

高原鼯鼠精子发生相关基因的季节性表达特征

姚宝辉^{1,2}, 安康^{1,2}, 侯齐琪^{1,2}, 张德罡^{1,2}, 苏军虎^{1,2,3}

(1. 甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学-新西兰梅西大学草地生物多样性研究中心, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃省祁连山草原生态系统野外科学观测研究站, 甘肃 天祝 733200)

摘要:【目的】探明高原鼯鼠(*Eospalax baileyi*)精子发生相关基因表达的季节性特征。【方法】分析高原鼯鼠繁殖期和非繁殖期睾丸形态、血清激素和睾丸特异性基因的季节特征。【结果】高原鼯鼠在繁殖期睾丸重量增加, 睾酮分泌升高, 初级精母细胞、次级精母细胞、单倍体精细胞和精子中特异性基因的表达水平均上调。非繁殖期睾丸萎缩, 睾酮分泌水平降低, 初级精母细胞、次级精母细胞、单倍体精细胞和精子中特异性基因的表达水平下调。【结论】高原鼯鼠睾丸形态、激素和基因表达具有季节性差异, 非繁殖期高原鼯鼠睾丸精子发生停滞在精原细胞阶段。这为揭示高原鼯鼠睾丸发育机理提供了参考, 对了解动物季节性繁殖的调控有重要意义。

关键词:季节性繁殖; 睾酮; 生殖细胞; 基因表达; 高原鼯鼠

中图分类号:S812.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2024)05-0061-11

DOI:10.13817/j.cnki.cycp.2024.05.007



季节性繁殖是指生活在非热带地区的动物, 面对环境因素(光照、温度、降水量和食物资源)的剧烈变化时形成的一种适应性繁殖策略^[1], 可以将产仔期选择在食物资源丰富和环境适宜的季节, 以提高繁殖效率和增加后代存活率。季节性繁殖动物的性腺活性在全年中出现周期性变化^[2]。当动物处于繁殖期, 睾丸活性恢复, 精子发生启动, 血清促性腺激素和睾酮浓度增加, 并逐渐产生成熟精子参与繁殖活动。在非繁殖季节, 一些动物表现出睾丸萎缩、睾丸重量减轻、血清中性激素水平降低、生精上皮细胞耗竭、曲细精管的内径减少以及精子发生停滞^[3]。

精子发生是雄性生殖干细胞发育为精子的复杂

过程, 主要包括4个阶段: 精原干细胞(Spermatogonial stem cells, SSC)的自我更新、精原细胞的增殖和分化、精母细胞的减数分裂和精子形成^[4]。季节性精子发生是指动物只在繁殖期启动精子发生, 而在非繁殖期精子发生进入停滞期, 生精细胞被阻断在某一特定发育阶段。在季节性繁殖动物中, 精子发生是由细胞增殖和细胞凋亡之间的相互作用调节的。在季节性退化的睾丸中, 曲细精管生精上皮细胞的萎缩过程会导致生殖细胞和支持细胞的凋亡^[5]。研究表明, 动物在非繁殖季节, 睾丸重量和曲细精管内径会大幅下降。由于生殖策略的不同, 曲细精管生精上皮细胞的萎缩过程不同, 精子发生停滞的阶段也不同。第1种是精子发生的减少, 即在保留所有生殖细胞系的情况下生殖细胞数量减少, 如索伊公羊(*Ovis aries*)^[6]和马鹿(*Cervus elaphus*)^[7]。第2种情况是精子发生停滞在精母细胞阶段, 即其他生殖细胞凋亡, 只能在曲细精管内观察到精原细胞、精母细胞和支持细胞, 如叙利亚仓鼠(*Mesocricetus auratus*)^[8]和草原犬鼠(*Cynomys ludovicianus*)^[9]。第3种情况是精子发生停滞在精原细胞阶段, 即除了精原细胞以外的生殖细胞凋亡, 只能在曲细精管中观察

收稿日期:2023-02-17; **修回日期:**2023-03-21

基金资助:甘肃省科技计划项目(20JR10RA564); 甘肃省教育厅产业支撑项目(2022CYZC-47); 甘肃省林草局科技支撑项目(LCJ2021020); 武威市市级科技计划项目(WW2002YFS008)

作者简介:姚宝辉(1993-), 男, 甘肃成县人, 博士研究生。

E-mail: 735310030@qq.com

*通信作者。E-mail: sujh@gsau.edu.cn

到精原细胞和支持细胞,如高原鼠兔(*Ochotona curzoniae*)^[10]和水貂(*Mustela vison*)^[11]。阐明不同类群动物在非繁殖期精子发生停滞的分子机制,对了解动物季节性繁殖的调控机制具有重要意义。

高原鼢鼠(*Eospalax baileyi*)是青藏高原的关键种,在4—6月进行繁殖^[12],终年营地下生活,感光受洞道限制,但仍能够感知外界光周期的变化,体内褪黑素产生受光周期调节,具有季节性分泌特征^[13-14]。高原鼢鼠被视为“生态系统工程师”,在自然种群密度下,在草地生态系统中发挥着重要作用,如促进营养循环、改善土壤结构和增加植被组成^[15]。然而,当种群密度较高时,由于高原鼢鼠掘土来建造洞道,并与家畜竞争优质牧草,加剧草地退化和土壤侵蚀^[16]。高原鼢鼠作为季节性繁殖动物,其睾丸发育具有周期性变化。安晓宇等^[13]和An等^[17]研究发现非繁殖期高原鼢鼠精子发生停滞在精原细胞阶段,但是在高原鼢鼠季节性繁殖变化中睾丸特异性基因的表达尚不明确。为探明高原鼢鼠睾丸季节性生理特征,本研究分析了高原鼢鼠繁殖期和非繁殖期的睾丸形态特征、血清激素水平变化和睾丸特异性基因表达差异,旨在探究高原鼢鼠在非繁殖期精子发生停滞阶段的调控机制,为掌握地下啮齿动物季节性繁殖调控提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物获取

于繁殖期(2020年4月底)和非繁殖期(2020年10月),在甘肃省天祝藏族自治县(37°19'N,102°75'E),用活捕笼(宝鸡市绿地新城有限公司,西安,中国)捕获高原鼢鼠。根据苏军虎等^[18]对高原鼢鼠的年龄划分,并将其分为亚成体、成体和老体类别,并选择成体进行研究。繁殖期(Breeding season,BS)高原鼢鼠20只,非繁殖期(Non-breeding season,NBS)高原鼢鼠20只。

首先,对高原鼢鼠实施安乐死。其次,解剖高原鼢鼠,采血,称量睾丸。最后,将每只鼢鼠的一个睾丸置于10%的中性福尔马林溶液中进行固定,并切片进行H&E染色。将另一个睾丸浸在液氮中,提取总RNA。

1.2 激素测定

血液在4℃、3 500 r/min下离心4 min,分离血清。

使用酶联免疫吸附测定试剂盒(Cloud Clone Crop.,中国武汉)测试睾酮(Testosterone)、黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)和促性腺激素释放激素(GnRH)的水平。使用酶标记仪器在450 nm波长下检测各孔吸光度值,以标准品浓度和对应吸光度值绘制标准回归曲线,计算各样本浓度值。

1.3 H&E 染色

睾丸组织在4℃下固定在10%中性福尔马林溶液中24 h。之后将固定的睾丸在乙醇浓度梯度中连续脱水,用二甲苯清除,并用石蜡包埋。并将石蜡组织块切成5 μm的切片,经过二甲苯脱蜡,乙醇梯度复水后,在苏木精染色缓冲液中染色,用0.05%伊红(溶于95%乙醇)复染,染色的切片在流动水下洗涤,并用1%盐酸(溶于75%乙醇)短暂处理。然后将切片在乙醇浓度梯度中连续脱水,并用中性树胶封片。并在光学显微镜下观察,每组至少5个重复。

1.4 RNA-Seq 数据

从繁殖期和非繁殖期各选取3个睾丸样本进行转录组测序。RNA-Seq数据保存在中国国家生物信息中心(PRJCA010603, <https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa/browse/CRA008119>)。

参考Zhang等^[19]的研究,使用RNA-Seq数据比较繁殖期和非繁殖期睾丸中SSC(*PIWIL4*、*FGFR3*、*TAF4B*、*GFRA1*、*ZBTB16*、*STRA8*)、初级精母细胞(*DENR*、*SYCP3*、*SPO11*、*DMRTC2*、*SYCE1*、*IFT81*)、次级精母细胞(*CIB4*、*CIB1*、*TMEM89*、*CCDC81*、*C9ORF116*、*C9ORF135*)、单倍体精细胞(*ACTRT3*、*KLF5*、*SAXO1*、*ACRV1*、*PLCZ1*、*CHD5*)和精子(*TNP1*、*SPATA19*、*GAPDHS*、*TEKT1*、*CATSPER1*、*THEG*)中特异性基因的表达。

1.5 实时荧光定量PCR

为了验证RNA序列中基因表达的准确性,我们选择了6个基因进行q-PCR检测。使用PrimeScript 1st Strand(Takara)试剂盒将所有样品RNA反转录为cDNA,使用TB Green®, Premix Ex Taq™ II(Takara)在实时PCR系统(Light Cycler 96 System)中通过实时荧光定量(q-PCR)扩增cDNA。采用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 法计算基因的相对表达。用于q-PCR的引物如表1所示。

表 1 q-PCR 引物序列
Table 1 List of the q-PCR primer sequence

Gene symbol	Primer Sequence	Product size/bp
<i>ZBTB16</i>	F:CCCCGGTGGAGAAGCATTTG R:CTGAATGAAACCCCTGAGGGAGG	170
<i>STRA8</i>	F:GCACACCGTTTTGAATCCCC R:TTTCCCGCCATCACGACTTT	197
<i>SYCE1</i>	F:CAGGTCATCGGCAACTGGGA R:GGACTTCAATCCGGGGCTCTA	151
<i>SYCP3</i>	F:TACTGAAGAAAATACTCCAGGTGA R:TGGCAAGAAGAGCCTTGTTAAT	134
<i>TEKT1</i>	F:GTGCACGACTGTAACCTCCA R:CCACACCCCTGCAATGAGAT	183
<i>CATSPER1</i>	F:CAGGCCACACCATCTTGACT R:CACCATGTAAGTGAGGCCGT	107
β -Actin	F:TTGTGCGTGACATCAAAGAG R:ATGCCAGAAGATTCCATACC	208

1.6 数据分析

使用 SPSS 23.0 软件对各指标进行统计分析,采用 t 检验法对平均值进行比较,并以平均值±SE 表示。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 高原鼢鼠睾丸的形态学和组织学研究

在非繁殖期,高原鼢鼠表现出睾丸萎缩、睾丸重量下降、曲细精管内径减小,并伴有生精上皮细胞耗竭。H&E 染色切片观察发现,在繁殖期睾丸曲细精管显示出正常的生理特征,曲细精管分布有各种类型的生殖细胞,包括:精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、圆形精子、长形精子和精子;在繁殖期的睾丸曲细精管正在进行精子发生。而在非繁殖期睾丸曲细精管生精上皮细胞退化,睾丸内只能观察到精原细胞、支持细胞和间质细胞,在非繁殖期的睾丸曲细精管中没有进行精子发生(图 1-A、1-B)。

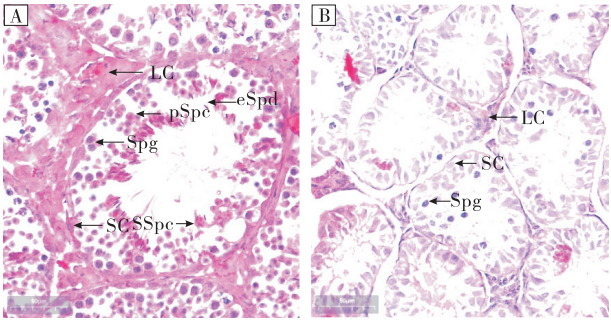


图 1 高原鼢鼠睾丸的形态学和组织学比较。
Fig. 1 Morphological and histological changes of testis of plateau zokors.

注:A 繁殖期睾丸的 H&E 染色;B 非繁殖期睾丸的 H&E 染色;SC 支持细胞;LC 间质细胞;Spg 精原细胞;pSpc 初级精母细胞;sSpc 次级精母细胞;eSpd 长形精子细胞。

2.2 血清激素

利用 ELISA 分析发现,繁殖期血清 GnRH 和睾酮的浓度显著高于非繁殖期的浓度($P<0.05$),繁殖期血清 FSH 和 LH 的浓度高于非繁殖期的浓度,但差异不显著(表 2)。

表 2 高原鼢鼠血清生殖激素变化。
Table 2 Changes of serum reproductive hormones in plateau zokor

	BS	NBS	t	P
GnRH/(pg·mL ⁻¹)	522.84±45.67	318.42±46.54	-3.297	0.011
睾酮/(pg·mL ⁻¹)	2 368.59±251.98	523.03±46.43	-4.949	0.008
FSH/(pg·mL ⁻¹)	4.59±0.61	3.59±0.16	-2.521	0.063
LH/(ng·mL ⁻¹)	37.08±6.95	27.47±5.15	-1.969	0.077

注:BS 繁殖期;NBS 非繁殖期,下同。

2.3 高原鼯鼠繁殖期和非繁殖期睾丸特异性基因的表达

2.3.1 睾丸 SSC 中特异性基因的表达 通过 RNA-Seq 数据比较繁殖期和非繁殖期睾丸的 SSC、初级精母细胞、次级精母细胞、单倍体精细胞和精子中特异性基因的表达。在 SSC 的特异性表达基因中，

PIWIL4 基因在非繁殖期睾丸中的表达显著高于繁殖期的表达 ($P < 0.05$), *FGFR3* 基因在繁殖期睾丸中的表达显著高于非繁殖期的表达 ($P < 0.05$)。 *TAF4B*、*GFRA1*、*ZBTB16*、*STRA8* 在繁殖期睾丸中的表达和非繁殖期的表达之间差异不显著(图2)。

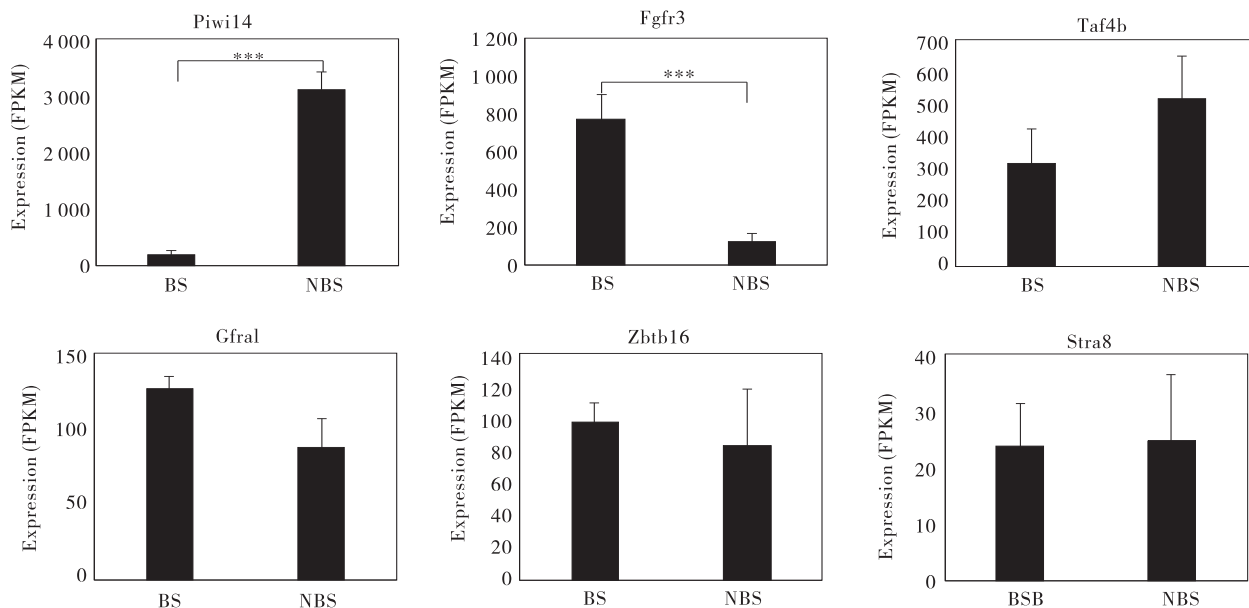


图2 高原鼯鼠睾丸 SSC 中特异性表达的基因

Fig. 2 Genes specifically expressed in the SSC of the plateau zokor testis

注：“*”表示 $P < 0.05$ ，“**”表示 $P < 0.01$ ，“***”表示 $P < 0.001$ ，下同。

2.3.2 睾丸初级精母细胞中特异性基因的表达 在初级精母细胞的特异性表达基因中，*DENR* 在繁殖期睾丸中的表达和非繁殖期的表达之间差异不显著。繁殖期睾丸中 *SYCP3*、*SPO11*、*DMRTC2*、*SYCE1*、*IFT81* 的表达显著高于非繁殖期的表达 ($P < 0.05$)(图3)。

2.3.3 睾丸次级精母细胞中特异性基因的表达 在次级精母细胞的特异性表达基因中，繁殖期睾丸中 *CIB4*、*CIB1*、*TMEM89*、*CCDC81*、*C9ORF116*、*C9ORF135* 的表达显著高于非繁殖期的表达 ($P < 0.05$)(图4)。

2.3.4 睾丸单倍体精细胞中特异性基因的表达 在单倍体精细胞的特异性表达基因中，繁殖期睾丸中 *ACTRT3*、*KLF5*、*SAXO1*、*ACRV1*、*PLCZ1* 和 *CHD5* 的表达显著高于非繁殖期的表达 ($P < 0.05$)(图5)。

2.3.5 睾丸精子中特异性基因的表达 在精子的特异性表达基因中，繁殖期睾丸中 *TNP1*、*SPATA19*、

TEKT1、*GAPDHS*、*CATSPER1* 和 *THEG* 的表达显著高于非繁殖期的表达 ($P < 0.05$)(图6)。

2.4 实时荧光定量 PCR(q-PCR)表达

随机选择 6 个基因 (*ZBTB16*、*STRA8*、*SYCE1*、*SYCP3*、*TEKT1*、*CATSPER1*) 进行验证。如图 7 所示，q-PCR 结果与转录组测序结果具有类似的表达趋势。证实了 RNA-seq 数据的真实性。

3 讨论

动物的季节性繁殖一直是生理生态学和生殖生物学关注的焦点,但大部分研究集中在地上动物,而对地下动物繁殖行为和繁殖生理的认知仍十分有限。为数不多的研究多集中在鼯鼠,如伊比利亚鼯鼠 (*Talpa occidentalis*)^[3]、欧洲鼯鼠 (*T. europaea*)^[20] 和中东盲鼯鼠 (*Spalax ehrenberghi*)^[21]。本研究中组织学分析发现,高原鼯鼠非繁殖期精子发生停滞在精原细胞阶段。高原鼯鼠在非繁殖期观察到睾丸重量下降,伴随曲细精管的退化,直到睾丸切片显示有精原细胞

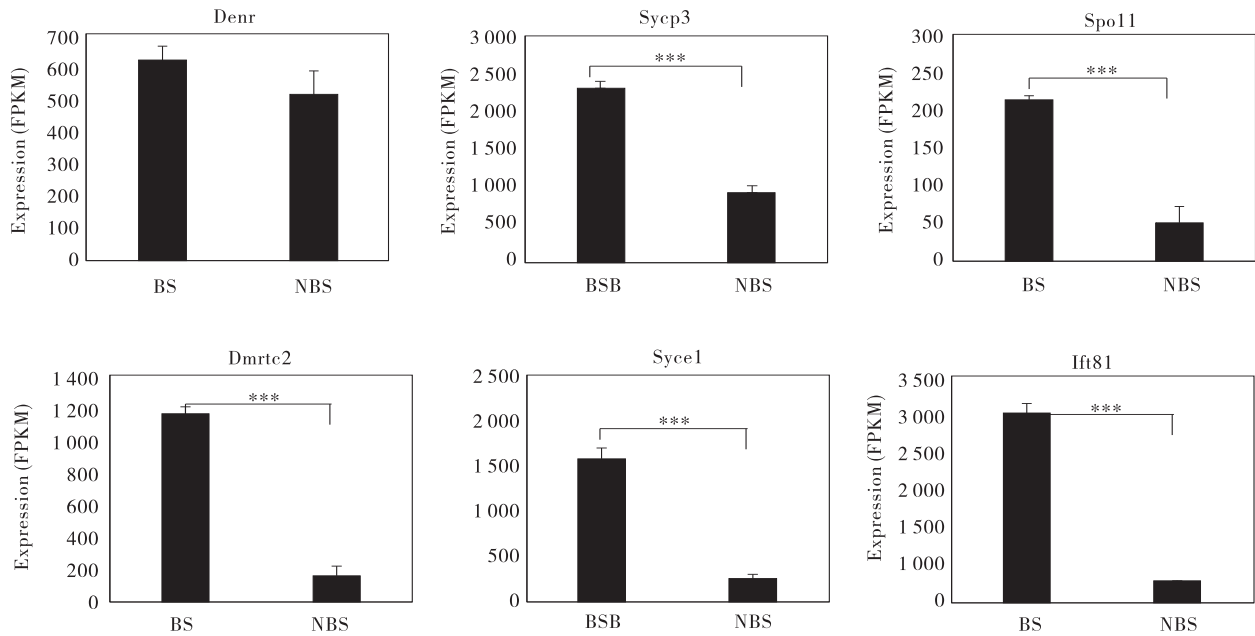


图 3 高原鼯鼠睾丸初级精母细胞中特异性表达的基因

Fig. 3 Genes specifically expressed in the primary spermatocytes of the plateau zokor testis

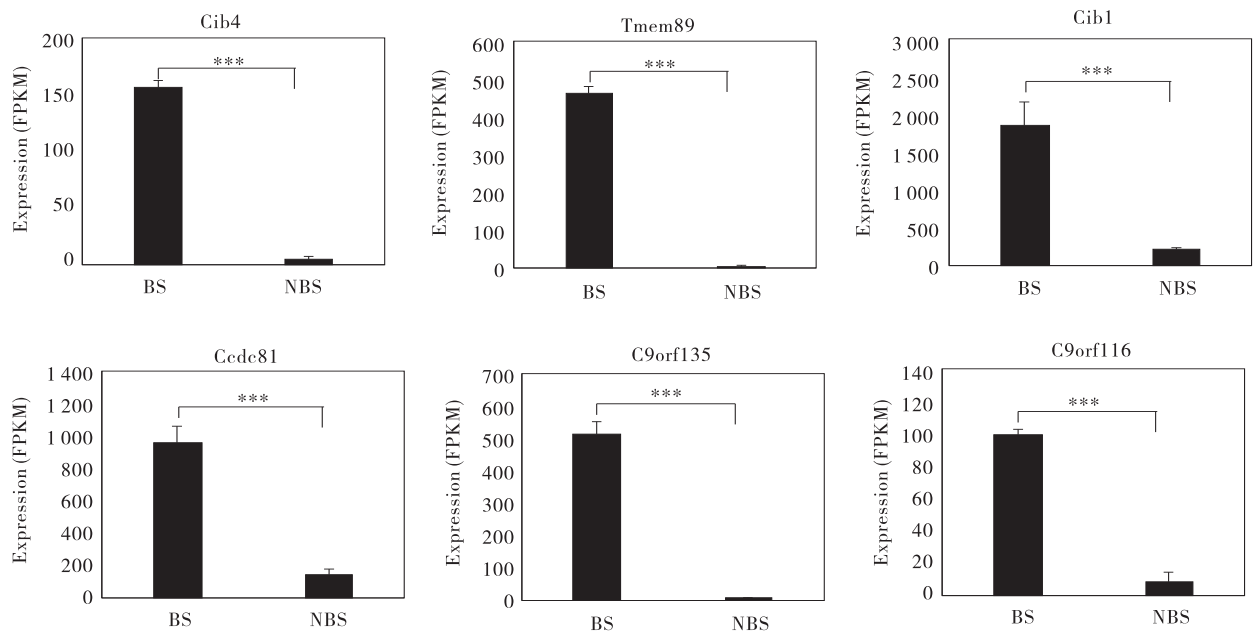


图 4 高原鼯鼠睾丸次级精母细胞中特异性表达的基因

Fig. 4 Genes specifically expressed in the secondary spermatocytes of the plateau zokor testis

和支持细胞,与安晓宇等^[13]和An等^[17]的研究一致。精原细胞特异性表达的基因在繁殖期和非繁殖期之间差异不显著,但繁殖期初级精母细胞、次级精母细胞、单倍体精细胞和精子中特异性基因表达水平显著高于其非繁殖期表达水平,这从基因水平证明了非繁殖期高原鼯鼠精子发生停滞在精原细胞阶段。

季节性繁殖动物的性腺活性在全年中出现周期性变化,包括睾丸大小、精子发生以及生殖激素的合

成和分泌等^[2]。在本研究中,高原鼯鼠睾丸大小和血清激素具有季节性变化,繁殖期血清 GnRH、睾酮、FSH 和 LH 的浓度高于非繁殖期的浓度,这与安晓宇等^[13]、安康等^[14]和An等^[17]的研究一致。在繁殖期,高水平的睾酮负责维持血睾屏障正常的生理功能,诱导生殖细胞减数分裂和减数分裂后的发育,并抑制生殖细胞凋亡。非繁殖期睾酮分泌水平较低会导致睾丸退化,生殖细胞凋亡率增加,精子发生停滞^[22]。非繁

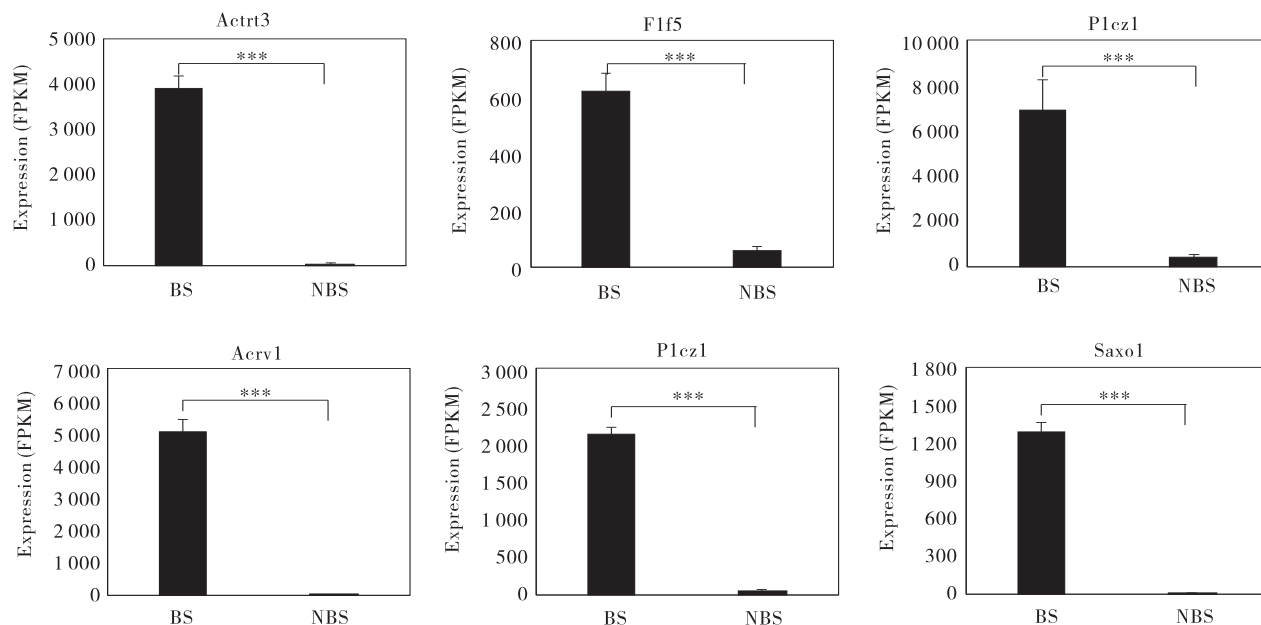


图5 高原鼯鼠睾丸单倍体精细胞中特异性表达的基因

Fig. 5 Genes specifically expressed in the haploid spermatids of the plateau zokor testis

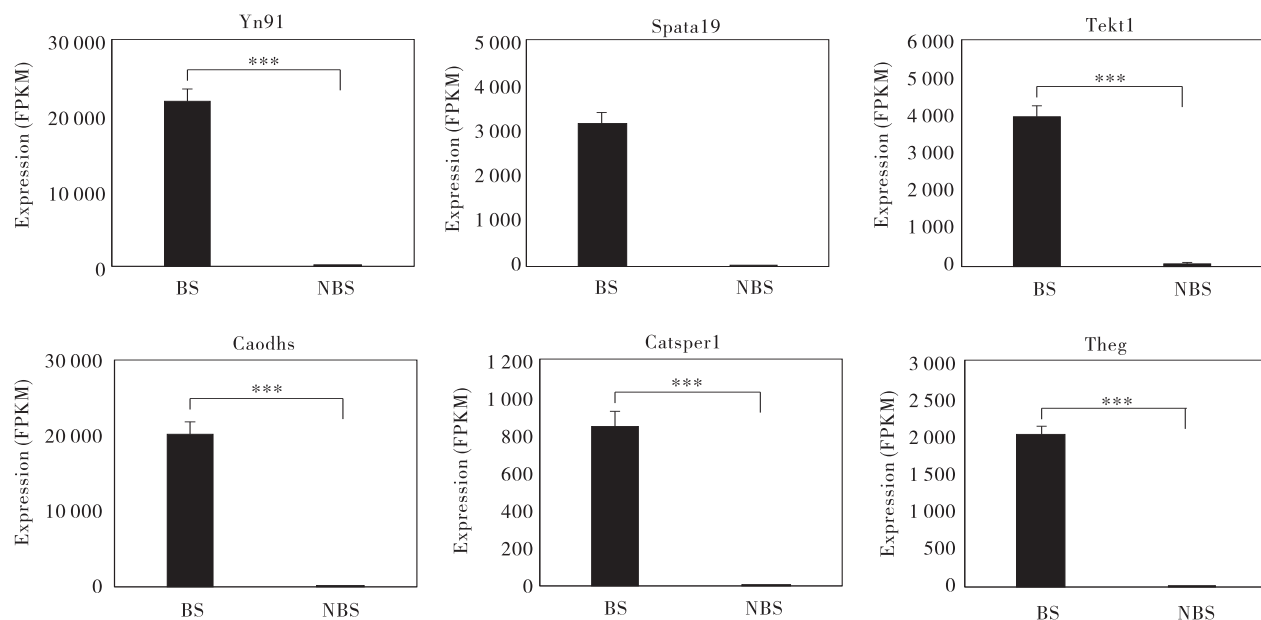


图6 高原鼯鼠睾丸精子中特异性表达的基因

Fig. 6 Genes specifically expressed in the sperm of the plateau zokor testis

殖期低水平的睾酮维持生殖细胞的存活,而繁殖期高水平的睾酮调节精子发生和动物生殖行为。

精原干细胞(SSC)是精子发生的基础,对雄性生育至关重要。SSCs自我更新以维持干细胞库,进一步的分化能够维持青春期后雄性的精子发生^[23]。SSC仅占小鼠生殖细胞总数的0.03%,然而在分化的精原细胞中进行有丝分裂,随后是2次减数分裂,每天产生数百万个精子^[24]。在SSC特异性表达的基因 *FGFR3*^[25]、*GFRA1*^[23]、*ZBTB16*(也称为 *PLZF*)^[26]、

TAF4B^[27]可以促进其自我更新,但只有 *FGFR3* 基因在繁殖期睾丸中的表达高。*GFRA1*和 *ZBTB16*在未分化的精原细胞中表达,通常被用作未分化精原细胞的标记物,*TAF4B*是精原干细胞增殖所必需的转录调节因子。*STRA8*在分化的精原细胞和减数分裂前的精母细胞中表达^[28]。*GFRA1*、*ZBTB16*、*TAF4B*和 *STRA8*也在非繁殖期SSC中以较高水平表达。因此,虽然高原鼯鼠非繁殖期睾丸精子发生停滞,但是非繁殖期SSC能够持续自我更新。*PIWIL4*是Argo-

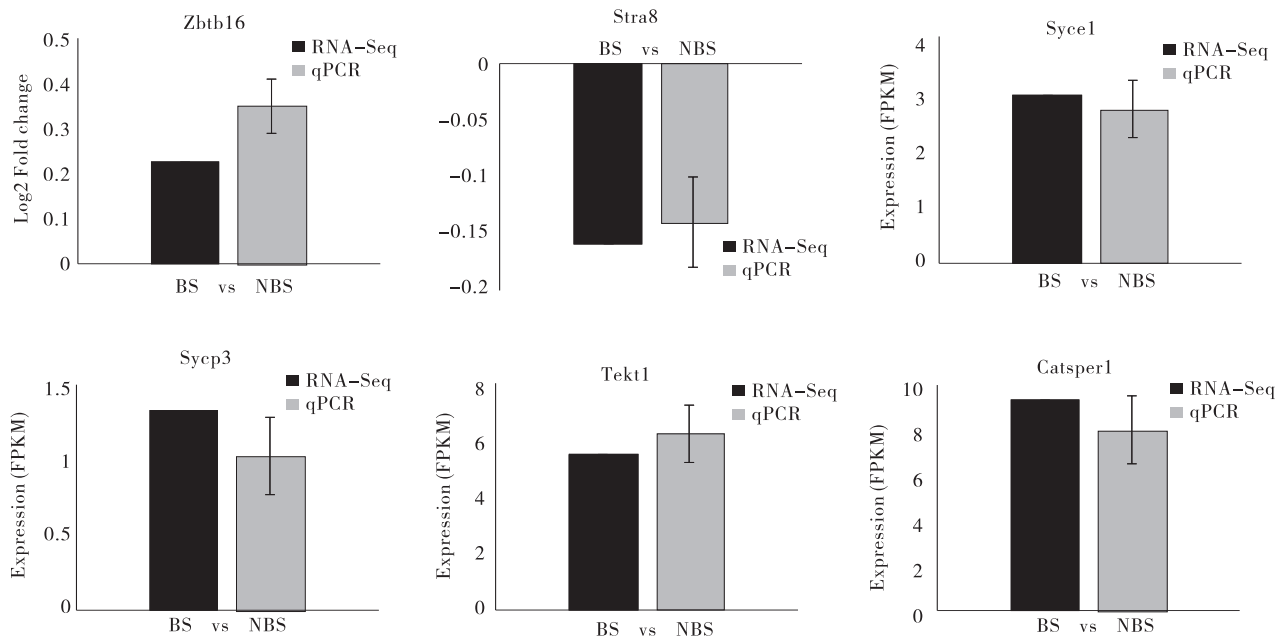


图 7 RNA-seq 数据中基因的 qPCR 验证

Fig. 7 The RT-qPCR validation of genes in RNA-seq data

naute 蛋白家族的 *PIWI* 分支,在动物睾丸中特异性表达,且对睾丸的发育至关重要,*PIWIL4* 在 DNA 甲基化过程中发挥着重要作用^[29]。在小鼠中,生殖细胞粗线期前的 *PIWIL2* 和 *PIWIL4* 与有丝分裂相对旺盛相关^[29]。*PIWIL4* 在高原鼯鼠非繁殖期睾丸中的高表达,可能是由于非繁殖期精子发生在第一次减数分裂期之前受阻,导致 *PIWIL4* mRNA 的积累^[19]。

减数分裂是有性生殖生物体中一种独特的细胞分裂过程。减数分裂细胞周期开始于一轮 DNA 复制,随后是两轮连续的细胞分裂,从而从二倍体祖细胞中产生单倍体生殖细胞。DNA 复制后,减数分裂特异性联会复合体将同源染色体物理连接成对,允许在第一次减数分裂时交换遗传物质和精确的染色体分离。联会复合体的组装和许多减数分裂特异性染色体事件发生在减数分裂前期 I。因此,进入减数分裂前期 I 是精子发生的关键步骤^[30]。本研究中发现初级精母细胞中特异性表达的基因(*SYCE1*、*SYCP3*、*SPO11*、*DMRTC2*),均与减数分裂相关,在繁殖期高原鼯鼠睾丸中均以较高水平表达,而在非繁殖期的表达显著降低。减数分裂起始因子 *STRA8* 基因调节精子发生中第一次减数分裂的启动^[28]。*SYCE1* 在减数分裂前期在同源染色体之间形成,仅存在于第 1 次减数分裂期间^[31]。*SYCP3* 是偶联复合物组装所必需的,在初级精母细胞中表达^[32]。*SPO11* 是一个减数分裂

相关基因,缺失会导致精子发生停滞^[33]。雄性 *DMRTC2* 基因的靶向缺失会导致精子发生异常,如减数分裂停滞^[34]。因此,我们认为非繁殖期高原鼯鼠睾丸的精子发生只进行到第一次减数分裂,并在第一次减数分裂早期停止,导致非繁殖期睾丸中几乎没有初级精母细胞、次级精母细胞、单倍体精细胞和精子。*IFT81* 对精子纤毛和鞭毛的形成和维持至关重要^[35],在繁殖期睾丸中表达更多,这也是因为非繁殖期睾丸不能产生精子。在有丝分裂开始时,*DENR* 在 Ser73 上被 Cyclin B/CDK1 和 Cyclin A/CDK2 磷酸化,然后在细胞退出有丝分裂时去磷酸化。Ser73 的磷酸化促进 *DENR* 蛋白的有丝分裂稳定性,并防止其在 Asp26 处断裂。这可能导致参与有丝分裂的 mRNA 的翻译增强^[36]。*DENR* 在非繁殖期睾丸中的表达和繁殖期一样高,这也可能与非繁殖期睾丸的减数分裂过程受阻和有丝分裂相对旺盛有关。

本研究发现,繁殖期高原鼯鼠睾丸次级精母细胞、单倍体精细胞和精子中特异性表达的基因表达水平均显著高于其非繁殖期的表达水平。结合前期文献,发现这些基因均与精子发生相关。例如 *CIB1* 和 *CIB4* 在人类睾丸中强烈表达,并在小鼠精子发生的单倍体阶段发挥关键作用^[37-38]。*CIB1* 和 *CIB4* 的缺失会使雄性由于精子发生的单倍体分化受损而表现出不育。而 *TMEM89* 仅在次级精母细胞中特异性

表达^[39]。*CCDC81*在哺乳动物精子细胞的中心体中表达,对纤毛轴丝成核至关重要^[40]。*C9ORF116*在次级精母细胞中表达^[41]。*ACRV1*蛋白主要位于人睾丸中圆形和细长的精细胞中,表明 *ACRV1* 可能在哺乳动物精子发生中起重要作用,可能是避孕疫苗的靶点^[42]。*PLCZ1*是精子成熟过程中细长精子细胞中的一种重要催化酶^[43]。*CHD5*在精子形成过程中的组蛋白到精蛋白重塑过程中起着协调作用,小鼠 *CHD5* 的失活导致精子染色质致密缺陷和雄性不育^[44]。*TNP1*是浓缩精子细胞染色质中的主要蛋白质,在哺乳动物精子发生过程中的组蛋白置换和染色质凝集中起关键作用^[45]。*SPATA19*蛋白产物位于精子线粒体外膜,参与精子细胞和多细胞生物发育和细胞分化^[46]。*GAPDHS*是一种精子特异性糖酵解酶,参与精子发生和精子运动过程中的能量产生^[47]。*TEKT1*参与小鼠精子轴素和鞭毛的发育^[48]。*CATSPER1*是一种存在于精子主要片段中的质膜蛋白,参与了精子激活和顶体反应^[49]。*THEG*主要位于单倍体圆形精细胞的细胞核中,*THEG*的突变导致小鼠的生精停滞^[50]。这些基因在繁殖期睾丸中表达高,而在非繁殖期睾丸中表达显著降低,也是因为非繁殖期睾丸不能产生精子的验证。

本研究发现,非繁殖期高原鼯鼠的精子发生停滞在精原细胞阶段,相关文献报道叙利亚仓鼠^[8]和草原犬鼠^[9]的精子发生停滞在精母细胞阶段。繁殖调控出现了不同的策略,可能于自身的适应性有关。由于繁殖是一项高投资和高耗能过程,维持精子发生的稳定需要消耗大量能量;以及高原鼯鼠生活在高寒地区(青藏高原),觅食和挖掘洞道也是高耗能过程。在权衡生存与繁殖之间的能量需求后,高原鼯鼠会选择最佳的生殖策略,以确保种群的延续。因此,我们推测,高原鼯鼠在非繁殖期主要把能量用于自身生存,而在睾丸发育(繁殖活动)上投入较少能量,使精原细胞能够自我更新,不影响下一繁殖周期的启动。然而,具体的精子发生停滞机制还需要进一步深入研究。

4 结论

雄性高原鼯鼠睾丸重量在繁殖期增加,睾酮分泌升高,曲细精管中存在各类生殖细胞,其中初级精母细胞、次级精母细胞、单倍体精细胞和精子中特异性

基因的表达均升高。非繁殖期虽然睾丸退化,睾酮分泌水平较低,精子发生停滞在精原细胞阶段。研究为理解高原鼯鼠季节性繁殖中睾丸的发育提供了参考。

参考文献:

- [1] Nishiwaki—Ohkawa T, Yoshimura T. Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrates [J]. The Journal of endocrinology, 2016, 229(3): 117—127.
- [2] Wang J, Wang Y, Zhu M, *et al.* Seasonal expression of luteinizing hormone receptor and follicle stimulating hormone receptor in testes of the wild ground squirrels (*Citellus dauricus Brandt*) [J]. Acta histochemica, 2017, 119(7): 727—732.
- [3] Dadhich R K, Real F M, Zurita F, *et al.* Role of apoptosis and cell proliferation in the testicular dynamics of seasonal breeding mammals: a study in the Iberian mole, *Talpa occidentalis* [J]. Biology of reproduction, 2010, 83(1): 83—91.
- [4] Hofmann M C. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche [J]. Molecular and cellular endocrinology, 2008, 288(1): 95—103.
- [5] Seco—Rovira V, Beltrán—Frutos E, Ferrer C, *et al.* The death of sertoli cells and the capacity to phagocytize elongated spermatids during testicular regression due to short photoperiod in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) [J]. Biology of reproduction, 2014, 90(5): 1—10.
- [6] Hochereau—de Reviers M T, Perreau C, Pisselet C, *et al.* Effect of a 2—month light cycle regimen on testicular parameters of adult Ile—de—France rams [J]. Microscopy research and technique, 1992, 20(3): 268—273.
- [7] Hochereau—de Reviers M T, Lincoln G A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus* [J]. Journal of reproduction and fertility, 1978, 54(2): 209—213.
- [8] Seco—Rovira V, Beltran—Frutos E, Ferrer C, *et al.* Testicular histomorphometry and the proliferative and apoptotic activities of the seminiferous epithelium in Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) during regression owing to short photoperiod [J]. Andrology, 2015, 3(3): 598—610.
- [9] Foreman D. Seminiferous tubule stages in the prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) during the annual breeding cycle [J], The Anatomical record, 1997, 247(3): 355—367.
- [10] Wang Y, Jia G, Yan R, *et al.* Testosterone—retinoic acid signaling directs spermatogonial differentiation and sea-

- sonal spermatogenesis in the Plateau pika (*Ochotona curzoniae*)[J]. *Theriogenology*, 2019, 123(1):74—82.
- [11] Blottner S, Schön J, Jewgenow K. Seasonally activated spermatogenesis is correlated with increased testicular production of testosterone and epidermal growth factor in mink (*Mustela vison*)[J]. *Theriogenology*, 2006, 66(6): 1593—1598.
- [12] 王艳莉,姚宝辉,谭宇尘,等. 高原鼢鼠阴道涂片HE、瑞氏和快速革兰氏染色法比较[J]. *草原与草坪*, 2021, 41(5):119—124.
- [13] 安晓宇,王玉军,李永昌,等. 高原鼢鼠精子发生的形态学特征和关键调控因子探究[J]. *兽类学报*, 2020, 40(5):435—445.
- [14] 安康,包明芳,姚宝辉,等. MTNR1a和MTNR1b基因在繁殖期与非繁殖期雄性高原鼢鼠HPG轴上的表达[J]. *兽类学报*, 2022, 42(4):410—419.
- [15] Zhang Y, Liu J. Effects of plateau zokors (*Myospalax fontanierii*) on plant community and soil in an alpine meadow [J]. *Journal of Mammalogy*, 2003, 84(2):644—651.
- [16] 赵云,张鹤山,张德罡. 鼢鼠破坏对天祝高寒草地土壤营养的影响[J]. *草原与草坪*, 2009, 136(5):17—19+22.
- [17] An K, Yao B, Kang Y, *et al.* Seasonal expression of gonadotropin genes in the pituitary and testes of male plateau zokor (*Eospalax baileyi*) [J]. *Animals*, 2022, 12(6):725.
- [18] 苏军虎,彭然,南志标,等. 甘南草原高原鼢鼠年龄划分及其组成分析[J]. *动物学杂志*, 2018, 53(1):46—54.
- [19] Zhang P, Wang M, Chen X, *et al.* Dysregulated genes in undifferentiated spermatogonia and Sertoli cells are associated with the spermatogenic arrest in cattleyak[J]. *Molecular reproduction and development*, 2022, 89(12): 632—645.
- [20] Tähkä K M, Teräväinen T, Pankakoski E, *et al.* The testes of moles (*Talpa europaea*) retain a considerable microsomal capacity for androgen synthesis during seasonal regression [J]. *General and comparative endocrinology*, 1989, 76(2):301—309.
- [21] Cooper H M, Herbin M, Nevo E. Ocular regression conceals adaptive progression of the visual system in a blind subterranean mammal [J]. *Nature*, 1993, 361(6408): 156—159.
- [22] Pakarainen T, Zhang F P, Mäkelä S, *et al.* *sis* and partially restores fertility in luteinizing hormone receptor knockout mice [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(2): 596—606.
- [23] Fayomi A P, Orwig K E. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men[J]. *Stem cell research*, 2018, 29:207—214.
- [24] Phillips B T, Gassei K, Orwig K E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis [J]. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences*, 2010, 365(1546):1663—1678.
- [25] Winge S B, Nielsen J, Jørgensen A, *et al.* Biglycan is a novel binding partner of fibroblast growth factor receptor 3c (FGFR3c) in the human testis[J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 2015, 399(1):235—243.
- [26] Lovelace D L, Gao Z, Mutoji K, *et al.* The regulatory repertoire of PLZF and SALL4 in undifferentiated spermatogonia[J], *Development*, 2016, 143(11):1893—1906.
- [27] Lovasco L A, Gustafson E A, Seymour K A, *et al.* TAF4b is required for mouse spermatogonial stem cell development[J]. *Stem cells*, 2015, 33(4):1267—1276.
- [28] Ma H, Niu C, Xia J, *et al.* Stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) plays important roles in many stages of spermatogenesis[J]. *Asian journal of andrology*, 2018, 20(5):479—487.
- [29] Gomes Fernandes M, He N, Wang F, *et al.* Human-specific subcellular compartmentalization of P-element induced wimpy testis-like (PIWIL) granules during germ cell development and spermatogenesis[J]. *Human reproduction*, 2018, 33(2):258—269.
- [30] Qian B, Li Y, Yan R, *et al.* RNA binding protein RBM46 regulates mitotic-to-meiotic transition in spermatogenesis [J], *Science advances*, 2022, 8(34):eabq2945.
- [31] Wang Q, Yan Q, Nan J, *et al.* Syce1 and Syce3 regulate testosterone and dihydrotestosterone synthesis via steroidogenic pathways in mouse Sertoli and Leydig cells [J]. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2022, 223:106135.
- [32] Syrjänen J L, Pellegrini L, Davies O R. A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation[J]. *Elife* 2014, 3:e02963.
- [33] Ge P, Zhang X, Yang Y, *et al.* Long-term exposure to formaldehyde induced down-regulation of SPO11 in rats [J]. *Inhalation toxicology*, 2021, 33(1):8—17.
- [34] Li T, Zhang H, Wang X, *et al.* Cloning, molecular charac-

- terization and expression patterns of DMRTC2 implicated in germ cell development of male Tibetan sheep[J]. International journal of molecular sciences, 2020, 21(7):2448.
- [35] Qu W, Yuan S, Quan C, *et al.* The essential role of intraflagellar transport protein IFT81 in male mice spermiogenesis and fertility, American journal of physiology[J]. Cell physiology, 2020, 318(6):1092–1106.
- [36] Clemm von Hohenberg K, Müller S, Schleich S, *et al.* Cyclin B/CDK1 and Cyclin A/CDK2 phosphorylate DENR to promote mitotic protein translation and faithful cell division[J]. Nature communications, 2022, 13(1):668.
- [37] Yuan W, Leisner T M, McFadden A W, *et al.* CIB1 is essential for mouse spermatogenesis[J]. Molecular and cellular biology, 2006, 26(22):8507–8514.
- [38] Xu Z, Miyata H, Kaneda Y, *et al.* CIB4 is essential for the haploid phase of spermatogenesis in mice[J]. Biology of reproduction, 2020, 103(2):235–243.
- [39] Huang L, Zhang J, Zhang P, *et al.* Single-cell RNA sequencing uncovers dynamic roadmap and cell-cell communication during buffalo spermatogenesis[J]. iScience, 2022, 26(1):105733.
- [40] Firat-Karalar E N, Sante J, Elliott S, *et al.* Proteomic analysis of mammalian sperm cells identifies new components of the centrosome[J]. Journal of cell science, 2014, 127(Pt 19):4128–4133.
- [41] Wang M, Liu X, Chang G, *et al.* Single-cell RNA sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis[J]. Cell stem cell, 2018, 23(4):599–614.
- [42] Tang A, Yan Q, Sun L, *et al.* Developmental expression of ACRV1 in humans and mice[J]. Andrologia, 2012, 44(1):16–22.
- [43] Sadakierska-Chudy A, Patrylak J, Janeczko J, *et al.* Downregulation of gene expression and the outcome of ICSI in severe oligozoospermic patients: A preliminary study [J]. Molecular reproduction and development, 2020, 87(12):1219–1230.
- [44] Li W, Wu J, Kim S Y, *et al.* Chd5 orchestrates chromatin remodelling during sperm development[J]. Nature communications, 2014, 5(1):3812.
- [45] Anjum K H, Nadeem A, Javed M, *et al.* Genomic and computational analysis of novel SNPs in TNPI gene promoter region of bos indicus breeding bulls[J]. Genetics research, 2022, 2022:9452234.
- [46] Nourashrafeddin S, Ebrahimzadeh-Vesal R, Modarressi M H, *et al.* Identification of Spata-19 new variant with expression beyond meiotic phase of mouse testis development[J]. Reports of biochemistry & molecular biology, 2014;2(2):89–93.
- [47] Margaryan H, Dorosh A, Capkova J, *et al.* Characterization and possible function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-spermatogenic protein GAPDHS in mammalian sperm[J]. Reproductive biology and endocrinology, 2015, 13:15.
- [48] Larsson M, Norrander J, Gräslund S, *et al.* The spatial and temporal expression of Tekt1, a mouse tektin C homologue, during spermatogenesis suggest that it is involved in the development of the sperm tail basal body and axoneme[J]. European journal of cell biology, 2000, 79(10):718–725.
- [49] Strünker T, Goodwin N, Brenker C, *et al.* The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca^{2+} influx in human sperm[J]. Nature, 2011, 471(7338):382–386.
- [50] Mannan A U, Nayernia K, Mueller C, *et al.* Male mice lacking the Theg (testicular haploid expressed gene) protein undergo normal spermatogenesis and are fertile[J]. Biology of reproduction, 2003, 69(3):788–796.

Seasonal characteristics of spermatogenesis related gene expression in male plateau zokor

YAO Bao-hui^{1,2}, AN Kang^{1,2}, HOU Qi-qi^{1,2}, ZHANG De-gang^{1,2}, SU Jun-hu^{1,2,3}

(1. College of Grassland Science, Key Laboratory of Grassland Ecosystem (Ministry of Education), Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U, S, Centers for Grazing land Ecosystem Sustainability, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Agricultural University-Massey University Research Centre for Grassland Biodiversity, Lanzhou 730070, China; 3. Gansu Qilianshan Grassland Ecosystem Observation and Research Station, Tianzhu 733200, China)

Abstract: 【Objective】 Seasonal breeding animals exhibit annual periodic changes in gonadal morphology, physiological hormones levels and gene expression, which can improve reproductive efficiency and offspring survival rate. This study aims to explore the seasonal characteristics of spermatogenesis-related gene expression in male plateau zokors. 【Method】 We analyzed testicular morphology, serum hormones levels and testicular-specific genes between breeding season and non-breeding season in plateau zokors. 【Result】 During the breeding season, male plateau zokor testes increased in size, testosterone levels were elevated, and a variety of germ cells were present in seminiferous tubules. The expression levels of specific genes were upregulated in primary spermatocytes, secondary spermatocytes, haploid spermatocytes and sperm. In contrast, during the non-breeding season, the testes were small and the level of testosterone were insufficient. The expression levels of specific genes were downregulated in primary spermatocytes, secondary spermatocytes, haploid spermatocytes and sperm. 【Conclusion】 Our findings indicate seasonal differences in testicular morphology, hormone and gene expression of plateau zokor. Spermatogenesis arrest at the spermatogonia stage during the non-breeding season. These results provide a valuable insight for into the mechanisms of testicular activity, and understanding the regulation of seasonal reproduction of animals.

Key words: seasonal reproduction; testosterone; germ cells; gene expression; plateau zokor

(责任编辑:刘建荣)