



胡后豪, 戴玉玲, 裴梦圆, 肖妍虹, 赵丹琿, 余小强, 卢玉珍. 家蚕 Fox 转录因子在精巢中的表达特征及 BmFoxL2 在精巢发育中的功能初探 [J]. 环境昆虫学报, 2022, 44 (1): 146–152.

家蚕 Fox 转录因子在精巢中的表达特征及 BmFoxL2 在精巢发育中的功能初探

胡后豪*, 戴玉玲*, 裴梦圆*, 肖妍虹, 赵丹琿, 余小强, 卢玉珍**

(华南师范大学生命科学学院, 广东省昆虫发育生物学与应用技术重点实验室, 广州 510631)

摘要: Fox 家族蛋白广泛存在于植物以外的物种中, 是一类与发育相关的重要转录因子。但是不同 Fox 基因在鳞翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori* 精巢中的表达特征, 以及 BmFoxL2 亚家族蛋白在精巢发育中的功能未知。本文检测了家蚕 12 个 BmFox 基因在家蚕精巢中的表达量, 发现 BmFoxL2-2 的表达量最高, BmFoxL2-1 次之。BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 在精巢中的表达量显著高于卵巢。亚细胞定位分析显示 BmFoxL2-1 在细胞核中表达, BmFoxL2-2 在细胞核和细胞质中都有表达。生物信息学分析显示 BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 都有保守的 Fox 结构域, 但 N 端结构以及理化性质存在差异。BmFoxL2-1 在家蚕精巢中的表达随着发育时间逐渐升高, BmFoxL2-2 的表达在幼虫末期和蛹期达到高峰; BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 在精巢内容物中的表达均高于精巢膜。在 Bm12 细胞中分别过表达 BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 蛋白后, BmNanos、BmVasa 和 BmCyclin A 等发育相关基因的表达均显著上调, 暗示这些基因受 BmFoxL2 亚家族蛋白的调控。由此, 本文推测家蚕 FoxL2 亚家族蛋白可能通过调节精巢细胞周期或生殖细胞的功能来调节家蚕精巢的发育。

关键词: 家蚕; 精巢; 转录因子; Fox 家族蛋白; 发育

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2022) 01-0146-07

Expression patterns of *Bombyx mori* Fox family transcription factors and functional analysis of BmFoxL2 in the testis

HU Qi-Hao*, DAI Yu-Ling*, PEI Meng-Yuan*, XIAO Yan-Hong, ZHAO Dan-Hui, YU Xiao-Qiang, LU Yu-Zhen* (Guangdong Provincial Key Laboratory of Insect Developmental Biology and Applied Technology, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: The Forkhead box (Fox) proteins are critical transcription factors involved in the development of many organisms but plants. However, the expression patterns of *Bombyx mori* Fox genes in the testis and function of BmFoxL2 subfamily during testis development remain unknown. In this study, the expression patterns of 12 BmFox genes in the testis were analyzed. BmFoxL2-2 had a highest expression level and followed by BmFoxL2-1. Both BmFoxL2-1 and BmFoxL2-2 were expressed at a significantly higher level in the testis than in ovary. BmFoxL2-1 was expressed only in the nucleus, and BmFoxL2-2 was located in both the nucleus and cytoplasm. Both BmFoxL2 proteins contained the conserved Forkhead domain, and

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD1002100); 国家自然科学基金 (31970474, 31901941)

共同第一作者简介: 胡后豪, 男, 1991 年生, 广东广州人, 博士后, 研究方向为昆虫免疫与发育, E-mail: huqihx@163.com; 戴玉玲, 女, 1998 年生, 广东湛江人, 本科生, 研究方向为昆虫免疫与发育, E-mail: 2875511764@qq.com; 裴梦圆, 女, 2002 年生, 河南开封人, 本科生, 研究方向为昆虫免疫与发育, E-mail: 2794202755@qq.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 卢玉珍, 博士, 副研究员, 主要研究方向为昆虫先天免疫, E-mail: luyuzhen2015@outlook.com

收稿日期 Received: 2021-12-08; **接受日期** Accepted: 2021-12-15

they varied in N-terminus, physical and chemical characteristics. The transcript of *BmFoxL2-1* gene was increased during development, *BmFoxL2-2* mRNA was abundant in the testis at the late stage of both larvae and pupae; *BmFoxL2* gene was expressed at a higher level in the sperm than in the testis membrane. Genes participate in development, including *BmNanos*, *BmVasa* and *BmCyclinA*, were upregulated in Bm12 cells overexpressing BmFoxL2-1 and BmFoxL2-2. Our results suggested that FoxL2 subfamily proteins might participate in testis development by regulating cell cycles or spermatogenesis in *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; testis; Fox transcription factor; FoxL2; development

家蚕是我国重要的经济益虫, 经过长期的驯化和人工育种, 目前已经培育出大批具备优良性状的家蚕品种。遗传杂交是人工育种的关键步骤, 其中雄性家蚕精子质量的高低直接影响着后代的性状。精巢作为精子发生的场所, 其发育机制的研究对于家蚕遗传育种有着重要的意义。

Fox 家族蛋白存在于植物以外的生物类群当中, 具有一个约含 100 个氨基酸的保守结构域, 根据不同 Fox 蛋白的保守性, 可分为 19 个亚族: FoxA ~ FoxS (Weigel *et al.*, 1989; Kerschner *et al.*, 2014)。不同 Fox 蛋白已被证明在哺乳动物和昆虫的组织发育和先天免疫等多种生物学过程中发挥关键作用。在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 中, *FoxN3* (*CHES-1-like*) 的过表达会导致精巢形态异常, 并抑制精子发生的过程 (Yu *et al.*, 2016)。甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* SeFox 蛋白结构与家蚕 BmFoxA 相似, 并且在精巢中有一定水平的表达 (Zhao *et al.*, 2014)。家蚕的 *BmFoxG-1* 可能通过调节 *BmCyclin A* 等细胞周期基因的表达, 从而调节家蚕精巢的发育 (胡后豪等, 2021)。Song 等通过基因芯片 (Microarray) 的方法分析发现不同 Fox 基因在家蚕精巢中都有不同程度的表达 (Song *et al.*, 2015)。这些研究都说明 Fox 基因的功能可能与精巢发育相关, 但其具体作用机制仍不清楚。

本研究通过 qRT-PCR 检测了不同 *BmFox* 基因在家蚕 5 龄第 5 天 (L5D5) 幼虫和预蛹期精巢中的表达水平, 结果发现 *BmFoxL2* 亚族基因在两个时间点均有高水平表达。本研究利用生物信息学方法对家蚕 FoxL2 亚族蛋白的结构进行了分析, 并进一步分析 *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 在家蚕不同发育阶段精巢中的表达情况以及在 Bm12 中的表达定位。最后, 在家蚕 Bm12 细胞中分别过表达 BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 蛋白, 并分析了 *BmVasa* 等生殖和细胞周期相关基因的表达变化。本研究的结果初步说明 BmFoxL2 亚族蛋白参与了家蚕精巢发育及精子发生的过程。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

本研究使用的大造家蚕品种由广东省蚕业技术推广中心提供, 家蚕的培养条件参考的方法胡后豪等 (2021)。家蚕 Bm12 细胞、大肠杆菌 DH5 α 和细胞过表达载体 IE1-pEGFP-N1 均为本实验室保存材料。

Trizol 总 RNA 提取试剂购自中国艾科瑞生物公司; 反转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂购自康为世纪生物技术有限公司; 细胞转染试剂购自 Qiagen 公司; 引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成; 去内毒素质粒小量抽提试剂盒购自广州美基生物科技有限公司; 实验所用其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 生物信息学分析

从家蚕基因组数据库 SilkDB 中获得 BmFoxL2-1 (BGIBMGA000635) 和 BmFoxL2-2 (BGIBMGA000838) 基因及蛋白质序列。蛋白质理化性质预测通过 ExPASy 进行, 磷酸化位点及糖基化位点利用 Cbs 网站进行分析, 蛋白结构域利用 SMART 进行分析。

1.3 不同发育阶段家蚕精巢 cDNA 制备

收集 5 龄第 3 天 (L5D3) 幼虫至成虫第 3 天的雄性家蚕, 在 PBS 缓冲液中进行解剖并取出精巢。采用 Trizol 法提取总 RNA。逆转录反应按照康为世纪 HiFiScript gDNA removal RT Master Mix 说明书进行, cDNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.4 不同 Fox 基因在家蚕不同发育阶段精巢中的表达量检测

以稀释后的 cDNA 为模板, 采用 qRT-PCR 方法分析目标基因的表达情况, 以家蚕 *rp49* 作为内参基因。qRT-PCR 循环条件如下: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。本研究所用引物序列见表 1。

表 1 实验所用引物的序列
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
<i>BmFoxA</i> -q-F	CTGTCCTTCAACGACTGCTTTGT
<i>BmFoxA</i> -q-R	CGTGGTGTCCTGCGTCTGCT
<i>BmFoxB</i> -2-q-F	ACTGGACCTTGCATCCCCAG
<i>BmFoxB</i> -2-q-R	GCCGCTTGTGCGGGCTAAAAA
<i>BmFoxC</i> -2-q-F	TCTCCGCAGCCGTATTCTTTA
<i>BmFoxC</i> -2-q-R	CGCCTGGTGGTGGTAGTAAGA
<i>BmFoxD</i> -q-F	CGACCCTCCACACCTCTGAC
<i>BmFoxD</i> -q-R	TCCATCGTCGCGCAGGTAAT
<i>BmFoxF</i> -q-F	CGCACTGTCTGCTTGCTCG
<i>BmFoxF</i> -q-R	CGCCTCCTCTGTGGTTTGGT
<i>BmFoxG</i> -1-q-F	ACCATCGCTACACTCTCCGC
<i>BmFoxG</i> -1-q-R	CTGCCTCGTGAGAACCCTCA
<i>BmFoxG</i> -2-q-F	GGCGGCACATAAAGCGATGA
<i>BmFoxG</i> -2-q-R	GAAGCTGTGCGGAGGACTCA
<i>BmFoxJ</i> -1-q-F	AGGAACAGCGACAAGAAACCAC
<i>BmFoxJ</i> -1-q-R	TGCCCTCTAAGTGAGCCAAGTC
<i>BmFoxL2</i> -1-q-F	AACTGCTGAAGCCCAAAGATGA
<i>BmFoxL2</i> -1-q-R	AGATGGCAGCGTCGGTAAGG
<i>BmFoxL2</i> -2-q-F	ACGGCAGAAATAGGCAGGGC
<i>BmFoxL2</i> -2-q-R	CCAGGGGCTAAAAGGCTATTGGGT
<i>BmFoxO</i> -1-q-F	TGAACTGGCTGAGGTTGGCT
<i>BmFoxO</i> -1-q-R	AAAGATTGCCCCAGGCGTTG
<i>BmFoxO</i> -2-q-F	GCCAGACAACCTACGTCGAGCAG
<i>BmFoxO</i> -2-q-R	GGTGATGGCTTGCGTTATGAG
<i>BmNanos</i> -q-F	AAGCTCTTCGCCAGAAGCGA
<i>BmNanos</i> -q-R	GGCAGCGGAACCTCTAAGT
<i>BmVasa</i> -q-F	ACTGCTCGCGTAGGAAACAG
<i>BmVasa</i> -q-R	AATGTAGCAGTGCCACCTCC
<i>BmCyclinA</i> -q-F	CTCTCAACACCCACCTCAC
<i>BmCyclinA</i> -q-R	CGCTGCTATTACTGAGGCT
<i>BmCyclinB</i> -q-F	TTGCGAGACCGATACCTTTG
<i>BmCyclinB</i> -q-R	AGATTGCTGCCGCTGCTA
<i>BmCyclinB3</i> -q-F	CATAAACTCCTTCTGGTGT
<i>BmCyclinB3</i> -q-R	TAATCGTCAATAGGGAAG
<i>BmCyclinL1</i> -q-F	TACAAAGGTTTTACTACTCG
<i>BmCyclinL1</i> -q-R	GATTACATCTCTTATTCTGC
<i>BmRp</i> -49-q-F	CAGGCGGTTCAAGGGTCAATAC
<i>BmRp</i> -49-q-R	TACGGAATCCATTTGGGAGCAT
<i>BmFoxL2</i> -1-ORF-F	ATGACGCCGTCGAGCCCC
<i>BmFoxL2</i> -1-ORF-R	TCACGCGTCATATCTGGGATAGGAAG
<i>BmFoxL2</i> -2-ORF-F	ATGGCCACCAAAACCCGGAG
<i>BmFoxL2</i> -2-ORF-R	TCAATCGACAGTGATCAGACCGCATT

1.5 BmFoxL2-1/-2 细胞过表达重组质粒的构建

根据 *BmFox2-1/-2* 的 cDNA 序列, 设计上下游引物 (表 1), 克隆方法参考的方法胡启豪等 (2021)。利用 *Sac* I 和 *Bam*H I 对目的片段及 pEGFP-N1-GFP 载体进行双酶切, DNA 凝胶回收后用 T4 连接酶将两者连接构建重组载体, 经 PCR 与双酶切验证后转化进大肠杆菌 DH5 α 中保存。采用去内毒素质粒抽提试剂盒抽提质粒供转染使用。

1.6 BmFoxL2-1/BmFoxL2-2 在 Bm12 细胞株的过表达及细胞定位分析

将 Bm12 细胞用新鲜培养基悬浮, 分装至 6 孔板中, 并补足培养基至每孔 2 mL, 当每孔细胞密度达到 80% 以上时, 参考 Qiagen 转染试剂说明书的方法将 BmFoxL2-1-EGFP 和 BmFoxL2-2-EGFP 质粒转染 Bm12 细胞。

转染 48 h 后, 去除细胞培养液, 加入适量 PBS 清洗细胞。用 4% 多聚甲醛固定细胞, 用 1% PBT (含 1% Triton X-100 的 PBS) 对固定后的细胞进行通透。往细胞中加入适量浓度的 DAPI 对细胞进行染色, 结束后用 1% PBT 清洗多余的 DAPI。制片后于激光共聚焦显微镜下分析 BmFoxL2-1-EGFP 和 BmFoxL2-2-EGFP 在细胞中的定位。

2 结果与分析

2.1 不同 Fox 基因在家蚕精巢中的表达

家蚕存在有核与无核两种形态的精子, 分别在幼虫阶段和预蛹期形成, 因此本研究收集了 5 龄第 5 天 (L5D5) 幼虫和预蛹期 (PP) 家蚕精巢。定量分析显示, 在两个时期的家蚕精巢中, *BmFoxL2-2* 的表达水平均显著高于其它 *BmFox* 基因, *FoxL2* 亚族的 *BmFoxL2-1* 和 *FoxO* 亚族的 *BmFoxO-1/BmFoxO-2* 的表达水平次之 (图 1)。因此, 在后续的研究中将重点分析 *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 在精巢发育中的作用。

2.2 BmFoxL2 蛋白的结构及理化性质分析

为进一步了解 BmFoxL2 的功能, 本研究对 BmFoxL2 蛋白的理化性质进行分析。结果显示 BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 蛋白的分子量分别为 20.35 kDa 和 24.52 kDa, 等电点分别为 9.85 和 5.87, BmFoxL2-1 蛋白的磷酸化和糖基化位点都高于 BmFoxL2-2 (表 2)。利用 SMART 网站对 2 个 BmFoxL2 亚族蛋白的结构预测, 结果显示均含一

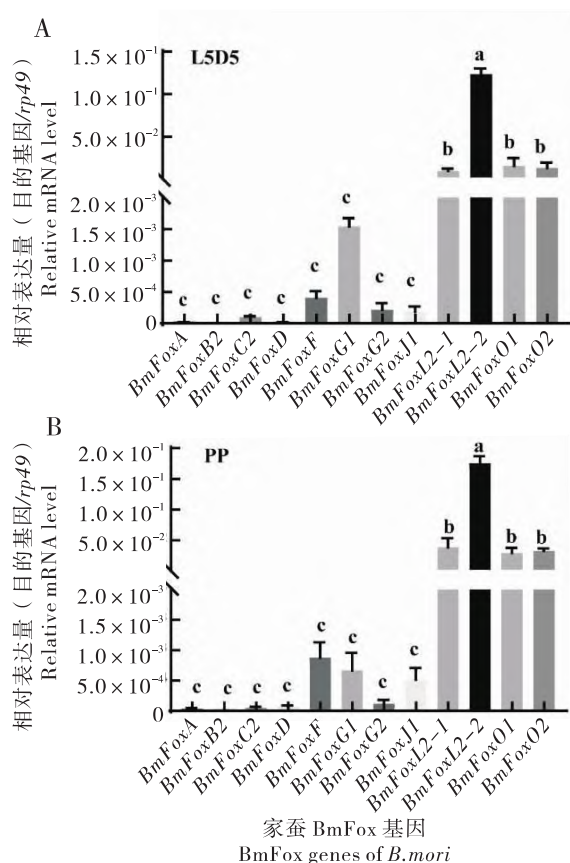


图1 不同 *BmFox* 基因在幼虫和预蛹期家蚕精巢中的表达

Fig. 1 Expression of different *BmFox* genes in the testis of *Bombyx mori* larvae and prepupae

注: A, 5 龄第 5 天幼虫; B, 预蛹。不同字母表示差异性显著 (单因素方差分析, Turkey 多重比较, $P < 0.05$)。Note: A, The day 5 of 5th instar larvae; B, Prepupae. Different letters indicated significant difference between the two groups (One way ANOVA; Tukey's HSD tests, $P < 0.05$) .

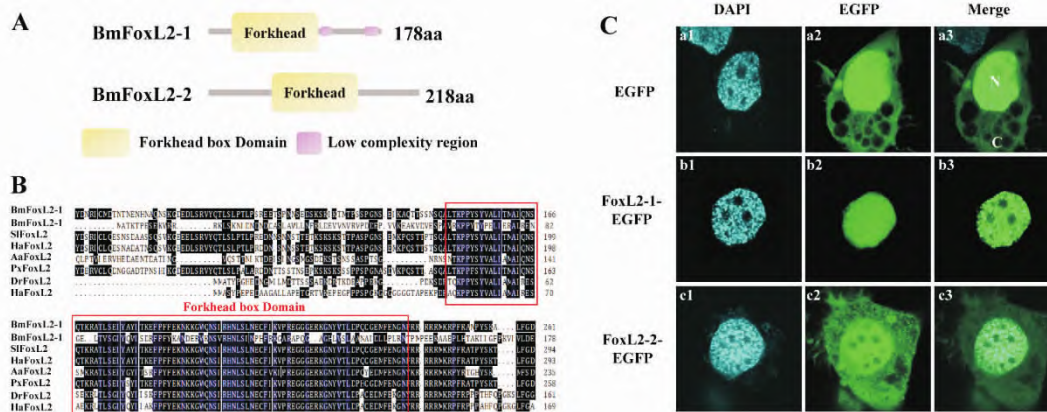


图2 BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 蛋白结构、序列和定位分析

Fig. 2 Structural analysis, sequence aglinment and cellular localization of BmFoxL2-1 and BmFoxL2-2

注: A, 蛋白结构预测; B, 氨基酸序列比对; C, 细胞定位分析。Note: A, Structural analysis; B, Sequence aglinment; C, Cellular localization.

个 Forkhead 结构域 (图 2-A), 并且 Forkhead 结构域的序列与其它昆虫以及人类 FoxL2 亚族蛋白的高度保守 (图 2-B)。

为了进一步确认 BmFoxL2-1/BmFoxL2-2 的亚细胞定位, 将构建好的 BmFoxL2-1-EGFP 和 BmFoxL2-2-EGFP 质粒转染家蚕 Bm12 细胞株 (图 2-C)。结果显示 BmFoxL2-1 定位于细胞核, BmFoxL2-2 在细胞核与细胞质中都有分布, 这可能是由于 BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 上所含的磷酸化和 O-糖基化位点数目不一所导致的。以上结果说明 BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 的功能可能存在差异。

2.3 BmFoxL2 亚族基因在精巢中的表达

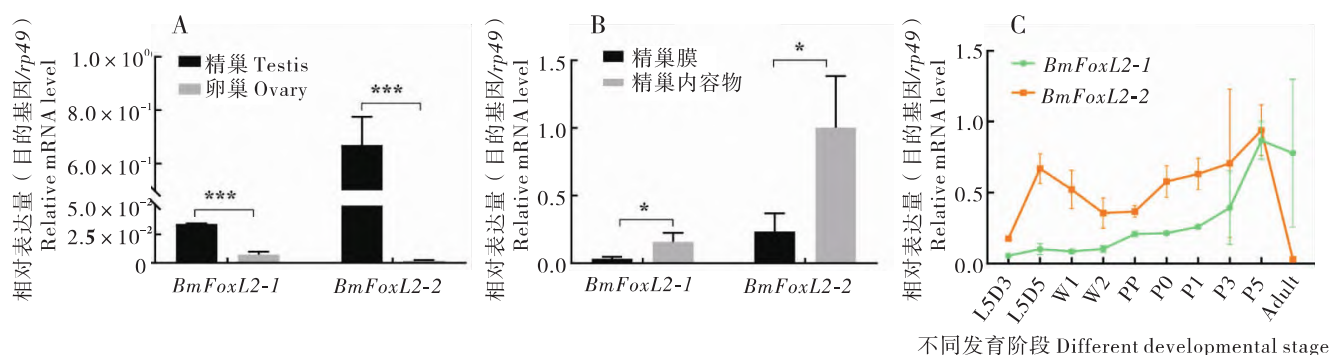
为进一步分析 *BmFoxL2* 亚族基因的功能, 本文检测了两个 *FoxL2* 亚族基因在 5 龄第 5 天家蚕幼虫精巢和卵巢中的表达变化, 发现两个 *BmFoxL2* 亚族基因在精巢中的表达均显著高于卵巢 (图 3-A)。由于精巢是精子发生的主要场所, 因此本研究对 5 龄第 5 天家蚕幼虫精巢的精巢膜和精巢内容物进行分离。对精巢膜和内容物的基因表达检测显示两个 *BmFoxL2* 亚族基因在精巢内容物中的表达水平均显著高于精巢膜 (图 3-B), 说明 BmFoxL2 蛋白可能参与精子发生。

为了分析 *BmFoxL2* 基因在精巢中的表达模式, 本研究在 5 龄第 3 天幼虫到成虫第 1 天的家蚕精巢中通过 qPCR 检测两个 *BmFoxL2* 基因的表达量。结果显示, *BmFoxL2-1* 的表达水平随着精巢的发育逐渐升高, 但在幼虫阶段增速缓慢, 而进入蛹期后, 上升速度开始加快。BmFoxL2-2 的表达水平在

表 2 BmFoxL2-1 和 BmFoxL2-2 蛋白理化性质分析

Table 2 Physical and chemical characteristics of BmFoxL2-1 and BmFoxL2-2

基因名称 Gene name	家蚕基因组数据库编号 SilkDB ID	氨基酸数 Size (aa)	蛋白质分子量 (kDa) Protein mol. mass	等电点 pI	磷酸化位点 Phosphorylation site	O-糖基化位点 O-Glycosylation site
<i>BmFoxL2-1</i>	BGIBMGA000635	178	20.35	9.85	25	12
<i>BmFoxL2-2</i>	BGIBMGA000838	218	24.52	5.87	15	11

图 3 *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 基因在家蚕中的表达Fig. 3 Expression of *BmFoxL2-1* and *BmFoxL2-2* transcripts in silkworm

注: A, *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 基因在家蚕精巢和卵巢中的表达; B, *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 基因在精巢内容物与精巢膜中的表达; C, *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 基因在不同发育阶段的精巢中的表达变化。柱上标有星号表示两组的表达差异显著 (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; t 检验)。Note: A, Expression of *BmFoxL2-1* and *BmFoxL2-2* transcripts in the testis and ovary of silkworm at day 5 of 5th instar larvae; B, Expression of *BmFoxL2-1* and *BmFoxL2-2* mRNAs in different parts of the testis at day 5 of 5th instar larvae; C, Expression of *BmFoxL2-1* and *BmFoxL2-2* transcripts in the testis of silkworm at different developmental stages. The asterisk above the column indicated significant difference between the two groups (*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; t-test).

5 龄幼虫末期 (L5D5) 达到一个高峰, 在变态发育阶段逐渐下降 (L5D5-PP), 在蛹期阶段 (P0-P5) 缓慢回升, 到了成虫阶段迅速下降。但 *BmFoxL2-2* 在不同发育阶段精巢中的表达均高于 *BmFoxL2-1* (图 3-C)。该结果进一步暗示 *BmFoxL2-2* 可能在有核精子的形成中发挥作用, 而 *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 都可能与无核精子的形成相关。

2.4 BmFoxL2 亚族蛋白对精巢生殖细胞发育的影响

细胞周期蛋白与生殖细胞有丝分裂和减数分裂等过程有着密不可分的关系。报道显示 BmFoxG-1 可能通过调节细胞周期等基因的表达, 参与精子发生过程。本研究在 Bm12 细胞株中过表达了 *BmFoxL2-1* 基因, 发现细胞周期基因 *BmCyclin A* 的表达显著上调, 而生殖干细胞发育关键基因 *BmNanos* 的表达也发生了显著上调 (图 4)。而过表达 *BmFoxL2-2* 基因后, *BmCyclin A*、

BmCyclin B 和 *BmCyclin B3* 等细胞周期基因的表达显著上调, *BmNanos* 和 *BmVasa* 等生殖干细胞发育关键基因的表达也发生了显著上调 (图 5)。以上结果说明, 两个 BmFoxL2 亚族蛋白都可能通过调节生殖干细胞的发育及精细胞分裂等过程, 影响家蚕精子的发生, 而且 *BmFoxL2-2* 的调控功能更加显著。

3 结论与讨论

FoxL2 为 Fox 家族蛋白的一员, 被认为是动物性别分化的关键因子。在小鼠中, *FoxL2* 纯合突变可以导致次级卵泡的缺失和卵母细胞的闭锁 (Uhlenhaut et al., 2009)。在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 和沙漠飞蝗 *Schistocerca gregaria* 中也发现 *FoxL2* 在卵巢中有较高水平的表达, 并影响卵巢的发育 (De Loof et al., 2010; Ye et al., 2017)。尽管也有研究显示 *FoxL2* 在泥蟹 *Scylla paramamosain*

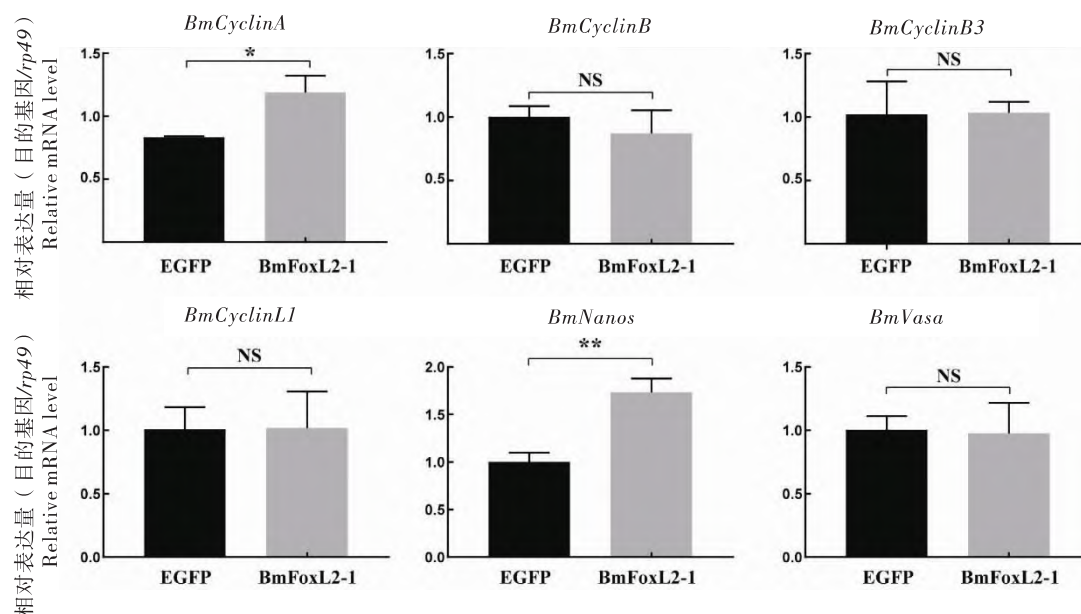


图4 BmFoxL2-1 蛋白对精子发生相关基因表达的影响

Fig. 4 Effect of BmFoxL2-1 overexpression on the expression of genes related to spermatogenesis

注: 柱上标有星号表示两组的表达差异显著; NS 两组的表达差异不显著 (* , $P < 0.05$; ** , $P < 0.01$; t 检验)。Note: Asterisks above the columns indicated significant difference between the two groups, “NS” indicates non-significant between the two groups (* , $P < 0.05$; ** , $P < 0.01$; t-test) .

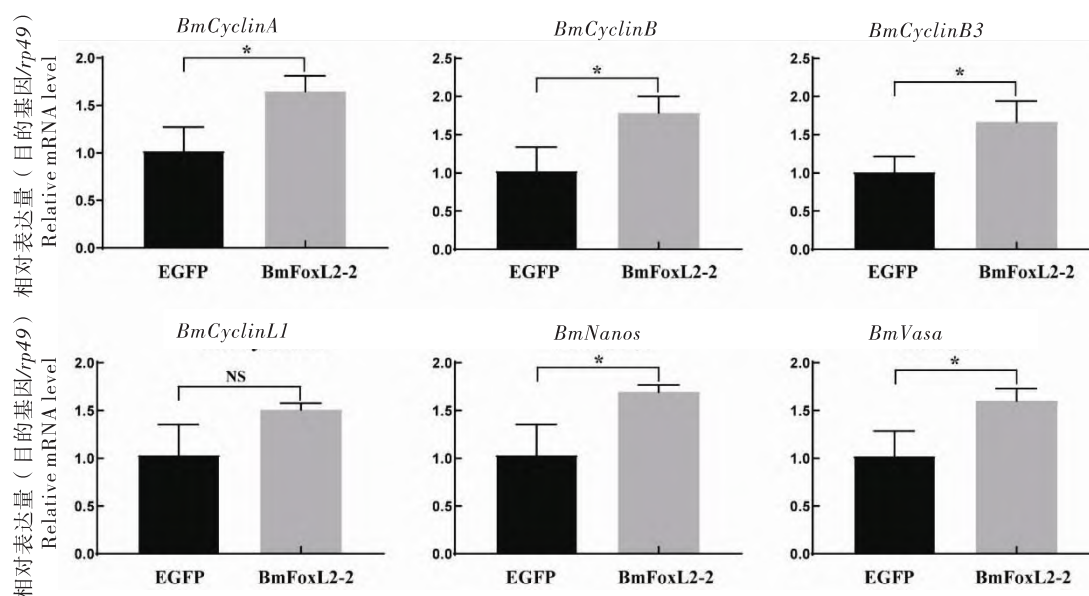


图5 BmFoxL2-2 蛋白对精子发生相关基因表达的影响

Fig. 5 Effect of BmFoxL2-2 overexpression on the expression of genes related to spermatogenesis

注: 柱上标有星号表示两组的表达差异显著; NS 两组的表达差异不显著 (* , $P < 0.05$; t 检验)。Note: Asterisks above the columns indicated significant difference between the two groups; “NS” indicated non-significant between the two groups (* , $P < 0.05$; t-test) .

等动物精巢中的表达高于卵巢, 家蚕 Microarray 数据也显示 *FoxL2-2* 基因在精巢中的表达高于卵巢, 但 *FoxL2* 蛋白在精巢中的功能仍不清楚 (Song *et al.*, 2015; Wan *et al.*, 2021)。本研究通过 qRT-PCR 实验发现两个家蚕 *BmFoxL2* 基因在精巢中的

表达水平显著高于卵巢, 并且主要在精巢内容物中表达。

在家蚕精子发生过程中, 精原细胞可以分化为有核精子与无核精子。在无核精子的辅助下, 有核精子与家蚕卵结合形成受精卵 (Sahara and

Kawamura, 2002; Pereira and Santos, 2015)。家蚕精子的二型分化具有严格的时期特异性, 即有核精子在幼虫阶段开始发生, 而无核精子的发生则要到预蛹期 (PP) 才能开始, 这些过程受到不同基因的严格调控 (Sahara and Kawamura, 2002)。本研究分析了 *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 在不同发育阶段家蚕精巢中的表达变化, 结果发现 *BmFoxL2-1* 在幼虫精巢中的表达水平较低, 在预蛹期开始上升; 而 *BmFoxL2-2* 的表达在 5 龄幼虫末期达到高峰后开始下降, 到了预蛹期后逐渐上升。这些表达变化与二型精子发生的时期相近, 推测两个 *BmFoxL2* 亚族基因的功能可能与家蚕精子的二型分化相关。

精子发生的过程是一个复杂且精细的过程, 在黑腹果蝇中, 生殖干细胞通过增殖与分化首先形成性原细胞。一个性原细胞经历有丝分裂和减数分裂后形成 64 个精细胞, 这些过程受到 *Vasa*、*Nanos* 以及细胞周期相关基因的调控 (Fabian and Brill, 2012; Fairchild *et al.*, 2016)。研究显示, 与黑腹果蝇相似, 家蚕生殖干细胞增殖与分化的过程同样需要 *Vasa* 和细胞周期等基因的参与 (贺真等, 2020)。本研究的结果显示, 在 Bm12 细胞中过表达 *BmFoxL2-2* 蛋白可以显著上调细胞周期基因 *BmCyclin A*、*BmCyclin B*、*BmCyclin B3* 和 *BmCyclin A*, 以及生殖干细胞发育关键基因 *BmNanos* 和 *BmVasa* 的表达 (图 5)。另外, 过表达 *BmFoxL2-1* 蛋白也可以上调 *BmCyclin A* 和 *BmNanos* 的表达, 但效果不如 *BmFoxL2-2* 的显著 (图 4)。由此推测家蚕 *FoxL2* 亚族蛋白都可以参与精子发生过程。但由于 *BmFoxL2-1* 和 *BmFoxL2-2* 蛋白的理化性质和亚细胞定位均存在差异 (图 2), 导致了两者对精子发生相关基因的表达调控存在差异。

综上, 本研究结果说明 *BmFoxL2* 亚族蛋白的功能与精子发生过程相关。以上结果完善了 *FoxL2* 亚族基因在雄性生殖系统发育中的功能, 同时也为研发通过提高精子质量优化家蚕性状的技术提供理论依据。

参考文献 (References)

DeLoof A, Huybrechts J, Geens M, *et al.* Sexual differentiation in adult insects: Male-specific cuticular yellowing in *Schistocerca gregaria* as a model for reevaluating some current (neuro) endocrine concepts [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2010, 56 (8): 919–925.

- Fabian L, Brill JA. *Drosophila* spermiogenesis: Big things come from little packages [J]. *Spermatogenesis*, 2012, 2 (3): 197–212.
- Fairchild MJ, Yang L, Goodwin K, *et al.* Occluding junctions maintain stem cell niche homeostasis in the fly testes [J]. *Current Biology*, 2016, 26 (18): 2492–2499.
- He Z, Li DC, Wu F. From fruit fly to silkworm: An overview on insect spermatogenesis [J]. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2020, 32 (12): 1322–1330. 贺真, 李德臣, 吴凡. 从果蝇到家蚕: 精子发生过程及调控机制概述 [J]. *生命科学*, 2020, 32 (12): 1322–1330.
- Hu QH, Pei MY, Zhao DH, *et al.* Identification and functional analysis of FoxG transcription factors in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2021, 58 (3): 2095–1353. 胡启豪, 裴梦圆, 赵丹琨, 等. 家蚕 FoxG 转录因子的鉴定及其在精巢发育中的功能初探 [J]. *应用昆虫学报*, 2021, 58 (3): 2095–1353.
- Kerschner JL, Gosalia N, Leir SH, *et al.* Chromatin remodeling mediated by the FOXA1/A2 transcription factors activates CFTR expression in intestinal epithelial cells [J]. *Epigenetics*, 2014, 9 (4): 557–565.
- Pereira MC, Santos DC. Testismorphology and dichotomic spermatogenesis in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) [J]. *Neotropical Entomology*, 2015, 44 (5): 481–488.
- Sahara K, Kawamura N. Double copulation of a female with sterile diploid and polyploid males recovers fertility in *Bombyx mori* [J]. *Zygote*, 2002, 10 (1): 23–29.
- Song JB, Li ZQ, Tong XL, *et al.* Genome-wide identification and characterization of Fox genes in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2015, 15 (5): 511–522.
- Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, *et al.* Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation [J]. *Cell*, 2009, 139 (6): 1130–1142.
- Wan HF, Zhong JY, Zhang ZP, *et al.* Characterization of the foxl2 gene involved in the vtg expression in mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. *Gene*, 2021, 798: 145807.
- Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, *et al.* The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo [J]. *Cell*, 1989, 57 (4): 645–658.
- Ye YX, Pan PL, Xu JY, *et al.* Forkhead box transcription factor L2 activates *Fcp3C* to regulate insect chorion formation [J]. *Open Biology*, 2017, 7 (6): 170061.
- Yu J, Liu YJ, Lan X, *et al.* CHES-1-like, the ortholog of a non-obstructive azoospermia-associated gene, blocks germline stem cell differentiation by upregulating Dpp expression in *Drosophila* testis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (27): 42303–42313.
- Zhao LN, Wei P, Guo HS, *et al.* Suppressing the expression of a forkhead transcription factor disrupts the chitin biosynthesis pathway in *Spodoptera exigua* [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2014, 86 (1): 4–18.