

## 17 $\alpha$ -甲基睾丸酮和来曲唑对尼罗罗非鱼 类固醇激素合成酶基因表达的影响

朱华平, 莫媛媛, 卢迈新\*, 高风英, 叶星, 黄樟翰, 可小丽  
(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

**摘要:** 用质量浓度为 10 mg/kg 的 17 $\alpha$ -甲基睾丸酮(MT)、芳香化酶抑制剂来曲唑(LE)分别对尼罗罗非鱼进行腹腔注射,在注射后 12、24、48 h 和 7、14、21 d 检测 *P450arom*、*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450scc* 基因表达量。结果表明,3 个基因表达量均先下调,而后回升。注射 MT 后,最先受到抑制的是 *P450scc* 基因,其次是 *P450arom* 和 *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 基因。*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 基因的表达量在注射后 7、14、21 d 时均与对照组存在显著差异( $P < 0.05$ ),其中 14 d 时的表达量降至最低;*P450scc* 基因的表达量在注射后 12、24、48 h 与对照组存在显著差异( $P < 0.05$ ),其中 24 h 时表达量降至最低;*P450arom* 基因至 48 h 时表达量降至最低,与对照组存在显著差异( $P < 0.05$ )。注射 LE 后,*P450arom* 和 *P450scc* 基因的表达较 *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 基因先受到抑制。*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 基因的表达量在注射后 48 h、7 d、14 d 时均与对照组存在显著差异( $P < 0.05$ ),其中 7 d 时降至最低;*P450scc* 基因和 *P450arom* 基因的表达量均在注射后 48 h 时表达量降至最低,且与对照组存在显著差异( $P < 0.05$ )。实验结果表明,MT 可能是通过调节 *P450scc* 基因水平来降低 *P450arom* 的表达量,而 LE 则通过直接调节 *P450arom* 基因的表达进而影响罗非鱼类的性别形成。

**关键词:** 尼罗罗非鱼;类固醇激素合成酶;17 $\alpha$ -甲基睾丸酮;来曲唑

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标志码:** A

鱼类的性腺在发育过程中存在雌激素或雄激素受体<sup>[1-6]</sup>,这为外源性类固醇激素诱导性腺分化的作用机理提供了依据。用外源性雌激素或雄激素处理能有效地诱导鱼类雌性化或雄性化<sup>[7-9]</sup>,在研究中可以根据需要用雌激素或雄激素处理产生全雄或全雌群体,可见类固醇激素在鱼类性腺分化中有重要作用。但性类固醇激素调控鱼类性别分化的分子作用机制目前还不清楚。在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中已经发现雌激素合成相关关键酶的转录在遗传型雌鱼(XX型)孵化后的 5~7 d(day after hatch, dah)的性腺中就有表达,显示雌激素的合成可能在性别分化期就已经存在。但在雄性却需到孵化后 30 d 才有微弱的表达<sup>[10]</sup>。同时,雌激素对遗传雌性(XX $\text{\textcircled{f}}$ )尼罗罗非鱼发育为表型与遗传型一致的雌性

个体起到关键作用<sup>[11]</sup>。

近年来,随着分子生物学和分子遗传学技术的不断发展和完善,罗非鱼性别决定及分化的研究开始尝试从分子机理上阐明影响性别决定的基因位点、位点之间的相互关系和相互作用,以及外界因素如何通过调控性别决定位点来影响其性别分化等。17 $\alpha$ -甲基睾丸酮(17 $\alpha$ -methyltestosterone, MT)与芳香化酶抑制剂均可诱导遗传雌性尼罗罗非鱼雄性化<sup>[12]</sup>。本研究拟通过 MT 与芳香化酶抑制剂来曲唑(letrozole, LE)处理遗传雌性(XX型)尼罗罗非鱼,通过分析性类固醇激素合成关键酶 *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* (*11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2*), *11 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶型 2*)、*P450arom* (*P450aromatase*, 性腺芳香化酶细胞色素 P450)和 *P450scc* (*cytochrome P450 cholesterol-side-chain-*

收稿日期:2011-04-29

修回日期:2011-06-28

资助项目:现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-49);广东省农业重点项目(2009B020201003);广东省海洋渔业科技推广专项(A201001C05);广东省自然科学基金项目(9451038001003595)

通讯作者:卢迈新, Tel:020-81617843, E-mail: mx-lu@163.com

cleavage, 细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶) 基因表达的变化, 探讨 17 $\alpha$ -甲基睾酮和来曲唑对遗传雌性 (XX 型) 的尼罗罗非鱼性类固醇激素合成酶的影响, 深入了解外源性激素和芳香化酶抑制剂的作用及其与鱼类性类固醇激素合成调控的关系, 尝试从分子水平上阐明影响性别决定的基因位点及影响鱼类性别分化的分子机理, 为人工控制鱼类性别、培育单性鱼等提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**实验鱼** 实验所用的遗传雌性 (XX ♀) 尼罗罗非鱼由中国水产科学研究院珠江水产研究所高要水产种质工程中心提供, 体质量为 (43.71  $\pm$  0.32) g, 体长为 (13.69  $\pm$  0.24) cm, 共 400 尾。

**主要试剂及实验仪器** 总 RNA 快速提取试剂盒购自 Bioteke Corporation 公司; Taq 酶、PrimeScript™ 反转录试剂盒、pMD19-T 载体购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司; Plasmid Mini Kit、DNase、胶回收试剂盒购自 Omega 公司; SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购自 ABI 公司; MT、LE 购自武汉华美华科技 (集团) 有限公司; DNA Ladder 购自广州东盛生物科技有限公司; 所有引物均由上海生工生物工程公司合成。荧光定量 PCR 反应在 ABI-7300 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems 公司) 上进行。

### 1.2 实验方法

**实验鱼的 MT 和 Letrozole 处理** 实验鱼分为 3 组, 即 MT 处理组、LE 处理组和对照组, 每组设置 3 个重复, 每个重复 30 尾鱼, 暂养于水泥池中 3 周, 每天投喂 2 次, 水温 (28  $\pm$  0.5)  $^{\circ}\text{C}$ 。

MT、LE 经无水乙醇溶解后用植物油稀释 (V/V = 1:10)。腹腔注射 MT、LE 的量均为 10 mg/kg。对照组注射无水乙醇: 植物油 (1:10) 混合液。注射 12、24、48 h 和 7、14、21 d 后取实验鱼的卵巢组织 (每次取 3 尾雌鱼), 置于液氮中保存备用。

**卵巢组织总 RNA 的提取及反转录** 剪取尼罗罗非鱼卵巢组织约 30 mg, 加 1 mL 的裂解液 RL 后, 冰上匀浆提取总 RNA。具体抽提步骤按 Bioteke 公司的高纯总 RNA 快速提取试剂盒手册进行。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 使用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, 于 -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA

Synthesis Kit 试剂盒将得到的总 RNA 反转录合成 cDNA, 产物保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  备用。

**荧光定量 RT-PCR 引物的设计与合成** 参照 GenBank 中尼罗罗非鱼 11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub> 基因 (序列号: AY190043)、P450 $arom$  基因 (序列号: U72071)、P450 $scc$  基因 (序列号: S57305) 的序列, 分别设计各基因的特异性引物, 预期扩增片段大小 80 ~ 250 bp, 引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物  
Tab. 1 Primers used for real-time quantitative PCR

引物 primers	引物序列 primer sequence
P450 $scc$ -F	5'-AAGTCTGGGCTTCGGCTTTG-3'
P450 $scc$ -R	5'-TCGAGAATGTGGATAAGAAAGAGTTG-3'
11 $\beta$ -HSD <sub>2</sub> -F	5'-GAGAACGCACCTGCTGAATAC-3'
11 $\beta$ -HSD <sub>2</sub> -R	5'-ATGACTTTGAAGCGATGAACC-3'
P450 $arom$ -F	5'-AGGAGATAGACGCTGTTGTGGGT-3'
P450 $arom$ -R	5'-TGTGTTTTCAGAATGATGTTTGTGC-3'
$\beta$ -actin-F	5'-CAGCAAGCAGGAGTACGATGAG-3'
$\beta$ -actin-R	5'-TGTGTGGTGTGTGGTTGTTT-3'

**阳性标准品的制备及标准曲线的建立** 以上述转录的 cDNA 为模板, 用特异引物对 P450 $scc$ -F/R、11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>-F/R、P450  $arom$ -F/R 和  $\beta$ -actin-F/R 分别扩增 P450 $scc$ 、11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>、P450 $arom$  和  $\beta$ -actin 基因。扩增产物用胶回收试剂盒回收纯化后, 分别克隆至 T 载体并转化到 DH5 $\alpha$  中, 筛选阳性克隆, 按质粒小量提取试剂盒 (TIANGEN) 说明书分别提取重组质粒并测序。测定阳性重组质粒的 OD 值, 计算其浓度。

将含有 P450 $scc$ 、11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>、P450 $arom$  和  $\beta$ -actin 基因的标准品重组质粒分别进行 10 倍系列稀释, 共设 5 个浓度梯度。以系列稀释的质粒为模板在实时荧光定量 PCR 仪 (ABI-7300) 上扩增, 每个浓度做 3 个重复, 无质粒的水作阴性对照。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 含 Power SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) 各 0.4  $\mu\text{L}$ , 重组质粒 DNA 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 50  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 然后 40 个循环: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 循环结束后获取溶解曲线分析 (65 ~ 95  $^{\circ}\text{C}$  范围内, 每 0.2 摄氏度读板 1 次), 以确认特异性扩增。按上述标准曲线的扩增结果, 斜率用 slope (S) 表示, 扩增效率 (E) 用公式  $E = 10^{1/S} - 1$  计算<sup>[13]</sup>。

**实时荧光定量 PCR** 使用 ABI 7300 荧光

定量 PCR 仪和 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒对尼罗罗非鱼 *P450scc*、*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450arom* 基因进行定量 PCR 扩增。反应体系及程序同上。每个样品重复 3 次,每次都定量测出相对应的域值( $C_t$ )。

**数据分析** 目的基因表达量的统计数值用算术平均值  $\pm$  标准误(mean  $\pm$  SE)表示,数据分析采用 SPSS 13.0 统计分析软件 Duncan 氏法进行多重比较,当  $P < 0.05$  时认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线的绘制

根据紫外分光光度计测定的重组标准品质粒 A 值,对各质粒 10 倍系列稀释,选取 5 个稀释度进

行荧光实时定量 PCR 扩增反应,以初始模板数的对数为横坐标,以  $C_t$  均值为纵坐标,绘制实时定量标准曲线(图 1)。各基因标准曲线的相关系数( $R^2$ )均大于 0.99,说明在稀释度范围内各基因的扩增均有很好的线性关系,具有较高的可信度。内参基因  $\beta$ -actin、*P450scc*、*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 和 *P450arom* 基因的扩增效率分别为 99.82%、102.27%、103.97%、94.20%。一般认为 PCR 扩增效率在 90% ~ 110% 即可以用于数据分析<sup>[13]</sup>。因此可认为本次扩增效率良好,标准曲线是可靠的。熔解曲线分析结果显示,各基因扩增产物均为单峰,且峰值单一,表明无引物二聚体及非特异性产物产生,扩增产物特异性高。

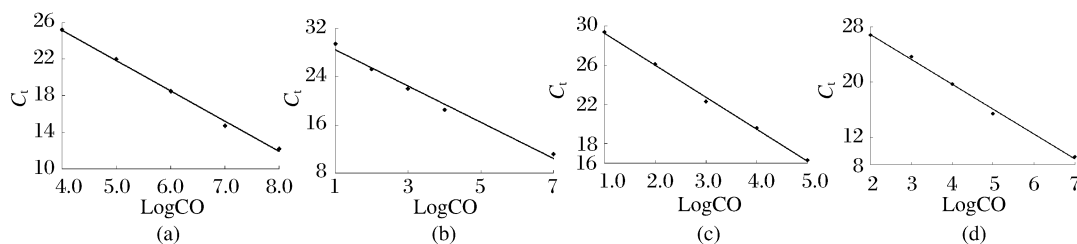


图 1  $\beta$ -actin (a), *P450scc* (b), *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* (c) 和 *P450arom* (d) 基因的标准曲线

Fig. 1 The standard curves of the standard samples of event-specific sequence  $\beta$ -actin (a), *P450scc* (b), *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* (c), and *P450arom* (d) gene

### 2.2 MT 对 *P450arom*、*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450scc* 基因表达的影响

注射 MT 后, *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 基因的表达量降低。注射后 7、14、21 d, *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 基因的表达量均与对照组存在显著差异( $P < 0.05$ ), 14 d 时表达量降为最低,为处理前的 0.05 倍。注射后 21 d 时,表达量回升(图 2)。

*P450scc* 基因的表达量在注射 MT 后 12、24、48 h 与对照组存在显著差异( $P < 0.05$ ), 24 h 时表达量降为最低,是处理前的 0.05 倍,之后表达量逐渐升高,至 14 d 时表达量达到处理前水平。

注射 MT 后, *P450arom* 基因在基因表达量逐渐降低,至 48 h 时表达量降为最低,与对照组存在显著差异( $P < 0.05$ ), 且是处理前水平的 0.1 倍。之后表达量逐渐增加,至 14 d 时表达量已显著高于处理前的水平。

总体来说, MT 激素对 *P450arom*、*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、

*P450scc* 3 个基因的表达均有抑制作用(图 2, 表 2)。

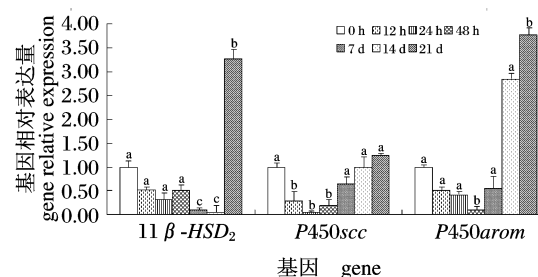


图 2 MT 处理对尼罗罗非鱼 *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450scc*、*P450arom* mRNA 表达量的影响

基因相对表达量 = 实验组基因表达量 - 对照组基因表达量; 柱形图上不同字母表示差异性显著( $P < 0.05$ )。下同。

Fig. 2 The effects of MT *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*, *P450scc*, and *P450arom* mRNA expression level of *O. niloticus*

Gene relative expression = gene expression of treated groups - control groups; Different letter on the histogram means significant differences ( $P < 0.05$ ). The same as the following.

表 2 处理组和对照组中各基因的  $\Delta C_t$  值(目的基因  $C_t$ /内参基因  $C_t$ )

Tab. 2 $\Delta C_t$ values (target gene $C_t$ /control gene $C_t$ ) of target genes in treated and control groups		mean $\pm$ SE						
组别 group	基因 gene	0 h	12 h	24 h	48 h	7 d	14 d	21 d
MT 处理组 MT-treated group	<i>11<math>\beta</math>-HSD<sub>2</sub></i>	9.17 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	8.66 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	12.55 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	11.79 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	11.28 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>	11.77 $\pm$ 0.51 <sup>c</sup>	7.43 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
	<i>P450scc</i>	5.22 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	7.07 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	9.78 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	5.24 $\pm$ 0.82 <sup>b</sup>	5.13 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	6.19 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	6.44 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>
	<i>P450arom</i>	6.04 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	8.32 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	4.41 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	5.67 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>	8.92 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	7.03 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	5.35 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>
LE 处理组 LE-treated group	<i>11<math>\beta</math>-HSD<sub>2</sub></i>	8.84 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	9.35 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	11.81 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>	12.27 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	13.64 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	10.02 $\pm$ 0.59 <sup>b</sup>	7.64 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
	<i>P450scc</i>	5.41 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	5.59 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	6.47 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	6.71 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	5.01 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	6.77 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	5.35 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>
	<i>P450arom</i>	6.22 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	7.04 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	4.06 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	4.44 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	8.72 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	7.91 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	5.39 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>
对照组 control group	<i>11<math>\beta</math>-HSD<sub>2</sub></i>	8.96 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	7.65 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	11.11 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	10.66 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	8.11 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	7.54 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	8.93 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>
	<i>P450scc</i>	4.95 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	5.46 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	5.70 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	2.98 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	4.34 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	6.23 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	6.88 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>
	<i>P450arom</i>	5.84 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	7.20 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	3.29 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	2.71 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	7.90 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	7.63 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>	7.35 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>

注:同列相同基因之间肩标相同表示差异性不显著,不同表示差异性显著( $P < 0.05$ )。

Notes: Different superscripts denote significant differences ( $P < 0.05$ ), same superscripts do not denote significant differences among the same gene in the same line.

### 2.3 LE 对 *P450arom*、*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450scc* 基因表达的影响

注射 LE 后, *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 基因的表达量在注射后 48 h、7 d、14 d 时均与对照组存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 在 7 d 时, *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>* 基因的表达量降为最低, 是处理前的 0.02 倍, 之后逐渐回升。

*P450scc* 基因的表达量在注射 LE 12 h、24 h 后逐渐降低, 在 48 h 时降为最低, 与对照组存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 且为处理前的 0.18 倍, 之后表达量升高。

*P450arom* 基因的表达量在注射 LE 24 h 时后逐渐降低, 并在 48 h 时降为最低, 与对照组存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 是处理前的 0.29 倍, 之后逐渐升高。

总体来说, LE 对 *P450arom*、*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450scc* 3 种基因的表达均有抑制作用, *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450scc* 基因在 14 d 之后、*P450arom* 则在 14 d 时恢复至处理前的水平(表 2, 图 3)。

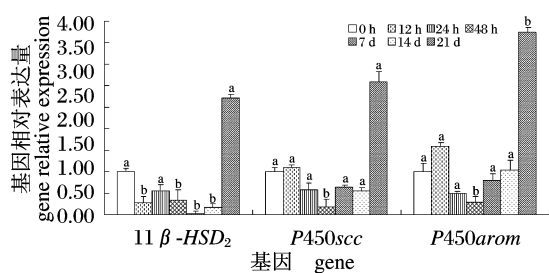


图 3 LE 处理对尼罗罗非鱼 *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450scc* 和 *P450arom* mRNA 表达量的影响

Fig. 3 The effects of LE on *11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*, *P450scc* and *P450arom* mRNA expression level of *O. niloticus*

### 3 讨论

已有研究证明, 注射、埋植、浸泡或投喂外源性激素均可有效地诱导雌雄异体和雌雄同体鱼类发生性别转化, 而性别转化过程中常伴随着雌性激素或雄性激素明显地升高或降低<sup>[14-16]</sup>, 表明类固醇激素在性别分化和性别转化过程中起重要作用。在类固醇激素的合成过程中, 涉及到大量的酶和许多潜在的生化途径, 其中 *P450arom*、*11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>*、*P450scc* 是类固醇激素合成过程中 3 种重要的酶<sup>[17]</sup>。

#### 3.1 类固醇激素合成酶在罗非鱼性别分化中的作用

胆固醇向孕烯醇酮转化是类固醇激素生物合成的必经途径和限速步骤, 这种转化由细胞色素 *P450scc* 所催化。因此 *P450scc* 对于类固醇激素的合成起了基础决定作用<sup>[18]</sup>。*P450scc* 由一单基因 *CYP11A1* 编码, 在孵化 5~7 d 后的雌雄尼罗罗非鱼个体中均检测到微弱的表达, 雌鱼孵化 10~15 d 后表达量升高, 35~70 d 时降低; 雄鱼孵化后 5~25 d 时表达量较低, 35~70 d 时表达量显著升高<sup>[19]</sup>。*P450arom* 在催化孕烯醇酮向雌二醇转化过程中发挥重要作用, 是性类固醇生成途径中的末端酶和限速酶<sup>[20]</sup>。它是相关基因 *cyp19* 的一个产物, 鱼类中鉴定出 2 种隶属于不同亚族的芳香化酶基因, 即卵巢芳香化酶基因 (*cyp19a*) 和脑芳香化酶基因 (*cyp19b*)<sup>[21]</sup>。尼罗罗非鱼的脑型芳香化酶的表达可以在脑、心、鳃和精巢等多种组织检测到<sup>[22]</sup>。在罗非鱼的性分化期, 芳香化

酶在所有 XX 性腺呈高水平表达,而在 XY 性腺表达却很低<sup>[10]</sup>。11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>具有单一氧化酶的活性,是糖皮质激素(GC)代谢酶,它调节GC在局部组织器官中的水平。11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>基因在尼罗罗非鱼的脑、肝和卵巢等组织中均有表达,精巢中表达量最高而卵巢较低,性别二态性表达模式暗示11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>具有将11 $\beta$ -羟睾酮(11 $\beta$ -hydroxytestosterone)转化为雄性激素11-酮基睾酮(11-KT)的功能<sup>[23]</sup>。

### 3.2 外源性激素和芳香化酶抑制剂对鱼类类固醇激素合成酶基因表达的影响

实验结果表明,MT和LE对P450 $arom$ 、11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>、P450 $scc$ 的表达均有短期的抑制作用,且均呈现初始表达量下降,而后回升的趋势。注射MT后,P450 $scc$ 基因的表达最先受到抑制,P450 $arom$ 和11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>次之;而注射LE后,P450 $arom$ 和P450 $scc$ 较先受到抑制,而11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>次之。这表明MT可能是通过调节P450 $scc$ 基因的表达进而调节降低了P450 $arom$ 的表达量,而LE为直接调节P450 $arom$ 基因进而对鱼类的性别造成影响。

外源性激素对鱼类类固醇激素合成酶基因表达的影响 外源性激素对鱼类的类固醇酶基因表达的影响在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中研究较多。用20 mg/kg的17 $\alpha$ -乙炔雌二醇(E<sub>2</sub>)或10 mg/kg的11 $\beta$ -羟雄烯二酮(11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione,11 $\beta$ OH $\Delta$ 4)处理雄性虹鳟鱼苗,8 d后检测到3 $\beta$ -HSD、P450 $scc$ 、P450 $c17$ 和P450 $c11$  mRNA水平的快速显著下降,表明雄激素和雌激素均能降低精巢类固醇酶的合成<sup>[24]</sup>。GOVOROUN等<sup>[25]</sup>用1 mg/kg的11 $\beta$ -羟雄烯二酮(11 $\beta$ OH $\Delta$ 4)处理遗传上全雌的虹鳟鱼苗,结果显示只有P450 $c17$ 的表达量维持不变,P450 $scc$ 的表达量升高,而3 $\beta$ -HSD(3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase,3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶)和P450 $arom$ 的表达量降低,提示类固醇的合成在雌雄鱼早期性腺分化中起主要作用,雄性激素可能是通过下调P450 $arom$ 的表达量而起到雄性化作用。用雌二醇(E<sub>2</sub>)埋植处理雌虹鳟[(169.8 $\pm$ 6.2)g]7 d后,达到或接近性成熟虹鳟的卵巢中P450 $scc$ 的mRNA水平没有受到影响,而P450 $arom$ 和3 $\beta$ -HSD的mRNA水平显著降低,表明雌二醇直接或间接对虹鳟卵巢中主要的类固醇酶基因表达起到负调控作用<sup>[26]</sup>。在本研究中,用

雄性激素17 $\alpha$ -甲基睾酮处理,尼罗罗非鱼卵巢中3个基因的表达均先下调而后恢复至处理前水平的趋势(图2),表明雄性激素处理能减少卵巢类固醇酶的合成。

芳香化酶抑制剂对鱼类类固醇激素合成酶基因表达的影响 LE为人工合成苯三唑类衍生物,是具有高度特异性的非甾体类第3代芳香化酶抑制剂(aromatase inhibitors,AIs),与雌激素生物合成的限速酶—P450芳香化酶中亚铁血红蛋白中的铁原子可逆结合,与内源性底物竞争芳香化酶活性位点,可逆地抑制该酶的活性(对酶的抑制程度可达99%以上),选择性抑制雌激素生物合成,有效阻断雄烯二酮及睾酮向雌激素转化,从而专一性降低雌激素水平,而不影响其他甾体激素的生物合成<sup>[27]</sup>。而且AI代谢较快,半衰期短(45 h),经5个半衰期(10 d)后,可能在体内完全清除<sup>[28]</sup>。用芳香化酶抑制剂或雄激素处理罗非鱼幼鱼,能诱导遗传雌性罗非鱼雄性化,表明直接或间接抑制雌二醇的合成是罗非鱼雄性化的必要条件<sup>[15,29-30]</sup>。本研究中尼罗罗非鱼注射LE后,P450 $arom$ 和P450 $scc$ 较先受到抑制,而11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>次之,提示LE直接调节P450 $arom$ 基因的表达进而抑制雌二醇的合成、影响鱼类的性别。利用芳香化酶抑制剂通过抑制芳香化酶活性可以诱导雌鱼转变为功能性雄鱼,从而提高雄性率,这在大鳞大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)<sup>[31]</sup>、日本牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[32]</sup>和斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[33]</sup>中已有报道。赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)经5 mg/kg体重剂量的LE埋植处理后,性腺芳香化酶活性显著降低,血清11-酮基睾酮(11-ketotestosterone,11-KT)浓度显著增加,雌二醇(estradiol-17 $\beta$ ,E<sub>2</sub>)水平显著降低,而睾酮(testosterone,T)含量无明显变化,表明AI主要通过抑制内源性E<sub>2</sub>的产生并提高11-KT水平,从而诱导赤点石斑鱼由雌性转变为雄性<sup>[34]</sup>。用来曲唑浸泡处理青鳉(*Oryzias latipes*)雌性成鱼或受精卵,可抑制脑芳香化酶的表达,也能影响卵黄蛋白原在卵母细胞中的合成和积累,从而抑制卵子的发生<sup>[35]</sup>。但也有研究结果显示,青鳉受精卵在芳香化酶抑制剂溶液中孵化,并没有观察到性转化现象,认为改变芳香化酶的活性不是鱼类性转化的必要条件<sup>[36]</sup>。SHILLING等<sup>[37]</sup>也发现,质量浓度达到1 mg/kg来曲唑溶液并没有抑制虹

鳟幼鱼卵黄蛋白原及雌二醇的合成。因此,雄性激素或芳香化酶抑制剂诱导性反转的机制可能还涉及到其它的因子,需进一步深入的研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] STROBL-MAZZULLA P H, LETHIMONIER C, GUEGUEN M M, *et al.* Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: neuroanatomical and functional relations [ J ]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 158(2) :191 - 201.
- [ 2 ] 兰滔,卢迈新,杨丽萍,等. 奥利亚罗非鱼雌激素  $\beta$  受体两种亚型 cDNA 的克隆、组织分布及雌激素对其表达的影响 [ J ]. *水产学报*, 2010, 34 ( 1 ) : 8 - 18.
- [ 3 ] DAVIS L K, PIERCE A L, HIRAMATSU N, *et al.* Gender-specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormone receptors, insulin-like growth factors and vitellogenins, and effects of 17 beta-estradiol in the male tilapia ( *Oreochromis mossambicus* ) [ J ]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 156(3) :544 - 541.
- [ 4 ] NES S, ANDERSEN O. Temperature effects sex determination and ontogenetic gene expression of the aromatases cyp19a and cyp19b, and the estrogen receptors esr1 and esr2 in Atlantic halibut ( *Hippoglossus hippoglossus* ) [ J ]. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73 ( 12 ) : 1481 - 1490.
- [ 5 ] FILBY A L, TYLER C R. Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow ( *Pimephales promelas* ) [ J ]. *Biology of Reproduction*, 2005, 73(4) :648 - 662.
- [ 6 ] IKEUCHI T, TODO T, KOBAYASHI T, *et al.* cDNA cloning of a novel androgen receptor subtype [ J ]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 ( 36 ) :25205 - 25209.
- [ 7 ] 陈本德. 甲基睾酮诱导鲫鱼雌核发育子代性转化的研究 [ J ]. *水产学报*, 1982, 6(2) :147 - 152.
- [ 8 ] 张甫英,胡炜,汪亚平. 应用雄性激素诱导异育银鲫性转化的研究 [ J ]. *遗传*, 2002, 22(1) :25 - 27.
- [ 9 ] 刘学,孙砚胜. 虹鳟鱼雌性化及其鱼子酱加工的初步研究 [ J ]. *动物学杂志*, 2000, 35(2) :31 - 35.
- [ 10 ] BAROILLER J F, D' COTTA H. Environment and sex determination in fanned fish [ J ]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 130(2) :399 - 409.
- [ 11 ] NAGAHAMA Y. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish [ M ] // NORBERG B, KJESBU O S, TARANGER G L, *et al.* *Reproductive physiology of fish*. Bergen: John Grieg AS, 2000:211 - 222.
- [ 12 ] KAWANO K, FURUSAWA S, MATSUDA H, *et al.* Expression of steroidogenic factor-1 in frog embryo and developing gonad [ J ]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 123(1) :13 - 22.
- [ 13 ] GETCHELL R G, GROOCOCK G H, SCHUMACHER V L, *et al.* Quantitative polymerase chain reaction assay for largemouth bass virus [ J ]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2007, 19: 226 - 233.
- [ 14 ] 马细兰,易诗白,张勇,等. 荧光实时定量 PCR 检测尼罗罗非鱼 GH、GHR、IGF- I 基因方法的建立及初步应用 [ J ]. *中山大学学报:自然科学版*, 2009, 48(3) :74 - 79.
- [ 15 ] WASSERMANN G J, AFONSO L O. Sex reversal in Nile tilapia ( *Oreochromis niloticus* Linnaeus ) by androgen immersion [ J ]. *Aquaculture Research*, 2003, 34(1) :65 - 71.
- [ 16 ] KROON F J, LILEY N R. The role of steroid hormones in protogynous sex change in the Blackeye goby, *Coryphopterus nicholsii* [ J ]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 118:273 - 283.
- [ 17 ] KORTNER T M, ARUKWE A. Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone exposure on steroidogenesis and cyclin-B mRNA expression in previtellogenic oocytes of Atlantic cod ( *Gadus morhua* ) [ J ]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, 146(4) :569 - 580.
- [ 18 ] IJIRI S, TAKEI N, KAZETO Y, *et al.* Changes in localization of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage ( P450scc ) in Japanese eel testis and ovary during gonadal development [ J ]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145:75 - 83.
- [ 19 ] IJIRI S, KANEKO H, KOBAYASHI T, *et al.* Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia ( *Oreochromis niloticus* ) [ J ]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(2) :333 - 341.
- [ 20 ] TRANT J M, GAVASSO S, ACKERS J, *et al.* Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes ( *CYP 19a* and *CYP19b* ) in zebrafish fry ( *Danio rerio* ) [ J ]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 290(5) :475 - 483.

- [21] KWON J Y, MCANDREW B J, PENMAN D J. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. Molecular Reproduction and Development, 2001, 59(4): 359-370.
- [22] CHANG X, KOBAYASHI T, SENTHILKUMARAN B, et al. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 141(2): 101-115.
- [23] JIANG J Q, WANG D S, SENTHILKUMARAN B, et al. Isolation, characterization and expression of 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 cDNAs from the testes of Japanese eel (*Anguilla japonica*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2003, 31: 305-315.
- [24] BARON D, FOSTIER A, BRETON B, et al. Androgen and estrogen treatments alter steady state messenger RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Molecular Reproduction and Development, 2005, 71(4): 471-479.
- [25] GOVOROUN M, MCMEEL O M, D' COTTA H, et al. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Journal of Experimental Zoology, 2001, 290: 558-566.
- [26] NAKAMURA I, KUSAKABE M, YOUNG G. Differential suppressive effects of low physiological doses of estradiol-17 $\beta$  *in vivo* on levels of mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein and three steroidogenic enzymes in previtellogenic ovarian follicles of rainbow trout [J]. General and Comparative Endocrinology, 2009, 163: 318-323.
- [27] TULAY M D, MUSRAFA M D. Comparison of the effects of letrozole and clomiphene citrate on ovarian follicles, endometrium and hormone levels in the rat [J]. Fertility and Sterility, 2003, 80(6): 1330-1332.
- [28] 杨锦修, 张家骅. 来曲唑促排卵研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(8): 97-101.
- [29] AFONSO L O B, WASSERMANN G J, DE OLIVEIRA R T. Sex reversal in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using a nonsteroidal aromatase inhibitor [J]. Journal of Experimental Zoology, 2001, 290(2): 177-181.
- [30] BHANDARI R K, NAKAMURA M, KOBAYASHI T, et al. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 145: 20-24.
- [31] PIFERRER F, ZANUY S, CARRILLO M, et al. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex-differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males [J]. Journal of Experimental Zoology, 1994, 270(3): 255-262.
- [32] KITANO T, TAKAMUNE K, NAGAHAMA Y, et al. Aromatase inhibitors and 17 $\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from genetic all female to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Molecular Reproduction and Development, 2001, 56(1): 1-5.
- [33] ANDERSEN L, KINNBERG K, HOLBECH H, et al. Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters; effects of an antiestrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2004, 30(3-4): 257-266.
- [34] 李广丽, 刘晓春, 林浩然. 芳香化酶抑制剂 Letrozole 对赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 性逆转的作用 [J]. 生理学报, 2005, 57(4): 473-479.
- [35] SUN L W, ZHA J M, SPEAR P A, et al. Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007, 145(4): 533-541.
- [36] KUHL A J, BROUWER M. Antiestrogens inhibit xenoestrogen-induced brain aromatase activity but do not prevent xenoestrogen-induced feminization in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Environmental Health Perspectives, 2006, 114(4): 500-506.
- [37] SHILLING A D, CARLSON D B, WILLIAMS D E. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition [J]. Journal of Steroid Biochemistry, 1999, 70(1-3): 89-95.

## Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone and letrozole on steroidogenic enzyme gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ZHU Hua-ping, MO Yuan-yuan, LU Mai-xin\*, GAO Feng-ying,  
YE Xing, HUANG Zhang-han, KE Xiao-li

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** Exogenous sex-steroid hormones and Letrozole (LE), a potent synthetic nonsteroidal aromatase inhibitor (AI), interfere in the committed step of the endogenous estrogens synthesis. In the present study, the efficacy of 17 $\alpha$ -Methyltestosterone (MT) and Letrozole (LE) on gonad steroidogenic enzyme gene expression was evaluated in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The genetically female tilapia were treated with 17 $\alpha$ -Methyltestosterone and Letrozole (at a dose of 10 mg/kg). Expressions of cytochrome P450 aromatase (*P450arom*), 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>) and cytochrome P450 cholesterol-side-chain-cleavage (*P450scc*) were examined in the gonads after injection treatment for 12 hours, 24 hours, 48 hours, 7 days, 14 days and 21 days, respectively. The results showed that the levels of *P450arom*, 11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub> and *P450scc* mRNA were decreased rapidly compared to the untreated group firstly, and then the mRNA levels of the three genes increased to the levels of pre-treatment. In the MT-treated group, the mRNA levels of *P450scc* were first decreased, followed by *P450arom* and 11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>. While in the LE-treated group, the mRNA levels of *P450arom* and *P450scc* were first decreased, followed by 11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub>. These results indicated that exogenous androgen or aromatase inhibitor treatment suppresses the expressions of key steroidogenic enzyme genes including *P450arom*, 11 $\beta$ -HSD<sub>2</sub> and *P450scc* in the female tilapia. Furthermore, it shows that MT may indirectly inhibit the expression of *P450arom*, while LE directly inhibits the expression of *P450arom*, and further influences the sex-inversion of fish. The present study suggests that besides steroid hormones, nonsteroidal compounds, such as aromatase inhibitors, have potential for production of monosex population in tilapia.

**Key words:** Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*); steroidogenic enzyme; 17 $\alpha$ -Methyltestosterone; letrozole

**Corresponding author:** LU Mai-xin. E-mail: mx-lu@163.com