

17 β -雌二醇诱导鲮鱼雌性化的机制： 芳香化酶和雌激素受体双染定位研究

翁幼竹¹, 张为民², 方永强¹, 刘丽丽¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 571002)

摘要:用免疫细胞化学双重染色技术和鼠抗人芳香化酶抗体、兔抗人雌激素 α 受体与 β 受体亚型(ER- α 和ER- β)抗体、兔抗人雌激素(E_2)抗体,对鲮鱼(*Mugil cephalus*)脑各部位进行定位研究。结果显示,芳香化酶和 E_2 、芳香化酶和ER- α 、芳香化酶和ER- β 、ER- α 和 E_2 的双染免疫活性物质分布在鲮鱼嗅脑、大脑、间脑和小脑的神经细胞的胞核或胞质及其突起或神经纤维上。值得指出的是,鲮鱼下丘脑视前区芳香化酶免疫活性细胞上共存有雌激素 α 受体与 β 受体亚型,提示 E_2 诱发鲮鱼雌性化的作用机制是, E_2 先与芳香化酶样神经细胞上的雌激素受体结合,而后激发与性分化相关的芳香化酶基因的表达。

关键词:鲮鱼; 17 β -雌二醇; 芳香化酶; 雌激素受体; 双重染色

中图分类号: Q959.478

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2003)06-0446-05

鲮鱼(*Mugil cephalus*)是我国东南沿海重要的养殖经济鱼类,其经济价值主要体现在卵巢上。据报道,在台湾已将鲮鱼卵巢加工为鱼仔酱,行销日本,被日本誉为三大海珍品之一^[1]。培育全雌鲮鱼也成为水产养殖的新热点。已有报道认为,在鲮鱼苗性分化前,投喂添加了一定剂量17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E_2)的颗粒饲料,可诱产生全雌鲮鱼^[2-4]。为探讨 E_2 诱导鲮鱼雌性化的机理,作者曾研究 E_2 对鲮鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞发育和分泌活动的影响,研究显示, E_2 可刺激脑垂体促性腺激素分泌细胞提早发育并进入分泌活动^[5]。后来,用原位杂交和免疫细胞化学方法研究显示,服用 E_2 的实验组鲮鱼下丘脑视前区芳香化酶转录物和蛋白的数量明显高于对照组,表明 E_2 诱导鲮鱼的雌

性化与芳香化酶的表达有关。据报道,芳香化酶是鱼类卵巢分化的关键酶,可调控性分化的方向^[6-7]。而 E_2 是如何刺激脑内芳香化酶基因的表达则成为问题焦点。作者设想 E_2 可能通过脑内芳香化酶样神经细胞上雌激素受体的介导,而激发芳香化酶基因表达的。本研究应用免疫细胞化学双重染色技术对鲮鱼脑内各部进行定位研究以证实这一设想。

1 材料和方法

1.1 鲮鱼雌性化培育

2001年4月将从厦门海区捕捞的鲮鱼苗(体长3.1~5.0 cm,体重0.68~1.20 g)放在福建龙海市福建省水产研究所苗种繁育中试基地的土池中养殖。组织切片表明,此时鱼苗尚未性分化。鱼苗在土池中适应1周,待恢复正常摄食后,开始投喂添加17 β -雌二醇的颗粒饲料,配制方法见文献[8]。每日投喂2次,上午投喂含雌激素的饲料,下午补足一天的饲料量。逐月取15尾作组织切片,检查性腺发育情况。持续用药6个月即停止用药。

1.2 样品制备

收稿日期:2003-05-19; 修订日期:2003-07-28.

资助项目:国家自然科学基金项目(30070598);福建省重中之重项目.

作者简介:翁幼竹(1968-),女,博士,副研究员,主要从事海洋动物生殖内分泌学研究. E-mail: xmwyz@public.xm.fj.cn

通讯作者:方永强. E-mail: fant98@public.xm.fj.cn

取投药后1个月尚未性分化的鱼苗共12尾,用少量的丁香酚麻醉后,解剖分离出完整的脑组织,固定于不含醋酸的Bouin氏液中,常规梯度酒精脱水 and 二甲苯透明,paraplast包埋,连续横切,切片厚7 μ m。参照Hibiya^[9]的专著,在显微镜下挑选出脑各部切片,用于免疫细胞化学双染反应。

1.3 免疫细胞化学双染反应

双染检测试剂盒为Zymed公司产品。染色程序采用LAB-SA(Labeled-[strept] Avidin-Biotin)法。鲮鱼脑切片脱蜡至水后,在3% H₂O₂-甲醇液中放置10 min,以除去内源性过氧化物酶活性。血清封闭10 min后,滴加第1种一抗,4℃孵育36~48 h,0.05% Tween-PBS(TP)洗。滴加生物素化二抗,室温孵育20 min,TP洗。滴加链霉卵白素-碱磷酶耦合物,孵育20 min,TP洗。滴加碱磷酶的底物-色素混合液显色,显微镜下观察显色结果,然后用TP洗。滴加双染增强剂,室温孵育30 min,TP洗。加血清封闭10 min后,滴加第2种一抗,4℃孵育36~48 h,TP洗。滴加生物素化二抗,室温孵育20 min,TP洗。滴加过氧化物酶标记链霉卵白素,孵育20 min,TP洗。滴加过氧化物酶的底物-色素混合液显色,显微镜下观察显色结果,TP洗。滴加封片剂覆盖组织,于60℃下20 min。该试剂盒采用2种不同的显色系统来显示结果,第1种一抗的免疫反应显暗紫色,第2种一抗的反应显红色。

所用一抗包括:鼠抗人芳香化酶抗体(1:300稀释)、兔抗人雌激素受体亚型 α 和 β 受体抗体(分别以1:400和1:300稀释)、兔抗人E₂抗体(1:100稀释)。

对照实验:用PBS替代一抗同步反应,结果显示免疫阴性。

2 结果

2.1 芳香化酶和E₂的免疫活性双标神经元在鲮鱼脑的定位

鲮鱼脑的双染结果显示,芳香化酶和E₂的免疫活性双标神经元定位在鲮鱼嗅脑、下丘脑视前区和小脑。在视前区,可见小型神经细胞的胞体对芳香

化酶抗体显免疫活性反应,染紫色,胞突则对E₂抗体显免疫活性反应,染红色(图版I-1)。免疫活性双标神经元在嗅脑的表达与视前区相似。而在小脑,免疫活性双标神经元的胞体大小不一,芳香化酶和E₂免疫阳性反应呈紫色和红色混杂,阳性物质定位在胞质或沿胞膜分布,胞核不着色(图版I-2)。

2.2 雌激素 α 受体亚型和芳香化酶的免疫活性双标神经元在鲮鱼脑的定位

在嗅脑、大脑、下丘脑视前区均有雌激素 α 受体亚型(estrogen receptor alpha, ER- α)和芳香化酶的免疫活性双标神经元分布。下丘脑视前区外侧免疫活性双标神经元有2种不同的定位:一是ER- α 免疫活性定位在神经细胞的胞核或胞质,显深紫色,而芳香化酶免疫活性定位在胞突,显红色(图版I-3);二是神经细胞的胞质显ER- α 免疫活性,胞膜则显芳香化酶免疫活性。此外,大量的ER- α 和芳香化酶免疫活性双标神经元定位在大脑的神经细胞,胞质显ER- α 免疫活性,染为深紫色,芳香化酶免疫活性显红色,定位在胞突上(图版I-4)。

2.3 雌激素 β 受体亚型和芳香化酶的免疫活性双标神经元在鲮鱼脑的定位

雌激素 β 受体亚型(estrogen receptor beta, ER- β)和芳香化酶免疫活性双标神经元存在于鲮鱼大脑,前者染深紫色,定位在神经细胞胞核或胞质,后者显红色,定位在胞膜和胞突上(图版I-5)。与ER- α 和芳香化酶双标神经元相似,ER- β 和芳香化酶双标神经元也存在于鲮鱼的嗅脑和下丘脑视前区,但数量很少。

2.4 ER- α 和E₂的免疫活性双标神经元在鲮鱼脑的定位

在下丘脑视前区内侧,ER- α 和E₂免疫活性双标神经元清晰可见。ER- α 免疫活性定位在神经细胞体,显深紫色,E₂免疫活性则在神经纤维或突起,显鲜红色(图版I-6)。在视前区外侧,可见有一串神经细胞的胞体、突起和神经纤维显ER- α 和E₂免疫活性。胞体显深紫色,为ER- α 免疫活性,突起和纤维显红色,为E₂免疫活性(图版I-7)。在嗅脑,可见神经细胞胞质呈ER- α 免疫活性,胞质突起呈E₂免疫活性,胞核不着色,(图版I

-8)。ER- α 和 E_2 免疫活性双标神经元还存在于大脑。

3 讨论

作者曾有研究发现,服用 E_2 的实验组鲮鱼下丘脑视前区芳香化酶转录物和蛋白的数量明显高于对照组,表明 E_2 诱导鲮鱼雌性化与芳香化酶的表达有关。为进一步分析 E_2 和芳香化酶的关系,必须了解鲮鱼脑各部包括下丘脑视前区中芳香化酶样神经细胞上是否存在 E_2 受体。弄清这一关键问题,有助于了解 E_2 在鲮鱼脑内的作用方式,并从深层次上了解 E_2 的作用机理,具有重要的理论和学术意义。从本研究结果可以看出,鲮鱼脑各部的芳香化酶样神经细胞上存在 E_2 ,下丘脑视前区芳香化酶样神经细胞上还存在 ER- α 与 ER- β ,芳香化酶免疫活性定位在胞突,ER 则定位在神经细胞胞核或胞质。这些结果表明, E_2 的作用方式可能是,先与芳香化酶样神经细胞上的 ER(ER- α 和 β) 结合,而后激发芳香化酶细胞的生理效应。类似情况还可见于一种哺乳类麝,其脑内视前内侧区和下丘脑腹内侧核同一神经细胞上 ER 和芳香化酶共存^[10]。此外,由于 ER 可介导 E_2 对脑内促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)神经元的生理效应^[11],因此,作者认为 E_2 还可能与鲮鱼脑内其他细胞上的 ER 结合,而激发 GnRH 神经元的生理效应。对 E_2 在鲮鱼脑内的生理作用及其机制有更全面的了解。

上述研究表明, E_2 在鲮鱼脑内可能有 2 种生理作用:一是 E_2 与芳香化酶样神经细胞上的 ER 结合,而后诱发与性分化相关的芳香化酶基因的表达,这可能是 E_2 诱导鲮鱼雌性化的机制;二是 E_2 与脑内 ER 结合,尔后激发 GnRH 神经元,使之分泌 GnRH,作用于脑垂体促性腺激素分泌细胞,使之发育

成熟。这可能是 E_2 诱发鲮鱼脑垂体促性腺激素分泌细胞发育并进入分泌活动^[5]的原因。

参考文献:

- [1] 徐进财. 吃出鲮鱼的健康[J]. 中国水产(台湾),1997(523): 3-12.
- [2] Cang C F, Lan S C, Pan B S. Feed administration of estradiol-17-beta stimulates female differentiation in juvenile grey mullet *Mugil cephalus*[J]. Zool Studies, 1995, 34(4): 257-264.
- [3] 方永强,翁幼竹,林君卓,等. 全雌鲮鱼培育的研究[J]. 水产学报,2001,25(2):131-135.
- [4] 翁幼竹,林君卓,方永强,等. 全雌鲮鱼培育的进一步研究[J]. 台湾海峡,2001,20(4):547-551.
- [5] 林君卓,翁幼竹,方永强. 17 β -雌二醇对鲮鱼脑垂体促性腺激素细胞分泌活动的影响[J]. 台湾海峡,2002,21(4):452-456.
- [6] Guiguen Y, Riordel M J, Fostier A. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): in vivo treatments, aromatase gene expression[J]. J Exp Zool, 1998, 281: 506-512.
- [7] Piferrer F, Zanuy S, Larrillo M, et al. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males[J]. J Exp Zool, 1994, 270: 255-262.
- [8] 方永强,李正森. 17 β -甲基睾酮刺激鲮鱼精子发生机制的初步研究[J]. 海洋与湖沼,1988,20:10-14.
- [9] Hibiya T. An atlas of fish histology: normal and pathological features[M]. New York: Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1985.
- [10] Veney S L, Rissman E F. Co-localization of estrogen receptor and aromatase enzyme immunoreactivities in adult musk shrew brain[J]. Hormones Behavior, 1998, 33: 151-162.
- [11] Butler K I, Barkoviss-Kallo J A, Goubillon M, et al. Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen[J]. J Neuroendocrinology, 2001, 13: 741-748.

Mechanism of 17 β -estradiol inducing female sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*: localization of double staining of aromatase and estrogen receptors

WENG You-zhu¹, ZHANG Wei-min², FANG Yong-qiang¹, LIU Li-li¹

(1. Third Institute of Oceanography, State Ocean Administration, Xiamen 361005, China;

2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Immunocytochemical localization in each region of grey mullet *Mugil cephalus* brain was carried out using immunocytochemical double staining technique and mouse anti-human aromatase, rabbit anti-human estrogen receptor (α and β subtypes) and rabbit-human estrogen (17 β -estradiol, E_2) antibodies. The results indicated that double-staining immunoreactive substance of aromatase and E_2 , aromatase and ER- α , aromatase and ER- β , ER- α and E_2 distributed in the the nucleus, cytoplasm and its protrusion and nerve fiber of neurons in telencephalon (olfactory bulb and cerebrum), diencephalon and cerebelli of grey mullet. It was worth noticing that the coexistence of aromatase-like immunoreactive cells and estrogen receptors α and β subtypes in the hypothalamic preoptic area could show that the action mechanism of E_2 inducing female sex differentiation in grey mullet is that E_2 combines with estrogen receptor at aromatase-like nerve cells, and then stimulates the expression of aromatase gene with relation to sex differentiation.

Key words: *Mugil cephalus*; 17 β -estradiol; aromatase; estrogen receptor; double staining

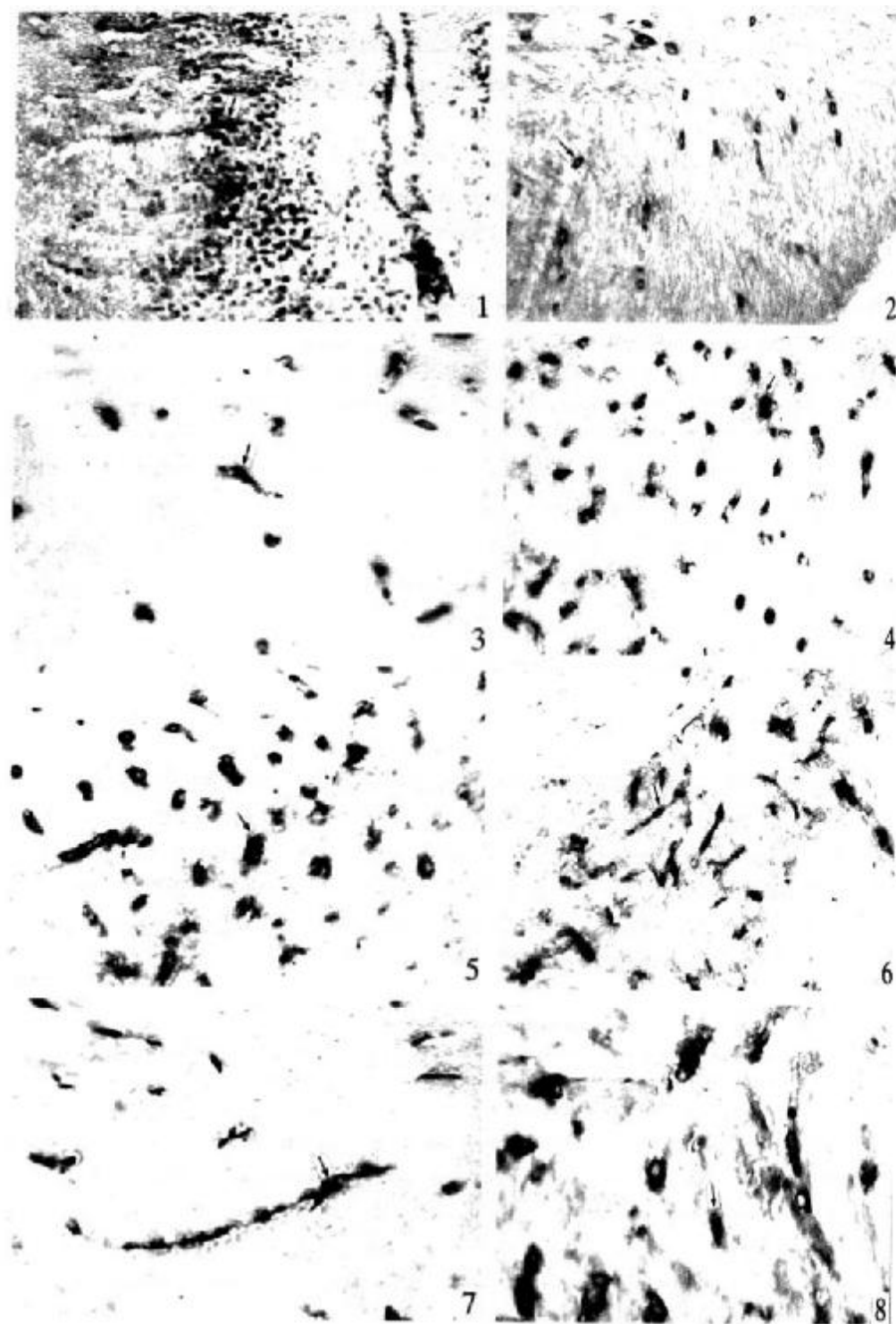
图版 I 说明

1. 芳香化酶和 E_2 免疫活性双标神经元(箭头)定位在鲷鱼下丘脑视前区,胞体染紫色,为芳香化酶免疫活性;胞膜和突起显红色,为 E_2 免疫活性, $\times 400$ 。
2. 芳香化酶和 E_2 免疫活性双标神经元(箭头)存在于鲷鱼小脑, $\times 400$ 。
3. ER- α 和芳香化酶免疫活性双标神经元(箭头)定位在鲷鱼下丘脑视前区, $\times 400$ 。
4. ER- α 和芳香化酶免疫活性双标神经元(箭头)定位在鲷鱼大脑, $\times 400$ 。
5. ER- β 和芳香化酶免疫活性双标神经元(箭头)存在于鲷鱼大脑, $\times 400$ 。
6. 鲷鱼下丘脑视前区中部存在着 ER- α 和 E_2 免疫活性双标神经元(箭头), $\times 400$ 。
7. 鲷鱼下丘脑视前区中一串神经细胞(箭头)共存着 ER- α 和 E_2 免疫活性, $\times 480$ 。
8. 鲷鱼嗅脑存在着 ER- α 和 E_2 免疫活性双标神经元(箭头), $\times 480$ 。

Explanation of Plate I

- 1, Double-staining neurons (arrow) of aromatase and estradiol were located at the hypothalamic preoptic area of grey mullet, the cell body stained purple showing aromatase immunoreactivity and the membrane and protrusion stained red showing estradiol immunoreactivity, $\times 400$.
- 2, Double-staining neurons (arrow) of aromatase and estradiol were located at the cerebelli of grey mullet, $\times 400$.
- 3, Double-staining neurons (arrow) of ER- α and aromatase were located at the hypothalamic preoptic area of grey mullet, $\times 400$.
- 4, Double-staining neurons (arrow) of ER- α and aromatase were located at the cerebrum of grey mullet, $\times 400$.
- 5, Double-staining neurons (arrow) of ER- β and aromatase were located at the cerebrum of grey mullet, $\times 400$.
- 6, Double-staining neurons (arrow) of ER- α and estradiol existed at the middle part of hypothalamic preoptic area of grey mullet, $\times 400$.
- 7, Coexistence of ER- α and estradiol in a string of neurons (arrow) was showed at the hypothalamic preoptic area of grey mullet, $\times 480$.
- 8, Double-staining neurons (arrow) of ER- α and estradiol existed at the olfactory bulb of grey mullet, $\times 480$.

翁幼竹 17 β -雌二醇诱导鲮鱼雌性化的机制：芳香化酶和雌激素受体双染定位研究
WENG You-zhu et al: Mechanism of 17 β -estradiol inducing female sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*: localization of double staining of aromatase and estrogen receptors



图版 I (说明见文末)

Plate I (Explanation of Plate I at the end of the text)