

脊椎动物性别决定和分化的分子机制研究进展

周林燕, 张修月, 王德寿*

(西南师范大学 生命科学学院, 重庆 400715; 重庆市水产科学技术重点实验室 重庆 400715)

摘要: 哺乳类性别决定是多种转录因子和生长因子相继表达和相互调控的结果。SRY 的表达启动雄性通路并诱导下游雄性特异基因 SOX9、AMH 等的表达。FOXL2 在雌性未分化性腺表达, WNT-4 和 DAX1 也在雌性性别决定或分化时期表达, 表明雌性通路也是受特定基因调控的, 而并非“默认通路”。鸟类的性别也是由遗传基因决定的, EFT1 (雌性) 和 DMRT1 (雄性) 可能是性别决定候选基因。爬行类为温度性别决定的典型, 温度可能通过调节雌激素水平和控制性别特异遗传基因表达决定性别。大部分两栖类性别受环境因素影响, 但发现 DMRT1 和 DAX1 可能与其精巢发育有关。鱼类性别决定和分化方式差异很大, 多种因素 (遗传基因、环境因素、类固醇激素等) 参与了这一过程。从青鳉 Y 染色体定位克隆的 DMY, 被认为是第一个非哺乳类脊椎动物雄性性别决定基因。所有这些表明脊椎动物性别决定和分化机制是多样化的。

关键词: 脊椎动物; 性别决定与分化; 分子机制

中图分类号: Q959.3; Q756 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 5853(2004)01 - 0081 - 08

Advances on Molecular Mechanism of Sex Determination and Differentiation of Vertebrates

ZHOU Lin-yan, ZHANG Xiu-yue, WANG De-shou*

(Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In mammal, sex determination and differentiation are the consequence of sequential expression and interaction between many transcription factors and growth factors. The expression of SRY initiates the male pathway and induces the expression of many male specific genes, such as SOX9, AMH etc. The expression of FOXL2 in the undifferentiated ovary, and WNT-4 and DAX1 in female pathway made it no longer to be regarded as default pathway. Sex determination in birds is also controlled by genetic factors. EFT1 (female) and DMRT1 (male) were recommended recently as possible candidate genes for sex determination in birds. Many reptiles exhibit typical temperature sex determination. Temperature regulates the estrogen level and the sexual dimorphic expression of DMRT1 and SOX9 in the embryonic gonads during temperature sensitive period. Sex determination in the majority of amphibians is probably controlled by environmental factors, however, genetic factors such as DMRT1 and DAX1 may be involved in the differentiation of testis. Mechanisms of sex determination and differentiation vary considerably in fish. Many factors, especially sex steroidal hormones, were involved in the process. DMY, isolated by positional cloning in medaka, was regarded as the first sex-determining gene in non-mammals. All these seem to indicate that molecular mechanisms of vertebrate sex determination and differentiation are diversified.

Key words: Vertebrate; Sex determination and differentiation; Molecular mechanism

性别决定是指决定未分化性腺向精巢方向发育, 还是向卵巢方向发育的过程。而性别分化则是指建立功能型性别、性别二态型和次级性征的所有形态和生理变化。脊椎动物性别决定机制大致可以

分为遗传性别决定 (genetic sex determination, GSD) 和环境性别决定 (environmental sex determination, ESD)。高等脊椎动物, 如哺乳类和鸟类的胚胎性别主要由性染色体上的遗传基因决定; 而低

* 收稿日期: 2003 - 07 - 04; 接受日期: 2003 - 10 - 16

基金项目: 教育部国际合作与交流项目研究基金 (教外司留 [2001] 345 号); 重庆市科委应用基础项目 (2001 - 6845)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wdeshou@swnu.edu.cn

等脊椎动物, 由于进化的原始性, 很多种类两性性染色体无差异, 有的甚至完全缺乏性染色体, 因而胚胎发育过程中外界环境的变化可以完全掩盖遗传因素的作用, 从而成为性别发育的决定因素。长期以来, 性别决定机制的研究主要集中在哺乳类, 特别是人类本身。因而对哺乳类性别决定的机制有了一定程度的认识, 而对其他脊椎动物性别决定机制的研究相对薄弱。近年来, 在其他脊椎动物中克隆了许多在哺乳类性别决定中起作用的同源基因, 为从进化角度阐述脊椎动物性别决定和分化的分子机制提供了依据。本文简要综述了这方面的研究进展。

1 哺乳类

哺乳动物的未分化性腺来源于中肾附近的泌尿生殖嵴。WT1 (Wilms' Tumor gene) \ LHX-9 (Lim homeobox gene 9) \ SF1 (steroidogenic factor 1) 及其他未知的转录因子在未分化性腺形成中有重要作用。小鼠 WT1 等位基因灭活 (inactivation of both WT1 alleles) 后的胚胎性腺和肾脏不能正常发育, 并且 WT1 等位基因灭活对小鼠是致死的 (Kreidberg et al, 1993)。LHX-9 缺陷小鼠的性腺无分泌功能 (Birk et al, 2000)。而 SF1 是人类和小鼠性腺和肾上腺发育必不可少的: SF1 异源灭活突变 (heterozygous inactivating mutation) 的病人出现性逆转, 并且肾上腺不能形成; 小鼠 SF1 等位基因灭活导致肾上腺和性腺不能形成。Wilhelm & Englert (2002) 证明, WT1 和 LHX-9 直接与 SF1 启动子结合, 进而激活和调节 SF1 的表达; SF1 启动子上分别有 4 个 WT1 和 1 个 LHX-9 结合位点。并且发现 WT1^{-/-}小鼠无 SF1 的表达, 而 LHX-9^{-/-}个体的 SF1 表达水平最低。虽然 WT1、LHX-9 和 SF1 在 SRY (sex determination region of Y chromosome) 上游表达, 但 SRY 的表达似乎并非由三者直接调节。Tevosian et al (2002) 发现, 小鼠 SRY 的表达需要 GATA4 (GATA zinc-finger transcription factor 4) 和 FOG2 (friend of GATA) 的协同作用。小鼠 FOG2 纯合子等位基因缺失 (homozygous for a null allele) 或 GATA4 纯合子定点突变 (homozygous for a targeted mutation), 会消除 GATA4 和 FOG2 联合因子的相互作用, 导致性腺形成异常。在正常发育 11.5 天 XY 胚胎性腺, SRY 的表达将达到峰值。而 FOG2^{-/-}XY 胚胎性腺, SRY 的表达却远远低于正常

水平。同样在 GATA4^{KI/KI}XY 性腺, 直到 13.5 天, 胚胎仍无精索形成, 而与 XX 性腺结构相似。另外, Sertoli 细胞的 3 个 Marker 基因 SOX9 (SRY related HMG box gene 9) \ AMH (anti-Mullerian Hormone) 和 Dhh (desert hedgehog gene) 与 Leydig 细胞中主要的 3 种类固醇合成酶 (P450SCC、 β -HSD 和 P450c17) 在 FOG2^{-/-}和 GATA4^{KI/KI}个体的性腺无表达, 而雌性特异基因 WNT-4 (wingless-related MMTV integration site 4) 却出现异位表达。

SRY 作为雄性发育的总开关基因 (master switch), 其表达将启动下游一系列诱导精巢分化的遗传变化和细胞活动: SOX9 是 SRY 仅有的直接调节目标基因, 在 SRY 表达后被激活, 并出现雄性特异上调 (Lovell-Badge, 2002); SOX9 在下游将与 WT1、SF1 协同作用激活 AMH 的表达, 进而抑制缪勒氏管发育。而 DAX1 (DSS-AHC on X chromosome, number 1) 在此过程中可能与 SF1 拮抗而抑制 AMH 的激活。DAX1 在精巢分化中调节精小管肌质细胞的发育, 进而影响精索的形成: DAX1 突变的雄性小鼠, 由于围绕精索的精小管基质细胞数量大大减少, 因而基质细胞和 Sertoli 细胞将形成不连续的基底膜, 从而导致精索呈开放状。DAX1 突变的 XY 小鼠, SRY 的表达接近野生型, 只是下游 SOX9 的表达大大减少。因此 DAX1 不是通过与 SRY 对抗诱导性逆转, 而是在 SRY 的下游和 SOX9 的上游起作用, 使雄性发育紊乱 (Meeks et al, 2003; Argente et al, 2003)。DMRT1 (DM-related transcription factor, number 1) 在哺乳类雄性发育中有重要作用: 小鼠胚胎两性未分化生殖嵴 DMRT1 的表达水平相似, 在分化阶段出现精巢特异表达上调, 在卵巢中的表达量减少 (Raymond, 1999a)。人类 DMRT1 若处于半合子状态, 则导致精巢发育缺陷而产生 XY 雌性 (Raymond, 1999b)。另一方面, 生长因子基因 (BMP/TGF、FGF、WNT 等) 在性腺分化中调节转录因子的活动, 如: FGF9 (fibroblasts growth factor 9) 在 SRY 的下游激活间充质细胞的增殖、中肾细胞的迁移和 Sertoli 前体细胞的分化。FGF9 的表达模式是在交配后 11.5 ~ 13.5 天出现雄性特异上调, 所以认为它可能在 SOX9 的激活和表达量上调中有重要作用 (Schmahl & Capel, 2003)。而 WNT-4 在雌性高水平的表达将使 DAX1 的表达上调, 同时间接地通过 SF1 抑制 AMH 在雌性的表达 (Morohashi, 2002)。

SRY 的表达可启动未分化 XY 性腺在 48 h 内完成精巢形态分化。其主要过程包括 Sertoli 前体细胞增殖, 中肾内源性细胞和内源性相关细胞向性腺迁移, 雄性特异的微管化 (vasculization) 以及其他细胞的分化, 进而形成雄性特异的两个区: 精索 (基质细胞包围着 Sertoli 细胞) 和间质区 (包含 Leydig 细胞) (Tilman & Capel, 2002)。研究发现, 信号通路分子 *FGF9*、*PDGFR α* (platelet-derived growth factor receptor α)、*PDGF* (platelet-derived growth factor) 和 *Dhh* 在此过程中有重要作用。定点敲除小鼠 *FGF9*, 将减少 XY 胚胎性腺 Sertoli 前体细胞的增殖, 致使精索不能正常形成; 甚至由于 Sertoli 细胞数量减少到低于雄性发育的阈值, 而导致性逆转发生。*PDGF* 作用于 *PDGFR α* , 在中肾内源性细胞或内源性相关细胞向性腺迁移中有重要作用, 其突变将影响迁移细胞的诱导和迁移模式的形成。*Dhh* 则主要作用于 *PDGFR α* , 在促进精索形成和 Leydig 细胞分化中发挥重要作用。但精巢 Leydig 细胞的发育明显迟于 Sertoli 细胞, 并受 Sertoli 细胞分泌因子的调控。因为 Sertoli 细胞在早期发育紊乱, Leydig 细胞的分化将被阻断, 并且类固醇合成过程中的关键酶 P450_{scc}、3 β -HSD 和 P450_{c17} 的 RNA 转录也将消失 (Capel, 2002)。

雌性通路可能并非是缺少 *SRY* 基因的默认通路, 而可能被特异的基因所调节。信号分子 *WNT-4* 在雌性发育中可能有重要作用。Vainio et al (1999) 认为 *WNT-4* 在雌性发育通路的缪勒氏管形成、间质细胞系分化、卵原细胞发育等不同阶段起作用。原因是 *WNT-4* 突变 XX 小鼠胚胎将产生缪勒氏抑制物质, 吴氏管继续发育, 而部分 *WNT-4* 突变胚胎将出现性逆转; *WNT-4* 突变 XX 性腺有雄性类固醇合成通路的关键性酶异常表达, 在出生后卵巢的卵原细胞数量减少且不育, Sertoli 细胞标志基因如 *Dhh*、*AMH* 和 *SOX9* 被激活。Jordan et al (2001) 通过离体转染 *WNT-4* 后发现, 无论是在 Leydig 细胞, 还是 Sertoli 细胞, *WNT-4* 都使 *DAX1* 的表达上调。而在 *WNT-4* 基因敲除的小鼠, *DAX1* 的表达水平明显降低。另外, *WNT-4* 和 *DAX1* 都存在剂量敏感性逆转, 二者的过量表达都能使 XY 胚胎发生性逆转 (Swain et al, 1998)。Swain (2002) 进一步发现, *WNT-4* 在雌性发育中可能起抑制中肾内源性细胞向卵巢迁移的作用, 因为 XX 小鼠 *WNT-4* 突变卵巢将形成异常腔状血管, 这种

结构仅在野生型小鼠精巢中出现。离体培养实验也发现, *WNT-4* 突变 XX 性腺将诱导内源性细胞从中肾向性腺迁移, 并且 *WNT-4* 的雌雄表达模式也与这一作用相向吻合: 雌性 *WNT-4* 在卵巢发育的整个阶段都有表达, 而在精巢分化时期出现明显的下调。而卵泡抑素 (follistatin, *Fst*) 在 *WNT-4* 的下游抑制 XX 性腺发生 XY 性腺特有的微管化, 并且能维持 XX 性腺体腔一侧的减数分裂生殖细胞的成活 (Yao et al, 2003)。

另外, *FOXL2* (forkhead/winged helix transcription factor gene 2) 是一种在眼睑、胎儿及成体卵巢滤泡细胞中特异性表达的转录因子。它的突变将导致眼睑畸形和卵巢发育受阻。*FOXL2* 是目前发现的哺乳动物卵巢发育中最早的标志性启动基因 (Marker), 在性别决定前的雌性生殖嵴和后来的 22 周和 29 周胎儿滤泡细胞和基质细胞中表达, 并且这种高水平表达模式一直持续到成体, 因此认为 *FOXL2* 在卵巢滤泡细胞发育中有重要作用 (Julie et al, 2003)。

2 鸟 类

鸟类和哺乳类都是典型的遗传性别决定。但哺乳类是雌性同配 (XX), 雄性异配 (XY)。而鸟类 (平胸类除外) 是雌性异配 (ZW), 雄性同配 (ZZ)。并且鸟类和哺乳类性染色体没有明显的同源性, 可能由不同的常染色体进化而来。迄今为止, 在鸟类中尚未发现类似哺乳动物 *SRY* 的性别决定总开关基因。关于性别决定有 W 显性基因、Z 染色体剂量和共同作用 (Tian, 1996) 3 种假说。

长期以来, 人们一直认为类似哺乳动物 *SRY* 性别决定基因存在于异配染色体上, 所以一些雌性 W 染色体特异基因近年相继被克隆, 如: *CHD-W* (chromo-domain-helicase-DNA-binding protein) ASW (avian sex-specific ω -linked) 和 *EFT1* (female-expression transcript, number 1) 等。*CHD-W* 基因位于 W 染色体上, 与老鼠的 *CHD1* 高度保守同源, 可以通过改变染色体结构调节转录, 但表达模式和功能尚未见报道 (Ellegren, 1996)。原位杂交发现, ASW 的 mRNA 在卵巢髓质中高水平表达, 而雄性则完全缺乏。ASW 早在 4.5 天胚胎未完全分化的卵巢就有表达, 并在卵巢分化的整个阶段和成体卵巢都有表达 (O'Neill et al, 2000)。EFT1 与已知的基因没有同源性, 并且仅在将发育为雌性性腺的性分化时

期表达。而通过鸟类逆转录病毒使 *EFT1* 在 ZZ 雄性过量表达, 将会诱导雄性到雌性的性逆转。表明该基因在鸟类雌性性别决定中可能有重要作用 (Smith, 2002)。

另一方面, 较多的研究认为, 位于 Z 染色体上的 *DMRT1* 极可能是鸟类雄性性别决定候选基因。*DMRT1* 在鸡胚胎泌尿生殖嵴有特异性表达, 并且早在 4.5 天胚胎就出现雌雄两性差异性表达, 雄性性腺明显高于雌性。*DMRT1* 在 ZW 雌性中的过量表达可以引起性逆转。此外, *DMRT1* 的表达在用芳化酶抑制剂 (fadrozole) 处理得到的由雌性到雄性的性逆转性腺中达到正常雄性胚胎水平, 同时 *SOX9* 的表达也被激活 (*SOX9* 的激活明显迟于 *DMRT1* 的上调), 因此认为 *DMRT1* 表达水平上调在本质上与精巢发育有关 (Smith et al, 2003)。鸟类是否存在类似哺乳类的剂量补偿作用一直有争议。鸟类可能不存在 Z 染色体失活, *DMRT1* 的表达水平与 Z 染色体的数量有关, 因为雄性两个拷贝 (ZZ) 的表达高于雌性 (ZW) (Smith et al, 1999)。

3 爬行类

爬行类是温度依赖性别决定 (temperature sex determination, TSD) 最典型的代表。研究发现, TSD 在鳄目、龟鳖目、有鳞目广泛存在 (Jiao et al, 2002)。在胚胎孵化的温度敏感期 (temperature sensitive period, TSP), 温度的变化可以完全掩盖遗传因子的作用而影响胚胎性别分化。但用雌激素处理雄性促进温度 (male promoting temperature, MPT) 孵化胚胎, 可以解除 MPT 诱导雄性发育的作用。表明雌激素在爬行类 TSD 中有重要作用。Wibbels et al (1991) 认为, 海龟性腺分化期间的温度和外源雌激素的敏感期是一致的, 二者在诱导性腺分化中有协同作用。Pieau et al (1999) 发现, 芳化酶在未分化性腺和 MPT 孵化胚胎的表达量很低, 而在雌性促进温度 (female promoting temperature, FPT) 孵化胚胎表达水平明显增加; 如果将 MPT 孵化的卵转移到 FPT, 芳化酶的活动就会增加。因此, FPT 可能通过诱导芳化酶的表达上调, 进而与雌激素协同作用促进胚胎雌性分化; 相反, MPT 抑制芳化酶的表达而诱导雄性发育。

虽然爬行类缺少性染色体, 但在性别决定具有温度依赖性的红耳滑龟 (*Trachemys scripta*) (Spotila et al, 1998)、北美短吻鳄 (*Alligator mississippien-*

sis) (Western et al, 1999) 和橄榄龟 (*Lepidochelys olivacea*) (Moreno-Mendoza et al, 1999) *SOX9* 有雄性特异性上调。*SOX9* 的 mRNA 在北美短吻鳄温度敏感末期出现表达上调, 即在精巢分化第一个信号出现后大约 10 天才发生上调, 所以 *SOX9* 不可能在性别决定早期起作用 (Western et al, 1999)。而橄榄龟 *SOX9* 的表达受温度调控: 在雄性和雌性促进温度孵化胚胎的温度敏感期 (21 ~ 25 阶段) 都有表达, 而到雌性促进温度孵化胚胎发育的 26 阶段, *SOX9* 的表达出现下调。*DMRT1* 的表达也是温度依赖的: 在雄性和雌性促进温度孵化胚胎的生殖嵴和中肾复合物都有表达, 但到温度敏感期的 23 ~ 25 阶段, 雄性促进温度发育胚胎性腺的 *DMRT1* 表达水平均高于雌性。因此, *SOX9* 的下调和 *DMRT1* 的上调分别在雌性和雄性温度性别决定中有重要作用 (Torres Maldonado et al, 2002)。

类固醇转录因子 *SF1* 对雌激素合成有重要的调节作用。Western et al (2000) 通过 RT-PCR 分析发现, *SF1* 在北美短吻鳄雌性产生温度胚胎的整个发育阶段 (20 ~ 27) 的表达量不变, 而在雄性产生温度的 23 ~ 25 阶段出现明显下调, 雌性个体芳化酶的表达在这一阶段出现明显上调。另外, *AMH* 在北美短吻鳄发育中仅在精巢有表达, 这种表达在雌性芳化酶上调之前就已经存在, 所以, *AMH* 在雄性促进温度发育胚胎可能抑制芳化酶表达水平的增加。

4 两栖类

两栖类性别决定中温度、类固醇激素、遗传因素的作用都不像其他种类那样典型, 染色体组型也极其复杂 (有 XX/XY 或 ZW/ZZ, 某些种类甚至进化为极不寻常的 OW 雌/OO 雄, 或者是 XX/XY 和 ZW/ZZ 在同种内共存) (Schmid & Steinlein, 2001)。虽然在自然状态下, 环境变化诱导性逆转的例子很少, 但通过改变实验胚胎孵化条件 (如温度、类固醇激素), 很多种类可以改变其性别分化, 而产生完全的性逆转。Wallace & Wallace (2000) 发现, 极端高温或低温能使正常的 XX/XY 系统发生紊乱, 诱导平均一半的蝾螈 (*Triturus cristatus*) 发生性逆转。类固醇激素在蛙性别发育中有重要作用, 但外源类固醇激素处理的作用则没有规律, 即使在种内差别也很大, 甚至完全相反。所以部分两栖类属于 ESD 的种类, 遗传因素在性别决定中可

能也有重要作用。

迄今为止,对两栖类性别分化分子机制的研究较少。Shibata et al (2002) 发现 *DMRT1* 在蛙 (*Rana ragosa*) 性腺中的表达是雄性特异的,而在雌性卵巢无表达。另外, *DMRT1* 的表达在 XX 性逆转性腺大大提高,表明 *DMRT1* 可能在两栖类雄性发育中有重要作用。*DAX1* 在蛙卵巢发育中下调,而如果用睾酮处理诱导遗传上为雌性向雄性的性逆转, *DAX1* 先出现下调,但随后又出现迅速上调,这表明 *DAX1* 在两栖类可能与精巢发育有关 (Sugita et al, 2001)。 *SF1* 在蛙胚胎卵巢无表达,但在精巢、肾脏、肾上腺和成体的脑有表达,所以 *SF1* 在蛙类固醇合成调节系统也有重要作用 (Kawano et al, 2001)。

5 鱼类

鱼类性别决定机制和性腺分化极其复杂。有雌雄异体和一些雌雄同体 (先雌后雄、先雄后雌、雌雄同步) 以及发育过程中的性逆转类型,并且鱼类的染色体组型在不同种类之间存在很大差异 (XX/XY、ZZ/ZW、ZO 以及一些未发现类型)。因此,在鱼类,遗传因素可能只是作为性别发育的基础,提供了两性发育的可能性,而性别分化则是在各种遗传因素和外部环境因子相互作用下实现的。温度、pH 值、盐度、光照、水质、食物丰度和种群内部关系对不同种鱼类的性别决定和分化的影响各不相同,所以鱼类性别决定的机制呈现多样化 (Baroiller & D'Cotta, 2000)。以下主要讨论雌雄异体鱼类的性别决定机制。

鱼类性别分化中一个最显著的特点是:在性腺分化的早期,外源类固醇处理能够改变其性别,而产生完全的性逆转。一般来说,雌激素能使遗传上雄性个体雌性化,而雄激素能使遗传上雌性个体雄性化。在实验室和渔业生产上可以根据需要用雌激素或雄激素处理产生全雄或全雌群体,可见内源性类固醇激素在鱼类性腺分化中有重要作用。关于内源性类固醇激素在鱼类性别分化中的作用存在两种假说,即平衡假说 (Bogart, 1987) 和缺失假说 (Nagahama, 2000)。平衡假说同时强调雌激素和雄激素在性分化中的作用,认为鱼类性腺分化方向主要取决于哪一种性类固醇激素占优势。在性腺分化早期,如果雌激素合成水平高于雄激素,性腺就发育为卵巢,相反则发育为精巢。而这种平衡的改变

(如外源类固醇激素的处理) 能完全改变遗传因素决定的分化通路。例如,芳化酶是催化雌二醇合成的关键酶,而 11β -羟化酶是鱼类雄激素 11-酮基睾酮 (11-KT) 的合成酶。在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的性分化期,芳化酶在所有 XX 性腺呈高水平表达,而在 XY 性腺的表达却很低;相反, 11β -羟化酶和 11-KT 在性分化期的雄鱼表达明显高于雌鱼 (Baroiller & D'Cotta, 2001)。而缺失假说则只强调雌激素在性分化中的作用。例如免疫组化研究表明,罗非鱼性分化期,类固醇生成细胞中类固醇合成关键酶 (P450_{sc}, 3β -HSD, P450_{c17}), 在所有雌性个体孵化后 10 天 (形态性别分化前) 开始表达,但在雄性却是到孵化后 30 天才有微弱的表达 (Nagahama, 2000)。另外,用芳化酶抑制剂阻断虹鳟、罗非鱼雌激素的生物合成,将诱导功能性精巢的产生 (Kitano et al, 1999)。Nagahama (2000) 据此认为:内源性雌激素是卵巢发育的天然诱导物,一旦性腺中有雌激素合成,不论其遗传性别如何,都将发育为卵巢。相反,若发育早期的性腺缺乏类固醇合成 (即雌、雄激素均缺失),则进入雄性通路,发育成精巢。但是,用雄激素处理未分化的 XX 个体能产生性逆转的可育雄性。其合理的解释是,在未分化的 XX 性腺中已经有雄激素受体的表达 (Ikeuchi et al, 1999)。

目前对鱼类性别决定和分化的机制的认识已不仅仅停留在激素水平上,许多哺乳类性别决定同源基因的克隆,为进一步从分子水平上阐明鱼类的性别决定和分化机制奠定了基础。已克隆的基因包括: *DMRT1* (Guan et al, 2000; Marchand et al, 2000)、*DAX1* (Wang et al, 2002)、*SF1* (Watanabe et al, 1999; Yoshiura et al, 2003)、*SOX9* (Yokoi et al, 2002; Zhou et al, 2003)、*DMY* (Matsuda et al, 2002) 等。这些基因在性别决定和分化中的作用值得深入研究。青鳉 (*Oryzias latipes*) *DMY* (DM domain gene on Y-chromosome) 是第一次从非哺乳脊椎动物鉴定出的性别决定候选基因,与 *SRY* 在哺乳类的作用类似。*DMY* 仅在青鳉 XY 性腺体细胞内表达,是雄性正常发育所必需的;且其表达量需达到一定的阈值,减少也将产生 XY 雌性个体;其开放阅读框一个点突变也能诱导 XY 雌性个体产生。但 *DMY* 并不存在于青鳉的所有种系,也未能在其他的硬骨鱼类找到其同源基

因。所以鱼类性别决定不像哺乳类,在不同的种甚至是不同的品系,可能存在不同的性别决定基因(Matsuda et al, 2002)。DMRT1 在罗非鱼成体精巢特异性表达;用雄激素处理遗传上 XX 幼鱼使其发生性逆转,发现性腺中也有 DMRT1 表达(Guan et al, 2000)。虹鳟 DMRT1 的表达也是雄性特异的,在雌激素处理的全雌群体中,DMRT1 的表达在 10 天以后大量减少(Marchand et al, 2000)。而 DAX1 在罗非鱼个体发生过程中雌雄并没有明显的表达差异,只是在性分化的关键时期有明显的上调(Wang et al, 2002)。最近,我们在罗非鱼中成功克隆了 FOXL2 和 DAX1 的同源复制基因 DAX2,初步研究表明 FOXL2 和 DAX2 都在性腺发育早期表达,且与性腺分化密切相关(Wang et al, 未发表资料)。

6 脊椎动物不同类群性别决定和分化分子机制的异同

哺乳类性别决定和分化通路是由大量的转录因子和生长因子相互作用、协调控制的结果。在雄性发育通路, SRY 的表达直接或间接地激活下游一系列转录因子和生长因子以一定的时序表达,进而形成了初具轮廓的级联调控通路。另外, FOXL2 在雌性未分化性腺表达,以及 WNT-4 和 DAX1 也在雌性性别决定或分化时期表达。所以雌性通路的发育需要特定的基因调控,而并非“默认通路”。遗传因素在哺乳类性别决定和分化过程中占绝对优势,外界环境和类固醇激素的影响只能改变其其次级性征,而通常不能诱导完全的性逆转。

鸟类染色体组型为雌性异配(ZW)。已经发现分别与 Z 染色体和 W 染色体连锁的性别决定候选基因,如 Z 染色体上的雄性性别决定候选基因 DMRT1,以及 W 染色体上的 CHD-W、ASW 和 EFT1。遗传因素在鸟类性别决定和分化中占一定优势,但外源激素对性别分化的影响亦有显现。

爬行类具有最为典型的温度依赖性别决定机制。在胚胎孵化的温度敏感期,如果临界温度上下浮动 1℃就可以导致全雄或全雌群体。爬行类可能存在决定性别的温度敏感因子或基因,极其细微的温度差异可能导致其激活或失活,进而诱导单一性别分化。虽然 DMRT1 和 SOX9 等是温度依赖的,并且是目前发现的最早在性别分化关键期出现雌雄差异的基因,但这些发现并不能解释温度决定性别

的原因,而可能只是温度作用的结果。

两栖类的研究明显落后于其他类群。在实验条件下,温度和类固醇激素等外界环境因素的变化能使很多种类改变其性别。但环境影响对性别的作用不典型且无规律,外源类固醇激素的处理在种间存在显著差异,甚至同一种类固醇激素处理在种内产生完全相反的结果。但 DMRT1 的表达是雄性特异的,而 DAX1 仅在卵巢发育过程中表达下调,这些表明遗传基因可能是两栖类性别决定的主要因素。

鱼类性别决定类型和性别决定方式因种而异,因而性别决定的分子机制也表现为复杂多样。同时,进化上的原始性导致鱼类性别可塑性强,性别分化通路下游基因或一些常染色体基因突变,以及外界环境因子的变化都可以导致完全的性逆转。因此,对鱼类性别决定和分化分子机制尚未形成统一认识。虽然 DMY 被认为是青鳉的性别决定候选基因,但它仅存在青鳉的几个种系,而在其他硬骨鱼类中未能发现类似 DMY 的性别决定基因。因而在鱼类中克隆得到的哺乳类性别决定同源基因(如 SF1、DAX1、SOX9 和 DMRT1 等)没有保守的性别决定功能,或者其功能有待于进一步验证,但这些基因可能在鱼类性别分化时期有部分功能是保守的。

纵观脊椎动物的性别决定与分化过程可以看出:①伴随着脊椎动物从低等到高等的进化,性别决定和分化机制在不同类群呈现明显的变化总趋势:遗传基因的作用逐渐增强,而环境因素的影响在削弱;直到哺乳类,外在环境因素的作用最终完全被遗传基因所取代。②到目前为止,性别决定和分化遗传基因调控通路在哺乳类已初现轮廓,并且哺乳类大量的性别决定同源基因在其他类群相继被克隆。但遗憾的是这些同源基因的结构、两性差异表达模式和性别分化时期的功能等在不同类群并非想像的那么保守,而是存在显著差异。所以可能在不同的类群甚至种间形成了极其特异的性别决定机制。而 DMRT1 则是迄今为止发现的唯一例外,其基因结构在不同类群相当保守,并且在脊椎动物的精巢分化或精子成熟过程中有重要作用。③哺乳动物与非哺乳动物性别分化机制存在显著区别:哺乳类精巢分化早于卵巢分化,来源于精巢的 MIS 和雄激素对于精巢和雄性次级性征的分化是必不可少的。在交配后 11.5 天, SRY 的表达启动精巢迅速完成形态分化,随后出现 AMH 在 Sertoli 细胞和

P450_{scc}、3 β -HSD 在 Leydig 细胞的表达。而卵巢的形态结构在此阶段几乎没有任何变化,并且也无类固醇合成酶基因的表达。目前认为雌激素对于精巢和卵巢最初的发育以及发育管道的分化并非必需。而在非哺乳类脊椎动物,雌性发育早于雄性,雌激素在雌性性别决定和分化中有重要作用。用芳化酶抑制剂或雌激素受体拮抗剂(tomaxifen)都可以成功地诱导性逆转,这在鸟类、爬行类、部分两栖类和鱼类都得到了证明。

近年来,虽然对脊椎动物性别决定和分化通路有一定程度的认识,但这种认识并不系统完整,更多的未知领域有待进一步探索。如:SRY 和 SOX9 上下游的目标调节基因、雌性发育通路调节基因以及性别决定相关基因的真正功能;目前对非哺乳类性别决定通路的认识基本上停留在下游分化阶段,同时外界环境因子如何介入性别决定通路,进而诱

导性逆转;生长因子如何通过与转录因子协同作用,在性别决定和性腺发育中起作用等一系列的问题,可能会成为今后研究的重点。近年来新的实验技术和方法的使用极大地推动了对脊椎动物性别决定和性别分化的理解和认识。其中差显技术(differential screening technique)、功能基因组学、基因功能表达系列分析技术(serial analysis of gene expression)、基因芯片技术(microarray)和日益完善的生物信息分析系统,都将加速对性别决定和分化这一复杂基因网络的认知。然而,仅仅基因的克隆和离体表达,并不能代表在生物体中的真实功能。在性别决定或分化的特定阶段利用蛋白组学分析、鉴定一种细胞中整套蛋白的功能就显得日益重要。总之,脊椎动物性别决定并没有统一的模式,有多种因素参与这一复杂的调控过程,表现多样化。对其深入而系统的认识和理解任重而道远。

参考文献:

- Argente J, Ozisik G, Pozo J, Teresa MM, Soriano-Guillen L, Larry JJ. 2003. A novel single base deletion at codon 434(1301delT) of the DAX1 gene associated with prepubertal testis enlargement [J]. *Mol. Genet. Metab.*, **78** (1): 79–81.
- Baroiller JF, D'Cotta H. 2001. Environment and sex determination in farmed fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **130**: 399–409.
- Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, Porter FD, Westphal H. 2000. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation [J]. *Nature*, **24**: 403 (6772): 909–913.
- Bogart MH. 1987. Sex determination: A hypothesis based on steroid ratios [J]. *J. Theor. Biol.*, **128**: 349–357.
- Capel B. 2002. Cell signaling pathways in testis development [C]. The 48th NIBB Conference, Okazaki Japan.
- Ellegren H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds [J]. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **263** (1377): 1635–1641.
- Guan G, Kobayashi T, Nagahama Y. 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3) -domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272** (3): 662–666.
- Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y. 1999. cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype [J]. *J. Biol. Chem.*, **274** (36): 25205–25209.
- Jiao BW, Wang DS, Deng SP. 2002. The approach of TSD in reptiles [J]. *Chinese Journal of Zoology*, **35** (4): 74–78. [焦保卫, 王德寿, 邓思平. 2002. 爬行动物温度性别决定研究进展. 动物学杂志, **35** (4): 74–78.]
- Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR, Vilain E. 2001. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans [J]. *Am. J. Hum. Gene.*, **68** (5): 1102–1109.
- Julie C, Elfride DB, Ludwine M. 2003. Human ovarian development and FOXL2 gene [C]. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, Kona, Hawaii, USA.
- Kawano K, Furusawa S, Matsuda H, Takase M, Nakamura M. 2001. Expression of steroidogenic factor-1 in frog embryo and developing gonad [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **123** (1): 13–22.
- Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. 1993. WT-1 is required for early kidney development [J]. *Cell*, **74** (4): 679–691.
- Lovell-Badge R. 2003. How does SRY act in mammalian sex determination [C]. The 48th NIBB Conference, Okazaki, Japan.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature*, **417** (6888): 559–563.
- Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, Morohashi K, Weiss J, Jameson JL. 2003. Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation [J]. *Development*, **130** (5): 1029–1036.
- Moreno-Mendoza N, Harley VR, Merchant-Larios H. 1999. Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures [J]. *J. Exp. Zool.*, **284** (6): 705–710.
- Morohashi K. 2002. Sex differentiation of the gonads-factors implicated in testicular and ovarian development [J]. *Environmental Science*, **9** (1): 13–22.
- Nagahama Y. 2000. Gonadal steroid hormones: Major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish [A]. In: Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO. Reproductive Physiology of Fish [M]. Bergen: John Grieg AS. 211–222.
- O'Neill M, Binder M, Smith C, Andrews J, Reed K, Smith M, Millar C, Lambert D, Sinclair A. 2000. ASW: A gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad [J]. *Dev. Genes Evol.*, **210** (5): 243–249.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. 1999. Temperature-depen-

- dent sex determination and gonadal differentiation in reptiles [J]. *Cell Mol. Life Sci.*, **55** (6-7): 887-900.
- Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. 1999a. Expression of *DMRT1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development [J]. *Dev. Biol.*, **215** (2): 208-220.
- Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D. 1999b. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators [J]. *Hum. Mol. Genet.*, **8** (6): 989-996.
- Schmahl J, Capel B. 2003. FGF9 acts downstream of *SRY* to induce proliferation and differentiation of sertoli cells [C]. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, Kona, Hawaii, USA.
- Schmid M, Steinlein C. 2001. Sex chromosomes, sex-linked genes, and sex determination in the vertebrate class Amphibia [J]. *EXS*, (91): 143-176.
- Shibata K, Takase M, Nakamura M. 2002. The *DMRT1* expression in sex-reversed gonads of amphibians [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **127** (3): 232-241.
- Smith CA. 2002. Candidate chicken sex-determining genes [C]. The 48th NIBB Conference, Okazaki, Japan.
- Smith CA, McClive PJ, Western PS, Reed KJ, Sinclair AH. 1999. Conservation of a sex-determining gene [J]. *Nature*, **402** (6762): 601-602.
- Smith CA, Katz M, Sinclair AH. 2003. *DMRT1* is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos [J]. *Biol. Reprod.*, **68** (2): 560-570.
- Swain A. 2002. The role of *WNT-4* in gonad development [C]. The 48th NIBB Conference, Okazaki, Japan.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. 1998. *DAX1* antagonizes *SRY* action in mammalian sex determination [J]. *Nature*, **391** (6669): 761-767.
- Sugita J, Takaseb M, Nakamura M. 2001. Expression of *DAX1* during gonadal development of frog [J]. *Gene*, **280**: 67-74.
- Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal *SRY* expression in mice require direct interaction between transcription partners *GATA4* and *FOG2* [J]. *Development*, **129** (19): 4627-4634.
- Tian ZH. 1996. Sex determination and sex chromosomes [J]. *Bulletin of Biology*, **31** (10): 13-15. [田志宏. 1996. 性别决定和性染色体. 生物学通报, **31** (10): 13-15.]
- Tilman C, Capel B. 2002. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination [J]. *Recent Prog. Horm. Res.*, **57**: 1-18.
- Torres Maldonado LC, Landa PA, Moreno MN, Marmolejo VA, Meza MA, Merchant LH. 2002. Expression profiles of *DAX1*, *DMRT1*, and *SOX9* during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **129** (1): 20-26.
- Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. 1999. Female development in mammals is regulated by *WNT-4* signalling [J]. *Nature*, **397** (6718): 405-409.
- Wallace H, Wallace BM. 2000. Sex reversal of the newt *Triturus cristatus* reared at extreme temperatures [J]. *Int. J. Dev. Biol.*, **44** (7): 807-810.
- Wang DS, Kobayashi T, Senthilkumaran B, Sakai F, Sudhakumari CC, Suzuki T, Yoshikuni M, Matsuda M, Morohashi K, Nagahama Y. 2002 Molecular cloning of *DAX1* and *SHP* cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297** (3): 632-640.
- Watanabe M, Tanaka M, Kobayashi D, Yoshiura Y, Oba Y, Nagahama Y. 1999. Medaka (*Oryzias latipes*) FTZ-F1 potentially regulates the transcription of P-450 aromatase in ovarian follicles: cDNA cloning and functional characterization [J]. *Mol. Cell Endocrinol.*, **149** (1-2): 221-228.
- Western PS, Harry JL, Graves JA, Sinclair AH. 1999. Temperature-dependent sex determination: Upregulation of *SOX9* expression after commitment to male development [J]. *Dev. Dyn.*, **214** (3): 171-177.
- Western PS, Harry JL, Marshall Graves JA, Sinclair AH. 2000. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: Expression of *SF1*, *WT1* and *DAX1* during gonadogenesis [J]. *Gene*, **241** (2): 223-232.
- Wibbels T, Bull JJ, Crews D. 1999. Synergism between temperature and estradiol: A common pathway in turtle sex determination [J]. *J. Exp. Zool.*, **260** (1): 130-134.
- Wilhelm D, Englert C. 2002. The Wilms tumor suppressor *WT1* regulates early gonad development by activation of *SF1* [J]. *Genes Dev.*, **16** (14): 1839-1851.
- Yao HC, Brennan J, Matzuk M. 2003. Follistatin operates one branch of the *WNT-4* signaling cascade in development of the mammalian ovary [C]. Third International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, Kona, Hawaii, USA.
- Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, Nagahama Y, Wakamatsu Y, Takeda H, Araki K, Morohashi K, Ozato K. 2002. *SOX9* in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of *SOX9* in gonad differentiation [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **63** (1): 5-16.
- Yoshiura Y, Senthilkumaran B, Watanabe M, Oba Y, Kobayashi T, Nagahama Y. 2003. Synergistic expression of *Ad4BP/SF-1* and cytochrome P450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction [J]. *Biol. Reprod.*, **68** (5): 1545-1553.
- Zhou R, Liu L, Guo Y, Yu H, Cheng H, Huang X, Tiersch TR, Berta P. 2003. Similar gene structure of two *SOX9a* genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. *Mol. Reprod. Dev.*, **66** (3): 211-217.