研究论文 · Linn ARTICLE

## 减数分裂期雄性大菱鲆孕激素及受体基因的表达分析

丰程程<sup>1,2,3</sup>, 柳意樊<sup>1,3</sup>, 安 皓<sup>1,2,3</sup>, 徐世宏<sup>1,3</sup>, 王彦丰<sup>1,3</sup>, 宋宗诚<sup>4</sup>, 刘清华<sup>1,3</sup>, 李 军<sup>1,3</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室,山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室,山东 青岛 266237;
4. 山东威海圣航水产科技有限公司,山东 威海 264200)

> 摘要:为研究孕激素在大菱鲆(Scophthalmus maximus)精原细胞增殖到减数分裂过程中的作用,以 6~22 月龄的大菱鲆精巢为材料,通过组织学方法和定量 amh、sycp3 基因确定精原细胞增殖期和减数 分裂期的大菱鲆精巢发育过程。通过酶联免疫吸附技术(ELISA)检测 6~22 月龄雄性大菱鲆血清中的孕 酮(P4)和17a,20β,双羟孕酮(DHP)含量变化,利用 qRT-PCR 技术和原位杂交技术检测孕酮核受体(pgr) 和膜受体(mPRa)在不同组织和不同发育时期的表达情况。结果表明孕激素在精原细胞增殖期高表达, 开始出现初级精母细胞时降低,在精子细胞数量增加时表达量再次升高,在精子细胞变态形成精子时 降低。pgr 在减数分裂初期定位于精巢中的 sertoli 细胞,在精原细胞增殖至减数分裂期表达量逐渐增加, 出现精子后显著降低; mPRa 在精原细胞增殖和初级精母细胞增加时表达量都很低,在精子细胞不断增 加时显著增加。推测在精原细胞增殖和减数分裂阶段孕激素可能主要通过调节 pgr 的表达量来促进精 巢发育,而在减数分裂II 期 pgr 和 mPRa 都发挥作用,在精子细胞变态成熟时,主要是mPRa发挥作用。

关键词: 大菱鲆(Scophthalmus maximus); 减数分裂; 孕激素; pgr; mPRa 中图分类号: Q256 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)08-0091-08 DOI: 10.11759//hykx20170227002

低等脊椎动物中、雌鱼生殖细胞先增殖进入减 数分裂阶段, 而雄鱼处于有丝分裂阻滞, 晚于雌鱼 再进入减数分裂期<sup>[1]</sup>。减数分裂进程一旦出错、精子 发生就会停滞并最终导致不育。因此、确保雄鱼生殖 细胞减数分裂正常进行是鱼类繁殖的必要条件。早 期研究认为、孕激素在雄鱼最后的精子成熟和排放过 程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。但最近的研究表明, 孕激素的 活性成分之一 ——17α, 20β-双羟孕酮(DHP)在鱼类 减数分裂起始阶段必不可少,在日本鳗鲡(Anguilla japonica)、尼罗罗非鱼(Oreochromis niloticus)和斑马 鱼(Danio rerio)中, DHP 诱导精原细胞进入减数分裂 起始阶段<sup>[3-5]</sup>。另外、孕激素的生物活性受孕激素受 体调控,受体主要包括核受体(nPRs)和膜受体(PAQR) 两大类。孕激素与核受体如 pgr(progesterone receptor) 结合后移动到胞核内作为转录因子调节靶基因的转 录、在胞质中还可以激活相关信号通路、共同调节 细胞的增殖和分化<sup>[6-7]</sup>。而膜受体如 mPRa(membrane progestin receptor alpha)mPRa 与孕酮特异性结合, 通过激活G蛋白调控下游的腺苷酸环化酶-环磷酸腺 苷(AC-cAMP)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路

来介导孕酮对精子运动的激活<sup>[8]</sup>。

大菱鲆(Scophthalmus maximus)为原产于欧洲 沿海的冷水性鲆科鱼类,自 1992 年引进中国后,成 为重要海水养殖良种之一,其工厂化养殖取得重大经 济效益,是中国水产养殖业一个新的经济增长点<sup>[9]</sup>。 然而大菱鲆生长期长,精巢发育缓慢,排精量低已

收稿日期: 2017-02-27; 修回日期: 2017-03-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31472264,31572602); 鳌山科 技创新计划资助项目(2015ASKJ02,2015ASKJ02-03-03)资助; 鲆鲽类 产业技术体系项目(nycytx-50); 中国科学院青促会项目(KFJ-EW-STS-060); 国家科技基础条件平台建设运行项目(2016DKA30470)

<sup>[</sup>Foundation: National Science Foundation of China, No. 31472264, 31572602; The Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, No.2015ASKJ02, 2015ASKJ02-03-03; Modern Agro-Industry Technology Research System, No.nycytx-50; Youth Innovation Promotion Association CAS and Chinese Academy of Science and Technology Service Network Planning, No.KFJ-EW-STS-060]; Project from the National Infrastructure of Fishery Germplasm Resource, No.2016DKA30470]]

作者简介: 丰程程(1989-), 女, 博士研究生, 主要从事海水鱼类增养 殖与生物技术研究, 电话: 15610052087, E-mail: fcc19891026@163.com; 李军, 通信作者, E-mail: junli@qdio.ac.cn; 刘清华, 通信作者, E-mail: qinghualiu@qdio.ac.cn

经成为制约产业发展的瓶颈。如何促进精巢中精原 细胞快速增殖并进入减数分裂是确保精子发生正常 进行,提高产精量的必要条件。本实验以 6~22 月龄 的雄性大菱鲆为研究对象,观察大菱鲆精巢从精原 细胞增殖到减数分裂的发育过程。检测大菱鲆血清 中的孕酮(P4)和 DHP 含量变化以及不同时期的精巢 中 pgr 和 mPRα 的时空表达模式。由此推测孕激素及 其受体在精原细胞增殖到减数分裂阶段发挥的作用, 为进一步阐明孕激素及相应受体的相关生理功能提 供理论依据,同时也为深入了解孕激素在鱼类生殖 周期调控中的生物学功能提供重要参考。

1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

实验材料取自山东省威海市圣航水产科技有限 公司和山东省烟台市东方海洋科技股份有限公司, 养殖水温 17℃。取月龄分别为 6 月龄(体质量 17.2 g± 5.5 g)、10 月龄(体质量 54.2 g±10.7 g)、12 月龄(体质 量 119.5 g±19.7 g)、14 月龄(体质量 232.2 g±30.2 g)、 16 月龄(体质量 416.7 g±54.3 g)、20 月龄(体质量 818 g± 69.3 g)、22 月龄(体质量 972.5 g±53.3 g)的成鱼,每个 时期取 5~20 尾。将鱼麻醉后,测量全长、体长、体 质量和性腺质量。尾部静脉抽取血液,4 000 r/min 离 心 10 min 取上清用于激素测定。取组织样品(心、脑、 垂体、肝、肠、胃、肾、脾、肌、鳃、精巢和卵巢)

#### 表1 实验用引物及序列

Tab. 1 Primer sequences for real-time PCR and in-situ hybridization

投入液氮, -80℃保存, 用于后续 RNA 提取。精巢样 品取一半分别固定于波恩氏液和 4%多聚甲醛(PFA) 中, 用于组织学观察和原位杂交。

#### 1.2 血清激素水平测定

所取的不同月龄的雄鱼血清通过 ELISA 方法测 定血清中 P4 和 DHP 的含量(pg/mL)。所用试剂盒为 美国 TSZ 公司的 Fish Progesterone(P)ELISA Kit 和 Fish 17α, 20βOH-PROG ELISA Kit。

#### 1.3 组织学观察

精巢在波恩氏液中固定 22 h, 然后转入 70%乙 醇中保存。固定的样品梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 常规石蜡包埋, 做连续切片, 厚度为 3μm, 苏木精-伊红染色(HE), 显微镜观察(Nikon E200), 并拍照 记录。

#### 1.4 实时荧光定量 PCR

通过荧光定量 PCR 研究 *pgr* 和 *mPRa* 在大菱鲆 成体各组织及不同月龄性腺中的表达模式。选用上 海飞捷总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 根据 Nanodrop 2000 测定的 RNA 浓度, 按照 Takara 反转录试剂盒 说明书合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板, *UBQ* (ubiquitin)和 *Rsp4*(radial spoke protein 4)为内参, 扩 增参数如下: 95°C 30 s; 95°C 10 s, 55°C 30 s 循环 40 圈。 荧光定量引物见表 1。

引物名称	引物序列(5'-3')	引物应用
<i>pgr</i> F	GTGATCTGTAGTGACGAGGCA	荧光定量
pgrR	ATGGCCTTCAACTGCTCTTT	荧光定量
mPRαF	CCCTCACCCAGAGAGTTTGT	荧光定量
mPRaR	CGAACACGTGAAAGATCTGG	荧光定量
amhF	TCCACATTCTCACTCTCGAT	荧光定量
amhR	AGAGTCTCACCATCTCCCTT	荧光定量
<i>sycp3</i> F	GATGAGTCAGCAGTATTCCC	荧光定量
<i>sycp3</i> R	GTCTTCAGCTTCTGGTTCTG	荧光定量
<i>UBQ</i> F	GCGTGGTGGCATCATTGAGC	荧光定量
<i>UBQ</i> R	CTTCTTCTTGCGGCAGTTGACAG	荧光定量
<i>Rsp4</i> F	CAACATCTTCGTCATCGGCAAGG	荧光定量
<i>Rsp4</i> R	ATTGAACCAGCCTCAGTGTTTAGC	荧光定量
pgr-S-F	ATGAGGAGAACGCCTATTTACG	原位杂交
pgr-S-R	CAGAGCATTACAGGCAGTTTGG	原位杂交
<i>mPRα</i> -S-F	AGATACCCAAGTTTGTCCTC	原位杂交
$mPR\alpha$ -S-R	CAACTCTTACTCCTCCTTCTC	原位杂交

#### 1.5 切片原位杂交

用梯度乙醇脱水 4%PFA 固定的精巢样品。透蜡 处理、石蜡包埋切片、切片厚度为 3 μm。切片脱蜡复 水. 4%PFA15 min 固定. PBST 洗涤 3 次. 每次 5 min. 蛋白酶 K(10 µg/mL)37°C 消化 15 min、再用 PBST 洗涤 3次,每次5min。65℃预杂交2h,终质量浓度为1ng/µL 的探针 80℃变性 10 min 后滴加在切片上, 200 uL/片, 封口膜覆盖,65℃孵育过夜。第二天洗涤,室温 2% blocking buffer 封闭 2 h, 荧光抗体孵育过夜。第三 天再洗涤、封闭、地高辛抗体孵育过夜。第四天洗 涤、用 NTMT 稀释 NBT/BCIP 后避光显色、待样品 达到理想色度后,用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min, 终止显色,50%甘油封片,拍照观察。原位探针引物 见表 1、根据设计的引物从精巢 cDNA 中扩增 pgr/ mPR 目的条带、胶回收连接到 PGEM-T easy 载 体、转化到大肠杆菌感受态、挑选阳性克隆测序。选 取含正确插入方向的单克隆,提取质粒,酶切纯化, 用 T7 和 SP6RNA 转录酶分别合成 pgr/mpRα反义和 正义探针。

#### 1.6 统计学处理

激素和基因的表达变化以平均值±标准误差表示,每组数据包括 3 个平行样品。统计学处理使用 spss17.0 进行单因素方差分析 LSD 法,检验水平均 为 *P*<0.05。

#### 2 结果

#### 2.1 组织学观察

通过组织学切片观察大菱鲆 6 月龄~22 月龄的 精巢发育过程。在 6 月龄~10 月龄阶段,大菱鲆精巢 中的生殖细胞全部为精原细胞(图 1a, 1b)。从 12 月龄 开始,随鱼体生长,精巢中逐渐观察到初级精母细 胞(图 1c),之后初级精母细胞占总生殖细胞的比例 逐渐增加。在 16 月龄的精巢中观察到大量的初级精 母细胞和少量精子细胞(图 1e),之后精子细胞的数 量不断增加(图 1f),在 22 月龄时,出现少量精子混 杂在精子细胞中(图 1g)。





50 um

Fig. 1 Characteristics of testis from 6–22 months after hatching in turbot

a. 6 月龄, 精原细胞; b. 10 月龄, 精原细胞; c. 12 月龄, 主要类型为精原细胞和初级精母细胞; d. 14 月龄, 主要类型为精原细胞和初级精 母细胞; e. 16 月龄, 主要类型为初级精母细胞和精子细胞; f. 20 月龄, 主要类型为初级精母细胞和精子细胞; g. 22 月龄, 主要类型为初 级精母细胞, 精子细胞和精子; SG. 精原细胞; PS. 初级精母细胞; ST. 精子细胞; SP. 精子

a. 6 mah, spermatogonia; b. 10 mah, spermatogonia; c. 12 mah, the major types include spermatogonia and primary spermatocytes; d.14 mah, the major types include spermatogonia and primary spermatocytes; e. 16 mah, the major types include primary spermatocytes and spermatids; f. 20 mah, the major types include primary spermatocytes and spermatids; g. 22 mah, the major types include primary spermatocytes, spermatids; and sperm; SG. Spermatogonia; PS. primary spermatocytes; ST. spermatids; SP. sperm

## 研究论文 • Linn → ARTICLE

#### 2.2 激素含量变化

P4和 DHP 在 6 月龄时高表达, 之后在 12~14 月 龄初级精母细胞增加时表达量逐渐降低, 在 14 月龄 时表达量最低,之后在出现大量精子细胞的 16~20 月龄阶段表达量显著升高,随精子细胞变态形成精 子 P4 和 DHP 的表达量再次显著降低(图 2)。





Fig. 2 Serum levels of sex steroids (mean  $\pm$  SEM) in male turbot from 6–22 months after hatching

a. P4; b. DHP; 每组数据为 3 个平行样的平均值土标准差;标注的不同字母表明具有显著性的差异(P < 0.05)

a. progesterone (P4); b. 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one(DHP); the concentrations of steroids levels are represented as means ± SEM of three independent samples; Different letters above histograms indicate significant difference (P < 0.05)

#### 2.3 组织表达模式分析

对 *pgr* 和 *mPRα* 在 10 月龄大菱鲆不同组织中的 表达结果分析显示, *pgr* 在垂体和精巢中表达量显著 高于其他组织,其次是卵巢,在其他组织中的表达 量都非常低(图 3a)。*mPRα* 在脑中表达量显著高于其 他组织。其次是垂体和眼,在其他组织中的表达量都 非常低(图 3b)。

#### 2.4 pgr, mPRa, sycp3, amh 在不同时期性 腺中的表达

pgr在6月龄精原细胞增殖期就已经表达,之后

持续显著上升,在 20 月龄精巢中主要细胞类型为精 子细胞时表达量最高,在 22 月龄出现少量精子时期 显著降低(图 4a)。*mPRα*在 6~14 月龄阶段主要细胞 类型为精原细胞和初级精母细胞时表达量较低,在 16 月龄出现大量初级精母细胞和少量精子细胞时显 著升高,16~22 月龄阶段略有降低,但仍显著高于 6~14 月龄阶段(图 4b)。*sycp3*在 6 月龄就已经开始表 达,之后持续升高,在 16 月龄出现大量初级精母细 胞和少量精子细胞时表达量显著升高,随精子细胞 数量增加,*sycp3* 相对表达量略有下降,在 22 月龄出



图 3 Real-Time PCR 检测在 10 月龄大菱鲆不同组织中 pgr 和 mPRamRNA 的表达

Fig. 3 Results of real-time PCR of the mRNA levels of *pgr* and *mPRα* in various tissues 10 months after hatching in turbot B. 脑; P. 垂体; G. 鳃; H. 心脏; L. 肝脏; S. 脾; K. 肾; ST. 胃; I. 肠; T. 精巢; O. 卵巢; E. 眼; M. 肌肉; SK. 皮肤。实验使用 10 月龄 雄鱼为材料, 设 3 次重复。数值代表 mRNA 的相对表达量。3 次重复数据以平均值±标准差展示。通过单因素方差分析,不同字母表明 具有显著性差异(*P*<0.05)

B. brain; P. pituitary; G. gill: H. heart; L. liver; S. spleen; K. kidney; ST. stomach; I. intestines; T. testis; O. ovary; E. eye; M. muscle; SK. skin; Relative mRNA level represents the mean  $\pm$  SEM of three independent samples. Different letters indicate significant difference of *pgr* and mPRa mRNA levels (P < 0.05)

研究论文 • ┃ □□□□ ARTICLE a h 4.0 а 6, а 3.5 5 mPRa相对表达量 3.0 pgr相对表达量 4 2.5 b b 2.0 3 1.5 2 d 1.0 6 1 0.5 0 0 22 20 6 10 12 14 16 20 6 10 12 14 16 2.2. 月龄 月龄 с d 25 70 60 20 sycp3相对表达量 amh相对表达量 50 15 40 b b 30 10 b b С 20 b c 5 10 0 0 6 10 12 14 22 6 10 12 14 20 22 16 20 16 月龄 月龄

图 4 Real-Time PCR 检测 pgr, mPRa, sycp3 和 amh 在 6~22 月龄性腺中的表达水平 Fig. 4 Real-time PCR analyses of mRNA levels of pgr, mPRa, sycp3, and amh in testis 6-22 months after hatching 相对表达量为 3 个平行样的平均值士标准差。图上标注的不同字母表明具有显著性的差异(P<0.05) Relative mRNA levels are represented as mean ± SEM of multiple independent samples. Different letters indicate significant difference of pgr, mPRa, sycp3, and amh mRNA levels (P < 0.05)

现少量精子时期时表达量最高(图 4c)。*amh*的表达量 从 6 月龄开始持续升高,在 14 月龄出现少量初级精 母细胞时达到最高峰,显著高于其他时期。之后随精 子细胞数量的不断增加,*amh*的表达量显著下降,在 之后的 16~22 月龄阶段持续低表达(图 4d)。

### 2.5 pgr, mPRa 在减数分裂期大菱鲆精巢 上的定位

通过原位杂交技术定位 *pgr* 和 *mPRα* 在 16 月龄 的精巢中的分布,在精巢边缘位置*pgr* 在间质细胞中 表达(图 5b), *mPRα* 没有检测到信号(图 5c)。该位置



图 5 pgr 和 mPRa 在 16 月龄大菱鲆精巢中的定位

Fig. 5 Distribution of pgr and  $mPR\alpha$  transcripts in testis 16 months after hatching by in-situ hybridizaton

SG. 精原细胞; PS. 初级精母细胞; Ser. 间质细胞

SG. Spermatogonia; PS. primary spermatocytes; Ser. sertoli cells

的精巢中主要细胞类型为精原细胞和初级精母细胞 (图 5a)。图 5d 和 5e 分别为 pgr 和 mPRα 的对照组。

3 讨论

低等脊椎动物中, 雌鱼生殖细胞先增殖进入减数分裂阶段, 而雄鱼处于有丝分裂阻滞<sup>[1]</sup>, 如尼罗罗非 鱼雌鱼孵化后 35 d 进入减数分裂 期, 而雄鱼在孵化 后 85 d 进入减数分裂 期; 雌性黑鲷鱼孵化后 120 d 进入减数分裂 期, 而雄鱼在孵化后 150 d 出现少量 进入减数分裂阶段的生殖细胞。减数分裂 期是一 个相当特殊的过程, 包括同源染色体的配对、联会和 同源染色体重组。之后初级精母细胞分裂为两个子 细胞, 重新生成的细胞紧接着发生第二次分裂。

减数分裂进程一旦出错, 精子发生就会停滞并 最终导致不育。通过组织切片观察表明大菱鲆在 6~10 月龄阶段为精原细胞增殖期,大菱鲆精巢中的 生殖细胞类型只有精原细胞、精原细胞不断增殖、 之后在 12~14 月龄阶段逐渐出现初级精母细胞, 表明 精巢从精原细胞增殖期开始进入减数分裂 期。在 16~20月龄阶段、初级精母细胞和精子细胞为主要的 生殖细胞类型、精原细胞仅在精巢边缘存在、表明 精巢开始进入第二次减数分裂阶段。在 22 月龄的精 巢中可以观察到精子细胞占主导地位、并出现少量 精子混杂在精子细胞中。svcp3 基因编码的蛋白主要 表达在初级精母细胞中,是第一次减数分裂偶线期 同源染色体配对过程中联会复合体的主要结构蛋白. 因此可以作为减数分裂 期的标记基因。本实验中、 在6月龄的大菱鲆精巢中 sycp3 已经开始低表达,但 在组织切片中没有观察到精母细胞、虽然此时精巢 中的精原细胞还没有开始减数分裂,但是 sycp3 已经 开始表达, 推测 sycp3 的表达可能开始于精原细胞增 殖期。在 6~14 月龄期间 svcp3 的表达量持续增加、表 明随月龄增加,精巢发育,越来越多的精原细胞发 育成初级精母细胞、这也和组织切片观察到的吻合、 在16和22月龄时高表达、表明虽然在这两个时期主 要细胞类型分别为精子细胞和精子、但在精巢边缘 仍有精原细胞源源不断的发育成初级精母细胞。amh 在 6~14 月龄阶段持续升高, 在之后的 16~22 月龄阶段 显著降低。由此表明、amh 在大菱鲆精原细胞增殖期和 减数分裂起始阶段显著高表达,在进入减数分裂 期 后表达量显著降低。推测 amh 促进精原细胞增殖并发 育成初级精母细胞、而精子细胞和精子对 amh 的表达 起抑制作用。amh (Anti-Mullerianhormone)是一类以多

肽形式存在的细胞生长因子、是转化生长因子 P 超 家族(TGF-P)的分泌型糖蛋白。哺乳动物睾丸 sertoli 细胞分泌的 amh 引起缪勒氏管退化。虽然硬骨鱼类 并不存在缪勒氏管、但是仍存在 amh 基因的表达。 在银汉鱼(Atherina)和尼罗罗非鱼中认为 amh 是雄性 性别决定的必要基因<sup>[10-11]</sup>。本实验研究结果与半滑 舌鳎(Cynoglossus semilaevis)上的研究结果类似, 在 半滑舌鳎中, amh 在孵化后 70 d 之前表达量低, 在 70 d 时达到最高峰, 而在 8 月龄生精期 amh 的表达量下 降<sup>[12]</sup>。同样,在青鳉(Oryzias latipes)和日本牙鲆 (Paralichthys olivaceus)中, amh 主要在未成熟的精巢 中表达,在精子发生前停止表达,如果 amh 持续表 达则会抑制精子发生过程<sup>[13-14]</sup>。在尼罗罗非鱼鱼中. amh 在 5~180 日龄的精巢的 sertoli 细胞和叶边细胞 中持续高表达。敲除银汉鱼和尼罗罗非鱼中 amh 位于 Y 染色体上的复制基因 amhy, 会导致雄性 XY 型胚胎 个体朝卵巢方向发育<sup>[10-11]</sup>。另外, amh 是 sertoli 细胞 的起源基因<sup>[15]</sup>,大菱鲆 amh 的表达量在 14 月龄后显 著降低, 也表明在进入减数分裂后, sertoli 细胞占精 巢总细胞的比例显著降低。

早期关于孕激素对硬骨鱼精子发生的研究主要 集中在促进精子成熟排精和提高精子活力方面<sup>[2]</sup>、 对孕激素通过孕酮受体对精原细胞增殖至减数分裂 阶段的调节机制研究的较少。目前在硬骨鱼中得到 两种具有生物活性的孕激素: 17α,20β-双羟孕酮 (DHP)和 17α,20β-21-三羟孕酮(20β-s),而在已报到的 硬骨鱼减数分裂起始阶段起作用的都是 DHP<sup>[16-17]</sup>。 本实验中, P4 和 DHP 水平在精原细胞增殖期显著高 于减数分裂 期。这和在斑马鱼、大西洋鲑(Atlantic salmon)和大西洋鳕鱼(Atlantic cod)中 DHP 水平在减 数分裂起始阶段增高的结果相似<sup>[5, 18-19]</sup>。用 DHP 体 内处理斑马鱼、诱导早期精原细胞增殖分化成后期 的精原细胞和精母细胞<sup>[15]</sup>。另外 DHP 体外处理日本 鳗鲡(Anguilla japonica)精巢会刺激精原细胞 DNA 复 制和减数分裂起始<sup>[3]</sup>。这些都说明 DHP 参与于早期 精子发生的调节过程。因此推测在大菱鲆中 P4 和 DHP 促进精原细胞增殖和减数分裂起始。另外在减 数分裂 期, P4 和 DHP 的表达量再次显著升高, 这 和在鲑科(Salmonidae)鱼类的研究中相似<sup>[2, 20]</sup>、因此 推测 P4 和 DHP 在大菱鲆中促进精子细胞变态成熟。

在斑马鱼、尼罗罗非鱼、大西洋鳕鱼等鱼中已 证明 DHP 是 *pgr* 的天然配体<sup>[4, 6, 19]</sup>。在斑马鱼中 DHP 也可以和 *mPRα* 特异结合<sup>[21]</sup>。本实验中, *pgr* 的表达

研究论文 • ∭ ARTICLE

量在 10 月龄时就开始显著升高、之后持续升高、至 20 月龄达到最高峰后显著下降。表明 pgr 从精原细 胞增殖期就开始显著增加,之后表达量持续升高, 直至精巢进入精子细胞变态成熟期、才显著降低。推 测 pgr 促进精原细胞增殖和减数分裂。之前在斑马 鱼、尼罗罗非鱼、日本鳗鲡中的研究结果表明、pgr 仅在生殖细胞减数分裂启动的关键时期出现显著上 升<sup>[3-4, 6]</sup>,本实验结果延长了 pgr 发挥作用的时期,推 测孕激素通过调节 pgr 基因表达量促进精原细胞增 殖和减数分裂两个阶段。本实验中大菱鲆精巢中 mPRα 的表达量在 6~14 月龄阶段较低, 之后显著升 高, 表明 mPRα 在精原细胞增殖期和减数分裂 期表 达量低,在减数分裂 期细胞类型主要为精子细胞和 精子时, mPRa 的表达量显著升高。之前的研究主要 集中在 mPRa 在精子上的表达和作用<sup>[22]</sup>, 在减数分 裂期精巢中的表达还没有研究。本实验定量 mPRa 在 大菱鲆不同时期精巢中的表达水平, 推测 mPRa 在精 子发生早期不发挥作用,在减数分裂 期和精子变态 成熟阶段作为主要的孕酮受体发挥重要作用。

定位结果表明, 在精巢中的生殖细胞类型主要 为精原细胞和初级精母细胞时, *pgr* 在 sertoli 细胞上表 达, 这和尼罗罗非鱼上的结果相似<sup>[4]</sup>。而 *mPRa* 没有明 显信号, 结合荧光定量结果推测可能是由于这个阶段 *mPRa* 的表达量很低, 所以没有检测到明显信号。

#### 参考文献:

- Lau E L, Lee M F, Chang C F, et al. Conserved sex-specific timing of meiotic initiation during sex differentiation in the protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Biol Reprod, 2013, 88(6): 1-13.
- [2] Scott A P, Sumpter J P, Stacey N, et al. The role of the maturation-inducing steroid, 17, 20beta-dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review[J]. J Fish Biol, 2010, 76(1): 183-224.
- [3] Higuchi M, Miura C, Iwai T, et al. Trypsin regulates meiotic initiation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) by promoting the uptake of taurine into germ cells during spermatogenesis[J]. Biol Reprod, 2013, 89(3): 1-9, 58.
- [4] Liu G, Luo F, Song Q, et al. Blocking of progestin action disrupts spermatogenesis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. J Mol Endocrinol, 2014, 53(1): 57-70.
- [5] Chen S X, Bogerd J, Schoonen E, et al. A progestin (17alpha, 20beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish[J]. Gen Comp Endocrinol, 2013, 185: 1-9.

- [6] Chen S X, Bogerd J, García-López A, et al. Molecular cloning and functional characterization of a zebrafish nuclear progesterone receptor[J]. Biol Reprod, 2010, 82(1): 171-181.
- [7] 张瑞, 阙华勇, 张国范, 等.海湾扇贝维甲酸受体\_RXR\_ cDNA 克隆与表达分析[J]. 海洋科学, 2016, 40(9): 1-8.
  Zhang Rui, Que Huayong, Zhang Guofan, et al. Mo-

lecular cloning and expression of the retinoid X receptor gene in *Argopecten irradians*[J]. Marine Sciences, 2016, 40(9): 1-8.

- [8] Salazar M. Progestin-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors[J]. Gene, 2016, 591(1): 6-13.
- [9] 郭佳伟, 谭训刚, 尤锋, 等. 大菱鲆周期蛋白依赖激 酶基因 cdk1、cdk6 克隆及表达分析[J]. 海洋科学, 2016, 40(4): 11-21.
  Guo Jiawei, Tan Xungang, You Feng, et al. Cloning and expression analysis of cdk1 and cdk6 in *Scophthalmus maximus*[J]. Marine Sciences, 2016, 40(4): 11-21.
- [10] Hattori R S, Murai Y, Oura M, et al. A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(8): 2955-2959.
- [11] Li M, Sun Y, Zhao J, et al. A tandem duplicate of anti-mullerian hormone with a missense SNP on the Y chromosome is essential for male sex determination in nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. PLoS Genet, 2015, 11(11): 1-23.
- [12] Liu S, Sun B, Liang Z, et al. Cloning and expression of anti-mullerian hormone gene in halfsmooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 35-43.
- [13] Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, et al. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 322(2): 508-513.
- [14] Shiraishi E, Yoshinaga N, Miura T, et al.Mullerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*)[J]. Endocrinology, 2008, 149(4): 1813-1819.
- [15] Liang Y Q, Huang G, Ying G, et al. The effects of progesterone on transcriptional expression profiles of genes associated with hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes during the early development of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Chemosphere, 2015, 128: 199-206.



- [16] Miura T, Higuchi M, Ozaki Y, et al. Progestin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenetic cells of the eel[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(19): 7333-7338.
- [17] Tubbs C, Tan W, Shi B, et al. Identification of 17, 20beta, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20beta-S) receptor binding and membrane progestin receptor alpha on southern flounder sperm (*Paralichthys lethostigma*) and their likely role in 20beta-S stimulation of sperm hypermotility[J]. Gen Comp Endocrinol, 2011, 170(3): 629-639.
- [18] Chen S X, Jan B, Eva A, et al. Cloning, pharmacological characterization, and expression analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) nuclear progesterone receptor[J]. Reproduction, 2011, 141(4): 491-500.
- [19] Chen S X, Fernanda A, Eva A, et al. Cloning, pharmacological characterization and expression analysis of

Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) nuclear progesterone receptor[J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 179(1): 71-77.

- [20] Milla S, Terrien X, Sturm A, et al. Plasma 11-deoxycorticosterone (DOC) and mineralocorticoid receptor testicular expression during rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermiation: implication with 17alpha, 20betadihydroxyprogesterone on the milt fluidity?[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2008, 6: 19.
- [21] Hanna R N, Zhu Y. Expression of membrane progestin receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary[J]. Gen Comp Endocrinol, 2009, 161(1): 153-157.
- [22] Tan W, Aizen J, Thomas P. Membrane progestin receptor alpha mediates progestin-induced sperm hypermotility and increased fertilization success in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2014, 200: 18-26.

## Progestin actions and expression analysis of progestin receptors in the meiotic in male turbot (*Scophthalmus maximus*)

# FENG Cheng-cheng<sup>1, 2, 3</sup>, LIU Yi-fan<sup>1, 3</sup>, AN Hao<sup>1, 2, 3</sup>, XU Shi-hong<sup>1, 3</sup>, WANG Yan-feng<sup>1, 3</sup>, SONG Zong-cheng<sup>4</sup>, LIU Qing-hua<sup>1, 3</sup>, LI Jun<sup>1, 3</sup>

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 4. Weihai Shenghang Aquatic Science and Technology Co., LTD, Weihai 264200, China)

**Received:** Feb. 27, 2017 **Key words:** *Scophthalmus maximus*; meiosis; progestin; *pgr*; *mPRα* 

**Abstract:** To explore the function of progestin during spermatogonial proliferation and meiosis, we used histological methods to investigate the gonadal development process of the male turbot (*Scophthalmus maximus*) 6 to 22 months of age. We detected the expression of *amh* and *sycp3* via the real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Using enzyme-linked immunosorbent (ELISA) technology, qRT-PCR, and in-situ hybridization, we detected the serum P4 and DHP levels and the expression patterns of the nuclear progesterone receptor (*pgr*) and membrane progestin receptor alpha (*mPRa*) during different development periods. The results reveal that the P4 and DHP levels were high during spermatogonial proliferation and meiosis II. The *pgr* expression was high from spermatogonial proliferation to meiosis I, whereas the *mPRa* expression was high during meiosis and spermiogenesis. Our in-situ hybridization results indicate *pgr* mRNA to be predominantly located in the Sertoli cells that were in contact with the proliferating spermatogonia and primary spermatocyte and that the *mPRa* mRNA was undetectable. Taken together, our data indicate the *pgr* expression to be involved in mediating the progestin stimulation of spermatogonia proliferation and meiosis is, whereas the *mPRa* plays an important role in meiosis