

雄性黄颡鱼芳香化酶基因 mRNA 在 性成熟期组织中表达分析

温海深^{1,2} 刘 淼¹ 祁保霞³ 何 峰¹
李吉方¹ 史 丹¹ 马瑞芹¹ 胡 建¹ 母伟杰¹ 张远青¹

(¹中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

(²农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 无锡 214081)

(³内蒙古民族大学动物科学技术学院, 通辽 028000)

摘 要 在水温分别为 20(常温对照组)、25、30℃ 条件下, 采用 RT-PCR 方法, 研究性腺成熟期雄性黄颡鱼组织中 P450 芳香化酶(P450aromA 和 P450aromB)的 mRNA 表达水平, 同时测定性腺成熟系数(GSI)、肝重指数(HSI)、肥满度(CF)和血浆睾酮(T), 雌二醇(E₂)含量。结果表明, P450aromA 在性腺发育成熟期雄性黄颡鱼心脏、肝、脾、胃、肾脏、精巢、鳃、脑、头肾、肠管组织中均无表达, P450aromB 只在脑和肠中有表达, 在脑中表达量高于肠, 表达量随着水温升高而显著下降; 各组实验鱼血浆 T 和 E₂ 含量与芳香化酶基因表达量存在相关关系。该实验结果表明, P450aromA 可能与精子发生相关, 可能不参与黄颡鱼精子排放过程; P450aromB 在雄鱼脑中高度表达, 可能参与性腺成熟期精子活力保持与排放过程, 且应激温度越高, 对性腺成熟期精子活力保持与排放过程影响越大。

关键词 黄颡鱼 P450arom mRNA 表达 睾酮 雌二醇

中图分类号 S917.4; Q7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)04-0026-08

Analysis of P450arom gene mRNA expression in histology of mature male *Pelteobagrus fulvidraco*

WEN Hai-shen^{1,2} LIU Miao¹ QI Bao-xia³ HE Feng¹ LI Ji-fang¹
SHI Dan¹ MA Rui-qin¹ HU Jian¹ MU Wei-jie¹ ZHANG Yuan-qing

(¹ Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Wuxi 214081)

(³ College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000)

ABSTRACT The steady-state level of the P450arom (P450aromA and P450aromB) mRNAs of male *Pelteobagrus fulvidraco* cultured at different temperatures and growth conditions were analyzed by RT-PCR, and GSI, HSI, CF, serum sexual steroid hormones testosterone (T) and estradiol (E₂) levels were measured by ¹²⁵I radioimmunoassay (RIA). The spatial expression result showed that P450aromA mRNA was not present in ten tissues of male *P. fulvidra-*

co, including spermary, liver, stomach, intestines, gill, heart, spleen, kidney, head kidney, and brain. P450aromB was expressed in brain and intestines. Expression of P450aroms was fist linked to temperature, serum sexual steroid hormones testosterone (T) and estradiol (E_2) level. The changes in mRNA level of P450arom shared the same trends with serum E_2 and T cultured at different temperatures. Our results suggested that P450aromA may be related with spermatogenesis. The high expression level in the brain of the male fish may be directly involved in the maintaining of sperm vitality and spermiation process. The results showed that higher temperature made more significant effects on sperm vitality and spermiation process.

KEY WORDS *Pelteobagrus fulvidraco* P450arom mRNA expression
Testosterone Estradiol-17 β

鱼类的生殖活动受外部环境因素和神经内分泌的双重调节。主要是通过下丘脑-垂体-性腺轴得以实现鱼类生殖细胞的发生、性别分化和性腺发育成熟及其相应的繁殖活动。如下丘脑产生的促性腺激素释放激素(GnRH)可刺激脑垂体分泌促性腺激素(GtH),GtH促使性腺组织产生类固醇激素(睾酮和雌二醇等)作用于生殖细胞,引起生殖细胞发育成熟和排卵(排精)。同时,性类固醇激素也会反馈抑制GnRH和GtH的分泌。在类固醇激素的代谢和转化过程中,需要多种酶参与催化,其中细胞色素P450芳香化酶(P450arom),作为P450细胞色素酶超家族中的一员,是目前已知的唯一的一个不可逆地催化雄烷二酮和睾酮转化为雌酮和雌二醇的酶,是雌激素生物合成中的关键酶和限速酶(Guiguen *et al.* 1999),在其中起着关键作用(洪万树等 2000)。

细胞色素P450芳香化酶(P450arom)广泛存在于大多数脊椎动物的脑和垂体中(Simpson *et al.* 1994; Trant *et al.* 2001)。除猪科动物外,绝大多数哺乳动物以及鸟类中,P450arom只有一种,由CYP19单基因编码(Corbin *et al.* 2007)。但在鱼类中却发现了由两种不同基因编码的P450arom,分别来自性腺(CYP19A)和脑(CYP19B)(Kwon *et al.* 2001),其中P450aromA由CYP19A基因编码,主要在卵巢中表达;P450aromB则由CYP19B基因编码,主要在中枢神经系统表达(Simpson *et al.* 2002)。

Naftolin等(1971)研究发现,雄激素对脑组织的作用是由脑组织内的芳香化酶将雄激素转化为雌激素(主要是17 β -雌二醇, E_2)而实现的,包括雄性性行为的激活、脑的性别差异以及甾体激素对促性腺素分泌的负反馈调节等。在硬骨鱼类中,脑型芳香化酶是组织特异性和细胞特异性分布的,主要在脑、下丘脑、视网膜等神经组织中表达。Callard等(1981)研究发现,鱼脑中含有非常高的芳香化酶活性,其水平比其他脊椎动物高出100~1000倍,一般认为,在脑中雌二醇的生成过程中起到关键性作用,也可能调节着中枢神经系统的发育(Kishida *et al.* 2001)、性行为的调节(Bjerselius *et al.* 2001)和性腺的分化(Trant *et al.* 2001)。并且大量研究表明,鱼类脑型芳香化酶可能还参与了脑-脑垂体-性腺轴的生理繁殖活动(Cavaco *et al.* 2001)。在牙鲆 *Paralichthys olivaceus*(Kitano *et al.* 1999)和罗非鱼 *Oreochromis niloticum*(D'Cetta *et al.* 2001)的研究中发现,高温处理组牙鲆芳香化酶基因在脑的表达量比对照组低;升温可使尼罗罗非鱼的芳香化酶mRNA表达水平降低。但是,上述两个实验的实验鱼均处于性腺分化期,且调控周期长。故采用热应激的方式对性成熟的雄鱼进行调控,对研究P450arom的作用机理存在一定的创新性,具有重要的意义。

黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* 是我国重要的淡水经济鱼类,由于它雄性个体生长快速,性别控制与单性育种研究受到空前关注。目前,已经克隆了黄颡鱼芳香化酶基因(徐跑等 2005a,b),有关雄性黄颡鱼内分泌生理的系统研究尚未见报道。本研究以精子排放期的雄性黄颡鱼为对象,测定黄颡鱼两种芳香化酶基因mRNA在脑和精巢中的表达量;同时进行温度调控试验,分析温度与血浆主要性类固醇激素含量的关系,查明芳香化酶基因mRNA在雄性黄颡鱼中的表达模式。通过这些研究,在理论上查明芳香化酶基因表达对雄鱼繁殖的生理作用,在实践上为雄性黄颡鱼生殖调控提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼类分组

2009 年 10 月从青岛水产品市场购买雄性黄颡鱼 40 尾。在实验室水族箱里暂养 3d, 流水充氧, 人工调节光照(250lx, 12L : 12D), 自然水温(20±0.5℃)。将实验鱼分为 3 组: 20(常温对照组)、25、30℃的水族箱内, 每组 10 尾实验鱼, 饲养观察 24h 后采样。

1.2 样品采集

实验结束后, 从实验鱼类尾静脉采集血液样品(采用 MS-222 进行麻醉, 浓度为 1/30 000), 分离血清(4℃ 储存 4~6h 后, 16 000 r/min 离心 10min, 取上清液), -40℃ 保存。测量所有鱼的形态学参数, 后解剖取其性腺、肝脏等称重, 计算性腺成熟系数($GSI = [GW / (BW - VW)] \times 100$), 肝重指数($HSI = [LW / BW]$), 肥满度($CF = [BW / BL^3]$)。解剖后迅速取出精巢、肝脏、胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾、脑和肌肉等组织, 50% 组织用 Bouin's 氏液固定, 用于组织切片, 其余放在液氮中速冻, 然后转移至 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。

1.3 试剂来源

本实验所用 18S 和 PCR 特异性引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。Taq 酶、DNase I (RNase free)、RNasin、RNA 提取试剂 Trizol Reagent、M-MLV 购自 TaKaRa 公司, 普通琼脂糖凝胶、Marker 购自北京天根生化科技有限公司, 其余为国产分析纯试剂。

1.4 组织学实验方法

性腺用 Bouin's 液固定 24~36h 后, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡(熔点 54~56℃)包埋, LEICA-RM2016 切片连续切片, 厚度为 5~7μm。采用苏木精-曙红(H. E)染色, 中性树胶封片, Nikon E200 型光学显微镜观察及显微摄影, 依据硬骨鱼类分期标准对性腺进行分期。

1.5 分子生物学实验方法

1.5.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 -80℃ 保存的肠、鳃、心、脾、肾、头肾、精巢、肝、胃、脑组织各 100mg, 用 RNAiso Reagent 抽提总 RNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以 DNase I 酶去除基因组 DNA, 紫外分光光度计测定 RNA 浓度。各组织 RNA 分别用 M-MLV 逆转录酶以 Oligo(dT)18 为引物合成 cDNA 第一链, 反应体系及程序为: 2μg RNA 加 Oligo(dT)18 2μl, 补水至 13μl, 混匀后 70℃ 放置 5min, 然后冰水浴 2min, 再往体系中加入缓冲液 5μl、dNTP 5μl、RNA 酶抑制剂 1μl、M-MLV 逆转录酶 1μl, 混匀后 42℃ 放置 60min, 最后 95℃, 5min 灭活逆转录酶。合成的 cDNA 于 -20℃ 保存备用。

1.5.2 芳香化酶 mRNA 表达

采用半定量 RT-PCR 法, 利用特异性引物来检测 P450aromA 和 P450aromB mRNA 在雄性黄颡鱼组织中的表达情况, cDNA 稀释后取 1μl 作为模板进行 PCR 扩增。以黄颡鱼 18s rRNA (表 1)(徐 跑等 2005a、b), 作为反应的内参照物。18s rRNA 所进行的 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 30s, 57℃ 30s, 72℃ 30s 共 18 个循环, 72℃ 延伸 10min。特异性引物 P450ATF 和 P450ATR 及特异性引物 P450BTF 和 P450BTR 利用 Primer 5.0 软件设计(表 1)。P450aromA 的 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s 共 40 个循环, 72℃ 10min。P450aromB 的 PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3min, 94℃ 30s, 55.3℃ 30s, 72℃ 30s 共 40 个循环, 72℃ 10min。取 5μl 的 PCR 产物进行电泳。对电泳结果采用 Tanon GIS 凝胶图象处理系统进行分析。

表1 黄颡鱼芳香化酶基因半定量 RT-PCR 表达所用引物

Table 1 Primers used for *P. fulvidraco* CYP19A and CYP19B gene cloning and mRNA expression analysis

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
18SF	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC	P450ATR	CAGTGAAGTTCAGGTGGTC
18SR	AGCAACTTAAATATACGCTATTGGAG	P450BTF	CTGGTTACTGGGTCTTGG
P450ATF	CCTGGATCTTCTCTAAAT	P450BTR	GCATTGATGACTTTACGC

1.6 血浆睾酮(T)和雌二醇(E₂)含量测定

用¹²⁵I放射性免疫测定方法(RIA)测量雄性黄颡鱼血清中睾酮(T)和雌二醇(E₂)的含量,试剂购置于天津九鼎医学生物工程有限公司。首先制作标准曲线,在待测血清中加入第一抗体后充分混匀,37℃水浴孵育60~90min。再加入分离剂,充分混合均匀后,3 600 r/min离心20min,弃去上清液,测定沉淀物cpm,计算激素含量(温海深等 2006)。

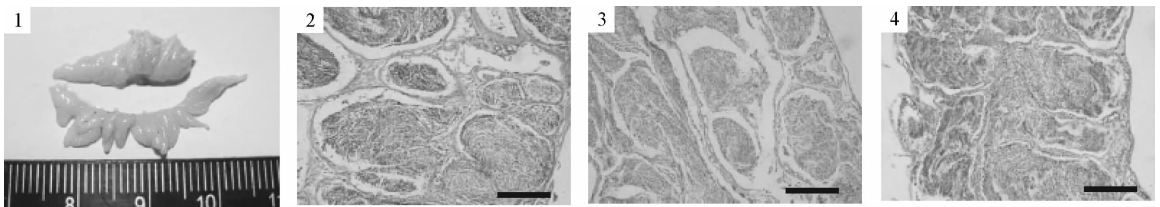
1.7 数据分析

所得数据均表示为平均数±标准误(Mean±S. E.),采用SPSS统计软件进行单因素方差分析并进行Duncan多重比较,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 实验结果

2.1 精巢发育组织学观察和生理指标的统计

实验结束后对3组雄鱼进行解剖,发现实验鱼均为V期精巢,精巢外观乳白色,分枝非常饱满而圆厚,挤压亲鱼的腹部,没有或很少有精液流出(图1-1)。切片中观察精子细胞已发育为完全成熟的精子,壶腹壁破裂,精子释放入小叶腔中,连成一片,呈漩涡状,此时精子强嗜碱性,被苏木精染成了深紫色(图1-2、图1-3、图1-4)。图1-2、图1-3、图1-4分别表示3个实验处理组鱼类的精巢发育期,从中可以看出,3个温度处理组鱼类精巢均处于精子排放期。计算GSI, HSI, CF。结果表明,黄颡鱼精巢GSI波动在0.4%~0.9%,HSI波动在1.4%~1.6%,CF波动在1.2%~1.5%。并且,3组实验鱼GSI、HSI、CF均没有显著差异。



说明:1. 精巢外观,呈乳白色,小叶状;2. 20℃(常温对照组),精巢处于V期,H. E×100,比例尺=70μm;

3. 25℃组,精巢处于V期,H. E×100,比例尺=70μm;4. 30℃组,精巢处于V期,H. E×100,比例尺=70μm

Explanation:1. Morphological structure of testis, milky, Lobular;2. 20℃, NC group, Lobular of testis in stage V, bar=70μm;

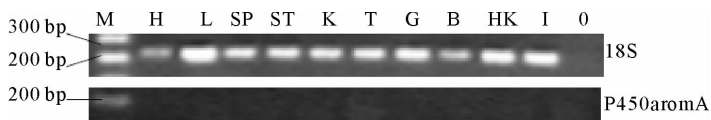
3. 25℃, group, Lobular of testis in stage V, bar=70μm;4. 30℃, group, Lobular of testis in stage V, bar=70μm

图1 黄颡鱼精巢组织学分期

Fig. 1 Histological developmental phases in the spermary of *P. fulvidraco*

2.2 雄性黄颡鱼 P450aromA 在各组织中表达

通过 RT-PCR 方法检测,采用 Tanon GIS 凝胶图象处理系统进行分析和 SPSS 数据统计。结果发现 P450aromA 在雄性黄颡鱼心脏、肝、脾、胃、肾、性腺、鳃、脑、头肾和肠 10 种组织中均无表达(图 2)。



M: DNA 分子量标准;H:心脏;L:肝脏;SP:脾;ST:胃;K:肾;T:精巢;G:鳃;B:脑;HK:头肾;l:肠;0:阴性对照(以水为模板)

M: DNA molecular weight marker; H:Heart; L:Liver; SP:Spleen; ST:Stomach;K:Kidney; T:Testis; G;Gill; B:Brain; HK:Head kidney; l:Intestine;0:Negative control (water as template)

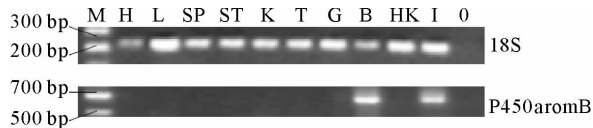
图 2 P450aromA 在雄性黄颡鱼各组织中的表达

Fig. 2 The expression of P450aromA in male

P. fulvidraco

2.3 雄性黄颡鱼 P450aromB 在各组织中的表达

通过 RT-PCR 方法检测,发现 P450aromB 在雄性黄颡鱼心脏、肝、脾、胃、肾、性腺、鳃、脑、头肾和肠 10 种组织中,只在雄鱼脑和肠中有较高强度表达,且脑中相对表达量高于肠(图 3、图 4)。



M:DNA 分子量标准; H:心脏;L:肝脏;SP:脾;ST:胃;K:肾;T:精巢;G:鳃;B:脑;HK:头肾;l:肠;0:阴性对照(以水为模板)

M: DNA molecular weight marker; H:Heart; L:Liver; SP:Spleen; ST:Stomach; K:Kidney; T:Testis; G;Gill; B:Brain;HK:Head kidney; l:Intestine;0:Negative control (water as template)

图 3 P450aromB 在雄性黄颡鱼各组织中的表达

Fig. 3 The expression of P450aromB in male

P. fulvidraco



图 4 雄鱼 P450aromB 在组织中的相对表达量(P450aromB/18S)

Fig. 4 The expression level of P450aromB in different tissues of male

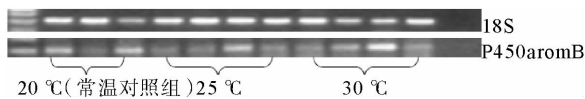
P. fulvidraco (P450aromB/18S)

2.4 雄性黄颡鱼不同温度条件下 P450aromB 在脑中表达水平的变化

由于雄性黄颡鱼 P450aromA 和 P450aromB 在性腺中均无表达,P450aromB 只在脑中表达。本实验采用脑作为对象,观察在不同温度条件芳香化酶表达状况。结果表明,对 20(常温对照组)、25、30℃ 3 个不同温度条件下,雄性黄颡鱼 P450aromB 表达在组间差异显著;且随着温度升高,表达量出现显著性下降,30℃ 达到最低(图 5、图 6)。

2.5 雄性黄颡鱼在不同温度条件下血浆中 T 和 E₂ 水平变化

测定血浆中睾酮 T 和 E₂ 含量,结果表明,雄性黄颡鱼血浆中 T 和 E₂ 水平在 3 组中存在显著性下降且趋势相同,在 20℃ 常温对照组,T 平均含量是 4.31ng/ml(n=4),E₂ 平均含量是 10.54 pg/ml(n=4);在 25℃ 处理组,T 含量均值为 1.99ng/ml(n=4),E₂ 平均



20℃(常温对照组):HB14,HB16,HB18; 25℃: HC12,HC13,

HC15,HC16;30℃:HD11, HD12,HD17,HD18;0:阴性对照(以水为模板)

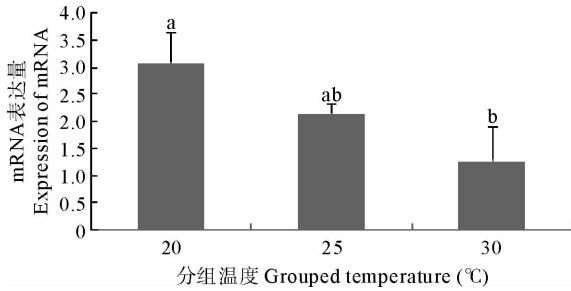
Negative control(water as template)

图 5 雄性黄颡鱼不同温度条件下 P450aromB 在脑中表达

Fig. 5 P450aromB expression in brain of male

P. fulvidraco at different temperature

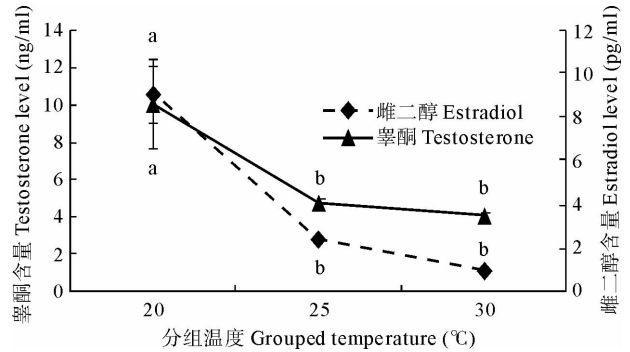
含量是 2.76 pg/ml($n=5$);在 30℃处理组,T 含量均值为 1.73 ng/ml($n=4$), E_2 平均含量是 1.14 pg/ml($n=5$),均达到最低(图 7)。



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)
Values are expressed as mean±standard error of mean.

Different letters indicate significant difference ($P<0.05$, one-way ANOVA, followed by Duncan's)

图 6 雄性黄颡鱼不同温度条件下 P450aromB 在脑中表达水平的相对变化量(P450aromB/18S)
Fig. 6 Relative level of P450aromB expression level in brain of male *P. fulvidraco* (P450aromB/18S) at different temperature



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)

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

图 7 不同处理组雄性黄颡鱼血浆中 T 和 E_2 含量变化
Fig. 7 Plasma testosterone and estradiol level in male *P. fulvidraco* of different treatment

3 讨论

本研究采用半定量 RT-PCR 的方法对雄性黄颡鱼 P450aromA 和 P450aromB 的 mRNA 组织表达进行分析,结果表明,P450aromA 在雄性黄颡鱼的 10 个组织中均无表达,研究结果与徐 跑等(2005a)对黄颡鱼研究结果相一致,也与奥利亚罗非鱼 *Oreochromis aureus* 雄鱼的研究结果相同(唐永凯等 2008)。但是,在金鱼 *Carassius auratus* 脑中检测到 P450aromA 微弱表达(Tchoudakova *et al.* 1998),在赤点石斑鱼 *Epinephelus akaara* 垂体和性腺中均有 P450aromA 表达(李广丽等 2004)。本研究中 P450aromB 只在雄性黄颡鱼脑和肠中有表达,脑表达量高于肠,与斑马鱼 *Danio rerio* 的研究结果相似,P450aromB 大量分布在雄性斑马鱼脑中,但在精巢、心脏、肝脏中没有任何表达(Chiang *et al.* 2001)。对于金鱼,P450aromB 只在脑中表达而不在精巢中表达(Tchoudakova *et al.* 1998)。但是,在牙汉鱼 *Odontesthes bonariensis* 的肾脏、垂体和脑中均有 P450aromB 表达(Pablo *et al.* 2005),而半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis* 脑和鳃中有 P450aromB 表达(陈彩芳 2010)。本研究结果表明,在处于成熟期的雄性黄颡鱼,CYP19A 和 CYP19B 在精巢中均无表达,CYP19B 在脑中高水平表达,这可能是由于 CYP19A 和 CYP19B mRNA 表达不仅取决于鱼的种类和精巢发育期,可能还与年龄以及外界因素有密切关系(Bla'zquez *et al.* 2005;Piferrer *et al.* 2005),其作用机制并不十分清楚。黄颡鱼脑内 P450aromB 的高水平表达,表明脑组织可能会通过芳香化酶作用将雄激素转化为雌激素,雄激素参与调节鱼类许多生理行为,如雄性性行为的激活、脑的性别差异以及类固醇激素对促性腺素分泌的负反馈调节(Cheshenko *et al.* 2008)。但是,雌激素在雄鱼中的生理学功能一直不清楚。

本文研究结果表明,采用处于精子排放期的黄颡鱼为研究对象,CYP19B mRNA 在黄颡鱼脑中的表达随着温度的升高而呈现显著下降趋势,此时实验鱼类血浆 T 和 E_2 含量均显著降低。已有的研究表明,鱼类和其他脊椎动物脑中芳香化酶活性受性腺或血液中性激素的调节(洪万树等 2000),睾酮对脑中性类固醇激素的芳香化作用存在正反馈调节(Kroon *et al.* 2005)。切除性腺的雄性大西洋鲑鱼 *Salmo salar*,其脑中芳香化酶活性降低,如果再给以埋植 T 或 11-酮基雄烯二酮,脑中芳香化酶活性就会提高(Mayer *et al.* 1991)。在

神经组织或腺体组织中芳香化酶活性分别有不同的调节机制,例如以雌激素或可被芳构化的雄激素处理金鱼,可使金鱼脑中芳香化酶活性提高,但脑垂体中芳香化酶活性不受影响(Pasmanik *et al.* 1988)。有研究发现,人脑组织能将雄激素芳香化为雌激素,这为雄激素在中枢神经内分泌组织内的芳香化提供了直接实验证据(Naftolin *et al.* 1971)。有人认为在硬骨鱼类中,脑型芳香化酶 P450aromB 参与了神经类固醇合成,可能影响了神经发育、脑的性别分化,进而影响雄性行为(Lephart 1996、1997;Robert *et al.* 2002)。但目前关于脑型芳香化酶对雄鱼的繁殖调控作用的研究鲜有报道(Seralin *et al.* 2001)。大多数研究者认为,鱼类精巢不能合成雌激素,脑是雄鱼雌激素合成的主要位点,雄鱼血清中较低的雌激素主要是由于脑芳香化酶将循环中的雄激素芳香化的结果,进而参与某些神经内分泌活动(Callard *et al.* 1978; Trant *et al.* 1994)。但在许多鱼类精巢中都检测到很高的芳香化酶 mRNA 表达(Tanaka *et al.* 1992; Ijiri *et al.* 2001),在本实验中雄性黄颡鱼 P450aromA 在排精期性腺中没有表达,P450aromB 在脑和肠中具有高水平表达,这与金鱼(Pasmanik *et al.* 1988)、大西洋鲑鱼(Mayer *et al.* 1991)、三刺鱼 *Gasterosteus aculeatus* (Borg *et al.* 1987)研究结果相似,且这 3 种鱼脑内芳香化酶活性生殖季节高于非生殖季节,与性腺发育的周期性和季节性变化吻合,而 P450aromA 在半滑舌鲷(陈彩芳 2010)精巢中表达与血清中 E_2 和 T 的变化趋势无相关性,似乎验证了血浆中雌激素可能来源于脑芳香化酶作用而合成的,与性腺型 P450aromA 无关这一说法。暗示脑内 P450aromB 的高表达与黄颡鱼成熟期存在密切关系,对雄性生殖功能可能起到重要调节作用。本文研究结果还显示,水温升高导致 P450aromB 表达量降低,血浆 T 和 E_2 含量均降低,进一步说明 P450aromB 可以将血液中的 T 芳香化为 E_2 ,由于 T 在温度升高时代谢清除率也在加强,致使它在血浆中的含量也在降低。因此,可以推测,在黄颡鱼排精期通过 P450aromB 活性维持一定水平的血浆 E_2 含量,可能与保持成熟精子活力和排精有关,但其生理机制需要深入研究。

本研究以排精期黄颡鱼为对象,研究了 P450aromB 表达与繁殖生理学指标的关联,发现了黄颡鱼精巢成熟期精子活力的保持可能与血浆 E_2 水平存在密切关系,且应激温度越高对血浆中 E_2 的水平影响越大,进而进一步影响成熟精子的活力和排精水平。研究结果为揭示雄性黄颡鱼内分泌生理机制提供了宝贵数据,同时也能够为全雄黄颡鱼育种提供重要参考。

参 考 文 献

- 李广丽,刘晓春,张勇,贝锦新,林浩然. 2004. 赤点石斑鱼两种芳香化酶 cDNA 的克隆及其表达的组织特异性. 动物学报,50(5): 791~799
- 陈彩芳. 2010. 四种细胞色素 P450 酶在半滑舌鲷繁殖生理机能中的作用研究. 见:中国海洋大学博士学位论文
- 洪万树,方永强. 2000. 鱼类芳香化酶活性研究的进展. 水产学报,24(3): 285~288
- 唐永凯,李建林,陈文华,俞菊华. 2008. 奥利亚罗非鱼卵巢芳香化酶基因的克隆及其表达. 中国水产科学,15(5): 729~737
- 徐跑,俞菊华,唐永凯,吴婷婷. 2005a. 黄颡鱼卵巢 P-450arom 基因的克隆及组织表达. 中国水产科学,12(5): 541~548
- 徐跑,俞菊华,李建林,夏德全. 2005b. 黄颡鱼脑 P-450 芳香化酶基因的克隆和组织表达. 水产学报,29(5): 591~598
- 温海深,宋海霞,杨立廷,马学坤,高玲. 2006. 外源激素对养殖牙鲆血浆睾酮和雌二醇含量的影响研究. 海洋学报(中文版),28(4): 115~120
- Bjerselius, R., Lundstedt-Enkel, K., Olsen, H. *et al.* 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17β -estradiol. *Aquat. Toxicol.* 53: 139~152
- Bla'zquez, M., and Piferrer, F. 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol. Cell Endocrinol.* 219: 83~94
- Borg, B., Timmers, R. J., and Lambert, J. G. 1987. Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. I. Distribution and effects of season and photoperiod. *Exp. Biol.* 47: 63~68
- Callard, G. V., Petro, Z., and Ryan, K. J. 1978. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. *Endocrinology*, 103: 2 283~2 290
- Callard, G. V., Petro, Z., and Ryan, K. J. 1981. Estrogen synthesis in vitro and in vivo in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 29: 14~20
- Cavaco, J. E., Baal, J., Dijk, W. *et al.* 2001. Steroid hormones stimulate gonadotrophs in juvenile male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol. Reprod.* 64: 1 358~1 365
- Cheshenko K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., and Eggen, R. I. I. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expres-

- sion or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 155:31~62
- Chiang, E. F. L., Yan, Y. L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., and Chung, B. C. 2001. Two Cyp 19 (P450 aromatase) gene on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol. Biol. Evol.* 18(4):542~550
- Choate, J. V., and Resko, J. A. 1994. Prenatal inhibition of aromatase activity affects luteinizing hormone feedback mechanisms and reproductive behaviors of adult guinea pigs. *Biol. Reprod.* 51: 1 273~1 278
- Corbin, C. J., Hughes, A. L., Heffelfinger, J. R. *et al.* 2007. Evolution of suiform aromatases: ancestral duplication with conservation of tissue specific expression in the collared peccary (*Pecari tayassu*). *Mol. Evol.* 65 (4): 403~412
- D'Cetta, H., Footier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., and Baroiner, J-F. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature- induce sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Repro. Dev.* 59: 265~276
- Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J. *et al.* 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod.* 54 (2):154~162
- Ijiri, S., Berard, C., and Trant, J. M. 2001. Characterization of gonadal and extra-gonadal forms of the cDNA encoding the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) cytochrome P450 aromatase (CYP19). *Mol. Cell. Endocrinol.* 164: 169~181
- Kishida, M., and Callard, G. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocri.* 142: 740~749
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., and Abe, S. I. 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.* 23:167~176
- Kroon, F. J., Munday, P. L., Westcott, D. A. *et al.* 2005. Aromatase pathway mediates sex change in each direction. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 272: 1 399~1 405
- Kwon, J. Y., McAndrew, B. J., and Penman, D. J. 2001. 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*. *Mol. Reprod. Dev.* 59(4):359~370
- Lephart, E. D. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res. Rev.* 22:1~26
- Lephart, E. D. 1997. Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61:375~380
- Mayer, G. A., Borg, B., Berglund, I. *et al.* 1991. Effects of castration and androgen treatment on aromatase activity in the brain of mature Atlantic Salmon (*Salmo salar* L) parr. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82:86~92
- Naftolin, F., Ryan, K. J., and Petro, Z. 1971. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:368~370
- Pablo, H. S-M., Natalia, P. M., López, G. C. *et al.* 2005. Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143: 21~32
- Pasmanik, M., Schlinger, B. A., and Callard, G V. 1988. In vivo steroid regulation of aromatase and 5 α -reductase in goldfish brain and pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 175~182
- Piferrer, F., and Bla'zquez M. 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 31:215~226
- Robert, H. D., and Yoshitaka, N. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191~364
- Seralin, G. E., and Moslemi, S. 2001. Aromatase inhibitors: past, present and future. *Mol. Cell Endocrinol.* 178: 117~131
- Simpson, E. R., Clyne, C. *et al.* 2002. Aromatase-a brief overview. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 93~127
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., and Graham, L. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15: 342~355
- Tanaka, M., Telecky, T. M., Fukada, S. *et al.* 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450aromatase (P450arom) from a rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ovary: relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 β in the ovary. *Mol. Endocrinol.* 8 (1): 53~61
- Tchoudakova, A., and Callard, G. V. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology*, 139: 2 179~2 189
- Trant, J. M., Gavasso, S., Ackers, J., and Chung, A. R. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.* 290: 475~483
- Trant, J. M. 1994. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450 arom. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95:155~168