

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00195

siRNA 介导 *Sry* 基因沉默对小鼠胚胎性别决定基因表达的影响

吴宁¹, 林秀坤¹, 廖冰¹, 杜卫华¹, 韩凤桐², 赵金红³

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094;
2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030;
3. 重庆畜牧科学院, 重庆 402460

摘要: 为研究 *Sry* 基因的调控网络, 采用 siRNA 表达载体介导的 RNAi 技术, 特异性地抑制睾丸决定因子 *Sry* 在小鼠胚胎中的表达, 并观察 *Sry* 基因沉默后对两性性腺分化中起重要作用的 *Wtl*, *Sfl*, *Dax1*, *Gata4*, *Sox9* 及 *Amh* 基因表达的影响。利用本课题组先前构建的 siRNA 重组表达载体 (pSilencer4.1/*Sry*217 及 pSilencer4.1/*Sry*565), 通过尾静脉注射法导入妊娠 9.5 天(9.5 dpc)的母鼠体内, 在 11.5 dpc 时取胚胎, 对性别鉴定为雄性的胚胎以 RT-PCR 法和 Western-blot 检测 *Sry* 基因的表达抑制效果, 并同时用定量 PCR 法检测 *Wtl* 等上述性别决定相关基因表达变化情况。结果表明, 注射干扰质粒后 48 h *Sry* 基因的 mRNA 和蛋白表达水平均降低, 其中 siRNA 表达质粒 pSilencer 4.1/*Sry* 565 的抑制效果显著, 可达到 80% 的抑制率。*Sry* 基因沉默后, *Wtl* 基因表达量显著升高; *Sfl*, *Dax1*, *Gata4*, *Sox9* 基因表达水平没有明显变化; *Amh* 基因无表达。试验结果表明, *Sry* 基因表达抑制会导致 *Wtl* 基因表达升高; 另外, *Sry* 基因激活 *Sox9* 基因的表达可能需要其他的辅助因子协同作用。

关键词: *Sry*; siRNA; 基因沉默; 尾静脉注射; 性别决定基因

Effect of *Sry* silencing by siRNA on the expression of sex determining genes in mouse embryos

WU Ning¹, LIN Xiu-Kun¹, LIAO Bing¹, DU Wei-Hua¹, HAN Feng-Tong², ZHAO Jin-Hong³

1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;
2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;
3. Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460, China

Abstract: In order to investigate *Sry* regulation network in the development of male embryo, we inhibited the *Sry* gene expression by RNAi and then examined expression of other sex-related genes. Six genes (*Sox9*, *Wtl*, *Sfl*, *Dax1*, *Gata4* and *Amh*), which are suggested to be closely related to *Sry* regulation were studied. Two siRNA expression vectors pSilencer4.1/*Sry*217 and pSilencer4.1/*Sry*565 were constructed and injected into gestated mouse through tail vein at 9.5 day of conception (dpc). The inhibition efficiency of *Sry* and the expression of other six genes were examined in male embryos at 11.5 dpc by RT-PCR and Western-blot. Expressions of the other six genes were analyzed by fluorescence quantity PCR. The

收稿日期: 2007-09-03; 修回日期: 2007-10-31

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(编号: 30671501)[Supported by the Fund of National Natural Science(No. 30671501)]

作者简介: 吴宁(1983-), 女, 河北石家庄人, 硕士生, 专业方向: 动物分子生物学研究。Email: wuning2283720@126.com

通讯作者: 林秀坤(1957-), 男, 山东人, 博士, 研究员, 研究方向: 动物生物技术。Tel: 010-62813339; Email: Linxiukun@yahoo.com

results indicated both the pSilencer4.1/*Sry*217 and pSilencer4.1/*Sry*565 could inhibit significantly increased after *Sry* silencing. In contrast, no significant changes were observed in the expression of *Sfl*, *Amh*, *Gata4*, *Dax1* and *Sox9* when silencing *Sry* by siRNA. Our results suggested that the *Wtl* transcription was regulated by *Sry*, whereas the *Sox9* expression is not directly regulated by *Sry* in the development of genital ridge.

Keywords: *Sry*; siRNA; gene silencing; tail vein injection; sex determination genes

Sry(sex determining region on Y chromosome)^[1,2]是Y染色体上的性别决定基因。哺乳动物的性别调控过程是以*Sry*基因为主导的一系列上游基因和下游基因参与的级联反应过程,其中*Sry*基因起到开关的作用^[3,4]。*Sry*基因编码的蛋白具有一个HMG-box保守区域,作为转录因子激活一系列基因的级联反应促进睾丸发育通路,同时抑制雌性发育通路,使性腺向睾丸方向发育并产生雄性表型^[5]。目前已经发现许多候选基因参与雄性分化过程,并发挥重要作用,例如,*Wtl*(Wilms' tumor gene)^[6-8],*Sfl*(Steroidogenic factor-1)^[9],*Amh* (Anti Müllerian Hormone)^[10,11],*Gata4*(GATA binding protein 4)^[12,13],*Dax1*(Dosage sensitive sex reversal locus-1)^[14]和*Sox9* (*Sry*-related HMG box-9)^[15-17]基因在性腺分化过程中均起到重要作用。*Sry*基因仅在两性分化前的生殖脊中短暂表达,指导性腺的分化。正是由于*Sry*基因表达的时空特异性,在体外难于建立供分析、鉴定的合适细胞培养系统,利用基因敲除技术也难于操作,至使*Sry*基因的调控网络研究进展缓慢。至今为止,*Sry*的上游作用因子和其下游作用靶基因还没有鉴定出来。RNAi技术的出现和迅速发展为我们研究*Sry*基因提供了新思路,本课题组先前尝试了siRNA(small interfering RNAs)表达载体介导的RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术,发现siRNA可特异性抑制小鼠胚胎的*Sry*基因的表达^[18]。为进一步研究*Sry*的基因调控机理,本文研究了在*Sry*基因沉默条件下与性别控制具有密切关系的6种基因,*Wtl*、*Dax1*、*Sfl*、*Gata4*、*Sox9*和*Amh*基因的表达变化情况,发现*Wtl* 基因的表达显著升高,但*Sox9* 基因的表达不发生变化。这一结果为阐明性别发育过程中*Sry*等性别控制基因的调控网络提供了一定的证据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 5 周龄昆明白鼠,购自北京大学医学部实

验动物中心。实验所用的小鼠均饲养在定期灭菌的控温鼠房,自由采食和饮水。其中雄性小鼠经训练,并确认其繁殖性能良好后选作种用。5 周龄的雌性小鼠进行超排:每只腹腔注射 PMSG 5U, 42~48 h 后再注射相同剂量的 HCG。然后与雄鼠按 1:1 的比例合笼。次日早晨,检查雌鼠阴栓,见阴栓的雌鼠单笼饲养用作后续实验。见阴栓日中午记为 0.5 dpc (days post coition, 交配后天数)。

1.2 菌种及质粒

大肠杆菌DH5 α 系本研究室保存, siRNA表达载体 pSilencer4.1/*Sry*217(简称p217), pSilencer4.1/*Sry*565 (简称p565)为本课题组先前构建^[18]。质粒用DH5 α 感受态转化,用无内毒素质粒提取试剂盒提取(购自天根公司),用内切酶*Bam*H 和*Hind* (购自NEB公司)进行酶切鉴定,质粒的浓度和纯度用紫外分光光度计测定。

1.3 尾静脉注射

每批妊娠小鼠分为 4 组,其中两组为对照组,分别注射pSilencer 4.1-CMV neo对照质粒和生理盐水;另两组为处理组,分别注射 siRNA 表达质粒 p217 和p565。在 9.5 dpc,进行孕鼠尾静脉注射,即用 1 mL注射器将用格林氏液稀释的 20 μ g质粒约 100~150 μ L,或等体积的生理盐水注入孕鼠尾静脉。注射方法采用常压缓慢注射法^[19,20]。

1.4 胚胎组织收集及性别鉴定

1.4.1 胚胎组织收集

尾静脉注射 siRNA 表达质粒 48 h 后,即 11.5 dpc 时脱颈法处死孕鼠,迅速取出胚胎,并将胚胎分割为两部分,胚胎头部放到离心管中 - 20 $^{\circ}$ C 保存,用来提取 DNA 鉴定胚胎性别;与其对应的包含生殖脊的剩余胚胎组织立即放于 RNA 样品保存液中(RNA Locker, 天泽基因公司)4 $^{\circ}$ C 保存,用来提取总 RNA。

1.4.2 性别鉴定

雄鼠和雌鼠 DNA 为参照,采用双重 PCR 法对

胚胎性别进行鉴定。在同一离心管中同时扩增雄性特异的 *Sry* 基因和作为参照的常染色体基因 *IL3*。基因扩增引物见表 1。扩增条件为 95 3 min, 94 30 s, 57 30 s, 72 1 min, 30 个循环, 72 8 min, 15 30 s。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 shRNA 表达载体对 *Sry* 基因表达干扰效果检测

1.5.1 RT-PCR 检测 *Sry* mRNA 表达水平

(1)总 RNA 的提取: 将性别鉴定为雄性的小鼠胚胎组织从 RNA 保存液中取出, 放入组织研磨器中, 加入 1 mL Trizol 试剂(Invitrogen 公司)在组织研磨器中充分匀浆。按 Trizol 法提取组织总 RNA, 用甲醛变性胶检测提取的 RNA 质量, 同时用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和质量。根据 RNA 样品在 260 nm 波长处的吸光度值确定其浓度, 根据在 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度比值判断 RNA 样品纯度, 只有比值在 1.8~2.0 范围内的 RNA 才用作后续

试验。(2)逆转录聚合酶链反应: 每一样品取 2 μg 总 RNA, 用 M-MLV 反转录酶(Promega 公司)反转录为 cDNA。反转录反应过程为: 在一个无 RNase 离心管中加入 RNA 1 μg, oligo (dT)₁₅ 1 μg, 加 DEPC 水至 10 μL。在 PCR 仪上 70 反应 5 min 后迅速置于冰上冷却, 然后加入 5×RT buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 1.25 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL(25 U/μL), M-MLV 反转录酶 (200 U/μL) 1 μL, 再加 DEPC 水至总体积为 25 μL。置于 PCR 仪上反应, 42 保温 30 min, 95 变性 5 min, 15 30 s 所得 cDNA 产物置于-20 保存。

每个样品都以反转录所得 cDNA 体积的 1/10 为模板, 用小鼠 *Sry* 基因特异引物扩增, 比较不同处理条件下 *Sry* 基因的表达量。RT-PCR 扩增 *Sry* 基因特异引物序列见表 1。扩增条件为 95 3 min, 94 30 s, 60 50 s, 72 40 s, 28 个循环, 72 8 min。同时

表1 胚胎性别鉴定、RT-PCR检测 *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4*, *Sox9* 和 *Amh* 基因表达所用引物信息
Table 1 Primers of mouse embryos sex determination and RT-PCR assay *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4*, *Sox9* and *Amh* genes

基因 Genes	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences(5' 3')	引物复性温度 Annealing temperature(℃)	产物长度 Product length(bp)
<i>Sry</i>	Sry-F1 ¹⁾	TGGTCCCGTGGTGAGAGGC	57	296
	Sry-R1 ¹⁾	TATGTGATGGCATGTGGGTTC		
	Sry-F2 ²⁾	AGCTCTTACACTTTAAGTTTGTACTTC	60	582
	Sry-R2 ²⁾	GCAGCTCTACTCCAGTCTTGCC		
<i>IL3</i>	Sry-F3	ATCGGAGGGCTAAAGTGTC	58	121
	Sry-R3	CAGTCTTGCTGTATGTGATGG		
	IL3-F ¹⁾	GGGACTCCAAGCTTCAATCA	57	544
<i>Wtl</i>	IL3-R ¹⁾	TGGAGGAGGAAGAAAAGCAA		
	Wtl-F	AATGGACAGAAGGGCAGAGC	59	157
	Wtl-R	GGGCCACTCCAGATACACG		
<i>Sox9</i>	Sox9-F	CCAGGTGCTGAAGGGCTAC	60	238
	Sox9-R	CTCCTCCACGAAGGGTCTC		
<i>Gata4</i>	Gata4-F	CCCTCCCGCACGATTTCT	60	131
	Gata4-R	AGGCCCAACTCGCTCAAA		
<i>Sfl</i>	Sfl-F	CTGCCAATACGATGGAGAATG	58	150
	Sfl-R	CATCTCCCGTAGAGTGCC		
<i>Amh</i>	Amh-F	TGATTCCCGCTGTTTCACGC	60	236
	Amh-R	AGGGCCAGTTGCGTGTTCGA		
<i>Dax1</i>	Dax1-F	TGGAGAAAGCGGTCTGTAGC	60	145
	Dax1-R	CCAGTATGGAGCAGAGGGATT		
<i>β-actin</i>	β-actin-F	AACCCTAAGGCCAACCCTG	58	212
	β-actin-R	CAGGATTCCATACCAAGAAGG		

注: 带有“1)”标记的引物用做小鼠胚胎性别鉴定, 带有“2)”标记的引物用做半定量 RT-PCR, 无标记的用作定量引物。
Notes: The primer sequences which remarked with “1)” were used in mouse embryos sex determination and with “2)” were used in the RT-PCR, others with no signs were used in fluorescence quantity PCR.

以小鼠 β -actin 基因作为内参照, 引物序列列于表 1 中。扩增条件为 95 3 min, 94 30 s, 60 50 s, 72 40 s, 22 个循环, 72 8 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外投射仪观察拍照。

1.5.2 Western-blot 检测 SRY 蛋白表达

性别鉴定为雄性的小鼠胚胎取生殖脊部位的组织用动物组织总蛋白提取试剂盒(普利来, 北京)提取组织总蛋白, 蛋白浓度的检测用 BCA 法(Pierce)。将蛋白样品于 95 加热变性 10 min, 每个样品取 30 μ g 上样。经 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离后, 通过预染的 Maker(Bio-rad), 将含有目的条带的分离胶切下, 用湿法电转到 NC 膜上, 电转结束后将 NC 膜浸入 5% 脱脂奶粉 PBST 封闭液中, 室温封闭 2 h。取出膜用 PBST 溶液洗涤 10 min \times 4 次, 放入一抗溶液中 (Sry, 1:1000, Abcam; β -actin, 1:200, 武汉博士德) 孵育过夜, 然后 PBST 洗膜 5~10 min \times 4 次, 与羊抗鼠 IgG 二抗(1:2000, Bio-rad)共孵育 1 h, 洗膜 3 次, 将膜与化学发光剂孵育 5 min(Supersignal West Pico, Pierce), 在暗室中压胶片曝光, 洗胶片。

1.6 SYBRGreen 荧光定量 PCR 法检测 *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4*, *Sox9* 和 *Amh* 基因的表达变化

RNA 提取及 cDNA 合成方法同上。以 cDNA 为模板, 加入相应引物及 SYBRPremixExTaqTM, 在 GeneAmp5700SequenceDetector 仪 Applied Biosystems 上分别对 *Sry*, *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4*, *Sox9*, *Amh* 和看家基因 β -actin (内参, 用于不同样本的标准) 进行扩增, 所需引物序列见表 1。将扩增产物 10 倍比例稀释成 6 个不同浓度的标准品, 制作 *Sry*, *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4*, *Sox9*, *Amh* 和 β -actin 标准曲线; 再将待测样品与标准品同时在 GeneAmp5700 荧光定量 PCR 仪上反应, 所得不同 *Ct* 值分别代入不同标准曲线, 电脑自动读出各样品起始模板量^[21]。将各基因定量结果与 β -actin 基因定量结果相比进行 RNA 校正, 即可得到各基因在小鼠胚胎生殖脊组织中的相对表达量。

1.7 图像分析

应用美国 Sigma Gel 图像分析系统对 RT-PCR 产物进行分析, 测量各个电泳条带密度值的体积积分值。根据条带密度与 DNA 含量成正比的定量关系, 通过建立标准系列, 可推算出待测电泳条带中的 DNA 含量。

1.8 统计学处理

对所得实验数据用 SPSS10.0 统计分析软件处

理, 用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用多样本比较的完全随机资料的方差分析法(单因素方差分析法(one-way ANOVA)处理, 多个样本均数间的两两比较采用最小显著差(LSD)*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 性别鉴定

采用双重 PCR 技术鉴定胚胎性别, *IL3* 基因扩增的片段长度为 544 bp, *Sry* 基因扩增片段长度为 296 bp, 依照扩增的条带鉴定胎儿性别。雄性胚胎扩增出现雄性特异基因 *Sry* 和常染色体参照基因 *IL3* 两条带(图 1, 泳道 3, 5, 7, 8, 10), 雌性胚胎只有 *IL3* 基因的一条带(图 1, 泳道 1, 2, 4, 6, 9), 同时扩增雌鼠和雄鼠 DNA 为参照(图 1, 泳道 9, 10)。结果说明, 用 PCR 方法可准确鉴定胚胎性别。

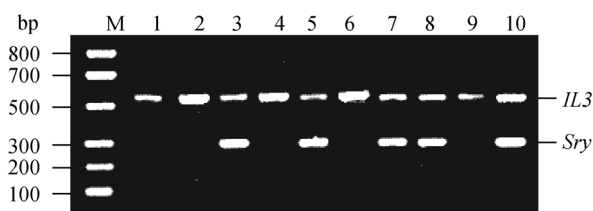


图1 PCR法鉴定小鼠胚胎性别

Fig. 1 Mouse embryos sex determination by PCR

2.2 *Sry* 基因表达水平变化

2.2.1 *Sry* mRNA 表达水平检测

两种 siRNA 表达载体 p217 和 p565 注入 9.5 dpc 的孕鼠后, 在 11.5 dpc 测定 *Sry* mRNA 表达水平的变化。结果表明, *Sry* 基因的 mRNA 表达水平均明显下降, 其中 p565 的抑制效果显著(图 2, A), 光密度值分析显示与对照组相比 *Sry* 基因表达量已下降到 20% 左右。而注射 siRNA 表达质粒 p217, *Sry* 基因的表达量仅下降到 50% 左右(图 2, B)。于 9.5 dpc 注射生理盐水组和注射对照质粒 pSilencer 4.1-CMV. neo 组 *Sry* 表达量基本一致。由于 p565 的抑制效果更好, 所以在后续实验中我们选择 p565 做进一步的研究。

2.2.2 SRY 蛋白表达水平变化

Western-blot 分析干扰载体 p565 对 SRY 蛋白表达影响结果见图 3。结果显示注射干扰质粒 p565 后小鼠胚胎生殖脊中 SRY 蛋白的表达量显著下降, 说明 p565 干扰质粒对 SRY 蛋白的表达也具有明显的抑制效果。

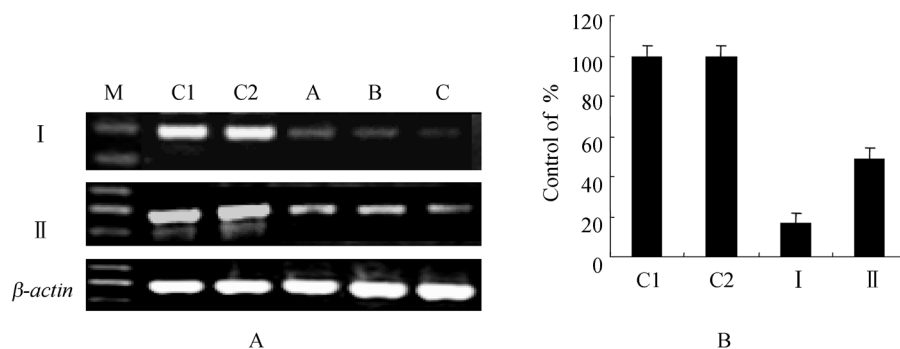


图 2 siRNA 表达载体对 *Sry* 基因抑制效果

A: RT-PCR 检测 siRNA 表达载体对 *Sry* mRNA 表达影响; B: 对 RT-PCR 图像光密度结果分析。

M: 100 bp DNA Marker; C1: 注射生理盐水对照组; C2: 注射 pSilencer4.1-CMV neo 质粒对照组; A, B, C: 注射 siRNA 表达载体的处理胚胎; : p565 处理组 *Sry* 的相对表达量; : p217 处理组 *Sry* 的相对表达量。

Fig. 2 The effect of siRNA expression vectors on *Sry* silencing

A: Changes of *Sry* mRNA by RT-PCR; B: Results of image analysis of changes of *Sry* mRNA.

M: 100 bp DNA ladder plus; C1: Controls injected with normal sodium; C2: Controls injected with pSilencer4.1-CMV neo plasmid; A, B, C: Embryos injected with siRNA expression vector; : The relative expression level of *Sry* treated with p565; : The relative expression level of *Sry* treated with p217.

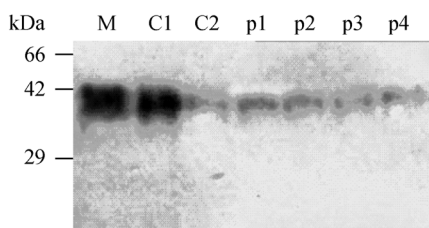


图 3 Western-blot 检测 SRY 蛋白表达

M: 蛋白 Marker; C1: 注射生理盐水对照组; C2: 注射 pSilencer 4.1-CMV neo 质粒对照组; p1~p5: 经 siRNA 表达载体 p565 处理的胚胎个体。

Fig. 3 Identification the changes of SRY protein by Western-blot

M: Protein Marker; C1: Controls injected with normal sodium; C2: Controls injected with pSilencer 4.1-CMV neo plasmid; p1~p5: Embryos treated with siRNA expression vector p565.

2.3 *Sry* 基因沉默后, *Wtl*, *Sox9*, *Sfl*, *Gata4*, *Dax1* 和 *Amh* 基因的表达变化

经 RT-PCR 和实时定量 PCR 检测, 在 *Sry* 基因表达抑制后 *Wtl* 基因的表达水平相对于对照组显著上升, 约上升 30%(图 4); *Amh* 基因则在 *Sry* 基因表达

下降后在 11.5 dpc 的雄性胚胎中检测不到表达; *Dax1*, *Sfl*, *Gata4* 和 *Sox9* 基因的 mRNA 表达水平与对注射阴性对照质粒 pSilencer4.1-CMV neo 的对照组无显著差异, 表明 *Sry* 基因沉默并不能直接影响 *Dax1*, *Sfl*, *Gata4* 和 *Sox9* 基因的表达。如表 2 所示。

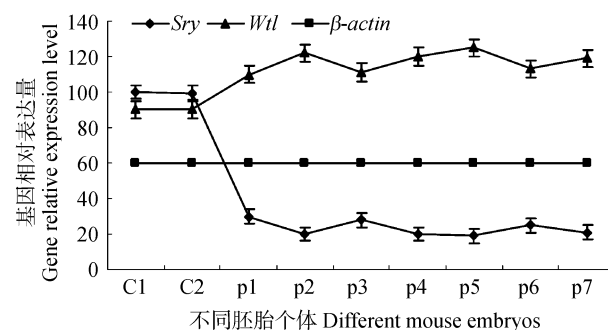


图 4 *Wtl* 基因表达随 *Sry* 基因抑制的变化曲线

C1: 注射生理盐水的对照胚胎; C2: 注射 pSilencer4.1-CMV neo 对照质粒胚胎; p1~p7: 经 siRNA 表达载体 p565 处理的胚胎。

Fig. 4 *Sry* silencing resulted in up-regulation of *Wtl* in embryos

C1: Control mock inject with normal sodium; C2: Control mock inject with pSilencer4.1-CMV neo plasmid; p1~p7: Embryos treated with siRNA expression vector p565.

表 2 *Sry*, *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4*, *Sox9* 和 *Amh* mRNA 与 β -actin mRNA 比值百分率变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative genes expression of *Sry*, *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4*, *Sox9* and *Amh*

组别 Group	<i>Sry</i> / β -actin	<i>Wtl</i> / β -actin	<i>Sox9</i> / β -actin	<i>Sfl</i> / β -actin	<i>Gata4</i> / β -actin	<i>Dax1</i> / β -actin	<i>Amh</i> / β -actin
pSilencer 4.1-CMV neo	98.85 \pm 10.11	117.31 \pm 9.70	62.57 \pm 3.34	75.98 \pm 9.69	60.22 \pm 5.37	93.24 \pm 8.17	—
p565	25.43 \pm 4.43**	87.83 \pm 5.21**	69.83 \pm 10.93	73.86 \pm 2.31	57.61 \pm 8.11	89.43 \pm 12.28	—

注: 表中各个基因 mRNA 与 β -actin mRNA 比值均 $\times 10^{-2}$; “***” 表示与注射干扰质粒 p565 的处理组与注射阴性对照质粒 pSilencer4.1-CMV neo 的对照组比较差异极显著($P < 0.01$), 无标志的表示上述两组相比无显著差异。

Notes: The ratio of the mRNA of genes and β -actin are multiplied 10^{-2} ; Means with the “***” the p565 treated embryos compare with the control were significantly deviation, these are have no signals marked means the two groups have no significant deviation.

3 讨论

哺乳动物的性别决定过程被认为是以 *Sry* 基因为主导的一系列上游基因和下游基因参与且相互作用的复杂过程, *Sry* 基因的表达打开了雄性发育通路, 使未分化的两性生殖腺向雄性方向发展^[3]。 *Sry* 基因编码的含有一个保守的 HMG 区域的蛋白—SRY, 作为转录因子激活一系列基因的表达。近年来通过对性反转和性腺发育综合症患者的研究已经发现了许多对性别决定和性别分化起重要作用的基因, 然而这些基因与 *Sry* 基因的相互作用及基因之间的相互关系还没有明确^[23]。小鼠的 *Sry* 基因在 10.5 dpc 在生殖脊中开始表达, 11.5 dpc 时达到高峰, 此后迅速下降, 到 12.5 dpc 已经检测不到 *Sry* 基因的表达。 *Sry* 从生殖脊前端开始表达到最后终止于睾丸, 整个表达过程不过两天^[3,17], 每一细胞表达 *Sry* 的时间也就仅仅几小时。 *Sry* 基因的时空表达特异性使其在体外难于建立表达 *Sry* 的细胞分析系统, 导致研究进展缓慢。RNAi 技术的发展为我们研究 *Sry* 基因提供了新思路。本研究中应用 siRNA 表达载体介导的 RNAi 技术特异性地沉默了发育中的小鼠胚胎 *Sry* 基因的表达, 表明 RNAi 技术可成功应用于哺乳动物活体起到特定基因沉默的效果。

为了观察在 *Sry* 基因沉默后对其他性别决定基因的表达影响, 我们在参与性别决定和分化的多个基因中选择了与 *Sry* 基因关系密切的 6 个基因, *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4*, *Sox9* 和 *Amh* 基因。一方面, 这几种基因被认为是 *Sry* 的上游作用基因或下游作用基因, 在性别决定过程中发挥着重要作用^[3,4]。另一方面, 参与哺乳动物性别调控的许多基因同 *Sry* 相似也具有时空表达特异性。为了考察 *Sry* 基因的表达抑制效果, 取胚胎的时间选择在 *Sry* 基因表达高峰的 11.5 dpc。在此之前 *Sry* 基因表达丰度低, 不易检测基因的表达也不利于抑制效果的观察, 而在此之后基因表达迅速下降也不能确切地考察基因的表达抑制效果。近几年通过细胞和基因芯片对性别决定相关基因的表达分析, 表明在 *Sry* 基因表达之前可见 *Wtl*, *Dax1*, *Sfl*, *Gata4* 等因子的表达^[22,23]。在 *Sry* 基因表达之后 *Sox9* 基因立即表达, 11.5 dpc 表达水平接近峰值^[15~17]。 *Amh* 也在 *Sry* 基因表达 20 h 之后开始表达, 在 11.5 dpc 可能有微量表达^[4]。此外, 在 *Sry* 基因表达之后, 约 12.5 dpc 可见 *Dmrt1*, *Dhh* 等基因的表达^[23], 但由于在 11.5 dpc 的小鼠胚胎中没有表达, 因而在本

实验中无法考察。

前期的研究表明 *Wtl* 基因(Wilms tumor gene1, 威尔姆斯瘤基因)的缺失导致 *Sry* 基因表达下调。 *Wtl* 基因首先是在 Denis-Drash 症候群(DDS)中发现的, *Wtl* 在中肾和生殖嵴中(小鼠 9 dpc)表达, 对早期性腺发育、生殖细胞分化和睾丸体细胞系的分化、形成均起重要作用。雄性 *Wtl* 基因敲除小鼠缺乏性腺并出现 XY 基因型完全性反转的雌性表型, 在人类 WT1 蛋白可以和 SRY 的启动子相互结合并使启动子的活性增强^[7]。这些研究似乎都表明在哺乳动物的性别决定级联反应中 *WT1* 基因位于 *SRY* 的上游调控性腺的分化。然而在鼠的 *Sry* 启动子区域内不存在保守的 *Wtl* 基因结合位点, 因此有人提出在多能分化的细胞中 *Wtl* 的表达是受 *Sry* 调控的^[6]。在本研究中, 当在小鼠胚胎性别分化时期沉默 *Sry* 基因的表达, *Wtl* 基因表达明显上调。在 Masanori 等^[8]的研究也证实小鼠的中肾中分离的 M15 细胞系中导入表达 *Sry* 基因的载体导致 *Wtl* 基因表达下调。基于以上实验事实我们推测 *Wtl* 基因在性腺分化过程中可能起到双重作用: 一方面 *Wtl* 可作为转录激活剂, 激活 *Sry* 基因的表达; 另一方面, *Sry* 基因表达又导致 *Wtl* 基因表达下调, 从而形成一种负反馈调节机制。这一观点还需要进一步的研究来证实。

Sox9(*Sry*-related HMG box-9)基因是 *Sry* 的同源基因, 是雄性特异表达基因, 对睾丸的形成和发育起重要作用。 *Sox9* 是继 *Sry* 表达之后第一个在支持细胞前体细胞中表达的基因, 且 *Sox9* 的表达总与睾丸发育密切相关^[3,15,16]。因此, *Sox9* 基因被认为是 *Sry* 直接作用的最佳候选基因。在小鼠体内 *Sry* 表达后即可见到 *Sox9* 的表达大量增加, 并由细胞质向细胞核内迁移。在 10.5 dpc 时, 仅仅在 *Sry* 表达之后便可在支持细胞中可检测到 *Sox9* 的微量转录本, 在 11.5 dpc 时 *Sox9* 在发育中的 XY 型性腺中表达量急速上升接近表达高峰, 此后持续在睾丸中高水平表达^[17]。因此, 推断 *Sry* 可以直接或间接地调控 *Sox9* 的表达。本研究中 *Sry* 基因表达抑制后, *Sox9* 基因的表达并没有受到显著影响, 提示 *Sry* 上调 *Sox9* 基因的表达可能需要其他辅助因子的协同作用。

抗缪勒氏管激素 *Amh*(Anti-Müllerian Hormone, 或缪勒氏管抑制物, Müllerian-Inhibiting Substance, MIS)由睾丸支持细胞和卵巢颗粒细胞分泌, 具有抑制雄性缪勒氏管发育、调节两性生殖细胞和性腺发育的重要作用。 *Amh* 被列为 *Sry* 下游基因的候选基因,

因其在 *Sry* 基因表达约 20 h 后表达,且在 *Amh* 基因的启动子区域存在 *Sry* 结合位点^[24]。为研究它们之间的相互关系,我们对 *Amh* 基因进行了考察,但在本研究中无论在对照组中还是 siRNA 表达载体处理组,在 11.5 dpc 的小鼠胚胎中都没有检测到 *Amh* 基因的表达。分析其原因,可能是 *Amh* 在 11.5 dpc 的小鼠胚胎生殖脊中还没有开始表达 *Amh* 基因表达的确切时间还需要大量的实验验证。

在小鼠上, *Dax1* 基因起初在两性生殖脊中都有表达且几乎与 *Sry* 同时表达,在 *Sry* 表达上调后可以观察到 *Dax1* 在雄性睾丸中表达下调,之后, *Dax1* 在雄性睾丸中表达关闭而只在雌性卵巢中表达^[4]。人和鼠 *Dax1* 基因加倍都会引起 XY 型性反转,表明 *Dax1* 可能是 *Sry* 的拮抗因子,前者增量表达可以使性腺向卵巢方向发育,后者可以抑制前者的活性使性腺向睾丸方向发育^[14]。 *Sfl* 和 *Gata4* 因子作为转录因子参与性腺发育的调节。Schmahl 等^[25] 研究发现,小鼠中 *Sfl* 最初广泛表达在未分化的性腺中,而在 *Sry* 表达之前便仅限制在 Sertoli 细胞中表达。 *Sfl* 可以和 *Sry* 启动子上的 -315 bp 的序列结合^[26, 27],表明 *Sfl* 可能是 *Sry* 的调控因子。 *Gata4* 因子在 11.5 dpc 在两性生殖脊腺中都有表达,之后在雄性发育中的睾丸的 Sertoli 细胞和支持细胞中表达,对雄性性别分化起重要作用^[12, 13]。在本研究中, *Sry* 基因沉默后, *Dax1*, *Sfl* 和 *Gata4* 基因的表达未发生明显变化,表明 *Sry* 不能直接调控 *Dax1*, *Sfl* 和 *Gata4* 基因的表达,同时也证实了 *Sfl* 和 *Gata4* 基因位于 *Sry* 基因的上游在性腺分化中发挥作用的观点。

本研究应用 siRNA 表达载体在哺乳动物体内成功实现抑制 *Sry* 基因的表达,并观测到 *Sry* 基因沉默对性别决定通路中其他基因表达的影响,为性别决定机理的揭示提供了新思路。哺乳动物性别决定和性别分化过程是一个多基因参与调控的非常复杂的过程,基因之间的确切作用关系还需要进一步的试验研究证实。

参考文献(References):

- [1] Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 1990, 346(6281): 240–244. [\[DOI\]](#)
- [2] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*, 1991, 351(6322): 117–121. [\[DOI\]](#)
- [3] Harley VR, Arkson MJ, Gentaro A. The molecular action and regulation of the testis determining factors, SRY and Sox9. *Endocrine Reviews*, 2003, 24(4): 466–487. [\[DOI\]](#)
- [4] Amanda S, Robin LB. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & Development*, 1999, 13(7): 755–767.
- [5] Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(8): 1500–1501. [\[DOI\]](#)
- [6] Toyooka Y, Tanaka S, Hirota O, Takagi N, Yamanouchi K, Tojo H, Tachi C. Wilms'tumor suppressor gene (Wt1) as a target gene of SRY function in a mouse ES cell line transfected with SRY. *Int J Dev Biol*, 1998, 42(8): 11433–1151. [\[DOI\]](#)
- [7] Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of Wt1. *J Biol Chem*, 2001, 276(20): 16817–16823. [\[DOI\]](#)
- [8] Ito M, Miyagishi M, Murata C, Kawasaki H, Baba T, Tachi C, Taira K. Down-Regulation of endogenous Wt1 expression by *Sry* transgene in the murine embryonic mesonephros-derived M15 cell line. *J Reprod Dev*, 2006, 52(3): 415–427. [\[DOI\]](#)
- [9] Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol*, 1994, 8(5): 654–662.
- [10] Munsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-Mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*, 1991, 113(2): 613–624. [\[DOI\]](#)
- [11] Jeske YW, Mishina Y, Cohen DR, Behringer RR, Koopman P. Analysis of the role of *Amh* and *Fra1* in the *Sry* regulatory pathway. *Mol Reprod Dev*, 1996, 44(2): 153–158. [\[DOI\]](#)
- [12] Tremblay JJ, Viger RS. GTAT4 factor differentially active multiple gonadal promoters through GATA regulatory elements. *Endocrinology*, 2001, 142(3): 977–986. [\[DOI\]](#)
- [13] Bielinska M, Seehra A, Toppari J. GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse. *Dev Dyn*, 2007, 236(1): 203–213. [\[DOI\]](#)
- [14] Bouma GJ, Albrecht KH, Washburn LL, Recknagel AK, Churchill GA, Eicher EM. Gonadal sex reversal in mutant *Dax1* XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. *Development*, 2006, 132(13): 3045–3054. [\[DOI\]](#)
- [15] Knower KC, Kelly S, Harley VR. Turning on the male SRY, SOX9 and sex determination. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101(3): 185–198. [\[DOI\]](#)
- [16] Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G, Lovell-Badge R. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol*, 2004, 274(2): 271–279. [\[DOI\]](#)
- [17] Kanai Y, Hiramatsu R, Matoba S, Kidokoro T. From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *J Biochem*,

- 2005, 138(1): 13–19. [\[DOI\]](#)
- [18] ZHAO Jin-Hong, DU Wei-Hua, DAO Er-Ji, PEI Jie, ZHANG Li, LIN Xiu-Kun. Study on the RNA interference of Sry in mouse embryos. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33(9): 890–894.
赵金红, 杜卫华, 道尔吉, 裴杰, 张丽, 林秀坤. 小鼠胚胎 Sry 基因的 RNA 干扰研究. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(9): 889–894.
- [19] Gratsch TE, De Boer LS, O'Shea KS. RNA inhibition of BMP-4 gene expression in postimplantation mouse embryos. *Genesis*, 2003, 37(1): 12–17. [\[DOI\]](#)
- [20] O'Shea KS, De Boer LS, Slawny NA, Gratsch TE. Transplacental RNAi: deciphering gene function in postimplantation-staged embryo. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 2006(4): 18657–18661.
- [21] KE Bing-Shen, LI Guang-Yun, CHEN Shi-Min, HUANG Xiang-Yan, CHEN Ying-Jian, XU Jun. A new method of processing quantitative PCR Data. *Hereditas(Beijing)* 2003, 25(3): 322–326.
克丙申, 李广云, 陈世敏, 黄象艳, 陈英剑, 徐军. 量 PCR 数据处理方法的理论探讨. *遗传*, 2003, 25(3): 322–326.
- [22] Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 1–28. [\[DOI\]](#)
- [23] Greenfield A. Applications of DNA microarrays to the transcriptional analysis of mammalian genomes. *Mamm Genome*, 2000, 11(8): 609–611. [\[DOI\]](#)
- [24] Small CL, Shima JE, Uzumcu M, Skinner MK, Griswold MD. Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. *Biol Reprod*, 2005, 72(2): 492–501. [\[DOI\]](#)
- [25] Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA. Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science*, 1994, 266(5190): 1494–1500. [\[DOI\]](#)
- [26] Schmahl J, Eicher EM, Washburn LL, Capel B. Sry induces cell proliferation in mouse gonad. *Development*, 2000, 127(1): 65–73.
- [27] De Santa Barbara P, Méjean C, Moniot B, Malclès MH, Berta P, Boizet-Bonhoure B. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod*, 2001, 64(3): 775–783. [\[DOI\]](#)

第十四届国际植物铁营养与相互作用及中国生物强化 2008年年会联合研讨会

“植物铁营养与相互作用国际研讨会”是一个国际例会，从上世纪七十年代开始，每两年举办一次。其目的是聚集各国从事植物铁营养研究方面的科学家进行交流，讨论植物铁营养所影响同时受之影响的各种因素(包括土壤、微生物、植物、动物等)及其相互之间的作用，促进该领域的国际交流和发展，揭示植物对土壤中铁的活化、吸收、代谢以及积累的生理及分子机制，通过育种和栽培措施减轻由于土壤缺铁胁迫和高铁毒害对世界农业生产的影响。前 13 届会议在美国和欧洲及日本等国召开，这次会议首次在中国举办，对促进我国在该领域的研究和加强国际间的交流与合作有着重要意义。

国际 HarvestPlus 项目是在国际热带农业研究所(CIAT)与国际食物政策研究所(IFPRI)两个非赢利国际农业机构下的国际合作计划，其使命是通过农作物育种(生物强化)减少和预防全球性的、尤其是发展中国家普遍存在的人体铁、锌和维生素 A 等隐性饥饿问题。在范云六院士、HarvestPlus 国际项目主席 Howdy Bouis 博士以及雷新根博士(康乃尔大学副教授)的共同努力和推动下，HarvestPlus-China(中国生物强化项目)于 2005 年正式启动，每年举办研讨会，讨论该项目的研究进展。

鉴于“植物铁营养与相互作用国际研讨会”和“HarvestPlus-China 年会”研讨的内容有很好的互补性。本届“国际植物铁营养及相互作用研讨会”将与中国生物强化项目(HarvestPlus-China)2008 年年会组成联合论坛，将植物铁营养与人类铁营养的研讨内容有机整合，形成一个整体。会议主题是“植物铁营养与人体健康”。从事植物营养、作物育种、动物和人类营养等相关领域的科学家将汇聚一起，对(1)环境中的铁化学、及与微生物和植物的互作，(2)植物缺铁、铁毒害的诊断及补救措施，(3)植物铁的吸收与调控，(4)铁在植物体内的转运、分配及调控，(5)植物铁代谢与蛋白质组学，(6)铁与其它元素的互作及植物修复，(7)铁的生物强化与人体健康和(8)中国生物强化项目 2008 年年会这 8 个议题的最新研究进展进行交流和讨论。

主 办：中国科学院遗传与发育生物学研究所

协 办：中国生物强化项目(HarvestPlus-China)委员会；中国农业科学院作物科学研究所；中国农业大学；北京师范大学
会期与地点：2008 年 10 月 11–16 日；北京九华山庄

会议网站：<http://www.conferencenet.org/conference/isinip.htm>

联系人：张佰茹, Tel: 010-64854467, E-mail: brzhang@genetics.ac.cn