

文章编号: 1000-0615(2018)05-0653-10

DOI: 10.11964/jfc.20170110686

## 雌激素拮抗剂对三疣梭子蟹卵巢发育及相关基因表达的影响

陆洋<sup>1</sup>, 吴旭干<sup>1\*</sup>, 柳梅梅<sup>1</sup>, 巩杰<sup>2</sup>, 成永旭<sup>1,3</sup>

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 南通大学生命科学学院, 江苏南通 226000;

3. 上海海洋大学上海市教委水产动物遗传育种协同创新中心, 上海 201306)

**摘要:** 通过活体注射、养殖实验和荧光定量PCR等方法, 研究了不同浓度他莫昔芬(TAM)对三疣梭子蟹雌体成活率、卵巢指数、肝胰腺指数及卵巢发育相关基因表达的影响。结果显示, 不同浓度TAM对雌体存活率和肝胰腺指数均无显著影响, 但在一定程度上抑制了卵巢指数。不同组织中的卵黄蛋白原(Vg)、雌激素相关受体(ER)、维甲酸受体(RXR)和蜕皮激素受体(EcR)基因表达均受到了TAM的影响, Vg基因在卵巢和肝胰腺中的表达水平明显受到TAM的抑制; 低浓度TAM组(6.7和13.4 μg/g)促进了卵巢和胸神经节中的ER基因的表达, 但高浓度TAM(20 μg/g)抑制了大部分组织中ER基因表达水平; 外源注射TAM对三疣梭子蟹卵巢和肝胰腺中的EcR基因表达的变化模式与ER基因基本相似; 此外, 低浓度TAM促进了卵巢中RXR基因的表达, 对肝胰腺中RXR基因表达无显著影响。研究表明, TAM通过抑制Vg基因表达影响卵巢发育, 同时ER和EcR可能参与了雌激素或雌激素拮抗剂对三疣梭子蟹卵巢发育的调控过程。

**关键词:** 三疣梭子蟹; 卵巢发育; 雌激素拮抗剂; 基因表达

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

雌激素是甲壳动物体内重要的活性激素, 在卵巢发育和卵黄发生过程中起重要的调控作用, 雌二醇是甲壳动物体内最主要的雌激素<sup>[1]</sup>。甲壳动物卵巢发育过程中, 血淋巴中的雌二醇含量通常与卵巢发育阶段显著相关, 在卵黄发生旺期含量最高<sup>[1-2]</sup>。大量研究表明, 外源雌二醇可以显著促进甲壳动物的卵黄发生、卵母细胞生长和卵巢发育<sup>[3-6]</sup>。在脊椎动物中, 雌激素主要通过与其受体(estrogen receptor, ER)结合来调控卵巢发育<sup>[7-8]</sup>, 迄今为止, 有关雌激素对甲壳动物卵黄发生和卵巢发育的作用机制研究较少<sup>[9-10]</sup>, 有关甲壳动物体内是否存在ER或类似的雌激素作用尚存在争议<sup>[11-14]</sup>。

雌激素拮抗剂通过与ER结合形成稳定的复合物, 从而减少ER与雌激素的结合, 进而阻止

雌激素发挥其作用, 因此, 采用雌激素拮抗剂进行动物离体和活体调控实验有助于理解雌激素的作用路径和可能机制<sup>[15-16]</sup>。他莫昔芬(TAM)是一种常用的雌激素拮抗剂, 由于其来源方便, 价格适中, TAM已被广泛应用于雌激素相关的基础研究中<sup>[16-17]</sup>及雌激素相关肿瘤疾病等临床医学中<sup>[18]</sup>。迄今为止, 尚未见TAM对甲壳动物卵巢发育和基因表达的报道。

尽管甲壳动物的ER没有被确认, 但是雌激素相关受体(estrogen related receptor, ERR)已经在多种甲壳动物中被发现<sup>[19]</sup>, ERR是一种与雌激素效应有着密切关系的核受体, 其与ER尤其是在DNA结合域具有非常高的同源性<sup>[20-21]</sup>。有研究表明, 尽管ERR不与雌激素直接结合<sup>[22]</sup>, 但其参与了ER信号通路<sup>[21, 23]</sup>, 可以调控动物能量代谢、

收稿日期: 2017-01-10 修回日期: 2017-05-08

资助项目: 国家自然科学基金(41276158, 41606169); 上海市自然科学基金(12ZR1413000); 上海市科技兴农重点推广项目(农科推字(2016)第1-18号); 上海市高峰学科建设项目(2015-62-0908); 浙江省东海海水养殖产业升级协同创新中心项目

通信作者: 吴旭干, E-mail: xgwu@shou.edu.cn

细胞增殖分化和性腺发育等多种生理过程<sup>[24-26]</sup>, 同时其基因表达水平受到雌激素的影响<sup>[27]</sup>。

在甲壳动物中, 卵巢发育过程非常复杂, 除了雌激素以外, 还可受到其他相关激素或基因的调节。例如, 已有研究表明蜕皮激素及其受体(ecdysone receptor, EcR)通过调控营养物质的合成与积累参与卵巢发育调控<sup>[28]</sup>。维甲酸X受体(retinoid X receptor, RXR)与甲基法尼酯(MF)可以通过调控卵巢和肝胰腺中Vg基因的表达进而调节卵巢发育过程<sup>[29-30]</sup>。因此探究雌激素拮抗剂对相关核受体基因的表达将有助于了解雌激素对卵巢发育调控的机制。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国重要的海水养殖蟹类之一, 但池塘养殖雌体卵巢发育不良一直是困扰该产业发展的一个重要问题<sup>[31]</sup>, 池塘养殖雌体卵巢发育不良可能与其雌二醇分泌有关<sup>[2]</sup>, 但其作用机制不详。鉴于此, 本实验采用TAM活体注射、养殖实验和荧光定量PCR技术, 首先研究了不同浓度TAM对三疣梭子蟹存活率、卵巢指数和肝胰腺指数的影响, 进一步研究了TAM对卵巢发育相关组织中ERR、RXR、EcR和卵黄蛋白原(Vg)基因表达的影响, 以期深入研究甲壳动物雌激素的作用机制提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用蟹与养殖条件

实验用三疣梭子蟹雌蟹取自上海水产研究所启东科研基地的室外养殖池塘, 初始体质量为150~200 g, 甲壳宽为10~12 cm, 挑选附肢完整、活力较好、生殖蜕壳后的雌性梭子蟹200只暂养于该基地的室内循环水系统中。由于三疣梭子蟹极易自相残杀导致存活率偏低, 因此实验期间每只雌蟹均单独饲养于梭子蟹养殖框中(长×宽×高=33.0 cm×27.5 cm×35.0 cm, 水深25.0 cm)<sup>[32]</sup>, 养殖框底部分成两个区域, 一侧放有约5.0 cm厚的细沙供梭子蟹潜伏, 另外一侧为投饵区。单体养殖框四周设有泡沫以便浮于水泥池中, 养殖框放于室内水泥池中(长×宽×高=5.8 m×2.4 m×1.7 m), 每个水泥池放入60只单体养殖框。暂养期间每日19:00按蟹体质量的1~3%投喂梭子蟹配合饲料(浙江欣欣饲料有限公司生

产, 粒径2.5 mm, 蛋白含量38%, 脂肪含量11%), 次日10:00清理残饵和粪便。实验用蟹暂养一周后, 挑选150只肢体健全且活体较好的个体用于正式实验。正式养殖实验时间为2014年11月1日—12月5日, 共35 d, 正式实验期间的养殖日常管理同暂养期间基本一致。实验期间自然光照, 水温为14~24 °C; 盐度为24; pH: 7.0~9.0; 平均溶解氧大于5 mg/L; 氨氮小于0.5 mg/L; 亚硝酸盐小于0.15 mg/L。

### 1.2 实验设计、养殖管理和采样

实验分为5组, 即3个不同浓度TAM注射组(6.7、13.4和20 μg TAM/g体质量), 无水乙醇注射组和未注射组2个对照组, 每组注射30只雌蟹。TAM购自Sigma公司(T5648, ≥99%); 由于TAM不易溶于生理盐水, 因此采用纯酒精溶解TAM<sup>[16]</sup>后进行注射。注射体积按照0.5 μL/g体质量<sup>[33]</sup>的标准计算, 本实验中三疣梭子蟹平均体质量为200 g, 注射体积为100 μL<sup>[3, 14]</sup>。注射位置为游泳足基膜处。注射频率为一周一次<sup>[33-34]</sup>, 分别在正式实验的0、7、14、21、28 d进行注射, 实验第35天进行采样, 采样前停食2 d。

每个实验组分别随机采样15只个体, 用吸水纸擦干蟹体表水分后精确称重(精确到0.01 g), 然后取出每只蟹的全部肝胰腺和卵巢, 用电子天平精确称重(精确到0.001 g)后分别计算肝胰腺指数(hepatosomatic index, HSI, %)=肝胰脏重/总体质量×100, 卵巢指数(gonadosomatic index, GSI, %)=卵巢重/体质量×100。同时采集每只雌体的卵巢、肝胰腺、脑神经节、眼柄和大颚器各0.1 g, 液氮速冻后保存于-80 °C冰箱用于总RNA提取。

### 1.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

通过总RNA提取试剂盒(TIANGEN, Cat.DP419)提取各组织中的总RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计法分别检测RNA的完整度和纯度。各取100 ng总RNA为反转录模板, 采用反转录试剂盒(TaKaRa, Cat.D2639A)进行第一链cDNA合成。实验中以三疣梭子蟹的18S基因作为荧光定量PCR的内参基因<sup>[35]</sup>, 所有引物均委托上海生工生物工程有限公司合成(表1)。

参考TaKaRa荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa, Cat.DRR420A)说明书, 将模板cDNA梯度稀释后进行标准曲线扩增。当无非特异性扩增, 目标

表1 荧光定量PCR的引物序列

Tab. 1 Primers and their sequences used in this experiment		
引物名称 primer name	核苷酸序列(5'-3') sequence	来源 source
18S-F	TCCAGTTCGCAGCTTCTTCTT	[35]
18S-R	AACATCTAAGGGCATCACAGACC	[35]
ERR-F	CCGAGAGTTTAAGGGAAGACGA	[19]
ERR-R	TGATTCACAGTCATTGGCAGC	[19]
RXR-F	TCACACACGACACCCAGAACA	[36]
RXR-R	GATGGATGACACGGACATAACAG	[36]
Vg-F	TGCTGCCAAACTATCCTTCATCC	[37]
Vg-R	CAACTATCGGAGCCAGGCAATC	[37]
EcR-F	CAGTGCCTGGTGAAGAGAGA	[38]
EcR-R	GCAGACATTGGACTTGTGG	[38]

基因和内参基因的扩增效率在95%~105%，标准曲线 $R^2$ 大于0.99时，确定qRT-PCR反应体系与条件。qRT-PCR的反应体系见表2，反应条件为95℃预变性30 s；95℃变性5 s，60~61℃退火30 s（Vg、EcR和RXR基因为60℃；ERR基因为61℃），40个循环。采用ABI荧光定量PCR分析仪（ABI-7500, ThermoFisher, Singapore）进行目标基因和内参基因的实时荧光定量PCR分析（qRT-PCR），每个样品的目标基因和内参基因均重复分析3次。

表2 目标基因和内参基因定量PCR反应体系的试剂添加量

Tab. 2 The volume of each reagent added to the PCR mixture used for qRT-PCR of target genes and reference gene (18S)		
试剂 reagent	目标基因 target genes	18S $\mu\text{L}$
SYBR Premix Ex Taq™(2×)	10	10
PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.4	0.4
PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.4	0.4
cDNA template	2	2
ROX Reference Dye II (50×)	0.4	0.4
dH <sub>2</sub> O	6.8	6.8
Total volume	20	20

## 1.4 数据分析

采用18S作为内参基因，计算 $\Delta C_T$ ，通过公式

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{样品}} - \Delta C_{T\text{对照}}$  计算 $\Delta\Delta C_T$ ， $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法对目的基因相对表达量进行分析。采用SPSS 17.0软件对qRT-PCR数据进行统计分析，所有数据采用平均值±标准误(mean±SE)表示，采用Levene氏法进行方差齐性检验，当不满足齐性方差时对百分比数据进行反正弦或平方根处理，采用AN-OVA对实验结果进行方差分析，采用Tukey氏法进行多重比较，当 $P < 0.05$ 时为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度雌激素拮抗剂对存活率和卵巢发育的影响

未注射组的存活率最高，无水乙醇组次之，TAM 20  $\mu\text{g/g}$ 注射组最低，但各组间差异不显著( $P > 0.05$ )（图1）。就卵巢指数而言，未注射组最高，TAM 6.7和20  $\mu\text{g/g}$ 注射组显著低于未注射组( $P < 0.05$ )；与无水乙醇注射组相比，注射TAM能够抑制卵巢指数，但无显著差异( $P > 0.05$ )（图2）。对于肝胰腺指数，5组雌体间均无显著差异( $P > 0.05$ )（图3）。

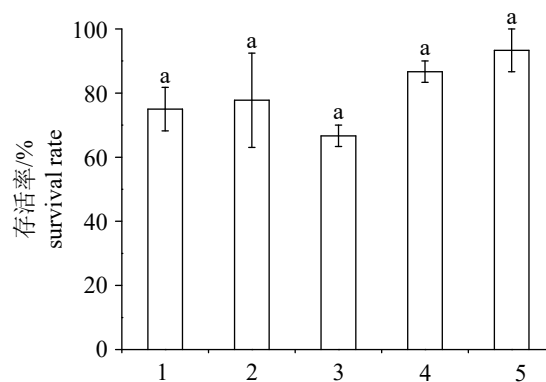


图1 不同浓度外源TAM对三疣梭子蟹存活率的影响

柱形图上含有相同字母代表差异不显著( $P > 0.05$ )，不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同

Fig. 1 The effects of exogenous estrogen antagonist on the survival rate of *P. trituberculatus*

1. 6.7  $\mu\text{g/g}$  TAM; 2. 13.4  $\mu\text{g/g}$  TAM; 3. 20  $\mu\text{g/g}$  TAM; 4. ethanol; 5. control. Same letters at the top of the columns indicate no significantly different ( $P > 0.05$ ), while different letters at the top of the columns indicate significantly different ( $P < 0.05$ ). The same below

### 2.2 不同浓度雌激素拮抗剂对卵巢发育相关基因表达的影响

荧光定量结果显示，不同浓度的TAM对不

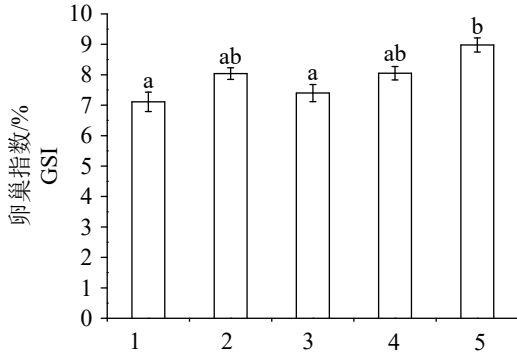


图2 不同浓度外源TAM对三疣梭子蟹卵巢指数的影响

Fig. 2 Effects of exogenous estrogen antagonist on the GSI of *P. trituberculatus*

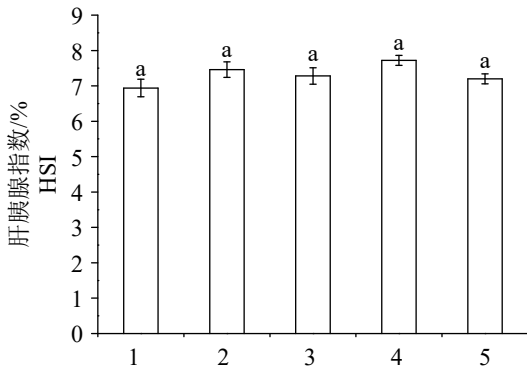


图3 不同浓度外源TAM对三疣梭子蟹肝胰腺指数的影响

Fig. 3 Effects of exogenous estrogen antagonist on the HSI of *P. trituberculatus*

同组织中 *Vg*、*ERR*、*RXR*和*EcR*基因表达均有所影响。就 *Vg*基因而言，注射TAM和无水乙醇对卵巢和肝胰腺中 *Vg*基因表达均有显著的抑制作用(图4)。

在脊椎动物中ERR参与ER信号通路<sup>[21, 23]</sup>，并且和性腺发育存在密切关系<sup>[25]</sup>，相比于*EcR*和*RXR*基因，*ERR*基因是本实验研究的重点基因，因此实验对*ERR*基因的表达进行了更广泛的检测。结果表明，*ERR*基因在卵巢、肝胰腺、脑神经节、胸神经节、眼柄和大颚器中广泛表达。在卵巢中，注射TAM 6.7 μg/g、13.4 μg/g组和未注射组的*ERR*基因表达水平较高，TAM 6.7 μg/g组显著高于乙醇组和未注射组( $P < 0.05$ ) (表3)；在肝胰腺中，外源注射TAM组抑制了*ERR*基因的表达水平，其中TAM 20 μg/g组显著低于13.4 μg/g、乙醇注射组和未注射组( $P < 0.05$ )。在脑神经节中，3个TAM注射组的*ERR*基因表达水平显著低

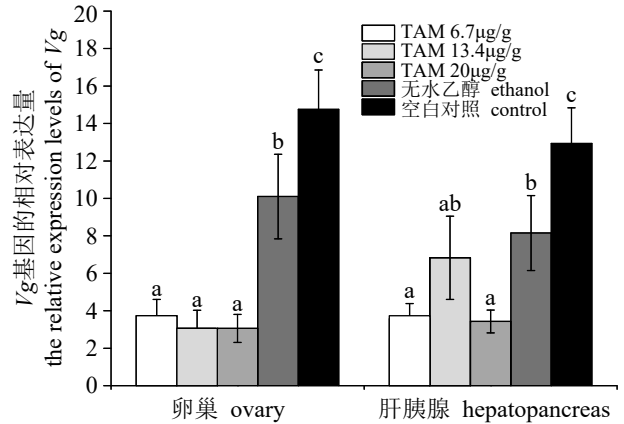


图4 不同浓度外源雌激素拮抗剂对梭子蟹卵巢和肝胰腺中 *Vg*基因表达的影响

Fig. 4 Effects of exogenous estrogen antagonist on the expression of *Vg* gene in ovary and hepatopancreas of *P. trituberculatus*

于乙醇注射组和未注射组，且未注射组的*ERR*基因表达水平显著高于乙醇注射组( $P < 0.05$ )。在胸神经节中，TAM 6.7 μg/g组的*ERR*基因表达水平相对较高，其余各组无显著差异( $P > 0.05$ )。在眼柄中，TAM 20 μg/g注射组的*ERR*基因表达水平表达量最低，其余各组差异不显著( $P > 0.05$ )。在大颚器中，TAM 6.7 μg/g组和未注射组的*ERR*基因表达水平最高，TAM 20 μg/g注射组最低( $P < 0.05$ )。

卵巢组织中，注射TAM 6.7和13.4 μg/g组的*EcR*基因表达量较高( $P < 0.05$ )，其余各组无显著差异( $P > 0.05$ ) (图5)；在肝胰腺中，3个TAM注射组的*EcR*基因表达水平均显著低于乙醇注射组和未注射组，其中6.7和13.4 μg/g组低于20 μg/g组( $P < 0.05$ )。

卵巢组织中，注射TAM 6.7 μg/g组的*RXR*基因表达水平最高( $P < 0.05$ )，其余各组差异不显著( $P > 0.05$ ) (图6)；肝胰腺中，未注射组的*RXR*基因表达水平最高( $P < 0.05$ )，3个TAM注射组和无水乙醇组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

在水生生物中，TAM具有微量的毒性<sup>[17]</sup>，实验结果显示注射TAM 20 μg/g组的存活率最低，但5个实验组存活率差异不显著，表明本实验所使用的TAM浓度对三疣梭子蟹来说无明显的毒性。相比于无水乙醇组，TAM 6.7和20 μg/g组卵巢指数相对较低。外源注射TAM后，卵巢

表3 不同浓度外源雌激素拮抗剂对梭子蟹各组织中ERR基因表达的影响

Tab. 3 Effects of exogenous estrogen antagonist on the expression of ERR gene in different tissues of *P. trituberculatus*

	TAM			无水乙醇 ethanol	空白对照 control
	6.7 μg/g	13.4 μg/g	20 μg/g		
卵巢 ovary	2.20±0.09 <sup>bc</sup>	2.36±0.07 <sup>c</sup>	1.83±0.14 <sup>a</sup>	1.82±0.16 <sup>a</sup>	1.99±0.12 <sup>ab</sup>
肝胰腺 hepatopancreas	3.72±0.75 <sup>ab</sup>	5.60±0.37 <sup>c</sup>	2.99±0.49 <sup>a</sup>	5.39±1.51 <sup>bc</sup>	6.48±0.48 <sup>c</sup>
脑神经节 cephalic ganglion	6.10±0.99 <sup>a</sup>	6.50±1.32 <sup>a</sup>	4.98±0.83 <sup>a</sup>	11.48±1.96 <sup>b</sup>	18.36±2.69 <sup>c</sup>
胸神经节 thoracic ganglia	10.81±1.09 <sup>b</sup>	7.69±1.53 <sup>ab</sup>	7.37±1.89 <sup>a</sup>	6.83±0.89 <sup>a</sup>	7.57±0.94 <sup>a</sup>
眼柄 eyestalk	6.83±2.16 <sup>b</sup>	6.19±0.85 <sup>b</sup>	2.07±0.45 <sup>a</sup>	4.90±0.72 <sup>b</sup>	6.17±0.77 <sup>b</sup>
大颚器 mandibular organ	9.41±2.19 <sup>cd</sup>	4.66±1.24 <sup>ab</sup>	1.99±0.41 <sup>a</sup>	6.54±0.52 <sup>bc</sup>	12.00±0.66 <sup>d</sup>

注: 同行数据间标记不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Notes: In the same row, values with different letters indicate the expression levels of ERR gene were significantly different (P<0.05)

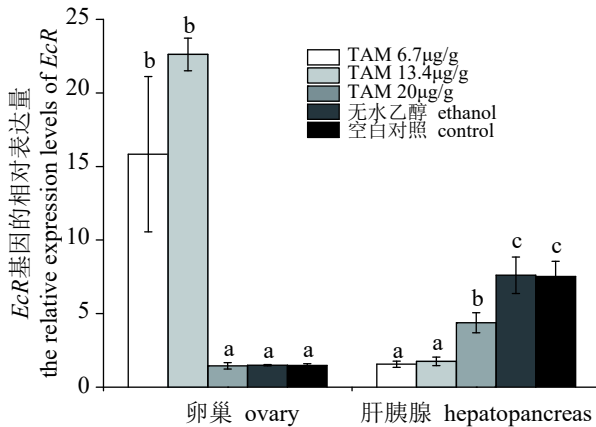


图5 不同浓度外源雌激素拮抗剂对梭子蟹卵巢和肝胰腺中EcR基因表达的影响

Fig. 5 Effects of exogenous estrogen antagonist on the expression of EcR gene in ovary and hepatopancreas of *P. trituberculatus*

指数受到了一定的抑制, 表明TAM可能影响了卵巢发育。同样有研究表明, 一定浓度的TAM可以减少雄性青鳉(*Oryzias latipes*)的性腺指数<sup>[17]</sup>。本实验中不同处理组的三疣梭子蟹卵巢指数差异不显著, 可能的原因是实验所用三疣梭子蟹卵巢已经发育到大生长期, 体内Vg足够合成卵黄磷蛋白, 虽然外源注射TAM可以抑制GSI, 但并不足以达到显著效果。

众所周知, 在性腺发育和成熟过程中会伴随着脂质和蛋白质含量的改变<sup>[39]</sup>。在本实验中, 外源注射TAM能够明显抑制卵巢和肝胰腺中Vg基因的表达(图4), 同样的, Sun等<sup>[40]</sup>也证明青鳉鱼肝胰腺中Vg基因的表达水平随着TAM浓度的增加而受到抑制。Vg对于甲壳动物的卵巢发

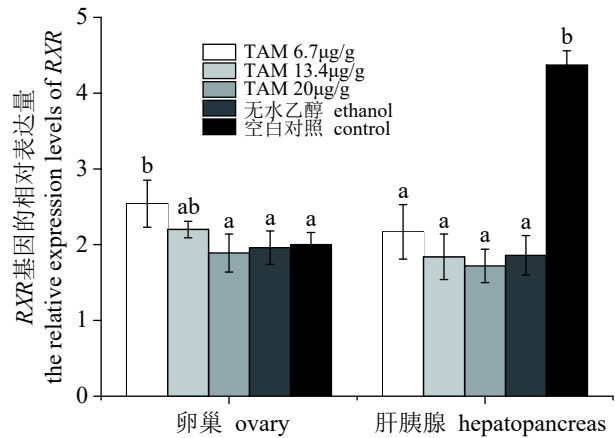


图6 不同浓度外源雌激素拮抗剂对梭子蟹卵巢和肝胰腺中RXR基因表达的影响

Fig. 6 Effects of exogenous estrogen antagonist on the expression of RXR gene in ovary and hepatopancreas of *P. trituberculatus*

育至关重要, 十足目甲壳动物卵巢发育的最大特征就是伴随着卵巢体积不断增大而慢慢成熟, 而卵巢成熟主要是由卵黄磷蛋白及其前体物质Vg的积累与转化来推动<sup>[41]</sup>。在活体注射中, TAM对Vg基因表达存在显著的抑制作用, 表明TAM可能和内源性雌激素竞争结合ER而产生了拮抗作用, 进而通过调节Vg的合成来影响卵巢发育过程<sup>[15]</sup>。

迄今为止, 有关ER的研究在脊椎动物中已有较多报道<sup>[42]</sup>, 然而在甲壳动物中尚未发现ER基因的存在。ERR基因与ER基因具有非常高的同源性, 能够参与激素受体信号通路<sup>[21, 23-25]</sup>, 与雌激素效应密切相关, 其表达水平可能受雌激素水平的影响<sup>[27]</sup>。在本实验中, 卵巢内ERR基

因的表达量在TAM 6.7和13.4  $\mu\text{g/g}$ 的浓度下相对较高,在TAM 20  $\mu\text{g/g}$ 浓度下, *ERR*基因的表达量和乙醇组无明显差异;同时在肝胰腺中,尽管外源注射低浓度TAM (TAM 6.7和13.4  $\mu\text{g/g}$ )不能显著抑制*ERR*的基因表达,但是相对高浓度的TAM能够显著下调*ERR*基因表达量。这可能是由于TAM在低浓度下具有一定的雌激素活性,可诱导*ER*等相关基因的表达,而达到一定浓度后表现为抑制作用<sup>[40, 43]</sup>。本实验中,外源TAM能够对三疣梭子蟹*ERR*基因的表达水平产生影响,表明雌激素以及外源雌激素拮抗剂可能通过*ERR*来发挥相关功能。

在脊椎动物中雌激素能够参与细胞增殖、脂质合成、蛋白质合成以及折叠转运等多种生理过程的信号通路<sup>[44]</sup>,而在甲壳动物中,大量研究表明蜕皮激素及其受体也能够通过调控营养物质合成和积累进而参与到卵巢发育调控过程中<sup>[30, 45-46]</sup>,本实验发现与*ERR*基因相似,在卵巢中低浓度外源TAM也能够促进*EcR*基因表达。已有研究表明,干扰*ERR*基因表达能够显著下调雌蚊体内*EcR*基因的表达量,结合本实验中TAM对*ERR*和*EcR*作用的相似性,表明雌激素可能与蜕皮激素存在cross talking,参与蜕皮激素信号通路。

脑神经节和胸神经节是甲壳动物重要的神经内分泌器官对卵巢发育有重要的调控作用<sup>[45, 47]</sup>。部分虾蟹类脑神经节和胸神经节的提取物均可诱导卵巢发育过程,但脑神经节的提取物可能比胸神经节的提取物更能促进卵巢发育<sup>[48-49]</sup>。本实验结果显示脑神经节中,3个TAM注射组的*ERR*表达量均显著降低。TAM对脑神经节中*ERR*基因表达量的抑制作用,暗示TAM可能通过抑制脑神经节中*ERR*基因表达来参与其对卵巢发育的调控。在眼柄中,TAM 20  $\mu\text{g/g}$ 组抑制了*ERR*基因的表达水平,众所周知,在甲壳动物中眼柄是调控卵巢发育的重要神经内分泌器官,能够分泌性腺抑制激素来抑制卵巢发育<sup>[45]</sup>。在本实验中,高浓度的TAM对*ERR*的抑制作用暗示*ERR*基因的表达量可能与眼柄中性腺抑制激素的合成负相关。

大颚器是三疣梭子蟹另一个重要内分泌器官<sup>[50]</sup>,主要功能为分泌甲基法尼酯(MF)参与蜕皮、形态发生和性腺发育的调控<sup>[51]</sup>。*RXR*基因是MF信号转导途径中的候选配体<sup>[52]</sup>,同时MF与*RXR*能够通过调控卵巢和肝胰腺中*Vg*基因的表达

进而调节卵巢发育过程<sup>[30, 50, 53]</sup>。在本实验中,只有注射低浓度TAM显著促进了卵巢中*RXR*基因的表达,其余各实验组无显著差异,而在肝胰腺中*RXR*基因的表达水平没有显著变化。研究表明虾蟹类卵巢发育期间*RXR*基因在卵巢中都有较高的表达水平,甚至数倍高于其他组织<sup>[30, 54-56]</sup>,暗示在甲壳动物卵巢发育过程中,*RXR*的主要作用器官为卵巢,同时本实验卵巢组织中TAM微弱的雌激素活性可能导致了*RXR*基因的高表达。然而有关*Vg*、*ERR*、*EcR*和*RXR*基因在雌激素介导的信号通路中的具体功能及其作用机制还有待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Quintio E T, Hara A, Yamauchi K, *et al.* Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1994, 109(1): 21-26.
- [2] 蔡生力,刘红.十足目甲壳动物卵黄蛋白原的生化特性及生物合成[J].水产学报,2017,41(1):150-158.  
Cai S L, Liu H. Biological characteristics and synthesis of vitellogenin in Decapoda, Crustacean[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(1): 150-158(in Chinese).
- [3] Rodríguez E M, Medesani D A, Greco L S L, *et al.* Effects of some steroids and other compounds on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during early vitellogenesis[J]. Journal of Experimental Zoology, 2002, 292(1): 82-87.
- [4] Zapata V, Greco L S L, Medesani D, *et al.* Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year. *In vivo* and *in vitro* studies[J]. Aquaculture, 2003, 224(1-4): 339-352.
- [5] Yano I, Hoshino R. Effects of 17  $\beta$ -estradiol on the vitellogenin synthesis and oocyte development in the ovary of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2006, 144(1): 18-23.
- [6] Merlin J, Mohanlal D L, Balasubramanian C P, *et al.* Induction of vitellogenesis and reproductive maturation in tiger shrimp, *Penaeus monodon* by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone: *In vivo* and *in vitro* studies[J].

- Invertebrate Reproduction & Development, 2015, 59(3): 166-175.
- [ 7 ] Greene G, Gilna P, Waterfield M, *et al.* Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA[J]. Science, 1986, 231(4742): 1150-1154.
- [ 8 ] 赵晓民, 徐小明. 雌激素受体及其作用机制[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(12): 154-158. Zhao X M, Xu X M. Estrogen receptor and its molecular mechanism[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry (Natural Science Edition), 2004, 32(12): 154-158(in Chinese).
- [ 9 ] 沈蓓杰, 杨筱珍, 吴旭干, 等. 外源17 $\beta$ -雌二醇对中华绒螯蟹III~IV期卵巢发育以及内源雌激素水平的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(3): 289-295. Shen B J, Yang X Z, Wu X G, *et al.* The effects of exogenous 17 $\beta$ -estradiol on ovary development and on the level of endogenous 17 $\beta$ -estradiol in *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(3): 289-295(in Chinese).
- [10] 柳梅梅, 吴旭干, 刘智俊, 等. 中华绒螯蟹卵巢发育期间两种雌激素受体在卵巢发育和肝胰腺的分布及变化[J]. 水生生物学报, 2015, 39(4): 822-830. Liu M M, Wu X G, Liu Z J, *et al.* Distribution and changes of two estrogen receptors in the ovaries and hepatopancreas during the ovarian development of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(4): 822-830(in Chinese).
- [11] Thornton J W, Need E, Crews D. Resurrecting the ancestral steroid receptor: Ancient origin of estrogen signaling[J]. Science, 2003, 301(5640): 1714-1717.
- [12] Paolucci M, Di Cristo C, Di Cosmo A. Immunological evidence for progesterone and estradiol receptors in the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*[J]. Molecular Reproduction and Development, 2002, 63(1): 55-62.
- [13] Köhler H R, Kloas W, Schirling M, *et al.* Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates[J]. Ecotoxicology, 2007, 16(1): 131-143.
- [14] Coccia E, De Lisa E, Di Cristo C, *et al.* Effects of estradiol and progesterone on the reproduction of the freshwater crayfish *Cherax albidus*[J]. The Biological Bulletin, 2010, 218(1): 36-47.
- [15] Jordan V C, Dix C J, Rowsby L, *et al.* Studies on the mechanism of action of the nonsteroidal antioestrogen tamoxifen (I. C. I. 46, 474) in the rat[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1977, 7(2): 177-192.
- [16] Singh A K, Srivastava P P, Verma R, *et al.* Effect of dietary administration of letrozole and tamoxifen on gonadal development, sex differentiation and biochemical changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Reproduction, Fertility and Development, 2014, 27(3): 449-457.
- [17] Sun L W, Zha J M, Spear P A, *et al.* Tamoxifen effects on the early life stages and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2007, 24(1): 23-29.
- [18] 高翠红, 韩萍. 来曲唑与三苯氧胺对人卵巢癌顺铂耐药细胞株SKOV3/DDP生长及耐药的影响[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(13): 2013-2017. Gao C H, Han P. Effects of letrozole and tamoxifen on the growth and drug resistance of cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line SKOV3/DDP[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2012, 27(13): 2013-2017(in Chinese).
- [19] 陆洋, 吴旭干, 潘桂平, 等. 三疣梭子蟹雌激素相关受体基因在蜕皮过程中的表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(3): 321-328. Lu Y, Wu X G, Pan G P, *et al.* Expression analysis of *PtERR* during the molting cycle in *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(3): 321-328(in Chinese).
- [20] Giguère V. To ERR in the estrogen pathway[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2002, 13(5): 220-225.
- [21] 陆蕴红. 雌激素相关受体 $\alpha$ (ERR $\alpha$ )与肿瘤疾病的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2014, 41(1): 126-132. Lu Y H. Research progress on estrogen-related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) and tumor diseases[J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2014, 41(1): 126-132(in Chinese).
- [22] Deblois G, Giguère V. Functional and physiological genomics of estrogen-related receptors (ERRs) in health and disease[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2011, 1812(8): 1032-1040.
- [23] 刘英华, 何宁, 姜淑卿, 等. 雌激素相关受体 $\alpha$ 与雌激素受体 $\alpha$ 通路相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(17): 1306-1309. Liu Y H, He N, Jiang S Q, *et al.* Correlation between estrogen receptor-related receptor  $\alpha$  and estrogen receptor

- $\alpha$  pathway[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2013, 20(17): 1306-1309(in Chinese).
- [24] Luo J M, Sladek R, Carrier J, *et al.* Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor  $\alpha$ [J]. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23(22): 7947-7956.
- [25] Fujimoto J, Nakagawa Y, Toyoki H, *et al.* Estrogen-related receptor expression in placenta throughout gestation[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 94(1-3): 67-69.
- [26] Tennessen J M, Baker K D, Lam G, *et al.* The *Drosophila* estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth[J]. Cell Metabolism, 2011, 13(2): 139-148.
- [27] Tarrant A M, Greytak S R, Callard G V, *et al.* Estrogen receptor-related receptors in the killifish *Fundulus heteroclitus*: Diversity, expression, and estrogen responsiveness[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2006, 37(1): 105-120.
- [28] Gong J, Ye H H, Yang Y J, *et al.* Ecdysone receptor in the mud crab *Scylla paramamosain*: A possible role in promoting ovarian development[J]. Journal of Endocrinology, 2015, 224(3): 273-287.
- [29] Durica D S, Wu X H, Anilkumar G, *et al.* Characterization of crab EcR and RXR homologs and expression during limb regeneration and oocyte maturation[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2002, 189(1-2): 59-76.
- [30] Gong J, Huang C C, Shu L, *et al.* The retinoid X receptor from mud crab: New insights into its roles in ovarian development and related signaling pathway[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23654.
- [31] Wu X G, Cheng Y X, Zeng C S, *et al.* Reproductive performance and offspring quality of wild-caught and pond-reared swimming crab *Portunus trituberculatus* broodstock[J]. Aquaculture, 2010, 301(1-4): 78-84.
- [32] 潘桂平, 候文杰, 吴旭干, 等. 水温和单体筐养对三疣梭子蟹雌体卵巢发育和常规生化成分的影响[J]. 海洋渔业, 2015, 37(6): 550-556.
- Pan G P, Hou W J, Wu X G, *et al.* Effects of water temperature and single crab basket culture on ovarian development and tissue proximate composition of female *Portunus trituberculatus*[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(6): 550-556(in Chinese).
- [33] Koskela R W, Greenwood J G, Rothlisberg P C. The influence of prostaglandin E2 and the steroidhormones, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and 17 $\beta$ -estradiol on moulting and ovarian development in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* Haswell, 1879 (Crustacea: Decapoda)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1992, 101(2): 295-299.
- [34] Reddy P R, Kiranmayi P, Kumariet K T, *et al.* 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone induced ovarian growth and vitellogenesis in the freshwater rice field crab *Oziotelphusa senex senex*[J]. Aquaculture, 2006, 254(1-4): 768-775.
- [35] Yang F, Xu H T, Dai Z M, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 142(4): 456-464.
- [36] 王伟, 吴旭干, 楼宝, 等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)RXR基因克隆及其在蜕皮过程中的表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(5): 1105-1114.
- Wang W, Wu X G, Lou B, *et al.* Cloning of retinoid x receptor (RXR) and its expression analysis during molting in *Portunus trituberculatus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2014, 45(5): 1105-1114(in Chinese).
- [37] 张艳. 三疣梭子蟹卵巢发育期间卵黄蛋白原(Vg)、卵黄磷蛋白(Vn)及Vg-mRNA表达的变化研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- Zhang Y. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin and vitellogenin gene expression during the ovarian development of swimming crab, *Portunus trituberculatus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011 (in Chinese).
- [38] 张晓燕, 李健, 刘萍, 等. 三疣梭子蟹蜕皮激素受体 *EcR*基因的cDNA克隆及表达分析[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 96-103.
- Zhang X Y, Li J, Liu P, *et al.* Cloning and expression analysis of *EcR* gene in *Portunus trituberculatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(1): 96-103(in Chinese).
- [39] Sharp R L and Maclatchy D L. Lipid dynamics in goldfish (*Carassius auratus*) during a period of gonadal recrudescence: Effects of  $\beta$ -sitosterol and 17 $\beta$ -estradiol exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007, 145(4): 507-517.
- [40] Sun L W, Shao X L, Chi J, *et al.* Transcriptional responses in the brain, liver and gonad of Japanese rice-fish (*Oryzias latipes*) exposed to two anti-estrogens[J].



- Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2011, 153(4): 392-401.
- [41] 吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究[J]. 海洋学报, 2007, 29(4): 120-127.
- Wu X G, Yao G G, Yang X Z, *et al.* A study on the ovarian development of *Portunus trituberculatus* in East China Sea during the first reproductive cycle[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2007, 29(4): 120-127(in Chinese).
- [42] Gibson D A, Saunders P T K. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues-A role for estrogen receptors and estrogen related receptors[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2012, 348(2): 361-372.
- [43] Chikae M, Ikeda R, Hasan Q, *et al.* Effects of tamoxifen, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, flutamide, and methyltestosterone on plasma vitellogenin levels of male and female Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2004, 17(1): 29-33.
- [44] Pinto P I S, Teodósio H R, Galay-Burgos M, *et al.* Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using suppression subtractive hybridization[J]. Molecular Reproduction and Development, 2006, 73(3): 318-329.
- [45] Nagaraju G P C. Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview[J]. Journal of Experimental Biology, 2011, 214(1): 3-16.
- [46] Subramoniam T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 2000, 125(2): 135-156.
- [47] Eastman-Reks S, Fingerman M. Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth *in vivo* and *in vitro* in the fiddler crab, *Uca pugilator*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1984, 79(4): 679-684.
- [48] Kulkarni G, Nagabhushanam R, Joshi P. Neuroendocrine regulation of reproduction in the marine female prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers)[J]. Indian Journal of Marine Sciences, 1981, 10: 350-352.
- [49] Takayanagi H, Yamamoto Y, Takeda N. An ovary-stimulating factor in the shrimp, *Paratya compressa*[J]. Journal of Experimental Zoology, 1986, 240(2): 203-209.
- [50] 郭敏. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)大颚器的生理功能及其对卵巢发育的内分泌调控[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
- Guo M. Endocrinological function of the mandibular organ in ovary development in *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [51] Nagaraju G P C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone?[J]. Aquaculture, 2007, 272(1-4): 39-54.
- [52] 邱锡尔, 朱冬发, 汤洁, 等. 甲基法尼酯在甲壳动物中的生理作用及其机制的研究进展[J]. 生物学杂志, 2015, 32(1): 76-81.
- Qiu X E, Zhu D F, Tang J, *et al.* Review of the physiological functions and their mechanisms of methyl farnesoate in crustacean[J]. Journal of Biology, 2015, 32(1): 76-81(in Chinese).
- [53] Eichner C, Dalvin S, Skern-Mauritzen R, *et al.* Characterization of a novel RXR receptor in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) regulating growth and female reproduction[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 81.
- [54] Tiu S H K, Hult E F, Yagi K J, *et al.* Farnesoic acid and methyl farnesoate production during lobster reproduction: Possible functional correlation with retinoid X receptor expression[J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 175(2): 259-269.
- [55] Cui J, Wu L T, Chan S M, *et al.* cDNA cloning and mRNA expression of retinoid-X-receptor in the ovary of the shrimp *Metapenaeus ensis*[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(11): 6233-6244.
- [56] Tang J, Zhu D F, Cui X Y, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of the retinoid X receptor in the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Miers, 1876) (Decapoda, Portunidae)[J]. Crustaceana, 2014, 87(3): 312-327.

## Effects of estrogen antagonist on ovarian development and expression of related genes to ovarian development of *Portunus trituberculatus*

LU Yang<sup>1</sup>, WU Xugan<sup>1\*</sup>, LIU Meimei<sup>1</sup>, GONG Jie<sup>2</sup>, CHENG Yongxu<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. School of Life Sciences, Nantong University, Nantong 226000, China;

3. Aquatic Animal Breeding Center of Shanghai University Knowledge Service Platform, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Estrogen plays an important role during the regulation of ovarian development in crustaceans, and tamoxifen (TAM) is a commonly used estrogen antagonist for the studying of molecular mechanism between estrogen and ovarian development of crustacean. This study was designed to investigate the effect of estrogen antagonist on survival rate, gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI), and expressions of the related genes to ovarian development of female *Portunus trituberculatus* by *in vivo* experiment, culture experiment and quantitative PCR (qPCR). The results showed that different concentrations of TAM had no significant effects on the survival rate and HSI among all treatments, but could suppress GSI. The results of qPCR showed that TAM had significant effects on the expression levels of *Vg* (vitellogenin), *ERR* (estrogen related receptor), *RXR* (retinoid X receptor) and *EcR* (ecdysone receptor) genes in different tissues of *P. trituberculatus*. The expression levels of *Vg* gene in ovary and hepatopancreas were obviously inhibited by TAM. For *ERR* gene, low concentration of TAM (6.7 and 13.4  $\mu\text{g/g}$ ) could promote the *ERR* transcription in the ovary and thoracic ganglion, while different from the results of low concentration, the significant decrease was found on the *ERR* mRNA levels in the most examined tissues from the high concentration of TAM treatment (20  $\mu\text{g/g}$ ) compared to the control treatment. The expression profiles of *EcR* affected by TAM were similar to *ERR* in ovary and hepatopancreas. In addition, the low concentration of TAM could promote the expression of *RXR* gene in ovary, but no significant differences were found on *RXR* expression levels in the hepatopancreas. In conclusion, these results suggested that TAM could inhibit the *Vg* expression levels, possibly resulting in the low GSI of female *P. trituberculatus*, and *ERR* and *EcR* might be involved in regulatory processes of estrogen or exogenous estrogen antagonist on ovarian development.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; ovarian development; estrogen antagonist; expression analysis

**Corresponding author:** WU Xugan. E-mail: xgwu@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41276158, 41606169); Shanghai Natural Science Foundation Project (12ZR1413000); Key Research and Extension Project from Shanghai Municipal Agriculture Commission Project (2016-1-18); Shanghai Universities Top Disciplines Project of Fisheries (2015-62-0908); Collaborative Innovation Project for Mariculture industry in East China Sea