

miR-430 对斑马鱼原始生殖细胞迁移和性腺发育影响的初步研究*

林小涵¹, 金超凡¹, 高晨¹, 汪波^{1**}, 贺艳^{1,2}, 齐洁^{1,2}, 张全启^{1,2}

(1. 中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 为了探究 microRNAs(miRNAs)在斑马鱼生殖细胞发育过程中所起的作用,本研究在斑马鱼胚胎期过表达 miR-430,结果发现原始生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)迁移出现紊乱,并且通过 qRT-PCR 发现 *nanos3*、*piwil2* 及 *tdrd7* 等生殖质基因的表达水平显著下调。此外,在斑马鱼性腺发育过程中,通过组织学观察发现过表达 miR-430 会导致雌性斑马鱼卵母细胞发育异常、卵巢发育迟缓,但是对雄性生殖细胞及性腺的发育没有造成明显的影响,并且进一步统计分析表明,miR-430 不影响斑马鱼的性别分化。综上所述,本研究初步明确了过表达 miR-430 对斑马鱼 PGCs 迁移、性腺发育以及性别分化的影响,并为进一步探究 miR-430 在斑马鱼生殖细胞发育过程中的功能及分子机制奠定了理论基础。

关键词: 斑马鱼; miR-430; 显微注射; PGCs; 卵母细胞; 性腺发育

中图分类号: Q38

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2022)03-072-08

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20210144

引用格式: 林小涵, 金超凡, 高晨, 等. miR-430 对斑马鱼原始生殖细胞迁移和性腺发育影响的初步研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(3): 72-79.

Lin Xiaohan, Jin Chaofan, Gao Chen, et al. Preliminary functional analysis of miR-430 in regulating zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cell migration and gonad development[J]. Periodical of Ocean University of China, 2022, 52(3): 72-79.

生殖细胞是多细胞生物体内能繁殖后代的细胞的总称,包括 PGCs 及其分化后形成的生殖细胞。PGCs 通过有丝分裂产生,随后迁移至原始性腺形成的区域,也就是生殖嵴,通过进一步的分化形成精原细胞或卵原细胞,最终分化生成成熟的卵子和精子。

miRNA 是内源性的非编码小 RNA,含有 18~25 个核苷酸,以序列特异性的方式参与转录后基因的表达调控,通过识别和招募蛋白复合物结合到靶基因的 3'UTR 来抑制翻译或影响 mRNA 稳定性,在细胞增殖、分化以及器官发育等多种生物学过程中发挥关键作用^[1]。其保守的种子区由 5'端的第 2~7 位核苷酸组成,是靶向配对过程中的决定因子^[2]。单个 miRNA 可以结合多个靶 mRNA,因此每个 miRNA 均可以参与并调节多种生物学过程^[3]。

miRNAs 在生殖细胞发育过程中扮演着十分重要的角色,主要参与 PGCs 的分化、生殖细胞的维持及发育过程,这在之前的研究中已经得到了广泛的证明。在果蝇 PGCs 迁移分化过程中,miR-6 和 miR-9 能够影

响 *vasa* 和 *nanos* 的表达,这些基因都是关键的生殖质组分^[4]。在生殖细胞的维持及分化过程中,miRNA 同样发挥着十分重要的功能。例如在生殖干细胞自我更新时,miRNA 在有丝分裂的 G1 期向 S 期转换的过程中,通过抑制细胞周期抑制因子 *dap* 来促进生殖干细胞的有丝分裂进程,进而促进生殖干细胞的自我更新^[5]。此外,果蝇中的 miR-184 可以调控 *sax* 受体表达,进而影响雌性生殖细胞的发育和分化过程^[6]。在小鼠中,miR-122a 主要在晚期雄性生殖细胞中表达,抑制精子发生过程中特异性表达的 mRNA。

尽管 miRNAs 的功能得到了广泛的证实,但是在鱼类中的研究还较少,大部分都在斑马鱼和青鳉等模式生物中进行^[7-9]。miR-430 家族最初是在硬骨鱼中被发现和鉴定,该家族在脊椎动物中高度保守,与其他脊椎动物 miRNAs 在进化上密切相关。在斑马鱼中,miR-430 家族在受精卵中合子基因转录开始时表达,是合子基因组中最早转录且转录水平最高的基因簇之一^[10],能直接调控数百个靶基因。其中,大多数靶基因

* 基金项目:国家重点研究发展计划项目(2018YFD0901205)资助

Supported by the National Key R & D Program of China(2018YFD0901205)

收稿日期: 2021-04-04; 修订日期: 2021-05-06

作者简介:林小涵(1996—),女,硕士生。E-mail: 15063908078@163.com

** 通讯作者: E-mail: wb@ouc.edu.cn

是母源基因,在缺失 miR-430 的情况下会在细胞中积累^[11]。在斑马鱼胚胎发育的过程中,miR-430 参与维持 PGCs 特异性表达基因的调控。例如,miR-430 可靶向体细胞中的 *nanos* 和 *tdrd7* 基因,降低它们 mRNA 的稳定性并且抑制其翻译,从而维持它们在 PGCs 生殖质中的特异性表达和分布^[8]。此外,miR-430 还影响趋化因子 *sdf1a* 和 *cxc7b* 的表达,通过降解原表达域内的 *sdf1a* mRNA 来调节其表达量和分布范围,同时调节 *cxc7b* 的表达水平以避免 *sdf1a* 过度消耗,确保 PGCs 的准确迁移^[12]。但是斑马鱼 PGCs 迁移到生殖嵴之后,在其向成熟的生殖细胞分化以及性腺发育的过程中,miR-430 的功能还未得到探究。

本研究以斑马鱼为实验对象,通过上调 miR-430 的表达探究其对斑马鱼 PGCs 的形成、迁移、生殖细胞发育以及性腺发育的影响。研究发现过表达 miR-430 会导致斑马鱼 PGCs 迁移紊乱,并且造成 *nanos3* 等生殖细胞标记基因 mRNA 表达量的显著下调。通过组织学观察发现过表达 miR-430 会造成卵母细胞发育异常,卵巢发育迟缓,但不影响斑马鱼的性别分化以及精巢的发育。

1 材料方法

1.1 材料

本实验所用斑马鱼包括野生型 AB 品系以及 CZ18 品系,均购买于国家斑马鱼资源中心。其中 CZ18 品系为 kop:EGFP-UTR-*nanos3* 转基因斑马鱼,其 PGCs 可特异性表达绿色荧光蛋白(EGFP)。成鱼饲养在自动水循环系统中,水温控制在 28 ℃,光周期为 14 h 光照/10 h 黑暗,喂食卤虫或鱼饲料(每天 3~4 次)。斑马鱼受精卵放置于斑马鱼胚胎培养液中,在 28 ℃ 恒温条件下孵育,孵化后在静水中饲养一个月,而后转移至水循环系统中喂养。

1.2 方法

1.2.1 显微注射和荧光检测 miR-430 mimic (5'-UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU-3') 和 Control miRNA (5'-UAACACGUCUAUACGCCCA-3') 由上海吉玛制药技术有限公司合成;LNA-430 (5'-ACAG-GCCGGGACAAUGCAAUA-3') 由 EXIQON 公司合成,其与 miR-430 有较高的结合亲和力,用于抑制 miR-430 的功能。在斑马鱼胚胎 1 细胞时期进行显微注射,其中 miR-430 mimic 和 LNA-430 的注射浓度均为 5 μmol/L。

使用尼康 SMZ1500 体视显微镜在胚胎不同发育阶段观察和跟踪 PGCs 的形成以及定位。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 在受精后 12 h 收集 30 枚 AB 品系斑马鱼胚胎,每个处理重复取样 3 次,用 PBS

清洗后转移至 RNA wait 中,4 ℃ 保存。按照说明书用 TRIzol 法提取斑马鱼胚胎 RNA,使用 g-eraser 反转试剂盒(宝生物工程有限公司)合成 cDNA。

用 Primer5 设计定量引物,选择 β -actin 作为内参基因,本研究所用引物详见表 1。使用宝生物工程有限公司的 2xSYBR Green PCR Master Mix 试剂和罗氏 Lightcycler 480 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的拷贝数,用 SPSS 2.0 进行显著性分析。

1.2.3 报告载体构建 从 NCBI 数据库获取 *nanos3* 的基因序列,设计带有酶切位点的引物扩增 *nanos3* 的 3'UTR 区域,将其克隆至 pMD-19T 载体,验证序列正确性后,用 *Xho* I 和 *Hind* III 酶对 *nanos3* 3'UTR 和 EGFP-N1 质粒进行双酶切,连接、转化后测序获得 EGFP-*nanos3* 3'UTR 报告载体。用 *Xho* I 酶线性化报告载体后,按照 Message Machine SP6 试剂盒(赛默飞公司)的指示在体外合成 mRNA。

1.2.4 组织切片 为检测过表达 miR-430 对斑马鱼性腺发育的影响,分别在 30、60 和 100 时取斑马鱼性腺样品,每个处理组随机取 30 尾斑马鱼样品。放在 4% 多聚甲醛中过夜保存,随后梯度甲醇脱水,−20 ℃ 保存。将样品切成 2~3 mm³ 的小块,经脱水、透明后进行石蜡包埋,使用徕卡 RM2016 切片机切片,分别在 60 和 37 ℃ 条件下展片和烘片,在脱蜡、脱水后进行切片染色和封片。使用尼康 AZ100 荧光显微镜观察不同发育时期的斑马鱼性腺切片结果。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

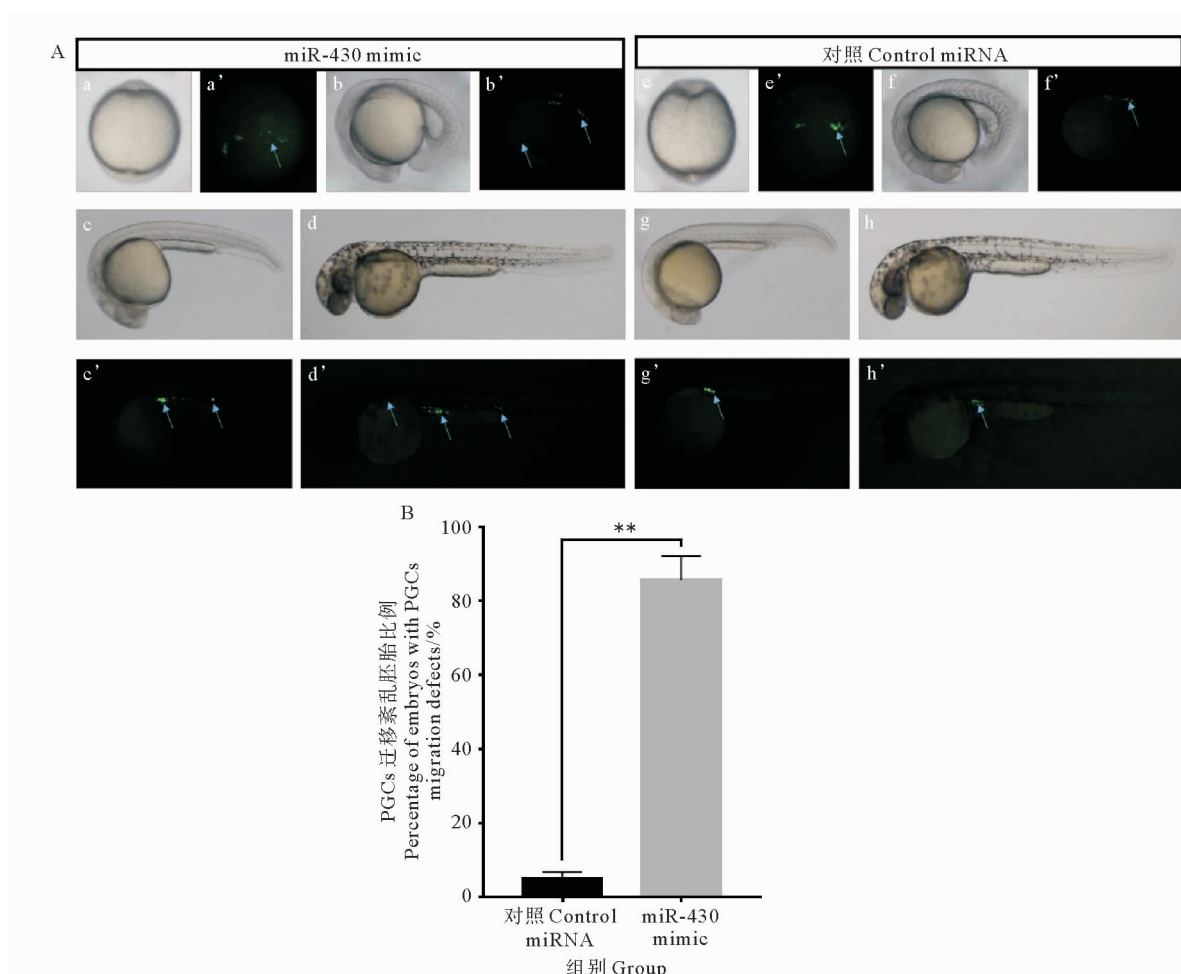
引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>nanos3</i> -qPCR-FW	CAACAGGTGTCAGGTATATCG
<i>nanos3</i> -qPCR-RV	GAAAGATCAGCCAGCTTCA
<i>piwil2</i> -qPCR-FW	TCGCTGCCACAAACAAA
<i>piwil2</i> -qPCR-RV	CGTGGGAGATGTCTGATAAAG
<i>tdrd7</i> -qPCR-FW	CACCTGAACCCTGGTAATG
<i>tdrd7</i> -qPCR-RV	GTTGACTCATCCGCTTCTC
β -actin-qPCR-FW	AAGCAGGAGTACGATGAGT
β -actin-qPCR-RV	GTTAGACAACCTACCTCCCTTTG
<i>nanos3</i> 3'UTR-FW (<i>Xho</i> I)	CCGCTCGAGCGGGAGATTTGA-AGAAACACT
<i>nanos3</i> 3'UTR- RV (<i>Hind</i> III)	CCCAAGCTTCTGACATTTAAA-AGGAGGACTAAAC

2 结果

2.1 过表达 miR-430 影响 PGCs 迁移

为检验合成的 miR-430 能否影响 PGCs 的形成及迁移,本文作者将 miR-430 mimic 注射到 CZ18 品系斑马鱼的 1 细胞时期的胚胎中,使用荧光显微镜检测 PGCs 的形成和迁移情况。检测结果表明 miR-430 不影响 PGCs 的正常形成,但在原肠晚期发现过表达 miR-430 的胚胎中 PGCs 的迁移发生紊乱,多数 PGCs 分散成单个细胞进行迁移运动(见图 1a'),而对照组胚胎中的 PGCs 以体轴为中心聚集成两簇进行迁移(见图 1e')。在胚胎发育至受精后 20 h 时,miR-430 过表达

的胚胎中 PGCs 的排列更为分散,排成一行向生殖嵴迁移(见图 1b')。在受精后 24 h 时,对照组中 PGCs 簇已经迁移至生殖嵴附近(见图 1g'),而过表达 miR-430 的胚胎中部分 PGCs 迁移至卵黄延伸部的尾端,定位在生殖嵴以外的区域(见图 1c')。受精后 36 h 时 PGCs 迁移已经结束,对照组中 PGCs 聚集在生殖嵴区域(见图 1h'),相较于对照 PGCs 的紧密分布,过表达组胚胎中 PGCs 排列松散,并且部分 PGCs 定位在卵黄延伸部的尾端(见图 1d')。本文作者还对 PGCs 的迁移情况进行了统计分析(见图 1B),结果表明过表达组中有 86% 的胚胎出现 PGCs 迁移紊乱的表型,显著高于对照组。

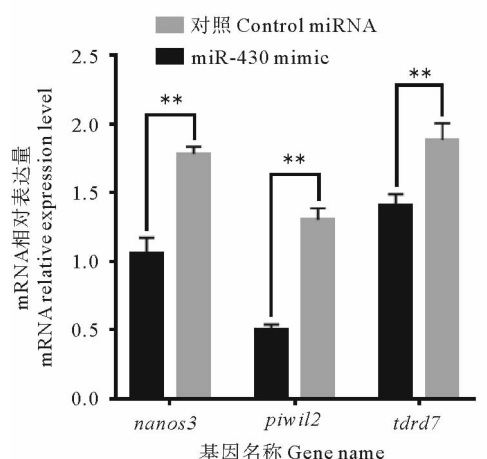


(A. 注射 miR-430 mimic 和 Control miRNA 的胚胎中 PGCs 的迁移情况。a~d 分别为受精后 9、20、24 和 36 h miR-430 mimic 注射组胚胎(白光);a'~d'分别为受精后 9、20、24 和 36 h miR-430 mimic 注射组胚胎(荧光);e~h 分别为受精后 9、20、24 和 36 h 对照组胚胎(白光);e'~h'分别为受精后 9、20、24 和 36 h 对照组胚胎(荧光)。箭头指示迁移中的 PGCs。B. 注射 miR-430 mimic 和 Control miRNA 后表型统计,每组处理分别统计了 200 枚胚胎。数据代表平均值±误差;**表示 $p < 0.01$ 。A. PGCs migration in embryos injected with Control miRNA and miR-430 mimic. a~d: Embryos from miR-430 mimic injected group at 9, 20, 24 and 36 h post fertilization (white light); a'~d': Embryos from miR-430 mimic injected group at 9, 20, 24 and 36 h post fertilization (fluorescent light); e~h: Embryos from control group at 9, 20, 24 and 36 h post fertilization (white light); e'~h': Embryos from control group at 9, 20, 24 and 36 h post fertilization (fluorescent light). Arrows indicate PGCs in migration. B. Phenotype statistics after injection of Control miRNA and miR-430 mimic, 200 embryos were examined for each group. The data represent the mean $\pm$ SD (error bars);** indicates $p < 0.01$.)

图 1 miR-430 过表达导致 PGCs 迁移紊乱

Fig.1 Overexpression of miR-430 results in aberrant migration of PGCs

随后,通过实时荧光定量 PCR 检测了过表达 miR-430 对生殖细胞特异性表达基因 *nanos3*、*piwil2* 和 *tdrd7* 的影响。实验结果如图 2 所示,在 PGCs 迁移的关键时期,miR-430 的过表达会引起内源 *nanos3*、*piwil2* 和 *tdrd7* mRNA 表达水平的显著下调。



(数据代表平均值±SD(误差棒);**表示 $p < 0.01$ 。The data represent the mean ± SD (error bars); ** indicates $p < 0.01$.)

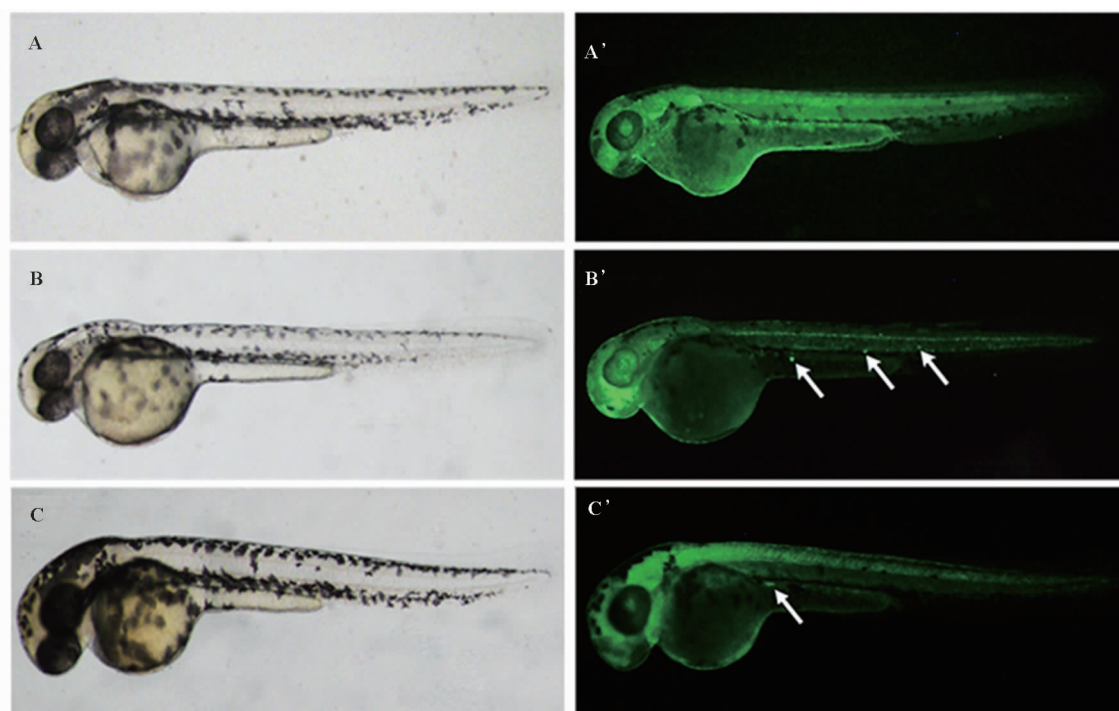
图 2 miR-430 的过表达对 PGCs 迁移相关的基因表达量的影响

Fig.2 The expression changes of PGCs-specific genes after up-regulating miR-430

在确定 miR-430 影响靶基因的表达后,通过将 LNA-430、miR-430 mimic 和 Control miRNA 分别与体外合成的 EGFP-*nanos3* 3'UTR 混合后共注射斑马鱼受精卵,进一步探究了过表达和抑制 miR-430 的表达对其靶基因 *nanos3* 表达和分布的影响。在受精后 36 h 时,荧光检测发现对照中绿色荧光蛋白可以在生殖细胞中表达,并且生殖细胞簇定位在生殖嵴(见图 3C、C')。在注射 LNA-430 的处理组中(见图 3A、A'),观察到斑马鱼全身荧光相对于对照组增强,并且无法准确辨认被标记的 PGCs。在共同注射 EGFP-*nanos3* 3'UTR 和 miR-430 mimic 组中(见图 3B、B'),斑马鱼体内的绿色荧光明显弱于以上两个处理组,并且发现 PGCs 迁移紊乱,部分 PGCs 定位于生殖嵴以外的区域。

2.2 miR-430 对性腺发育和性别分化的影响

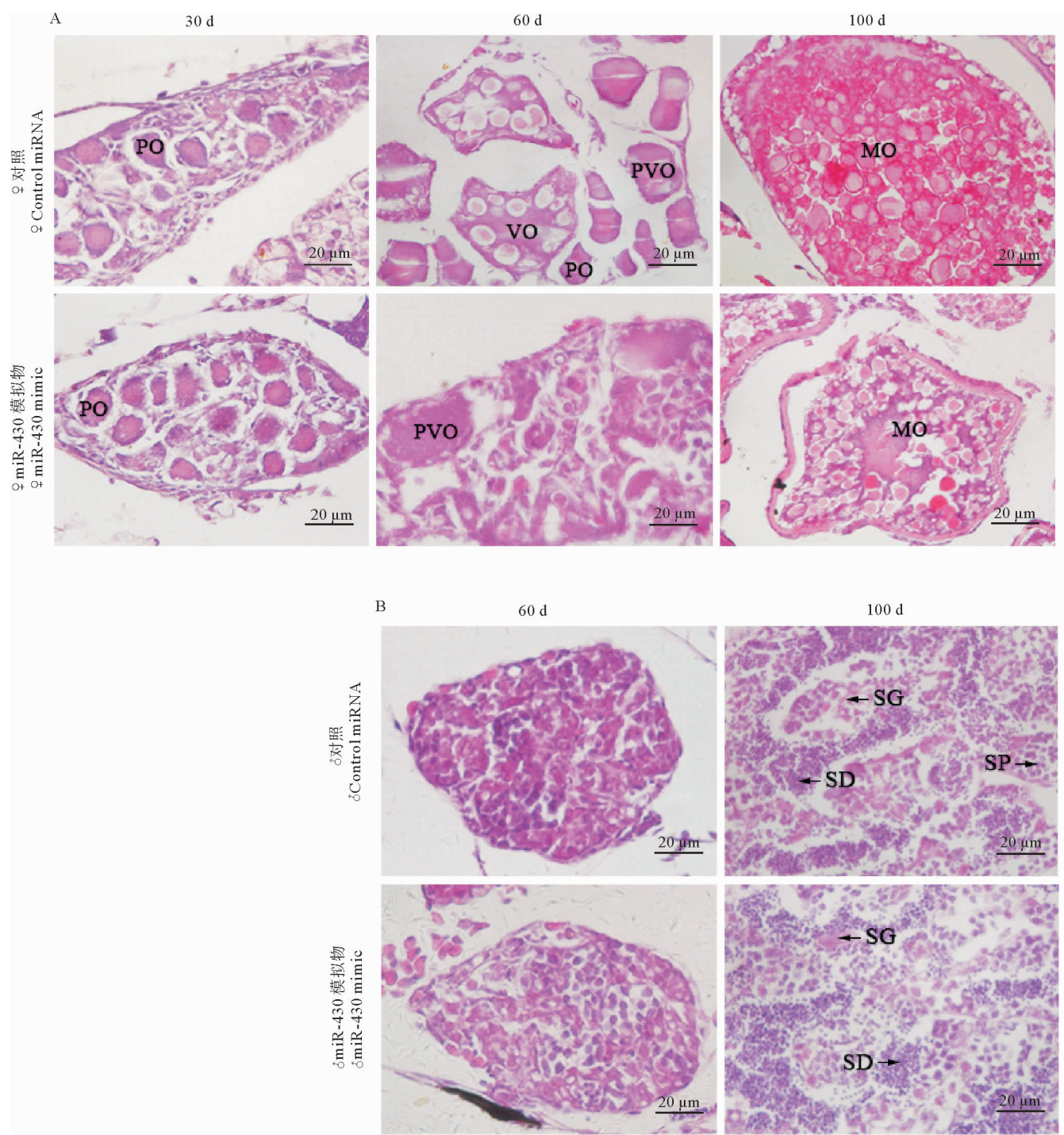
为了进一步探究 miR-430 对斑马鱼性腺发育的影响,向 AB 品系斑马鱼受精卵中注射 miR-430 mimic,制备受精后第 30、60 和 100 天的性腺组织切片并进行观察分析(见图 4A、B)。受精后第 30 天的对照组和实验组切片结果表明,斑马鱼性腺发育正常,此时性腺未出现明显的雄鱼特征,均表现为雌性特征。卵母细胞处于初级生长期,卵母细胞发育正常,和对照相比没有明显区别。对 2 月龄斑马鱼性腺组织切片的观察发现,在



(A 和 A' 代表共注射 LNA-430 和 EGFP-*nanos3* 3'UTR 的斑马鱼;B 和 B' 代表共注射 miR-430 mimic 和 EGFP-*nanos3* 3'UTR 的斑马鱼;C 和 C' 代表共注射 Control miRNA 和 EGFP-*nanos3* 3'UTR 的斑马鱼。箭头指示 PGCs 的定位。A and A' represent zebrafish injected with LNA-430 and EGFP-*nanos3* 3'UTR; B and B' represent zebrafish injected with miR-430 mimic and EGFP-*nanos3* 3'UTR; C and C' represent zebrafish injected with Control miRNA and EGFP-*nanos3* 3'UTR. Arrows demonstrate the location of PGCs.)

图 3 miR-430 的表达水平对其靶基因 *nanos3* 的影响

Fig.3 Effects of miR-430 expression level on its target gene *nanos3*



(A. 受精后第30、60和100天对照和miR-430 mimic注射组斑马鱼的卵巢切片; B. 受精后第60和100天对照和miR-430 mimic注射组斑马鱼的精巢切片。PO为初级生长期卵母细胞, PVO为卵黄发生前卵母细胞, VO为卵黄发生期卵母细胞, MO为成熟卵母细胞, SG为精原细胞, SP为精母细胞, SD为精细胞。标尺均为20 μm。A. Ovarial histology examination of zebrafish from control group and miR-430 mimic injected group at 30, 60, and 100 d post fertilization; B. Spermatid histology examination of zebrafish from control group and miR-430 mimic group at 60, and 100 d post fertilization. PO, primary-growth oocyte; PVO, previtellogenic oocyte; VO, vitellogenic oocyte; MO, mature oocyte; SG, spermatogonia; SP, spermatocyte; SD, spermatid. Scale bar=20 μm.)

图4 不同日龄斑马鱼性腺切片

Fig.4 Gonad histology of wild-type and miR-430-injected fish

注射 miR-430 的斑马鱼中,雄鱼性腺和对照组并无区别;对照组的卵母细胞处于从初级生长期向卵黄发生期过渡的阶段,而过表达组的卵巢发育明显滞后,卵母细胞数目少且发育异常,细胞形态不完整。在受精后

第100天时,斑马鱼已经性成熟,精巢中有大量精细胞形成,同时可以观察到精原细胞和精母细胞;此时卵母细胞进入成熟期,卵黄颗粒基本充满卵母细胞,而过表达 miR-430 组的卵母细胞发育略有滞后,其内部的卵

黄颗粒数目明显少于对照组卵黄颗粒数目。

另外,在受精后第 100 天时对斑马鱼性腺的大小进行了进一步分析测定,解剖观察结果如图 5 所示,注射 miR-430 组雄鱼的精巢和对照组雄鱼的精巢形态与大小不存在明显差异;而注射 miR-430 的雌鱼的卵巢明显发育不良、体积偏小,约为对照组卵巢体积的二分之一。

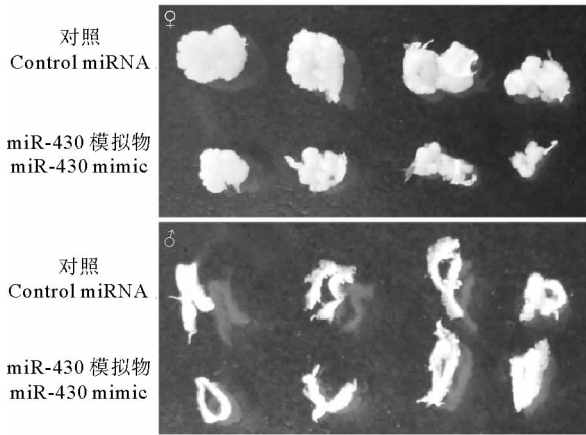
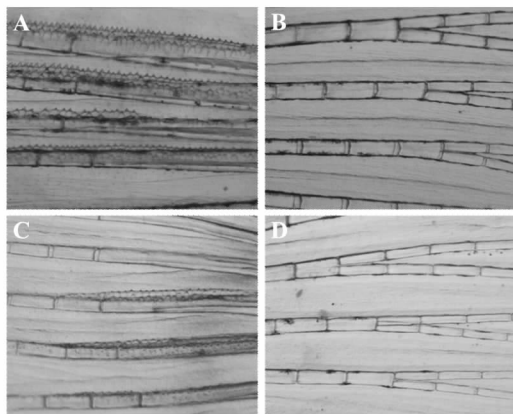


图 5 受精后 100 d 的斑马鱼性腺

Fig.5 Zebrafish gonads at 100 d post fertilization

在出生后第 100 天,已经可以通过表观特征群区分斑马鱼的雌雄,雄鱼的胸鳍表面存在锯齿状突起(见图 6A),雌鱼的胸鳍表面光滑(见图 6B)。在显微镜下观察斑马鱼胸鳍鉴定雌雄比例,发现 miR-430 注射组雄鱼胸鳍表面锯齿状突起较少(见图 6C)且没有对照组明显。统计结果显示:miR-430 注射组 23.5%雄鱼,76.5%雌鱼;对照组 24.0%雄鱼,76.0%雌鱼,表明斑马鱼的性别分化不受 miR-430 的影响。



(A 和 B 分别代表对照组雄性和雌性斑马鱼胸鳍;C 和 D 分别代表 miR-430 过表达组雄性和雌性斑马鱼胸鳍。A and B: Pectoral fins of male and female zebrafish in the control group; C and D: Pectoral fins of male and female zebrafish in the miR-430 overexpression group.)

图 6 过表达 miR-430 不影响斑马鱼性别分化

Fig.6 miR-430 overexpression has no effect on zebrafish sex differentiation

3 讨论

在本研究中,发现 miR-430 的过表达会引起斑马鱼 PGCs 迁移的紊乱,致使部分 PGCs 无法正常迁移至生殖嵴,并且导致 *nanos3* 等 PGCs 特异性表达基因 mRNA 水平降低。在生殖细胞发育过程中,上调 miR-430 可以抑制卵母细胞的发育,并且造成卵巢发育迟缓,但是对斑马鱼精巢发育及性别分化没有明显影响。

miR-430 此前已被证明在 PGCs 迁移中发挥关键作用,miR-430 及其哺乳动物同源基因 miR-302 均可拯救 miRNAs 缺失突变体中的 PGCs 异位表型,miR-430 能够通过调节趋化因子 *sdf1a* 和 *cxc7b* mRNA 的表达确保 PGCs 的准确迁移^[12]。本研究通过注射 miR-430 mimic 在斑马鱼胚胎中过表达 miR-430,同样发现 PGCs 的定位出现异常,从另一个角度探究了 miR-430 对 PGCs 迁移的影响。在斑马鱼中,PGCs 的形成由生殖质这种特殊的母源性细胞质决定^[13],一些母源 mRNA,如 *dnd*、*vasa* 和 *nanos3* 等定位于生殖质中,这些 mRNA 随着胚胎发育被整合进入体细胞和 PGCs。miR-430 在受精卵中合子基因转录开始时就大量表达^[7],由于受到 miR-430 介导的 mRNA 去帽化、mRNA 降解和翻译抑制,部分生殖质基因在体细胞中会被迅速降解。在 PGCs 中,其靶 mRNA 也受到 miR-430 的调控^[11],但 *nanos3* 和 *tdrd7* mRNA 3'UTR 中的顺式作用元件能补偿 miR-430 介导的抑制作用,使这些 mRNA 能在 PGCs 中稳定存在。此外,近些年的研究发现,一些生殖系特异性 RNA 结合蛋白也在维持生殖质基因的特殊表达模式中发挥重要作用。其中,*dnd1* 可以通过结合 mRNA 以及阻止 miRNAs 与靶位点的相互作用,来抵消斑马鱼 PGCs 中 miR-430 等 miRNAs 的功能^[14];DAZL 能与 *tdrd7* 结合,通过诱导 poly (A)尾部的伸长(聚腺苷酸化)来缓解 miR-430 介导的对 *tdrd7* mRNA 的抑制^[15]。这些机制共同作用,保证了 *nanos3* 和 *tdrd7* 等基因在 PGCs 中的稳定表达和功能发挥。在本研究中,miR-430 的过表达会进一步加剧其对体细胞中靶 mRNA 的抑制作用,并且超出了 PGCs 中 *nanos3* 和 *tdrd7* 等基因的顺式作用元件以及 DAZL 和 *dnd* 等保护机制对 miR-430 介导的降解的补偿范围,进而导致这些生殖质基因在 PGCs 中表达量减少。

斑马鱼中已有的研究显示 *nanos3* 的正常表达对于 PGCs 的迁移和存活至关重要,敲降 *nanos3* 会造成部分 PGCs 的错误定位^[16]。本研究结果证明过表达 miR-430 可导致内源 *nanos3* 表达的下调以及外源 *nanos3* 3'UTR 的分布和定位变化,和已有的研究结果是一致的。表明 miR-430 可以通过调控 PGCs 中

nanos3 等生殖质基因的表达,参与调节 PGCs 的迁移运动。

鱼类的卵泡发育和卵母细胞成熟受下丘脑、垂体和卵巢产生的激素控制^[17],卵母细胞的成熟是在卵泡刺激素(LH)、成熟诱导激素(MIH)和成熟促进因子(MPF)三种主要调节因子的控制下发生的^[18]。近些年来,多项研究证明有多种 miRNAs 通过转录后调控在硬骨鱼类的卵母细胞发育、成熟以及卵子发生等过程中发挥作用。青鳞 miR-202 在卵子发生/卵泡发生中的起到关键作用,敲除 miR-202 导致早期卵泡发育受损,卵子数量减少^[19]。斑马鱼 23 号染色体上的 miRNA-200 簇是卵母细胞成熟和排卵所必需的^[20]。已有研究在斑马鱼卵母细胞中检测到了 miR-430b,认为 miR-430b 可能参与调控斑马鱼卵母细胞的成熟^[21]。

斑马鱼的性腺发育一般从出生后第 30 天开始,在性别分化之前,所有性腺均发育为卵巢;在出生后第 40~50 天期间,性腺开始分化;当发育到第 60 天时,性腺分化结束,卵巢和精巢形成。已有的研究表明,足够数量的早期生殖细胞对雌性斑马鱼的性发育至关重要,斑马鱼早期胚胎中生殖细胞的缺失,会导致斑马鱼发育为雄性^[22]。本研究结果表明,过表达 miR-430 会影响斑马鱼卵母细胞的正常发育,并导致卵巢发育迟缓,但不影响斑马鱼的性别分化。由于 PGCs 在迁移到生殖嵴后能与体细胞共同形成原始性腺,并最终增殖分化形成两性配子,PGCs 的正常迁移和准确定位是其功能发挥的前提条件。因此,本文作者推测过表达 miR-430 导致部分 PGCs 不能正常迁移至生殖嵴,造成定位于生殖嵴的 PGCs 数目减少,进而影响了后续卵巢的正常发育。

综上所述,本研究对 miR-430 在斑马鱼生殖细胞发育中的功能进行了初步探究。证明过表达 miR-430 会造成 PGCs 迁移紊乱,miR-430 可能通过影响 PGCs 中 *nanos3*、*piwil2* 和 *tdrd7* 等生殖质基因的表达及定位,在 PGCs 迁移过程中发挥关键作用。另外,在胚胎发育早期上调 miR-430 还会将会影响性腺分化时期卵母细胞的正常发育,导致卵巢发育迟缓。上述结果为后续研究 miR-430 在 PGCs 迁移和生殖细胞发育中的分子调控奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Science, 2004, 116: 281-297.
- [2] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. Cell, 2003, 115(7): 787-798.
- [3] Bartel D P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233.
- [4] Maatouk D M, Loveland K L, Mcmanus M T, et al. Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline[J]. Biology of Reproduction, 2008, 79(4): 696-703.
- [5] Iovino N, Pane A, Gaul U. miR-184 Has multiple roles in drosophila female germline development [J]. Developmental Cell, 2009, 17(1): 123-133.
- [6] Hatfield S D, Shcherbata H R, Fischer K A, et al. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway[J]. Nature, 2005, 435(7044): 974-978.
- [7] Giraldez A J, Cinalli R M, Glasner M E, et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish [J]. Science, 2005, 308(5723): 833-838.
- [8] Mishima Y, Giraldez A J, Takeda Y, et al. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430 [J]. Current Biology, 2006, 16(21): 2135-2142.
- [9] Tani S, Kusakabe R, Naruse K, et al. Genomic organization and embryonic expression of miR-430 in medaka (*Oryzias latipes*): Insights into the post-transcriptional gene regulation in early development[J]. Gene, 2010, 449(1-2): 41-49.
- [10] Chen P Y, Manninga H, Slanchev K, et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning [J]. Genes & Development, 2005, 19(11): 1288-1293.
- [11] Giraldez A J, Mishima Y, Rihel J, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs[J]. Science, 2006, 312(5770): 75-79.
- [12] Staton A, Knaut H, Giraldez J. miRNA regulation of Sdf1 chemokine signaling provides genetic robustness to germ cell migration[J]. Nature Genetics, 2011, 43(3): 204-211.
- [13] Hashimoto Y, Maegawa S, Nagai T, et al. Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation[J]. Developmental Biology, 2004, 268(1): 152-161.
- [14] Kedde M, Strasser M J, Boldajipour B, et al. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA[J]. Cell, 2007, 131(7): 1273-1286.
- [15] Takeda Y, Mishima Y, Fujiwara T, et al. DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly (A) tail length in zebrafish[J]. Plos One, 2009, 4(10): e7513.
- [16] Koprunker M, Thisse C, Thisse B, et al. A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells [J]. Genes & Development, 2001, 15(21): 2877-2885.
- [17] Clelland E, Peng C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 312(1-2): 42-52.
- [18] Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish[J]. Development Growth & Differentiation, 2008, 50(Sup1): 195-219.
- [19] Gay S, Bugeon J, Bouchareb A, et al. MiR-202 controls female fecundity by regulating medaka oogenesis[J]. Plos Genetics, 2018, 14(9): e1007593.
- [20] Xiong S, Tian J, Ge S, et al. The microRNA-200 cluster on chromosome 23 is required for oocyte maturation and ovulation in zebrafish[J]. Biology of Reproduction, 2020, 103(4): 769-778.
- [21] Abramov R, Fu G, Zhang Y, et al. Expression and regulation of miR-17a and miR-430b in zebrafish ovarian follicles[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 188: 309-315.
- [22] Dai X, Jin X, Chen X, et al. Sufficient numbers of early germ cells are essential for female sex development in zebrafish[J]. Plos One, 2015, 10(2): e0117824.

Preliminary Functional Analysis of miR-430 in Regulating Zebrafish (*Danio rerio*) Primordial Germ Cell Migration and Gonad Development

Lin Xiaohan¹, Jin Chaofan¹, Gao Chen¹, Wang Bo¹, He Yan^{1,2}, Qi Jie^{1,2}, Zhang Quanqi^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Process, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China)

Abstract: To explore the role of microRNAs (miRNAs) in the development of zebrafish germ cells, this study overexpressed miR-430 during the embryonic stage of zebrafish and found that the migration of PGCs was aberrant. qRT-PCR results demonstrated that the expression of germplasm genes, such as *nanos3*, *piwil2*, and *tdrd7* was significantly down-regulated. In addition, in the process of gonadal development in zebrafish, histological observation showed that the overexpression of miR-430 would lead to abnormal oocyte development and retarded ovaries development in female zebrafish, but had no significant effect on the development of male germ cells and testis. Further statistical analysis demonstrated that the overexpression of miR-430 did not affect the sex differentiation of zebrafish. In summary, our research preliminarily determined the effect of miR-430 on PGCs migration, gonad development, and sex differentiation, laying a theoretical foundation for further exploration of the function and molecular mechanism of miR-430 in the development of zebrafish germ cells.

Key words: zebrafish (*Danio rerio*); miR-430; microinjection; PGCs; oocyte; gonad development

责任编辑 高 蓓