

雌性三倍体长牡蛎中 CDC42 过表达导致卵子发生受阻

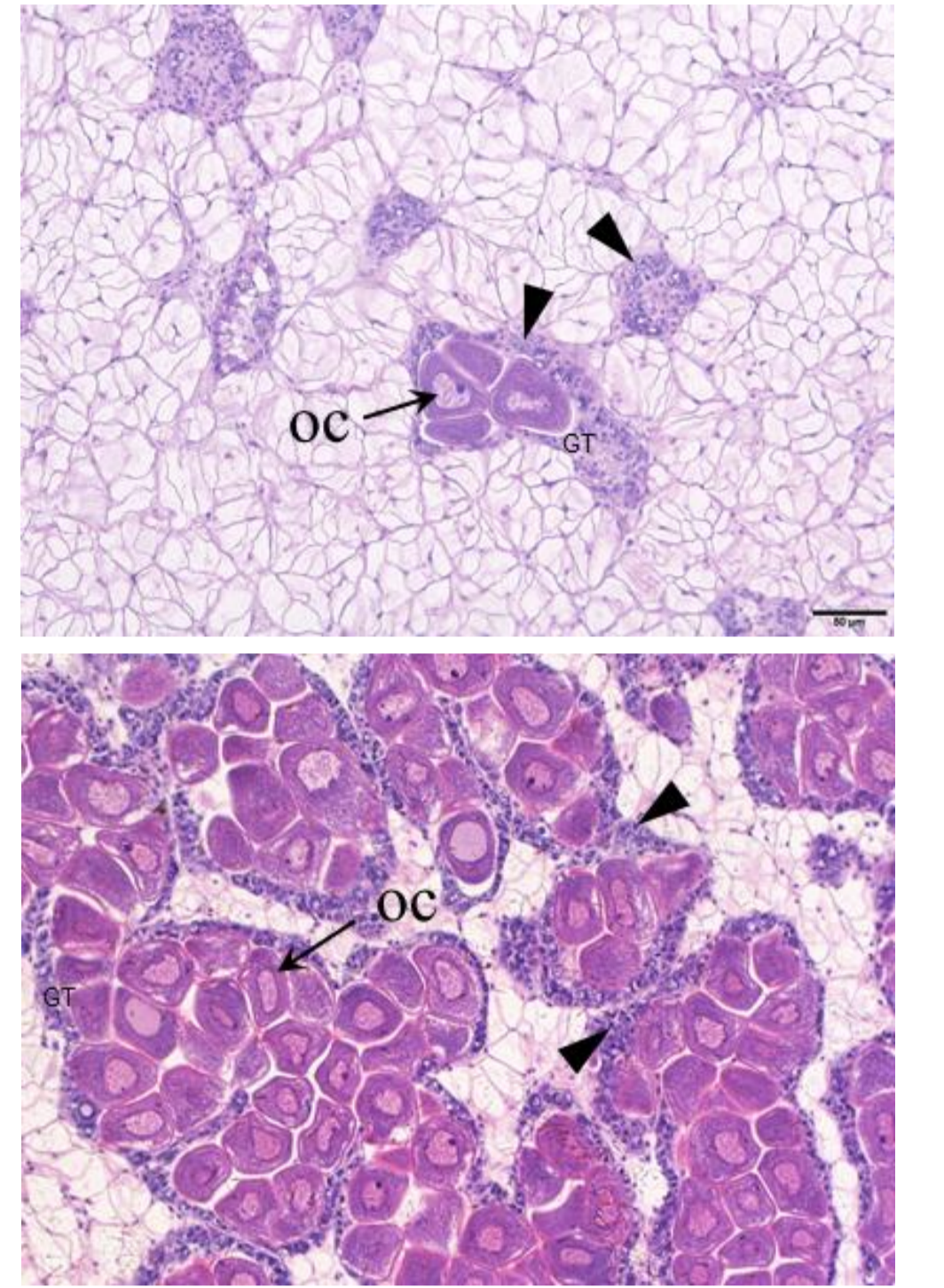
杨琼¹ 于红^{1*} 杜少军² 李琪^{1*}

¹ 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 青岛, 266003

² Institute of Marine and Environmental Technology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA

摘要

雌性三倍体长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 在繁殖力上表现出明显的个体差异, 产生少量甚至不产生卵细胞的个体称为 β 型雌性, 产生大量卵细胞的个体称为 α 型雌性。目前, 关于三倍体繁殖力差异的分子机制的研究鲜有报道。本研究采用DNA双链断裂标记物 γ H2AX的免疫荧光分析发现, 三倍体性腺细胞中的DNA损伤水平明显高于二倍体, 尤其是在 β 型雌性中。细胞分裂周期蛋白42 (CDC42) 是一类Rho GTP酶, 在DNA损伤修复和基因组稳定性发挥重要作用。在RNA水平和蛋白水平上, 三倍体性腺中CDC42的表达显著高于二倍体。通过ZCL278抑制雌性三倍体中CDC42蛋白活性发现, ZCL278促进雌性三倍体性腺发育, 显著减少DNA损伤, 促进卵细胞发生。转录组分析表明, ZCL278可能上调PI3K-AKT信号通路促进DNA损伤修复, 促进雌性三倍体性腺发育和卵细胞发生。本研究为了解三倍体水产动物不育的分子机制提供了新的视角。



结果

1、雌性三倍体太平洋牡蛎的DNA损伤增加

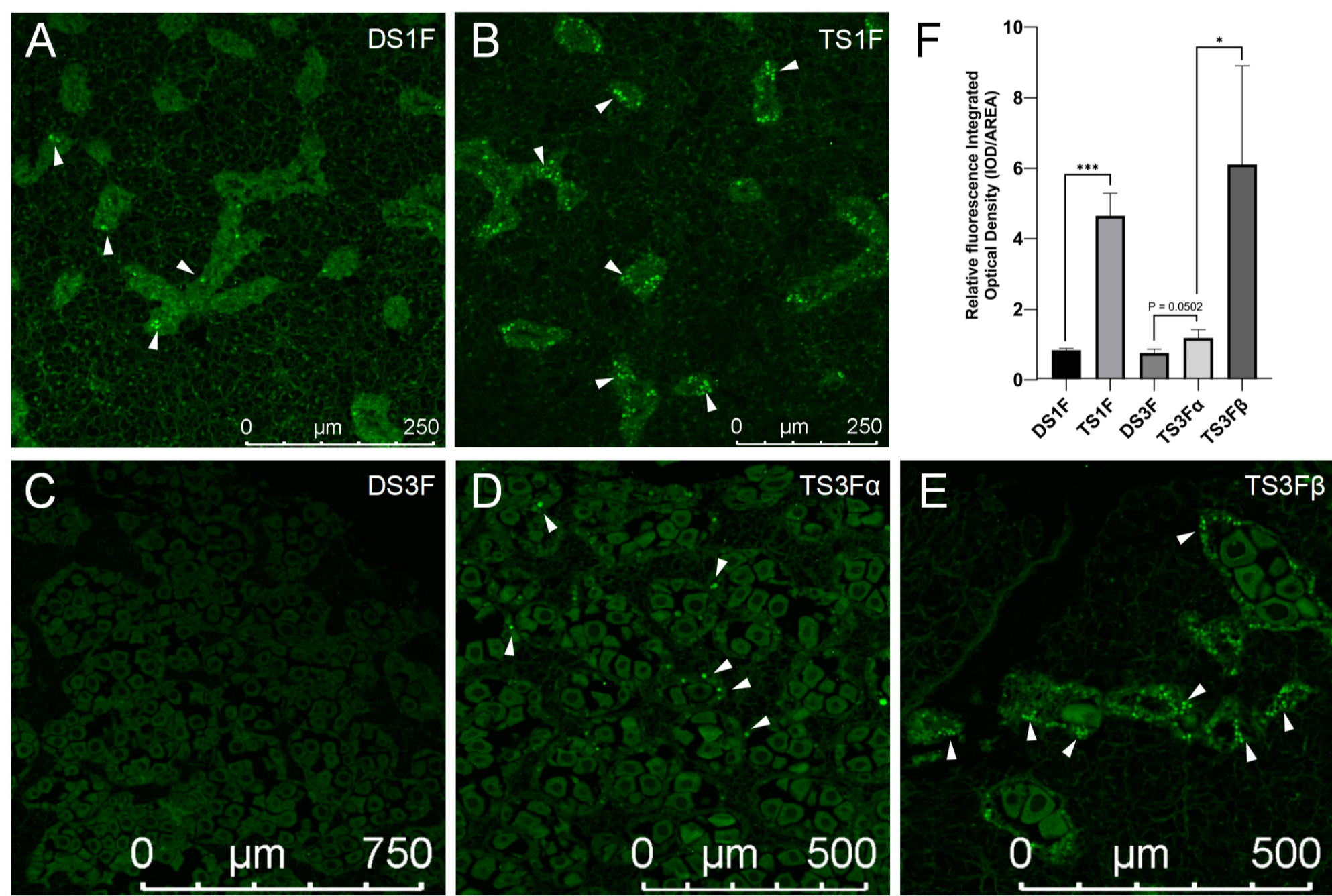


图1 不同时期长牡蛎性腺中 γ H2AX的免疫荧光。增殖期(A-B)和成熟期(C-E)雌性三倍体DNA损伤显著高于二倍体, β 型雌性DNA损伤程度最高。

2、雌性三倍体长牡蛎性腺中CDC42表达显著高于二倍体

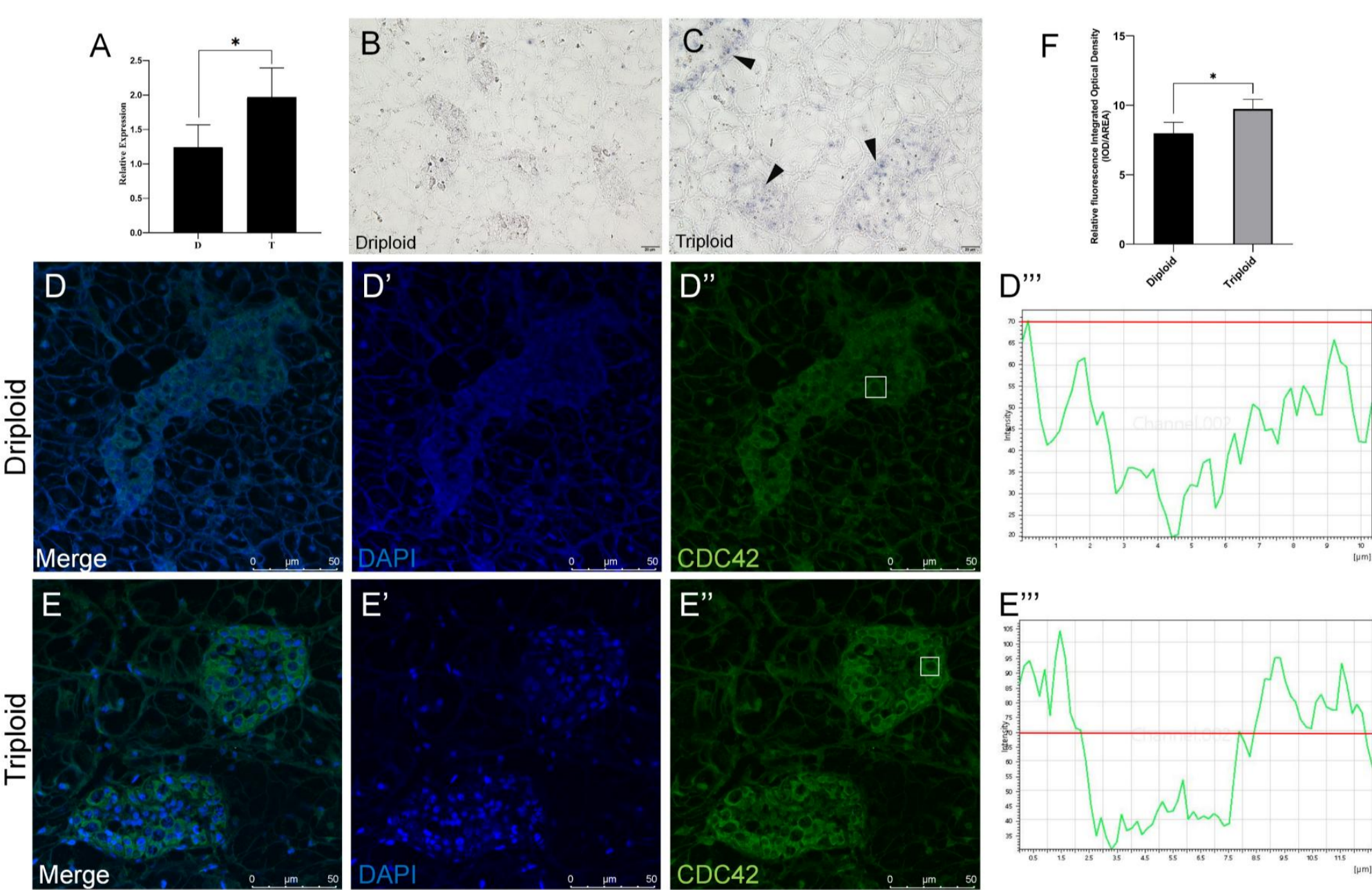


图2 增殖期雌性二倍体和三倍体性腺中CDC42基因的表达模式。(A-B) 荧光定量和原位杂交结果, 增殖期CDC42基因在三倍体性腺中表达, 且显著高于二倍体; (D-F)免疫荧光结果, CDC42蛋白在异常生殖细胞中显著高表达。

3、雌性三倍体长牡蛎性腺中出现大量异常生殖细胞

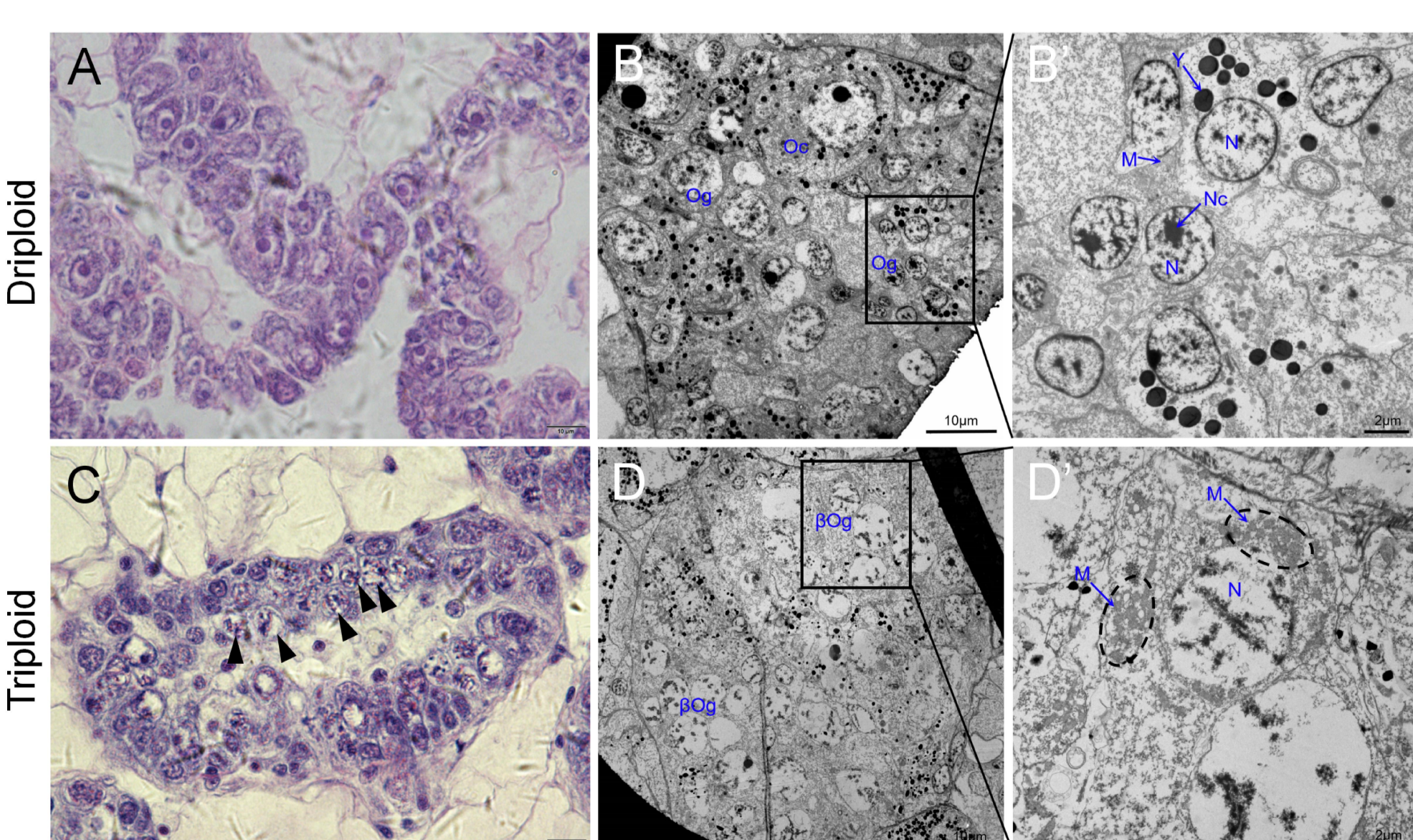


图3 增殖期雌性二倍体和雌性三倍体性腺组织的组织切片和超微结构; 三倍体中异常生殖细胞, β gonia, 呈现异常膨大的细胞核和异常高度浓缩的染色质。

4、抑制CDC42蛋白活性促进雌性三倍体卵子发生, 减少DNA损伤

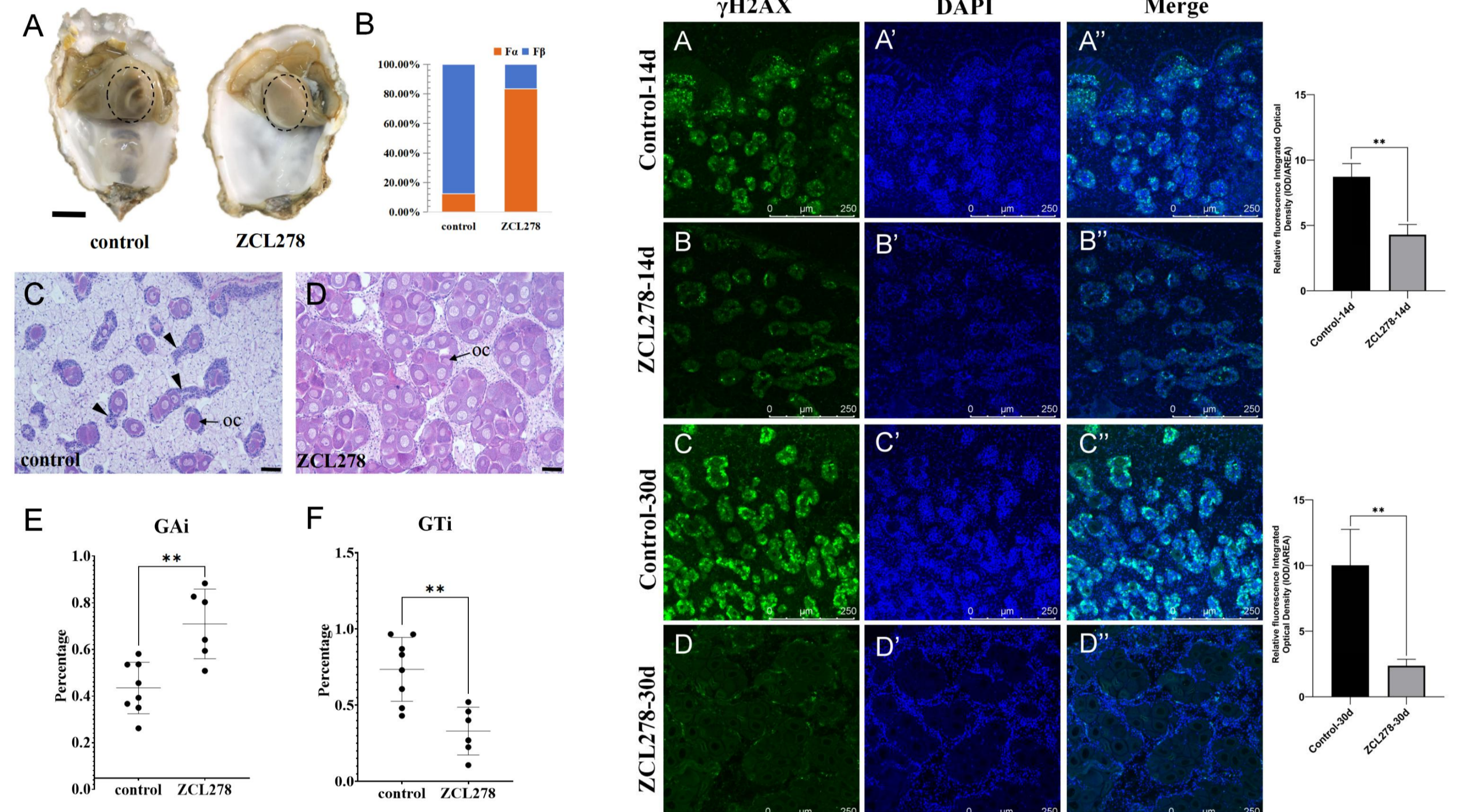


图4 (左) 对ZCL278处理30天后牡蛎性腺的形态学和组织学变化。(A) ZCL278处理三倍体性腺发育比对照组更饱满。(B-D) ZCL278后雌性 α 三倍体比例升高, 卵细胞发生增加。

图5 (右) ZCL278处理后, γ H2AX荧光标记显著下降, 表明DNA损伤显著减少。

5、抑制雌性三倍体CDC42活性的转录组分析

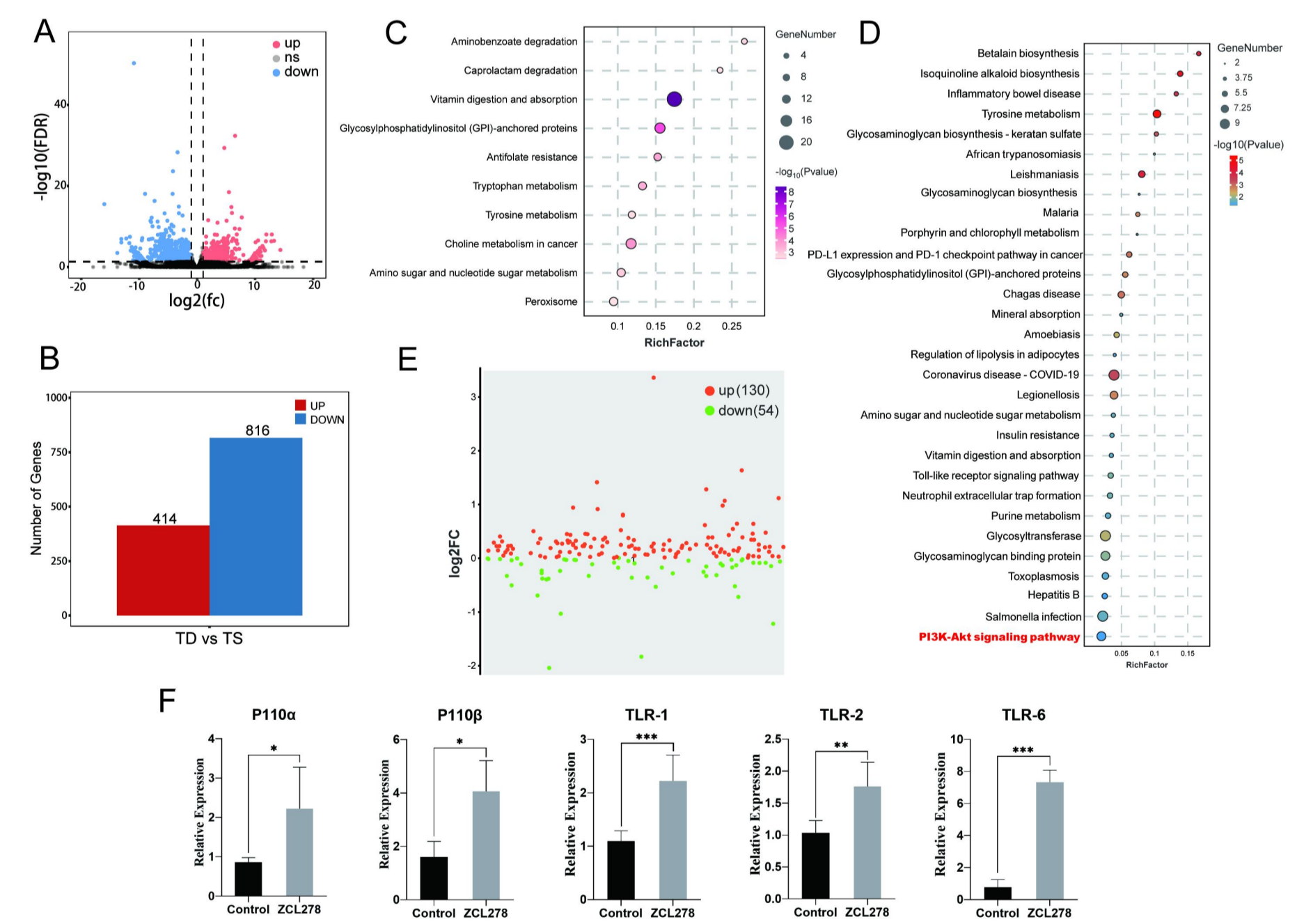
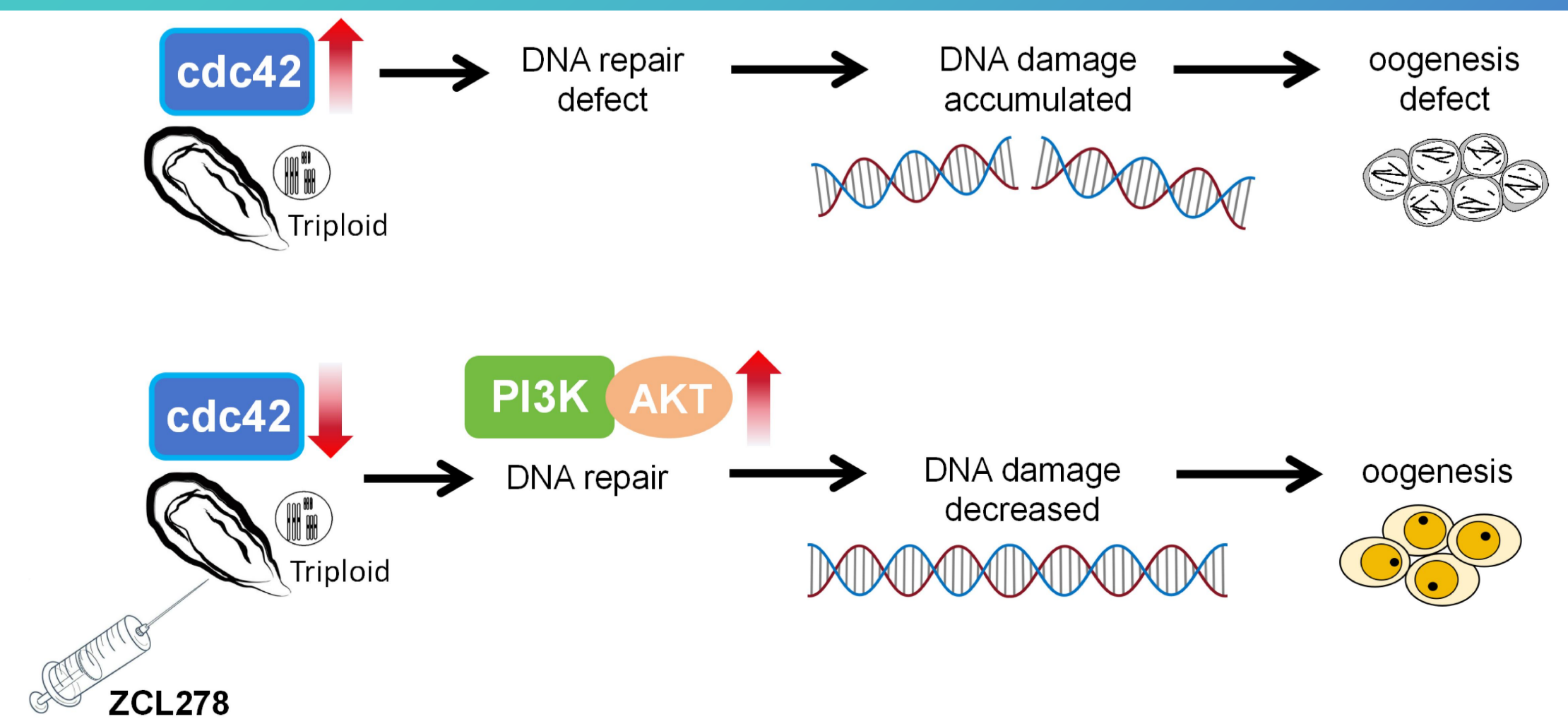


图6 对照组和ZCL278处理14天三倍体长牡蛎性腺的转录组分析, PI3K-AKT通路基因表达上调, 且多数DNA修复和重组通路基因表达上调。

结论



在雌性三倍体长牡蛎的卵子发生过程中, CDC42的过表达抑制了DNA修复, 导致DNA损伤积累, 从而阻碍卵子发生, 形成异常的生殖细胞, β gonia。