amh*, and *sox9*) for male differentiation were down-regulated significantly, while those of the key genes (*foxl2* and *cyp19a1*) for female differentiation were up-regulated observably. The fluorescent signals of *Amh* and *Sox9* expression almost disappeared, while *Foxl2* and *Arom* were activated to express abundantly, which fully demonstrated the sex reversal of the gonads from male to female (sex reversal rate: 70.27%). However, the MPT gonads treated with WAY 200070 and G-1 still differentiated into testes, and the expression patterns of the key genes and proteins were similar to those in male gonads. The above results demonstrate that activation of *Esr1* alone can fully initiate the early female differentiation process of gonads, suggesting that estrogen may induce early ovarian differentiation *via* *Esr1* in *Trachemys scripta*. The findings provide a basis for further revealing the mechanisms of estrogen regulation in sex determination and differentiation of turtles.

Keywords: estrogen receptor; gonadal differentiation; estrogen; sex reversal; *Trachemys scripta*

除了遗传型性别决定(genetic sex determination, GSD) (代表动物: 哺乳类、鸟类), 温度依赖型性别决定(temperature-dependent sex determination, TSD)是另一种典型的由环境因素决定动物性别的性别决定模式, 其主要特征是缺失性染色体,

子代性别由胚胎孵化温度决定(如鳄鱼、龟类等)^[1-3]。研究发现, 雌激素介导调控脊椎动物性别决定、性别分化和性腺发育过程。在鸟类^[4-6]、爬行类^[7-9]、鱼类^[10-11]等非哺乳类动物中, 雌激素或其合成抑制剂(如芳香化酶抑制剂)甚至能

够拮抗性染色体和温度等对性别的决定作用,继而逆转性腺的性别分化方向。

红耳龟(*Trachemys scripta*)是一种常见的TSD爬行动物,其在26℃产雄温度(male-producing temperature, MPT)孵化下100%胚胎分化为雄性,32℃产雌温度(female-producing temperature, FPT)孵化下100%胚胎发育为雌性。根据红耳龟胚胎发育形态图谱^[12],第14期时性腺刚刚形成,同时进入性别决定时期(第14–17期,性别决定关键时期);第14–19期,被称为温度敏感期(temperature-sensitive period, TSP),期间孵化温度的改变会直接影响之后的性腺分化^[13]。大量研究已证实在TSP期间,外源雌激素能够诱导红耳龟MPT性腺向雌性彻底逆转,而芳香化酶抑制剂则导致FPT性腺完全分化为睾丸^[13–15],但雌激素如何调控早期雌性分化及卵巢形成的分子机制并不明晰。

在大部分脊椎动物中,雌激素是通过与雌激素受体(estrogen receptor, ER)特异性结合来发挥调控作用。ER主要包括两种介导基因组效应的核受体Esr1 (estrogen receptor 1, ER α)和Esr2 (estrogen receptor 2, ER β),以及介导非基因组效应的G蛋白偶联膜受体(G protein-coupled estrogen receptor 1, Gper1)^[16–17]。小鼠雄性或雌性个体中*esr1*基因缺失均会导致不育,而缺失*esr2*基因的雌性个体却仅表现出生育能力低下(雄性无影响)^[18–19]。敲低鸡的*gper1*基因,结果显示Gper1介导调控雌激素诱导的原始生殖细胞增殖^[20],而Gper1在小鼠雌激素发挥作用的过程中并非必需^[21]。此外,越来越多的研究利用ER激动剂或抑制剂/拮抗剂来解析雌激素作用的具体途径。在GSD动物中华鳖^[22]和TSD动物美洲短吻鳄^[8]中,Esr1激动剂与外源雌激素作用类似,能够诱导未分化的ZZ/MPT性腺向雌性方向逆转,提示在这两个物种中,Esr1是介导雌激

素调控卵巢分化的主要受体。目前,关于红耳龟Esr1、Esr2和Gper1的功能研究尚未见报道,雌激素作用的受体类型还不明确。

为了解析雌激素受体是否直接影响红耳龟胚胎性腺的性别分化,本研究向尚未启动性腺分化的胚胎分别注射Esr1激动剂PPT、Esr2激动剂WAY 200070和Gper1激动剂G-1,从组织形态学和分子研究水平分析了性腺的性逆转情况。研究结果揭示了Esr1在红耳龟早期雌性分化和卵巢形成中的关键作用,为进一步阐明雌激素在龟卵巢决定、分化和发育中的具体调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 胚胎孵化及组织收集

实验所需红耳龟受精卵采集自湖南汉寿龟鳖养殖场(产蛋后12 h内收集)。将龟卵均匀地排列在孵化盒中,盖上湿润的蛭石后置于孵化器中孵育。设置两个孵化温度:产雄温度26℃(MPT)和产雌温度32℃(FPT),湿度控制在75%–85%。孵化过程中,对照红耳龟胚胎发育形态图谱^[12],在关键发育时间点进行药物注射及胚胎组织收集,本研究的动物实验方案通过了浙江万里学院实验动物伦理委员会的伦理审查(批准号:20230104002)。实验中,采集性腺和性腺-中肾复合体(gonad-mesonephros complexes, GMCs),分别保存于TRIzol (Invitrogen)和4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)中,用于RNA提取和组织切片染色。将第14–18期和第21期的MPT和FPT性腺样品(3个重复,共计36个样本),送至北京诺禾致源生物科技有限公司进行2代转录组测序(RNA-Seq),基因的表达水平[每个千个碱基的转录每百万映射读取的片段数(fragments per kilobase million, FPKM)值]由公司分析后提供。

1.2 药物注射

在 26 °C (MPT) 孵化温度下, 待龟卵发育至第 16 期时, 利用微量进样器向胚胎分别注射 Esr1 激动剂 PPT (Sigma)、Esr2 激动剂 WAY 200070 (Aladdin) 和 Gper1 激动剂 G-1 (Aladdin), 药物浓度分别为 4.0、6.0 和 4.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (使用 95% 乙醇溶解), 注射量为 5 μL /枚卵。实验中, 设置 MPT 和 FPT 对照组, 注射 5 μL 95% 乙醇。以上每组各处理 300 枚受精卵。收集第 21 和 25 期胚胎, 分离性腺和 GMCs。

1.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

将保存于 TRIzol 中的 MPT 和 FPT 正常组性腺(第 14–18 期和 21 期)、3 个 ER 激动剂处理组及对照组性腺(第 25 期)进行总 RNA 抽提, 根据逆转录试剂盒(Thermo Scientific)的操作流程, 合成 cDNA 模板。参考 TaKaRa 试剂盒说明书配制 12.5 μL PCR 反应体系: 6.25 μL SYBR[®] Premix, 0.5 μL 引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 1 μL cDNA (200 ng/ μL), 4.75 μL 水。在 BIO-RAD 实时定量 PCR 仪(CFX Connect)上设置反应程序如下: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 反应循环 40 次。实验中设置不少于 3 个生物学重复($n \geq 3$), 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算基因相对表达量, 选择 *gapdh* 为内参基因。所得数据($\bar{x} \pm s$)用 SPSS 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 时具有统计学意义。基因引物序列见表 1。

1.4 组织包埋切片及染色

将保存于 4% PFA 中的 GMCs 组织(第 21、25 期)在 4 °C 条件下过夜固定(16–24 h), 次日用 50% 乙醇替换 PFA, 2 h 后替换为 70% 乙醇(4 °C 可长期保存)。包埋前在体视显微镜下观察并修正 GMCs 组织形状, 然后经 80%、90%、95% 和 100% 乙醇依次脱水, 二甲苯透明后浸泡于液态石蜡中, 2 h 后完成石蜡包埋并进行切片[厚度 (6 ± 1) μm]。组织切片在烘箱(60 °C)中干燥后浸于

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

Primer name	Primer sequence (5'→3')
esr1-F	TCATACACTCCTGTGAAAGTGG
esr1-R	AGCTGAGGTCTGCTCAAAGTC
esr2-F	TGCACTGCCTATGAACAGAGAG
esr2-R	CCTTCACAAGACCAAAACGCC
gper1-F	AACACAGGAATTA AAAAGGTCCAAGG
gper1-R	TGCCATGCACAAAGCAAATGA
dmrt1-F	ACTACCCTCCTGCCTCCTACCT
dmrt1-R	CTCCTTTGGTGCTTTCATTGCT
amh-F	CGGCTACTCCTCCCACACG
amh-R	CCTGGCTGGAGTATTTGACGG
sox9-F	CAGTCCGAGCCATTACAGCG
sox9-R	GCGGGTGATGGTCGGGTA
foxl2-F	AGAACAGCATCCGCCACAAC
foxl2-R	CGGGTCCAGCGTCCAGTAG
cyp19a1-F	AGCACTATGGAAAGAAATTCGACCT
cyp19a1-R	GGTTTCAATAAGAGTGCTTGCCAA
gapdh-F	GGCTTTCCTGTTCCAACCTC
gapdh-R	GACAACCTGGTCCTCCGTGTATC

二甲苯中彻底脱蜡, 先后经 100%、90%、70%、50% 乙醇渗透, 苏木素和伊红(hematoxylin & eosin, H&E)染色, 封片后在尼康 Ni-E 电动正置显微镜下观察拍照。

1.5 免疫荧光染色

将 GMCs 组织切片脱蜡后依次经 100%、90%、70%、50% 乙醇逐级复水, 后置于 95 °C 的抗原修复液(10 mmol/L 柠檬酸钠溶液)中约 30 min。待自然冷却至室温后, 向切片滴加封闭液室温封闭 1 h。吸弃封闭液后, 迅速滴加一抗溶液过夜孵育(4 °C)。次日, 使用洗脱液清洗切片(3 次, 每次 10 min), 滴加荧光二抗和 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)混合液于室温下避光孵育, 2 h 后使用洗脱液充分清洗切片。经抗荧光衰减剂封片后, 使用激光扫描共聚焦显微镜(Nikon)进行观察拍照。本实验用到的一抗及稀释比例为: 兔抗 Vasa (1:500, Abcam)、鼠抗 Ctnnb1 (1:500, Sigma)、兔抗 Sox9 (1:500, Millipore)、羊抗 Foxl2 (1:300,

杭州华安生物技术有限公司制备)、兔抗 Amh (1:1 000, 杭州华安生物技术有限公司制备)和鼠抗 Aromatase (Arom) (1:100, 杭州华安生物技术有限公司制备); 根据种属来源, 对应的荧光二抗及稀释比例为: 驴抗兔 IgG594、驴抗鼠 IgG488 和驴抗羊 IgG488 (1:500, Invitrogen)。

2 结果与分析

2.1 雌激素受体基因在早期胚胎性腺中的表达

为了探究雌激素受体在红耳龟胚胎性腺性别分化中的作用, 首先检测了 3 种雌激素受体基因 *esr1*、*esr2* 和 *gper1* 在性别决定和分化关键时

期(第 14–21 期, 第 14 期时性腺刚开始形成)的产雄温度(MPT)和产雌温度(FPT)性腺中的表达规律。RNA-seq 结果显示, *esr1* 在被检时期性腺中的转录水平均明显高于 *esr2* 和 *gper1*, 且在性别分化启动前的第 14–18 期(温度敏感期), 始终呈现 FPT 性腺高表达。至第 21 期(雌雄性腺形态结构差异分化明显)时, *esr1* 的表达量明显下降(图 1A)。荧光定量 PCR 检测结果与转录组基本一致, 进一步证实 *esr1* 在 FPT 性腺中高表达, 而 *esr2* 和 *gper1* 仅微弱表达或不表达(图 1B)。以上结果提示, *Esr1* 可能与红耳龟早期雌性分化高度关联, 而 *Esr2* 和 *Gper1* 在性腺分化中的作用有限。

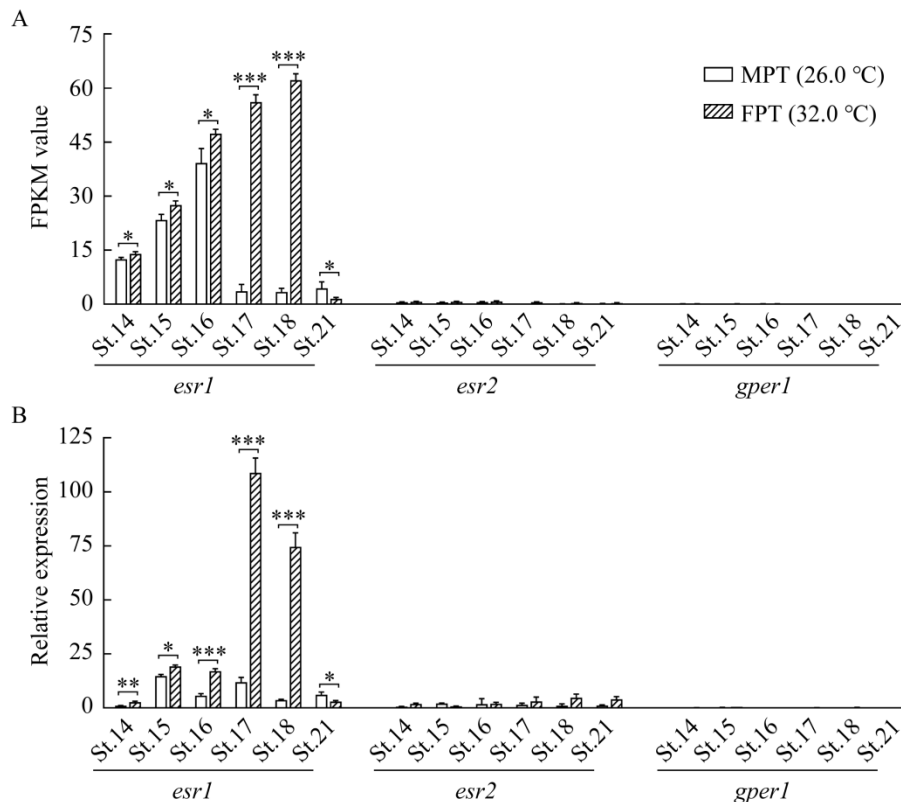


图 1 雌激素受体基因 *esr1*、*esr2* 和 *gper1* 的表达 RNA-Seq (A)和 qRT-PCR (B)检测 3 种雌激素受体基因在第 14–21 期 MPT 和 FPT 胚胎性腺中的表达情况. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 1 Expression of estrogen receptor genes *esr1*, *esr2* and *gper1*. The expression levels of three estrogen receptor genes in MPT and FPT gonads of stages 14–21 were analyzed by RNA-Seq (A) and qRT-PCR (B). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

2.2 雌激素受体激动剂对性腺组织结构的影响

为了进一步明确3种雌激素受体在红耳龟性腺分化中的调控角色,分别向性别分化启动前的MPT龟胚施加Esr1、Esr2和Gper1激动剂PPT、WAY 200070和G-1,从性腺形态结构、生殖细胞分布模式、雌雄基因和蛋白表达分布方面对处理后的胚胎性腺进行了性逆转分析。

首先,从组织学水平对激活雌激素受体后的第25期MPT性腺进行观察。体视显微镜下可见,对照组MPT性腺外观短粗(图2A);对照组FPT性腺较长且呈平扁状(图2F)。经PPT注射处理的MPT性腺呈现细长状,形态类似于

FPT性腺(图2B、2C)。性腺组织切片的H&E染色结果显示,对照组MPT性腺的外层皮质区明显退化,而髓质区高度发育并形成雄性典型结构——性索(图2G、2G');对照组FPT性腺则发育出较厚的皮质区,而髓质区显著退化,出现空腔(图2L、2L')。PPT处理后的MPT性腺髓质区呈现不同程度的退化,未见明显的索状结构,而皮质区变厚、出现生殖细胞(图2H、2I,图2H'、2I'),此时性腺由雄性逆转为雌性。与PPT处理组相比,WAY 200070和G-1处理后的MPT性腺外形和内部结构均与雄性性腺类似,髓质区分布有发达的雄性性索,此时性腺仍向睾丸分化,未发生性别逆转现象(图2D、2E,图2J、2K,图2J'、2K')。

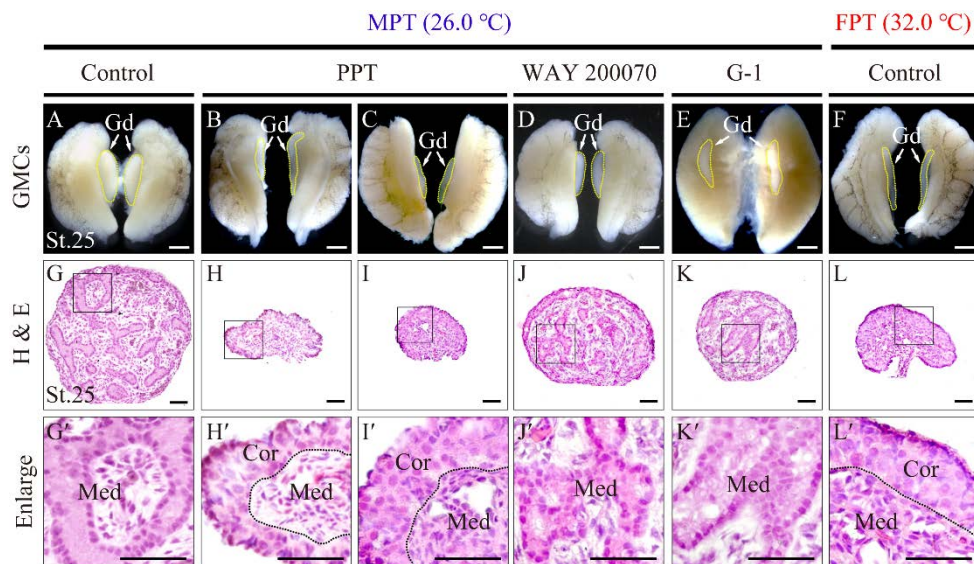


图2 雌激素受体激动剂处理后性腺的形态结构变化 Esr1激动剂PPT、Esr2激动剂WAY 200070和Gper1激动剂G-1分别处理MPT胚胎后,A-F:体视显微镜下观察第25期性腺的外部形态.Gd:性腺(黄色虚线标示);标尺:1 mm.G(G')-L(L'):H&E染色观察第25期性腺的内部组织结构.Cor:皮质区;Med:髓质区(黑色虚线代表皮质和髓质的分界);标尺:50 μm

Figure 2 Morphological and structural changes of gonads treated with estrogen receptor agonists. After MPT embryos treated with Esr1 agonist PPT, Esr2 agonist WAY 200070 and Gper1 agonist G-1, respectively. A-F: The external morphology of stage 25 gonads was observed by stereomicroscope. Gd: Gonads (circle it with a yellow dotted line); Scale bars: 1 mm. G (G')-L (L'): H&E staining showed the internal organizational structure of stage 25 gonads. Cor: Cortical area; Med: Medullary area (the dashed black line represents the boundary between cortex and medulla); Scale bars: 50 μm.

2.3 雌激素受体激动剂对生殖细胞分布的影响

本研究通过生殖细胞特异性 Vasa 蛋白的免疫荧光染色进一步明确雌激素受体激动剂处理后生殖细胞的分布变化。结果如图 3 所示,生殖细胞主要分布在 MPT 性腺的髓质区性索上和 FPT 性腺的皮质区内(第 25 期)。在经 PPT 处理的 MPT 性腺中,生殖细胞主要定位在皮质区内,与雌性分布模式一致(性逆转),而 WAY 200070 和 G-1 处理后生殖细胞的分布未出现明显变化,仍主要位于性腺内部性索上,与对照组 MPT 性腺的分布模式类似。实验中以 Ctnnb1(一种细胞黏附蛋白,与膜蛋白结合)的免疫荧光染色来辅

助显示性腺内部的形态结构,其主要分布在红耳龟 MPT 性腺内部髓质区性索上细胞以及 FPT 性腺外层皮质区细胞的细胞膜上(图 3)。

2.4 雌激素受体激动剂对雌雄基因表达的影响

为了进一步验证 Esr1 激动剂 PPT 能够诱导 MPT 性腺发生雄向雌性逆转,而 Esr2 激动剂 WAY 200070 和 Gper1 激动剂 G-1 处理后的 MPT 性腺仍向雄性方向分化,本研究利用 qRT-PCR 从分子水平分析激活雌激素受体对雌雄特异性基因(雄性: *dmrt1*、*amh* 和 *sox9*; 雌性: *foxl2* 和 *cyp19a1*)表达的影响。结果如图 4 所示, *dmrt1*、*amh* 和 *sox9* 基因在对照组 MPT 性腺中

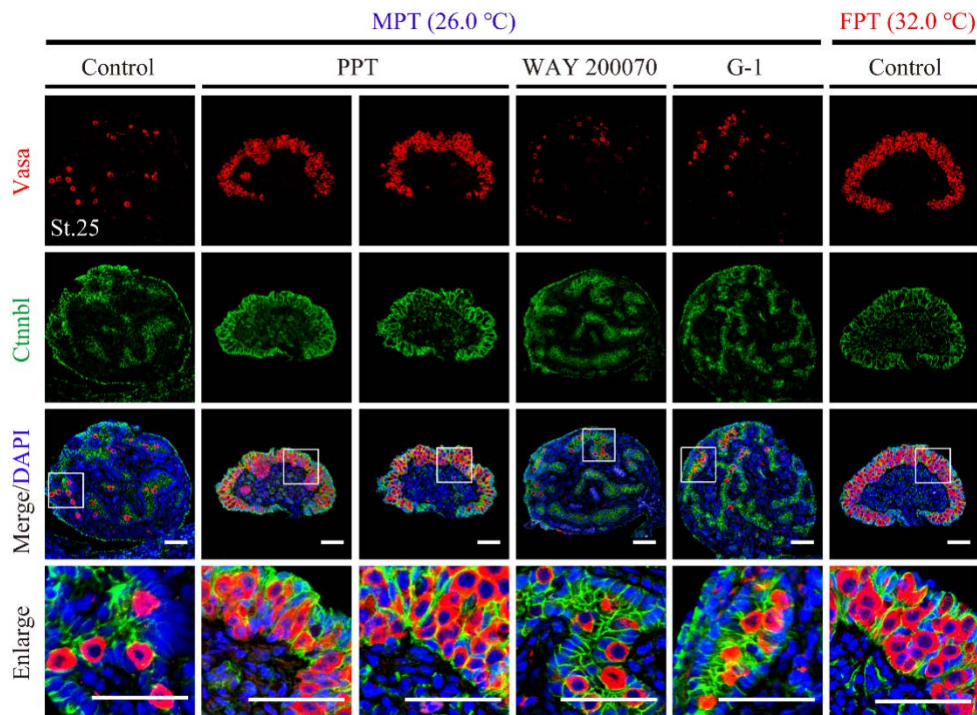


图 3 雌激素受体激动剂处理后生殖细胞的分布变化 Vasa 免疫荧光染色观察 Esr1 激动剂 PPT、Esr2 激动剂 WAY 200070 和 Gper1 激动剂 G-1 分别处理 MPT 胚胎后,第 25 期性腺中生殖细胞的分布情况。标尺: 50 μm

Figure 3 Distribution changes of germ cells after estrogen receptor agonist treatment. Vasa immunofluorescence staining showed the distribution of germ cells in gonads of stage 25 MPT embryos after treatments with Esr1 agonist PPT, Esr2 agonist WAY 200070 and Gper1 agonist G-1, respectively. Scale bars: 50 μm .

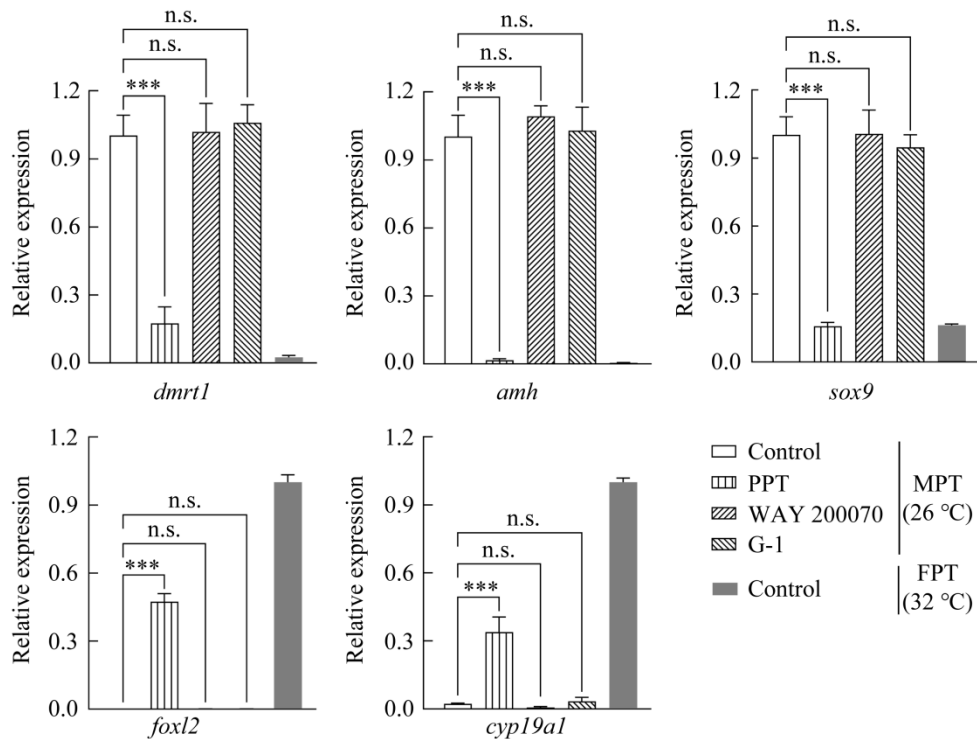


图 4 雌激素受体激动剂处理后性别特异性基因的表达变化 qRT-PCR 检测 Esr1 激动剂 PPT、Esr2 激动剂 WAY 200070 和 Gper1 激动剂 G-1 分别处理 MPT 胚胎后, 第 25 期性腺中 *dmrt1*、*amh*、*sox9*、*foxl2* 和 *cyp19a1* mRNA 的表达。***: $P < 0.001$; n.s.: 无显著差异

Figure 4 Expression changes of sex-specific genes after estrogen receptor agonist treatment. The mRNA expression of *dmrt1*, *amh*, *sox9*, *foxl2* and *cyp19a1* in gonads of stage 25 MPT embryos after treatments with Esr1 agonist PPT, Esr2 agonist WAY 200070 and Gper1 agonist G-1, respectively, were detected by qRT-PCR. ***: $P < 0.001$; n.s.: No significance.

呈现高水平表达, 而 *foxl2* 和 *cyp19a1* 仅微弱表达, 甚至未能检测到其表达信号; 相反地, 在对照组 FPT 性腺中, *foxl2* 和 *cyp19a1* 高度表达, 而 *dmrt1*、*amh* 和 *sox9* 的表达水平较低。PPT 处理后, MPT 性腺中 *dmrt1*、*amh* 和 *sox9* mRNA 表达水平明显降低($P < 0.001$), 而 *foxl2* 和 *cyp19a1* mRNA 表达量显著上升($P < 0.001$)。相比之下, WAY 200070 和 G-1 处理后这 5 个基因的表达量均未发生显著变化(统计学上无差异), *dmrt1*、*amh* 和 *sox9* 仍维持高水平表达, *foxl2* 和 *cyp19a1* 呈现低表达, 与对照组雄性性腺中的表达模式一致(图 4)。

2.5 雌激素受体激动剂对雌雄蛋白分布的影响

利用免疫荧光染色技术对 Amh、Sox9、Foxl2、Aromatase (Arom, 由 *cyp19a1* 基因编码) 蛋白在处理性腺中的分布变化进行检测, Sox9 & Foxl2 (图 5)和 Amh & Arom (图 6)双标染色显示, Sox9 和 Amh 分别主要分布在 MPT 性腺髓质区 sertoli 细胞的细胞核和细胞质中, 而在 FPT 性腺中几乎未见表达的荧光信号; Foxl2 和 Arom 则分别主要定位于 FPT 性腺体细胞的细胞核和细胞质中, 而在 MPT 性腺中未见表达。PPT 处理后, 在少部分第 21 期 MPT 性

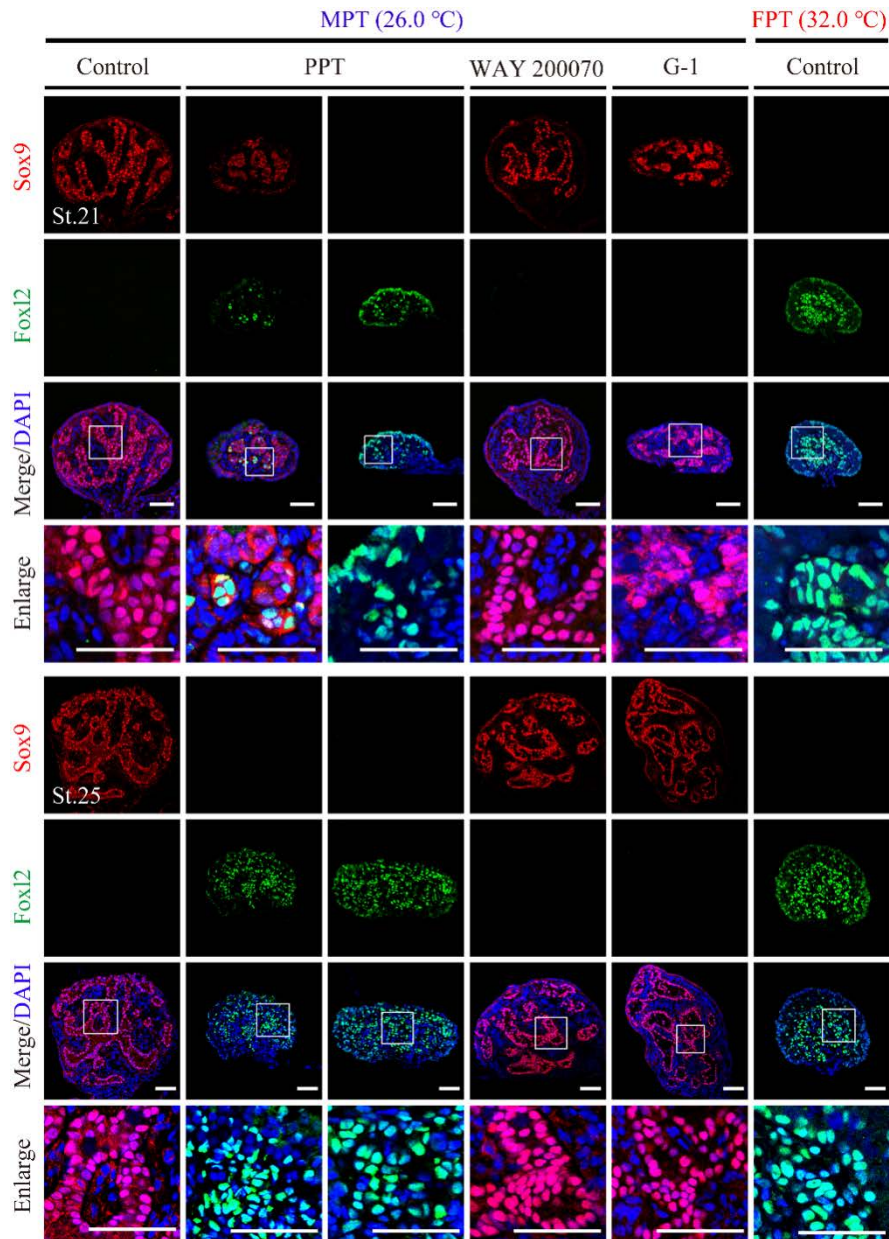


图 5 雌激素受体激动剂处理后性别特异性蛋白 Sox9 和 Foxl2 的分布变化 免疫荧光双标染色检测 Esr1 激动剂 PPT、Esr2 激动剂 WAY 200070 和 Gper1 激动剂 G-1 分别处理 MPT 胚胎后, 第 21 期和 25 期性腺中 Sox9 和 Foxl2 蛋白的表达分布. 标尺: 50 μm

Figure 5 The distribution changes of sex-specific proteins Sox9 and Foxl2 after estrogen receptor agonist treatment. Double immunofluorescence staining showed the expression distribution of Sox9 and Foxl2 in gonads of stage 21 and 25 MPT embryos after treatments with Esr1 agonist PPT, Esr2 agonist WAY 200070 and Gper1 agonist G-1, respectively. Scale bars: 50 μm .

腺中, 同时检测到了 Sox9 和 Foxl2 以及 Amh 和 Arom 的表达信号, 此时性腺呈现间性(卵巢丸)(间性数/反转数: 9/24, 表 2); 大部分性腺

中仅见 Foxl2 和 Arom 的荧光信号, 性腺完全逆转为雌性(卵巢数/反转数: 15/24, 表 2)。待胚胎发育至第 25 期时, 在 PPT 处理后的 MPT

性腺中 *Sox9* 和 *Amh* 的表达几乎完全消失, *Foxl2* 和 *Arom* 被诱导呈现丰富表达, 此时发生性逆转的 MPT 性腺全部彻底分化为卵巢, 未发现雌雄间性个体(卵巢数/逆转数: 26/26, 表 2)。

相比之下, WAY 200070 和 G-1 处理后这 4 个蛋白在 2 个时期的表达水平及分布模式均与对照组 MPT 性腺类似, 未发生性别逆转现象(图 5 和图 6)。

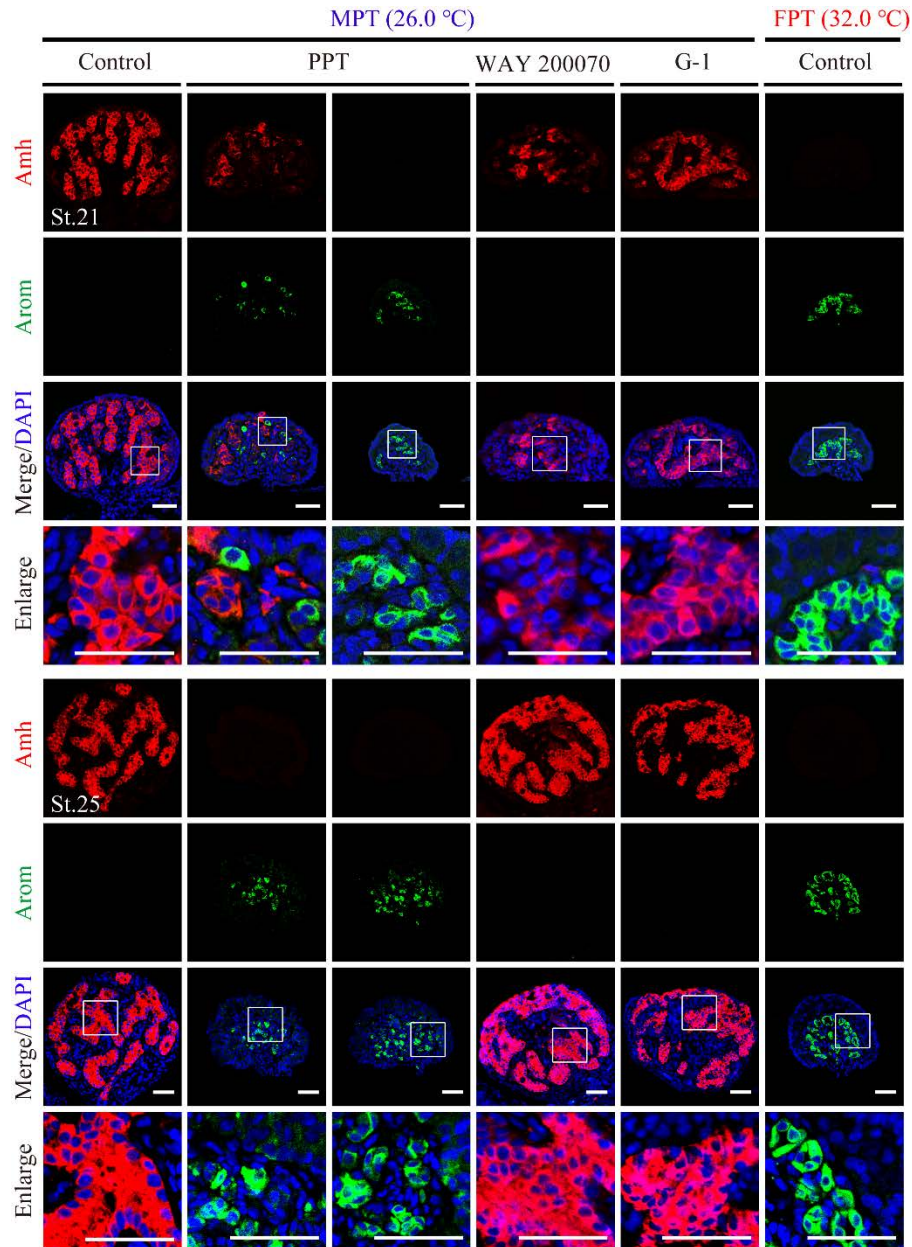


图 6 雌激素受体激动剂处理后性别特异性蛋白 *Amh* 和 *Arom* 的分布变化 免疫荧光双标染色检测 *Esr1* 激动剂 PPT、*Esr2* 激动剂 WAY 200070 和 *Gper1* 激动剂 G-1 分别处理 MPT 胚胎后, 第 21 期和 25 期性腺中 *Amh* 和 *Arom* 蛋白的表达分布. 标尺: 50 μm

Figure 6 The distribution changes of sex-specific proteins *Amh* and *Arom* after estrogen receptor agonist treatment. Double immunofluorescence staining showed the expression distribution of *Amh* and *Arom* in gonads of stage 21 and 25 MPT embryos after treatments with *Esr1* agonist PPT, *Esr2* agonist WAY 200070 and *Gper1* agonist G-1, respectively. Scale bars: 50 μm .

以上研究结果证明, 单独激活 Esr1 确实能够充分启动红耳龟早期雌性分化过程。数据统计如表 2 所示, 在 PPT 处理后的 MPT 胚胎中, 第 21 期时, 70.59% (24/34) 性腺向雌性方向逆转; 第 25 期时, 70.27% (26/37) 性腺彻底分化为卵巢, 性逆转率高。而 WAY 200070 和 G-1 处理后的 MPT 性腺 100% 仍发育为睾丸, 未观察到性逆转个体(表 2)。

3 讨论与结论

在大部分脊椎动物中, 雌激素在雌性性别决定、性腺分化和卵巢发育中扮演重要的调控角色, 甚至能够拮抗遗传因子或环境信号(如温度)对早期性别的决定作用, 从而逆转性腺的分化方向。在红耳龟中, 外源雌激素可单独诱导产雄温

度(MPT)下的胚胎性腺完全分化为卵巢已得到充分的证实, 本研究以雌激素受体(ER)为切入点, 旨在为揭示雌激素调控龟性别决定和性腺分化的分子机制提供基础。

雌激素主要通过结合 ER (Esr1、Esr2 和/或 Gper1) 发挥调控作用。特异性敲除(或敲低) ER 编码基因或施加 ER 激动剂、抑制剂(或拮抗剂)已成为鉴定受体功能以及揭示雌激素作用机制(受体)的常用方法。本研究向性别分化前的红耳龟 MPT 胚胎分别注射 3 种 ER 的激动剂, 结果发现 Esr1 激动剂 PPT 处理后的 MPT 性腺逆转为卵巢, 生殖细胞及雌雄特异性基因和蛋白的表达分布均与雌性相似(与施加外源雌激素的影响类似^[14]), 而 Esr2 和 Gper1 激动剂处理后的性腺仍维持原有的分化路径, 最终发育为睾丸, 提示

表 2 雌激素受体激动剂处理 MPT 胚胎后性腺的雌雄数量及性逆转率

Table 2 The number of male and female gonads and the rate of sexual reversal after treatment of MPT embryo with estrogen receptor agonists

Developmental stage	Incubation temperature	Treated groups	Number of embryos	Number of testes	Number of ovaries	Number of ovotestes	Sex (reversal rate)
Stage 21	Male-producing temperature (26 °C)	Control group	32	32	0	0	—
		Esr1 agonist	34	10	15	9	70.59%
		PPT					(15+9)/34
		Esr2 agonist	38	38	0	0	0%
		WAY 200070					(0+0)/38
		Gper1 agonist	32	32	0	0	0%
		G-1				(0+0)/32	
Stage 25	Male-producing temperature (26 °C)	Control group	31	0	31	0	—
		Esr1 agonist	42	42	0	0	—
		PPT	37	11	26	0	70.27%
		Esr2 agonist	36	36	0	0	0%
		WAY 200070					(0+0)/36
		Gper1 agonist	34	34	0	0	0%
		G-1				(0+0)/34	
	Female-producing temperature (32 °C)	Control group	44	0	44	0	—

Male-to-female sex reversal rate=(numbers of ovaries and ovotestes)/numbers of embryos. The “—” in the table indicates the control group, and there is no sexual reversal.

Esr1 在红耳龟早期雌性分化和卵巢形成中具有不可或缺的关键作用。同样地,在另一种 TSD 动物美洲短吻鳄中,PPT 能够诱导产雄温度下的胚胎性腺分化为卵巢,而在同样环境下施加 *Esr2* 激动剂 WAY 200070 后未观察到性别逆转现象^[8]。在同属龟鳖目的 GSD 动物中华鳖中,先前研究也已证明 PPT 与雌激素一样,能够充分启动性腺的雌性分化通路^[22-23],而且抑制 *Esr1* 能够恢复外源雌激素引起的性逆转,明确了雌激素是通过 *Esr1* 诱导卵巢分化^[22]。与上述龟鳖和鳄鱼等爬行动物不同,在哺乳类和鱼类中,ER 似乎仅在生殖中表现出多样的功能。研究发现,无论在雄性还是雌性小鼠中,*Esr1* 都比 *Esr2* 具有更重要的作用——敲除 *esr1* 会导致 XX 和 XY 个体不育,敲除 *esr2* 后的 XX 个体仅表现出较低的生育能力,而 XY 个体仍具有生殖能力^[18-19]。与两种核受体相比,Gper1 似乎并不参与小鼠生殖器官中的雌激素反应^[21],而在鸡中,Gper1 被证实介导调控雌激素诱导的原始生殖细胞增殖过程^[20]。在一些硬骨鱼中,*Esr2* 似乎对生殖功能更为重要——分别单独敲除 *esr1*、*esr2a* 和 *esr2b* 后,雄性和雌性斑马鱼仍具有正常的生殖功能,而对雌鱼 *esr2a* 和 *esr2b* 进行双敲后,卵泡发育受阻,且随后发生了性逆转^[24-25]。此外,*esr2a*^{-/-}型雌性青鳞表现出输卵管不通,导致完全不育^[26]。上述研究提示,在不同进化地位的脊椎动物中,介导雌激素发挥调控作用的雌激素受体的类型及主要功能是不同的,而在不同性别决定模式的爬行动物(如龟鳖类)中,雌激素主要通过 *Esr1* 调控早期卵巢分化可能是保守的。

雌激素的信号传递是一个极为复杂的级联反应,尤其是核受体 *Esr* 介导的基因组效应发挥功能需要较长的时间(膜受体 Gper1 介导的非基因组效应能够快速响应雌激素)^[27]。在红耳龟和中华鳖中,本课题组先前通过 RNA 干扰和过表

达技术分别鉴定了雄性分化关键基因 *dmrt1*^[14,28]、*amh*^[29-30]和 *sox9*^[31]以及雌性分化重要基因 *foxl2*^[32-33]和 *cyp19a1*^[34-35],发现尽管 TSD 和 GSD 最上游的调控者不同(环境温度和性染色体上的性别决定基因),但二者可能拥有类似的下游分子调控通路。本研究发现,激活红耳龟 *Esr1* 后,*dmrt1*、*amh* 和 *sox9* 表达显著下调,而 *foxl2* 和 *cyp19a1* 表达明显上升,与在中华鳖中的发现一致^[22]。这提示雌激素与这些性别决定和分化相关基因有着直接或间接的联系,也就是说,在龟鳖动物中,雌激素结合 *Esr1* 后可能通过作用于 *foxl2* 等下游性别相关基因从而诱导卵巢分化,然而其中具体的分子级联路径还需进一步研究。

在美洲短吻鳄^[8]、太平洋丽龟^[7]、红耳龟^[13,15]等 TSD 动物的温度敏感期(TSP)内,施加雌激素能够单独诱导 MPT 性腺向卵巢发育,表明决定性别的温度效应被外源雌激素阻断,这似乎提示内源雌激素在性别决定中可能也发挥着重要的调控作用。而本课题组前期研究发现,雌激素合成酶芳香化酶(aromatase,催化内源雄激素转化为雌激素的关键酶)在红耳龟性别分化启动后的 FPT 性腺中才被检测到表达信号,其编码基因 *cyp19a1* 的性别差异性表达于第 17 期(性别决定后期)开始出现,在第 19 期 FPT 性腺中的表达量迅速上调^[34]。此外,与 26 °C (产雄温度)相比,在 29.2 °C 孵化温度(雌雄比例约为 1:1)下,更低剂量的外源雌激素就可以诱导产生全雌子代,这表明孵化温度越接近产雌温度(32 °C),诱导双向潜能性腺最终分化为卵巢所需的雌激素剂量可能越低^[36]。结合 *Esr1* 的表达特征[在性别决定后期(17、18 期)的 FPT 性腺中高度表达,且与 MPT 性腺中的表达量存在极显著的差异],提示在红耳龟中,(外源)雌激素似乎仅是干扰而不是简单地推翻温度诱导的性别决定通路,其在性别分化

中的调控作用更为明显。

综上所述,本研究从组织形态学和分子研究水平探讨了3种ER激动剂对红耳龟胚胎性腺分化的影响,发现仅PPT能够诱导形成MPT型卵巢,明确了Esr1在早期雌性分化启动中的充分作用,提示Esr1极可能是介导雌激素调控龟卵巢分化的主要受体。接下来,拟向MPT龟胚先后施加雌激素和Esr1抑制剂(或施加雌激素+敲低*esr1*基因),观察由雌激素诱导的雄转雌性逆转能否被有效地恢复,从而进一步明确Esr1在龟雌激素调控通路中的角色定位。

REFERENCES

- [1] WARNER DA, SHINE R. The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile[J]. *Nature*, 2008, 451(7178): 566-568.
- [2] FERGUSON MW, JOANEN T. Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*[J]. *Nature*, 1982, 296(5860): 850-853.
- [3] BULL JJ, VOGT RC. Temperature-dependent sex determination in turtles[J]. *Science*, 1979, 206(4423): 1186-1188.
- [4] GUIOLI S, ZHAO D, NANDI S, CLINTON M, LOVELL-BADGE R. Oestrogen in the chick embryo can induce chromosomally male ZZ left gonad epithelial cells to form an ovarian cortex that can support oogenesis[J]. *Development*, 2020, 147(4): dev181693.
- [5] ELBRECHT A, SMITH RG. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens[J]. *Science*, 1992, 255(5043): 467-470.
- [6] SMITH CA, KATZ M, SINCLAIR AH. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(2): 560-570.
- [7] MERCHANT-LARIOS H, RUIZ-RAMIREZ S, MORENO-MENDOZA N, MARMOLEJO-VALENCIA A. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1997, 107(3): 373-385.
- [8] KOHNO S, BERNHARD MC, KATSU Y, ZHU J, BRYAN TA, DOHENY BM, IGUCHI T, GUILLETTE LJ. Estrogen receptor 1 (ESR1; ER α), not ESR2 (ER β), modulates estrogen-induced sex reversal in the American alligator, a species with temperature-dependent sex determination[J]. *Endocrinology*, 2015, 156(5): 1887-1899.
- [9] 王莉, 胡涛, 宓猛冬, 杨克周, 钱国英, 葛楚天. 雌激素对中华鳖性腺分化及 *Dmrt1*、*sox9* 基因表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 467-473.
WANG L, HU T, MI MD, YANG KZ, QIAN GY, GE CT. The effects of estrogen on gonadal differentiation and expressions of *Dmrt1* and *sox9* in *Pelodiscus sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 467-473 (in Chinese).
- [10] PIFERRER F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish[J]. *Aquaculture*, 2001, 197(1/2/3/4): 229-281.
- [11] IWAMATSU T, KOBAYASHI H, HAMAGUCHI S, SAGEGAMI R, SHUO T. Estradiol-17 β content in developing eggs and induced sex reversal of the medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A, Comparative Experimental Biology*, 2005, 303(2): 161-167.
- [12] GREENBAUM E. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2002, 80(8): 1350-1370.
- [13] MATSUMOTO Y, CREWS D. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 354(1/2): 103-110.
- [14] GE CT, YE J, ZHANG HY, ZHANG Y, SUN W, SANG YP, CAPEL B, QIAN GY. *Dmrt1* induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination[J]. *Development*, 2017, 144(12): 2222-2233.
- [15] RAMSEY M, CREWS D. Steroid signaling and temperature-dependent sex determination—reviewing the evidence for early action of estrogen during ovarian determination in turtles[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(3): 283-292.
- [16] KLINGE CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors[J]. *Steroids*, 2000, 65(5): 227-251.
- [17] REVANKAR CM, CIMINO DF, SKLAR LA, ARTERBURN JB, PROSSNITZ ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling[J]. *Science*, 2005, 307(5715): 1625-1630.
- [18] LUBAHN DB, MOYER JS, GOLDING TS, COUSE JF, KORACH KS, SMITHIES O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene[J]. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America, 1993, 90(23): 11162-11166.
- [19] COUSE JF, HEWITT SC, KORACH KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 74(5): 287-296.
- [20] GE CT, YU ML, ZHANG CQ. G protein-coupled receptor 30 mediates estrogen-induced proliferation of primordial germ cells via EGFR/Akt/ β -catenin signaling pathway[J]. Endocrinology, 2012, 153(7): 3504-3516.
- [21] OTTO C, FUCHS I, KAUSELMANN G, KERN H, ZEVNIK B, ANDREASEN P, SCHWARZ G, ALTMANN H, KLEWER M, SCHOOR M, VONK R, FRITZEMEIER KH. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice[J]. Biology of Reproduction, 2009, 80(1): 34-41.
- [22] LI P, GUO Y, JIN L, LIANG X, CHEN GA, SUN W, XIAO L, QIAN GY, GE CT. *ESR1* mediates estrogen-induced feminization of genetic male Chinese soft-shelled turtle[J]. Biology of Reproduction, 2022, 107(3): 779-789.
- [23] TOYOTA K, MASUDA S, SUGITA S, MIYAOKU K, YAMAGISHI G, AKASHI H, MIYAGAWA S. Estrogen receptor 1 (*ESR1*) agonist induces ovarian differentiation and aberrant müllerian duct development in the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*[J]. Zoological Studies, 2020, 59: e54.
- [24] TANG HP, CHEN Y, LIU Y, YIN YK, LI GF, GUO Y, LIU XC, LIN HR. New insights into the role of estrogens in male fertility based on findings in aromatase-deficient zebrafish[J]. Endocrinology, 2017, 158(9): 3042-3054.
- [25] LU HJ, CUI Y, JIANG LW, GE W. Functional analysis of nuclear estrogen receptors in zebrafish reproduction by genome editing approach[J]. Endocrinology, 2017, 158(7): 2292-2308.
- [26] KAYO D, ZEMPO B, TOMIHARA S, OKA Y, KANDA S. Gene knockout analysis reveals essentiality of estrogen receptor β 1 (*Esr2a*) for female reproduction in medaka[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 8868.
- [27] VASUDEVAN N, PFAFF DW. Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles[J]. Endocrine Reviews, 2007, 28(1): 1-19.
- [28] 孙伟, 史思瑞, 蔡晗, 宓猛冬, 钱国英, 葛楚天. 中华鳖 *Dmrt1* 基因在雄性性别分化中的功能分析[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(9): 881-889.
- SUN W, SHI SR, CAI H, MI MD, QIAN GY, GE CT. Function analysis of *Dmrt1* in male sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis*[J]. Scientia Sinica (Vita), 2015, 45(9): 881-889 (in Chinese).
- [29] ZHOU YJ, SUN W, CAI H, BAO HS, ZHANG Y, QIAN GY, GE CT. The role of anti-müllerian hormone in testis differentiation reveals the significance of the TGF- β pathway in reptilian sex determination[J]. Genetics, 2019, 213(4): 1317-1327.
- [30] 陈佳文, 孙伟, 金琳, 惠航博, 雷建东, 胡佳暄, 王宗吉, 葛楚天. 红耳龟 *Amh* 基因在温度依赖性性别决定中的功能[J]. 水生生物学报, 2023, 47(11): 1858-1868.
- CHEN JW, SUN W, JIN L, HUI HB, LEI JD, HU JX, WANG ZJ, GE CT. Functional analysis of *Amh* in temperature dependent sex determination in *Trachemys scripta*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(11): 1858-1868 (in Chinese).
- [31] HUI HB, XIAO L, SUN W, ZHOU YJ, ZHANG HY, GE CT. *Sox9* is indispensable for testis differentiation in the red-eared slider turtle, a reptile with temperature-dependent sex determination[J]. Zoological Research, 2021, 42(6): 721-725.
- [32] MA XH, LIU F, CHEN QR, SUN W, SHEN JD, WU KY, ZHENG ZY, HUANG JQ, CHEN JW, QIAN GY, GE CT. *Foxl2* is required for the initiation of the female pathway in a temperature-dependent sex determination system in *Trachemys scripta*[J]. Development, 2022, 149(13): dev200863.
- [33] JIN L, SUN W, BAO HS, LIANG X, LI P, SHI SR, WANG ZJ, QIAN GY, GE CT. The forkhead factor *Foxl2* participates in the ovarian differentiation of Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*[J]. Developmental Biology, 2022, 492: 101-110.
- [34] SHEN JD, SUN W, WU KY, ZHUANG TY, LEI JD, MA QL, XIAO L, GE CT. Loss- and gain-of-function analyses reveal the essential role of *Cyp19a1* in ovarian determination of the red-eared slider turtle[J]. Genetics, 2023, 224(1): iyad041.
- [35] 包海声, 蔡晗, 韩伟, 张海艳, 孙伟, 葛楚天, 钱国英. *Cyp19a1* 基因在中华鳖早期卵巢分化中的功能研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2017, 47(6): 640-649.
- BAO HS, CAI H, HAN W, ZHANG HY, SUN W, GE CT, QIAN GY. Functional characterization of *Cyp19a1* in female sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis*[J]. Scientia Sinica (Vita), 2017, 47(6): 640-649 (in Chinese).
- [36] WIBBELS T, BULL JJ, CREWS D. Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination[J]. Journal of Experimental Zoology, 1991, 260(3): 371-381.

(本文责编 郝丽芳)