

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.01.019

Catsup 通过调控细胞内锌水平影响 雌性果蝇生殖的机制研究

高 燕, 韦 田, 纪晓雯, 李广莹, 肖桂然

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘 要: 锌稳态与生殖健康息息相关, 文章以果蝇为模型, 从锌转运蛋白 *Catsup* 入手, 发现在果蝇卵巢生殖干细胞微环境特异性沉默 *Catsup* 基因影响卵巢胶原蛋白的表达, 从而影响卵巢结构及生殖能力。进一步研究发现, *Catsup* 敲低导致的生殖障碍是由于细胞质中的锌水平降低导致的。该研究为机体锌缺乏导致的生殖问题的诊断和治疗提供理论依据, 具有重要研究意义。

关键词: 果蝇; *Catsup* 基因; 锌; 卵巢; 生殖; 胶原蛋白

中图分类号: Q74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2023)01-0126-05

Objective to explore the mechanism of *Catsup* affecting female *Drosophila* reproduction by the regulation of intracellular zinc

GAO Yan, WEI Tian, JI Xiaowen, LI Guangying, XIAO Guiran

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Zinc homeostasis is closely related to reproductive health. Based on the model of *Drosophila*, it was found that *Catsup* gene silencing specifically in the microenvironment of *Drosophila* ovarian germ stem cells affected the expression of ovarian collagen, and then affected the ovarian structure and reproductive capacity. Further studies showed that the reproductive dysfunction caused by *Catsup* knockdown was due to the decrease of zinc level in cytoplasm. This study provides theoretical basis for the diagnosis and treatment of reproductive problems caused by zinc deficiency, which is of significance.

Key words: *Drosophila*; *Catsup* gene; zinc; ovary; reproduction; collagen

锌是第二大微量元素, 参与多个细胞代谢过程, 如基因表达、DNA 合成、蛋白质合成、免疫功能、伤口愈合和细胞分裂^[1]。锌还对孕期、儿童和青少年时期的生长发育至关重要^[2]。但人体没有专门的锌存储系统, 因此需要每天摄入锌维持机体稳态平衡^[1]。已有一些研究发现锌与生殖密切相关。在雄性生殖系统中, 睾丸、附睾、前列腺以及精液中锌含量较多^[3]。当机体锌离子水平较低时, 雄性机体会出现异常, 如生长发育迟缓、性成熟推迟、免疫功能降低、精子活力降低等^[3]。此

外, 研究发现机体中锌离子稳态失衡也会影响雌性生殖系统的发育。当锌离子摄入不足时会影响卵母细胞的质量、卵母细胞分裂、排卵异常等^[4-5], 还会影响卵巢发育, 甚至造成雌性难产、卵巢萎缩等严重影响^[6], 但具体的机制仍不清楚。

果蝇是遗传学和发育生物学中重要的模式生物之一, 具有体积小、生命周期短(约 12 d)、繁殖力强、子代数量多等特点^[7]。果蝇有 2 个卵巢, 每个卵巢有 15~20 个卵巢管, 在每个卵巢管前端有 1 个卵原区结构, 在卵原区顶端有 5~7 个帽细

收稿日期: 2021-03-08; 修回日期: 2021-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31671284); 安徽省科协人才托举计划资助项目(RCTJ202001)

作者简介: 高 燕(1994—), 女, 安徽阜阳人, 合肥工业大学硕士生;

肖桂然(1988—), 女, 山东邹城人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师。

胞,前端与端丝细胞相连,后端通过调控细胞黏附蛋白 DE-Cadherin 将生殖干细胞固定在卵原区,这 3 种细胞共同构成生殖干细胞微环境(niche)^[8]。目前,果蝇卵巢已被用于 niche 形成、结构维持、干细胞与 niche 之间作用机制的研究^[9]。雌性动物卵巢释放卵子的过程称为排卵,研究发现人类和果蝇等不同动物的排卵方式基本相似,因此果蝇卵巢模型系统适于研究生殖调控机制^[10]。

在动物中有 solute-linked carrier 39A (SLC39A, ZIP 家族)和 solute-linked carrier 30A (SLC30A, ZnT 家族)^[11] 2 种锌转运蛋白家族调节细胞内锌水平。ZIP 家族蛋白负责锌从细胞器或细胞外到细胞质的运输, ZnT 家族介导锌从细胞质输出到细胞器或细胞外^[12]。生物信息学比对发现, *Catsup* 基因是哺乳动物 *Zip7* 基因的同源物,属于 ZIP 家族的锌转运蛋白,定位于高尔基体,负责将高尔基体中的锌运至细胞质^[11]。虽然文献^[13-14]报道 *Catsup* 突变会导致卵子形成异常,果蝇生殖能力下降,但具体分子机制并不清楚,因此,本文利用 Gal4/UAS 系统^[15]在果蝇卵巢 niche 中特异性敲低 *Catsup* 以研究对生殖发育的影响,并进一步探索分子机制,旨在解析锌对生殖调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 果蝇品系

果蝇饲养于 25 °C、60%湿度、12 h/12 h 交替光照的培养箱中,本文所用果蝇品系及来源如下: W1118(来自 Vienna Drosophila Research Center, 编号 60000)、*Catsup* RNAi(来自 Vienna Drosophila Research Center, 编号 100095)、*Catsup* RNAi; dZnt7 RNAi(*Catsup* RNAi 和 dZnt7 RNAi 重组果蝇,其中 dZnt7 RNAi 来自清华果蝇中心,编号 THU5682)、*Catsup* RNAi; dZip1 OE(*Catsup* RNAi 和 dZip1 OE 重组果蝇,其中 dZip1 OE 果蝇来自文献^[16])、*Catsup* RNAi; dZnt1 OE(*Catsup* RNAi 和 dZnt1 OE 重组果蝇,其中 dZnt1 OE 果蝇来自文献^[17])、C587-Gal4; UAS-EGFP(来自 Bloomington Drosophila Stock Center, 编号 67747)、C587-Gal4, Vkg-GFP/Cyo(来自文献^[18])。

1.1.2 果蝇标准玉米培养基

果蝇标准玉米培养基配方如下: 玉米粉

100 g、红糖 40 g、酵母 25 g、白糖 14.5 g、大豆粉 10 g、琼脂 8 g,添加超纯水至 1 L。

1.1.3 果蝇加药培养基

在标准玉米培养基中添加终浓度 4 mmol/L ZnCl₂ 或 50 μmol/L TPEN(N,N,N,N-Tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine)。

1.2 实验方法

1.2.1 生殖能力测定

在 25 °C、60%相对湿度条件下饲养果蝇,将 C587; UAS-EGFP 处女蝇分别与不同品系的 UAS 雄蝇杂交,获得子一代果蝇。收集 1 d 内羽化的雌蝇,放入添加适量酵母的果蝇培养管,每管 10 只雌蝇和 3 只雄蝇。饲养约 2 d,将雌蝇分别放入添加适量酵母的培养管,每管 1 只,每个基因型分装 10 管进行平行实验。每隔 24 h 将雌蝇导入新管,连续 7 d 统计产蛋数量,每组产蛋量取平均值,即得每种品系果蝇 1 周内生殖能力的变化。

1.2.2 卵巢 niche 结构的观察

本研究所用的 C587-Gal4; UAS-EGFP 果蝇是在卵巢 niche 表达增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP),用于标记 niche 部位,便于用荧光显微镜观察 niche 形态。将 C587-Gal4; UAS-EGFP 处女蝇分别与不同品系的 UAS 雄蝇杂交,在 25 °C、60%相对湿度条件下饲养,获得子一代果蝇。收集 1 d 内羽化的雌蝇放入添加适量酵母的果蝇培养管,饲养 3 d,解剖果蝇卵巢,在荧光显微镜下观察卵巢 niche 结构的变化。

1.2.3 卵巢 niche 部位胶原蛋白的观察

果蝇 IV 型胶原蛋白(Col IV)由 α-1 (Cg25c)和 α-2 (Vkg)组成,形成异三聚体翻译后被赖氨酸和脯氨酸羟化酶修饰,最终形成功能性基底膜^[19]。在果蝇中, Vkg-GFP 是功能性 GFP-trap 融合到 IV 型胶原蛋白 α-2 链(Vkg),全长内源性蛋白从其内源性启动子中表达为 Vkg-GFP 融合蛋白^[20]。利用遗传重组技术获得 C587-Gal4, Vkg-GFP 果蝇,用荧光显微镜观察卵巢 niche 组织,可根据绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)表达(荧光强度)来反映 Vkg(胶原蛋白)的表达水平。

1.2.4 卵巢大小的统计

利用 Image J 软件统计卵巢大小,显著性水平取 $P < 0.05$ (*) 为显著, $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)。

2 结果与分析

2.1 敲低 *Catsup* 对果蝇生殖能力的影响

果蝇产蛋数量是反映果蝇生殖能力的一个重要指标^[9]。文献^[21]研究发现,在果蝇卵巢 niche 中敲低 *Catsup* 会导致果蝇产蛋数量显著减少, *Catsup* 表达下调对果蝇产蛋量的影响如图 1 所示。从图 1 可以看出,与正常果蝇相比,在卵巢中敲低 *Catsup* 导致果蝇产蛋量明显下降,尤其从第 2 天开始产蛋量大幅下降(约 70%),5 d 后产蛋量趋近于 0,结果表明 *Catsup* 基因对正常生殖行为具有重要作用。

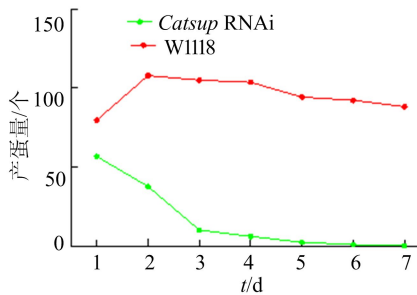
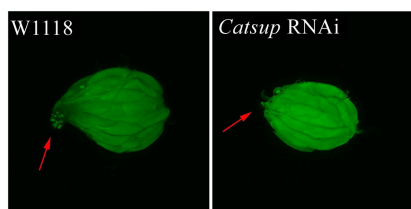


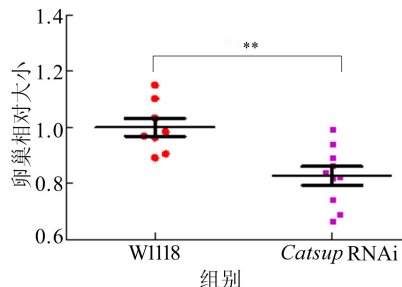
图 1 *Catsup* 表达下调对产蛋量的影响

2.2 敲低 *Catsup* 对果蝇卵巢 niche 的影响

生殖干细胞存在于 niche 组织中,对果蝇卵子形成至关重要^[22]。在 niche 组织中, *Catsup* 表达下调对卵巢 niche 及其大小的影响如图 2 所示。



(a) 卵巢 niche 结构



(b) 卵巢大小

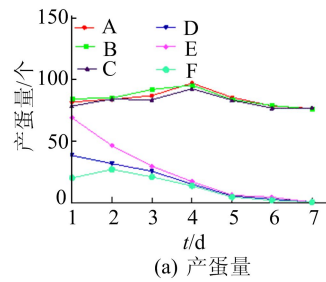
图 2 *Catsup* 表达下调对卵巢 niche 及其大小的影响

从图 2 可以看出, *Catsup* RNAi 会导致果蝇卵巢 niche 丢失(图 2a 中红色箭头所指),同时

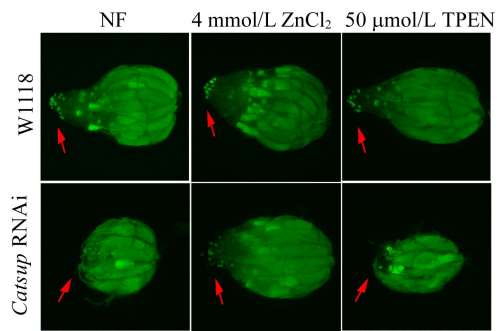
Catsup 表达下调也会导致卵巢大小显著减小(图 2b, $P < 0.01$),结果表明 *Catsup* 表达下调影响果蝇卵巢 niche 结构维持,进而导致果蝇产蛋减少。

2.3 膳食加锌对生殖障碍的影响

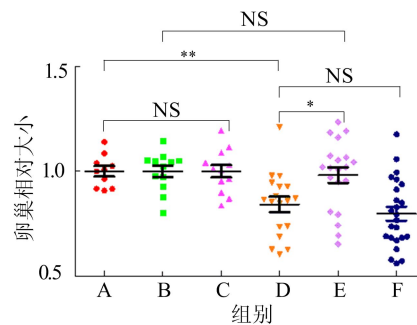
Catsup 蛋白负责将高尔基体内锌转运至细胞质内^[11], *Catsup* RNAi 会导致高尔基体内积锌,细胞质内缺锌。本文通过调控膳食中锌水平分析 *Catsup* 敲低对生殖的影响,如图 3 所示。



(a) 产蛋量



(b) 卵巢 niche 结构



(c) 卵巢大小

图 3 膳食锌水平对生殖的影响

图 3 中: A 代表正常食物(normal food, NF) W1118; B 代表 4 mmol/L $ZnCl_2$ W1118; C 代表 50 $\mu\text{mol/L}$ TPEN W1118; D 代表正常食物 NF *Catsup* RNAi; E 代表 4 mmol/L $ZnCl_2$ *Catsup* RNAi; F 代表 50 $\mu\text{mol/L}$ TPEN *Catsup* RNAi。从图 3 可以看出,在膳食中添加 4 mmol/L $ZnCl_2$ 能够在一定程度挽救 *Catsup* 敲低导致果蝇产蛋下降,并且其卵巢 niche 结构和卵巢大小都明显恢复;而膳食中添加锌螯合剂 50 $\mu\text{mol/L}$ TPEN 则会加

重这些表型。结果表明 *Catsup* 敲低导致细胞质锌减少,从而引起果蝇生殖障碍问题,可通过膳食补锌改善由于细胞质缺锌导致的生殖障碍问题。

2.4 遗传补锌对生殖障碍的影响

为了进一步证实 *Catsup* 敲低导致的生殖问题与细胞质内缺锌相关,本实验利用遗传手段调控细胞内锌水平观察 *Catsup* 敲低对生殖的影响。*dZnt7* 蛋白定位于高尔基体上,负责将其转运到细胞质中,与 *Catsup* 功能相反;*dZip1* 蛋白定位于细胞膜上,负责将胞外锌转运至胞内,*dZnt1* 蛋白定位于细胞膜,负责将胞质中的锌转出细胞,与 *dZip1* 蛋白功能相反^[11]。通过遗传重组技术共表达锌转运相关蛋白,观察对果蝇产蛋能力、niche 结构和卵巢大小的影响,如图 4 所示。

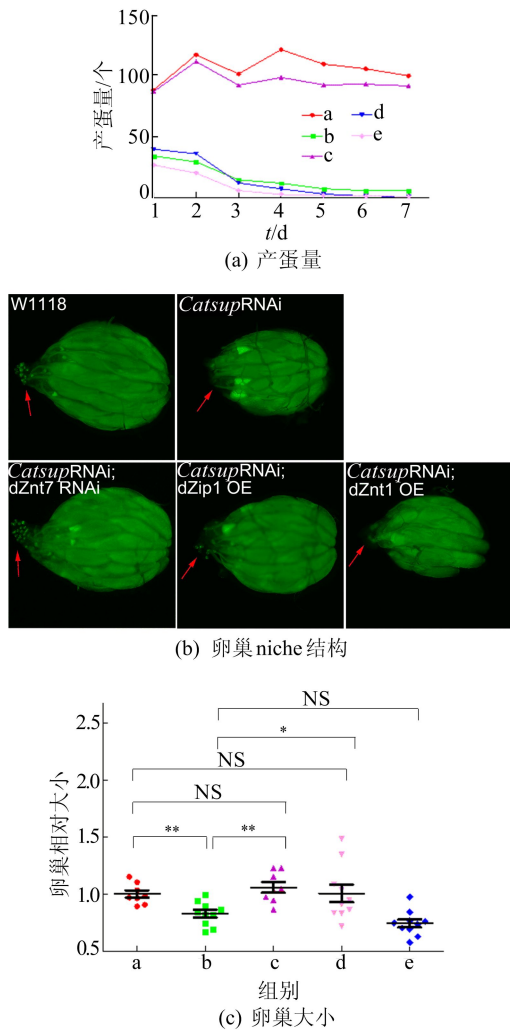


图 4 遗传手段改变细胞质锌水平对生殖的影响

图 4 中: a 代表 W1118; b 代表 *Catsup* RNAi; c 代表 *Catsup* RNAi; *dZnt7* RNAi; d 代表 *Catsup* RNAi; *dZip1* OE; e 代表 *Catsup* RNAi;

dZnt1 OE。从图 4 可以看出, *dZnt7* RNAi 可以完全挽救 *Catsup* RNAi 导致的产蛋能力减弱、niche 丢失和卵巢变小等问题; *dZip1* OE 可以部分挽救 *Catsup* RNAi 导致的生殖问题; 而 *dZnt1* OE 则会加重表型。结果表明, *Catsup* 敲低导致细胞质缺锌, 高尔基体内积锌, 而 *dZnt7* RNAi 或 *dZip1* OE 能够提高细胞质锌水平, 挽救生殖缺陷问题, 此外, *dZnt1* OE 降低细胞质内锌水平会加重表型。因此, 敲低 *Catsup* 是通过影响细胞内锌水平导致果蝇的生殖障碍问题。

2.5 敲低 *Catsup* 对卵巢卵原区胶原蛋白的影响

已有研究发现胶原蛋白对生殖有重要作用, 在果蝇卵巢 niche 中, IV 型胶原蛋白和 β -整合素共同作用维持 E-Cadherin 正常水平, 从而确保生殖干细胞在卵巢粘附, 维持卵巢 niche 结构^[23]。因此, 本文推测 *Catsup* 敲低可能影响了卵巢中胶原蛋白的水平, 进而影响卵巢 niche 结构维持。本实验利用 C587-Gal4、Vkg-GFP 来观察 niche 部位胶原蛋白水平, *Catsup* 表达下调对卵巢卵原区胶原蛋白的影响如图 5 所示。

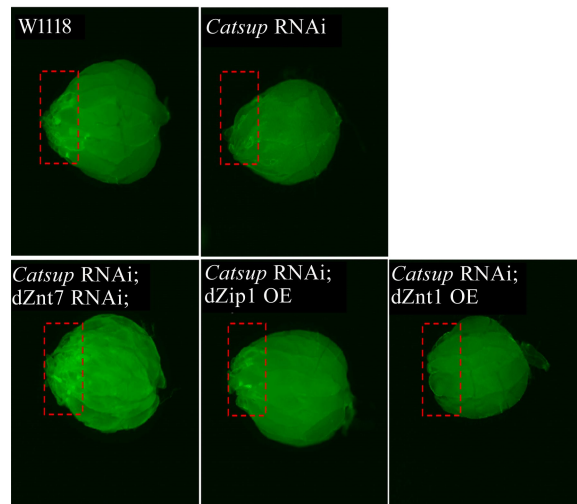


图 5 *Catsup* 表达下调对卵巢卵原区胶原蛋白的影响

从图 5 可以看出, *Catsup* 敲低导致卵巢卵原区胶原蛋白显著减少; *dZnt7* RNAi 可以完全挽救 *Catsup* 敲低导致的胶原蛋白降低; *dZip1* OE 可以部分挽救; 而 *dZnt1* OE 则会加重该表型。结果表明 *Catsup* 敲低导致卵原区胶原蛋白减少, 影响卵巢 niche 结构维持, 导致卵巢缺陷、产蛋能力下降。

3 讨 论

本研究发现, 在卵巢中敲低 *Catsup* 会导致产

蛋显著减少、卵巢 niche 丢失和卵巢变小等生殖障碍问题,这些生殖缺陷可能与敲低 *Catsup* 导致细胞质缺锌相关。从膳食角度出发,调控细胞内锌水平发现,膳食补锌能够在一定程度上挽救敲低 *Catsup* 导致的果蝇生殖障碍问题,其对产蛋能力、卵巢 niche 结构和卵原区胶原蛋白水平都有一定程度的挽救。

利用遗传手段在卵巢 niche 部位敲低 *Znt7* 或过表达 *Zip1*,增加细胞质内锌水平,能够很好地挽救 *Catsup* RNAi 导致的生殖缺陷。结果表明,*Catsup* 在卵巢表达减少,引起细胞质锌缺乏,导致卵原区胶原蛋白表达减少,影响卵巢 niche 结构维持、卵巢形态异常和产蛋能力减弱。

许多文献报道,锌对生殖健康具有重要作用,但是目前分子机制并不清楚。*Catsup* 基因是哺乳动物 *Zip7* 基因的同源物,具有调控细胞内锌稳态作用。本研究发现 *Catsup* 基因通过调控细胞内锌水平影响生殖发育,该结果为机体锌缺乏导致的生殖问题的诊断和治疗提供理论依据,也为生殖健康相关保健食品的开发奠定一定基础。

参 考 文 献

- [1] DOROTA S, BARBARA B K. Role of zinc in immune system and anti-cancer defense mechanisms [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2273.
- [2] WARET W, SANDSTEAD H H. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2006, 20(1): 3-18.
- [3] FORESTA C, GAROLLA A, TONI L D. Role of zinc trafficking in male fertility: from germ to sperm [J]. *Human Reproduction*, 2014, 29(6): 1134-1145.
- [4] 俸云, 赵鑫, 阮子芸, 等. 微量元素锌对牛卵母细胞体外成熟及其体外受精胚胎发育的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2019, 55(10): 14-19.
- [5] CROXFORD T P, MCCORMICK N H, KELLEHER S L. Moderate zinc deficiency reduces testicular *Zip6* and *Zip10* abundance and impairs spermatogenesis in *Mice1-3* [J]. *The Journal of Nutrition*, 2011, 141(3): 359-365.
- [6] 梁武凤, 吴标, 张志生. 微量元素锌铜对不孕症卵泡卵子的影响 [J]. *中国医师杂志*, 1999, 35(1): 51-60.
- [7] XIAO G R, ZHOU B. What can flies tell us about zinc homeostasis? [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 611(1): 134-141.
- [8] TANG X, SONG X, CHEN S, et al. Interactions between stem cells and their niche in the *Drosophila* ovary [J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2008, 73(73): 39-47.
- [9] DEADY L D, LI W, SUN J J. The zinc-finger transcription factor *Hindsight* regulates ovulation competency of *Drosophila* follicles [J]. *eLife*, 2017, 6(6): e29887.
- [10] JEONG E B, JEONG S S J, CHO E J, et al. *Makorin 1* is required for *Drosophila* oogenesis by regulating insulin/Tor signaling [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215688.
- [11] EIDE D J. The SLC39 family of metal ion transporters [J]. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 2004, 447(5): 796-800.
- [12] SEKLER I, SENSI S L, HERSHFINKE M. Mechanism and regulation of cellular zinc transport [J]. *Molecular Medicine*, 2007, 13(7/8): 337-343.
- [13] SUBHASH K. *Beadex*, a *Drosophila* LIM domain only protein, function in follicle cells is essential for egg development and fertility [J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 367(1): 97-103.
- [14] STATHAKIS D G, BURTON D Y, MCIVOR W, et al. The catecholamines up (*Catsup*) protein of *Drosophila melanogaster* functions as a negative regulator of tyrosine hydroxylase activity [J]. *Genetics*, 1999, 153(1): 361-443.
- [15] 马沛勤, 苏仙绒, 陈莉. 果蝇 GAL4/UAS 系统在本科遗传学实验中的应用 [J]. *运城学院学报*, 2014, 32(5): 67-69.
- [16] LANG M, WANG L, FAN Q, et al. Genetic inhibition of solute-linked carrier 39 family transporter 1 ameliorates $\text{A}\beta$ pathology in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease [J]. *PLoS Genetics*, 2017, 8(4): e1002683.
- [17] WANG X X, WU Y T, ZHOU B. Dietary zinc absorption is mediated by *ZnT1* in *Drosophila melanogaster* [J]. *The FASEB Journal*, 2009, 23(8): 2650-2661.
- [18] ZHU C H, XIE T. Clonal expansion of ovarian germline stem cells during niche formation in *Drosophila* [J]. *Development*, 2003, 130(12): 2579-2588.
- [19] VAN D B V, GEORDIE Z, LISE P, et al. Companion blood cells control ovarian stem cell niche microenvironment and homeostasis [J]. *Cell Reports*, 2015, 13(3): 546-560.
- [20] MORIN X, CHIA W. A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(26): 15050-15055.
- [21] 尚进, 薛劲松, 叶佳伟, 等. 果蝇 *Catsup* 基因在卵巢中表达降低对生殖的影响 [J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2020, 43(7): 988-991.
- [22] WEAVER L N, DANIELA D B. Maintenance of proper germline stem cell number requires adipocyte collagen in adult *Drosophila* females [J]. *Genetics*, 2018, 209(4): 1155-1166.
- [23] SONG X Q, ZHU C H, DOAN C, et al. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches [J]. *Science*, 2002, 296(5574): 1855-1857.

(责任编辑 闫杏丽)