



尼罗罗非鱼 *Smoothened* 的鉴定、表达模式及在精巢中的作用

黄 琴, 张泽明, 白孝明, 赵长乐, 代向燕,
陶文静, 周林燕, 王德寿*, 魏 静*

(西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 为探究 *Smoothened* (*Smo*) 信号在精巢不同细胞增殖与存活中的作用, 实验分离鉴定了尼罗罗非鱼 *smo* (命名为 *Onsmo*), 检测了其在不同组织中的表达分布及在精巢中的细胞表达模式, 在尼罗罗非鱼精巢组织的体外培养体系中, 用 *Smo* 特异性激动剂 SAG 或抑制剂环巴胺分别进行处理, EdU 掺入法及 TUNEL 法检测了处理后生殖细胞 (*Vasa*⁺)、Sertoli 细胞 (*Amh*⁺) 与 Leydig 细胞 (*Cyp17a1*⁺) 增殖或凋亡情况。结果显示, *Onsmo* 开放阅读框全长 2 478 bp, 编码 825 个氨基酸, 含有 7 次跨膜结构域, 与人 SMO 氨基酸一致性达 77%; *Onsmo* 表达于包括精巢在内的多个组织; 在精巢中, *Onsmo* 在多种不同类型细胞表达, 包括精原细胞、精母细胞、Sertoli 细胞以及 Leydig 细胞; 在精巢组织的体外培养体系中, SAG 处理对精原细胞增殖具有显著促进作用, 而环巴胺处理对 Sertoli 细胞、Leydig 细胞凋亡具有显著促进作用。研究表明, *Onsmo* 信号在尼罗罗非鱼精巢精原细胞增殖与体细胞存活中具有重要作用。该研究首次证实了 *Smo* 信号在鱼类精巢不同细胞增殖与存活中的作用, 为进一步研究其作用机制奠定了重要基础。

关键词: 尼罗罗非鱼; *Smoothened*; 精巢; EdU 掺入法; TUNEL 法; 增殖; 存活

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

Hedgehog (Hh) 信号通路在胚胎发育、组织发生与维持过程中具有重要作用^[1-3]。*Smoothened* (*Smo*) 在该通路的信号传导过程中起着中心调控作用^[4]。*Smo* 属于 G 蛋白偶联受体家族成员, 含有高度保守的 7 次跨膜结构域^[5]。目前, 不少研究者成功研制了 *Smo* 多种特异性化学小分子激动剂如 SAG, 抑制剂如环巴胺 (Cyclopamine), 从而极大促进了对该信号通路的相关研究^[6-7]。

在哺乳类动物, SMO 信号在精巢组织不同细胞增殖与存活过程中具有重要作用。如 SAG 或

环巴胺处理大鼠 (*Rattus norvegicus*)、小鼠 (*Mus musculus*) 体外培养的精巢组织, 可促进组织中不同细胞的增殖或凋亡^[8-9]。SAG 处理经二甲磺基乙烷消除内源性成熟 Leydig 细胞 (LC) 的大鼠曲细精管, 发现其可显著促进 Leydig 干细胞 (stem Leydig cells) 的增殖与分化, 促进睾酮的产生^[10]。然而, *Smo* 信号在鱼类精巢细胞增殖与存活中的作用迄今未见更多报道。

罗非鱼为世界性养殖鱼类, 拥有食性杂、生长快、抗逆性强、性成熟时间短等优点, 是我国

收稿日期: 2021-07-05 修回日期: 2021-10-08

资助项目: 国家自然科学基金 (32172969, 31972776, 31972778, 32072957); 重庆市自然科学基金 (cstc2020jcyj-msxmX1045)

第一作者: 黄琴 (照片), 从事鱼类生殖研究, E-mail: 295579752@qq.com

通信作者: 王德寿, 从事鱼类性别决定与分化和生长调控的机制研究, E-mail: wdeshou@swu.edu.cn;

魏静, 从事鱼类生殖与干细胞研究, E-mail: lalsos@swu.edu.cn



农业农村部重点推广的水产养殖主导品种之一, 是鱼类生殖生理研究的良好模型^[11]。目前, *Smo* 及其信号在罗非鱼中的相关研究尚属空白。基于此, 本实验拟分离、鉴定尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *smo* (命名为 *Onsmo*), 并对其表达模式及在精巢不同细胞增殖与存活中的作用进行研究。该研究将促进对鱼类精巢细胞分化发育及其调控机制的深入认识, 为最终实现鱼类育性控制及健康养殖奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用尼罗罗非鱼从日本国立基础生物学研究所引进, 在西南大学(重庆北碚)培育建系, 现培养于西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 所有操作符合实验室动物伦理规范。尼罗罗非鱼受精卵和成鱼均于 25~28 °C 循环水中培养, 光照周期为 12 h 光照, 12 h 黑暗。

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、第一链 cDNA 合成试剂盒、2×*Taq* Mix 酶、DNase I (RNase free)、pMD-19T 载体、pGEM[®]-T Easy 载体和 Solution I 连接试剂均购自 TaKaRa 公司(日本), 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司(中国), 胎牛血清、DMEM 培养基、谷氨酰胺、丙酮酸钠、亚硒酸钠、非必需氨基酸、青链霉素、β-巯基乙醇购自 Gibco 公司(美国), Hepes 购自 Sigma 公司(美国), T7 mMESSAGE mMACHINE[®]试剂盒购自 Ambion 公司(美国), 10× DIG RNA Labeling Mix 购自 Sigma 公司(美国), 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)购自上海碧云天生物技术有限公司(中国), cell-light[™] EDU Apollo 567 in Vivo kit 购自广州市锐博生物科技有限公司(中国), SAG、环巴胺(Cyclopamine)购自 MCE 公司(美国), 二抗(山羊抗兔 IgG)购自 CST 公司(美国)等。免疫组化所用抗尼罗罗非鱼 *Vasa*、*Amh* (Anti-Müllerian Hormone) 和 *Cyp17a1* (cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1) 抗体由本实验室制备^[12-14]。

实验所用引物名称及序列见表 1, 引物合成及测序均由华大基因完成。

1.2 实验方法

cDNA 克隆 在美国国家生物技术信息中

表 1 本实验所用引物信息

Tab. 1 Sequences information of the primers used in this study

引物名称 primers name	引物序列(5'→3') primer sequences (5'→3')
<i>Smo</i> -ORF-F1	CCGCTCGAGATGCTCTCCAAGAGTTGGAG
<i>Smo</i> -ORF-R1	CGACGCGTTTAGAAGTCAGAGTCAGCATC
<i>Smo</i> -RT-F1	AGACTCTGTGAGCGGGATCT
<i>Smo</i> -RT-R1	CTGGGGCGGTTCTTAATGGT
<i>β-actin</i> -RT-F1	GGCATCACACCTTCTACAACGA
<i>β-actin</i> -RT-F1	ACGCTCTGTCAGGATCTTCA
<i>smo</i> -FISH-F1	CCTCATCTGGAAACGCACCT
<i>smo</i> -FISH-F1	TAGGGACACTTCTCCTCGCA

心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得 *smo* 开放阅读框序列 (GenBank ID, XP_003445059.1)。将尼罗罗非鱼精巢组织提取的 1 μg RNAs 逆转录合成 cDNAs, 以此为模板, 用 *Onsmo* 特异性引物 (表 1) 进行 PCR 以获得 *Onsmo* 开放阅读框序列, PCR 产物经胶回收、亚克隆, 最后送华大基因测序, 以验证其序列的正确性。

序列分析 用 Clustal W 及 Genedoc 进行氨基酸序列多重比对; 在线 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜区分析; 用 MEGA 6.0 软件进行系统进化树构建。

组织表达分布 提取 6 月龄尼罗罗非鱼脑、鳃、心脏、肾脏、肝脏、肌肉、卵巢、脾脏和精巢组织总 RNAs, 逆转录合成 cDNAs, 用 *Onsmo* 基因特异性引物 (表 1) 进行 PCR, 以检测其在不同组织中的表达分布情况。PCR 扩增条件: 95 °C 变性 3 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 0.5~1 min, 共 28~35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。

荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 具体方法参考文献^[15]。简言之, 用 10×DIG RNA Labeling Mix 和 T7 mMESSAGE mMACHINE[®]试剂盒合成 DIG 标记的 *Onsmo* 正义链和反义链 RNA 探针; 取 60、180 dah (孵化后天数) 尼罗罗非鱼精巢组织, 4% 多聚甲醛 4 °C 固定过夜, 然后梯度脱水、石蜡包埋、切片 (5 μm), 然后分别用 *Onsmo* 正义链 (对照) 和反义链 RNA 探针 (浓度 1 : 3 000) 65 °C 孵育 16 h, 依次用 Anti-DIG-POD (1 : 3 000, 1% 封闭剂稀释) 室温封闭

3 h, 1×PBS 清洗, TSA plus Tetramethyl rhodamine Solution (1 : 50) 避光孵育 60 min, DAPI 染色, 最后共聚焦显微镜 (奥林巴斯, FV3000) 进行观察。

精巢组织的体外培养 无菌取出 90 dah 雄性尼罗罗非鱼 (XY) 完整的精巢组织, 平均分为 2 份, 于 48 孔细胞培养板中进行精巢组织块的培养。1 份为对照组, 用含相应体积溶剂二甲基亚砜 (DMSO) 的 5N 培养基进行培养; 另 1 份为实验组, 用含 SAG (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 或环巴胺 (25 $\mu\text{mol/L}$) 的 5N 培养基进行培养, 每组重复 3 次以上。5N 培养基为含谷氨酰胺、丙酮酸钠、亚硒酸钠、必需氨基酸、 β -巯基乙醇、胎牛血清的 DMEM 培养基, 具体配方参见文献^[16]。

EdU 掺入法检测细胞增殖能力 将 EdU A 液 (1 : 1 000) 加入 SAG 处理及其对照组培养的精巢组织, 孵育 48 h 后, 取出以进行固定、包埋、切片, 然后用 Apollo/DAPI 染色, 具体参照 EdU 试剂盒说明书; 同时分别用抗尼罗罗非鱼生殖细胞标志分子 Vasa、Sertoli 细胞 (SC) 标志分子 Amh 及 LC 标志分子 Cyp17a1 的抗体进行免疫组化染色; 最后共聚焦显微镜观察, 以研究 SAG 对精巢组织细胞增殖的影响。

TUNEL 法检测细胞凋亡 环巴胺及其对照组培养的精巢组织处理 48 h 后, 取出以进行固定、包埋、切片, 然后用 TUNEL 反应液 (TdT 酶和荧光标记液, 1 : 100) 染色, 具体参照 TUNEL 试剂盒说明书; 同时分别用抗尼罗罗非鱼 Vasa、Amh、Cyp17a1 抗体进行免疫组化染色; 最后共聚焦显微镜观察, 以研究环巴胺对精巢组织细胞存活的影响。

1.3 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示与对照组差异显著或差异极显著。

2 结果

2.1 cDNA 及其序列分析

获得含完全开放阅读框的 *Onsmo* cDNA 序列 2 478 bp, 编码 825 个氨基酸。与其他物种同源分子相似, *Onsmo* 含 7 次跨膜结构域 (图 1); 其与人 (*Homo sapiens*) SMO 氨基酸一致度达 77%, 其

中 7 次跨膜结构域达 84% (图 2)。系统进化分析显示, *Onsmo* 先与斑马鱼 (*Danio rerio*) 聚为一支, 然后与哺乳类、鸟类、爬行类及两栖类聚为一支 (图 3)。综上, *Onsmo* 为哺乳类直系同源分子。

2.2 组织表达分布

以 β -actin 为内参, 利用 RT-PCR 检测 *Onsmo* 在脑、鳃、心脏、肠、肾脏、肝脏、卵巢、脾脏和精巢中的表达情况。结果显示, *Onsmo* 表达于包括精巢在内的所有组织, 其中鳃和脾脏中表达量相对较低 (图 4)。

2.3 在精巢组织中的细胞表达模式

已有研究表明, 雄性尼罗罗非鱼 (XY) 通常情况下在 85 dah 开始减数分裂^[17]。本研究采用 FISH 检测 *Onsmo* 在 60、180 dah 精巢组织中 mRNA 的细胞表达模式。结果显示, 在 60 dah 精巢组织, 部分精原细胞可见明显信号 (图版 I -1); 在 180 dah 精巢组织, 除精子和精细胞外, 精原细胞、精母细胞、SC 及 LC 均可见明显信号 (图版 I -2, 4); 在用 *Onsmo* 正义探针检测的对照组未见任何信号 (图版 I -3)。从而表明, *Onsmo* 表达于精巢组织包括精原细胞、精母细胞、SC 及 LC 在内的多种细胞。

2.4 Smo 信号在精巢不同细胞增殖中的作用

SAG 处理体外培养的 90 dah 尼罗罗非鱼精巢组织, EdU 掺入法检测细胞增殖活性 (图版 II)。结果显示, SAG 处理 48 h 后, 可见 Vasa⁺EdU⁺ 细胞百分比高达 68%, 对照组仅为 10% (图 5)。此外, SC (Amh⁺) 和 LC (Cyp17a1⁺) EdU⁺ 细胞百分比与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。从而表明, Smo 信号可显著促进尼罗罗非鱼精原细胞增殖。

2.5 Smo 信号在精巢不同细胞存活中的作用

环巴胺处理体外培养的 90 dah 尼罗罗非鱼精巢组织, TUNEL 法检测细胞凋亡情况。结果显示, 环巴胺处理 48 h 后, 可见精巢组织中 Vasa⁺ 细胞凋亡率与对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 而 Amh⁺ 和 Cyp17a1⁺ 细胞发生大量凋亡, 其中 Amh⁺ 细胞凋亡率从对照的 11% 升高到 85% ($P < 0.01$), Cyp17a1⁺ 细胞凋亡率从对照组的 2% 升高到 51% ($P < 0.01$) (图版 III)。从而表明, Smo 信号对精巢 SC 和 LC 的存活具有重要作用。

1	ATGCTTCCAAGAGTTGGAGCCCATTTGTTGGATTTACGGGATGCTTTGGCTGGGCTGCCTGGCTTTCTGGCTGCGGGCAGTGTG	30
91	M S S K S W S P I V G F Y G M L C V W A A W L S G C G A V L TCTCCAATGGGACGATATTTGAGGATACCTGCAAGAAAACCAACTTGCAGGTGCTTAAATACAACACATGTTGGGATCGCCTTA	60
181	S P N G T I F E D T C K K T T T C E V L K Y N T C L G S P L CCATACACTCACTTCTGATCCTGGCGGAGGACTCCAGCACCAAGAAGAGGCTTTTGAAGTTGACCATGTGGTCCGGTTTGGCG	90
271	P Y T H T S L I L A E D S S T Q E E A F E K L T M W S G L R AACCCCTCGCTGTTGGTGGTATCCAGCCTCTGCTGGCCGCTACATGCCAAATGCGAAAACGGCCGAGTTGAATGCCACG	120
361	N A P R C W S V I Q P L L C A V Y M P K C E N G R V E L P S CAGAGCTCTGCTGACTACAGTGGTCCATGTAGCATGTGGATCGGGAGCGAGGCTGGCCAGCTTCTCAAAATGTGACAAATCCCT	150
451	Q S L C L T T R G P C S I V D R E R G W P S F L K C D K F P GTGGCTGTTGCAATGAGGTGCAAAAGCTGAAGTCAACACATCGGGCAGTGTGAAGTCTCTGGTGAAGACGGACATTCAGTGGAGC	180
541	V G C S N E V Q K L K F N T S G Q C E A P L V K T D I Q S S TGGTACAAGGACGTGGAGGCTGTGGTATCCAGTGTGACAAATCCTGTTCACTGAAGAGGAGCAATGACATGACACGCTATATCGCT	210
631	W Y K D V E G C G I Q C D N P L F T E E E H N D M H A Y I A TACTTGGCACCATCACCTCCTGCACTTTCTTACCTGGCCACATTTCTTGACAGTGGAAAACTAAACCGCTACCCAGCTGTC	240
721	<u>Y F G T I T L L C T F F T L A T F L A D W K N S N R Y P A V</u> ATTCTTCTACATCAACGCTGTTTCTTTGGGCGAGCATGGCTGGCCAAATTTCTGGATGGCGCAGTGAAGAGATGTATGC	270
811	<u>I L F Y I N A C F F V G S I G W L A Q F L</u> D G A R E E I V C AAGACGCAACACGATGCGACTCGGGGAGCCCTGCTTTCGGAAACGCTGTCATGGTCAACATTTTCATCATGCTACTACTCCCTG	300
901	K S D N T M R L G E P S S S E T L S C V T I F I I V Y Y S L ATGTCGGGTGATTTGGTTGTGATGACATGCTGGCAGACATCTTCAAAGCTTGGGCACTACTCACCAGCAGTGTGCTGGT	330
991	M S G V I W F V M L T Y A W H T S F K A L G T T H Q P L S G AGAACCCTTACTTCCATATGGTCACTGGTCCATCCCTTGTCTCACTGTGGCCATCTAGCAATCGTGAGGTGTGAGGAGACTCT	360
1 081	R T S Y F H M V T W S I P F V L T V A I L A I A E V D G D S GTGAGCGGATCTGTTTGTGGGTACAAGAATTACAGGTATCGTGTGGCTTTGTGCTGGCACCATTGGAGTGGTGTGTTGTTGGT	390
1 171	V S G I C F V G Y K N Y R Y R A G F V L A P I G V V L V V G GGCTACTTCTCATTTCGAGGCGTTATGACATATTTTCCATCAAAGTAACACCCCGGCTCTTGTAGTGAGAAAGCAGCGAGCAAAATC	420
1 261	<u>G Y F L I</u> R G V M T L F S I K S N H P G L L S E K A A S K I AATGAGACAATGCTGCACTTGGAAATTTGGATTCCTTGCTTTGGTTTGTCTTATAACCTTGGCTGCCACTTTATGACTCTTC	450
1 351	N E T M L R L G I F G F L A F G F V F I T F G C H F Y D F AACCAAGCTGAGTGGGAAAGAAGCTTCAGGACTATGTGCTGTGTGAGGCCAAGTGAACAATCGCCTCTCAGACAAAACGCCATCCCA	480
1 441	N Q A E W E R S F R D Y V L C E A N V T I A S Q T N K P I P GAATGCCACATTAAAGACCGCCAGTCTGATGGTGGAGAAAATTAACCTGTTTCCATGTTGGGACGGGTATCGCCATGAGTACCTGG	510
1 531	E C T I K N R P S L M V E K I N L F S M F G T G I A M S T W GTCTGGCAAAAGCCACCATCTCATCTGGAACGCACCTGGTGAAGTCAATGGCCGTAGCGATAATGAACCGAAGAGGATAAAGAAA	540
1 621	<u>V W T K A T I L I W K R T W C K I I G R S D N E P K R I K K</u> AGCAAGATGATCGCAAGGCATTCGCGATGAGGAAGGAGCTCCACAAGATCCAGAGAAAGAGCTGCTCTCAGTATGCACACCGTTC	570
1 711	S K M I A K A F A M R K E L H K D P E K E L S F S M H T V S CACGAAGGACAGTGGCCGGAATCAATTTGACCTAAACGAGCCATCAATGACATGTCGCTGGCTTGGGACAGCATGTGACAAAGATG	600
1 801	H E G P V A G I N F D L N E P S N D M S S A W A Q H V T K M GTGGCCAGAGGAGTGCATCTCCACAGGACATTTCTGTTACTCCACTGGTACACCAGTGCCTCCAGGAGGAGAAACCGCCTG	630
1 891	V A R R G A I L P Q D I S V T P T G T P V P P P E E R N R L TGGATGGTGGAGCCGAAATTTACCGGAAATGATAAAGAGGAAAAAGAAGAAGAAGAGGAAGAGGAGTGCCTCCGTCGAGGAG	660
1 981	W M V E A E I S P E M I K R K K K K K R K K E V R P V E E ATGGTGGACCACCGTTTATCGCCAGCGAGTTTGGTGCAGCTCAGTGCCTGCTGCCAACTGCCTCTCATCAAGCCTGGTT	690
2 071	M V D H Q V Y R Q R E F G R S S V P R L P K L P P H P S L V GCCAATCTGCGGAAACAGCAGACACAACAAGAAGATTGAGGAGGAAGTTCTGCTGGTCTTACCAGACTTCCAACCTTCAGCCGT	720
2 161	A N L R E Q Q R Q Q Q K I E E E V L P G S Y P D F Q P S R R CTGTCATGCGAGGAAAGTGTCCCTACTGCACTACCAGACAGCCAGAAATGGCTATGGCCACAGCATGCTATGACCCCTGACCTTC	750
2 251	L S C E E K C P Y L Q Y Q T S Q N G Y G H S M L S D P L T F AGAGATCGTCCAGAGGATCTGGTCTTGGTCCGCTTACCCTCCCAATGGCAGCCTAGTGCCTTTCAGCTACCTGGAGAAATG	780
2 341	R D R P E D L G L G P R Y P P S N W Q P S A S S R Y P G E M GATATCACTAATGGAATATCAGAAAGAATGGCCACGTTGGCTCGGTACCAGCAGCCGAGGGCTGGTTACGGACCATCACTCCAGG	810
2 431	D I T N G I S E R M A H V A R V P A G R R A G Y G P I H S R ACCAATTAATGGAGGCGGAGCTTATGGATGCTGACTCTGACTCTAA T N L M E A E L M D A D S D F *	825

图 1 尼罗罗非鱼 *Onsmo* 的核苷酸及其对应氨基酸序列

核酸序列编号在左侧, 蛋白质序列编号在右侧。下划线部分是预测的 7 次跨膜结构域。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Onsmo*

Nucleotide sequences are numbered on the left and amino acid sequences are numbered on the right. The underlined parts are the predicated seven transmembrane domains.

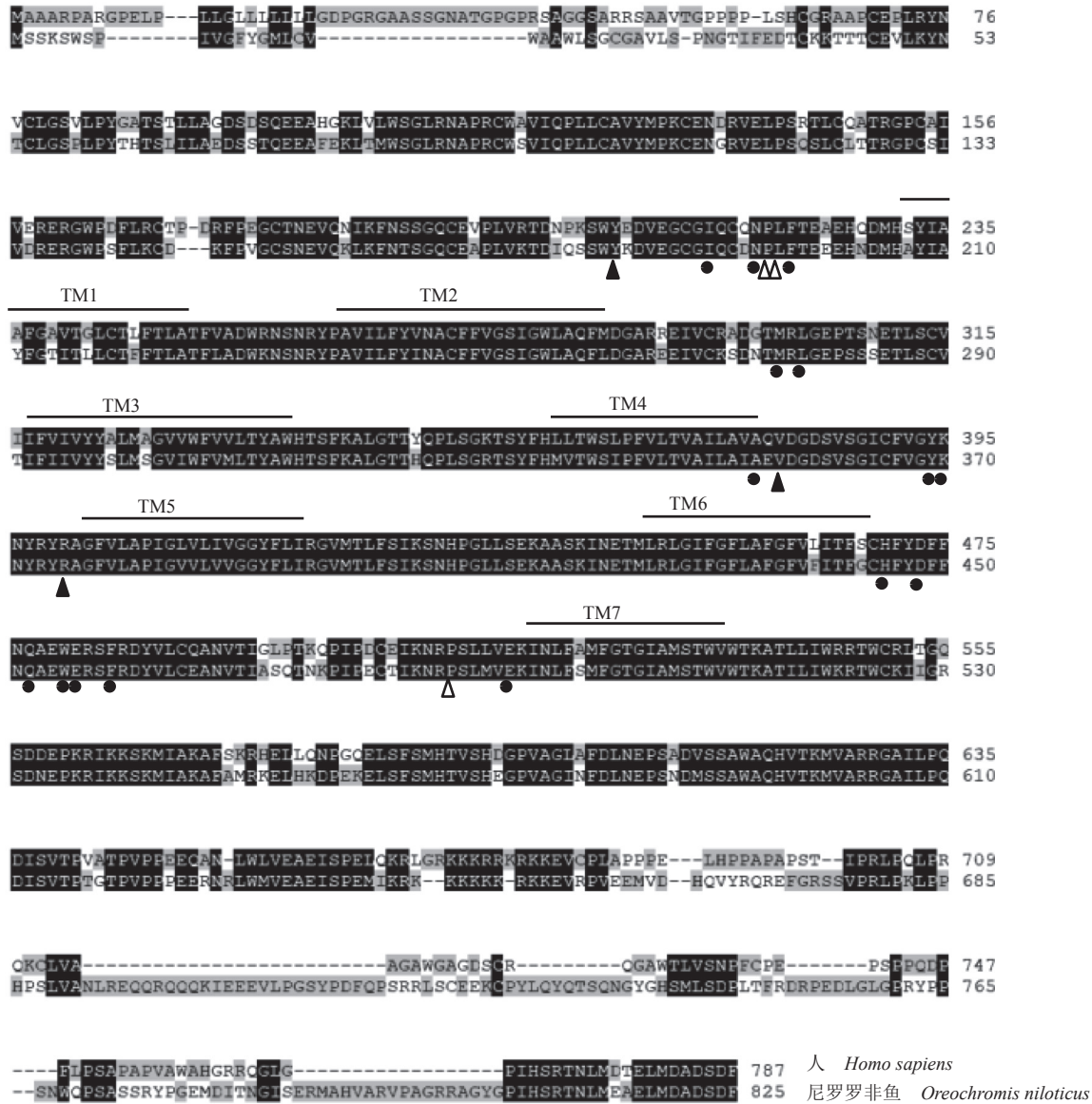


图 2 尼罗罗非鱼与人 SMO 氨基酸序列比对

TM. 跨膜结构域, 实心三角形表示环巴胺作用残基, 空心三角形表示 SAG 作用残基, 圆点表示环巴胺和 SAG 共同作用残基。

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of SMO between *O. niloticus* and human

TM. transmembrane domain, solid triangles indicate the residues that are involved in the inhibition activity by cyclopamine, hollow triangles indicate the residues that are involved in the activation activity by SAG, dots indicate the residues that are involved in both cyclopamine and SAG.

3 讨论

Hh 是机体内一条重要的信号通路, 一直以来受到了学术界极广泛关注。Hh 通路由配体、受体 [包括抑制性受体 Patched (Ptch) 与活化性受体 Smo]、转录因子 Gli 和靶基因组成。配体有 3 个, 即 Desert Hh (Dhh)、Sonic Hh (Shh) 和 Indian Hh (Ihh); Ptch 有 2 个, 即 Ptch1 和 Ptch2, 二者均可结合 Hh 配体。无配体时, Ptch 抑制 Smo 的活性;

有配体时, Ptch 解除对 Smo 的抑制, 进而激活转录因子 Gli (包括 Gli1、Gli2、Gli3), 启动靶基因表达^[18-19]。可见, Smo 在 Hh 通路中起着中心调控作用。本研究分离鉴定了 *Onsmo*, 原位杂交结果显示其表达于精巢中, 包括精原细胞、SC 及 LC 在内的多种细胞, 并在鱼类中首次证实了该信号在精原细胞增殖及 SC 和 LC 存活中具有重要作用。该研究极大促进了对于 Smo 在鱼类精巢分化发育中作用的深入认识, 为进一步研究其信号级联及

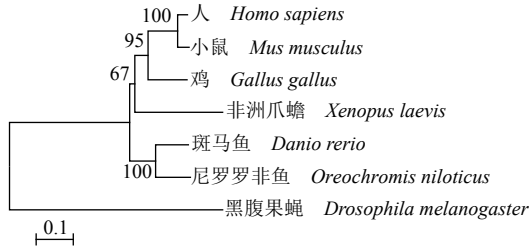


图3 尼罗罗非鱼和其他物种的 Smo 进化树

用 MEGA 6.0 程序中的 Neighbor-Joining 法构建。人. NP_005622; 小鼠. NP_795970.3; 鸡. XP_015143674; 热带爪蟾. AAK15464.1; 斑马鱼. NP_571102; 尼罗罗非鱼. XP_003445059.1; 黑腹果蝇. NP_523443。

Fig. 3 Phylogenetic tree of Smo from *O. niloticus* and other species

Phylogenetic tree was constructed using Neighbor-Joining method within the MEGA 6.0 program. *Homo sapiens*. NP_005622; *Mus musculus*. NP_795970.3; *Gallus gallus*. XP_015143674; *Xenopus tropicalis*. AAK15464.1; *Danio rerio*. NP_571102; *O. niloticus*. XP_003445059.1; *Drosophila melanogaster*. NP_523443.

作用机制奠定了重要基础。

Smo 最早于果蝇中分离鉴定, 其广泛存在于

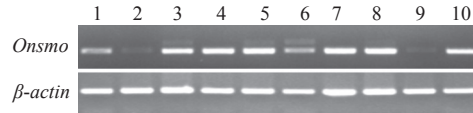
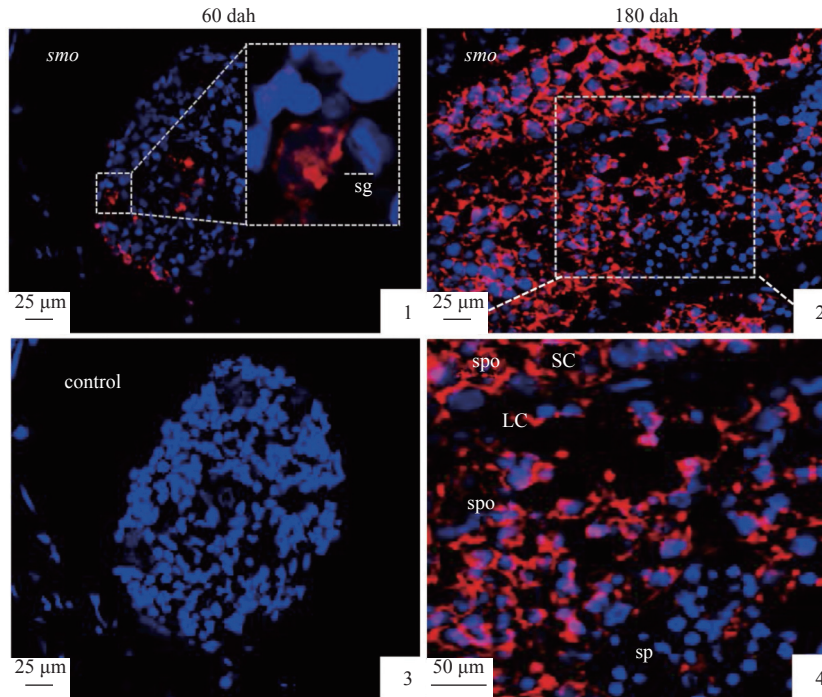


图4 RT-PCR 检测 Onsmo 在不同组织 mRNA 表达水平 β -actin 为内参基因, 1. 脑, 2. 鳃, 3. 心脏, 4. 肠, 5. 肾脏, 6. 肝脏, 7. 肌肉, 8. 卵巢, 9. 脾脏, 10. 精巢。

Fig. 4 mRNA expression profile of *Onsmo* in different adult tissues by RT-PCR

β -actin was used as an internal control. 1. brain, 2. gill, 3. heart, 4. intestine, 5. kidney, 6. liver, 7. muscle, 8. ovary, 9. spleen, 10. testis.

从果蝇到哺乳类的不同物种^[20-21]。Onsmo 具有保守的 7 次跨膜结构域, 与人一致度高达 77%。大量研究证实, SAG 和环巴胺分别是 Smo 特异性激动剂和抑制剂。SAG 是一种氯代苯并噻吩分子, 在哺乳类的研究表明, SAG 通过与 Smo 跨膜结构域结合从而激活 Smo 活性, 其中结合的残基包括 Asp384、Try394、Glu518、Asn219、Met301 等^[7,22]; 环巴胺是一种甾醇生物碱, 通过与 Smo 跨膜结构域结合抑制 Smo 活性, 其中结合的残基包括

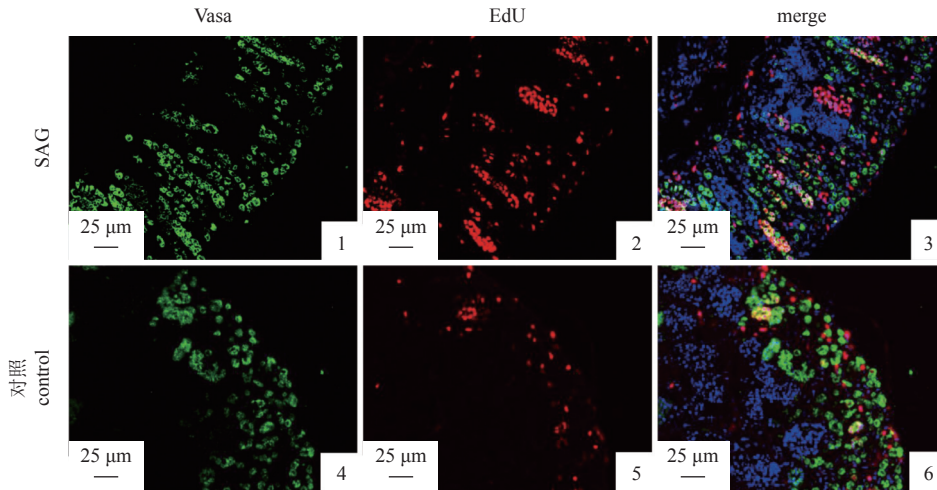


图版 I FISH 检测 *Onsmo* 在精巢组织的 mRNA 细胞表达模式

用荧光原位杂交 (红色为信号) 方法, 以 60 dah (1) 和 180 dah (2) 的尼罗罗非鱼精巢横切面为材料, 使用 DIG 标记的 RNA 反义探针 (*smo*) 和正义探针 (对照) 进行原位杂交, DAPI (蓝色) 标记细胞核, (3) 对照, (4) 为 (2) 中虚线框部分。sg. 精原细胞, spo. 精母细胞, sp. 精子, SC. Sertoli 细胞, LC. Leydig 细胞。

Plate I Cellular mRNA expression patterns of *Onsmo* in testis by FISH

Testicular sections dissected from 60 (1), 180 dah (2) *O. niloticus* were hybridized with the antisense and sense RNA probes, then developed by fluorescence (red) procedures following DAPI staining (blue), (3) control, (4) dotted-line field of (2). sg. spermatogium, spo. spermatocytes, sp. sperm, SC. Sertoli cells, LC. Leydig cells.



图版 II EdU 掺入法检测 SAG 处理对精巢生殖细胞增殖的影响

将精巢组织放置在含 EdU 的培养基, 添加 0 或 0.5 μmol/L SAG, 培养 48 h 后进行 EdU 染色和 Vasa 的荧光免疫组化, 增殖的细胞掺入 EdU (红色), DAPI 标记细胞核。

Plate II Effect of SAG on the proliferation of germ cells by EdU incorporation

Testicular tissues were cultured in 5N containing EdU with 0, 0.5 μmol/L SAG, respectively. After 48 h incubation, they were treated by EdU staining combined with immunofluorescence of Vasa. The proliferating cells had incorporated EdU (red) and were counterstained with DAPI (blue).

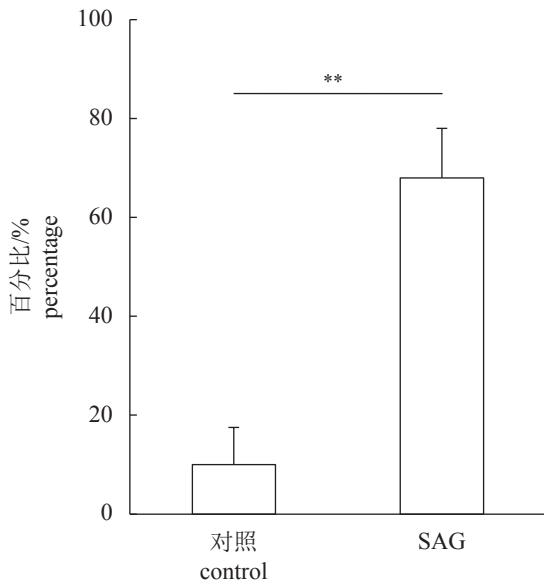


图 5 生殖细胞 (Vasa⁺) 中增殖细胞 (EdU⁺) 百分比统计
统计 Vasa⁺ 和 EdU⁺ 双阳性的细胞数量占总数量的百分比, 其值用平均值±标准差表示 (n=3), **表示差异极显著 (P<0.01), 下同。

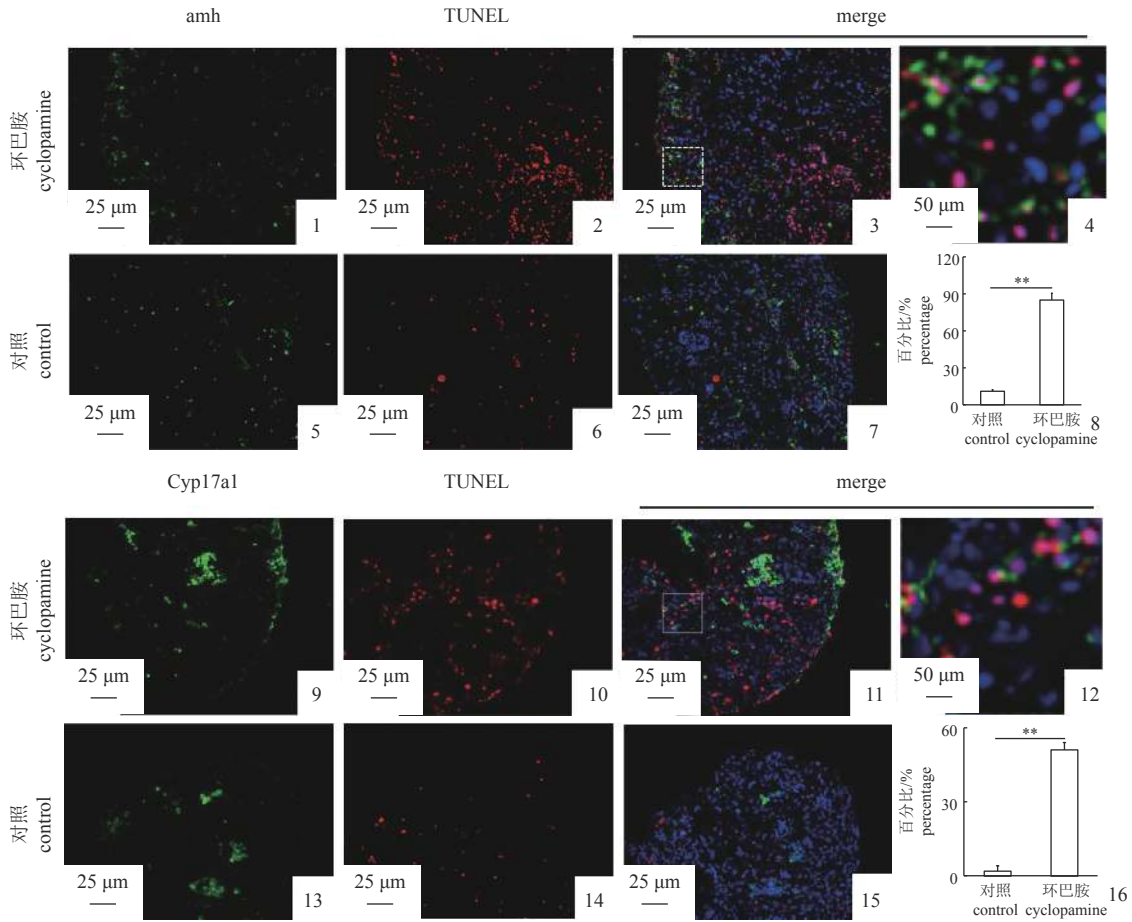
Fig. 5 Percentage of proliferative cells (EdU⁺) among the Vasa⁺ cells

The percentage of Vasa⁺ and EdU⁺ double positive cells in the total number was calculated. The values are given as the mean±SD (n=3). **, very significant difference from the control (P<0.01), the same below.

Asp384、Try394、Glu518、Val386 和 Asn219 等^[7,23]。本实验发现, SAG 和环巴胺结合的关键残基在

Onsmo 中完全保守 (图 2), 提示其可用于 Onsmo 功能的相关研究。

Vasa 属于 DEAD-box 蛋白家族成员, 是包括尼罗罗非鱼在内的多种动物生殖细胞特异性标志分子^[12,24]。Amh 又称缪勒氏管抑制物, 是转化生长因子 β 超家族成员, 已有研究表明, 在尼罗罗非鱼中, 其主要表达于精巢 SC 细胞和卵巢的颗粒细胞^[13]。Cyp17 是类固醇激素生物合成通路中关键的限速酶之一, 在鱼类有 Cyp17a1 和 Cyp17a2, 其中 Cyp17a1 主要表达于成熟 LC 中^[14,25]。在本研究中, 用抗尼罗罗非鱼 Vasa、Amh 和 Cyp17a1 抗体进行染色, 以检测 Smo 信号在精巢组织不同细胞增殖与存活中的作用。结果显示, Smo 激动剂 SAG 处理 90 dah 尼罗罗非鱼精巢组织 48 h, 可显著促进精原细胞增殖, 其抑制剂环巴胺处理可显著促进 SC 或 LC 发生凋亡。该研究结果与在哺乳类如大鼠、小鼠中的研究结果基本相似^[9]。与此不同的是, Mäkelä 等^[26] 研究报道, 环巴胺处理大鼠、小鼠曲细精管可促进生殖细胞发生凋亡, 而在本研究中并未见生殖细胞出现明显凋亡。推测其原因, 一是可能与所取样品的发育时期、体外培养条件、处理时间等有关; 二是可能与物种差异有关。不过, Smo 信号在鱼类精巢细胞分化发育中的作用及其机制, 尚待进一步研究。



图版III TUNEL 法检测环巴胺处理对精巢体细胞存活的影响

1~7 和 9~15 是精巢组织在含 0 或 15 μmol/L 环巴胺中培养 48 h, 然后进行 TUNEL 分别与 Amh、Cyp17a1 的荧光免疫组化共染。凋亡的细胞被 TUNEL (红色) 标记, DAPI 标记细胞核; 8 和 16 是 Amh⁺ 与 Cyp17a1⁺ 细胞中 TUNEL⁺ 细胞的百分比, 其值用平均值±标准差表示 (n=3)。

Plate III Effect of cyclophamine on the survival of somatic cells by TUNEL staining

1-7 and 9-15, testicular tissues were cultured in 5N with 0, 15 μmol/L cyclophamine, respectively. After 48 h incubation, they were detected by TUNEL staining combined with Amh or Cyp17a1. The apoptotic cells were labeled with TUNEL (red) and were counterstained with DAPI (blue). 8 and 16. the percentage of apoptosis cells among Amh⁺ or Cyp17a1⁺ cells, the values are given as the mean±SD (n=3).

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Sasai N, Toriyama M, Kondo T. Hedgehog signal and genetic disorders[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 1103.
 [2] Niewiadomski P, Niedziółka S M, Markiewicz Ł, et al. Gli proteins: Regulation in development and cancer[J]. *Cells*, 2019, 8(2): 147.
 [3] Wang C C, Jing J H, Hu X Y, et al. Gankyrin activates the hedgehog signalling to drive metastasis in osteosarcoma[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(13): 6232-6241.
 [4] Hu A, Song B L. The interplay of Patched, Smoothened

and cholesterol in Hedgehog signaling[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2019, 61: 31-38.

[5] Xiao X, Tang J J, Peng C, et al. Cholesterol modification of smoothened is required for hedgehog signaling[J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(1): 154-162.e10.
 [6] Fan J W, Li H W, Kuang L, et al. Identification of a potent antagonist of smoothened in hedgehog signaling[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 46.
 [7] Sharpe H J, Wang W R, Hannoush R N, et al. Regulation of the oncoprotein Smoothened by small molecules[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(4): 246-255.
 [8] Szczepny A, Hogarth C A, Young J, et al. Identification of hedgehog signaling outcomes in mouse testis develop-

- ment using a hanging drop-culture system[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 80(2): 258-263.
- [9] Yao H H C, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(11): 1433-1440.
- [10] Li X H, Wang Z, Jiang Z M, *et al.* Regulation of seminiferous tubule-associated stem Leydig cells in adult rat testes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(10): 2666-2671.
- [11] Wei J, Fan Z H, Yang Z, *et al.* Leukemia inhibitory factor is essential for the self-renewal of embryonic stem cells from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) through Stat3 signaling[J]. *Stem Cells and Development*, 2018, 27(2): 123-132.
- [12] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation[J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 111(1-2): 167-171.
- [13] Liu X Y, Xiao H S, Jie M M, *et al.* Amh regulate female folliculogenesis and fertility in a dose-dependent manner through Amhr2 in Nile tilapia[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020, 499: 110593.
- [14] Fang X L, Wu L M, Yang L Y, *et al.* Nuclear progesterin receptor (Pgr) knockouts resulted in subfertility in male tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 182: 62-71.
- [15] Zhao Y, Yang Z, Wang Y, *et al.* Both Gfra1a and Gfra1b are involved in the self-renewal and maintenance of spermatogonial stem cells in medaka[J]. *Stem Cells and Development*, 2018, 27(23): 1658-1670.
- [16] Huang Q, Yang Z, Wang J, *et al.* Establishment of a stem Leydig cell line capable of 11-ketotestosterone production[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2020, 32(16): 1271-1281.
- [17] Feng R J, Fang L L, Cheng Y Y, *et al.* Retinoic acid homeostasis through *aldh1a2* and *cyp26a1* mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10131.
- [18] Radhakrishnan A, Rohatgi R, Siebold C. Cholesterol access in cellular membranes controls hedgehog signaling[J]. *Nature Chemical Biology*, 2020, 16(12): 1303-1313.
- [19] Qi X F, Li X C. Mechanistic insights into the generation and transduction of hedgehog signaling[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2020, 45(5): 397-410.
- [20] van den Heuvel M, Ingham P W. *Smoothed* encodes a receptor-like serpentine protein required for *hedgehog* signalling[J]. *Nature*, 1996, 382(6591): 547-551.
- [21] Huangfu D, Anderson K V. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates[J]. *Development*, 2006, 133(1): 3-14.
- [22] Jiang H P, Wang X, Cui X L. Two distinct conformers of SAG investigated by solution NMR and variable-temperature experiments[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 166: 83-89.
- [23] Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Cyclopamine and hedgehog signaling: chemistry, biology, medical perspectives[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(20): 3418-3427.
- [24] Li M Y, Hong N, Xu H Y, *et al.* Medaka *vasa* is required for migration but not survival of primordial germ cells[J]. *Mechanisms of Development*, 2009, 126(5-6): 366-381.
- [25] Shu T T, Zhai G, Pradhan A, *et al.* Zebrafish *cyp17a1* knockout reveals that androgen-mediated signaling is important for male brain sex differentiation[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 295: 113490.
- [26] Mäkelä J A, Saario V, Bourguiba-Hachemi S, *et al.* Hedgehog signalling promotes germ cell survival in the rat testis[J]. *Reproduction*, 2011, 142(5): 711-721.

Identification and expression pattern of Smoothened in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its role in testicular cells

HUANG Qin, ZHANG Zeming, BAI Xiaoming, ZHANG Changle, DAI Xiangyan, TAO Wenjing, ZHOU Linyan, WANG Deshou*, WEI Jing*

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Smoothened (SMO) is a seven-transmembrane protein related to the G protein-coupled receptor and plays a central role as transducer in the Hedgehog (Hh) signaling pathway, which has been demonstrated to play an important role in the differentiation and development of gonadal cells in mammals. However, the role of Smo signaling in fish testis development remains unknown by now. To elucidate the role of Smo signaling in *Oreochromis niloticus* testis, the *O. niloticus smo* (*Onsmo*) cDNA was cloned and characterized. Its expression profile in different tissues was investigated by RT-PCR and in testis by fluorescence in situ hybridization (FISH). After treatment with Smo specific agonist SAG and inhibitor cyclopamine, the proliferation and apoptosis of germ cells and somatic cells in an ex vivo testicular organ culture system were evaluated by EdU incorporation and TUNEL staining, respectively. The full open reading frame of *Onsmo* is 2 478 bp in length, it encodes a putative 825 amino acids protein, including seven transmembrane domains. The identity of amino acid sequence with human SMO is up to 77%. *Onsmo* was expressed in multiple examined tissues including testis. According to FISH results, *Onsmo* in testis was expressed in spermatogonia, spermatocytes, Sertoli cells (SC) and Leydig cells (LC). In the testicular organ culture system, our experimental data show that SAG significantly promoted the proliferation of spermatogonia, whilst cyclopamine significantly promoted the apoptosis of testicular SC and LC. Taken together, our study suggests that Smo signaling plays an important role in the proliferation of spermatogonia and the survival of testicular somatic cells in *O. niloticus*. To our best knowledge, this study firstly reports the role of Smo signaling in fish testicular cells. This study not only enriches our understanding of the role of Smo signaling in fish testicular cells, but also lays an important foundation for further elucidation of its mechanism.

Key words: *Oreochromis niloticus*; Smoothened; testis; EdU incorporation; TUNEL staining; proliferation; survival

Corresponding authors: WANG Deshou. E-mail: wdeshou@swu.edu.cn;

WEI Jing. E-mail: lalsos@swu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32172969, 31972776, 31972778, 32072957); Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX1045)