

文章编号: 1674-5566(2024)02-0297-11

DOI: 10.12024/jsou.20230304116

雌性三角帆蚌 *Srd5a1* 基因的分子鉴定和功能研究

曹慕莲¹, 霍滢朵¹, 刘宗雨¹, 缪煜琳¹, 金鑫¹, 汪桂玲^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 性类固醇激素与生物生殖、配子排放以及性腺发育密切相关, *Srd5a1* 基因在性类固醇激素合成过程中扮演重要角色。为了探究性类固醇激素合成相关酶基因 *Srd5a1* 对雌性三角帆蚌卵巢发育的影响, 应用 RACE 克隆得到了该基因全长 cDNA 序列, 通过实时荧光定量 (qRT-PCR)、原位杂交技术以及不同浓度 17 β -雌二醇 (E2) 和 17 α -甲基睾酮 (MT) 激素处理来探究基因的表达特性。结果显示, *Srd5a1* cDNA 全长 2 224 bp, 包括 446 bp 5'-UTR、953 bp 3'-UTR 和 825 bp ORF, 编码 274 个氨基酸。*Srd5a1* 基因在性腺中的表达呈二态性, 在卵巢中表达量更高; 且在卵巢排放期的表达量最高, 极显著高于其他各时期。原位杂交结果显示, *Srd5a1* 基因在卵巢卵母细胞、卵泡以及精巢精母细胞中有表达。不同浓度 E2 和 MT 处理 24 d 后, *Srd5a1* 基因的表达发生了变化。综上, *Srd5a1* 基因可能在雌性三角帆蚌卵巢卵母细胞发育成熟和配子排放中发挥一定作用, 对探索三角帆蚌性腺生长发育具有重要意义, 同时为实现三角帆蚌单性化养殖提供理论参考价值。

关键词: 三角帆蚌; *Srd5a1* 基因; 卵巢发育; 17 β -雌二醇; 17 α -甲基睾酮

中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是我国最特殊的淡水育珠蚌之一, 雄性三角帆蚌所产珍珠经济效益更高^[1-2]。目前, 三角帆蚌中并未发现异型性染色体, 其性腺发育机制尚不清楚, 需深入研究其性腺发育关键因子以精准地开展三角帆蚌的性别调控。

类固醇 5 α 还原酶家族有 3 个成员: SRD5A1、SRD5A2 和 SRD5A3, 分别由 *Srd5a1*、*Srd5a2* 和 *Srd5a3* 基因编码^[3]。90 年代初, *Srd5a1* 基因首次被 ANDERSSON^[4] 克隆。该基因在不同物种之间表达模式不同, 发挥不同的生物学功能。*Srd5a1* 基因在成年老鼠卵巢、肝、脑和皮肤中有高表达^[5]; 在香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 性腺中有特异表达^[6]; 黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*) 中 *Srd5a1* 基因的表达与性腺早期发育呈正显著相关, 可能在其性腺早期发育过程中发挥关键作用^[7]。SRD5A1 是一种位于细胞内质网膜上的微

粒体蛋白, 属于 NADPH 依赖性氧化还原酶, NADPH 辅因子结合位点在类固醇 5 α 还原酶家族中高度保守, 以保证催化 3-oxo- Δ^4 还原反应的进行^[8]。SRD5A1 能将孕激素和雄激素分别催化为活性更强的孕烷和 5 α -二氢睾酮 (5 α -dihydrotestosterone, DHT), 参与性别分化和性类固醇激素代谢过程^[9]。DHT 除了能够诱导鱼类雄激素反应外, 还能诱导雌激素反应, 如促进硬骨鱼类卵巢产生 17 β -雌二醇^[10]。RILEY 等^[11] 在体外将雌性罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 肝细胞暴露于 100 μ mol/L DHT 后, 发现能诱导雌激素反应蛋白卵黄蛋白原 (Vtg) 的释放。有报道称, 无脊椎动物和脊椎动物中的 SRD5As 是功能同源物^[12], 但 *Srd5a1* 基因在无脊椎动物中的功能研究还不清楚。

目前, 有研究者已在头足纲、双壳纲和腹足纲等软体动物中发现了性类固醇激素物质的存在。此外, 有些性类固醇激素能够参与贝类生殖

收稿日期: 2023-03-10 修回日期: 2023-05-21

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”项目 (2022YFD2400700); 国家自然科学基金 (31772835); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目 (CAR-49)

作者简介: 曹慕莲 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为三角帆蚌性别决定与分化。E-mail: 1793823911@qq.com

通信作者: 汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

调控和性腺发育过程^[13]。与脊椎动物相比,关于性类固醇激素在贝类中的合成机制及其功能研究还不系统。为了更好地了解 *Srd5a1* 基因在三角帆蚌性类固醇激素合成机制中的作用及其在雌性三角帆蚌性腺发育中的功能,本研究克隆了三角帆蚌 *Srd5a1* 基因,检测其在性腺中的表达位置,并通过 17 β -雌二醇 (E2) 和 17 α -甲基睾酮 (MT) 体外激素处理研究 *Srd5a1* 基因表达模式,为三角帆蚌性腺生长发育及其生殖内分泌机理提供参考,同时为实现三角帆蚌单性化养殖提供理论参考价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用三角帆蚌由浙江省金华市武义养殖基地提供,实验室暂养 2~5 d,水温为 (26 \pm 2) °C。用微型注射器抽取 12~36 月龄三角帆蚌的部分性腺组织液于载玻片上,镜检辨别雌雄。分别选取 12~36 月龄健康的三角帆蚌雌雄各 3 只,4~8 月龄幼蚌雌雄各 6 只,对其进行性腺组织取样;分别采集生长健康的 24 月龄雌雄三角帆蚌的 7 个组织:闭壳肌、斧足、外套膜、鳃、肝脏、性腺和肾脏;根据形态学观察^[14],将 36 月龄雌性三角帆蚌性腺样本分为增殖、生长、成熟、排放和休止 5 个时期。液氮速冻,然后放置在 -80 °C 下保存备用。

1.2 石蜡切片制备和染色

取体积相同 (5 mm \times 5 mm \times 5 mm) 的新鲜雌雄性腺组织于 4% 多聚甲醛中固定 2 h,实验样品设

3 个平行,后转入 70% 乙醇中 4 °C 保存备用。梯度脱水,包埋浸蜡,制作厚度为 6~8 μ m 的石蜡切片。37 °C 烘箱烘干 12 h, -20 °C 保存备用。根据 H.E 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 说明书进行染色,树胶封片。Leica DM 2500 显微镜 (Leica, 德国) 拍照。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

冷冻的性腺组织 RNA 按照 Trizol 方法提取,分别使用 NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, 美国) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量与完整性。cDNA 体外反转录根据试剂盒 (RR047A-1, TaKaRa) 进行。最终将其稀释 5 倍,于 -20 °C 保存备用。

1.4 *Srd5a1* 基因全长克隆和生物信息学分析

用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计 (表 1)。通过 5'/3' SMARTerTM RACE cDNA 试剂盒进行序列扩增,纯化的 PCR 产物经过连接转化和蓝白斑筛选后,由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行菌液测序。

1.5 荧光定量 PCR 分析

在 *Srd5a1* 基因的 ORF 区设计引物,以 *EFl- α* 作为内参基因,引物序列见表 1。qRT-PCR 反应体系 (20 μ L): 2 \times TB Green Premix Ex Taq 10 μ L, RNase-free water 6.8 μ L, 正向和反向引物各 0.8 μ L, cDNA 1.6 μ L。实验样品设 3 个平行,每个样品重复 3 次。CFX96 仪 (Bio-Rad) 检测基因相对表达量。反应程序为: 95 °C 3 min, 95 °C 5 s, 57 °C 30 s, 40 个循环。使用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法计算 *Srd5a1* 基因的相对表达量。

表 1 引物名称和序列
Tab. 1 Primer names and sequences

引物名称 Primer name	序列 5'-3' Sequence (5'-3')	目的 Application
<i>Srd5a1</i> -F1	TACATCCAGGGTGGCTTCCT	序列验证
<i>Srd5a1</i> -R1	AACCATCAGCTCTACCGCAG	
<i>Srd5a1</i> -F2	ATGTCGTGCCGAGTTCTAATG	
<i>Srd5a1</i> -R2	CGGATGTCTCCCTGTTTTT	
<i>Srd5a1</i> -3'	ATGTGTTGGGGAGTTGAGACT	3'克隆
<i>qSrd5a1</i> -F	ACAGGGGAGACATCCGTGTA	荧光定量
<i>qSrd5a1</i> -R	TGGACTGACCATGTGGCTACT	
EFl- α F	GGAACCTCCCAGGCAGACTGTGC	
EFl- α R	TCAAAACGGGGCCGACAGAAT	
I- <i>Srd5a1</i> -F	ACAGGGGAGACATCCGTGTA	原位杂交
I- <i>Srd5a1</i> -R	TAATACGACTCACTATAGGG TGGACTGACCATGTGGCTACT	

1.6 原位杂交实验

引物通过 Primer 5.0 设计, T7 启动子序列 (TAATACGACTCACTATAGGG) 加在荧光定量下游引物 5' 端 (表 1)。用 T7 High Efficiency Transcription 试剂盒 (北京全式金生物技术股份有限公司) 体外转录纯化的 PCR 产物, 标记探针通过 DIG RNA Labeling Mix (Roche, 德国) 获得后储存于 -80°C 。原位杂交按照 Enhanced Sensitive ISH Detection kit II, AP 试剂盒 (Booster, USA) 进行。Leica DM 2500 显微镜 (Leica, 德国) 观察杂交信号并进行拍照。

1.7 不同浓度 17β -雌二醇和 17α -甲基睾酮浸泡实验

实验采用乙醇溶解激素后直接浸泡的方法进行, 激素为 17β -雌二醇 (17β -Estradiol, E2) 和 17α -甲基睾酮 (17α -Methyltestosterone, MT), 得到的浓度 40 ng/L 和 200 ng/L 参考 PUINEAN^[15]。选取壳长为 8~11 cm 的 12 月龄健康雌性三角帆蚌, 随机分为 5 组: 空白对照组 (0 ng/L)、 17β -雌二醇低浓度实验组 (40 ng/L) 和高浓度实验组 (200 ng/L)、 17α -甲基睾酮低浓度实验组 (40 ng/L) 和高浓度实验组 (200 ng/L), 每组 30 只, 浸浴 1、3、6、12、18 和 24 d。每天定时换水换液, 确保水体中激素浓度直至相应取样时间点, 并投喂新鲜的小球藻保证营养。在每个时间点, 从每组中随机选择 5 只进行性腺组织取样, 液氮速冻后存于 -80°C 备用。

2 结果

2.1 三角帆蚌 *Srd5a1* 基因的序列分析

三角帆蚌 *Srd5a1* 基因 cDNA 全长为 2 224 bp (登录号: OP750480), 包括 446 bp 5'-UTR、953 bp 3'-UTR 和 825 bp ORF, 共编码氨基酸 274 个 (图 1)。将三角帆蚌 *Srd5a1* 基因氨基酸序列在 NCBI 中进行比对。结果显示, 三角帆蚌 *Srd5a1* 基因与鳞角腹足蜗 (*Gigantopelta aegis*) 的同源性为 53.3%; 与红鲍 (*Haliotis rufescens*) 和澳洲鲍鱼 (*Haliotis rubra*) 的同源性分别为 52.67% 和 52.63% (图 2)。

2.2 *Srd5a1* 基因在 24 月龄雌雄三角帆蚌各组织中的表达分析

组织定量结果表明, *Srd5a1* 基因在 7 个组织中均有表达。其中, *Srd5a1* 基因在性腺中存在差异性表达, 卵巢中的表达量极显著高于精巢 ($P <$

0.01); 在鳃和斧足组织中表达较高, 在外套膜中表达最低 (图 3)。

2.3 *Srd5a1* 基因在幼蚌和成年蚌性腺组织中的表达分析

与 12 月龄性腺组织表达相比, *Srd5a1* 在性腺早期发育阶段 (4~8 月龄) 的整体表达水平较低, 呈现先下降后上升再下降的波动性变化, 其在 5 月龄和 8 月龄的表达量相对较低, 与其他各月龄存在显著差异 (图 4)。在 12~36 月龄性腺组织中, *Srd5a1* mRNA 表达呈现二态性, 在 12 和 24 月龄卵巢中的表达极显著高于精巢 ($P < 0.01$), 在 36 月龄精巢中表达量最高 (图 5)。

2.4 *Srd5a1* 基因在雌性三角帆蚌卵巢不同发育时期中的表达分析

Srd5a1 基因在卵巢整个发育过程中均有表达, 其表达量呈现先上升后下降的趋势。随着卵母细胞体积增大, 数目增多, *Srd5a1* 基因的表达显著上调, 并在配子排放时达到峰值, 配子排放后滤泡开始萎缩, *Srd5a1* 基因的表达迅速下降至最低值 (图 6)。

2.5 *Srd5a1* 基因在性腺中的定位结果

Srd5a1 mRNA 在卵巢卵母细胞细胞质以及卵泡上有强烈的阳性信号, 且随着卵母细胞卵黄的积累, 其阳性信号更为强烈; 在精巢精母细胞中检测到其微弱的阳性信号 (图版)。

2.6 不同浓度 17β -雌二醇和 17α -甲基睾酮浸泡雌性三角帆蚌 *Srd5a1* 基因的表达分析

用不同浓度的激素处理 24 d, 结果显示: 在低浓度 40 ng/L E2 处理条件下, 第 1 天, *Srd5a1* 基因表达迅速上升, 在处理 6 d 后其表达量出现极显著下降, 第 12 天时, 回升至正常水平; 第 18 天时, 出现显著性下降; 第 24 天时, 又回升至正常水平, *Srd5a1* 基因的表达变化规律以 6 d 为 1 个周期。在高浓度 200 ng/L E2 处理条件下, 第 1~3 天, *Srd5a1* 基因表达显著性下降, 第 6~18 天, 其表达量开始回升, 显著高于空白对照组; 第 24 天时, *Srd5a1* 基因的表达回落至较低水平 (图 7)。

在低浓度 40 ng/L MT 处理条件下, *Srd5a1* 基因的表达只在第 1 天有显著性升高, 其他各时间点处, 该基因表达量没有显著变化。高浓度 200 ng/L MT 处理 24 d, *Srd5a1* 基因的整体表达水平出现显著性下降 (图 8)。

ttggacatttatgttgggtgcgtttcactctgaccattggtacccatttttatttggacagttaagttgggttgtttcacctaaccatt
 aatgtccaaatatcaaaaatgggggtggcaagaatcagaggaaactctgactatataacccaaccaccaccaccttttttgggtgtgcgt
 aaacctaaccacgcgtacacaatcaaatagagttcaatagcagttatactcagggaaggaactatcccttgttgaagaagaaaagta
 ggtcctctgagatttggcatgtcgtgcccagttcctaagtatcgtgtagaaagtaaatatgggttctggaagttgacctccctttcctaa
 cgagctgaattcaaggaacatttgttgggtgactgtgtaataactaatagtggtgttttgggtgatggtacaccagcagatattcact**ATCG**
 M
 AGAAATATAAGATTTTATTTTCTACTTGAACAATTTTCTTCAAGCGTAATCAACGTCAGTTACGACCTGAATGAATTCCTAGCGTAG
 E K Y K I L F S T W N N F S S S V I N V S Y D L N E F L A L
 TCTACTTATTGATGGGTCTCTCAGCCCTCGTCCCCTAGCTTCGGGATTAAGGGCCCCTTATGGGCGCTATATCCGGCAAGGTTGGGGTC
 V Y L L M G L S A L V P L A S G L R A P Y G R Y I R Q G W G
 CTTTCCTCGACTCGGAACAGCATGGTTCATTCAAGAATTGCCGGCCTTAGCTATACCTGTGATACTGTTGATATTCACGGATTGTTCCA
 P F L D S R T A W F I Q E L P A L A I P V I L L I F T D C S
 AGCTTAAGTACTTACCAACAAGATAGTACTGGGAATTTATCTAGTACATTATGTACACAGAGTTTTCATTTATCCAGCACTGATGAAAT
 K L K Y L P N K I V L G I Y L V H Y V H R V F I Y P A L M K
 CTGGGCAAGTTTCTGCTTTGATGGTGTTCCTGTGTGCCATTTTCTTCTGCATCTTGTGGCTACATCCAGGGTGGCTTCTGCTTTGGC
 S G Q V S A L M V F L C A I F F C I L V G Y I Q G G F L L C
 ACGCAAATTTGCTCCTGACTGGTACCAGACTCCAACATTTTATGTAGGTATCATGCTTCAGCTGACAGGAATGGAATCAACATTTATT
 H A N F A P D W Y Q T P T F Y V G I M L Q L T G M A I N I Y
 CAGATCACATACTCAGGTCCTAAGAAAAACAGGGGAGACATCCGTGTACAAAAATCCTAGAGGTGGACTTTTTGAGTACGTGTGAGGGG
 S D H I L R S L R K T **G E T S V Y K I P R G G** L F E Y V S G
 CAAACTTTTTGGAGAGATATTGGAATGGTTGGCTATGCAGTAGCCACATGGTCATTCCAAGGGGTGCCATGTTTGTTCACAGCCT
 A N F F G E I L E W F G Y A V A T W S F Q G V A M F V S T A
 GTAATATTGGACCAAGGCCTTCCAGCATCACAGGTACTACAAGGAGAAATTTGAAGATTATCCAGCGAAGAGGAAAGCTCAGACCGT
 C N I G P R A F Q H H R Y Y K E K F E D Y P A K R K A L R P
 TAATCAT**TAG**attttagagtgcatttttgcatcaagcttggaaatgatctgttgcacccagcttatggtttctgcttctctgatt
 l i i *
 gttttgttagtagacatgccaagacaatagcaacaaaattagata**agtaaa**tgacacatgtttgaagt**aattaa**tgaataaagtatt
 atatatgttaagatgttctctaaaatggtagctactcataagtgatgtctatacaagtttgaagaacacaaggtgatctaacaatccacaa
 gctttatcatgtgttggcgagttgagacttgaactcatgccccagttatcttttcagacaaaagagatatttcagatattgctcct
 ttttccttcatctatatgaaatttttattactgcggtagagctgatggttctttggaatgtgtgaaattgtttgaaatattcagattaac
 cagtaaagtatcttttataatttggtagcagtttattttcagatttggcaacatttgaataattttagtgtagttgatatactggttc
 tgaggtaaaacttaactgtgctagaactctggtggttttgcactactgtagtttataaaaaataaaattcatttcatttttcacaattt
 gtactccagttttcttagataatgtatattgcttatatatgtattgtaataaaattatttgcgtgtttttaaacttttgcacctgtt
 aaatttgtttcactacctttttataaatttatttattcttgaataatgtttgcattctgtacattgagaattactgttttccaagtggt
 gtacatttgettatttccggaattgtatecgtgttttggccactgacaaaatgtcaggtggcatgagactgattgtgccagctagttcc
 aaggatatacagaataatagttttgaaataaaattacaaaattttaatcatgaaaaaaaaaaaa

起始密码子和终止密码子用黑色方框框出;绿色方框内为NADPH 绑定域;红色方框内为非规范聚腺苷酸化信号。

The black box showed the start and stop codons; The green box showed the NADPH binding domain; The red box showed the non-canonical polyadenylation signal.

图1 *Srd5a1* cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 *Srd5a1* cDNA sequence and encoded amino acid sequence

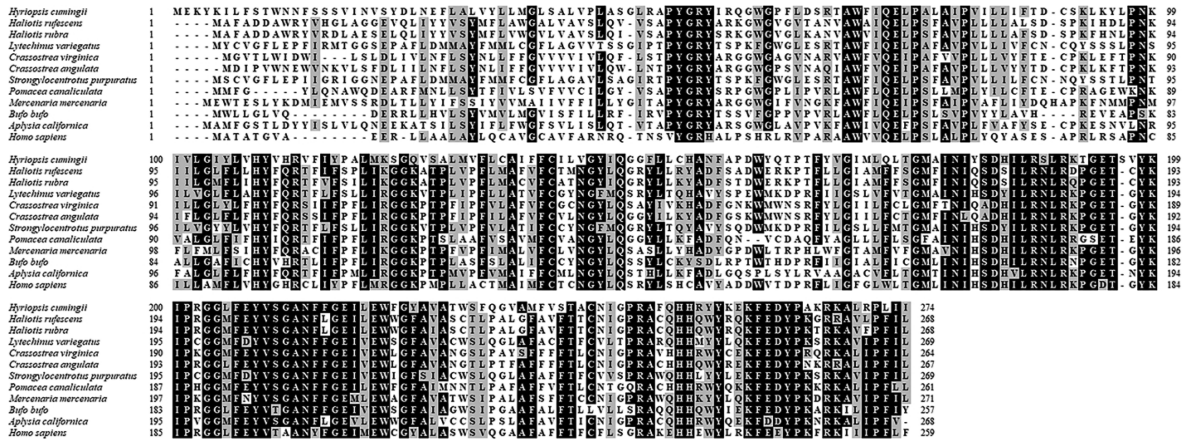


图2 *Srd5a1* 氨基酸的多序列比对
Fig. 2 Multiple comparisons of *Srd5a1* amino acid

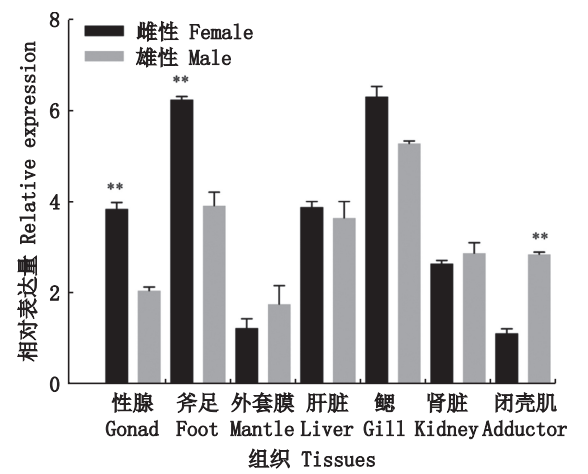


图3 *Srd5a1* 基因在 24 月龄雌雄三角帆蚌各组织中的表达
Fig. 3 Expression of *Srd5a1* in different tissues of 24-month-old male and female *H. cumingii*

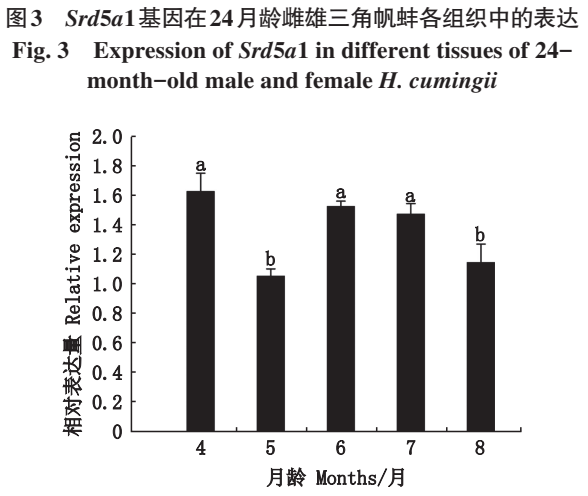


图4 *Srd5a1* mRNA 在 4-8 月龄性腺组织中的表达
Fig. 4 Expression of *Srd5a1* mRNA in the gonads of 4-8 months old

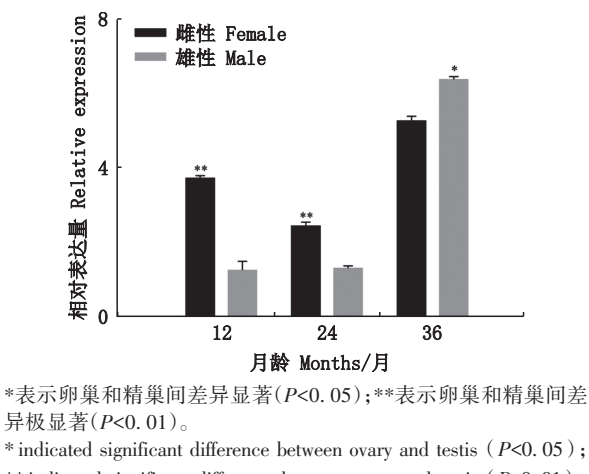


图5 *Srd5a1* mRNA 在 12-36 月龄性腺组织中的表达
Fig. 5 Expression of *Srd5a1* mRNA in the gonads of 12-36 months old

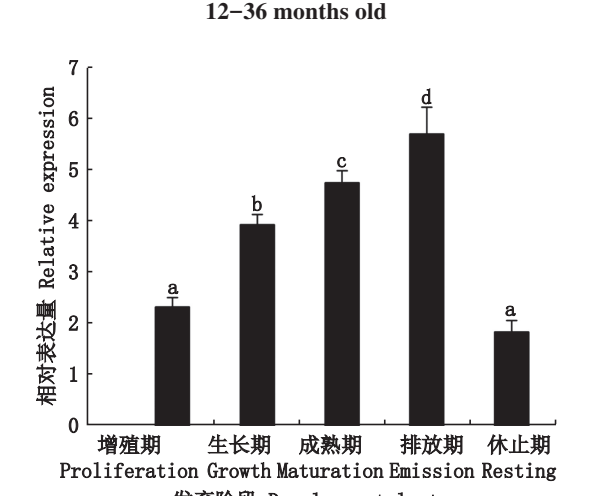
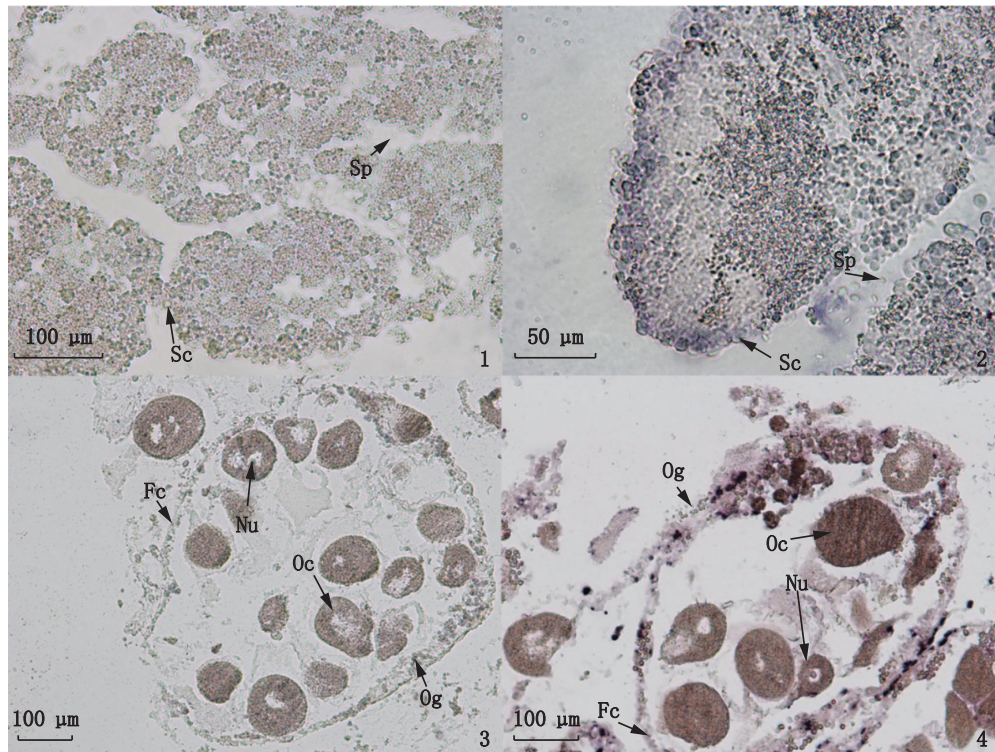


图6 *Srd5a1* mRNA 在卵巢不同发育时期中的表达
Fig. 6 Expression of *Srd5a1* mRNA in different developmental periods of the ovary

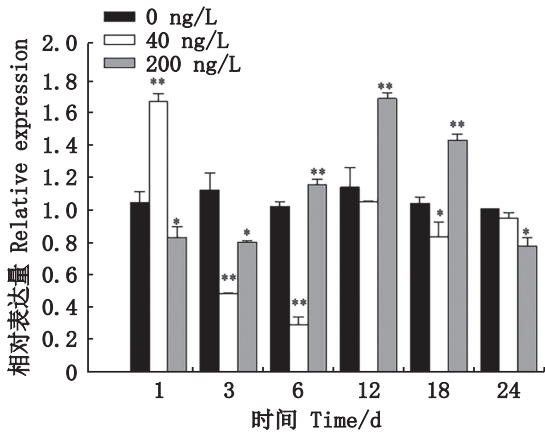


1. 精巢空白组; 2. 精巢实验组; 3. 卵巢空白对照组; 4. 卵巢实验组; 紫色为阳性信号。Sp. 精子; Sc. 精母细胞; Fc. 卵泡; Oc. 卵母细胞; Og. 卵原细胞; Nu. 细胞核。

1. Testis blank control group; 2. Testis experimental group; 3. Ovarian blank control group; 4. Ovarian experimental group; Purple color is the positive signal. Sp. Sperm; Sc. Spermatocyte; Fc. Follicles; Oc. Oocyte; Og. Oogonium; Nu. Nucleus.

图版 *Srd5a1* mRNA 在雌雄性腺中的表达定位

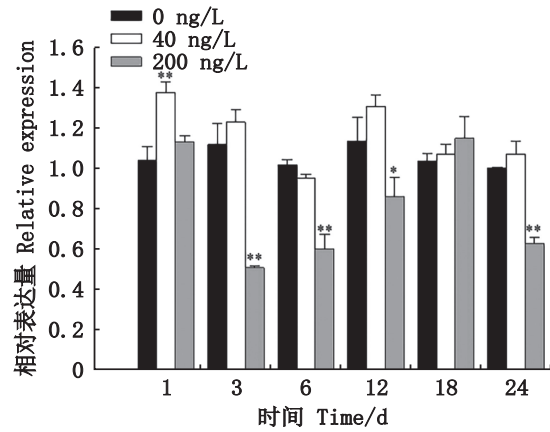
Plate Localization of *Srd5a1* mRNA expression in male and female gonads



*表示显著差异($P < 0.05$); **表示极显著差异($P < 0.01$)。
* indicates significant differences ($P < 0.05$); ** indicates highly significant differences ($P < 0.01$).

图7 不同浓度17β-雌二醇处理下*Srd5a1*基因在卵巢中的表达

Fig. 7 Expression of *Srd5a1* gene in ovary treated with E2 at different concentrations



*表示显著差异($P < 0.05$); **表示极显著差异($P < 0.01$)。
* indicates significant differences ($P < 0.05$); ** indicates highly significant differences ($P < 0.01$).

图8 不同浓度17α-甲基睾酮处理下*Srd5a1*基因在卵巢中的表达

Fig. 8 Expression of *Srd5a1* gene in ovary treated with MT at different concentrations

3 讨论

SRD5A 有 3 种分别由 *Srd5a1* 基因、*Srd5a2* 基因和 *Srd5a3* 基因所编码的同工酶^[3], 作为性类固醇激素合成过程中的重要催化酶, 在性腺发育、性别分化及激素生理中发挥重要作用。SRD5A 的同系物已在人类^[16]、大鼠^[5]、鸟类^[17]、青蛙^[18]和鱼类^[19]等脊椎动物中被报道, 在香港牡蛎 (*Magallana hongkongensis*)^[6] 和光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*)^[20]等软体动物中也被鉴定出来。RAMOS 等^[21]克隆的仓鼠 *Srd5a1* 基因的 3' 非翻译区包括两个非规范聚腺苷酸化信号, 本研究通过首次克隆三角帆蚌 *Srd5a1* cDNA 序列全长以及生物信息学分析揭示其 3' 非翻译区也包括两个非规范聚腺苷酸化信号, 分别为 AATTAA 和 AGTAAA; 近端 5' 侧翼序列处有真核生物转录所需的 TATA 和 CCAT box^[3]。仓鼠中 *Srd5a1* 基因编码的氨基酸包括 NADPH 结合域: GETGYKIPRGG^[21]; 鳗鱼 (*Anguillidae*) 中 *Srd5a1* 基因编码的氨基酸含有 NADPH 结合域: GETGYKIPVGG^[3]; 三角帆蚌中 *Srd5a1* 编码的氨基酸也含有 NADPH 结合域: GETSVYKIPRGG (GXXXXXXXXXGG), 不同物种中该区域比较保守, 为 *Srd5a1* 基因能够参与性类固醇激素合成的还原反应提供保证。多重序列比对结果显示, 三角帆蚌 *Srd5a1* 基因的氨基酸序列与无脊椎动物相似度较高, 证明 *Srd5a1* 基因在进化过程中相对保守。

芮彩霞^[22]发现 *Srd5a1* 基因在生物机体各个组织中广泛分布, 如肾上腺、肝脏、肾脏、皮肤以及神经和免疫等非性类固醇激素依赖组织。*Srd5a1* 基因在 24 月龄雌雄三角帆蚌 7 个组织中均有表达, 表明三角帆蚌 7 个组织均可合成 SRD5A1 并发挥其生物学功能。其中, *Srd5a1* 基因在三角帆蚌性腺中的表达呈二态性, 在卵巢中的表达量更高。据报道, *Srd5a1* 基因在成年日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)^[3]、大鼠^[5]、香港牡蛎^[6] 卵巢中的表达水平较高; 此外, 洪磊^[23]通过干扰黔北麻羊 *Srd5a2*, 发现黔北麻羊的卵巢颗粒细胞的增殖受到抑制。由此推测, *Srd5a1* 基因可能在雌性三角帆蚌性腺发育过程中发挥一定作用。在性腺发育早期 5—7 月龄, 三角帆蚌原始生殖细胞数量逐渐增多, 形态逐渐规则^[24], *Srd5a1* 基因的表达出现显著性上升; 当 7—8 月龄, 性腺开始分

化后, 其表达出现显著下降, 推测 *Srd5a1* 基因可能在三角帆蚌早期性腺发育中发挥关键作用。*Srd5a1* 基因在三角帆蚌卵巢不同发育阶段表达变化显著, 随着卵母细胞数量逐渐增多, 体积逐渐增大, *Srd5a1* 基因的表达量逐渐升高; 在配子排放之际, 其表达量达到峰值; 排放期过后卵泡逐渐萎缩, *Srd5a1* 基因的表达量出现显著性下降, 由此说明, *Srd5a1* 基因可能与卵母细胞的发育和配子排放密切相关。*Srd5a1* 基因在 12、24、36 月龄性腺中的表达呈二态性, 在 24 月龄中卵巢的表达量低于 12 月龄和 36 月龄卵巢, 可能由于 24 月龄正处于性成熟阶段^[25], 卵巢可能处于增殖期的原因; *Srd5a1* 基因在 36 月龄的表达水平最高, 可能由于 36 月龄性腺已完全成熟, 卵巢处于排放期的原因。原位杂交结果显示, *Srd5a1* 基因主要在卵巢卵母细胞的细胞质和卵泡中出现阳性信号, 且阳性信号随着卵母细胞卵黄颗粒的积累越强烈, 在精巢精母细胞检测到越微弱的阳性信号, 推测 *Srd5a1* 基因可能在三角帆蚌卵母细胞的成熟、卵泡结构和精巢精母细胞发育中发挥作用。

近年来, 外源性类固醇激素能够影响水生生物性腺发育的相关报道越来越多。有研究^[26]表明, 外源性类固醇激素可诱导人工养殖鱼类性腺发育成熟和排卵。另有研究发现外源性类固醇激素刺激贝类后可发生性逆转现象。E2 作为活性最强的雌激素, 参与鱼类、两栖类和爬行类等低等脊椎动物性别决定与分化、性腺发育过程, 与人和小鼠等哺乳动物卵泡发育也有密切联系^[27]。MORI 等^[28]最早提出 E2 可影响双壳类的性别分化, 在季节性性成熟早期阶段, 将 E2 注射到太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 体内, 发现雄性逆转为雌性。用 E2 处理北极贝 (*Spisula sachalinensis*)^[29]、福建牡蛎 (*Crassostrea angulata*)^[30]、虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)^[31]、太平洋牡蛎^[28]、黑唇珍珠牡蛎 (*Pinctada margaritifera*)^[32]等贝类后, 可以促进其卵巢发育和配子发生过程。本研究利用不同浓度 E2 处理雌性三角帆蚌 24 d 发现, 40 ng/L E2 处理 6 d 后, 其卵巢中 *Srd5a1* 基因的表达受到极显著抑制。这与雌二醇处理非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 6 d 后, 其精巢中 *Srd5a1* 基因的表达受到显著抑制结果类似^[33]。由此说明, 在短期处理下,

Srd5a1 基因对 E2 的作用十分敏感。200 ng/L E2 处理下, *Srd5a1* 基因前期表达受到抑制, 后期表达上调, 可能随着时间推移, 高浓度的 E2 不断涌入雌性三角帆蚌体内, 内源性类固醇激素平衡状态被打破, 需要 *Srd5a1* 基因高度表达进行补偿。由此推测 E2 可能通过影响 *Srd5a1* 基因的表达水平来调节三角帆蚌内源性类固醇激素的合成, 从而参与卵巢发育和配子发生过程。除了雌激素能影响卵巢分化, 调控卵母细胞发育成熟外, 雄激素也参与雌性生物的生殖功能。11-酮基睾酮(11-ketotestosterone, 11-KT), 鱼类特异性雄激素, 可调控澳洲鳎(*Anguilla australis*) 卵黄卵母细胞发育^[34]; 雌性斑马鱼的雄性受体被敲除后, 雄激素不能与相应受体结合发挥生物学功能, 使得卵巢的大小和质量都有所下降^[35]。此外, MT 已在斑马鱼(*Danio rerio*) 中被证实有雌激素和雄激素效应^[36], MT 能够抑制雌性麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*) 卵巢的发育并使之退化^[37]。本研究通过不同浓度 MT 处理雌性三角帆蚌 24 d 后发现, *Srd5a1* mRNA 的表达在 40 ng/L MT 处理下没有明显效果, 仅在第 1 天有显著性上调, 可能是应激反应导致; 200 ng/L MT 处理下, *Srd5a1* 基因的整体表达水平受到抑制, 可能由于外源雄激素不断涌入, 三角帆蚌卵巢内源雄激素需求降低, *Srd5a1* mRNA 表达被抑制。由此说明, *Srd5a1* 基因在雌性三角帆蚌性类固醇激素合成过程中发挥重要作用, MT 可能通过负调控 *Srd5a1* 基因的表达对卵巢卵母细胞生长成熟以及卵巢发育产生影响。

综上所述, 本研究首次从三角帆蚌中克隆了性类固醇激素合成相关酶基因 *Srd5a1*。通过研究其表达特性, 发现 *Srd5a1* 基因可能与雌性三角帆蚌卵巢发育、成熟以及配子排放密切相关; 利用不同浓度外源雌雄激素处理雌性三角帆蚌后, 发现 *Srd5a1* 基因参与三角帆蚌内源性类固醇激素的合成过程, 外源激素可能通过正负调控 *Srd5a1* 基因的表达影响雌性三角帆蚌的性腺发育过程。研究结果为三角帆蚌性腺生长发育及其生殖内分泌机理提供参考, 同时为实现三角帆蚌单性化养殖提供理论参考价值。

参考文献:

[1] 李家乐, 王德芬, 白志毅, 等. 中国淡水珍珠养殖产业

发展报告[J]. 中国水产, 2019(3): 23-29.

LI J L, WANG D F, BAI Z Y, et al. China freshwater pearl culture industry development report [J]. China Fisheries, 2019(3): 23-29.

[2] 汪桂玲, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1618-1627.

WANG G L, BAI Z Y, LIU X J, et al. Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1618-1627.

[3] YAZAWA T, INABA H, IMAMICHI Y, et al. Profiles of 5 α -reduced androgens in humans and eels; 5 α -dihydrotestosterone and 11-ketodihydrotestosterone are active androgens produced in eel gonads [J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 657360.

[4] ANDERSSON S, RUSSELL D W. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 alpha-reductases [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(10): 3640-3644.

[5] NORMINGTON K, RUSSELL D W. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. Evidence for distinct physiological functions [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(27): 19548-19554.

[6] TONG T, ZHANG Y, HUANG J M, et al. Transcriptomics analysis of *Crassostrea hongkongensis* for the discovery of reproduction-related genes [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134280.

[7] MARTYNIUK C J, BISSEGER S, LANGLOIS V S. Current perspectives on the androgen 5 alpha-dihydrotestosterone (DHT) and 5 alpha-reductases in teleost fishes and amphibians [J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 194: 264-274.

[8] HAN Y F, ZHUANG Q, SUN B, et al. Crystal structure of steroid reductase SRD5A reveals conserved steroid reduction mechanism [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 449.

[9] ROBITAILLE J, LANGLOIS V S. Consequences of steroid-5 α -reductase deficiency and inhibition in vertebrates [J]. General and Comparative Endocrinology, 2020, 290: 113400.

[10] OLIVEIRA A G, COELHO P H, GUEDES F D, et al. 5 α -Androstane-3 β , 17 β -diol (3 β -diol), an estrogenic metabolite of 5 α -dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ER β expression in the ventral prostate of adult rats [J]. Steroids, 2007, 72(14): 914-922.

[11] RILEY L G, HIRANO T, GRAU E G. Estradiol-17 β and dihydrotestosterone differentially regulate vitellogenin and insulin-like growth factor-I production in primary hepatocytes of the tilapia *Oreochromis mossambicus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C:

- Toxicology & Pharmacology, 2004, 138(2): 177-186.
- [12] BAYNES A, MONTAGUT PINO G, DUONG G H, et al. Early embryonic exposure of freshwater gastropods to pharmaceutical 5-alpha-reductase inhibitors results in a surprising open-coiled "banana-shaped" shell [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 16439.
- [13] 曾臻,倪健斌,史博,等. 3β -HSD 基因在福建牡蛎性类固醇激素合成机制中的表达研究[J]. 渔业研究, 2019, 41(2): 87-95.
- ZENG Z, NI J B, SHI B, et al. Expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene (3β -HSD) in steroid genesis mechanism in the Fujian oyster, *Crassostrea angulata* [J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(2): 87-95.
- [14] 潘彬斌,李家乐,王志毅. 池养三角帆蚌卵巢发育与卵子发生的组织学研究[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(4): 452-456.
- PAN B B, LI J L, BAI Z Y. Histological study on ovarian development and oogenesis of *Hyriopsis cumingii* cultured in the pond [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(4): 452-456.
- [15] PUINEAN A M, LABADIE P, HILL E M, et al. Laboratory exposure to 17β -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*[J]. Aquatic Toxicology, 2006, 79(4): 376-383.
- [16] THIELE S, HOPPE U, HOLTERHUS P M, et al. Isoenzyme type 1 of 5alpha-reductase is abundantly transcribed in normal human genital skin fibroblasts and may play an important role in masculinization of 5alpha-reductase type 2 deficient males [J]. European Journal of Endocrinology, 2005, 152(6): 875-880.
- [17] SOMA K K, BINDRA R K, GEE J, et al. Androgen-metabolizing enzymes show region-specific changes across the breeding season in the brain of a wild songbird [J]. Journal of Neurobiology, 1999, 41(2): 176-188.
- [18] ANDERSSON S, BISHOP R W, RUSSELL D W. Expression cloning and regulation of steroid 5α -reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation [J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(27): 16249-16255.
- [19] PASMANIK M, CALLARD G V. Changes in brain aromatase and 5α -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*)[J]. Endocrinology, 1988, 122(4): 1349-1356.
- [20] ADEMA C M, HILLIER L W, JONES C S, et al. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail [J]. Nature Communications, 2017, 8: 15451.
- [21] RAMOS L, CHÁVEZ B, VILCHIS F. Cloning and differential expression of steroid 5α -reductase type 1 (*Srd5a1*) and type 2 (*Srd5a2*) from the Harderian glands of hamsters [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 166(2): 388-395.
- [22] 芮彩霞. 肝细胞因子诱导SRD5A1基因的表达调控机制[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2006.
- RUI C X. HGF regulates expression of SRD5A1 through *egr1* in HepG2[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2006.
- [23] 洪磊. 黔北麻羊 *SRD5A2* 和 *HSD3B1* 基因的表达及其对卵巢颗粒细胞的影响研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.
- HONG L. Study of *SRD5A2* and *HSD3B1* gene expression and their effects on ovarian granulosa cells in Qianbei Ma Goat[D]. Guiyang: Guizhou University, 2021.
- [24] 薛婷. 淡水珍珠蚌 DUI 发生及性腺发育研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- XUE T. Study on DUI occurrence and gonad development of freshwater pearl mussels [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [25] 上官宵兆,刘美玲,毛颖睿,等. 三角帆蚌 *17\beta*-HSD11 基因的表达特征及 17β -雌二醇对其表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(1): 1-9.
- SHANGGUAN X Z, LIU M L, MAO Y R, et al. Expression analysis of *17\beta*-HSD11 gene in *Hyriopsis cumingii* and effect of 17β -estradiol on its expression [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(1): 1-9.
- [26] 徐永江,柳学周,王妍妍. 外源激素对二龄圆斑星鲷卵巢发育诱导效果的初步研究[J]. 海洋科学进展, 2013, 31(2): 247-255.
- XU Y J, LIU X Z, WANG Y Y. Effects of exogenous hormones on the ovarian development of sexually immature spotted halibut *Verasper variegata* [J]. Advances in Marine Science, 2013, 31(2): 247-255.
- [27] 郑任驰,罗少凤,朱玮蔚,等. 金钱鱼 *mmp* 基因在性腺中的表达及其对外源 17β -雌二醇的响应[J]. 广东海洋大学学报, 2022, 42(6): 56-64.
- ZHENG R C, LUO S F, ZHU W W, et al. Expression of *mmp* genes during gonadal development and their response to exogenous 17β -estradiol in *Scatophagus argus* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2022, 42(6): 56-64.
- [28] MORI K, TAMATE H, IMAI T. Histochemical study on the change of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the oyster during the stages of sexual maturation and spawning [J]. Tohoku Journal of Agricultural Research, 1966, 17: 179-187.
- [29] VARAKSIN A A, VARAKSINA G S, REUNOVA O V, et al. Effect of serotonin, some fatty acids and their metabolites on reinitiation of meiotic maturation in oocytes of bivalve *Spisula sachalinensis* (schrenk) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1992, 101(3): 627-630.
- [30] CROLL R P, WANG C D. Possible roles of sex steroids in

- the control of reproduction in bivalve molluscs [J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1/4): 76-86.
- [31] OSADA M, TAKAMURA T, SATO H, et al. Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: Control by estradiol-17 β and the central nervous system [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2003, 299A(2): 172-179.
- [32] TEANINIURAITEMOANA V, LEPRÊTRE M, LEVY P, et al. Effect of temperature, food availability, and estradiol injection on gametogenesis and gender in the pearl oyster *Pinctada margaritifera* [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2016, 325(1): 13-24.
- [33] 徐伟, 楼钦钦, 魏无际, 等. 雌二醇短期暴露对非洲爪蟾性腺和输卵管形态及性二态基因表达影响的初步研究[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(1): 263-270.
- XU W, LOU Q Q, WEI W J, et al. Initial evaluation on gonadal and oviductive morphology and sexually dimorphic gene expression of *Xenopus laevis* after short-term exposure to 17 β -Estradiol [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(1): 263-270.
- [34] 蒲鲁鲁, 张子平, 王艺磊, 等. 硬骨鱼类雄激素受体研究进展[J]. *动物学杂志*, 2011, 46(4): 150-160.
- PU L L, ZHANG Z P, WANG Y L, et al. Androgen receptors in teleosts [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2011, 46(4): 150-160.
- [35] 李天慧, 翟刚, 贺江燕, 等. 雄激素受体缺乏抑制肝脏 Vtg 合成导致卵巢发育障碍[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(9): 1277-1284.
- LI T H, ZHAI G, HE J Y, et al. Androgen receptor deficiency causes ovarian dysgenesis via reducing the hepatic vitellogenin production in zebrafish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(9): 1277-1284.
- [36] FENSKE M, SEGNER H. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 67(2): 105-126.
- [37] 刘少贞, 朱玉婷, 赵凌瑞. 17 α -甲基睾酮对麦穗鱼性腺组织学的影响[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(2): 147-152.
- LIU S Z, ZHU Y T, ZHAO L R. Effect of MT on gonadal histology of *Pseudorasbora parva* [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2016, 36(2): 147-152.

Molecular identification and functional study of *Srd5a1* in female *Hyriopsis cumingii*

CAO Mulian¹, HUO Yingduo¹, LIU Zongyu¹, MIAO Yulin¹, JIN Xin¹, WANG Guiling^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Sex steroid hormones are closely related to biological reproduction, gamete emission and gonadal development. And *Srd5a1* plays an important role in the synthesis of sex steroid hormones. In order to investigate the effect of the sex steroid hormone synthesis-related enzyme gene *Srd5a1* on ovarian development in female *Hyriopsis cumingii*, *Srd5a1* was obtained from the gonads of *H. cumingii* by RACE (Rapid-amplification of cDNA ends). The expression characteristics of *Srd5a1* were investigated by real-time fluorescence quantification (qRT-PCR), *in situ* hybridization and *in vitro* induction of 17 β -estradiol (E2) and 17 α -methyltestosterone (MT) at different concentrations for 24 days. The results showed that the full-length cDNA of *Srd5a1* was 2 224 bp, including ORF 825 bp, 3'-UTR 953 bp, and 5'-UTR 446 bp, encoding 274 amino acids. The expression of *Srd5a1* in the gonad was bimodal, with higher expression in the ovary than that in the testis; *Srd5a1* had the highest expression level in the ovarian discharge period, which was extremely significantly higher than that in all other periods. *In situ* hybridization results showed that *Srd5a1* detected positive signals in ovarian oocytes and follicles as well as spermatocytes of the testis. The expression of *Srd5a1* was changed after 24 days of treatment with different concentrations of E2 and MT. In conclusion, *Srd5a1* may play a role in the developmental maturation of the ovary oocyte and gamete emission in the female *H. cumingii*. This study is important for exploring the gonadal growth and development of *H. cumingii*, and also provides a theoretical reference value for the realization of monogamous breeding of *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; *Srd5a1*; ovarian development; 17 β -estradiol; 17 α -methyltestosterone