

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.23.046

浅析斑马鱼性别决定的调控因素*

何玉雪 王 博 刘云章 荣小至 周建峰[△]

(中国海洋大学医药学院 山东 青岛 266003)

摘要:性别决定是经典而高度保守的生物过程。在许多物种中性别决定是以遗传为基础的,个体所携带的性染色体决定了性别。然而,由于鱼类性腺发育呈现高度可变性、复杂性的特点,其性别决定机制仍未有定论。斑马鱼作为一个研究发育和疾病的重要脊椎模式动物,性别决定和分化的高度可塑性使其成为研究生理和环境因素对性腺发育影响及其作用机制的独特模型。本综述总结近年来对斑马鱼性别决定及分化过程的研究,为探索鱼类性别决定机制提供新的见解。

关键词:斑马鱼;性别决定;性腺分化

中图分类号:Q959.4;Q492.4;Q492.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)23-4597-04

Analysis on the Regulatory Factors of Sex Determination in Zebrafish*

HE Yu-xue, WANG Bo, LIU Yun-zhang, RONG Xiao-zhi, ZHOU Jian-feng[△]

(School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT: Sex determination is a classical and highly conserved biological process. In many species, sex determination is genetically based. The sex chromosomes that individuals carry determine sex identity. However, due to the high variations and complexity of the gonadal development, the mechanism of sex determination in fish remains elusive. Zebrafish has gained prominence as a vertebrate model system to study development and disease. The high plasticity of sex determination and differentiation makes this species a unique model for studying the influences of physiological and environmental factors on sex development and their mechanisms. This review summarizes recent studies on the sex determination and differentiation in zebrafish and provides new insights into exploring the mechanisms.

Key words: Zebrafish; Sex determination; Gonadal differentiation

Chinese Library Classification(CLC): Q959.4; Q492.4; Q492.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)23-4597-04

前言

脊椎动物在性腺分化为精巢或卵巢的过程中,呈现出多种性别决定机制^[1,2]。这些机制有的严格受基因调控--基因性别决定(Genetic sex determination, GSD),有的是依赖于环境因素--环境性别决定(Environmental sex determination, ESD)^[3],还有的是通过基因性别决定 GSD 和环境性别决定 ESD 相互作用共同调控。

在哺乳动物中,性别是通过性染色体 XX/XY 型确定的,雄性个体内有两套异型的性染色体 XY^[4]。鸟类的性别是通过 ZZ/ZW 型确定的,雌性个体内有两套异型的性染色体 ZW^[4]。爬行动物性别可能是 GSD 或 ESD 所调控的^[5]。然而鱼类在性别决定机制中呈现高度变化性,包括 GSD(XX/XY, ZZ/ZW, 多基因, 常染色体), ESD 以及 GSD-ESD 相互作用^[2,6]。

斑马鱼(Danio rerio)广泛应用于发育生物学、生态毒理学研究。然而,控制斑马鱼性别决定的机制仍知之甚少。鉴于斑马鱼对科学研究的重要性,本综述旨在以斑马鱼为模型,对其性

别决定所涉及遗传和环境因素的最新进展进行总结,以及它们如何相互作用以协调斑马鱼性腺发育及分化过程的信息进行分析,充分发现斑马鱼在生殖生物学研究方面的潜能,为脊椎动物性别决定和分化以及对环境影响造成表型可塑性的研究提供理论依据。

1 斑马鱼性腺特征

斑马鱼性腺来源于两种类型的细胞:原始性腺细胞(Pri-mordial germ cell, PGC)和与生殖脊相邻的体细胞。原始性腺细胞具有细胞较大(直径 6-11 μm),高质核比,单核仁存在的特征^[7],它可以分化成卵原细胞或精原细胞,也是斑马鱼性别的关键决定因素^[8]。在早期胚胎发育过程中,原始性腺细胞向生殖脊定向迁移,并与周围的体细胞衍生细胞一起形成性腺,原始性腺细胞最终分化为两种生殖细胞即精子和卵母细胞,邻近生殖脊的体细胞发育成支持性腺组织的结构^[9,10]。

Takahashi^[11]首次报道斑马鱼性腺分化过程的复杂性,他指出每个斑马鱼都在最开始形成卵巢(Juvenile ovary, 我们命名

* 基金项目:中央高校基本科研专项基金项目(201822023)

作者简介:何玉雪(1995-),硕士研究生,主要研究方向:分子医学生物学, E-mail: 1521266654@qq.com

[△] 通讯作者:周建峰,教授,主要研究方向:分子医学生物学, E-mail: jfzhou@ouc.edu.cn, 电话: 0532-82032957

(收稿日期:2019-04-23 接受日期:2019-05-18)

为幼年卵巢),"幼年卵巢"主要由卵原细胞和原代卵母细胞组成。受精后 2.5 周至 4 周的斑马鱼可以观察到"幼年卵巢"期的组织学特征,而"幼年卵巢"阶段可能在不同个体之间存在几天至一周以上的差异^[12]。当所有个体都发育成卵母细胞的卵巢样性腺时,将会经历特殊的幼年雌雄同体阶段^[13]。幼年卵巢中的卵母细胞可以进一步分为两类:滤泡前染色质核仁阶段和滤泡周围核阶段。直径为 20 毫米的滤泡前染色质核仁阶段的卵母细胞进入减数分裂,它们都聚集在囊中,且每个囊中的卵母细胞在发育过程中是同步的^[13]。卵母细胞可根据大小、细胞核和细胞质的形态以及它们周围的滤泡细胞的外观分为五个阶段(阶段 I 至阶段 V)^[14]。而在约一半被遗传编程成为雄性的个体中,卵母细胞将经历细胞凋亡,让位于雄性生殖细胞,最终性腺分化为成熟的精巢^[13]。

2 调控斑马鱼性腺发育和分化的因素

2.1 GSD 在斑马鱼性别决定和分化中的作用

GSD 机制可分为两种主要形式:染色体性别决定(Chromosome sex determination, CSD),其中性别相关基因位于单一性染色体对中;多基因性别决定(Polygenic sex determination, PSD),性别决定基因分布在整个基因组中。

在斑马鱼性别遗传机制研究中,Anderson 早期实验确定两个与斑马鱼性别相关的基因座,分别在 4 号染色体和 3 号染色体上^[15]。后来研究表明 4 号染色体是野生型(非驯化)斑马鱼的性染色体,并且遵循 ZZ/ZW 遗传性别决定机制。不过有趣的是,实验室驯化的斑马鱼品系(AB 和 Tübingen 系等)没有在 4 号染色体检测到性别相关基因座,可能是由于主要性别决定区在驯化过程中丧失所致^[16]。近几年,一些分子机制研究支持驯化斑马鱼的性别决定由 PSD 调控,是基因座上多个等位基因组合作用的结果,通常分散在整个基因组中^[3,17]。总之,野生型斑马鱼性别是通过 ZZ/ZW 型确定的,而驯化斑马鱼缺乏主要的性连锁基因座或性染色体,且来自多个独立全基因组不同性别相关基因座的鉴定实验,表明其性别发育和分化是受多种基因影响的过程。迄今为止,斑马鱼研究中已经发现了许多在斑马鱼性别发育和分化中发挥重要作用的基因。

piwi (P-element induced wimpy testis) 基因,斑马鱼中有两个 piwi 基因,即 piwil1 (ziwi) 和 piwil2 (zili)。piwil1 的突变导致生殖细胞凋亡,证明了其在原始生殖细胞维持中的作用^[18]。在 piwil2 突变体中,生殖细胞的数量减少,并且卵母细胞在减数分裂 I 期停滞,突出其在生殖细胞分化和减数分裂中的作用^[19]。

cyp19a1a (cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a) 基因,编码催化雌激素合成的 P450 aromA 酶,主要在卵巢中表达,并在卵泡的颗粒细胞中合成雌激素。在 cyp19a1a 突变体中,卵巢分化受损并发育成雄性,参与雄性和雌性发育的关键性腺基因的表达也被延迟^[20]。同时已构建 cyp19a1a 转基因斑马鱼,深入表征 cyp19a1a 基因在斑马鱼性腺中的表达和定位,并可用于研究性别分化动态及其内分泌干扰化学物质的影响^[21]。因此,cyp19a1a 对雌性性腺分化至关重要,也是雄性性腺发育所必需的。

amh (anti-Müllerian hormone) 基因,是转化生长因子 β (TGF β) 超家族的成员,主要在精原细胞周围的支持细胞中表

达。文献报道 amh 突变体大多发育成雌性,可观察到雌性卵巢主要包含过度增殖的卵原细胞,且雄性生殖细胞的分化受损^[22]。雄性生殖细胞能够分化成精子,其发育依赖于支持细胞的直接膜接触或支持细胞分泌的旁分泌信号,因此 amh 对于雄性生殖细胞分化发挥着至关重要的作用。

dmrt1 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1) 基因,是哺乳动物性别决定的关键调节因子,与其他物种一样,斑马鱼 dmrt1 对雄性分化也很重要。dmrt1 突变体精巢发育缺陷,导致雌性数量增加。同时雄性 dmrt1 突变体生殖细胞无法存活、生长和分化^[22,23]。因此斑马鱼 dmrt1 主要在雄性性别决定和睾丸发育中起作用。

gd9 (growth differentiation factor 9) 基因,是转化生长因子 β (TGF β) 超家族的成员,在性腺分化前的生殖细胞中表达,并且在发育中的卵巢中达到峰值,可能参与促进斑马鱼中的卵母细胞或卵巢分化,并且可能通过抑制体细胞中 amh 表达起作用^[24]。

近年来,参与斑马鱼性发育的候选基因数量大幅增加。最新研究表明,斑马鱼 wnt4a (wingless-type MMTV integration site family, member 4a) 是哺乳动物 Wnt4 的直系同源物,wnt4a 突变体主要发育为雄性,WNT4 信号传导在雌性性别决定中发挥关键作用,表明 Wnt4a 是哺乳动物和非哺乳动物脊椎动物中雌性性别决定和生殖发育的重要调节因子^[25]。Figla (folliculogenesis specific basic helix-loop-helix) 是一种保守的转录因子,1997 年首次在小鼠卵巢中被鉴定为卵母细胞特异性转录因子,脊椎动物斑马鱼 figla 基因在驱动卵巢分化进程中可能也发挥重要作用^[13]。hsf5 (heat shock transcription factor family member 5) 是参与一系列分化、发育、繁殖和应激诱导适应的转录因子,高表达于斑马鱼初级精母细胞,在斑马鱼雄性的减数分裂进展中起关键作用^[26]。相信随着科学研究的进步,未来能不断解锁斑马鱼的基因之谜。

2.2 ESD 在斑马鱼性别决定和分化中的作用

近年来,有证据表明环境因素在斑马鱼性别分化也起着重要的作用。

2.2.1 温度 温度被认为是影响鱼类性别决定主要的环境因素。大多数研究表明,在高水温(33-37 °C)下饲养斑马鱼,使其胚胎发育期间或在性腺分化期间诱导向雄性发展,但是温度影响斑马鱼性别决定的基础机制仍然是未知的^[27]。同时有研究发现在斑马鱼中 DNA 甲基转移酶 dnmt3b (DNA methyltransferase 3 beta) 与其他关键生殖基因(amh, cyp19a1a, dmrt1) 的表达能够响应温度变化而被调节^[28]。此外,温度作为压力因素可以促进诱导皮质醇^[27]。这些假设需要更多的研究来支持,并阐明可能涉及的关键参与者。

2.2.2 氧浓度 据报道斑马鱼缺氧可影响性别决定和分化,导致趋向雄性。这和参与控制斑马鱼 (cyp11a, cyp19a 和 cyp19b 等) 中性激素合成基因的下调以及雌性中睾酮/雌二醇比率的增加有关^[29]。此外,在缺氧条件下培养的斑马鱼胚胎表现出 PGCs 迁移破坏,睾酮和雌二醇浓度改变以及诱导缺氧诱导因子-1 信号,随后会促进雄性分化并因此促进趋向雄性群体^[30]。这些发现表明缺氧会影响斑马鱼的性别决定和分化。然而,关于缺氧影响斑马鱼性别比研究仍需通过进一步探索来解决确切的机制。

2.2.3 种群密度和食物 尽管种群密度和食物的影响不是很明显,但也被报道是可以改变鱼类性发育的环境因素。研究显示斑马鱼种群密度升高,会导致雄性比例增加^[31]。不过有研究表明一些野生型斑马鱼种系中密度不影响性别比^[32]。因此,这些结果表明,斑马鱼的驯化过程可能导致性发育对环境影响的敏感性增加。有文献提出皮质醇水平的升高与高放养密度等压力情况有关,可能会在这种雄性化中起作用。饲养密度以及食物供应对斑马鱼性发育的作用值得进一步研究。

2.2.4 环境激素污染物 近年来,水生生态系统污染有所增加,特别是内分泌干扰物(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)。这些来源于环境的化学物质通过模拟或拮抗内源激素的作用,调节激素合成、结合和代谢,或通过与激素受体结合来引起生物体分泌紊乱。内分泌干扰物可能对斑马鱼的性别比例产生强烈影响,当用类雌激素作用的化合物如 17 α -乙炔雌二醇,在关键的发育期可导致性别比例趋向雌性的转变^[33]。相反,使用雄激素内分泌干扰物如 17 β -去甲雄三烯醇酮和芳香酶抑制剂会引起斑马鱼的形态雄性化,诱导雄性性别比例升高^[34]。除了干扰性别比例,EDCs 还会影响性腺成熟。已有研究表明斑马鱼在某些情况下暴露于异雌激素会促进性腺分化和成熟^[35]。同样,EDCs 影响斑马鱼性腺成熟机制的信息仍然有限。

2.3 其他因素

表观遗传调控通常包含组蛋白的共价修饰(乙酰化,乙酰胺化等),DNA 甲基化(胞嘧啶残基的甲基化)以及非编码 RNA。越来越多的证据表明,表观遗传机制在脊椎动物的性别决定和分化中发挥作用。目前已利用斑马鱼模型研究性腺中的基因性别特异性转录和 DNA 甲基化谱,并发现 DNA 启动子甲基化与 *esr1*(estrogen receptor 1), *amh* 和 *dnmt1* 转录之间存在关联^[35]。表观遗传调控的研究可以为解决鱼类性别决定的复杂难题提供新的方向。

3 总结与展望

综上所述,斑马鱼性腺发育及分化是一个非常复杂的过程,不同品系之间的快速进化和基因组变异对确定主要的遗传性别决定机制造成更多挑战。驯化斑马鱼的性别则可能由多基因的遗传因素决定的。在不同的斑马鱼品系中鉴定了具有性别二态表达的各种候选基因,其表达模式和调节机制表明它们也参与性别特异性性腺发育信号网络。同时在哺乳动物性别决定中起关键作用的基因(如 *Wnt4a*、*Figla* 等),在斑马鱼中也起着类似的作用,表明脊椎动物的性别决定和分化的核心途径在硬骨鱼谱系中基本上也是保守的,这也为寻找参与驯化斑马鱼性腺发育的候选基因提供方向。此过程在很大程度上也受环境影响,如温度、氧气、密度与营养、环境激素等,然而这些环境因素如何将信号转导至未分化的性腺仍有待阐明。

参考文献(References)

- [1] Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals[J]. *Physiological Reviews*, 2007, 87(1): 1-28
- [2] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences[J]. *Aquaculture*, 2002, 208(3-4): 191-364
- [3] Budd A, Banh Q, Domingos J, et al. Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture [J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2015, 3(2): 329-355
- [4] Major A T, Smith C A. Sexual development: genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation [J]. *Sex Reversal in Birds*, 2016, 10(5-6): 288-300
- [5] Holleley C E, Sarre S D, O'Meally D, et al. Sex reversal in reptiles: reproductive oddity or powerful driver of evolutionary change?[J]. *Sexual Development*, 2016, 10(5-6): 279-287
- [6] Bao L, Tian C, Liu S, et al. The Y chromosome sequence of the channel catfish suggests novel sex determination mechanisms in teleost fish[J]. *BMC Biology*, 2019, 17(1): 6
- [7] Hsu C W, Pan Y J, Wang Y W, et al. Changes in the morphology and gene expression of developing zebrafish gonads[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2018, 265: 154-159
- [8] Cao Z, Mao X, Luo L. Germline stem cells drive ovary regeneration in zebrafish[J]. *Cell Reports*, 2019, 26(7): 1709-1717.e3
- [9] Leerberg D M, Sano K, Draper B W. Fibroblast growth factor signaling is required for early somatic gonad development in zebrafish[J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(9): e1006993
- [10] Zhou L, Feng Y, Wang F, et al. Generation of all-male-like sterile zebrafish by eliminating primordial germ cells at early development[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1834
- [11] Takahashi H. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*[J]. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ*, 1977, 28(3): 958-964
- [12] Santos D, Luzio A, Coimbra A M. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors [J]. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 2017, 191: 141-163
- [13] Qin M, Zhang Z, Song W, et al. Roles of *Figla/figla* in juvenile ovary development and follicle formation during zebrafish gonadogenesis [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(11): 3699-3722
- [14] Elkouby Y M, Mullins M C. Methods for the analysis of early oogenesis in zebrafish[J]. *Developmental Biology*, 2017, 430(2): 310-324
- [15] Anderson J L, Rodríguez Marí A, Braasch I, et al. Multiple sex-associated regions and a putative sex chromosome in zebrafish revealed by RAD mapping and population genomics [J]. *PloS One*, 2012, 7(7): e40701
- [16] Wilson C A, High S K, McCluskey B M, et al. Wild sex in zebrafish: loss of the natural sex determinant in domesticated strains [J]. *Genetics*, 2014, 198(3): 1291-1308
- [17] Liew W C, Bartfai R, Lim Z, et al. Polygenic sex determination system in zebrafish[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34397
- [18] Houwing S, Kamminga L M, Berezikov E, et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish[J]. *Cell*, 2007, 129(1): 69-82
- [19] Houwing S, Berezikov E, Ketting R F. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish[J]. *The EMBO Journal*, 2008, 27(20): 2702-2711
- [20] Yin Y, Tang H, Liu Y, et al. Targeted disruption of aromatase reveals dual functions of *cyp19a1a* during sex differentiation in zebrafish[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(9): 3030-3041
- [21] Hinfray N, Sohm F, Caulier M, et al. Dynamic and differential ex-

- pression of the gonadal aromatase during the process of sexual differentiation in a novel transgenic cyp19a1a-eGFP zebrafish line[J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 261: 179-189
- [22] Lin Q, Mei J, Li Z, et al. Distinct and cooperative roles of amh and dmrt1 in self-renewal and differentiation of male germ cells in zebrafish[J]. Genetics, 2017, 207(3): 1007-1022
- [23] Webster K A, Schach U, Ordaz A, et al. Dmrt1 is necessary for male sexual development in zebrafish [J]. Developmental Biology, 2017, 422(1): 33-46
- [24] Chen W, Liu L, Ge W. Expression analysis of growth differentiation factor 9 (Gdf9/gdf9), anti-müllerian hormone (Amh/amh) and aromatase (Cyp19a1a/cyp19a1a) during gonadal differentiation of the zebrafish, Danio rerio [J]. Biology of Reproduction, 2017, 96 (2): 401-413
- [25] Kossack M E, High S K, Hopton R E, et al. Female sex development and reproductive duct formation depend on Wnt4a in zebrafish[J]. Genetics, 2019, 211(1): 219-233
- [26] Saju J M, Hossain M S, Liew W C, et al. Heat shock factor 5 is essential for spermatogenesis in zebrafish [J]. Cell Reports, 2018, 25(12): 3252-3261.e4
- [27] Baroiller J F, D'Cotta H. The reversible sex of gonochoristic fish: insights and consequences [J]. Sexual Development, 2016, 10 (5-6): 242-266
- [28] Ribas L, Liew W C, Dí az N, et al. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(6): E941-E950
- [29] Hoo J Y, Kumari Y, Shaikh M F, et al. Zebrafish: a versatile animal model for fertility research [J]. BioMed Research International, 2016, 2016: 9732780
- [30] Robertson C E, Wright P A, Koblitz L, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, Danio rerio [J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2014, 281(1786): 20140637-20140637
- [31] Ribas L, Valdivieso A, Dí az N, et al. Appropriate rearing density in domesticated zebrafish to avoid masculinization: links with the stress response [J]. The Journal of Experimental Biology, 2017, 220 (6): 1056-1064
- [32] Hazlerigg C R E, Lorenzen K, Thorbek P, et al. Density-dependent processes in the life history of fishes: evidence from laboratory populations of zebrafish Danio rerio[J]. PloS One, 2012, 7(5): e37550
- [33] Luzio A, Monteiro S M, Garcia-Santos S, et al. Zebrafish sex differentiation and gonad development after exposure to 17 α -ethinylestradiol, fadrozole and their binary mixture: A stereological study [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 166: 83-95
- [34] Muth-Köhne E, Westphal-Settele K, Brückner J, et al. Linking the response of endocrine regulated genes to adverse effects on sex differentiation improves comprehension of aromatase inhibition in a fish sexual development test[J]. Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands), 2016, 176: 116-127
- [35] Laing L V, Viana J, Dempster E L, et al. Sex-specific transcription and DNA methylation profiles of reproductive and epigenetic associated genes in the gonads and livers of breeding zebrafish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology, 2018, 222: 16-25