

P450c17s 基因 mRNA 在雄性半滑舌鲷繁殖周期中的表达

陈彩芳^{1,2}, 温海深^{1*}

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;
2. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

摘要: 利用已克隆得到的半滑舌鲷 P450c17-I 和 P450c17-II 基因 cDNA 全长序列, 通过半定量 RT-PCR 技术, 结合雄鱼性腺发育期、各发育期血清中睾酮(T)含量, 研究了这两个基因在雄性半滑舌鲷各组织内的空间表达及在雄鱼繁殖周期中的季节性表达。结果表明, 半滑舌鲷 P450c17-I 组织分布具有广泛性, 在精巢、胃、肠、心、脾和脑内都有表达, 而 P450c17-II 组织分布具有特异性, 仅在精巢和头肾内有表达。在精巢不同发育期内, P450c17-I 表达与性腺发育呈正相关, 而 P450c17-II 表达模式则相反。推测这可能是由于在整个繁殖期, P450c17-I 基因在转录水平或转录后调控半滑舌鲷性类固醇激素的生成, 而 P450c17-II 可能与孕激素诱导排精及精原细胞 DNA 复制有关。

关键词: 半滑舌鲷; P450c17; 空间表达; 时间表达

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国第一个进行人工养殖的舌鲷科鱼类, 俗称牛舌头、鲷目、鲷米、龙利, 属于鲷形目(Pleuronectiformes)、舌鲷科(Cynoglossidae)、舌鲷属(*Cynoglossus*), 自然分布于我国沿海海区, 是近海名贵的底栖大型土著鱼类, 素有“富贵鱼”、“海洋中的黄金”之称, 雌雄个体差异较大, 雌雄生殖腺差异悬殊, 性成熟的雄鱼精巢, 体积或重量只有成熟卵巢的 1/900~1/200^[1]。雄鱼生殖力弱, 导致自然海区卵子受精率很低, 再加上沿岸海水污染和不当捕捞等原因, 该鱼的资源量逐年减少, 逐渐向濒危方向发展。因此, 重视、加快半滑舌鲷雄鱼的繁殖生理学研究具有重要的理论意义与应用价值。

在脊椎动物内, 类固醇激素生成需要一系列类固醇激素生成酶的相继作用。细胞色素 P450c17 是类固醇激素生成途径中最为关键的酶类之一。它是一种微粒体酶, 具有两种活性(17 α -羟化酶、17,

20-裂解酶)^[2], 并在性腺类固醇激素的合成(雄激素和雌激素)中起重要作用。在硬骨鱼类中, 雄激素可促进雄性附性器官的发育、刺激和维持雄鱼第二性征及促进精子发生, 特别是血清中睾酮(T)可以调节精巢发育和行为^[3]。

以前认为, 鱼类和哺乳动物都只存在一种 P450c17, 直到 Zhou 等^[4-5]在罗非鱼(*Oreochromis Niloticus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)内发现了一种新的 P450c17 克隆。目前, 一般认为鱼类存在两个不同基因编码的两种细胞色素 P450c17s(P450c17-I 和 P450c17-II), 前者具有两种酶活性, 即 17 α -羟化酶/17,20-裂解酶活性, 后者只具有 17 α -羟化酶活性, P450c17-I 和 P450c17-II 基因已在多种鱼类中克隆得到^[4-13]。关于 P450c17 的研究报道大多集中在雌鱼, 在雄鱼繁殖周期中的作用研究较少^[13]。本实验克隆得到半滑舌鲷 P450c17-I 和 P450c17-II 的全长 cDNA 序列(EU580533、EU732518), 并利用

收稿日期: 2012-02-07 修回日期: 2012-03-29
资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA10A403)
通讯作者: 温海深, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

已克隆得到的 P450c17-I 和 P450c17-II 基因 cDNA 全长序列, 通过半定量 RT-PCR 技术, 结合雄性性腺发育期、血清中睾酮(T)含量, 探讨 P450c17s 在雄性半滑舌鲷繁殖周期中的分子生理机制, 以期为半滑舌鲷的繁殖生物学提供更进一步的理论依据, 为生产实践环节提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 实验样品

2007 年 2 月至 2008 年 1 月, 从烟台莱州某养殖场每隔 3 个月 (2 月—4 月、5 月—7 月、8 月—10 月、11 月—翌年 1 月) 定期采样一次, 共采集实验鱼 57 尾, 平均体长为(32.38±4.14) cm, 平均体质量为(235.65± 76.10) g。在实验室水族箱里暂养 3~4 d, 流水充氧(溶解氧≥4 mg/L), 自然光周期(14L : 10D), 自然水温。

对实验鱼进行尾静脉采血, 分离血清, -40 °C 储存, 用于激素测定; 鱼体解剖后迅速取精巢、肝脏、胃、肠、鳃、心脏、脾、肾、头肾、脑、肌肉组织, 称取精巢重、肝重用于计算性腺成熟系数, $GSI(\%) = [GW/(BW-VW)] \times 100$ 、肝重指数 $HIS(\%) = [LW/(BW-VW)] \times 100$ (图 1), 然后液氮速冻并保存于-80 °C 超低温冰箱, 用于后续的基因表达实验, 其中精巢一部分保存于 Bouin 氏液, 用于精巢组织分期(图 2), 另一部分同前, 保存于-80 °C 超低温冰箱。

1.2 激素测定

根据温海深等^[14]测定方法, 采用碘 [¹²⁵I] T 放射免疫分析法(RIA)测定血清中 T 含量的周年性变化(n≥3)。

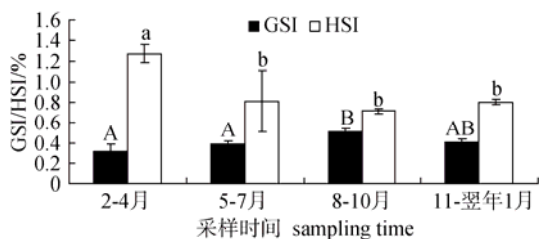


图 1 雄性半滑舌鲷 GSI 和 HSI 季节性变化
数据均表示为平均数±标准误, 图中标有不同的字母表示存在显著性差异 (P<0.05, Duncan 氏多重比较), 以下各图注释同此。

Fig. 1 Seasonal changes of GSI and HSI in male *C. semilaevis*

Values are expressed as mean±standard error of mean. Different letters indicate significant difference (P<0.05, one-way ANOVA, followed by Duncan's), the same as the following.

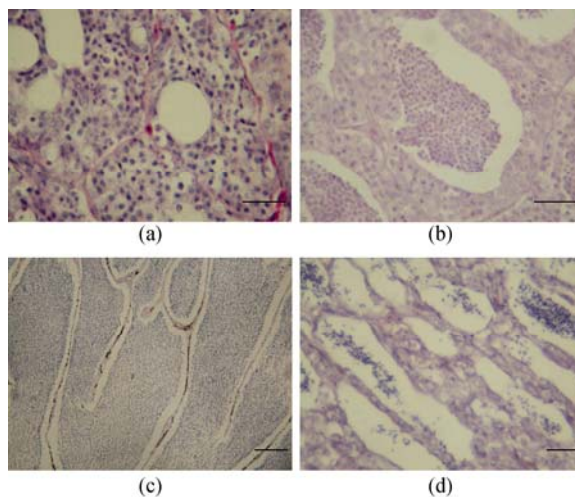


图 2 半滑舌鲷精巢发育组织学分期
(a) III期 (2—4 月); (b) IV期 (5—7 月); (c) V期 (8—10 月); (d) VI期 (11—翌年 1 月)。

Fig. 2 Photomicrographs of *C. semilaevis* testis development histology

(a) the testis in the stage III(Feb.—April); (b) the testis in the stage IV(May—July); (c) the testis in the stage V(Aug.—Oct.); (d) the testis in the stage VI(Nov.—Jan.,the next year).

1.3 试剂

RNAsio Reagent、Taq 酶、Dnase I、RNasin、PMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司, M-MLV 购自 Promega 公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DH5α感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司, 其余试剂均为国产分析纯试剂。引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

1.4 总 RNA 提取和 cDNA 合成

半滑舌鲷各组织总 RNA 提取按照 RNAsio Reagent 试剂盒说明书进行, 之后利用 M-MLV, 结合通用引物来合成各组织的 cDNA 第一链。所得 cDNA 第一链以管家基因 18S rRNA 进行检测, 确保其反转录是否成功。合成的 cDNA 于-40 °C 保存备用。

1.5 P450c17-I 和 P450c17-II 基因的组织表达及季节性表达

组织表达 根据 P450c17-I 和 P450c17-II 基因全长序列, 设计特异性引物(表 1), 以 18S rRNA 为内标, 对半滑舌鲷雄鱼精巢、肝脏、胃、肠、鳃、心脏、脾、肾、头肾、脑、肌肉进行组织表达的检测。18S rRNA 引物序列引自孙业盈等^[15]。P450c17-I/-II PCR 反应条件分别为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 35 s, 57 °C/63 °C 35 s, 72 °C 35 s 共 32/34 个循环, 72 °C 10 min。18S rRNA 所进行的

PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 35 s, 61 °C 35 s, 72 °C 35 s 共 18 个循环, 72 °C 10 min。目的产物回收测序验证扩增的正确性。

表 1 半滑舌鲷 P450c17-I、-II 基因时空表达引物
Tab. 1 Primer sequences for tongue sole P450c17-I, -II gene expression analysis

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	扩增长度/bp size
P450c17-IF	GGCCTGCGTCTTCTAAGG	269
P450c17-IR	ATGATGGCCATTTAAGAAC	
P450c17-II F	AACTGAAGGACTGCATCTAC	324
P450c17-II R	TGTTCACTGCCCGTTCAC	

在不同发育期精巢中的季节性表达 根据精巢分期结果, 选取处于 III 期、IV 期、V 期、VI 期雄性半滑舌鲷精巢组织, 进行半滑舌鲷 P450c17-I 和 P450c17-II 基因时间表达。特异性引物、18S rRNA 引物及 PCR 反应条件同上。取 8 μL PCR 产物进行电泳。电泳结果采用 Quantity One v4.62 (Bio-Rad, America) 凝胶图像处理系统进行量化分析。目的产物回收测序验证扩增的正确性。

1.6 数据分析

收集 III 期、IV 期、V 期、VI 期性成熟雄性半滑舌鲷的精巢, 按照实验设 3 个平行组。实验所得数据均表示为平均数±标准误(mean±SE), 采用 SPSS 13.0 统计软件中的 Duncan 氏法进行数据处理和检验分析, 当 P < 0.05 时认为差异显著。

2 结果

2.1 雄性半滑舌鲷血清 T 含量的年季节性变化

雄性半滑舌鲷血清中 T 水平随着精巢的发育而呈明显的周期性变化 (图 3), 含量最高值出现在 8—10 月繁殖季节, 平均为 4.378 8 ng/dL(n=8), 之后显著下降(P<0.05), 11~翌年 1 月份降至全年最低点, 均值为 0.171 8 ng/dL(n=14), 2—4 月份略微上升, 均值为 0.262 5 ng/dL(n=6), 之后到 5—7 月份, 血浆中 T 含量显著升高(P<0.05), 达均值 4.015 0 ng/dL(n=8)。

2.2 P450c17-I 在雄性半滑舌鲷各个组织内的表达分析

通过 RT-PCR 方法检测了 P450c17-I 在性腺发育期处于 IV 期的雄性半滑舌鲷精巢、肝、胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾、脑和肌肉 11 种组织中的表达。结果表明, 半滑舌鲷 P450c17-I 基因表达具

有广泛性, 在精巢、胃、肠、心、脾和脑内都有表达, 且精巢内表达量最高, 同时在心、脾脏和脑内也检测到了表达(图 4)。

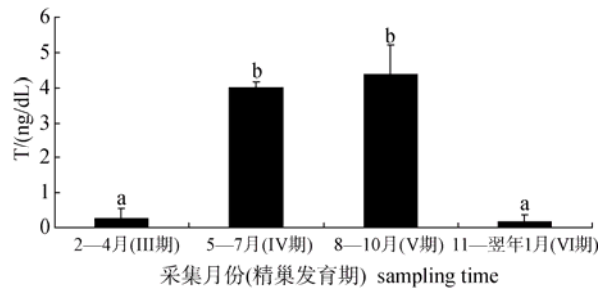


图 3 雄性半滑舌鲷血清 T 含量的季节性变化
Fig. 3 Seasonal changes of plasma testosterone level in male *C. semilaervis*



图 4 P450c17-I 在雄性半滑舌鲷各个组织的表达
T:精巢; L:肝脏; St: 胃; I:肠; Gi:鳃; H:心脏; Sp:脾; K: 肾; Hk: 头肾; B:脑; Mu:肌肉; M: Marker; N: 阴性对照。

Fig. 4 The mRNA expression of P450c17-I in male *C. semilaervis*

T:testis; L:liver; St:stomach; I:intestine; Gi:gill; H:heart; Sp:spleen; K: kidney; Hk:head kidney; B:brain; Mu:muscle; N: negative control.

2.3 P450c17-II 在雄性半滑舌鲷各个组织内的表达分析

半滑舌鲷 P450c17-II 基因具有组织表达特异性, 只在精巢和头肾内表达, 在其他组织内均未检测到表达(图 5), 头肾 P450c17-II 表达量要低于精巢 P450c17-II 表达量。

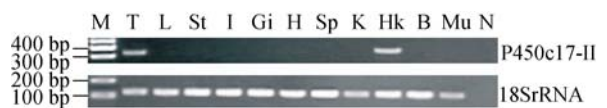


图 5 P450c17-II 在雄性半滑舌鲷各个组织的表达
T:精巢; L:肝脏; St: 胃; I:肠; Gi:鳃; H:心脏; Sp:脾; K:肾; Hk: 头肾; B:脑; Mu:肌肉; M: Marker; N: 阴性对照。

Fig. 5 The mRNA expression of P450c17-II in male *C. semilaervis*

T:testis; L:liver; St:stomach; I:intestine; Gi:gill; H:heart; Sp:spleen; K: kidney; Hk:head kidney; B:brain; Mu:muscle; N: negative control.

2.4 P450c17-I 在不同发育期半滑舌鲷精巢内的季节性表达分析

精巢内 P450c17-I 表达量在 VI 期精巢内达到了

全年最高值,均值为 45.2956 ± 12.3014 ; 之后显著的下降 ($P < 0.05$), 进入精巢发育期 III 期, 降至 16.9801 ± 4.7121 ; 到了性腺发育期 IV 期, 精巢内 P450c17-I 大幅升高, 均值为 39.0878 ± 8.7184 ; 而精巢发育到 V 期, P450c17-I 表达量虽呈现小幅下降, 但基本维持此水平, 均值为 37.4809 ± 18.2374 (图 6)。

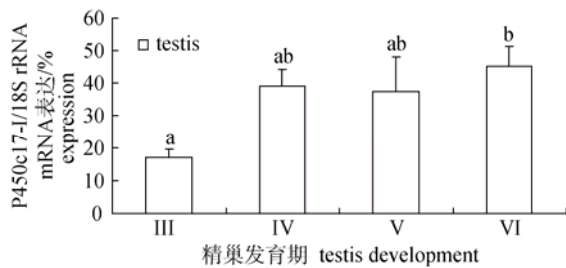


图 6 P450c17-I 在半滑舌鲷各个发育期精巢内的季节性表达

Fig. 6 Seasonal changes of P450c17-I expression in the testis of *C. semilaevis*

2.5 P450c17-II 在半滑舌鲷不同发育期精巢内的季节性表达分析

半滑舌鲷 P450c17-II 基因在其各个发育阶段的精巢中都有表达。精巢内 P450c17-II 表达量在 VI 期精巢内达到了全年最高值, 均值为 38.8688 ± 6.3423 ; 之后略微下降, 进入精巢发育期 III 期, 降至 34.4654 ± 4.1568 ; 到性腺发育期 IV 期, 精巢内 P450c17-II 继续下降, 至均值为 22.8503 ± 4.6133 ; 而精巢发育到 V 期, P450c17-II 表达量大幅下降至全年最低, 均值为 10.4415 ± 5.2234 (图 7)。

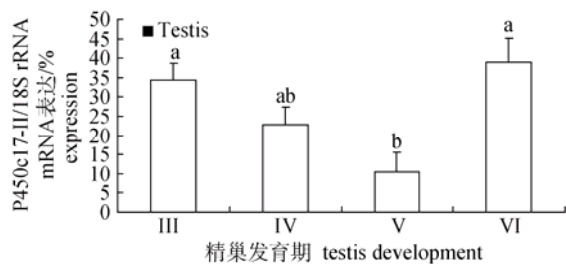


图 7 P450c17-II 在半滑舌鲷各个发育期精巢内的季节性表达

Fig. 7 Seasonal changes of P450c17-II expression in the testis of *C. semilaevis*

3 讨论

通过各组织内的空间表达研究, 在雄鱼精巢内检测到了一条 P450c17-I 主亮带, 这与其他鱼类中

得到的结果一致^[7,8,10,16], 表明半滑舌鲷精巢是 P450c17-I 表达的主要位点, 且 P450c17-I 在性类固醇激素生物合成中起到了关键作用。同时, 实验在雄鱼脑内检测到了一个强信号, 其 P450c17-I 表达量比精巢内表达量低 13 倍。在先前的研究中, 脑内 P450c17 基因表达也在其他鱼类中检测到, 包括胖头鲮 (*Pimephales promelas*)^[10], 黄鳍 (*Monopterus albus*)^[7], 斑马鱼 (*Danio rerio*)^[8], 而且, 胖头鲮脑内 P450c17 表达量比性腺低 30 倍, 黄鳍脑内却只检测到了一条微弱带, 斑马鱼脑内 P450c17 表达量低于卵巢和肾脏。本研究中关于 P450c17-I 的时间表达也支持这个观点, 表明类固醇调控是依赖于脑—垂体—性腺轴。

硬骨鱼类中有一个天然的孕激素— $17\alpha, 20\beta$ -DHP 存在于精子发生早期的精巢内, 与 11-KT 一样, 它也能诱导精原细胞的 DNA 复制, 是精子发生/减数分裂的开启者^[17]。P450c17 不仅是生成孕激素的关键酶, 也是 Leydig 细胞内雄激素合成的关键酶^[18], C17,20 裂解酶活性催化 17α -羟孕酮生成雄烯二酮, 这对硬骨鱼类生成 11-KT 也很重要^[19]。本研究中半滑舌鲷精巢内 P450c17-I 的时间表达也间接验证了上述论点。在整个性腺发育期精巢内都有 P450c17-I 表达, 且在一定程度上与性腺发育呈现正相关性。随着精巢发育, P450c17-I 表达量趋于升高, 除在 V 期精巢内出现略微下降, 而血清中 T 的含量不断升高, 直至 V 期开始下降。这与胖头鲮内的研究结果不同^[10], 其精巢内 P450c17-I 的表达量与性腺发育呈负相关。金鱼 (*Carassius auratus*), 血清 T、11-KT 和 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 在精子发生期间能达到最大值^[20], 在鱼类精子发生时, 孕激素也在排精和精子成熟中起到了重要作用^[21-23]。半滑舌鲷 VI 期精巢内 P450c17-I 表达持续增加似乎也验证了这一点。T 作为 E_2 前体, 其合成既需要 P450c17 的 17α -羟化酶活性, 又需要 P450c17 的 17,20 裂解酶活性, 而本研究结果说明了 P450c17s 与类固醇激素之间的相互调节作用。

通过空间表达研究, 在雄鱼头肾内检测到了一条 P450c17-II 亮带。这与 Zhou 等^[5]研究结果相一致, 另外, 在斑马鱼的整个肾脏内也检测到了 P450c17 的杂交信号^[8]。这可能与头肾内类固醇激素生成有关, 鱼类头肾相当于哺乳动物的肾上腺皮质。已有研究表明, 硬骨鱼类头肾具有合成

P450c17 蛋白的能力,用于参加皮质醇和 17 α , 20 β -DHP 的生物合成^[8,19,24]。

作为另一个经典类固醇激素生成组织,在雄鱼精巢内检测到了 P450c17-II 表达。这分别与罗非鱼及青鳉内 P450c17-II 的组织表达和定位相互印证^[4-5]。通过原位杂交发现,青鳉 P450c17s 在精巢间质细胞内均能检测到。结果说明,半滑舌鲷精巢是 P450c17-II 表达的主要位点,与 P450c17-I 一样, P450c17-II 在性类固醇激素生成中也起到了关键作用。

雄性精巢中孕激素能诱导排精和精子成熟,硬骨鱼类中孕激素 17 α , 20 β -DHP 在精子发生早期的精巢内存在,它能诱导精原细胞的 DNA 复制,是精子发生/减数分裂的开启者^[17]。P450c17 不仅是生成孕激素的关键酶,也是 Leydig 细胞内雄激素合成的关键酶^[18]。本研究中半滑舌鲷精巢内 P450c17-II 的时间表达也间接验证了上述论点。在整个性腺发育期精巢内都有 P450c17-II 表达,且在一定程度上与性腺发育呈现负相关性。随着精巢发育(GSI 趋于升高、血清中 T 水平升高),P450c17-II 表达量趋于下降,这与半滑舌鲷精巢内 P450c17-I 表达模式及作用不同,暗示其与雄激素合成无相关性,而在 VI 期精巢内显著升高,这可能与孕激素在排精及诱导下一批精原细胞的 DNA 复制中所具有的作用有关^[17,21-23]。

本研究在已克隆得到的 P450c17-I 和 P450c17-II 全长 cDNA 的基础上,对实验材料的成熟系数(GSI)以及肝重指数(HIS)进行了统计分析,进一步掌握实验材料的发育情况,同时,首次进行了这两个基因的组织表达及结合 GSI、HIS 和血清中 T 含量进行其在雄鱼精巢繁殖周期中的表达分析,发现在整个繁殖期, P450c17-I 基因在转录水平或转录后调控半滑舌鲷性类固醇激素的生成, P450c17-II 表达模式与前者不同,其主要可能与孕激素诱导排精及精原细胞 DNA 复制有关。

参考文献:

- [1] 孙中之, 李建, 李娟. 半滑舌鲷的生物学特性与养殖技术[J]. 齐鲁渔业, 2006, 12(23): 22-23.
- [2] Miller W L, Auchus R J, Geller D H. The regulation of 17, 20 lyase activity [J]. Steroids, 1997, 62(1): 133-142.
- [3] Liley N R, Stacey N E. Hormones, pheromones, and

reproductive behaviour in fish[M]//Hoar W S, Randall D J, Donaldson E M, Eds. Fish Physiology. London: Academic Press, New York. 1983: 1-63.

- [4] Zhou L Y, Wang D S, Shibata Y, *et al.* Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 362(1): 619-625.
- [5] Zhou L Y, Wang D S, Kobayashi T, *et al.* A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney [J]. Endocrinology, 2007, 148(9): 4282-4291.
- [6] Sakai N, Tanaka M, Adachi S *et al.* Rainbow trout cytochrome P-450c17 (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase)-cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P-450c17 mRNA expression during oogenesis [J]. FEBS Letter, 1992, 301(1): 60-64.
- [7] Yu H, Cheng H, Guo Y, *et al.* Alternative splicing and differential expression of P450c17 (CYP17) in gonads during sex transformation in the rice field eel [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 307(1): 165-171.
- [8] Wang Y J, Ge W. Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extra-gonadal tissues [J]. General and Comparative Endocrinology, 2004, 135(2): 241-249.
- [9] Kazeto Y, Ijiri S, Todo T, *et al.* Molecular cloning and characterization of Japanese eel ovarian P450c17 (CYP17) cDNA [J]. General and Comparative Endocrinology, 2000, 118(1): 123-133.
- [10] Halm S, Kwon J Y, Rand-Weaver M, *et al.* Cloning and gene expression of P450 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas* [J]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 130(3): 256-266.
- [11] Trant J M. Isolation and characterization of the cDNA encoding the spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*) form of cytochrome P450c17 [J]. Journal of Experimental Zoology, 1995, 272(1): 25-33.
- [12] Chen C F, Wen H S, Wang Z P, *et al.* Cloning and expression of P450c17-I (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase) in brain and ovary during gonad development in *Cynoglossus semilaevis* [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2010, 36(4): 1001-1012.
- [13] Jin G X, Wen H S, He F, *et al.* Molecular cloning, characterization expression of P450c17-I and P450c17-II and their functions analysis during the reproductive cycle in males of barfin flounder (*Verasper moseri*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, DOI 10.1007/s10695-011-9564-2.
- [14] 温海深, 宋海霞, 杨立廷, 等. 外源激素对养殖牙鲆

- 血浆睾酮和雌二醇含量的影响研究[J]. 海洋学报, 2006, 28(4): 115-120.
- [15] 孙业盈, 张全启, 齐洁, 等. 半滑舌鳎 DMRT1 基因的克隆与表达分析[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2008, 54(2): 221-226.
- [16] Freking F, Nazairians T, Schlinger B A. The expression of the sex steroid-synthesizing enzymes CYP11A1, 3 β -HSD, CYP17, and CYP19 in gonads and adrenals of adult and developing zebra fish [J]. General and Comparative Endocrinology, 2000, 119(2): 140-151.
- [17] Takeshi M, Masato H, Yuichi O, *et al.* Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in the spermatogenic cell of the eel [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(19): 7333-7338.
- [18] Dufau M L, Miyagawa Y, Takada S, *et al.* Regulation of androgen synthesis: The late steroidogenic pathway [J]. Steroids, 1997, 62(1): 128-132.
- [19] Kobayashi T, Nakamura M, Kajiura-Kobayashi H, *et al.* Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3 β -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Cell and Tissue Research, 1998, 292(3): 573-577.
- [20] Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. Gonadotropin surge during spawning in male goldfish [J]. General and Comparative Endocrinology, 1986, 62(1): 70-79.
- [21] Ueda H, Kanbegawa A, Nagahama Y. Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1985, 59(1): 24-30.
- [22] Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, *et al.* Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. Biomedical Research, 1991, 12(4): 241-248.
- [23] Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, *et al.* The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish [J]. Journal of Experimental Zoology, 1992, 261(3): 359-363.
- [24] Sangalang G B, Freeman H C. *In vitro* biosynthesis of 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by the ovaries, testes, and head kidneys of the Atlantic salmon *Salmo salar* [J]. General and Comparative Endocrinology, 1988, 69(3): 406-415.

The characteristic analysis of P450c17s mRNA expression during the reproductive cycle in male *Cynoglossus semilaevis* Günther

CHEN Cai-fang^{1,2}, WEN Hai-shen^{1*}

(1. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: Cytochrome P450c17 is one of the most critical enzymes in steroidogenic pathway, which is essential in the production of sex steroid hormone (androgens and estrogens). Up to date, there are two P450c17s (P450c17-I and P450c17-II) encoded by two different genes. P450c17-I possesses two enzyme activities, namely 17 α -hydroxylase and 17, 20-lyase, while P450c17-II only has 17 α -hydroxylase. Under the condition of P450c17-I and P450c17-II complete cDNAs, the spatial and temporal expressions of the two genes are studied by the semi-RT-PCR technology, combined with gonad development and serum testosterone (T) level. The results of gene spatial expression analysis showed that tongue sole P450c17-I was distributed widely, which was expressed in testis, stomach, intestine, heart, spleen and brain, while tongue sole P450c17-II distribution was tissue-specific, which was only expressed in testis and head kidney. During various developmental stages of testis, P450c17-I expression pattern revealed developmental stage-dependency, while the expression pattern of P450c17-II was on the contrary. It is predicted that, during the whole reproductive period, P450c17-I regulates the sex steroid hormone on the transcriptional level or after transcription in male tongue sole, while P450c17-II may be related to progestin in inducing spermiation and DNA replication in spermatogonia.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; P450c17; spatial expression; temporal expression

Corresponding author: WEN Hai-shen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn