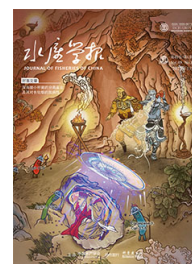


DOI: 10.11964/jfc.20230213894

青鳉精巢 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的细胞表达模式及视黄酸和 11-酮基睾酮对其差异调控作用



屈锡梅^{1,2}, 王园^{1,3}, 赵长乐¹, 刘磊¹, 陶文静¹, 王德寿^{1*}, 魏静^{1*}

1. 西部(重庆)科学城种质创制大科学中心, 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; 2. 成都康诺行生物医药科技有限公司, 四川成都 610219; 3. 贵州宏财聚农投资有限责任公司, 贵州六盘水 553500

摘要:

【目的】探究青鳉胶质细胞源神经营养因子(GDNF)在精巢中的细胞表达模式, 及视黄酸(RA)和11-酮基睾酮(11-KT)对其表达调控作用。

【方法】通过荧光原位杂交(FISH)检测了青鳉 *gdnf* 的2个复制基因(即 *gdnfa* 与 *gdnfb*) 在精巢中的细胞表达模式, 并通过实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)、5'端上游序列转录活性分析等从组织、细胞及分子水平探究了精巢分化发育重要调控因子RA和11-KT对二者的表达调控作用。

【结果】在精巢中, *gdnfa* 主要表达于体细胞, 而 *gdnfb* 除表达于体细胞外, 在生殖细胞中也有明显表达。不同浓度RA和11-KT处理体外培养的青鳉精巢组织及其传代培养体细胞MTS1, 结果表明, 二者均可显著下调 *gdnfa* 的表达, 上调 *gdnfb* 的表达。分别用 *gdnfa* 与 *gdnfb* 不同截短5'端上游序列的荧光素酶报告载体转染MTS1, 结果显示, RA处理可降低 *gdnfa* 的多个截短5'端上游序列荧光素酶活性, 增强 *gdnfb* 的多个截短5'端上游序列荧光素酶活性, 11-KT处理的结果与此基本相似。

【结论】青鳉 *gdnfa* 与 *gdnfb* 在精巢中具有差异的细胞表达模式, 同时二者在组织、细胞及分子水平均受到了RA和11-KT的差异化调控。本研究深化了对鱼类 *gdnf* 的2个复制基因的细胞表达模式及其调控的深入认识, 为其进一步生物学功能研究奠定了重要基础。

关键词: 青鳉; 胶质细胞源神经营养因子; 视黄酸; 11-酮基睾酮; 精巢; 体细胞

第一作者: 屈锡梅, 从事基因调控与功能研究, E-mail: ximeiqu@qq.com



通信作者: 王德寿, 从事鱼类性别分化与性别决定研究, E-mail: wdeshou@swu.edu.cn; 魏静, 从事鱼类干细胞与生殖生理研究, E-mail: lalsos@swu.edu.cn



资助项目: 国家自然科学基金(31972776, 32172969, 31972778, 32172953); 重庆市自然科学基金(cstc2020jcyj-msxmX1045)

收稿日期: 2023-02-01
修回日期: 2023-02-22

文章编号:
1000-0615(2025)01-019105-11
中图分类号: S 917.4
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

胶质细胞源神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 是介导哺乳类精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs) 自我更新与维持的关键因子^[1-4]。在小鼠 (*Mus musculus*) 中, GDNF 主要由精巢 Sertoli 细胞和管周肌样细胞产生^[5-8], 其缺陷可导致精巢内 SSC 不能自我更新, 生殖细胞进行性耗竭, 其过表达可导致精巢曲细精管累积大



量未分化精原细胞, 最终导致不育^[3,9]。在体外普通培养体系中, SSC 只能短暂存活或发生自发分化^[10-11], 而在添加 GDNF 的条件培养基中, SSC 可持续增殖 6 个月以上^[9]。在其他哺乳动物如人 (*Homo sapiens*)、猪 (*Sus scrofa*)、牛 (*Bos taurus*) 的研究同样表明, GDNF 可显著促进 SSC 增殖及干性维持^[12-14]。另一方面, 视黄酸 (retinoic acid, RA) 和雄激素在精巢生殖细胞分化发育过程中具有重要作用, 前者是介导生殖细胞减数分裂起始的关键分子^[15-16], 后者与生殖细胞不同阶段的分化发育密切相关^[17-18]。有研究显示, RA 和雄激素与精巢组织中 GDNF 的周期性表达水平密切相关, 但其具体调控机制如何, 目前仍知之甚少。

在鱼类, *gdnf* 广泛存在于包括青鳉 (*Oryzias latipes*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 及斑马鱼 (*Danio rerio*) 在内的鱼类基因组中, 同时由于鱼类特有的第三轮基因组复制, 其存在复制基因。研究表明, 虹鳟有 3 个 *gdnf* 复制基因, 即 *gdnfa1*、*gdnfa2* 和 *gdnfb*, 其中 *gdnfa1* 与 *gdnfa2* 的细胞表达模式目前未见报道, *gdnfb* 主要表达于 A 型未分化精原细胞, 并且其表达水平的高低与精原细胞的增殖、分化进程密切相关^[19-20]。斑马鱼有 2 个 *gdnf* 复制基因, 即 *gdnfa* 和 *gdnfb*, 其中 *gdnfa* 在生殖细胞中表达, *gdnfb* 的细胞表达模式尚未见报道^[21]。本实验室前期研究表明, 青鳉有 2 个 *gdnf* 复制基因, 即 *gdnfa* 与 *gdnfb*, 二者均表达于精巢, 并且在精原干细胞系 SG3 中具有重要作用^[22]。然而, 青鳉 *gdnfa* 与 *gdnfb* 在精巢中的细胞表达模式如何, RA 及雄激素对其表达调控如何, 目前尚不清楚。基于此, 本研究拟通过荧光原位杂交 (fluorescent *in situ* hybridization, FISH) 检测青鳉 *gdnfa* 与 *gdnfb* 在精巢细胞中的表达模式, 并从组织、细胞与分子水平探究 RA 及鱼类主要雄激素 11-酮基睾酮 (11-ketotestosterone, 11-KT) 对其表达调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青鳉培养于 28 °C 循环水系统, 光照周期为 14 h 光照, 10 h 黑暗, 每天投喂 3 次饵料。本研究获得了西南大学实验动物管理和使用伦

理委员会批准 (No. IACUC-20181015-12), 实验过程中操作人员严格遵守西南大学伦理规范, 并按照西南大学伦理委员会制定的规章制度执行。

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、逆转录试剂盒 PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser、2×*Taq* Mix 酶、DNase I、solution I、pRL-Tk 质粒、pGEM T-easy、pGL3、TB Green Premix Ex *Taq* II、限制性内切酶 *Mlu* I、*Xho* I、*Nhe* I、*Hind* III 均购自 TaKaRa 公司 (日本), RA 购自 MCE 公司 (中国), 地高辛 (DIG) RNA 标记试剂盒购自 Roche 公司 (瑞士), 酪酰胺信号放大试剂盒 (TSA Plus Fluorescence System kits) 购自 NEN Life Science 公司 (美国), 无 RNA 酶的 TURBO™ Dnase 购自 Ambion 公司 (美国), DNA Marker BM2000 购自重庆鼎国生物技术有限责任公司, 通用型 DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒、无内毒素质粒小提中量试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 转染试剂 TransIT-X2 购自 Mirusbio 公司 (美国), DMEM 培养基、亚硒酸钠、丙酮酸钠、青-链霉素、非必需氨基酸、谷氨酰胺、胎牛血清、β-巯基乙醇购自 Gibco 公司 (美国), Hepes(N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司 (美国), 双荧光素酶报告系统 (Dual-luciferase reporter assay system) 购自 Promega 公司 (美国), 大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存菌种。实验所用引物名称及序列见表 1, 引物合成由深圳华大基因股份有限公司完成, 测序由北京擎科生物科技股份有限公司完成。

1.2 实验方法

探针的制备 取 4 月龄雄性青鳉精巢, 使用 RNAiso Plus 进行总 RNA 的提取, 随后使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行逆转录, 合成 cDNA。使用 *gdnfa* 与 *gdnfb* 特异性引物经聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增获得 682 bp 的 *gdnfa* 和 703 bp 的 *gdnfb* 片段, 将回收得到的 *gdnfa* 与 *gdnfb* 片段在 solution I 的作用下与 pGEM T-easy 连接, 测序并扩增得到带有 T7 启动子的 *gdnfa* 与 *gdnfb* 片段, 用地高辛 (DIG) RNA 标记试剂盒合成正义和反义 RNA 探针, 最后用 RNase-free TURBO DNase 处理后 -80 °C

表 1 本研究所用引物信息

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

引物名称 primers name	正向引物(5'→3') forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') reverse primer (5'→3')
<i>Olgdnfa</i>	CTGCTGAGCTCTGTTGCTAC	GATACACCACGTTGTCGTCC
<i>Olgdnfb</i>	GCCTGACCACTTGTTGATTC	CTAGCAGAGTGCTTCCTCAC
M13	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
<i>Olddx4</i>	TCGAGGACGGGATGAAGAC	CGGGCCTCCTGGTAAATCTG
<i>Oldnd</i>	ATCCACGGGATGTCTACGA	GAGGTTTGGCCTAGGTGCTT
<i>Olraraa</i>	CCGCGTTTCTTGGACATTG	ACGTCCACTTTGTCTGCCTC
<i>Olrarya</i>	GAGATGGTGCTTCCCAGAG	GCAAAGGCCAAACACCAGGTC
<i>Olar</i>	CTTACCTTACCACCACCCC	GGATACCACTGTTCCGGACG
<i>Ohwt1a</i>	ACCAGACAGGTTACAGCACA	CCACAGTCGGTGAATCACA
<i>Ohwt1b</i>	CTGAGGAACTACAGCAGTGATAA	TATGAGTCCGAGTGTGAGTCT
<i>Olgdnfa</i> -qPCR	GGAAGACGAAGAGCCACTGTTC	TGCTGATGGTCGCTCGATAA
<i>Olgdnfb</i> -qPCR	CGAGTAACGGAGGATGTGGG	GCCCAGAGCAGTACCTGAAT
<i>Olgdnfa</i> -1871	CGACGCGTGTGCTTTGGCGGCATTATTT	CCCTCGAGTTTAGACTCAGTTCCTATAAAGA
<i>Olgdnfa</i> -516	CGACGCGTGTGCTTTGGCGGCATTATTT	CCCTCGAGCATTCTCCATTCCTGCGTG
<i>Olgdnfa</i> -1370	CGACGCGTAGGGAATGGAGAATGAGATG	CCCTCGAGTTTAGACTCAGTTCCTATAAAGA
<i>Olgdnfa</i> -410	CGACGCGTATACGAGCAGCAAATCCT	CCCTCGAGTTTAGACTCAGTTCCTATAAAGA
<i>Olgdnfa</i> -152	CGACGCGTACAGAATGAATTGGGGTAC	CCCTCGAGTTTAGACTCAGTTCCTATAAAGA
<i>Olgdnfb</i> -2005	CTAGCTAGCTGATGCTAAACTGTGCTTGTGAG	CCCAAGCTTTGTCCACTCCAGTCTGACAGAA
<i>Olgdnfb</i> -471	CTAGCTAGCTGATGCTAAACTGTGCTTGTGAG	CCCAAGCTTCTGTTGCATGGAATGTGCGAG
<i>Olgdnfb</i> -1558	CTAGCTAGCTATCTCGACATTCCATGCAAAC	CCCAAGCTTTGTCCACTCCAGTCTGACAGAA
<i>Olgdnfb</i> -480	CTAGCTAGCTGTTGGAGCCCAAATTGTT	CCCAAGCTTTGTCCACTCCAGTCTGACAGAA
<i>Olgdnfb</i> -196	CTAGCTAGCTATGTGGTGTGTTGTGCGCA	CCCAAGCTTTGTCCACTCCAGTCTGACAGAA
<i>actb2</i>	GGCATCACACCTTCTACAACGA	ACGCTCTGTCAGGATCTTCA

保存备用。

荧光原位杂交 具体方法参见已有文献^[23]。取 4 月龄雄性青鳉精巢，经 4% 多聚甲醛 (PFA) 于 4 °C 过夜固定、乙醇梯度脱水、石蜡包埋、切片，分别用 DIG 标记的正义 (对照) 与反义 RNA 探针 (稀释比例 1 : 3000) 和 TSA Plus Fluorescence Systems 进行 FISH 后，于激光共聚焦显微镜 (FV3000, 奥林巴斯) 下观察拍照。

RA 和 11-KT 处理体外培养的精巢组织

于体式显微镜下无菌取出 4 月龄青鳉的完整精巢组织，1×PBS 洗涤 3 次，每尾鱼的精巢组织放于一个 48 孔细胞培养板的培养孔中，用 ESM2 培养基于 28 °C 进行培养，随机分为 3 个大组，即 RA 处理组、11-KT 处理组及对照 DMSO 组，每组 3 个重复。RA 处理组分为 2 个小组，分别加入 1 和 10 μmol/L RA；11-KT 处理组分为 2 个小组，分别加入 1 和 20 ng/mL 11-KT；对照组加入等量的 DMSO。处理 24 h 后收集样品于 1.5 mL EP 管中，加入 1 mL RNAiso plus，液氮速冻后转移至 -80 °C 保存

备用。

精巢体细胞培养 于体式显微镜下无菌取出 4 月龄雄性青鳉精巢，于 75% 乙醇中消毒 5 s，1×PBS 洗涤 3 次，转移至装有 400 μL 0.25% 胰酶的 1.5 mL 无菌 EP 管中，用解剖剪充分剪碎后于 28 °C 消化 10 min，加入等量 ESM2 培养基终止消化，1 000 r/min 离心 6 min，弃上清液，加入 50 μL ESM2 培养基重悬后转移至 96 孔板中，于 28 °C 恒温培养箱中培养，48 h 后更换新的 ESM2 培养基 100 mL，待细胞长成单层后按常规方法进行传代培养。

RA 和 11-KT 处理精巢传代培养的体细胞

将上述培养细胞均匀铺至 6 孔细胞培养板中，用 ESM2 培养基进行培养，12 h 后更换新的培养基，RA 处理组分别加入 1 和 10 μmol/L RA，11-KT 处理组分别加入 1 和 20 ng/mL 11-KT，对照组加入等量 DMSO，每组 3 个重复，分别处理 0.5、2.0、8.0、16.0 和 24.0 h 后，收集细胞于 1.5 mL EP 管，加入 1 mL RNAiso plus，

液氮速冻后转移至 -80°C 保存。

PCR 上述收集样品提取总 RNA 后, 使用 PrimeScript RT reagent kit with gDNA eraser 试剂盒逆转录为 cDNA。通过 RT-PCR 检测相关分子的表达情况。使用 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒进行 qRT-PCR, 定量检测相关基因的表达情况, 以 *actb2* 作为内参基因, 目的基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算。

不同截短的 *gdnfa* 与 *gdnfb* 5'上游序列荧光素酶报告载体的构建 用双酶 (*Mlu* I 和 *Xho* I) 切法构建不同截短的 *gdnfa* 5'上游序列萤火虫荧光素酶报告载体, 分别命名为 pGL3-*gdnfa*-1 871F、pGL3-*gdnfa*-516R、pGL3-*gdnfa*-1 370F、pGL3-*gdnfa*-410F 和 pGL3-*gdnfa*-152F; 用 *Nhe* I 和 *Hind* III 构建不同截短的 *gdnfb* 5'上游序列萤火虫荧光素酶报告载体, 分别命名为 pGL3-*gdnfb*-2 005F、pGL3-*gdnfb*-471R、pGL3-*gdnfb*-1 558F、pGL3-*gdnfb*-480F 和 pGL3-*gdnfb*-196F。

RA 和 11-KT 对不同截短的 *gdnfa* 与 *gdnfb* 5'上游序列转录活性的影响 将上述精巢组织传代培养体细胞均匀铺至 48 孔细胞培养板中, 用 ESM2 培养基培养 6 h 后, 用 TransIT-X2[®] Dynamic Delivery System 将上述构建的不同截短的 *gdnfa* 与 *gdnfb* 5'上游序列荧光素酶报告载体分别与海肾荧光素酶报告载体 pRL-TK 共转染细胞, 转染 2 h 后, 处理组分别加入 10 $\mu\text{mol/L}$ RA 或 20 ng/mL 11-KT, 对照组加入等量 DMSO, 每组 3 个重复。处理 24 h 后, 用 Dual-luciferase reporter assay system 试剂盒检测细胞的萤火虫荧光素酶活性和海肾荧光素酶活性。相对荧光素酶活性=(处理组萤火虫荧光素酶活性/处理组海肾荧光素酶活性)/(对照组萤火虫荧光素酶活性/对照组海肾荧光素酶活性)。

1.3 数据分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验数据进行单因素方差分析和 *t* 检验分析, 实验中数值采用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示 ($n=3$)。

2 结果

2.1 青鳉 *gdnfa* 与 *gdnfb* 在精巢中的细胞表达模式

分别用 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的正义、反义探针通过 FISH 探究其在成体青鳉精巢中的细胞表达模

式。结果显示, 二者均在成体精巢细胞中有明显表达, 但其细胞表达模式存在明显差异。*gdnfa* 主要表达于体细胞 (图版-1~7), 而 *gdnfb* 除表达于体细胞外, 在生殖细胞如精母细胞中也有明显表达 (图版-8~14)。

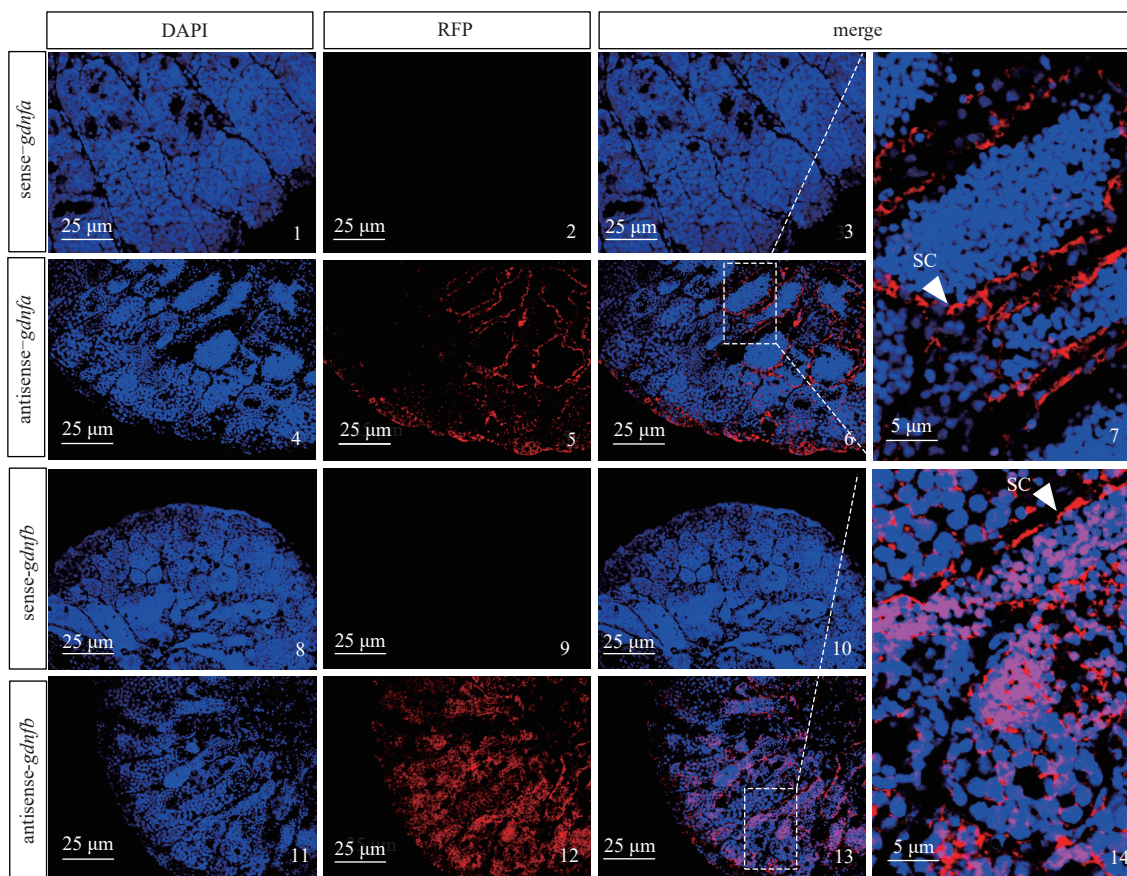
2.2 RA 和 11-KT 对精巢组织中 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的表达调控作用

为探究 RA 和 11-KT 对青鳉 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的调控作用, 用不同浓度 RA 和 11-KT 分别处理离体培养精巢组织 24 h。结果显示, *gdnfa* 的表达受到 RA (10 $\mu\text{mol/L}$) 负调控, 而 *gdnfb* 的表达受到 RA (1 和 10 $\mu\text{mol/L}$) 正调控 (图 1-a); 与之类似, *gdnfa* 的表达受到 11-KT (20 ng/mL) 负调控, 而 *gdnfb* 的表达受到 11-KT (1 和 20 ng/mL) 正调控 (图 1-b)。

2.3 RA 和 11-KT 对精巢体细胞中 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的表达调控作用

为进一步探究 RA 和 11-KT 对精巢组织中 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的调控是细胞水平直接调控还是通过细胞之间的间接调控, 分离培养了青鳉精巢细胞, 并检测了 RA 对传代培养体细胞中 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的表达调控作用。分离培养的精巢组织传代细胞不表达生殖细胞标记分子 *ddx4* 和 *dnd*, 表达 RA 受体基因 (*rar*) 和雄激素受体基因 (*ar*), 同时还表达 *gdnfa*、*gdnfb* 及 *wt1b* (图 2-a~b)。大量研究表明, WT1 是精巢 Sertoli 细胞的标志分子^[24-25]。由此, 实验初步鉴定分离培养的细胞可能为精巢 Sertoli 细胞, 命名为 MTS1。由于该细胞除表达 *rar* 和 *ar* 外, 还同时表达 *gdnfa* 和 *gdnfb*, 因此, 分离培养的 MTS1 是研究 RA 和 11-KT 对 *gdnfa* 与 *gdnfb* 调控的理想细胞模型。

不同浓度 RA 和 11-KT 处理 MTS1 不同时间后, qRT-PCR 检测 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的表达变化情况。结果显示, RA (1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$) 从 0.5 h 起至 24.0 h 可下调 *gdnfa* 的 mRNA 表达 (图 2-c), 但对于 *gdnfb* 的表达调控, 除 1 $\mu\text{mol/L}$ RA 在 0.5 h 上调其 mRNA 表达外, 其他无显著影响 (图 2-e)。与此类似, 11-KT (1 ng/mL 和/或 20 ng/mL) 在 0.5、2.0 和 24.0 h 显著下调 *gdnfa* 的 mRNA 表达 (图 2-d), 而 11-KT (20 ng/mL) 在 0.5 h、8.0 h、16.0 h 和 24.0 h 上调 *gdnfb* 的



图版 青鳞 *gdnfa* (1~3) 与 *gdnfb* (8~10) 在 4 月龄精巢组织中的细胞表达模式

4 月龄青鳞精巢组织切片分别用 *gdnfa*(1~7) 与 *gdnfb* (8~14) 的反义探针进行荧光原位杂交, 信号用红色荧光蛋白 (RFP) 表示, 对照分别用其正义探针进行原位杂交, 细胞核用 DAPI(蓝色) 染色。白色箭头指示体细胞 (SC)。1~3 和 8~10 为对照组, 4~6 和 11~13 为实验组, 7 和 14 为局部放大图。

Plate The cellular mRNA expression patterns of *gdnfa* (1—7) and *gdnfb* (8—10) in a 4-month-old medaka testis

Testis sections of 4-month-old medaka were *in situ* hybridized with the antisense probes of *gdnfa* (1—7) and *gdnfb* (8—14), the signal was represented by red fluorescent protein (RFP), the controls were hybridized with the sense probes, nucleus was stained by DAPI (blue). White arrows indicate somatic cells (SC). 1—3 and 8—10 represents the control group, 4—6 and 11—13 represents the experimental group, 7 and 14 represent a local enlarged image.

mRNA 表达 (图 2-f)。由此表明, *gdnfa* 的 mRNA 表达在细胞水平直接受到 RA 和 11-KT 负调控, 而 *gdnfb* 的 mRNA 表达受到 RA 和 11-KT 正调控。

2.4 RA 和 11-KT 对不同截短 *gdnfa* 与 *gdnfb* 5'上游序列转录活性的影响

为进一步探究 RA 和 11-KT 对 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的调控在分子水平是直接调控还是通过不同分子进行间接调控, 分析了 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的 5'端上游序列, 发现二者均含有多个 RAR、AR 等结合基序, 然后通过双荧光素酶活性分析, 检测了 RA 和 11-KT 对不同截短的 *gdnfa* 与 *gdnfb* 5'上游序列转录活性的影响。

用构建的不同截短的 *gdnfa* 5'上游序列荧光素酶表达载体转染 MTS1, 结果显示, 与对照组空载 pGL3 basic 相比, pGL3-*gdnfa*-1871F、pGL3-*gdnfa*-516R、pGL3-*gdnfa*-1370F、pGL3-*gdnfa*-410F 和 pGL3-*gdnfa*-152F 均具有明显转录活性, 其中 pGL3-*gdnfa*-516R 转录活性最低, 并且 pGL3-*gdnfa*-1370F、pGL3-*gdnfa*-410F 与 pGL3-*gdnfa*-152F 转录活性相当, 从而表明 *gdnfa* 5'上游序列-152~10 bp 具有核心转录调控元件。添加 10 μmol/L RA 培养 24 h 后, 与对照组添加 DMSO 相比, pGL3-*gdnfa*-1370F、pGL3-*gdnfa*-410F 与 pGL3-*gdnfa*-152F 的转录活性明显降低 (图 3-a); 添加 20 ng/mL 11-KT 培养 24 h 后, pGL3-*gdnfa*-1871F 的转录活性显著降低

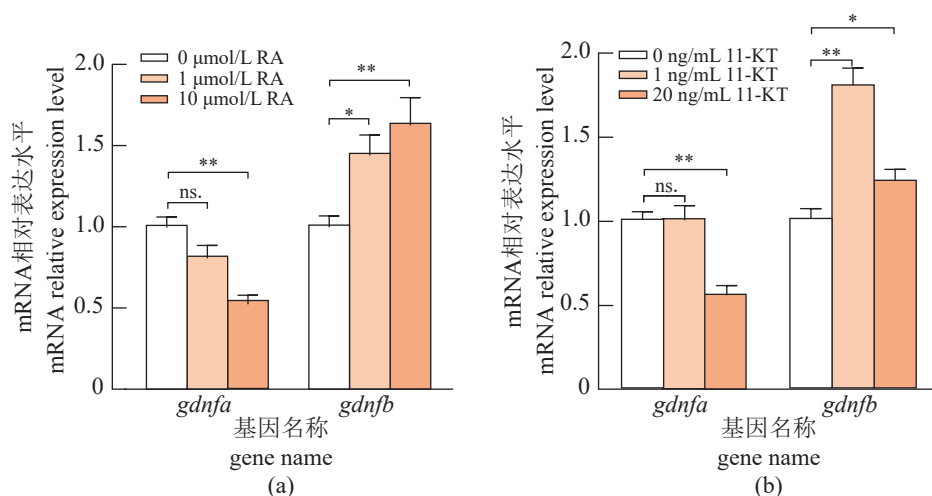


图1 视黄酸 (a) 和 11-酮基睾酮 (b) 在组织水平对 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的表达调控

ns. 与对照组相比差异不显著 ($P>0.05$), *. 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$), **. 与对照组相比差异极显著 ($P<0.01$), 下同。

Fig. 1 Regulation of RA (a) and 11-KT (b) on the expression of *gdnfa* and *gdnfb* at the tissue level

ns. no difference compared with the control group ($P>0.05$), *. significant difference compared with the control group ($P<0.05$), **. extremely significant difference compared with the control group ($P<0.01$), the same below.

(图 3-a)。表明 RA 和 11-KT 可在分子水平负调控 *gdnfa* 的转录表达。

用构建的不同截短的 *gdnfb* 5'上游序列荧光素酶表达载体转染 MTS1, 结果显示, 与对照组空载 pGL3 basic 相比, pGL3-*gdnfb*-196F 转录活性较低, pGL3-*gdnfb*-480F 无转录活性, 表明 *gdnfb* 5'上游序列-480~-196 bp 具有负向调控元件 (图 3-b); 与 pGL3-*gdnfb*-480F 无转录活性相比, pGL3-*gdnfb*-1558F 具有较强转录活性, 表明 *gdnfb* 5'上游序列-1558~-480 bp 具有正向调控元件 (图 3-b)。添加 10 $\mu\text{mol/L}$ RA 培养 24 h 后, 与对照组添加 DMSO 相比, pGL3-*gdnfb*-2005F、pGL3-*gdnfb*-471R、pGL3-*gdnfb*-1558F 和 pGL3-*gdnfb*-196F 的转录活性明显升高 (图 3-b); 添加 20 ng/mL 11-KT 培养 24 h 后, pGL3-*gdnfb*-2005F 和 pGL3-*gdnfb*-1558F 的转录活性明显升高 (图 3-b)。由此表明, RA 和 11-KT 可在分子水平正调控 *gdnfb* 的转录表达。

3 讨论

GDNF 最早在大鼠 (*Rattus norvegicus*) 神经胶质细胞系培养物中被纯化和克隆^[26], 其在哺乳类多个物种 SSC 自我更新和维持中具有重要作用^[3, 12-13, 27]。在哺乳类中, GDNF 主要表达于 Sertoli 细胞与精巢管周肌样细胞^[5-8]; 在鱼类中,

目前已在斑马鱼、虹鳟、青鳉中分离鉴定了其同源分子。与哺乳类不同, 鱼类 *gdnf* 具有复制基因, 目前除有报道显示斑马鱼 *gdnfa*、虹鳟 *gdnfb* 表达于精巢生殖细胞外^[19-21], 其他如斑马鱼 *gdnfb*、虹鳟 *gdnfa1* 与 *gdnfa2*、青鳉 *gdnfa* 与 *gdnfb* 在精巢中的细胞表达模式均未见报道。本研究发现, 青鳉 *gdnfa* 主要表达于精巢体细胞, 而 *gdnfb* 除在体细胞表达外, 在生殖细胞中也有明显表达 (图版)。从而表明, 青鳉 *gdnf* 的 2 个复制基因在精巢的细胞表达模式与哺乳类既有相同, 也存在一定差异。

视黄酸是维生素 A 的活性代谢物, 其在精原细胞分化发育过程中具有重要作用。当 RA 信号被阻断或维生素 A 缺乏时, 小鼠精原细胞不能正常分化^[28-32], 不能起始减数分裂^[33-34]。有研究显示, RA 与小鼠精巢中 *Gdnf* 水平呈负相关, 并能转录抑制其在 Sertoli 细胞中的表达^[35-37]。在本研究中, 在精巢组织 (图 1) 及其培养的体细胞 MTS1 (图 2) 中, RA 可显著抑制 *gdnfa* 的表达而促进 *gdnfb* 的表达, 进一步的 5'上游序列分析表明, *gdnfa* 与 *gdnfb* 的 5'上游序列中均含有多 RAR 结合位点, 双荧光素酶活性分析表明, RA 可直接下调 *gdnfa* 的转录活性、上调 *gdnfb* 的转录活性 (图 3), 这与其在组织和细胞水平的研究结果相吻合。

雄激素是调控精巢细胞分化发育的关键激

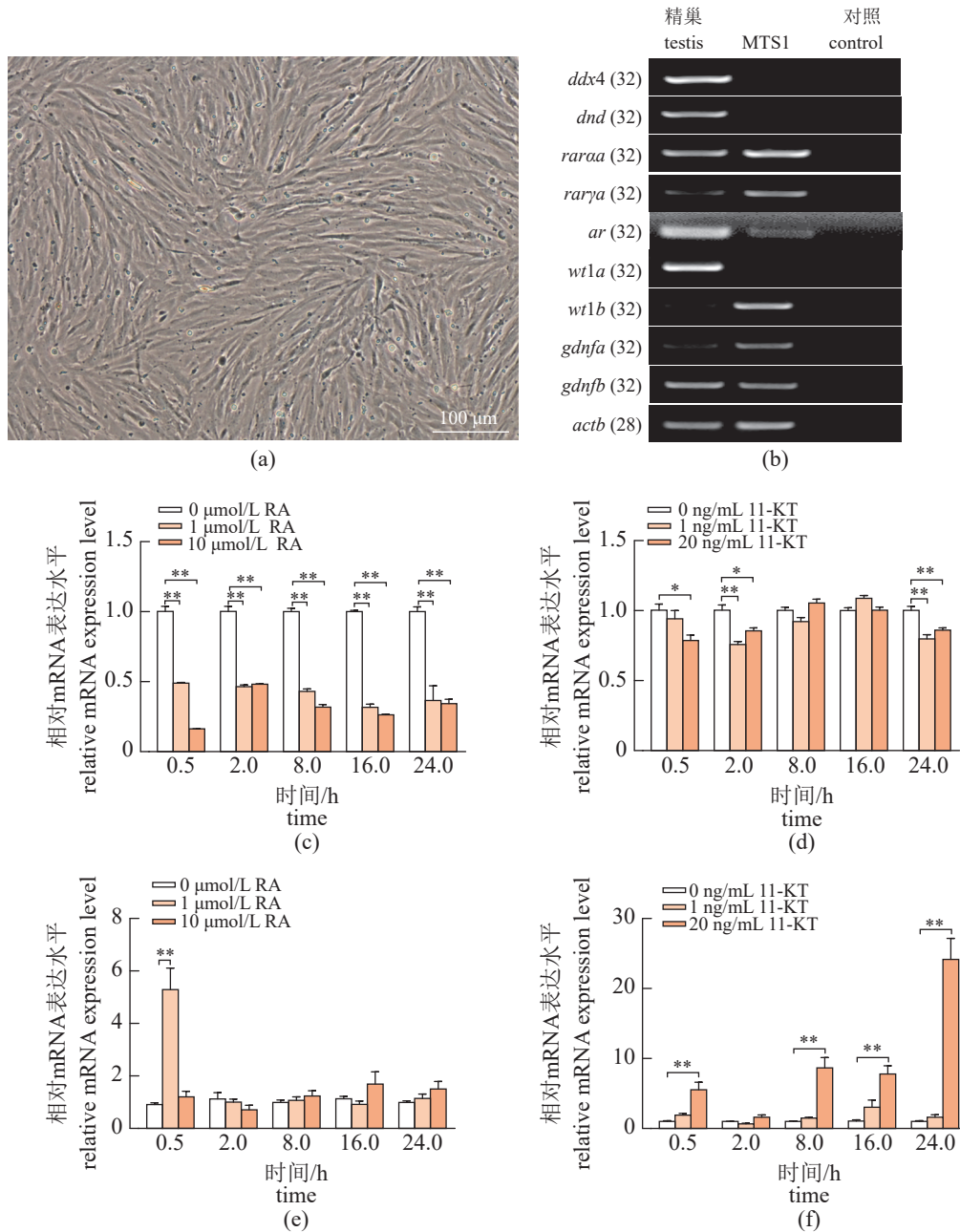


图 2 RA 和 11-KT 在细胞水平对 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的表达调控

(a) 4 月龄青鲮精巢组织中分离培养的细胞 MTS1(第 16 代)。 (b) RT-PCR 检测分离培养细胞的基因表达, 括号中的数字代表 PCR 循环数。 (c) (d) *gdnfa*, (e) (f) *gdnfb*。 (c) (e) RA 在细胞水平对 *gdnfa*、*gdnfb* 的表达调控。 (d) (f) 11-KT 在细胞水平对 *gdnfa*、*gdnfb* 的表达调控。

Fig. 2 Regulation of RA and 11-KT on the expression of *gdnfa* and *gdnfb* at the cellular level

(a) The cells (named as MTS1) were isolated from 4-month-old medaka testis and cultured at the passage of 16. (b) Gene expression of MTS1 by RT-PCR. The number in brackets represents the number of PCR cycles. (c) (d) *gdnfa*, (e) (f) *gdnfb*. (c) (e) The expression of *gdnfa* and *gdnfb* in MTS1 after RA treatment. (d) (f) the expression of *gdnfa* and *gdnfb* in MTS1 after 11-KT treatment.

素之一^[18], 抑制小鼠雄激素受体可导致精子发生异常和生殖细胞凋亡^[38]。目前, 雄激素对 GDNF 的调控作用尚存争议。有研究显示, 雄激素可诱导小鼠管周肌样细胞中 *gdnf* 的表达^[7-8], 而抑制小鼠前列腺发育过程中 *gdnf* 的表达^[39];

此外, 雄激素抑制虹鳟 *gdnfb* 的表达^[40]。在本研究中, 青鲮 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的 5'上游序列中均含有多个 AR 结合位点, 与 RA 相似, 11-KT (鱼类主要雄激素) 在组织(图 1)、细胞(图 2)及分子(图 3)水平均可下调 *gdnfa* 的转录活性、上

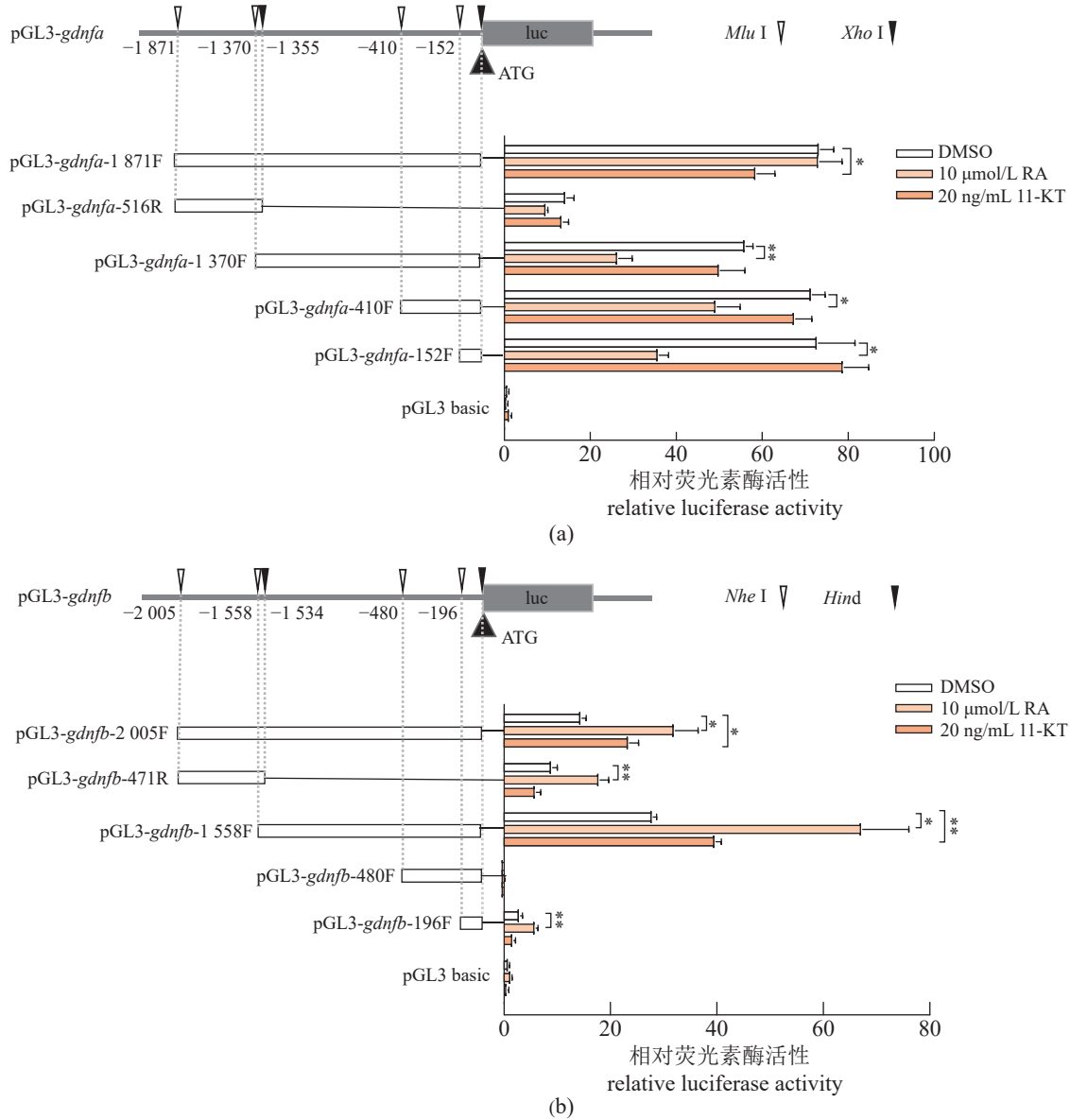


图 3 RA 和 11-KT 在分子水平对 *gdnfa* 与 *gdnfb* 的表达调控

(a) *gdnfa* 的不同截短 5' 上游序列荧光素酶重组载体构建及 RA 和 11-KT 对其转录活性的影响。(b) *gdnfb* 的不同截短 5' 上游序列荧光素酶重组载体构建及 RA 和 11-KT 对其转录活性的影响。

Fig. 3 Regulation of RA and 11-KT on the expression of *gdnfa* and *gdnfb* at the molecular level

(a) Construction of luciferase recombinant vector with different truncated 5' upstream sequence of *gdnfa* and the effect of RA and 11-KT on its transcription activity. (b) Construction of luciferase recombinant vector with different truncated 5' upstream sequence of *gdnfb* and the effect of RA and 11-KT on its transcription activity.

调 *gdnfb* 的转录活性。

综上, 青鳉 *gdnfa* 与 *gdnfb* 在精巢中的细胞表达模式及其对 RA 和 11-KT 的调控应答均存在差异, 其中 *gdnfa* 与哺乳类相似, 表达于精巢体细胞, 并且受到 RA 和 11-KT 负调控, 而 *gdnfb* 与哺乳类存在显著差异, 除表达于体细胞外, 在生殖细胞中也有明显表达, 并且受到 RA 和 11-KT 正调控。提示青鳉 *gdnfa* 与 *gdnfb*

在精巢中的具体生物学功能可能存在一定差异。本研究深化了对鱼类 *gdnf* 的 2 个复制基因的细胞表达模式及其调控的认识, 为其生物学功能的深入研究奠定了基础。

参考文献 (References):

[1] Parker N, Laychur A, Sukwani M, et al. Spermatogonial stem cell numbers are reduced by transient inhibition of GDNF sig-

- naling but restored by self-renewing replication when signaling resumes[J]. *Stem Cell Reports*, 2021, 16(3): 597-609.
- [2] Garcia T X, Hofmann M C. NOTCH signaling in Sertoli cells regulates gonocyte fate[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(16): 2538-2545.
- [3] Meng X J, Lindahl M, Hyvönen M E, *et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF[J]. *Science*, 2000, 287(5457): 1489-1493.
- [4] Takashima S, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, *et al.* Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(3): 489-502.
- [5] Johnston D S, Olivas E, DiCandeloro P, *et al.* Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia[J]. *Biology of Reproduction*, 2011, 85(4): 763-769.
- [6] Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, *et al.* Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway[J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 113(1): 29-39.
- [7] Chen L Y, Brown P R, Willis W B, *et al.* Peritubular myoid cells participate in male mouse spermatogonial stem cell maintenance[J]. *Endocrinology*, 2014, 155(12): 4964-4974.
- [8] Chen L Y, Willis W D, Eddy E M. Targeting the *gdnf* gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(7): 1829-1834.
- [9] Kubota H, Avarbock M R, Brinster R L. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(47): 16489-16494.
- [10] Jeong D, McLean D J, Griswold M D. Long-term culture and transplantation of murine testicular germ cells[J]. *Journal of Andrology*, 2003, 24(5): 661-669.
- [11] Nagano M, Ryu B Y, Brinster C J, *et al.* Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(6): 2207-2214.
- [12] Oatley J M, Reeves J J, McLean D J. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during *in vitro* culture[J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(3): 942-947.
- [13] Guo Y, Hai Y N, Gong Y H, *et al.* Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2014, 229(4): 407-413.
- [14] Kakiuchi K, Taniguchi K, Kubota H. Conserved and non-conserved characteristics of porcine glial cell line-derived neurotrophic factor expressed in the testis[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 7656.
- [15] van Pelt A M M, de Rooij D G. Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice[J]. *Biology of Reproduction*, 1990, 43(3): 363-367.
- [16] Van Pelt A M, De Rooij D G. The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement[J]. *Biology of Reproduction*, 1990, 42(4): 677-682.
- [17] Yu G Q, Zhang D W, Liu W, *et al.* Zebrafish androgen receptor is required for spermatogenesis and maintenance of ovarian function[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(36): 24320-24334.
- [18] Smith L B, Walker W H. The regulation of spermatogenesis by androgens[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014, 30: 2-13.
- [19] Bellaïche J, Goupil A S, Sambroni E, *et al.* *Gdnf-Gfra1* pathway is expressed in a spermatogenetic-dependent manner and is regulated by *fsH* in a fish testis[J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 91(4): 94.
- [20] Nakajima S, Hayashi M, Kouguchi T, *et al.* Expression patterns of *gdnf* and *gfra1* in rainbow trout testis[J]. *Gene Expression Patterns*, 2014, 14(2): 111-120.
- [21] Doretto L B, Butzge A J, Nakajima R T, *et al.* *Gdnf* acts as a germ cell-derived growth factor and regulates the zebrafish germ stem cell niche in autocrine- and paracrine-dependent manners[J]. *Cells*, 2022, 11(8): 1295.
- [22] Wei J, Liu L Y, Fan Z H, *et al.* Identification, prokaryote expression of medaka *gdnfa/b* and their biological activity in a spermatogonial cell line[J]. *Stem Cells and Development*, 2017, 26(3): 197-205.
- [23] 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.
- [24] Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Eslaminejad M B, Sedighi-Gilani M, *et al.* Starvation is more efficient than the washing technique for purification of rat Sertoli cells[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2014, 50(8): 723-730.
- [25] Zheng Q S, Wang X N, Wen Q, *et al.* *Wt1* deficiency causes

- undifferentiated spermatogonia accumulation and meiotic progression disruption in neonatal mice[J]. *Reproduction*, 2014, 147(1): 45-52.
- [26] Lin L F H, Doherty D H, Lile J D, *et al.* GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons[J]. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132.
- [27] Meng X, de Rooij D G, Westerdahl K, *et al.* Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse testis[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(8): 3267-3271.
- [28] van Pelt A M M, de Rooij D G. Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells[J]. *Endocrinology*, 1991, 128(2): 697-704.
- [29] van Pelt A M M, van Dissel-Emiliani F M F, Gaemers I C, *et al.* Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis[J]. *Biology of Reproduction*, 1995, 53(3): 570-578.
- [30] Gaemers I C, Sonneveld E, van Pelt A M M, *et al.* The effect of 9-*cis*-retinoic acid on proliferation and differentiation of a spermatogonia and retinoid receptor gene expression in the vitamin A-deficient mouse testis[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(10): 4269-4276.
- [31] Hogarth C A, Evanoff R, Mitchell D, *et al.* Turning a spermatogenic wave into a tsunami: synchronizing murine spermatogenesis using WIN 18, 446[J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 88(2): 40.
- [32] Evans E, Hogarth C, Mitchell D, *et al.* Riding the spermatogenic wave: profiling gene expression within neonatal germ and sertoli cells during a synchronized initial wave of spermatogenesis in mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2014, 90(5): 108.
- [33] Li H, Palczewski K, Baehr W, *et al.* Vitamin A deficiency results in meiotic failure and accumulation of undifferentiated spermatogonia in prepubertal mouse testis[J]. *Biology of Reproduction*, 2011, 84(2): 336-341.
- [34] Raverdeau M, Gely-Pernot A, Féret B, *et al.* Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(41): 16582-16587.
- [35] Hasegawa K, Namekawa S H, Saga Y. MEK/ERK signaling directly and indirectly contributes to the cyclical self-renewal of spermatogonial stem cells[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(11): 2517-2527.
- [36] Sakai M, Masaki K, Aiba S, *et al.* Expression dynamics of self-renewal factors for spermatogonial stem cells in the mouse testis[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2018, 64(3): 267-275.
- [37] Saracino R, Capponi C, Di Persio S, *et al.* Regulation of *Gdnf* expression by retinoic acid in Sertoli cells[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2020, 87(4): 419-429.
- [38] Li C L, Yang B, Pan P, *et al.* MicroRNA-130a inhibits spermatogenesis by directly targeting androgen receptor in mouse Sertoli cells[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2018, 85(10): 768-777.
- [39] Park H J, Bolton E C. RET-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor signaling inhibits mouse prostate development[J]. *Development*, 2017, 144(12): 2282-2293.
- [40] Maouche A, Curran E, Goupil A S, *et al.* New insights into the evolution, hormonal regulation, and spatiotemporal expression profiles of genes involved in the *Gfra1/Gdnf* and *Kit/Kitlg* regulatory pathways in rainbow trout testis[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(6): 1599-1616.

Differential expression patterns of *gdnfa* and *gdnfb* in the testis of medaka (*Oryzias latipes*) and their regulation by retinoic acid and 11- ketotestosterone

QU Ximei^{1,2}, WANG Yuan^{1,3}, ZHAO Changle¹, LIU Lei¹,
TAO Wenjing¹, WANG Deshou^{1*}, WEI Jing^{1*}

1. Integrative Science Center of Germplasm Creation in Western China (Chongqing) Science City, Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Chengdu Kangnuoxing Biopharmaceutical Technology Co., Ltd., Chengdu 610219, China;
3. Guizhou Hongcai Junong Investment Co., Ltd., Liupanshui 553500, China

Abstract: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a key factor mediating the self-renewal and maintenance of spermatogonial stem cells (SSCs). Our previous research indicated that there were two *gdnf* genes in medaka (*Oryzias latipes*), namely *gdnfa* and *gdnfb*, both of which were expressed in the testis and play important roles in the spermatogonial stem cell line SG3. However, the cellular expression patterns of *gdnfa* and *gdnfb* in the testis, as well as regulation of their expressions by retinoic acid (RA) and androgen, remain unclear. In this study, the cellular expression patterns of medaka *gdnfa* and *gdnfb* in the testis were detected using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Furthermore, the regulation of RA and 11-ketotestosterone (11-KT) on the expression of *gdnfa* and *gdnfb* was investigated at the tissue, cell, and molecular levels through real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and transcriptional activity analyses of their 5' upstream sequences. These results indicated that in medaka testicular sections, *gdnfa* was primarily expressed in somatic cells, while *gdnfb* was expressed in both germ cells and somatic cells. In testicular organ culture and somatic cells MTS1 derived from adult medaka testis, RA and 11-KT at different concentrations significantly down-regulated the expression of *gdnfa*, whereas up-regulated the expression of *gdnfb*. moreover, RA and 11-KT treatment reduced the luciferase activity of different truncated 5' upstream sequences of *gdnfa*, but enhanced the luciferase activity of different truncated 5' upstream sequences of *gdnfb*. Collectively, medaka *gdnfa* and *gdnfb* exhibit differential cellular expression patterns in the testis and are differentially regulated by RA and 11-KT at the tissue, cell, and molecular levels. This study deepens our understanding of the cellular expression patterns and regulation of medaka *gdnfa* and *gdnfb*, and lays an important foundation for further research on their biological functions.

Key words: *Oryzias latipes*; glial cell line-derived neurotrophic factor; retinoic acid; 11-ketotestosterone; testis; somatic cell

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 (31972776, 32172969, 31972778, 32172953); Chongqing Natural Science Foundation (cstc2020jcyj-msxmX1045)