

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00068

## 芳香化酶抑制剂对暗纹东方鲀 *CYP19A*、*DMRT1* 基因表达及性腺分化的影响

黄波<sup>1</sup>, 杨小玉<sup>2</sup>, 戴奇<sup>1</sup>, 汪奇<sup>1</sup>, 云丹<sup>1</sup>, 周忠良<sup>1</sup>

1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062;
2. 江苏中润农业发展有限公司, 江苏 南通 226634

**摘要:** 采用组织学和分子生物学方法, 研究了投喂芳香化酶抑制剂来曲唑(LE)后暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)初孵仔鱼 *CYP19A*、*DMRT1* 基因表达以及性腺的组织学变化, 以期进一步了解 P450 芳香化酶(P450arom)在鱼类早期性别分化过程中的作用。RT-PCR 结果显示, 对照组样品 *CYP19A* 和 *DMRT1* 表达显示性二态, 雌性表达 *CYP19A* 基因, 雄性表达 *DMRT1* 基因。LE 处理组在性别分化期间, 雄性样品单一表达 *DMRT1*, 雌性样品则同时表达 *CYP19A* 和 *DMRT1*。qRT-PCR 结果显示: LE 处理组雌性仔鱼 *CYP19A* 基因表达被显著抑; 虽然在仔鱼出膜后 22 d(dph)的表达水平高于 9 dph, 但仅为同日对照组的 2.11%。LE 处理组雌性样品 22 dph 时 *DMRT1* 基因表达量上调, 至 150 dph 时达对照组雄性水平。55 dph 的性腺组织学结果表明, LE 处理可导致暗纹东方鲀稚鱼原始卵巢退化, 并向功能性精巢发育。150 dph 的 LE 处理组性腺均为精巢, 并与对照组精巢发育同步。结论认为, 暗纹东方鲀性腺分化期间 P450arom 是卵巢形成和维持发育所必须的, 抑制 P450arom 活性可导致雌性暗纹东方鲀发生雄性化逆转。

**关键词:** 暗纹东方鲀; 性别分化; 芳香化酶抑制剂(AI); *CYP19A*; *DMRT1*

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2013)01-0068-07

P450 芳香化酶(P450arom)是人及脊椎动物控制睾酮转化为雌激素的最关键酶, 催化睾酮和雄烯二酮转化为雌酮和雌二醇。而雌激素在鱼类卵巢分化、发育和雌性性别特征维持中起重要作用。为此 P450arom 在雌鱼性别分化中的作用受到人们的关注<sup>[1]</sup>。实验室应用 P450arom 抑制剂(AI)诱导鱼类雄性化的研究已有报道, AI 处理不仅可以使石斑鱼(*Epinephelus merra*)等雌性先熟的雌雄同体鱼类提前向雄性转化<sup>[2]</sup>, 也可导致罗非鱼(*Nile tilapia*)<sup>[3]</sup>、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)<sup>[4]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[5]</sup>等雌雄异体鱼类发生雄性化逆转。但也有与此相反结果的报告, 如 AI 和雌激素受体拮抗剂未能诱导日本青鳉(*Oryzias la-*

*tipes*)功能性雄性化<sup>[6]</sup>。由于相关的研究报道不多, 尤其是实验涉及的鱼类种类较少, 目前对研究报道中出现矛盾的结果还未能作出合理解释。进一步的研究不仅可增加对 P450arom 在鱼类早期性别分化中作用机制的了解, 同时对养殖鱼类的单性育种也具有理论指导意义。

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)俗称河鲀, 是长江中下游水域中的名贵鱼种。长期以来, 由于野生河鲀血液、肝、卵巢等器官组织含有剧毒而影响食用。随着暗纹东方鲀人工养殖技术不断成熟<sup>[7]</sup>, 毒素得到有效控制, 养殖规模不断扩大, 逐渐成为重要的特种水产品。雄性个体毒素含量远低于雌性, 因此河鲀单雄性养殖将是安全生产

收稿日期: 2012-02-29; 修订日期: 2012-04-25.

基金项目: 上海自然科学基金(08ZR1407300).

作者简介: 黄波(1986-), 男, 硕士, 主要从事水生动物毒理学研究. E-mail: bobisma86@163.com

通信作者: 周忠良, 男, 副教授. E-mail: zhouzl@mail.ecnu.edu.cn

的重要途径之一。研究发现, 暗纹东方鲀仔稚鱼在性别分化过程中 *CYP19A* 基因表达呈现明显的性二态现象, 雌性在孵化后 16 d *CYP19A* 基因表达量显著上调, 而雄性则在 66 d 时略有上调<sup>[8]</sup>。调节控制 *CYP19A* 的表达是否能有效控制河鲀性别分化方向, 提高雄性化比例, 是人工诱导培育单雄性鱼类群体的理论基础。本研究探讨了人工养殖条件下以芳香化酶抑制剂来曲唑(LE)对暗纹东方鲀仔稚鱼 *CYP19A* 基因表达、雄性标志性基因 *DMRT1* (doublesex and mab-3-related transcription factor 1) 以及性腺组织变化的影响, 以期为鱼类性别调控研究提供必要的的数据, 也为暗纹东方鲀的单雄性诱导提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物与试剂

实验于 2011 年 4—9 月在江苏省南通市江苏中润农业发展有限公司进行。实验用暗纹东方鲀样品为人工受精初孵仔鱼, 在直径 2.2 m 的玻璃圆桶中驯化 1 周。

TRIzol 试剂(TaKaRa 公司), SYBR Green Assay 逆转试剂盒(TaKaRa 公司), 琼脂糖(Amersco), SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 试剂盒(TaKaRa 公司), Goldview(TaKaRa 公司)、DNA Marker 2000(TaKaRa 公司), 其他化学试剂均为分析纯。来曲唑(1-[双(4-氰基苯基)甲基]-1,2,4-三氮唑, LE)购自湖北远成药业有限公司。

### 1.2 LE 处理和取样

实验在直径 2.2 m 的玻璃圆桶中进行。每个圆桶中投放 500 尾仔鱼。共 4 个圆桶, 2 个为平行实验组, 2 个为平行对照组; 实验过程中增氧, 每天早晚投喂 2 次, 活饵料+人工饲料; 隔日换水 1/3。实验组投喂人工饲料中添加芳香化酶抑制剂来曲唑(LE), 剂量为 1.25 g/(kg·d)[LE/(鱼苗·d)]; 对照组不添加。

孵化后 9 d(dph)开始处理, 持续处理 50 d, 停药后清水饲养至 150 dph 结束。分别于 9 dph、22 dph、35 dph、55 dph 和 150 dph 取样, 每个平行组取 20 尾, 处理组和对照组共取 80 尾。平均体长

在 0.5 cm 以下时, 取整条仔鱼; 平均体长在 0.5~1.0 cm 之间时, 去头尾取躯干部分; 平均体长 1~4 cm 时, 去头尾及部分腹壁取带有性腺的部分躯干; 平均体长 4 cm 以上时只取性腺。组织学样品用 Bouin 氏液固定后转至 70% 乙醇保存; 分子样品暂放液氮中带回实验室进一步处理。

### 1.3 组织学观察

常规石蜡切片, 切片厚 6 μm, HE 染色, 光学显微镜观察并拍照记录。

### 1.4 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因的引物设计

*CYP19A* 基因引物参照李延伸等<sup>[8]</sup>, 暗纹东方鲀性腺 *DMRT1* 基因 RT-PCR 引物设计: 根据 GenBank 中已有的红鳍东方鲀(BAF93506.1), 绿河鲀(*Tetraodon nigroviridis*, CAF99837), 罗非鱼(XP\_003444528), 黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*, AAP84972), 青鲈(AAL02165)等鱼的 *DMRT1* 基因核苷酸及氨基酸序列, 在 DM 保守结构域内设计 *DMRT1* 基因简并引物, 以暗纹东方鲀成鱼性腺的 cDNA 为模板, PCR 扩增选择条带单一清晰的目的基因片段回收, 送上海生工生物工程技术服务有限公司克隆测序, 所得序列与 GenBank 核酸数据库中的已知序列进行 Blastx 同源性分析。根据本实验需求选取了 1 对兼并引物用于 RT-PCR 表达分析, 引物序列 CAGGATGCCCAAGTGCT (5'-3'), CGCT AAAGATGGGTGGG(5'-3')。

### 1.5 实时定量 PCR 检测

参照李延伸等<sup>[8]</sup>的雌性暗纹东方鲀 *CYP19A* 特异性引物, 同时根据常规 PCR 得到的暗纹东方鲀 *DMRT1* 序列片段, 应用 Primer Premier 5 软件设计了 *DMRT1A* 可行的 Real-time PCR 引物, 其中 *MEST* 基因是内参基因(表 1)。

对每一个样品进行总 RNA 抽提, 用 1.2% 凝胶电泳进行抽提检测, 测量 RNA 总浓度, 取 1 μg 总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 分装备用。参照 Real-time PCR 的方法<sup>[9]</sup>对设计好的引物进行扩增并对该基因表达做记录。最后采用相对定量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  分析方法<sup>[10]</sup>对所有数据进行分析。计算公式:

$$\text{mRNA 相对表达量} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

表 1 real-time PCR 引物及参数  
Tab.1 Primers and parameters of real-time PCR

引物名称 primer	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')	产物长度/ bp product size	退火温度 anneal temp
<i>MEST</i> -F	TCGCTCTTGAGCTGCTTT	109	53℃
<i>MEST</i> -R	CGTGGATGATGCGTTTCT		54℃
<i>CYP19A</i> -F	CCGAGGCTACTTCACCAA	185	53℃
<i>CYP19A</i> -R	GTCCACCTGAGCCAAATC		52℃
<i>DMRT1A</i> -F	CGGCAGGCTCAAGAGGAGGA	156	60℃
<i>DMRT1A</i> -R	TGGGACCACAGAAGAAGACGT		60℃

其中  $\Delta\Delta C_t = [C_t(CYP19A) - C_t(MEST)]_{目的组} - [C_t(CYP19A) - C_t(MEST)]_{对照组}$ 。

## 1.6 数据分析:

结果以平均值 $\pm$ 标准误( $\bar{x} \pm SE$ )的形式表示。采用 SPSS18.0 处理所有数据。用单因素方差分析进行分析,  $P < 0.05$  为差异显著;  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 LE 处理对仔鱼 *CYP19A* 基因表达量的影响

以 *MEST* 作为内参基因, 以 9 dph 样品为对照, 应用荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测对照和实验组暗纹东方鲀仔鱼性别分化过程中 *CYP19A* 基因表达量变化(图 1)。9 dph 时, 检测到的 *CYP19A* 表达量较低, 在各样品之间没有显著差异( $P > 0.05$ )。

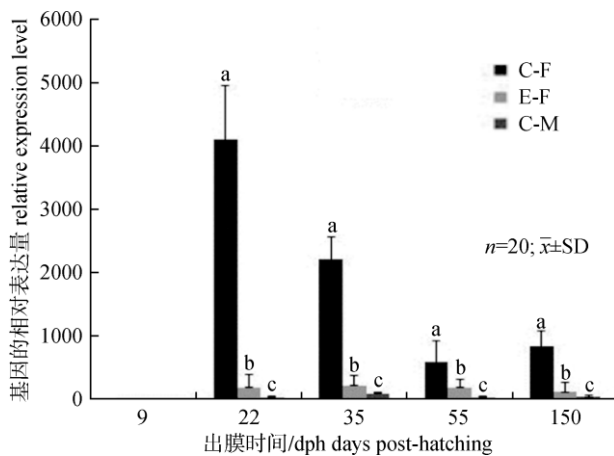


图 1 来曲唑处理暗纹东方鲀仔鱼后 *CYP19A* 基因的相对表达量

C-F 表示对照组雌鱼; E-F 表示实验组雌鱼; C-M 表示对照组雄鱼。不同小写字母表示同组间差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 1 The relative expression level of *CYP19A* gene in *Takifugu obscurus* larva treated with letrozole (LE)

C-F: control female; E-F: female treated with LE; C-M: male treated with LE. Different letters mean significant difference( $P < 0.05$ ).

22 dph 时对照组中 50% 样品的 *CYP19A* 基因表达显著上调( $P < 0.05$ ), 平均表达量约为 9 dph 时的 4 113 倍, 显示出雌性个体的表达特点<sup>[8]</sup>, 另外 50% 样品的 *CYP19A* 基因表达则没有明显上调, 显示出雄性个体的表达特点。LE 处理组样品也明显地显示出性二态现象, 但雌性个体的 *CYP19A* 平均表达水平仅比 9 dph 上调 189 倍, 为同日对照的 2.11%。实验期间, 对照组 *CYP19A* 表达有所波动, 35 dph 时下降至 22 dph 的 50%, 55 dph 时继续下降约为 22 dph 的 18%; 此后维持在此水平上下。而 LE 处理组 *CYP19A* 的表达在 35 dph、55 dph、150 dph 没有显著变化, 平均相对表达水平分别为 219, 187, 200, 但均显著低于同日的对照组。

### 2.2 LE 处理对仔鱼 *DMRT1* 基因表达量的影响

暗纹东方鲀仔鱼 *DMRT1* 基因的表达量也呈现出明显的性二态(图 2)。上述 *CYP19A* 基因表

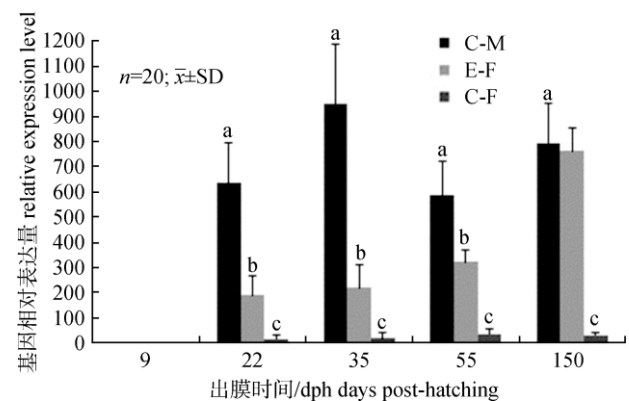


图 2 来曲唑处理暗纹东方鲀仔稚鱼 *DMRT1* 基因相对表达量

C-F 表示对照组的雌鱼; E-F 表示处理组; C-M 表示对照组雄鱼。不同小写字母表示同组间差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 The relative expression level of *DMRT1* in *Takifugu obscurus* larva treated with letrozole (LE)

C-F: female in control; E-F: female treated with LE; C-M: male treated with LE. Different letters mean significant difference( $P < 0.05$ ).

达量高的雌性样品, *DMRT1* 基因表达量则低(图 2, C-F), 而 *CYP19A* 表达量低的雄性样品(图 2, C-M) *DMRT1* 基因表达量则高。图 2 中可以看到, 与 9 dph 相比, 22 dph 对照组样品中, 雄性 *DMRT1* 基因表达显著上调, 平均表达量为 9 dph 时的 635 倍; 其后的 35 dph、55 dph、150 dph 时, 虽有变动, 但基本保持在这一水平。对照雌性样品中, *DMRT1* 虽有上调, 但表达量极低, 最高的在 55 dph 时也仅为对照雄性的 5.9%。LE 处理组 *DMRT1* 基因表达趋势与 *CYP19A* 正相反。22 dph、35 dph、55 dph、150 dph 时 *DMRT1* 基因的表达量分别是 9 dph 表达量的 189、219、321 和 763 倍, 显著高于各发育阶段对照组雌鱼( $P < 0.05$ )。至 150 dph 时, 实验组样品的 *DMRT1* 表达与对照的雄鱼接近无差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 LE 处理对仔鱼 *CYP19A*、*DMRT1* 基因表达的影响

图 3 是 35 dph 时暗纹东方鲀性腺 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因表达图谱。从图中可以看到, 对照组(图 3-A)4 个样品中 1、2 两个样品 *DMRT1* 基因条带明显, 而 3、4 两个样品 *CYP19A* 基因条带明显, 呈现出明显的性二态表达, 与定量检测结果相符。LE 处理组(图 3B)中, 5、7 两个样品可见明显的 *DMRT1* 基因条带, 显示雄性特点, 而 6、8 两个样品中不仅 *CYP19A* 和基因条带明显, 同时也可见到 *DMRT1* 基因条带出现, 即 2 种性别的标志基因在同个性腺中表达。

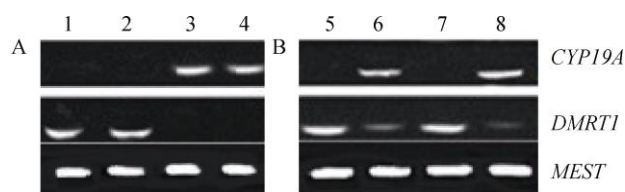


图 3 暗纹东方鲀 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因的表达

A. 对照组; B. 来曲唑处理组.

Fig. 3 The expression of *CYP19A* and *DMRT1* genes of *Takifugu obscurus*

A. control group; B. LE treatment group.

### 2.4 性逆转性腺的组织学特征

55 dph 时, 对照组中暗纹东方鲀性腺组织学分化已经结束(图 4)。从组织学切片中可以看到,

精巢的特征是中央为输精小管等体细胞所填充, 原始的精原细胞(Sc)位于精巢的外围, 由支持细胞包围而形成精小叶原基(图 4-A)。卵巢中央卵巢腔(Oc)明显, 卵原细胞(Og)围绕卵巢腔排列, 细胞大且呈圆形, 胞质较少。部分卵原细胞处于分裂相。卵巢壁向腔内凸起形成小叶。LE 处理组样品中, 部分样品具典型的精巢特征, 但未见具典型卵巢腔的组织样品; 约 50% 样品外周有一圈细胞核大、核仁染色较深的精原细胞, 以及被支持细胞包围的原始精小囊, 同时性腺中部又有残留的卵巢腔及退化的卵原细胞(图 4-C), 显示间性体特征。150 dph 时, LE 处理组样品均显示精巢组织学特征(图 4-D): 原始精小囊数量增加, 排列在精巢周围; 精小囊向内是排列整齐的输精小管, 并夹杂有核仁较大的精原细胞。与对照组精巢无明显区别。

### 3 讨论

在鱼类性别分化或转变过程中, 性激素比例是决定表型性别形成方向的关键, 雌激素过表达促使向卵巢分化, 雄激素促使向精巢的分化<sup>[11]</sup>。外源雌激素或雄激素诱导性别分化实验已经证明了这一观点<sup>[4]</sup>。脊椎动物内源雌二醇(E2)和 11-酮基睾酮(11-KT)均由睾酮(AT)转换而成。P450 芳香化酶(P450arom)催化 AT 氧化脱去 19-甲基转变成 E2, *CYP11B* 编码的 P45011 $\beta$  羟化酶(P45011 $\beta$ )则催化 AT 转化成 11-KT 的反应。因此 P450arom 是控制体内雌激素生成的关键酶<sup>[12-14]</sup>, 干扰 P450arom 的活性可改变动物内源雌激素的生成速率。在大鳞大马哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)<sup>[15]</sup>、尼罗罗非鱼<sup>[3,16]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[16]</sup>、斑马鱼<sup>[17]</sup>、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[18]</sup>、点斑篮子鱼(*Siganus guttatus*)<sup>[19]</sup>、红鳍东方鲀<sup>[4]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[20]</sup>等种类已证实, 应用 AI 可诱导仔鱼雄性, 本实验结果验证了在暗纹东方鲀也具有同样的诱导效果。

鱼类中存在两种编码 P450arom 的基因, 即 *CYP19A* 和 *CYP19B*。*CYP19A* 主要集中在性腺表达, 与卵巢发育关系密切, 其表达量存在明显的



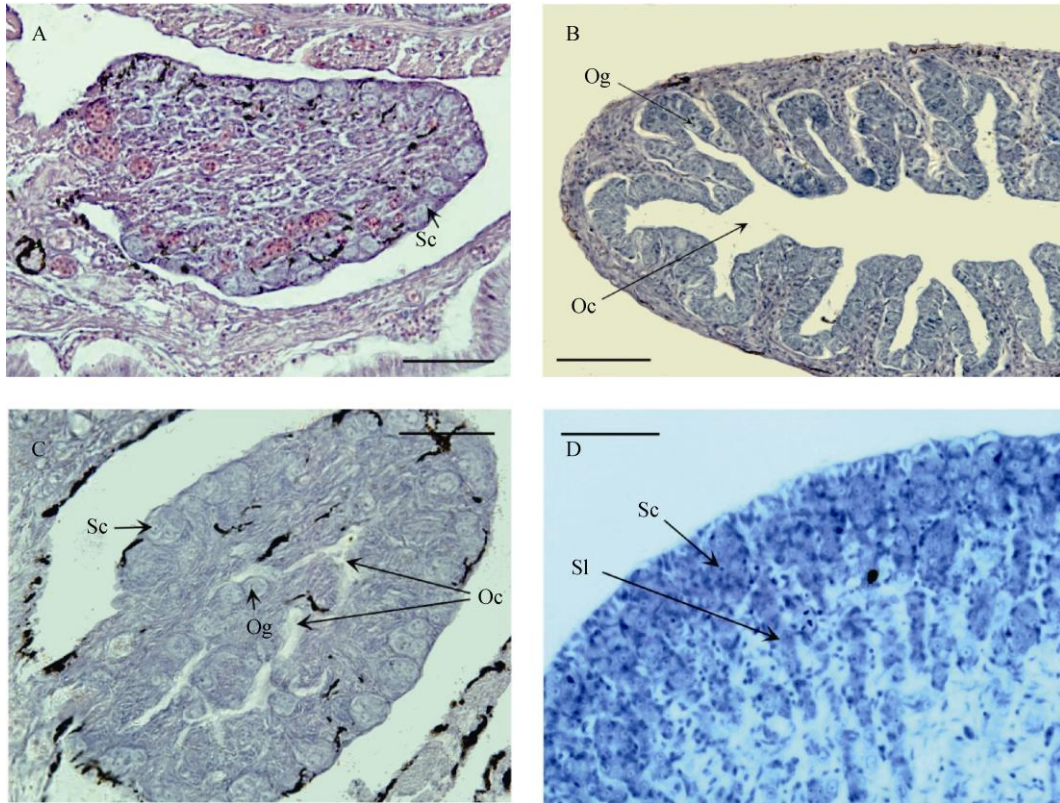


图 4 暗纹东方鲀性腺发育的组织学切片

A、B 分别为对照组 55 dph 的精巢和卵巢; C 为 LE 处理组 55 dph 的间性体性腺; D 为 LE 处理组 150 dph 的精巢。

Og 为卵原细胞; Oc 为卵巢腔; Sc 为精原细胞; Sl 为输精管细胞. 标尺=500 μm.

Fig. 4 Section of gonad in *Takifugu obscurus*

A, B. Testes and ovary in control at 55 dph, respectively; C. Inter-sexual gonads in LE-treated *T. obscurus* at 55 dph; D. Testes in LE-treated *T. obscurus* at 150 dph. Og: oogonia; Oc: ovarian cavity; Sc: spermatogonium; Sl: seminal lobule. Scale bar=500 μm.

性别差异,常作为雌性的标志基因。*CYP19B* 主要分布于神经中枢,其表达量与性别没有明显相关性<sup>[21]</sup>。不同 AI 试验中,*CYP19A* 基因表达反应不完全一致。100 μg/L 以上浓度的 LE 处理 72 h 可导致青鳞卵巢 *CYP19A* 基因表达水平显著高于对照<sup>[22]</sup>。本实验中 LE 处理的暗纹东方鲀仔鱼 *CYP19A* 表达明显下调,在整个处理期间始终保持在较低水平,显著低于对照雌鱼,与在罗非鱼、斑马鱼、红鳍东方鲀等种类的相关试验一致。*CYP19A* 的这种不同表现,可能与鱼个体所处的发育阶段以及处理时间长短有关。Sun 等<sup>[21]</sup>的实验采用的是青鳞成鱼,处于性成熟阶段,卵母细胞发育以及肝合成卵黄蛋白原等生理活动需要高水平的雌激素维持。AI 的作用使体内雌激素量骤然下降,短时间内 *CYP19A* 表达水平的提高可能是机体的应激补偿反应。若延长处理时间至卵巢

退化,*CYP19A* 的表达也可能下调。*CYP19A* 和 *CYP11B* 均在性腺的体细胞中表达并合成相应的酶。本实验以及其他种类的 AI 处理诱导雄性逆转实验都是在生命的早期阶段,性腺处于分化时期。*CYP19A* 等都是在性腺的体细胞中表达,因此性腺分化首先是性腺中体细胞进行分化。仅雌性化的体细胞中有 *CYP19A* 高表达。高的雌激素水平不仅是触发生殖细胞向卵原细胞分化所必须的,同时也与体细胞分化状态维持相关联。在小鼠 *DMRT1* 基因敲除研究中证实,高的雌激素水平是维持体细胞分化所必须的<sup>[23]</sup>。本实验室早期的研究也发现,暗纹东方鲀仔鱼 *CYP19A* 的表达早于性腺的组织学分化<sup>[8]</sup>,因此 AI 处理可抑制 P450arom 酶活,导致体内雌激素水平下降,进而使雌性体细胞脱分化。*CYP19A* 表达下调可能就是雌性体细胞脱分化的结果<sup>[1]</sup>。

在 P450arom 受抑制的同时, 11-KT 合成的通路可能得到加速, 雄激素的增加有可能使性腺中体细胞自发地向雄性分化。在本实验中, LE 处理导致基因型雌鱼 *DMRT1* 基因表达水平上调是一个很好的例证。*DMRT1* 是目前发现的从果蝇到人都具有的与性别相关的基因。本实验结果显示, 对照组仅雄性有 *DMRT1* 表达。这与在青鳉、斑马鱼、罗非鱼、石斑鱼、黑鲷和红鳍东方鲀<sup>[23]</sup>等多种鱼类研究结果一致, *DMRT1* 仅在精巢的支持细胞和精细胞中高表达, 卵巢中没有。因此 *DMRT1* 的表达可看作是雄性发育标志。本实验结果显示, LE 处理组基因型雌鱼的 *DMRT1* 和 *CYP19A* 基因在同一个体中表达, 说明性腺中同时存在雌、雄体细胞, 性腺正逆转向精巢分化。性腺组织学结果也显示, 从残留的卵巢腔、雌性生殖细胞与雄性生殖细胞同存, 到分化后期的单一雄性生殖腺特征, 进一步证实暗纹东方鲀幼鱼的性逆转过程。

综合以上分析可以得出这样的结论: 雌激素是暗纹东方鲀仔鱼性别分化中雌性分化和卵巢发育的必要激素; 抑制 P450arom 可导致基因型雌鱼发生雄性化逆转, 形成有功能的精巢; 该阶段 *CYP19A* 基因表达下调和 *DMRT1* 表达上调是雄性化逆转的标志。

#### 参考文献:

- [1] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 165: 352–366.
- [2] 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.
- [3] Kwon J Y, McAndrew B J, Penman D J. Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia [J]. *J Fish Biol*, 2002, 60: 625–636.
- [4] Rashid H, Kitano H, Lee K H, et al. Fugu (*Takifugu rubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development [J]. *Sex Dev*, 2007, 1(5): 311–322.
- [5] Uchida D, Yamashita M, Kitano T, et al. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal [J]. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol*, 2004, 137: 11–20.
- [6] Kawahara T, Yamashita A. Estrogen-Independent Ovary Formation in the Medaka Fish, *Oryzias latipes*[J]. *Zool Sci*, 2000, 17: 65–68.
- [7] 吴剑峰, 华元渝. 暗纹东方鲀养殖技术[J]. *中国水产*, 2002, 8: 57–59.
- [8] 李延伸, 戴奇, 郭正龙, 等. 暗纹东方鲀性别分化的组织学及芳香化酶基因表达研究[J]. *复旦学报*, 2011, 50(5): 645–652.
- [9] Schmittgen T. Real-time quantitative PCR [J]. *Methods*, 2001, 25: 383–385.
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [11] Baroiller J F, Guiguen Y, Fostier A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish [J]. *Cell Mol Life*, 1999, 55: 910–931.
- [12] Schulz R W, Vischer H F, Cavaco J E B, et al. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 129B: 407–417.
- [13] Schulz R W, de França L R, Lareyre J J, et al. Spermatogenesis in fish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 165: 390–411.
- [14] Ankley G T, Bencic D C, Breen M S, et al. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action [J]. *Aquat Toxicol*, 2009, 92: 168–178.
- [15] 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]. *J Exp Zool*, 1994, 270: 255–262.
- [16] Guiguen Y, Baroiller J F, Ricordel M J, et al. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54: 154–162.
- [17] McAllister B G, Kime D E. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible spermdamage in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2003, 65: 309–316.
- [18] Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, et al. Aromatase inhibitors and  $17\alpha$ -methyltestosterone cause sex-reversal from

- genetical female to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Mol Reprod Dev 2000, 56: 1–5.
- [19] Komatsu T, Nakamura S, Nakamura M. Masculinization of female golden rabbitfish *Siganus guttatus* using an aromatase inhibitor treatment during sex differentiation[J]. Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol, 2006, 143(4): 402–409.
- [20] Tzchori G, Degani A. Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (*CYP19*) in the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2004, 138(3): 271–280.
- [21] Sun L, Shao X, Chi J, et al. Transcriptional responses in the brain, liver and gonad of Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) exposed to two anti-estrogens [J]. Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol, 2011, 153(4): 392–401.
- [22] Findlay B. Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen[J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 202: 11–17.
- [23] Yamaguchi A, Lee K H, Fujimoto H, et al. Expression of the *DMRT* gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. Comp Biochem Physiol D, 2006, 1: 59–68.

## Effect of aromatase inhibitor on expression of *CYP19A*, *DMRT1*, and gonadal sex differentiation in *Takifugu obscurus*

HUANG Bo<sup>1</sup>, YANG Xiaoyu<sup>2</sup>, DAI Qi<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>, YUN Dan<sup>1</sup>, ZHOU Zhongliang<sup>1</sup>

1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;  
2. Jiang Su Zhong Run Agricultural Development Co., Ltd., Nantong 226634, China

**Abstract:** As in all other lower vertebrates, sex differentiation in fish is susceptible to environmental and steroidogenic stimulation or inhibition. Alteration of the sex differentiation process is possible in many fishes through the manipulation of the environment and steroid function. Some chemicals, which have androgenic or estrogenic function, are known to alter the gonadal sex in fish from female to male or vice versa if administered during the period of gonadal sex differentiation. Other than direct androgenic or estrogenic effects, there are chemicals which are capable of disrupting the enzymatic pathway of natural androgenic-estrogenic balance in fish. Among the non-steroidal aromatase inhibitors (AI), letrozole is typically used as an effective human drug in the treatment of estrogen-dependent disease, including breast cancer, and was found to be effective in suppression of all estrogens after oral administration.

To assess the involvement of aromatase during gonadal sex differentiation in *Takifugu obscurus*, we fed fry of this species with letrozole [1.25g/(kg d)]. Gonadal development was observed histologically using a microscope, and the expression of *CYP19A* and *DMRT1* was measured during the period of sex differentiation. The results of RT-PCR revealed that there was a sexually dimorphic expression pattern of *CYP19A* and *DMRT1* in the *T. obscurus* fry during gonad differentiation. *CYP19A* was expressed in female, and *DMRT1* was expressed in male control fish. In fry treated with LE, both of *CYP19A* gene and *DMRT1* gene expression were observed in female, but only the *DMRT1* gene was expressed in male fry. A quantitative real-time PCR analysis revealed that the expression of the *CYP19A* gene in female was significantly inhibited after treatment with LE. Though expression of *CYP19A* was higher at 22 days post hatch (dph) than at 9 dph, it was only 2.11% the level of the control female. *DMRT1* gene expression was up-regulated gradually in LE treated female fry during sex differentiation, and reached the same level as control males at 150 dph. In LE treated female fry, degeneration of the ovarian cavity and primary spermatocytes were observed in sections of the gonad. The functional testes were developed at 150 dph. Our research demonstrates that aromatase activity is necessary for ovarian formation and development during sex differentiation in *T. obscurus*. Masculinization can be induced by LE treatment in *T. obscurus* during sex differentiation.

**Key words:** *Takifugu obscurus*; sex differentiation; aromatase inhibitor AI; *CYP19A*; *DMRT1*

**Corresponding author:** ZHOU Zhongliang. E-mail: zhouzl@mail.ecnu.edu.cn