

DOI: 10.12131/20230144

文章编号: 2095-0780-(2023)06-0166-07

• 研究简报 •

中华鳖 *Dkk1* 基因的分子特征及对外源性激素处理的响应

汪泳昌^{1,2}, 祝骏贤², 李建松³, 陈辰², 纪利芹², 洪孝友², 刘晓莉², 王亚坤², 吴聪聪², 余汶君², 罗来福², 陈海港², 魏成清², 朱新平², 张俊杰¹, 李伟²

1. 新疆农业大学生命科学院, 新疆乌鲁木齐 830052

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所/农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东广州 510380

3. 惠州市财兴实业有限公司, 广东惠州 516000

摘要: *Dkk1* 基因在哺乳动物睾丸发育和精子发生过程中扮演着重要角色, 然而其在龟鳖类动物中的研究十分有限。为探索龟鳖类 *Dkk1* 基因的潜在功能和作用机制, 克隆了中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) *Dkk1* 基因的 cDNA 片段, 分析其序列特征、表达模式以及对外源性激素处理的响应。克隆获得的 *Dkk1* 基因 cDNA 序列长度为 823 bp, 其中 3'-非编码区 (UTR) 为 67 bp, 5' UTR 为 90 bp, 开放阅读框为 666 bp, 共编码 222 个氨基酸。中华鳖 *Dkk1* 蛋白是一种稳定性较差、亲水性较强的碱性蛋白, 其二级结构和三级结构主要以 α -螺旋和无规则卷曲为主。氨基酸序列同源性比对结果显示其与中华草龟 (*Chinemys reevesii*) *Dkk1* 蛋白的相似性较高 (81%), 与棱皮龟 (*Dermochelys coriacea*) *Dkk1* 蛋白的同源性较低 (70%)。通过 RT-PCR 和 RT-qPCR 分析发现, 中华鳖 *Dkk1* mRNA 在 3 冬龄成体精巢中极显著性高表达 ($P < 0.001$), 而在其余体组织中几乎不表达。并且随着年龄的增长, 中华鳖精巢中 *Dkk1* 基因的表达量逐渐上升, 并在 3 冬龄时达到顶峰。此外, 17 β -雌二醇 (E_2) 和 17 α -甲基睾酮 (17 α -MT) 处理均可显著抑制成体中华鳖精巢中 *Dkk1* 基因的表达 ($P < 0.05$)。研究表明, *Dkk1* 基因可能在中华鳖睾丸发育和精子发生过程中起着重要作用。

关键词: 中华鳖; *Dkk1* 基因; 睾丸发育; 精子发生; 生物信息学分析; 外源性激素

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Molecular characterization of *Dkk1* gene and its response to exogenous hormone treatment in *Pelodiscus sinensis*

WANG Yongchang^{1,2}, ZHU Junxian², LI Jiansong³, CHEN Chen², JI Liqin², HONG Xiaoyou², LIU Xiaoli², WANG Yakun², WU Congcong², YU Wenjun², LUO Laifu², CHEN Haigang², WEI Chengqing², ZHU Xinping², ZHANG Junjie¹, LI Wei²

1. College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China

2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510380, China

3. Huizhou Wealth Xing Industrial Co., Ltd., Huizhou 516000, China

收稿日期: 2023-07-28; 修回日期: 2023-09-07

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32102792); 广东省农业农村厅种业振兴项目 (2022-SJS-00-00, 2022-SPY-00-015); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2023SJHX1); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (2019KJ150); 中国-东盟海洋合作基金 (CAMC-2018F); 广东省淡水水产种质资源库运行项目 (2022-SBH-00-001); 国家淡水水产种质资源库珠江分库 (FGRC18537)

作者简介: 汪泳昌 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为动物生物学。E-mail: ayongchanga@163.com

通信作者: 张俊杰 (1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为鱼类生物学。E-mail: zhangjuji@sina.cn

李伟 (1984—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: liwei_1984@163.com

Abstract: *Dkk1* gene plays an important role in mammalian testicular development and spermatogenesis, but the research of *Dkk1* gene in turtles is still limited. Therefore, in order to explore its potential function and mechanism of action in turtles, we cloned a cDNA fragment of *Dkk1* gene from Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*), and analyzed its sequence characteristics, expression pattern and response to exogenous hormone treatment. The cDNA of *Dkk1* gene was 823 bp in length, with 3' UTR of 67 bp, 5' UTR of 90 bp, open reading frame of 666 bp, and encoded 222 amino acids in total. *Dkk1* protein is a kind of alkaline protein with poor stability and high hydrophilicity. The secondary and tertiary structures of *Dkk1* protein are mainly dominated by α -helix and irregular coil. Amino acid sequence homology comparison showed high similarity with *Chinemys reevesii* *Dkk1* protein (81%), but low homology with *Dermochelys coriacea* *Dkk1* protein (70%). RT-PCR and RT-qPCR analyses reveal that *Dkk1* mRNA was significantly highly expressed in spermathecae of 3-winter-age *P. sinensis* adults ($P < 0.001$), while it was hardly expressed in the rest of somatic tissues. Moreover, the expression of *Dkk1* gene in *P. sinensis* spermathecae gradually increased with age and peaked at 3-winter-age. In addition, both 17β -estradiol and 17α -methyltestosterone treatments significantly inhibited the expression of *Dkk1* gene in adult *P. sinensis* spermathecae ($P < 0.05$). The results suggest that the *Dkk1* gene might play an important role in the process of testicular development and spermatogenesis in *P. sinensis*.

Keywords: *Pelodiscus sinensis*; *Dkk1* gene; Testicular development; Spermatogenesis; Bioinformatics analysis; Exogenous hormones

Dkk1 (Dickkopf-like 1) 是 Dickkopf (DKK) 基因家族中的一员, 属于分泌型糖蛋白, 最初是在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 中被鉴定为胚胎头部诱导剂和 Wingless (Wnt) 拮抗剂^[1]。已有研究证明 *Dkk1* 可以在脊椎动物的多种细胞类型中抑制 Wnt 诱导的 β -catenin 的稳定性^[2-3]。在小鼠 (*Mus musculus*) 中, *Dkk1* 由单个基因编码, 其表达首先在 2 细胞期和 4 细胞期中检测到^[4], 在胚胎第 15 天时, *Dkk1* 基因在发育中的骨骼和眼睛中表达, 但在性腺原基中不表达。然而在成年小鼠中, *Dkk1* 基因的表达只限于睾丸, *Dkk1* mRNA 在发育中的精母细胞中丰富表达, 首先在发育中的顶体中表达, 然后在成熟精子的顶体中积累^[5]。不仅如此, *Dkk1* 还是一种 N-糖基化蛋白, 在精母细胞成熟过程中参与精子合成^[6], 它标志着发育中的精母细胞和精子细胞, 通过靶向敲除 *Dkk1* 基因, 小鼠胚胎正常发育, 形成可育后代^[7]。但是, *Dkk1* 基因的缺失会导致精子体外受精能力严重受损, 而这种作用在体内受精中似乎得到了某种因素的补偿。此外, *Dkk1* 基因还与人类 (*Homo sapiens*) 的弱精子症^[8] 和不育症^[9] 密切相关。上述研究表明, *Dkk1* 基因在哺乳动物睾丸发育和精子发生过程中扮演着十分重要的角色, 但是目前关于 *Dkk1* 基因在龟鳖类动物中的研究还鲜有报道。

爬行纲在物种进化过程中具有特殊的进化位置, 是第一批真正摆脱水环境依赖而登陆的脊椎动物, 也是羊膜动物中最早的一种, 既能进化为哺乳类, 又能演化为鸟类, 在动物学研究中占有举足轻重的地位^[10]。中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 隶属于爬行纲、龟鳖目、鳖科、中华鳖属, 是我国淡水特种养殖中的重要品种, 因其独特的营养价值^[11]

和药用价值^[12] 而深受市场青睐, 直接经济价值超过百亿。随着年龄的增长, 中华鳖睾丸发育呈现出不同的形态特征, 大致可分为 4 个时期: 精原细胞期、精母细胞期、精子细胞期和精子期。1 冬龄雄性中华鳖精巢中的细胞分散, 曲细精管内主要由精原细胞组成; 2 冬龄曲细精管中的生精上皮除了有精原细胞外, 初级精母细胞也逐渐分化形成; 3 冬龄精巢已具备各种类型的精细胞, 曲细精管腔内出现大量精子^[13-14]。中华鳖的睾丸发育和精子发生受多基因的调控, 例如: Li 等^[15] 发现中华鳖中 *Hmgb2* 基因的表达呈现睾丸特异性, 主要存在于圆形精子细胞和精子中, 证实其在中华鳖的精巢发育和精子生成过程中具有重要功能; Lei 等^[16] 发现 *Spats1* 是一个雄性表达特异的基因, 其主要存在于中华鳖的初级精母细胞、次级精母细胞和精子中, 与中华鳖的精子发生和释放密切相关; Zhou 等^[17] 使用 RNA 干扰技术成功敲除 *Amh* 基因, 证明其在促进中华鳖的睾丸发育和精子发生方面具有必要和充分的作用。然而, 除了关键基因之外, 外源性激素也可以在一定程度上调控睾丸发育和精子发生^[18-19], 且在不同发育时期发挥着不同的作用^[20]。例如: 意大利壁蜥 (*Podarcis sicula*) 在高浓度 17β -雌二醇 (E_2) 和低浓度甲基睾酮 (MT) 中会阻滞精子发生^[21], 而在低浓度 E_2 和高浓度 MT 中可诱导精子发生的恢复^[22]。锯盖鱼 (*Centropomus undecimalis*) 在 15 和 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 MT 下可刺激睾丸的发育和生长并加速精子发生^[23]; 产后 15~30 d 的大鼠暴露于 E_2 下会延迟精子发生^[24]。然而, 近年有关 *Dkk1* 基因的研究十分匮乏, 且现有的研究还远不足以阐明中华鳖精子发生的背后机制。因此本研究克隆了中华鳖 *Dkk1* 基因的 cDNA 序列, 对其序列特征进行详细分析, 探索其在不同体组织和不同

时期性腺中的表达模式, 以及其对外源性激素 [E_2 和 17α -甲基睾酮 (17α -MT)] 处理的响应, 为深入探讨 *Dkk11* 基因在中华鳖睾丸发育和精子发生中的功能研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料的收集

本研究所用中华鳖采购自广东省惠州市财兴实业有限公司, 选取 1、2、3 冬龄健康中华鳖, 麻醉后放血。取 3 冬龄中华鳖的心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、肌肉、卵巢和 1、2、3 冬龄的精巢组织于无酶冻存管中, 并将其迅速放入液氮中速冻, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存, 每种组织均取 3 个生物重复。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

使用 Trizol 法提取中华鳖各组织的总 RNA, 提取 RNA 的浓度和质量由 NanoQTM 核酸检测仪和 1% (w) 琼脂糖凝胶电泳检测。使用 HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 反转录试剂盒 (Vazyme, 中国) 去除基因组 DNA 污染, 合成 cDNA 第一链。

1.3 中华鳖 *Dkk11* cDNA 的克隆

参考 NCBI GenBank 公布的中华鳖 *Dkk11* 基因序列信息 (XM_014572465) 设计引物 Dkk11-F/Dkk11-R (表 1), 以 3 冬龄中华鳖精巢 cDNA 为模板, 将 *Dkk11* 基因的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 区域进行扩增, 并使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。目的片段使用 Gel Extraction Kit (Omega, 中国) 胶回收试剂盒进行回收, 连接至 pMD19-T (TaKaRa, 中国) 载体上, 将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa, 中国) 中。最后, 从转化后的细胞中筛选出阳性克隆, 并送至广州天一辉远基因科技有限公司进行测序。

表 1 中华鳖 *Dkk11* cDNA 克隆和表达分析的引物
Table 1 Primers used for cDNA cloning and expression analysis of *P. sinensis Dkk11*

名称 Name	序列 (5'—3') Sequences (5'—3')	用途 Purpose
Dkk11-F	GGGACAGGGAAGGGAAC	cDNA 克隆
Dkk11-R	GCAAGAAAGACCAAGGAGTAGG	
Dkk11-qF	ATGGCTAGCAGCCTGTGTCT	实时荧光定量和半定量分析
Dkk11-qR	GACCTGGCAAAGAGATGGAG	
EF1 α F	ACTCGTCCAAGTACAAGCCTC	内参基因
EF1 α R	CACGGCGAACATCTTTCACAG	

1.4 *Dkk11* 基因的生物信息学分析

使用 ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) 在线网

站预测开放阅读框^[25], 采用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列的翻译和同源性比较^[26]、ClustalW (BioEdit) 软件进行氨基酸序列的多重比对^[27-28], 通过 ProtParam 分析 *Dkk11* 蛋白的理化性质^[29] 和 SOPMA 分析 *Dkk11* 蛋白二级结构^[30], 利用 SWISS-MODLE 同源建模构建 *Dkk11* 蛋白质三级结构^[31]。

1.5 组织表达分析

运用 Primer 软件设计实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 所需引物 Dkk11-qF/Dkk11-qR, 同时选择中华鳖的 *Ef1 α* 基因作为内参基因^[32] (表 1)。以中华鳖不同组织的 cDNA 作为模板, 利用 Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, 新加坡) 对其进行实时荧光定量 PCR 分析。反应体系为 20 μL , 其中 2 \times iTaq Universal SYBR Green (BIO-RAD, 美国) 10 μL , 引物 Dkk11-qF/Dkk11-qR 各 0.5 μL , cDNA 模板 2 μL , 双蒸水 (ddH₂O) 7 μL 。半定量分析使用与 RT-qPCR 相同的特异性引物 (Dkk11-qF/Dkk11-qR), 采用各组织的 cDNA 作为模板进行普通 PCR (RT-PCR) 扩增。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶分离并进行拍照 (GenoSens2200, 中国)。

1.6 成体雄性中华鳖外源性激素处理

选取体表无伤、活跃的 3 冬龄雄性中华鳖 33 只, 其中 30 只平均分为 2 组 (E_2 处理组和 17α -MT 处理组), 从腿部肌肉注射 E_2 和 17α -MT, 质量浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 剂量为 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[16]; 另外 3 只注射等剂量的溶剂作为空白对照组, 分别于激素处理后第 6、第 12、第 24、第 48 小时和第 7 天随机采集 3 只雄性性腺, 置于液氮中进行总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析。

1.7 数据分析

使用 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 法于第 6、第 12、第 24、第 48 小时计算目的基因的相对表达量^[15], 每个实验至少独立重复 3 次, 所有数据均以“平均值 \pm 标准误 ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)”表示。采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 中华鳖 *Dkk11* 基因克隆结果及其编码蛋白氨基酸序列分析

克隆获得的中华鳖 *Dkk11* cDNA 序列长为 823 bp, 其中 3' 非编码区 (UTR) 长 67 bp, 5' UTR 长 90 bp, ORF 长 666 bp, 共编码 222 个氨基酸 (图 1)。中华鳖 *Dkk11* 蛋白的相对分子质量为 24.924 77 kD, 理论等电点为 10.8, 不稳定系数为 58.71, 脂溶系数为 84.91, 总平均亲水系数为 -0.418 , 表明 *Dkk11* 蛋白是一种稳定性较差、亲水性较强的碱性蛋白质。其二级结构主要由 α -螺旋、 β -折叠、无规则卷曲和延伸链组成, 其中 α -螺旋占 33.78%, β -折叠占

5.86%, 无规则卷曲占 46.85%, 延伸链占 13.51%, 三级结构主要以 α -螺旋和无规则卷曲为主。氨基酸序列同源性比对结果显示: 其与中华草龟 (*Chinemys reevesii*) 的相似性较高 (81%), 与棱皮龟 (*Dermochelys coriacea*) 的相似性较低

(70%), 与绿海龟 (*Chelonia mydas*)、三趾箱龟 (*Terrapene carolina triunguis*)、巴西红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*)、西部锦龟 (*Chinemys picta bellii*) 的同源性分别为 80%、79%、78%、78% (图 2)。

```

1  gggacagggaagggaactggggcagtgaggagctctggggaggacagaaggagatccactctgacgtgATGCGAGCATGCTGGCTGCTGCT
1  M R A C W L L L
91 CTGCGCCCTGGTACGCTGCTGGTGGGGCAAGGGCTCCCTCCTGTCGCCTGCTGCCCGCCGCTGCTGGGCCACTTCCAACGCCTGCT
9  C A L V T L L A G A K G S L L S P A A R R L L G H F Q R L L
181 GGGCGTAGCCGGACAGTTGGGAGAGGGACGCTTTGAGGCCCGCTGATTCAGCAAGCTTCCCCCAACTACCACACTGAGGAGAA
39  G R S R A Q L G E G R F E A P V D F S K L P P N Y H T E E K
271 GGCGCAGCCAGGGTGGGGAATGCCACAGTGTACAGCCACCGCGAGATTAAACAAGGTGACAGACGACCAGACGGGTGCGATGCTGTTCTC
69  A Q R R V G N A T V Y S H R E I N K V T D D Q T G A M L F S
361 TGACAGGATGGTACCTCCATCGAGCGGGACCTGGCAAAGAGATGGAGGGGAAGCCAAGCAGAGTCTAGTGAAGAGGAGCAGGTGGCGG
99  D R M V T S I E R D L A K R W R G S Q A E S S E E G A G G G
451 GGCAGAAGCAGAGCCTGTCGTAGAGAGACGTGTCCTGCCGATCCCACGCCAGGCTCGCCTTCCCTATCATCAACTACCGCGCAGAGC
129  A E A E P V V E R R V L P I P R P R L A F L I I N L P R R A
541 TAGGCCCGAGAAGGCCTCTGATCCAGCTGGTCCGATGGCTCATCCCTTGTGACAGGAGACACAGGCTGTAGCCATCCGGATGGGCT
159  R P E K A S D S S W S D G S S L S D R R H R L L A I R D G L
631 GATGGAAGCCCCCACCCTCTGAAGAAAGCTCCCCCATTACCTGGCCAGACAAAGCTGTAGTAAGGAGGCCCAATTTTCTTCTT
189  M E A P H P L K K A P P I T L A Q H K A V V R R P Q F F F F
721 CTTCAGAAAGCTGTAGcaaatagagagagtgggcagggcagtgagagaggtctgagccacgtgggtggagctgtgtaatcagtcctactcct
219  F R K L
811  tggcttttcttgc

```

ATG. 起始密码子; TGA. 终止密码子。

ATG. Start codon; TGA. Termination codon.

图1 中华鳖 *Dkk1l* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide of *P. sinensis Dkk1l* gene and its encoded protein sequence

2.2 中华鳖 *Dkk1l* 基因的组织表达

RT-qPCR 结果显示, 中华鳖 *Dkk1l* mRNA 在 3 冬龄成体精巢中极显著性高表达 ($P < 0.001$), 而在心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、肌肉和卵巢中几乎不表达 (图 3-a)。RT-PCR 结果显示, 该基因仅在 3 冬龄中华鳖成体精巢组织中检测到目的条带, 而在其他体组织中均未检测到 (图 3-b)。

2.3 中华鳖不同发育时期精巢中 *Dkk1l* 基因的表达变化

通过 RT-qPCR 检测中华鳖 *Dkk1l* 基因在不同发育时期精巢中的表达变化。结果显示, 随着中华鳖年龄的增长, 其精巢中 *Dkk1l* 基因的表达量逐渐上升, 并在 3 冬龄时达到顶峰。此外, *Dkk1l* 基因在 2 冬龄和 3 冬龄精巢中的表达量极显著高于 1 冬龄 ($P < 0.001$), 而 2 冬龄和 3 冬龄精巢之间的表达差异不显著 ($P > 0.05$) (图 4)。

2.4 E_2 和 17α -MT 处理对中华鳖精巢 *Dkk1l* 基因表达的影响

对雄性中华鳖进行 E_2 和 17α -MT 激素处理后, 其精巢中 *Dkk1l* 基因的表达量显著降低 ($P < 0.05$)。 E_2 处理后, 精巢中 *Dkk1l* 基因的表达量持续下降, 至第 48 小时几乎为 0, 但是在 7 d 后得到部分恢复; 17α -MT 处理后, 精巢中 *Dkk1l* 基因的表达量同样受到显著性抑制 ($P < 0.05$), 在第 48 小时达到最低值, 但在第 7 天显著上升 ($P < 0.05$) (图 5)。

3 讨论

本实验通过克隆得到中华鳖 *Dkk1l* 基因的 cDNA 序

列, 序列长 823 bp, 共编码 222 个氨基酸, 氨基酸序列比对和 NJ 进化树结果表明其与爬行类亲缘关系最近。RT-qPCR 和 RT-PCR 结果显示 *Dkk1l* mRNA 在精巢组织中高表达且极显著高于卵巢等其他组织 ($P < 0.001$), 表明 *Dkk1l* 基因表达在中华鳖中具有性别二态性和组织特异性。这与在小鼠和人类中发现的两性差异表达模式类似。*Dkk1l* 基因的组织分布研究表明, *Dkk1l* mRNA 仅在睾丸中表达丰富, 而在附睾和其他组织中几乎不表达。此外, 人类基因芯片结果显示 *Dkk1l* 基因在成年男性睾丸中的杂交信号强度是胎儿睾丸的 405.56 倍, 对人体多个组织的 RT-PCR 分析表明, *Dkk1l* mRNA 仅在睾丸中表达, Western blot 分析也表明 *Dkk1l* 基因主要在睾丸中表达^[5]。综上所述, 推测 *Dkk1l* 基因在中华鳖睾丸形成或功能维持上可能具有重要的调控作用。

同时, 本实验发现, 随着中华鳖年龄的增长, 其精巢中 *Dkk1l* 基因的表达量逐渐上升, 并在 3 冬龄时达到顶峰, *Dkk1l* 基因在中华鳖成体睾丸中的表达与其睾丸发育和精子发生的过程大致吻合。1 冬龄中华鳖的睾丸主要由精原细胞组成; 2 冬龄时逐渐分化为初级精母细胞和次级精母细胞, 并且在生精管中观察到少量精子; 3 冬龄时已经完全性成熟, 睾丸中产生大量成熟精子^[33]。*Dkk1l* 基因这种特殊的表达模式与睾丸发育成熟程度呈正相关, 并且很可能参与了精子发生过程。因此, 在生产实践中通过 *Dkk1l* 基因的相对表达量可预估中华鳖睾丸的发育成熟程度, 这可为选育高繁殖力和优秀的雄性亲本提供新的生物指标。

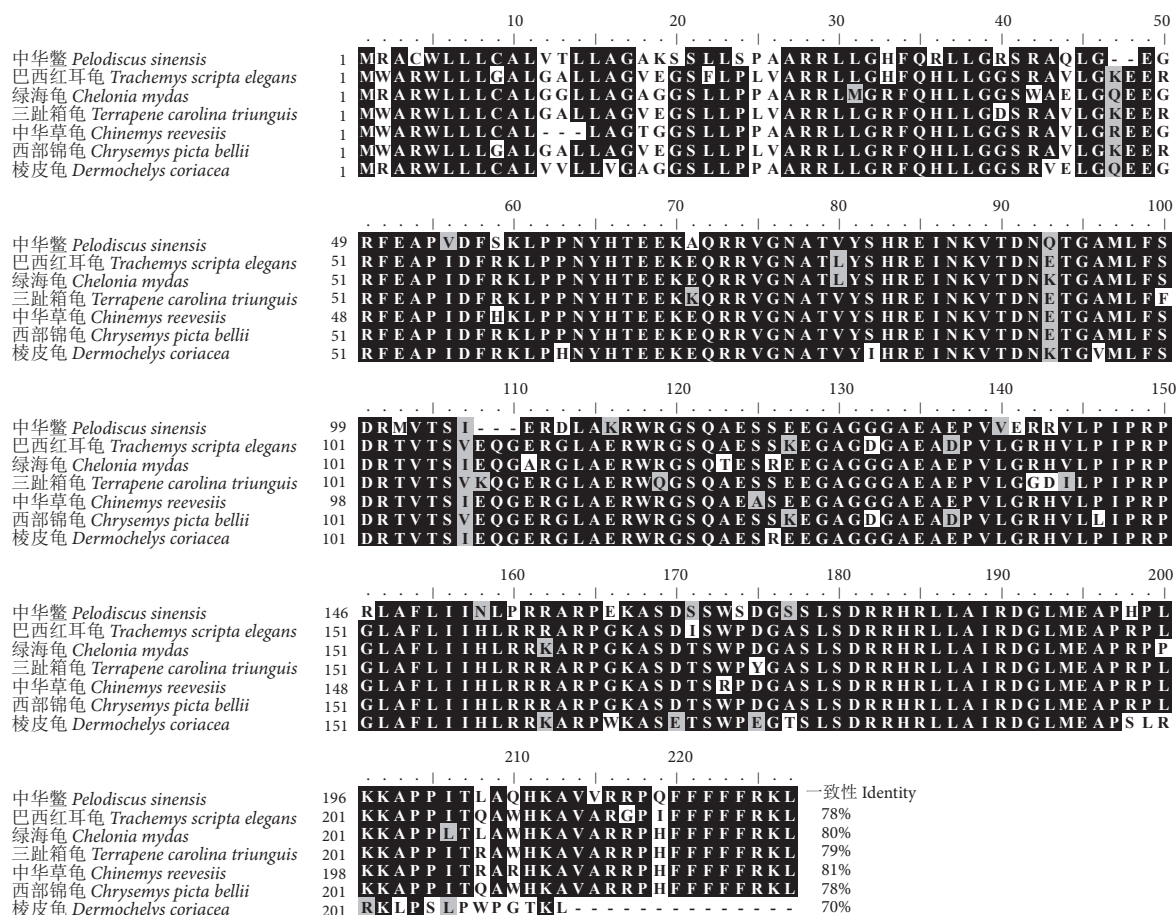


图2 中华鳖与其他物种的 *Dkk1* 氨基酸序列同源相似性比对

注: 所有的氨基酸序列来自于 NCBI 数据库: 巴西红耳龟, XM_034791724.1; 绿海龟, XM_037888484.1; 三趾箱龟, XM_026659251.1; 中华草龟, XM_039510142.1; 西部锦龟, XM_024113109.1; 棱皮龟, XM_038381465.2。黑色阴影为氨基酸序列比对相同的位点, 灰色阴影为相近位点。

Fig. 2 Homologous comparison of *Dkk1* amino acid sequence of *P. sinensis* with other species

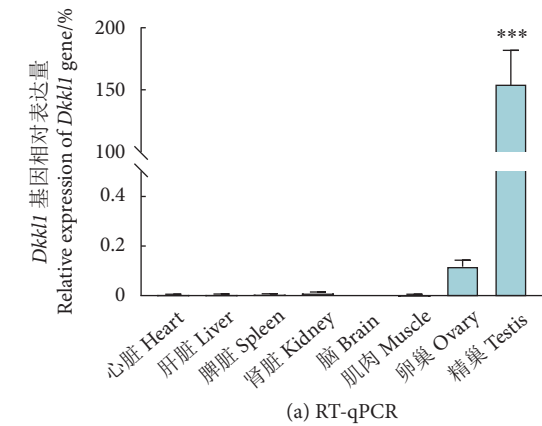
Note: All amino acid sequences come from NCBI database: *T. scripta elegans*, XM_034791724.1; *C. mydas*, XM_037888484.1; *T. carolinatriunguis*, XM_026659251.1; *C. reevesii*, XM_039510142.1; *C. picta bellii*, XM_024113109.1; *D. coriacea*, XM_038381465.2. The black and gray shadows represent the same and similar sites, respectively.

精子发生是雌激素与雄激素共同调节的结果^[34]。E₂ 是一种天然的雌激素^[35], 17 α -MT 是一种具有雄激素效应的内分泌干扰物^[36], 这两种物质已被广泛用于与睾丸发育和精子发生有关的功能研究^[37-38]。本实验通过向雄性中华鳖注射外源性激素 E₂ 和 17 α -MT 后, 发现两者均可显著抑制 *Dkk1* 基因的表达。相比于 17 α -MT, E₂ 对 *Dkk1* 基因的抑制作用更强, 在注射 12 h 后, 其表达量几乎为零。有研究表明, 外源性雌激素可通过影响雌激素受体途径诱导精子发生障碍, 并对精子的质量和受精潜力产生负面影响^[39], 低剂量的 E₂ 可延迟精子产生, 而高剂量的 E₂ 则会完全抑制精子产生^[40]。*Dkk1* 基因在精子发生过程中被定位在成熟的精子或精子的顶体中^[4], 同时还发现 *Dkk1* 基因在小鼠胎盘发育和精子发生过程中表达, 并且具有促进精子穿透透明带的能力, 将其敲除后, 小鼠体外受精能力显著降

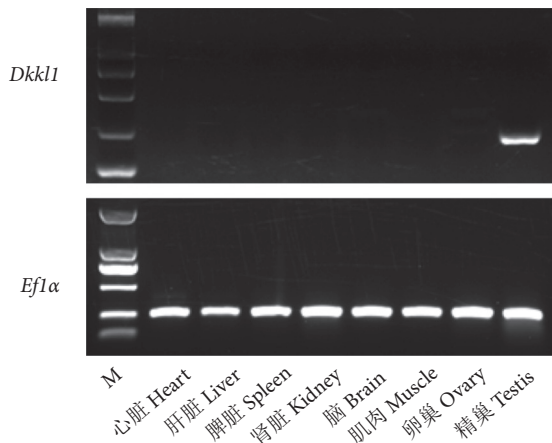
低^[6]。因此, 外源性激素 E₂ 处理可能是抑制 *Dkk1* 基因表达的关键因素。雌、雄激素通过不同的受体途径影响精子发生, 而雄激素大多是通过雄激素特异性受体 AR 介导的^[41]。本实验中, 通过注射外源性激素 17 α -MT 导致 *Dkk1* 基因的表达受到显著抑制。Dakhova 等^[42]发现 *Dkk1* 基因是睾酮产生的负调控因子, 敲除 *Dkk1* 基因导致类固醇生成酶基因 *Cyp11a* 和 *Cyp17* 表达量增加, 使睾酮的合成局部上调。而注射外源性激素 17 α -MT 会导致生物体内睾酮水平瞬间升高^[43], 从而可能抑制中华鳖 *Dkk1* 基因的转录, 以响应体内睾酮水平的升高。

4 结论

本实验通过克隆得到中华鳖 *Dkk1* 基因的 cDNA 片段, 对其进行生物学信息分析, 发现中华鳖在进化关系上



(a) RT-qPCR



(b) RT-PCR

图3 中华鳖 *Dkk1* 基因在 3 冬龄成体组织中的表达情况

注: ***. $P < 0.001$; M. DL2000 Marker.

Fig. 3 Expression of *Dkk1* gene in tissues of 3-winter-age adult *P. sinensis*

Note: ***. $P < 0.001$; M. DL2000 Marker.

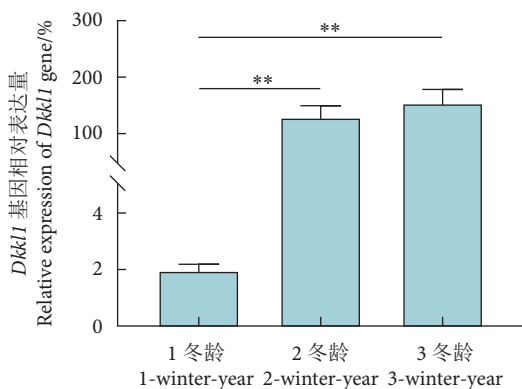


图4 中华鳖 *Dkk1* 基因在不同发育时期精巢中的表达情况
注: **. $P < 0.01$ 表示差异极显著。

Fig. 4 Expression of *P. sinensis Dkk1* gene in different developmental periods of testis

Note: **. $P < 0.01$ represents very significant difference.

与爬行类动物相近。运用 RT-PCR 和 RT-qPCR 对 *Dkk1* 基因在雌、雄中华鳖各组织和精巢不同发育时期的表达差异进行了分析, 确定 *Dkk1* 基因在 3 冬龄成体精巢中显著高

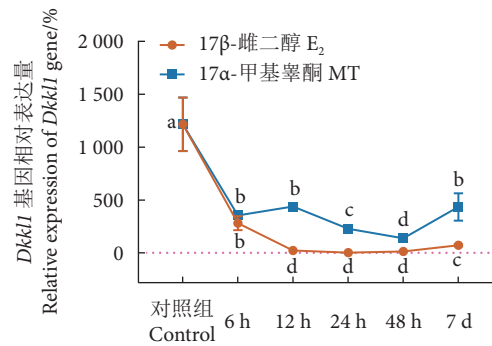


图5 中华鳖精巢中 *Dkk1* 基因对 17β-雌二醇和 17α-甲基睾酮处理后的表达响应

注: 不同小写字母表示组间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Expression response of *Dkk1* gene in testis of *P. sinensis* to E₂ and 17α-MT treatment

Note: Different lowercase letters represent significant differences between groups ($P < 0.05$).

表达, 并且随着年龄的增长其表达量逐渐升高。通过注射外源性激素 E₂ 和 17α-MT, 发现其可显著抑制 *Dkk1* 基因在精巢中的表达。由以上结果可以推论, *Dkk1* 基因在中华鳖睾丸发育和成熟过程中起着重要作用, 可能与精子发生密切相关, 且可受外源性激素调控, 这为今后龟鳖类动物睾丸发育及精子发生机制的研究拓展了新思路。

参考文献:

- [1] GLINKA A, WU W, DELIUS H, et al. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction[J]. Nature, 1998, 391(6665): 357-362.
- [2] HU Y, LIU M Y, XU S W, et al. The clinical significance of Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor gene family in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e927368.
- [3] DOUCET D, BRUBAKER C, TURNER D, et al. Factors affecting the role of canonical Wnt inhibitor Dickkopf-1 in cancer progression[J]. Front Oncol, 2023, 131114822.
- [4] KANEKO K J, DEPAMPHILIS M L. Soggy, a spermatocyte-specific gene, lies 3.8 kb upstream of and antipodal to *TEAD-2*, a transcription factor expressed at the beginning of mouse development[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(20): 3982-3990.
- [5] YAN Q X, WU X P, CHEN C R, et al. Developmental expression and function of *DKKL1/Dkk1* in humans and mice[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2012, 10: 51.
- [6] KOHN M J, SZTEIN J, YAGI R, et al. The acrosomal protein Dickkopf-like 1 (DKKL1) facilitates sperm penetration of the zona pellucida[J]. Fertil Steril, 2010, 93(5): 1533-1537.
- [7] KANEKO K J, KOHN M J, LIU C, et al. The acrosomal protein Dickkopf-like 1 (DKKL1) is not essential for fertility[J]. Fertil Steril, 2010, 93(5): 1526-1532.
- [8] 颜秋霞, 唐爱发, 来永庆, 等. 精子顶体相关基因 *DKKL1* 在正常人和男性不育患者睾丸组织中的表达差异 [J]. 实用医学杂志, 2014, 30(1): 36-39.
- [9] 颜秋霞, 马义, 陈润强, 等. 弱精子症患者精子中 *DKKL1* 的表

- 达[J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(3): 324-328.
- [10] CHEN H, HUANG Y F, LIU T F, et al. Characteristics of seasonal spermatogenesis in the soft-shelled turtle[J]. Anim Reprod Sci, 2020, 214106307.
- [11] 何中央, 张海琪, 周凡, 等. 中华鳖“浙新花鳖”[J]. 中国水产, 2017(3): 80-88.
- [12] YANG Y N, LI C, SONG W, et al. Purification, optimization and physicochemical properties of collagen from soft-shelled turtle calipash[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 89: 344-352.
- [13] 朱道玉, 吴红松. 中华鳖精巢发育的组织学观察[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 10522-10524, 10677.
- [14] 朱道玉. 中华鳖性腺的发生与发育研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(5): 924-930.
- [15] LI W, ZHU J X, LEI L, et al. The seasonal and stage-specific expression patterns of *HMGB2* suggest its key role in spermatogenesis in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. Biochem Genet, 2022, 60(6): 2489-2502.
- [16] LEI L, ZHU J X, CHEN C, et al. Expression and characterization of the *Spats1* gene and its response to E₂/MT treatment in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. Animals, 2022, 12(14): 1858.
- [17] ZHOU Y J, SUN W, CAI H, et al. The role of anti-Müllerian hormone in testis differentiation reveals the significance of the *TGF-β* pathway in reptilian sex determination[J]. Genetics, 2019, 213(4): 1317-1327.
- [18] THIRUMALAI A, PAGE S T. Androgens in male contraception[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2022, 36(5): 101627.
- [19] HESS R A, SHARPE R M, HINTON B T. Estrogens and development of the rete testis, efferent ductules, epididymis and vas deferens[J]. Differentiation, 2021, 118: 41-71.
- [20] DEAN R, MANK J E. The role of sex chromosomes in sexual dimorphism: discordance between molecular and phenotypic data[J]. J Evol Biol, 2014, 27(7): 1443-1453.
- [21] ROSATI L, AGNESE M, DI FIORE M M, et al. P450 aromatase: a key enzyme in the spermatogenesis of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*[J]. J Exp Biol, 2016, 219(15): 2402-2408.
- [22] VERDERAME M, LIMATOLA E, SCUDIERO R. Ectopic synthesis of vitellogenin in testis and epididymis of estrogen-treated lizard *Podarcis sicula*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2016, 235: 57-63.
- [23] PASSINI G, STERZELECKI F C, DE CARVALHO C V A, et al. 17 α -Methyltestosterone implants accelerate spermatogenesis in common snook, *Centropomus undecimalis*, during first sexual maturation[J]. Theriogenology, 2018, 106: 134-140.
- [24] ROUGE M, DROUAULT M, HANOUX V, et al. *Ex vivo* effects of 17 β -estradiol on the prepubertal rat testis[J]. Reprod Toxicol, 2023, 118: 108363.
- [25] ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal[J]. Nucl Acids Res, 2012, 40(W1): W597-W603.
- [26] ZHANG Y, ZHANG Y, XU L, et al. Molecular cloning, tissue expression and polymorphism analysis of the *Caveolin-3* gene in ducks[J]. Brit Poultry Sci, 2021, 62(1): 17-24.
- [27] KOHLI D K, BACHHAWAT A K. CLOURE: Clustal Output Reformatter, a program for reformatting ClustalX/ClustalW outputs for SNP analysis and molecular systematics[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13): 3501-3502.
- [28] CHEN J S, ZHU N Y, KONG L, et al. First case of soft shell disease in Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) associated with *Aeromonas sobria*: *A. veronii* complex[J]. Aquaculture, 2013, 406/407: 62-67.
- [29] HUANG X, LIANG Y, ZHANG R, et al. Genome-wide identification of the *PP2C* gene family and analyses with their expression profiling in response to cold stress in wild sugarcane[J]. Plants (Basel), 2023, 12(13): 2418.
- [30] GEURJON C, DELEAGE G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Bioinformatics, 1995, 11(6): 681-684.
- [31] ANDREW W, MARTINO B, STEFAN B, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucl Acids Res, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [32] 祝骏贤, 陈辰, 刘晓莉, 等. 中华鳖组蛋白 H2A 变体克隆及其在卵母细胞中的表达分析[J]. 水生生物学报, 2021, 45(6): 1207-1213.
- [33] YANG Y F, WU J H, LIN R L, et al. Seasonal spermatogenesis, epididymal storage, and creatine kinase expression in *Pelodiscus sinensis*[J]. Anim Reprod Sci, 2023, 249: 107198.
- [34] di FIORE M, SANTILLO A, FALVO S, et al. Molecular mechanisms elicited by d-aspartate in leydig cells and spermatogonia[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(7): 1127.
- [35] JIANG Y J, LUO H R, HOU M X, et al. Aromatase inhibitor induces sex reversal in the protogynous hermaphroditic rice field eel (*Monopterus albus*)[J]. Aquaculture, 2022, 551: 737960.
- [36] ZHU Q, HAN C, LIU S, et al. Development and gene expression analysis of gonad during 17 α -methyltestosterone-induced sex reversal in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. Aquac Rep, 2022, 23: 101049.
- [37] ASAD F, NAZ S, ALI T, et al. Effect of natural and synthetic androgen hormone on sex reversal of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Braz J Biol, 2023, 84: e272413.
- [38] XU G F, HUANG T Q, GU W, et al. Effects of letrozole and 17 α -methyltestosterone on gonadal development in all-female triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquac Res, 2021, 52(6): 2460-2469.
- [39] STEWART M K, MATTISKE D M, PASK A J. Exogenous oestrogen impacts cell fate decision in the developing gonads: a potential cause of declining human reproductive health[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8377.
- [40] CHAVES-POZO E, LIARTE S, VARGAS-CHACOFF L, et al. 17 β -estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males[J]. Biol Reprod, 2007, 76(1): 142-148.
- [41] WALKER W H. Androgen actions in the testis and the regulation of spermatogenesis[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1288: 175-203.
- [42] DAKHOVA O, O'DAY D, KINET N, et al. Dickkopf-like1 regulates postpubertal spermatocyte apoptosis and testosterone production[J]. Endocrinology, 2009, 150(1): 404-412.
- [43] JUNIOR M Z, NAUFAL M R, SETIAWATI M, et al. The sex ratio and testosterone levels in tilapia immersed in different doses of 17 α -methyltestosterone[J]. J Akuakultur Indonesia, 2017, 16(1): 51-59.