

文章编号:1000-0615(2006)02-0145-06

## 17-甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响

李广丽<sup>1,2</sup>, 刘晓春<sup>1</sup>, 林浩然<sup>1</sup>

(1. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

(2. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

**摘要:**采用腹部埋植方式,用17-甲基睾酮(17-MT)以 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量处理2龄雌性赤点石斑鱼(每4周埋植1次,共埋植2次),检查埋植前后性腺结构、血清中性类固醇激素水平以及脑和性腺芳香化酶活性的变化。结果显示:一次埋植17-MT即可诱导赤点石斑鱼发生不同程度的性逆转,性腺成熟系数(GSI)明显下降,性腺中卵细胞退化,精原细胞增殖,出现大量精母细胞和精子细胞,性逆转雄鱼精巢的组织结构与正常雄鱼精巢相似,部分鱼转变为功能性雄鱼,经轻微的腹部挤压可排精,精子活力与正常雄鱼相似。赤点石斑鱼埋植17-MT后前脑、中脑的芳香化酶活性明显提高而后脑的芳香化酶活性降低,但性腺芳香化酶活性无显著变化。埋植17-MT后第4周血清中11-酮基睾酮(11-ketotestosterone, 11-KT)浓度显著升高,而睾酮(testosterone, T)和雌二醇(estradiol-17 $\beta$ , E<sub>2</sub>)浓度变化不显著。这些结果表明,脑部芳香化酶活性的显著升高与性逆转密切相关,17-MT主要通过提高血清中11-KT水平诱导赤点石斑鱼发生性逆转。

**关键词:**赤点石斑鱼; 17-甲基睾酮; 性逆转; 芳香化酶活性; 性类固醇激素

**中图分类号:**Q45;S917 **文献标识码:**A

## Effects of 17-methyltestosterone on sex reversal in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*

LI Guang-li<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-chun<sup>1</sup>, LIN Hao-ran<sup>1</sup>

(1. Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animal, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the effects of 17-methyltestosterone (17-MT) on gonadal development, serum steroids and aromatase activities in 2-year-old female red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) during reproductive season. Groupers were divided into two groups, one implanted with 17-MT ( $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  body weight) and the other elastomer without 17-MT into peritoneal cavity once every four weeks for 8 weeks. Blood samples were obtained from 6 fish of each group every 4 weeks for later analysis of sex steroids. After blood samples were collected, forebrain, midbrain, hindbrain, and gonads were collected and stored at  $-70^\circ\text{C}$  for later aromatase activity measurement and gonadal histological study. Significantly lower gonadosomatic index (GSI) was observed in 17-MT-treated group. Fish implanted with 17-MT once showed complete degradation of oocytes and sex inversion with developing testicular tissues at the 4th week, while all fish in the control group were still female with developing ovaries. 17-MT induced females to develop into functional males with authentic testes similar in structure to those in normal males, and no significant difference in sperm motility rate and concentration was observed between them. 17-MT elevated the aromatase activities both in forebrain and midbrain but reduced that in hindbrain, with no difference in gonad before and after 17-MT implantation. Serum 11-ketotestosterone (11-KT) levels increased significantly on the 4th week, while no differences of serum

收稿日期:2005-05-24

资助项目:国家海洋863项目(2001AA621010);广东省科技计划项目(A3050201);教育部科学技术研究重点项目(02105);国家自然科学基金项目(39970586)

作者简介:李广丽(1967-),女,吉林延边人,副教授,博士,主要从事鱼类生理学研究。E-mail: guangli211@yahoo.com.cn

通讯作者:林浩然, E-mail: LS32@zs. edu. cn

testosterone (T) and estradiol-17 ( $E_2$ ) levels were observed in control and 17-MT-treated group. Present results suggested that the elevation of brain aromatase activities was associated closely with sex reversion, and the increasing 11-KT levels may be important for sex inversion induced by 17-MT in red-spotted grouper.

**Key words:** *Epinephelus akaara*; 17-methyltestosterone; sex reversal; aromatase activity; sex steroids hormone

1969年,日本学者 Yamamoto 和 Kajishima 首次对鱼类的性别决定机制进行了系统的阐述,总结了鱼类的性腺类型、雌雄同体现象、性别决定的遗传学基础以及性类固醇激素对性分化的影响,提出类固醇激素是自然的“性诱导剂”,雌激素是“雌性诱导剂”,而雄激素是“雄性诱导剂”<sup>[1]</sup>。河鲈 (*Perca fluviatilis*)<sup>[2]</sup>、褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[3]</sup>和石斑鱼 (*Epinephelus*)<sup>[4-8]</sup>等鱼类经投喂或埋植外源雄激素数月后,都得到了具有成熟精液的功能性雄鱼。迄今为止,至少在 15 个科 47 种鱼类进行了激素诱导实验并取得了良好的诱导效果,在所使用的 31 种激素中,以 17-甲基睾酮(17-MT)诱导转雄效果最好<sup>[9]</sup>,且埋植激素比口服激素有效<sup>[7]</sup>。

赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 为我国名贵的海水养殖鱼类之一,为雌性先熟的雌雄同体鱼类,在自然条件下,雌性初次性成熟年龄个别为 2 龄,多数为 3 龄,一般在 6 龄由雌性转化为雄性。近年来,由于自然海区钓捕过度,生殖群体性别比例失调,个体较大的成熟雄鱼减少,给苗种人工繁育工作带来很大困难。虽然投喂雄激素已经成功诱导了赤点石斑鱼雄性化,但促进石斑鱼性别转化的机理目前尚未得到阐述。本研究采用 17-甲基睾酮(17-MT)处理 2 龄雌性赤点石斑鱼,研究芳香化酶活性、性类固醇激素浓度变化与性腺发育变化之间的关系,探讨赤点石斑鱼性别转化过程中生殖内分泌调控机理,为解决石斑鱼大批量苗种人工繁育问题提供理论依据。

## 1 材料方法

### 1.1 实验鱼

2 龄雌性赤点石斑鱼(体重 450~520 g,体长 28~33 cm)于 2003 年 4 月购自广东省大亚湾水产试验中心,驯养后在该中心实验基地进行试验,水温 23.1~28.2℃,实验鱼每日投喂 1 次冰鲜饵料。

### 1.2 实验设计和样品处理

将 17-甲基睾酮(Sigma 产品)以一定比例与医用合成橡胶基质(MDX4-4210, Dow Corning

Corporation)混合均匀,涂抹到自制模具上,50℃烘干备用。实验分为两组,每组 30 尾鱼。采用腹部埋植方式,处理组(MT组)每尾鱼埋植 10 mg·kg<sup>-1</sup>体重的 17-MT,对照组埋植等剂量的医用合成橡胶基质,4 周后重复埋植一次,实验持续 8 周(2003 年 4 月 18 日-6 月 18 日)。每 4 周随机抽取 6 尾鱼尾静脉采血,4℃静置 4~6 h 后,以 10 000 g·min<sup>-1</sup>离心 5 min,血清用于性类固醇激素的测定。取血后迅速取脑和性腺于液氮中急冻,保存于 -70℃用于芳香化酶活性测定。同时计算性腺成熟系数 GSI(性腺重量/体重×100)。

### 1.3 组织学分析

部分性腺(性腺中部)用 Bouin 氏液固定,石蜡包埋,切片厚度 6 μm,H.E 染色,光镜下观察性腺发育状况。

### 1.4 血清中性类固醇激素的测定

睾酮(T)和雌二醇( $E_2$ )放免分析试剂盒购自北京北方生物技术研究所,11-酮基睾酮(11-KT)酶联免疫分析试剂盒购自 Cayman 公司,实验按照试剂盒说明进行。

### 1.5 芳香化酶活性的测定

脑和性腺中芳香化酶活性以 <sup>3</sup>H 标记的雄烯二酮(I-<sup>3</sup>H-A)1-C 上的 <sup>3</sup>H 因芳香化作用,特异性失去 <sup>3</sup>H 而形成的 <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O 量来衡量。测定方法参照文献[10],稍加改进。取贮存于 -70℃的脑和性腺,用 pH 7.4 的磷酸钾缓冲液在冰浴中匀浆,匀浆液以 1000 g 在 4℃离心,上清液加 100 μL 辅因子溶液和 0.6 μmol·L<sup>-1</sup>的 <sup>3</sup>H-A(936.1 TBq·mmol<sup>-1</sup>,Perkin Elmer),反应液在 28℃反应 80 min,加入 10% 三氯乙酸(每毫升含 80 mg 活性碳)终止反应,重复两次以除去多余的未反应的 <sup>3</sup>H-A。所得上清液用液闪仪测定放射性强度,并用蛋白质分析试剂盒(Bio-Rad Corporation)测定蛋白质含量,芳香化酶活性表示为 <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O pmol·mg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>。

### 1.6 数据分析

用 SPSS 软件单因子方差分析(ANOVA)及 Duncan 氏检验对照组和处理组间是否有显著性

差异 ( $P < 0.05$ )。结果以平均值  $\pm$  标准误表示。

## 2 结果

### 2.1 17 -MT 对赤点石斑鱼性腺发育和性腺成熟系数 (GSI) 的影响

性腺组织学显示,10 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>剂量的 17 -MT 埋植 1 次即可有效诱导性逆转。17 -MT 有效促使卵巢退化,明显降低性腺成熟系数(图 1)。

性腺组织学观察显示,在埋植后第 4 周,对照组性腺为 ~ 期卵巢(图版-1),而 17 -MT 组随机取样的所有实验鱼均发生不同程度的性逆转,卵母细胞退化,精原细胞增殖(图版-2),并出现大量精母细胞和精子细胞(图版-3)。这些性逆转雄鱼的精巢在组织结构上和正常雄鱼精巢相似,部分鱼已发育形成功能性精巢,在输精管中积聚大

量的精子(图版-4),轻微挤压腹部可排精,且精子活力与正常雄鱼相似。

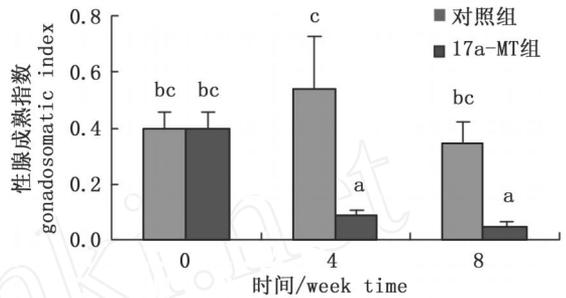
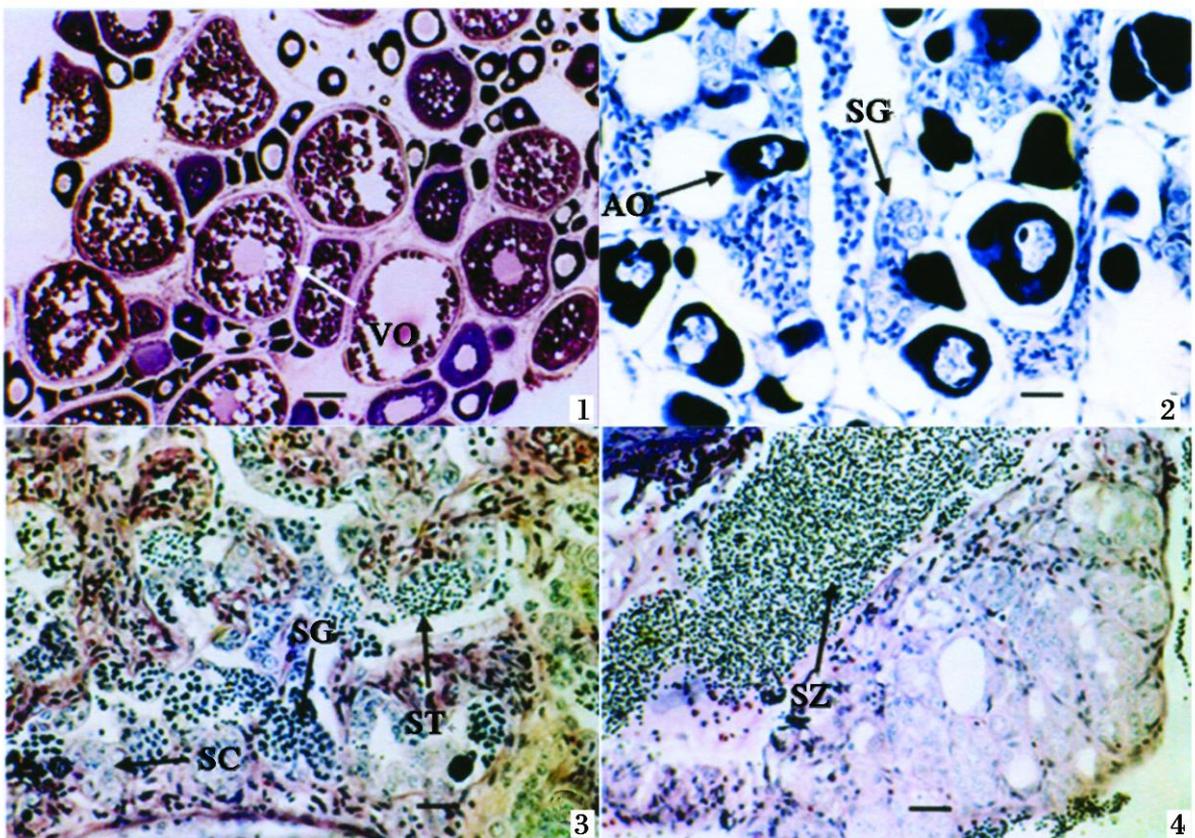


图 1 埋植 17 -MT 对性腺成熟系数的影响

Fig.1 Effects of 17 -MT on GSI in *E. akaara* 不同字母表示数据之间的差异显著 ( $P < 0.05$ )

Values with different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) within the data



图版 埋植 17 -MT 后 4 周赤点石斑鱼性腺组织结构的变化

#### Plate Gonadal histology during sex inversion of *E. akaara* 4 weeks after 17 -MT implantation

1. 对照组性腺切片示正常发育的卵巢组织,标尺为 250  $\mu$ m; 2. 埋植 MT 后性腺示精原细胞和退化的卵母细胞,标尺为 50  $\mu$ m; 3. 埋植 MT 后性腺示精母细胞和精子细胞,标尺为 50  $\mu$ m; 4. 性逆转完成发育成熟的精子,标尺为 50  $\mu$ m; AO. 退化的卵母细胞;VO. 卵黄生成卵母细胞;SG. 精原细胞;SC. 精母细胞;ST. 精子细胞;SZ. 精子

1. gonadal tissue of vehicle control , scale bar = 250  $\mu$ m; 2. gonadal tissue of MT-implanted fish , showing spermatogonia and degeneration of oocytes , scale bar = 50  $\mu$ m; 3. gonadal tissue of MT-implanted fish , showing spermatocyte and spermatid , scale bar = 50  $\mu$ m; 4. MT-implanted fish , with testis filled with seminiferous tubles containing mature , viable spermatozoa , scale bar = 50  $\mu$ m; AO. atretic oocyte; VO. vitellogenic oocyte; SG. spermatogonia; SC. spermatocyte; ST. spermatid; SZ. spermatozoa

2.2 17-MT对血清中性类固醇激素的影响

第1次埋植17-MT后(第4周)血清中睾酮(T)浓度有所升高,第2次埋植后(第8周)T浓度略降低,但与对照组相比差异不显著;血清中11-酮基睾酮(11-KT)在埋植17-MT后第4周急剧上升,浓度达245.457 pg·mL<sup>-1</sup>,几乎为对照组的2倍,但第8周11-KT水平与对照组相似;埋植17-MT后血清中雌二醇(E<sub>2</sub>)浓度与对照组相比无显著差异(图2)。

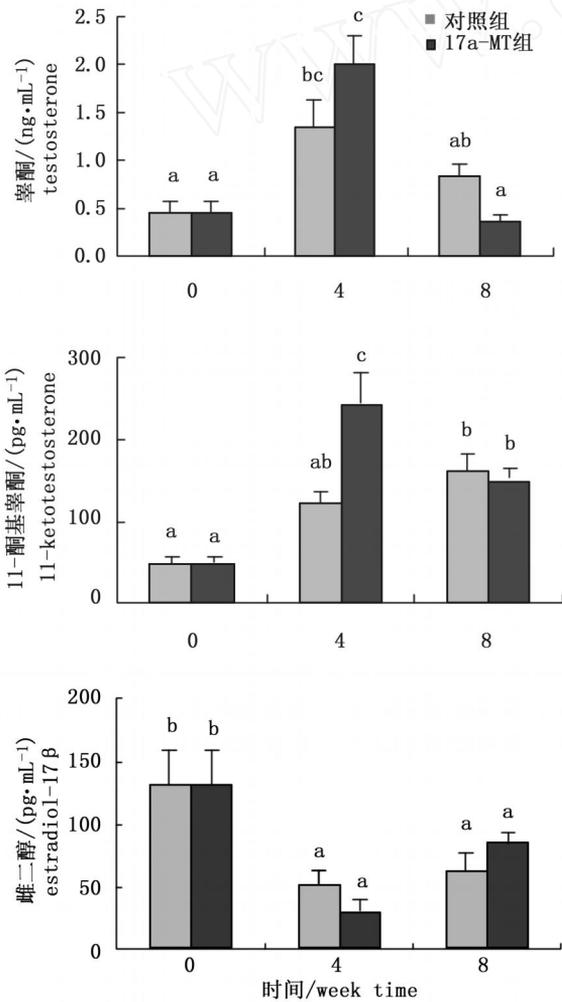


图2 埋植17-MT对血清中性类固醇激素的影响

Fig. 2 Effects of 17-MT on sex steroids in *E. akaara*

2.3 17-MT对芳香化酶活性的影响

埋植17-MT后前脑芳香化酶活性明显高于对照组;第1次埋植17-MT后中脑芳香化酶活性显著升高,但第2次埋植后活性增加不显著;而后脑芳香化酶活性在埋植17-MT后显著降低(P < 0.05)(图3);性腺中芳香化酶活性在第1次埋植后略降低而第2次埋植后略升高,但与对照组相比无显著性差异(图4)。

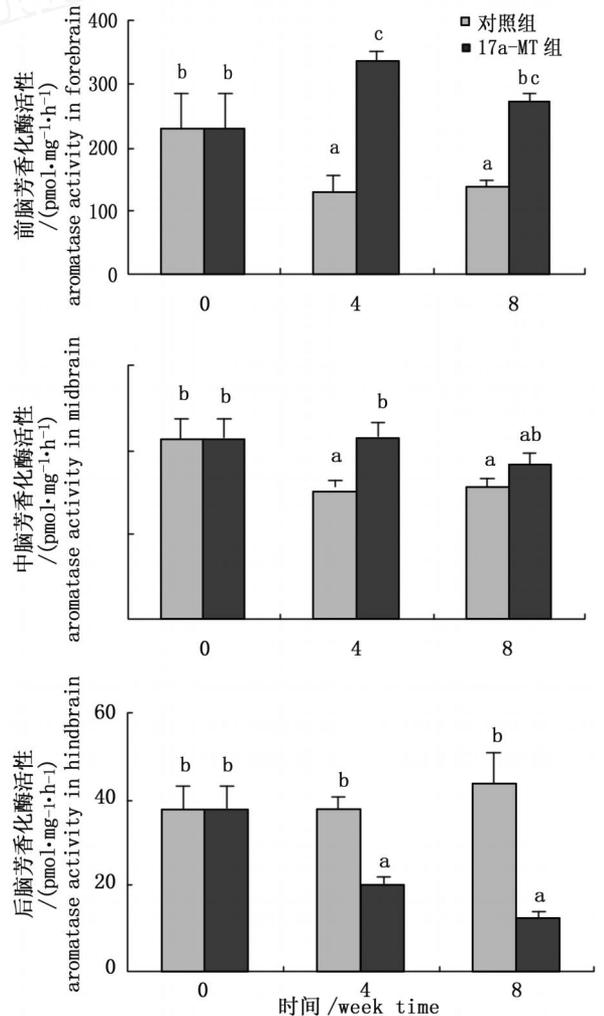


图3 埋植17-MT对脑芳香化酶活性的影响

Fig. 3 Effects of 17-MT on aromatase activity in brain in *E. akaara*

3 讨论

在诱导鲑点石斑鱼<sup>[4]</sup>、黄腹石斑鱼<sup>[5]</sup>、白纹石斑鱼<sup>[6]</sup>、七带石斑鱼<sup>[7]</sup>和蜂巢石斑鱼<sup>[8]</sup>转雄实验

中,17-MT已被证明是一种有效的诱导剂,在自然性逆转发生之前任何年龄阶段处理都可诱导转雄<sup>[8]</sup>。本实验显示,赤点石斑鱼经17-MT处理后,性腺成熟系数明显降低,与卵母细胞退化、精

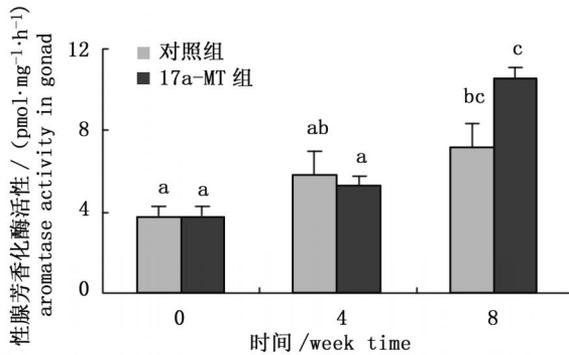


图4 埋植17-MT对性腺芳香化酶活性的影响

Fig. 4 Effects of 17-MT on aromatase activity in gonad in *E. akaara*

巢组织增殖的性腺组织学结构相一致。性逆转初期,精原细胞大量增殖;至性逆转中期,精原细胞和退化的时相卵母细胞共同存在,但精巢组织在性腺中占主导地位;随着性逆转发展进程,精原细胞和精母细胞成为性腺中的优势细胞,并最终产生精液,表明 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 埋植剂量的17-MT可以有效诱导赤点石斑鱼性逆转。相似的性腺形态学变化在鲑点石斑鱼<sup>[6]</sup>和自然性逆转的赤点石斑鱼<sup>[11]</sup>都有报道。

本实验中,赤点石斑鱼第一次埋植17-MT后血清中11-KT浓度明显增加而T略增加。已知11-KT是硬骨鱼类自然发生的雄性激素,它可以由睾酮转化而来,并直接与雌雄同体鱼类精子生成开始有关<sup>[12]</sup>;由于睾酮在雌性阶段主要产生5-还原型雄激素(5-DHT和5 $\alpha$ -3 $\beta$ -17-diol),而在雄性阶段主要产生11-氧化型雄激素(11-KT和11-T)<sup>[13]</sup>,这种代谢途径的改变导致了赤点石斑鱼11-KT的显著升高。但第二次埋植后11-K水平与对照组相似而T水平反而略降低,暗示以 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的17-MT诱导赤点石斑鱼性逆转时只需埋植一次,二次埋植不一定产生更好的效果。实验证实,鲑点石斑鱼经高剂量或长时间的17-MT处理后诱导产生的转雄鱼精液没有授精能力<sup>[4]</sup>。

芳香化酶是控制雄激素向雌激素转化的关键酶和限速酶,它的活性高低直接影响雌二醇的产生量。研究表明,经由芳香化酶催化雄激素转化而来的雌激素不仅作用于生殖系统和生殖行为,也影响脑的发育及功能,在脑组织中通过芳香化酶将雄激素转化为雌激素是睾酮调节许多生理行

为(包括雄性性行为的激活、脑的性别差异以及垂体激素对促性腺激素分泌的负反馈调节)的关键机制<sup>[14]</sup>。罗非鱼在性别分化的特定时间里用17-MT处理后,发现脑芳香化酶活性的显著性升高,且脑芳香化酶活性升高最大的一组罗非鱼雄性率最高<sup>[15]</sup>。本实验中,埋植17-MT后,前脑和中脑的芳香化酶活性均明显升高,与上述结果相符。可以认为,脑部芳香化酶活性的提高与性逆转密切相关。17-MT可能通过提高脑部芳香化酶活性,将脑部雄激素转化为雌激素(主要是雌二醇),从而完成脑的性分化、激活雄性性行为等多种雄性化效应。

第一次埋植17-MT后性腺芳香化酶活性降低,而第二次埋植后活性反而略升高,与血清中雌二醇水平变化趋势相似。这种情况暗示了部分17-MT芳香化为雌激素,与第二次埋植后T较对照组降低而11-KT没有持续升高的结果相吻合。由于17-MT可芳香化,埋植后MT组血清中雌二醇浓度与对照组相似,因此作者推测赤点石斑鱼的性逆转不太稳定,在处理后期可能有性别回复趋势,是否如此尚有待实验证实,但白纹石斑鱼<sup>[6]</sup>和七带石斑鱼<sup>[7]</sup>埋植17-MT一年后性逆转的雄鱼又回复为雌鱼的例子可支持上述推测。

17-MT诱导鱼类性逆转的机制有两种观点, Lee等<sup>[13]</sup>认为,17-MT诱导性逆转是通过(1)直接作用于性腺或/和(2)对下丘脑-垂体轴产生正反馈,使GTH升高,从而促进原始生殖细胞分化和增殖诱导性腺发生变化。但Kitano等<sup>[3]</sup>认为,17-MT诱导褐牙鲈转雄的机制同芳香化酶抑制剂一样,是通过降低性腺中芳香化酶mRNA表达导致雌二醇(E<sub>2</sub>)总量降低而引起的。本实验中,埋植17-MT后性腺中芳香化酶活性和血清中E<sub>2</sub>浓度变化不显著,但性腺中芳香化酶mRNA表达却显著降低(另文发表),暗示性逆转的根本原因在于性腺本身产生的E<sub>2</sub>总量降低导致性腺中卵母细胞退化。但不排除17-MT直接或间接作用于性腺诱导其发生性逆转的可能性,因为在锦鱼(*T. duperrey*)性腺和中枢神经系统中可检测到标记的睾酮(T)<sup>[16]</sup>。

综上所述,脑部芳香化酶活性的显著升高与性逆转密切相关,17-MT主要通过提高血清中11-KT水平诱导赤点石斑鱼发生性逆转。

感谢大亚湾水产试验中心张海发、刘付永忠、黄培卫以及渔排上的工作人员在实验的具体实施和操作方面给予的极大帮助！感谢本实验室唐啸尘、卓琦、杨金普、朱培等同学的帮助和支持！

#### 参考文献：

- [1] Yamamoto T, Kajishima T. Sex differentiation [A]. In: Hoar W S, Randall D J and Donaldson E M (Eds.), Fish physiology [M]. Academic Press, 1969. 117 - 175.
- [2] Rougeot C, Jacob B S, Kestemont P, et al. Sex control and sex determinism study in *Eurasian perch*, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reverses male breeders [J]. Aquaculture, 2002, 211:81 - 89.
- [3] Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, et al. Aromatase inhibitor and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mol Reprod Dev, 2000, 56:1 - 5.
- [4] Kuo G M, Ting Y Y, Yeh S L. Induced sex reversal and spawning of blue spotted grouper, *Epinephelus fario* [J]. Aquaculture, 1988, 74:113 - 126.
- [5] Glamuzina B, Glavič N, Skaramuca B, et al. Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe) [J]. Aquaculture Res, 1998, 29:563 - 567.
- [6] Hassin S, Monbrison D, Hanin Y, et al. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aneus*. 1. Growth and reproduction [J]. Aquaculture, 1997. 156:305 - 316.
- [7] Tanaka H, Tsuchihashi Y, Kuromiya Y. Induction of sex reversal in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* [A]. In: Proceeding of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish [C]. Bergen, Norway, 1999. 423.
- [8] Kobayashi Y, Lee Y D, Takemura A, et al. Histological observation of sex change in honey comb grouper, *Epinephelus merra* [A]. In: Proceeding of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish [C]. Bergen, Norway, 1999, 269 - 267.
- [9] Pandian T J, Sheela S G. Hormonal induction of sex reversal in fish [J]. Aquaculture, 1995, 138:1 - 22.
- [10] Chang C F, Lin B Y. Estradiol-17 $\alpha$  stimulates aromatase activity and reversible sex change in protandrous Black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* [J]. J Exp Zool, 1998, 280:165 - 173.
- [11] Chan S T H, Yeung W S B. Sex control and sex reversal in fish under natural conditions [A]. In: Hoar W S, Randall D J and Donaldson E M (Eds.), Fish Physiol. Vol. 10, Part B [M]. Academic Press, New York, NY, 1983. 171 - 222.
- [12] Miura T, Miura C. Japanese eel: a model for analysis of spermatogenesis [J]. Zool Sci, 2001, 18:217 - 219.
- [13] Lee S T L, Kime D E, Chao T M, et al. *In vitro* metabolism of testosterone by gonads of grouper (*Epinephelus tauvina*) before and after sex inversion with 17 $\alpha$ -methyltestosterone [J]. Gen Comp Endocrinol, 1995, 99:41 - 49.
- [14] 张吉强, 蔡文琴. 脑内芳香化酶表达的定位、调控及意义 [J]. 生理科学进展, 2001, 32(2): 107 - 110.
- [15] Tsai C L, Wang L H, Chang C F, et al. Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. J Neuroendocrinol, 2000, 12(9): 894 - 898.
- [16] Kincl F A, Kramer C R, Koulish S. Sex reversal in wrasses 1. Uptake of testosterone by the gonads and central nervous system and its aromatization in the CNS of *Thalassoma duperrey* (Teleostei: Labridae) [J]. Endocrinol Exp, 1987, 21:115 - 123.

## 《水产学报(光盘版)》、《上海水产大学学报(光盘版)》再版发行

《水产学报(光盘版)》、《上海水产大学学报(光盘版)》将于2006年4月再版发行,新版本的两刊光盘涵盖了从创刊到2005年底的所有文章的全文。欢迎从事水产科研、教学等相关领域的读者订阅,每刊光盘订价为50元(含邮费)。需要者可直接汇款到编辑部,联系地址:上海市军工路334号,上海水产大学48信箱,联系人:伍稷芳,邮编:200090,电话:021-65710232,同时请注明订阅光盘的名称。另外,本刊对已经购买过两刊旧版光盘的读者只收取少量升级服务费和邮寄费(20元),请读者主动与编辑部联系。