

三角帆蚌 *17β-HSD11* 基因的表达特征及 17β -雌二醇对其表达的影响

上官宵兆, 刘美玲, 毛颖睿, 王晓强, 王雅昱, 汪桂玲, 李家乐

Expression analysis of *17β-HSD11* gene in *Hyriopsis cumingii* and effect of 17β -estradiol on its expression

SHANGGUAN Xiaozhao, LIU Meiling, MAO Yingrui, WANG Xiaoqiang, WANG Yayu, WANG Guiling, LI Jiale

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20211103629>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[三角帆蚌中 *WNT4* 基因克隆及表达分析](#)

Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

[三角帆蚌 *KLHL10* 基因的特征和表达分析](#)

Characterization and expression analysis of *KLHL10* gene in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 389 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200402983>

[三角帆蚌 *cyclin B* 基因克隆及功能](#)

Expression and function of *cyclin B* gene in *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 496 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190402584>

[卵胎生许氏平 *Sox9* 基因的克隆、启动子分析、表达及其细胞定位研究](#)

Cloning, promoter analysis, expression and cell localization of *Sox9* gene in an ovoviparous teleost, black rockfish *Sebastes schlegeli*

上海海洋大学学报. 2020, 35(5): 671 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-277>

[三角帆蚌 *IGF2* 基因的亚细胞定位及重组蛋白促体外细胞活性分析](#)

Subcellular localization of *IGF2* gene and analysis of recombinant protein to promote *in vitro* cellular activity in *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2022, 31(6): 1335 <https://doi.org/10.12024/jsou.20220603891>

文章编号: 1674-5566(2023)01-0001-09

DOI:10.12024/jsou.20211103629

三角帆蚌 *17β-HSD11* 基因的表达特征及 17β -雌二醇对其表达的影响

上官宵兆¹, 刘美玲¹, 毛颖睿¹, 王晓强¹, 王雅昱¹, 汪桂玲^{1,2,3}, 李家乐^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 通过 RACE 技术、实时荧光定量 (qRT-PCR) 技术、原位杂交和 17β -雌二醇注射来探究 *17β-HSD11* 基因在三角帆蚌性腺发育和性激素合成中的表达特性和作用。结果显示:*17β-HSD11* 基因的 cDNA 全长为 1 134 bp, 其中, 5' UTR 40 bp, 开放阅读框 (ORF) 923 bp, 3' UTR 171 bp, 编码 307 个氨基酸。*17β-HSD11* 基因在胰腺、性腺中表达量较高, 且卵巢极显著高于精巢。原位杂交结果显示雌性三角帆蚌卵母细胞、滤泡膜和卵膜上均存在杂交信号。注射不同质量浓度 17β -雌二醇之后发现 *17β-HSD11* 基因在雌雄性腺中的相对表达量均被抑制, 其中: 低质量浓度注射后, *17β-HSD11* 基因的表达量在卵巢中下降 33.38%, 在精巢中下降 37.74%; 而高质量浓度注射后, *17β-HSD11* 基因的表达量在卵巢中下降 57.78%, 在精巢中下降 61.31%。由此推测 *17β-HSD11* 可能与三角帆蚌性腺发育和雌激素合成相关。

关键词: 三角帆蚌; *17β-HSD11*; 17β -雌二醇; 性腺发育

中图分类号: S 917.4 **文献标志码:** A

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 作为我国重要的育珠贝类^[1], 雌雄个体间的产珠性能不同, 其中雄性优于雌性^[2]。研究性别决定和性腺发育, 对三角帆蚌的单一化养殖具有重要的理论基础和实践价值。性激素在动物的性腺发育、性别分化以及功能维持方面发挥重要作用^[3-5]。类固醇急性调节蛋白 (StAR3)、细胞色素 P450 (CYP) 和羟类固醇脱氢酶 (HSD) 等酶类可以调节性激素的合成^[6-7]。目前在贝类中这方面的研究还不够深入, 三角帆蚌中还未见报导。

17β -羟基类固醇脱氢酶 (17β -HSD) 中除 17β -HSD5 之外, 剩余的 14 种亚型均属于短链还原脱氢酶 (SDRs) 家族^[8], SDRs 家族基因在氨基酸、类固醇激素、脂类、碳水化合物以及外源代谢中作用显著^[9]。典型的 SDRs 共有 4 个相对保守的区域: 辅助因子结合域 (TGxxxGxG)、催化活性位点 (YxxSK)、结构稳定域 (NAG) 和决定反应方向的域 (PGxxxT)^[10-12]。*17β-HSD* 家族基因在类

固醇激素合成中发挥重要作用^[13], 同时在性类固醇激素合成的最后过程中起氧化还原作用, 催化激素之间的相互转化从而调节体内激素水平的变化^[14]。近年来, 研究表明 *17β-HSD* 参与水生动物的类固醇代谢^[15], 同时该家族基因的部分亚型也在软体动物中被逐渐证明可能参与其性激素合成^[6-7, 16-18]。*17β-HSD11* 作为 *17β-HSD* 家族基因的一种, 可以催化雌二醇变为雌酮、睾酮变为雄烯二醇, 同时参与脂肪代谢^[8]。

本实验在三角帆蚌中通过 RACE 技术首次克隆了 *17β-HSD11* 基因, 获得 cDNA 全长序列。同时通过实时荧光定量技术检测 *17β-HSD11* 基因在性腺发育不同组织和不同年龄中的相对表达量。结合在性腺中的定位以及被外源雌激素刺激之后基因表达量的变化来阐明 *17β-HSD11* 在三角帆蚌性类固醇激素合成机制中的作用, 为三角帆蚌性腺发育和性别分化研究提供理论基础。

收稿日期: 2021-11-26 修回日期: 2022-01-26

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”项目 (2018YFD0901406); 国家自然科学基金 (31772835); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目 (CAR-49)

作者简介: 上官宵兆 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为三角帆蚌性别决定与分化。E-mail: 760093492@qq.com

通信作者: 汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

1 材料与方法

1.1 实验动物

武义伟民水产有限公司养殖基地(浙江省金华市)提供实验所用的三角帆蚌。在上海海洋大学暂养 3 d,水温为(26 ± 2) °C。选择个体规格相近的 2 龄三角帆蚌雌雄各 3 只,分别采集性腺、闭壳肌、斧足、肝胰腺、外套膜和鳃瓣共 6 个组织。收集 1 ~ 8 月龄幼贝性腺组织,各个月龄均取样 6 只。取 1、2、3 龄雌雄三角帆蚌性腺各 3 只。上述组织采样后置于液氮中速冻并于 -80 °C 保存备用。4% 多聚甲醛固定三角帆蚌雌雄性腺组织,2 h 后移至 70% 乙醇中保存备用。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

总 RNA 的提取使用 Trizol 法进行, RNA 质量与完整性分别使用 NanoDrop 2000C (Theemo Scientific, 美国) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 Primer Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒反转录合成 cDNA (TaKaRa, 日本)。将 cDNA 稀释 5 倍使 RNA 质量浓度变为 100 ng/μL, 存于 -20 °C 备用。

1.3 基因克隆与序列分析

根据基因序列用 Prime 5.0 设计两对引物用于已有序列验证,并设计 3' RACE 引物(表 1)。使用 5' / 3' SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, 美国) 反转录特定 cDNA 和扩增未知序列。产物切胶回收,连接转化,蓝白斑挑菌,送至上海生工有限公司测序。根据 WANG 等^[19] 的方法进行序列分析和构建系统进化树。

1.4 荧光定量 PCR 分析

采用 Prime 5.0 在 ORF 区设计 *17β-HSD11* 基因序列引物,内参基因选择 *EFL-α* (表 1)。使用 TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa, 日本) 进行检测。qRT-PCR 反应体系(20 μL): 2 × TB Green Premix Ex Taq 10 μL, RNase-free water 6.8 μL, 正向和反向引物各 0.8 μL, cDNA 1.6 μL。CFX96 仪 (Bio-Rad, 美国) 检测基因相对表达量。反应程序: 95 °C 3 min, 95 °C 5 s, 57 °C 30 s, 40 个循环, 65 ~ 95 °C 每个循环增加 0.5 °C 需 5 s。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *17β-HSD11* 的相对表达量。

1.5 原位杂交

石蜡包埋性腺组织,并获得厚度为 6 ~ 8 μm 的组织切片 (Leica, 德国)。梯度乙醇和二甲苯脱蜡,用于原位杂交实验。根据 *17β-HSD11* 基因的 cDNA 序列设计引物(表 1)。T7 High Efficiency Transcription 试剂盒(全式金,北京)及 DIG RNA 标记试剂盒 (Roche Applied Science, Switzerland) 用于体外转录和探针标记。之后置于 -80 °C 保存备用。使用 Enhanced Sensitive ISH Detection kit II, AP 试剂盒 (Boster, USA) 进行原位杂交。按照说明书进行操作,之后封片镜检。杂交信号检测和照片拍摄使用徕卡 DM 2500 显微镜 (徕卡, 德国)。

1.6 17β-雌二醇注射

注射器抽取 2 龄三角帆蚌性腺辨别雌雄,每组 5 雌 5 雄,分 3 组,进行暂养。3 d 后,进行激素注射实验。将 17β-雌二醇溶解在无水乙醇中,17β-雌二醇的质量浓度为 150 和 500 ng/μL。每只注射 200 μL,质量为 30 μg 和 100 μg。对照组注射同等剂量的无水乙醇。注射 48 h 后取性腺,置于液氮中,存于 -80 °C 进行 RNA 提取。同时取性腺组织于 4% 多聚甲醛中用于石蜡切片验证性别。

2 结果

2.1 三角帆蚌 *17β-HSD11* 基因的序列分析

三角帆蚌 *17β-HSD11* 基因 cDNA 全长为 1 134 bp (登录号为 OM248660),其中 5' UTR 40 bp, 3' UTR 171 bp, 开放阅读框 (ORF) 923 bp, 编码 307 个氨基酸。所编码的氨基酸中存在辅助因子结合域 (TGxxxGxxG)、催化活性位点 (YxxSK) 和结构稳定域 (NNAG)。见图 1。

在 NCBI 中将三角帆蚌的 *17β-HSD11* 氨基酸序列和其他物种进行比对,发现三角帆蚌的 *17β-HSD11* 序列与九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 的同源性为 58.7%, 与葡萄牙牡蛎 (*Crassostrea angulate*) 和长牡蛎 (*Crassostrea giga*) 的同源性均为 58.18% (图 2)。系统进化树如图 3 所示,表明 *17β-HSD11* 基因与扇贝、牡蛎等贝类聚为一支。

表 1 引物名称及序列
Tab.1 Primer names and sequences

引物名称 Primer name	序列 5'→3' Sequence (5' to 3')	引物用途 Primers usage
<i>17β-HSD11</i> -1F	GACTGCCGTTGCCAATACC	片段序列验证
<i>17β-HSD11</i> -1R	TGCCCTTCATTCCTCTCCA	
<i>17β-HSD11</i> -2F	GAGAGGAATGAAGGGCACA	
<i>17β-HSD11</i> -2R	TGTAGTGTCAATACCCGCGA	
<i>17β-HSD11</i> -3'-outer	TGTTGGAGAGGAATGAAGGGCAC	3' RACE
3' RACE-outer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	
<i>17β-HSD11</i> -3'-inner	CCGATAGGTGTCCCACATCAGGC	
3' RACE-inner	TGAAGGAGTTCATGGGGTTTGGC	
Q- <i>17β-HSD11</i> -F	CGATTAGTCGTTCCCGTCAA	荧光定量引物
Q- <i>17β-HSD11</i> -R	CGTATTTTCATCAGCAGTGGC	
<i>EFL-α</i> F	GGAACITCCCAGGCAGACTGTGC	内参引物
<i>EFL-α</i> R	TCAAACCGGGCCGAGAGAAT	
Y- <i>17β-HSD11</i> -F	CGATTAGTCGTTCCCGTCAA	原位杂交
Y- <i>17β-HSD11</i> -R	TAATACGACTCACTATAGGGCGTATTTTCATCAGCAGTGGC	

2.2 *17β-HSD11* 基因在 2 龄三角帆蚌雌雄各组织中的表达分析

17β-HSD11 在三角帆蚌雌雄个体中均有表达,不同组织之间表达量存在差异(图 4)。在肝胰腺中表达量最高,雌性显著高于雄性($P < 0.05$)。在性腺中,*17β-HSD11* 基因卵巢中的表达量极显著高于精巢($P < 0.01$)。在鳃中,雌雄个体之间不存在显著性差异,在外套膜和斧足中,雄性显著高于雌性($P < 0.05$)。在闭壳肌中,雄性的表达量极显著高于雌性($P < 0.01$)。

2.3 *17β-HSD11* 在性别发育早期和不同年龄三角帆蚌性腺的表达量

三角帆蚌 *17β-HSD11* 基因在不同发育阶段性腺表达量存在差异(图 5)。在 1~3 月龄相对表达较高,在 4 月龄开始下降,到 6 月龄表达量显著上升($P < 0.01$)。在 1~3 龄三角帆蚌中,*17β-HSD11* 在卵巢的表达量均极显著高于精巢($P < 0.01$),且在 2 龄中卵巢的表达量最高(图 6)。

2.4 *17β-HSD11* 基因在雌雄性腺中的定位

原位杂交结果表明,在雌性性腺中,*17β-HSD11* 基因在滤泡膜、卵膜和卵母细胞(细胞核和细胞质)中存在杂交信号。在雄性性腺中,滤泡膜上存在信号(图版)。

2.5 注射 17β -雌二醇后 *17β-HSD11* 基因的表达量差异

17β -雌二醇分 2 个质量浓度进行注射,低质

量浓度组注射 30 μg ,高质量浓度组注射 100 μg 。低质量浓度和高质量浓度注射之后,*17β-HSD11* 基因在三角帆蚌雌性性腺中的表达量和对照组比均下调。低质量浓度组注射 48 h 后,*17β-HSD11* 基因在雌性性腺中表达量极显著下调($P < 0.01$),下调 33.38%,雄性性腺中显著下调($P < 0.05$),下调 37.74%。高质量浓度组中,*17β-HSD11* 基因在雌雄性性腺中表达量均极显著下调($P < 0.01$),在雌性中下调 57.78%,在雄性中下调 61.31%(图 7)。高质量浓度组中 *17β-HSD11* 的下调比低质量浓度组下调得更为明显。

3 讨论

17β -HSD 作为性类固醇激素合成过程中的关键催化酶,是性类固醇激素作用的调节因子^[20]。哺乳动物中该家族基因已经有 15 种被鉴定^[21],该家族基因在部分软体动物中被发现,例如 2、4、8、11、12、14 亚型,均表明软体动物中可能存在和脊椎动物类似的生物学功能^[6-7,18,22-24]。本实验首次克隆了三角帆蚌 *17β-HSD11* 的 cDNA 序列全长,发现其编码 307 个氨基酸。所编码的氨基酸中存在 SOD 家族的典型结构特征辅助因子结合域(TG_{xxx}G_{xx}G)、催化活性位点(Y_{xx}SK)和结构稳定性基序(NNAG)^[10-12],多序列比对结果显示 *17β-HSD11* 的序列与无脊椎动物相似度较高,证明 *17β-HSD11* 在进化过程中相对保守。

```

1   ctgtcacattttcactgcccgttgccaatacctgtcgaaATGACACCTTCCTTGAAATTA
1   M N T F L E L
61  ATATATTATTGTTCTTCTCTGACTGTATCTAGAAAGCATTTTCGATTAGTCGTT
8   I Y L L F F L L Y C Y L E S I F R L V V
121 CCCGTCAAACGAAAATCTGTAAAGGTAAGATTATTTAGTAACCGGGGTCGCCATGGC
28  P V K R K S V K G K I I L V T G A G H G
181 ATCGGAAAGGAATTCGCCCTCGAATTTAGCCGACTGGAGGTATCCTCGTTTGTGGGAC
48  I G K E F A L E F S R L G G I L V L W D
241 ATAAATAAGGCCAACACGATGCCACTGCTGATGAAATACGAGAAGGAGGAGTACAGCT
68  I N K A N N D A T A D E I R E G G G T A
301 TACACATACGTTTGTATGTAGCAAGGTGGATGATTAACGCTGTGTGACACAGGTT
88  Y T Y V C D V S K V D D I K R V S D Q V
361 TACCGAGACGTTGGAAATTTGGTGAACAATGCAGGAATCTACACGGGGGG
108 Y R D V G N V D I L V N N A G I L H G Y
421 GAGCTGCTGAAAAATAAAGAAGACATCAGAAGGACATTTGACATCAACACCATGGCT
128 E L L K I K E E D I R R T F D I N T M A
481 CATTTCTGACCTTACGAGAGTTTTGCCCTCATGTTGGAGAGGAATGAAGGCCACATA
148 H F W T L R E F L P S M L E R N E G H I
541 ATCACTGTGGCTTCCATGGCAGCAAGTCTGGCTCAGCTTATCTGTGGATTATAGTGCC
168 I T V A S M A G K S G S A Y L V D Y S A
601 TCCAAGTTGCTGCTTTGGGATGACTGAAGCCCTAAGTGAGGAGTGCACCATCTTCAC
188 S K F A V F G M T E A L S E E L H H L H
661 AAGGATGGAATAAAACACGACTGCTGCCCATGTTGTTGACACAGGTCTCACTAAA
208 K D G I K T T T V C P M F V D T G L T K
721 TATCCACAAAGGAAGTTTGTAAAATCTATCACCAAAGGAAGTTGCCCTGAGGGCCATT
228 Y P Q G R F G K I L S P K E V A L E A I
781 GATGGGCTCTTAAGGATCATGTTGTCATGGTACCCAGTCTATTCAAGTCTCCGTC
248 D G A L K D H V V V M V P R S I Q V S V
841 ATCATTGGCAACTTTCCATACAGATTTAGACCAACTCTGAAGGAGTTCATGGGTTT
268 I I G Q L F P Y R F R R T L K E F M G I
901 GGCATTCTCCACAGTACGAGTCTTCTAAGTACCAGATAACAAACACACAGAGACAAT
288 G I L P Q Y E S S K S P D N K H T R D N
961 TAAaagttccaaaaaattgattgaagaccctccatgctcatttgcataagaaaaattgt
308 *
1 021 tgtcattgattaaaaatgtataaatttaaaaaaaagaaaaaaagaaaaaa
1 081 aaaaaaaagaaaaaaagaaaaaattaaaaaaagaaaaaaagaaaaaa

```

小写字母表示 5' UTR 和 3' UTR。大写字母表示编码区(上方为核苷酸,下方为氨基酸)。方框内为起始密码子和终止密码子。阴影部分表示辅助因子结合区;下划线表示结构稳定域;波浪线表示催化活性位点。

Lowercase letters indicated 5' UTR and 3' UTR. uppercase letters indicated coding regions (nucleotides above, amino acids below). In the box were the start codon and the stop codon. Shaded areas indicated cofactor binding regions, underline indicated structural stability domain, and wavy lines represent sites of catalytic activity.

图 1 三角帆蚌 17β -HSD11 的 cDNA 序列及编码的氨基酸序列
Fig. 1 17β -HSD11 cDNA sequence and encoded amino acid sequence of *H. cumingii*

17β -HSD11 在各个组织中均有表达,表明该基因在三角帆蚌中可能存在广泛的生物学功能,与其他动物相似^[25]。在三角帆蚌雌性性腺中的表达量高于雄性, 17β -HSD11 在虾夷扇贝中卵巢高于精巢,表现出性二态,在性腺功能维持中作用显著^[14]。进一步探讨 17β -HSD11 在组织中的定位情况,该基因在卵母细胞的细胞核和细胞质上均有明显杂交信号,同时在卵膜和滤泡膜上也存在信号,而在精巢中仅在滤泡膜上有信号。该基因在性腺组织中的定位情况和定量结果高度相似。在紫贻贝卵母细胞发育过程中, 17β -HSD11

在各个时期均有阳性信号,且与性类固醇激素生物合成关系显著^[26]。可见在三角帆蚌中该基因在卵母细胞的发育中也发挥作用。此外, 17β -HSD11 可以催化脂肪酸的代谢,在肝脏中表达量最高表明可能参与了三角帆蚌脂肪代谢,相似情况在栉孔扇贝和福建牡蛎中均有报导^[7,14,27]。

2 龄蚌中 17β -HSD11 基因在雌性性腺中的表达量高于 1 龄,可能是三角帆蚌在 1 龄时性腺发育未完全,原始生殖细胞处于大量增殖阶段^[28],此时 17β -HSD11 作为氧化酶催化作用较弱,雌二醇以有活性形式存在,从而促进性腺发育。在 2 龄时,此时三角帆蚌性腺发育趋于成熟,而成熟生长过程中, 17β -HSD11 基因在雌性中表达量极显著上升,可能是氧化作用加强,雌二醇被转化为雌酮。在 3 龄中表达量相对 2 龄较低,可能是由于 3 龄时性腺发育成熟,不同的发育时期对 17β -HSD11 基因也存在影响,在虾夷扇贝、栉孔扇贝中均表明 17β -HSD11 基因在性腺发育过程中存在类似变化^[7,14]。在雌性中 17β -HSD11 基因的作用较为明显,说明该基因可能是雌激素合成过程中的关键限速酶,同时在卵母细胞发育过程中发挥重要作用;而在雄性中基因表达呈现上升趋势,较雌性中的作用减弱,说明 17β -HSD11 可能在睾酮和雄烯二醇二者之间转化的催化能力不强,具体原因有待进一步验证。在太平洋牡蛎中该基因将雌二醇转化为雌酮的能力低于将雌酮转化为雌二醇^[29]。在杂色鲍中, 17β -HSD11 发挥氧化酶作用,将睾酮转化为雄烯二醇,降低雄激素的含量^[24]。在早期幼贝性腺发育过程中, 17β -HSD11 在 6 月龄表达量最高,而三角帆蚌 5 ~ 6 月龄时进行性别分化^[30],说明其可能在三角帆蚌性别分化过程中发挥重要作用。

性激素在软体动物性腺发育过程中作用显著,外源性激素诱导可能引起性逆转^[31]。在脊椎动物中,外源激素可以与相应的受体结合从而影响或者调节激素合成相关基因的表达^[32]。以往的研究^[33-34]表明,外源性雌二醇抑制 *StAR3*、*Cyp17a*、 17β -HSD 等激素合成基因的表达从而取代内源性激素的作用。本实验注射 17β -雌二醇之后, 17β -HSD11 基因的表达量显著下调,在高质量浓度组中下调更为严重,表明该基因受到了雌激素的负调控作用,证实可能在三角帆蚌雌激素合成中发挥重要作用。

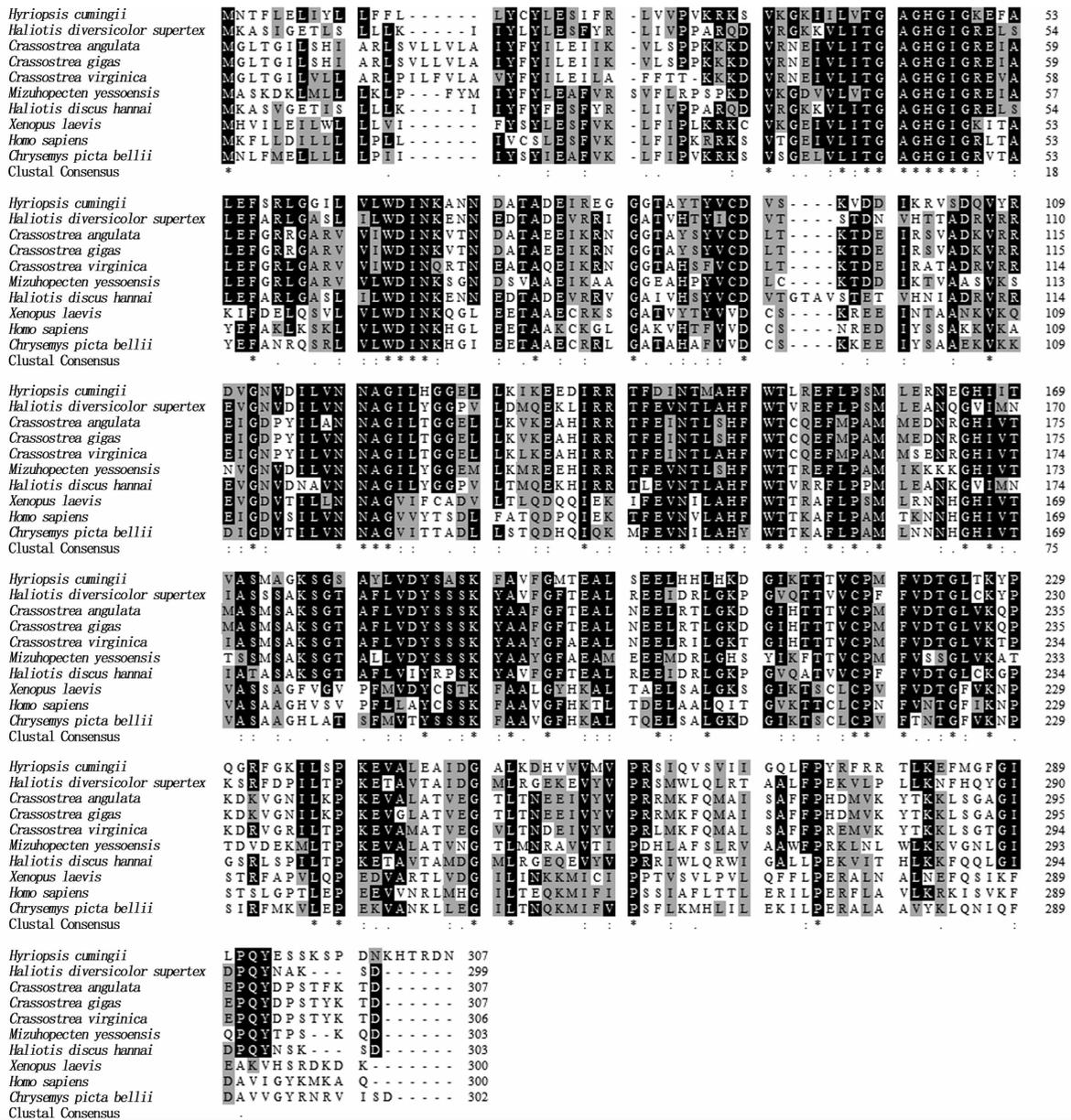


图2 *17β-HSD11* 氨基酸的多序列比对
Fig. 2 Multiple comparisons of *17β-HSD11* amino acid

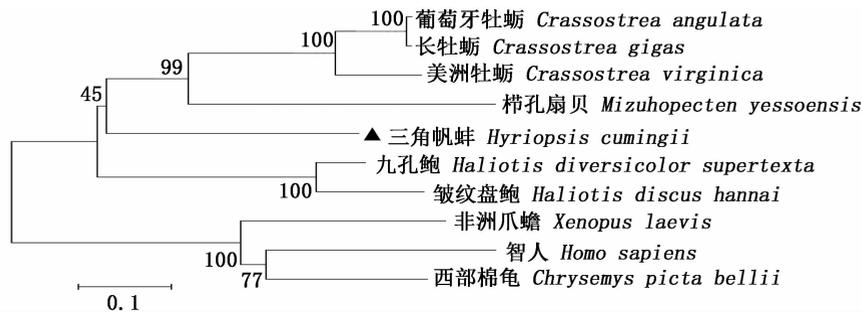
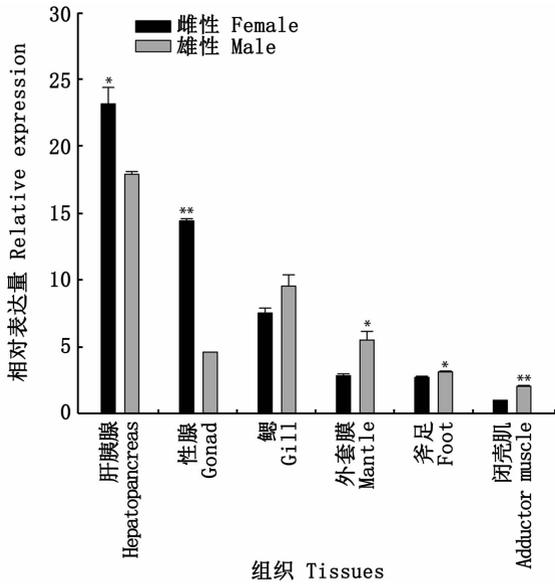


图3 不同物种 *17β-HSD11* 氨基酸序列系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of *17β-HSD11* amino acid sequence in different species

节点上的数字表示重复 1 000 次的 Bootstrap 检验置信值。

The numbers on the nodes represent the confidence values of Bootstrap test repeated 1 000 times.

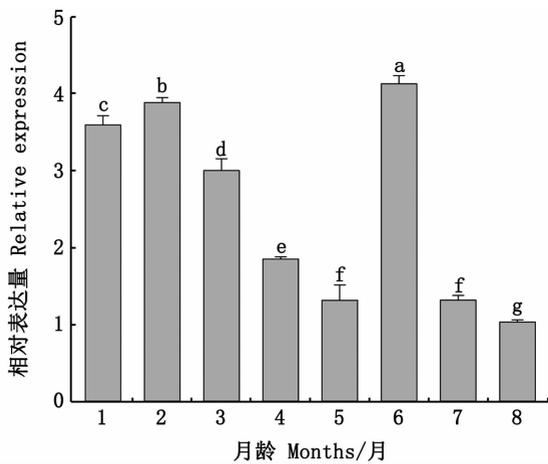


* 表示雌雄间存在显著性差异 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

* indicates significant difference between males and females (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) .

图4 不同性别三角帆蚌 17β -HSD11 在各组织中的相对表达量

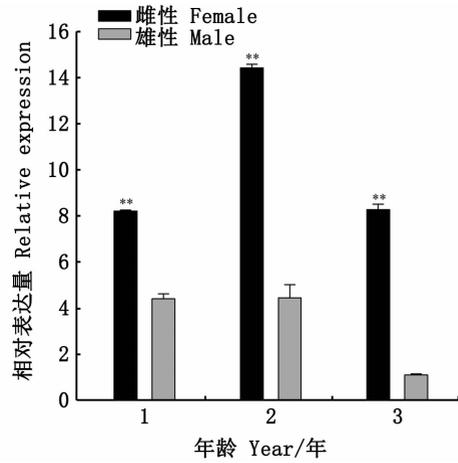
Fig.4 Relative expression of 17β -HSD11 in different tissues of *H. cumingii* of different sexes



不同小写字母表示各月龄之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。 Different lowercase letters indicate significant differences between different month ages.

图5 17β -HSD11 在早期(1~8月龄)性腺组织中的相对表达量

Fig.5 Relative expression of 17β -HSD11 in early (1-8 months of age) gonadal tissues

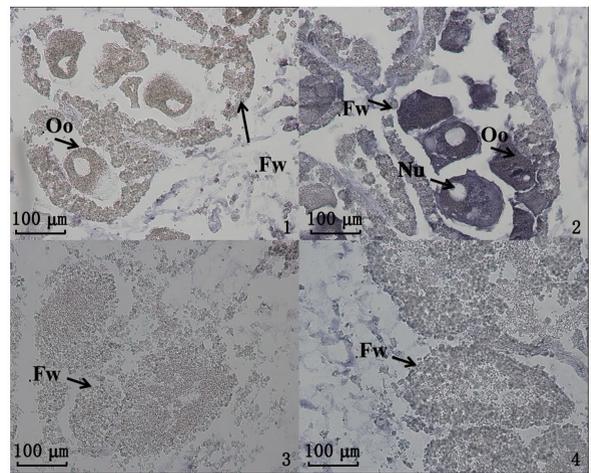


* 表示雌雄间存在显著性差异 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

* indicates significant difference between males and females (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$) .

图6 17β -HSD11 在不同年龄三角帆蚌性腺中的相对表达量

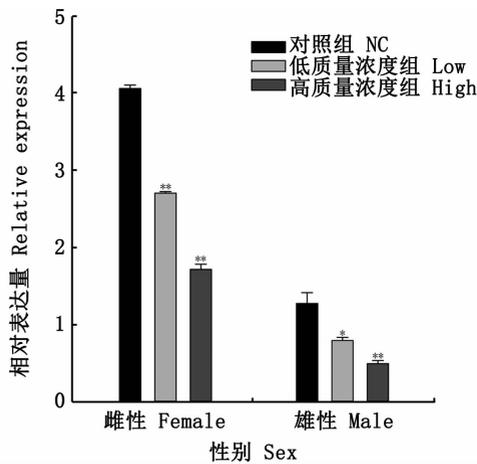
Fig.6 Relative expression of 17β -HSD11 in gonads of *H. cumingii* of different ages



左侧图像为空白组未加探针,右侧为加探针的实验组。上方为雌性性腺,下方为雄性性腺。Oo. 卵母细胞; Fw. 滤泡膜; Nu. 细胞核。

The left images were from negative controls without Probes, and the right images were obtained using sense Probes. The female gonads are above and the male gonads below. Oo. Oocyte; Fw. Follicular wall; Nu. Nucleus.

图版 17β -HSD11 成熟三角帆蚌性腺原位杂交结果
Plate In situ hybridization of 17β -HSD11 in the gonads of mature *H. cumingii*



表示处理组和对照组之间存在显著性差异 ($P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

* indicates significant difference between the treatment group and the control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

图7 $17β$ -雌二醇注射后 *17β-HSD11* 的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *17β-HSD11* after $17β$ -estradiol injection

绝大多数贝类中关于性激素合成相关基因的研究微乎其微,仅有的研究也仅仅停留在分子鉴定,并未深入研究。本研究首次鉴定了三角帆蚌的性激素合成相关基因 *17β-HSD11*,通过外源雌激素注射三角帆蚌,探究了 *17β-HSD11* 基因表达量的变化,为三角帆蚌的性激素合成研究提供基础,*17β-HSD11* 基因可能在三角帆蚌性腺发育、性别分化和雌激素合成中发挥重要作用。研究性激素合成相关基因可以为三角帆蚌性腺发育和性别分化提供一定的理论基础,同时为育珠产业提供一定的生产实践指导。

参考文献:

- [1] 汪桂玲,白志毅,刘晓军,等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1618-1627.
WANG G L, BAI Z Y, LIU X J, et al. Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1618-1627.
- [2] 刘斐斐,崔晓羽,董赛赛,等. 三角帆蚌中 *WNT4* 基因克隆及表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(6): 801-810.
LIU F F, CUI X Y, DONG S S, et al. Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2020, 29(6): 801-810.
- [3] GENNOTTE V, AKONKWA B, MÉLARD C, et al. Do sex reversal procedures differentially affect agonistic behaviors and sex steroid levels depending on the sexual genotype in Nile tilapia? [J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology, 2017, 327(4): 153-162.
- [4] BASSI G, SIDHU S K, MISHRA S. The expanding role of mitochondria, autophagy and lipophagy in steroidogenesis [J]. Cells, 2021, 10(8): 1851.
- [5] SIMARD J, RICKETTS M L, GINGRAS S, et al. Molecular biology of the $3β$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $Δ5$ - $Δ4$ isomerase gene family [J]. Endocrine Reviews, 2005, 26(4): 525-582.
- [6] ZHANG M M, WEI H L, LIU T, et al. Potential GnRH and steroidogenesis pathways in the scallop *Patinopecten yessoensis* [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 204: 105756.
- [7] THITIPHUREE T, NAGASAWA K, OSADA M. Molecular identification of steroidogenesis-related genes in scallops and their potential roles in gametogenesis [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2019, 186: 22-33.
- [8] 曾臻,余美舜,谭强来,等. $17β$ -HSDs 的种类和功能概述及其在贝类中的研究进展[J]. 水产学报, 2022, 46(6): 1104-1116.
ZENG Z, YU M S, TAN Q L, et al. Review of types and functions of $17β$ -HSDs and related research progress in mollusks [J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(6): 1104-1116.
- [9] ZHANG S, XIE L, ZHENG S Q, et al. Identification, expression and evolution of short-chain dehydrogenases/reductases in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8): 4201.
- [10] OPPERMAN U, FILLING C, HULT M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update [J]. Chemico-Biological Interactions, 2003, 143-144: 247-253.
- [11] KRISTAN K, RIZNER T L, STOJAN J, et al. Significance of individual amino acid residues for coenzyme and substrate specificity of $17β$ -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus* [J]. Chemico-Biological Interactions, 2003, 143-144: 493-501.
- [12] DUAX W L, GHOSH D, PLETNEV V. Steroid dehydrogenase structures, mechanism of action, and disease [J]. Vitamins & Hormones, 2000, 58: 121-148.
- [13] 谢浪. 罗非鱼 SDR 超家族基因的生物信息学分析及其在性腺发育过程中的作用研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
XIE L. The bioinformatical analysis on SDR superfamily genes and characterization of their possible roles in the development of tilapia gonad [D]. Chongqing: Southwest University, 2016.
- [14] 曾臻,倪健斌,谭强来,等. 福建牡蛎 *17β-HSD* 基因的克隆及其生殖周期表达 [J]. 应用海洋学学报, 2020, 39(1): 12-19.

- ZENG Z, NI J B, TAN Q L, et al. Cloning of *17 β -HSD* gene and its characterization in the Fujian oyster, *Crassostrea angulata*, during gonad development[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2020, 39(1): 12-19.
- [15] ZHOU L Y, LI M H, WANG D S. Role of sex steroids in fish sex determination and differentiation as revealed by gene editing[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 313: 113893.
- [16] HATHAWAY R R. Conversion of estradiol-17 β by sperm preparations of sea urchins and oysters [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1965, 5(5): 504-508.
- [17] MORI K, TAMATE H, IMAI T. Histochemical study on the change of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the oyster during the stages of sexual maturation and spawning [J]. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 1966, 17: 179-187.
- [18] LIMA D, MACHADO A, REIS-HENRIQUES M A, et al. Cloning and expression analysis of the 17 β hydroxysteroid dehydrogenase type 12 (HSD17B12) in the neogastropod *Nucella lapillus*[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 134: 8-14.
- [19] WANG G L, DONG S S, GUO P F, et al. Identification of Foxl2 in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* and its involvement in sex differentiation [J]. *Gene*, 2020, 754: 144853.
- [20] PAYNE A H, HALES D B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones[J]. *Endocrine Reviews*, 2004, 25(6): 947-970.
- [21] 刘建国. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 性类固醇激素和 17 β -羟类固醇脱氢酶 8 在性腺发育过程中的潜在作用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- LIU J G. Potential roles of sex steroids and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 8 in *Chlamys farreri* during gonadal development [D]. Qingdao: China Ocean University, 2014.
- [22] 王丹, 李海龙, 毕颖, 等. 栉孔扇贝 *17 β -hsd4* 基因的克隆和表达分析[J]. *水产学报*, 2013, 37(3): 367-375.
- WANG D, LI H L, BI Y, et al. Cloning and expression analysis of *17 β -hsd4* gene in *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(3): 367-375.
- [23] LIU J G, ZHANG Z F, MA X S, et al. Characteristics of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 8 and its potential role in gonad of Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 141: 77-86.
- [24] ZHAI H N, ZHOU J, CAI Z H. Cloning, characterization, and expression analysis of a putative 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 11 in the abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 130(1/2): 57-63.
- [25] SAKURAI N, MIKI Y, SUZUKI T, et al. Systemic distribution and tissue localizations of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12 [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 99(4/5): 174-181.
- [26] ROSATI L, AGNESE M, ABAGNALE L, et al. The mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Bay of Naples: New insights on oogenic cycle and its hormonal control [J]. *The Anatomical Record*, 2019, 302(6): 1039-1049.
- [27] MOTOJIMA K. *17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 11* is a major peroxisome proliferator-activated receptor α -regulated gene in mouse intestine [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271(20): 4141-4146.
- [28] 董赛赛, 崔晓羽, 段胜华, 等. 三角帆蚌 *KLHL10* 基因的特征和表达分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2021, 30(3): 389-398.
- DONG S S, CUI X Y, DUAN S H, et al. Characterization and expression analysis of *KLHL10* gene in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2021, 30(3): 389-398.
- [29] MATSUMOTO T, OSADA M, OSAWA Y, et al. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 118(4): 811-817.
- [30] 薛婷. 淡水珍珠蚌 DUI 发生及性腺发育研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- XUE T. Study on DUI occurring and gonad development of freshwater pearl mussels [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.
- [31] DEVLIN R H, NAGAHAMA Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences[J]. *Aquaculture*, 2002, 208(3/4): 191-364.
- [32] GOVOROUN M, MCMEEL O M, MECHEROUKI H, et al. 17 β -estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(5): 1841-1848.
- [33] MENG L H, YU H Y, QU J B, et al. Two *cyp17* genes perform different functions in the sex hormone biosynthesis and gonadal differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Gene*, 2019, 702: 17-26.
- [34] ABDELMONEIM A, ABDU A, CHEN S, et al. Molecular signaling pathways elicited by 17 α -ethinylestradiol in Japanese medaka male larvae undergoing gonadal differentiation [J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 208: 187-195.

Expression analysis of *17β-HSD11* gene in *Hyriopsis cumingii* and effect of 17β -estradiol on its expression

SHANGGUAN Xiaozhao¹, LIU Meiling¹, MAO Yingrui¹, WANG Xiaoqiang¹, WANG Yayu¹, WANG Guiling^{1,2,3}, LI Jiale^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The effects of *17β-HSD11* gene on gonad development and sex hormone synthesis in *H. cumingii* were investigated by RACE (Rapid-amplification of cDNA ends), real-time quantitative (qRT-PCR), in situ hybridization (ISH) and 17β -estradiol injection. The results showed that the full length of *17β-HSD11* cDNA was 1 134 bp, including 5' UTR 40 bp, open reading frame (ORF) 923 bp, 3' UTR 171 bp. It coded 307 amino acids. *17β-HSD11* was highly expressed in the hepatopancreas and the gonad, and the ovary was significantly higher than the testis. ISH results showed that there were hybridization signals on oocyte, follicular membrane and egg membrane. The expression of *17β-HSD11* gene was inhibited in both male and female gonads after injection of 17β -estradiol at different mass concentrations. The expression of *17β-HSD11* gene was decreased by 33.38% in ovary and 37.74% in testis after injection of 17β -estradiol at low mass concentrations. Moreover, after high mass concentration injection, the expression of *17β-HSD11* gene was decreased by 57.78% in ovary and 61.31% in testis. From the above results, it was speculated that *17β-HSD11* was related to gonadal development and estrogen synthesis in *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; *17β-HSD11*; 17β -estradiol; gonad development