

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17329

## 三倍体雌性虹鳟性腺发育阶段细胞色素相关基因的表达

相福生<sup>1,2,3</sup>, 徐革锋<sup>2</sup>, 谷伟<sup>2</sup>, 黄天晴<sup>2</sup>, 刘晨斌<sup>2</sup>, 王炳谦<sup>2</sup>

1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
3. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306

**摘要:** *Cyp19a1b*、*Cyp11a1*、*Cyp11b2*、*Cyp17a1*、*Hsd3b1* 等细胞色素相关基因能够调节硬骨鱼类性类固醇的合成, 对性腺发育和性别决定产生影响。本研究以全雌三倍体虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)为研究对象, 正常雌性二倍体虹鳟为对照, 选取 31~68 dpf (days post fertilization) 时间段的虹鳟仔鱼脑组织, 采用 qRT-PCR 和酶联免疫的方法研究以上几种基因的表达状况和脑芳香化酶的活性变化, 以期探明导致三倍体雌性虹鳟性腺发育异常的关键原因。qRT-PCR 结果显示, 二倍体中 *Cyp19a1b* 在 30~50 dpf 时表达量上调并且维持在较稳定水平, 但 50~56 dpf 时表达量逐渐下调, 之后 56~68 dpf 表达量持续上调; 三倍体中 *Cyp19a1b* 表达量在 30~35 dpf 开始上调, 35~47 dpf 逐渐下调, 47~55 dpf 开始第二次上调, 之后维持在较稳定水平直至 68 dpf, 但三倍体 *Cyp19a1b* 的表达量显著( $P<0.05$ )低于同期二倍体的。二倍体 *Cyp11a1* 表达量在 34 dpf 出现峰值, 三倍体 *Cyp11a1* 在 38 dpf 时出现峰值。二倍体 *Hsd3b1* 表达量在 33~42 dpf 时维持在较高水平, 在 38 dpf 时出现高峰; 三倍体 *Hsd3b1* 表达量在 47~59 dpf 时较高, 在 49 dpf 出现高峰。二倍体中 *Cyp11b2* 在 37 dpf 出现峰值, 之后开始下调; 三倍体在 40 dpf 出现峰值, 之后逐渐下调, 但三倍体 *Cyp11b2* 表达量显著低于同期二倍体。二倍体 *Cyp17a1* 的表达量在 35~46 dpf 时逐渐上升, 在 45 dpf 时达到高峰之后直至 69 dpf 逐渐下降, 并且维持在较为平稳的水平上; 但是在相同的实验条件下未检测到同一时期三倍体 *Cyp17a1* 的表达量。酶联免疫结果显示, 在 40 dpf 时二者的脑芳香化酶活性到达高峰, 但在 40~60 dpf 时期, 二倍体虹鳟脑芳香化酶活性显著( $P<0.05$ )高于三倍体虹鳟, 尤其在 45~50 dpf 时, 该酶活性分别较三倍体的高 1.15 倍和 1.12 倍。以上结果表明三倍体虹鳟早期性腺发育迟缓的原因之一是 *Cyp19a1b*、*Cyp11a1*、*Cyp11b2*、*Cyp17a1*、*Hsd3b1* 等基因的表达晚于二倍体, 且表达量低于二倍体, 造成雌二醇不能正常合成, 最终导致性腺发育迟缓。

**关键词:** 虹鳟; 性腺发育; 脑芳香化酶; 细胞色素

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)05-0949-09

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)自 20 世纪 50 年代引进中国以来, 因其较高的经济价值和食用价值受到养殖者的青睐。相比于二倍体虹鳟, 三倍体虹鳟具有生长快、个体大、经济效益更高的特点, 近年来受到广泛关注。但三倍体虹鳟性腺发育迟缓, 从 8 月龄开始, 雌性性腺发育出现异常, 不能产生正常的卵细胞, 雄性同样不能产生正常的精子<sup>[1]</sup>。与哺乳动物不同, 调节硬骨鱼类神经形成进

而影响性腺发育的神经类固醇物质的合成起始于脑部。而相关的神经类固醇生成酶由细胞色素 P450 家族的部分基因编码<sup>[2]</sup>, 这些基因在虹鳟性腺未分化时(35~63 dpf, days post fertilization)就已开始表达, 且其调控通路较为复杂, 相互之间产生影响<sup>[3-4]</sup>。首先细胞色素 P450 侧链裂解酶(P450<sub>scc</sub>, 由 *Cyp11a1* 基因编码)催化胆固醇转化为孕烯醇酮, 启动生物体内类固醇激素合成的第

收稿日期: 2017-09-13; 修订日期: 2017-12-05.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金项目(CARS-46); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2018HY-ZD03); 黑龙江省自然科学基金面上项目(C2016069).

作者简介: 相福生(1990-), 男, 硕士研究生, 主要从事冷水鱼育种与繁殖的研究. E-mail: fishxiangfs@163.com

通信作者: 王炳谦(1963-), 研究员. E-mail: wangbingqian@hrfri.ac.cn

一步,之后  $3\beta$ -羟化类固醇脱氢酶(*Hsd3b* 编码)催化  $\Delta 5$  类固醇转化成  $\Delta 4$  类固醇,即将孕烯醇酮转化成孕酮,沿着此通路 17-羟化酶和 17,20-裂解酶(由 *Cyp17a1* 编码)将孕酮转化成雄激素。而  $11\beta$ -羟化酶(由 *Cyp11b2* 编码)参与特异性雄激素(11-氧化雄激素)的产生,此特异性雄激素能够活化类固醇使其产生生物活性。

而 *Cyp19a1b* 作为脊椎动物脑性别分化的关键要素,它能够将雄激素转化成雌激素,最终决定动物性别<sup>[5-7]</sup>。脑芳香化酶活性在鱼脑中的表达随着年龄和性类固醇水平的提高而增加<sup>[8]</sup>。*Cyp19a1b* 高表达是通过雌激素和芳香化的雄激素上调芳香化酶的表达得以实现的,这表明脑芳香化酶活性与性类固醇水平密切相关。芳香化是发生在内质网中的氧化反应,3 mol NADPH 和 3 mol  $O_2$  可生成 1 mol 雌激素。NADPH-细胞色素 P450 还原酶运送 NADPH 到 P450arom(芳香化酶),芳香化酶与雄激素结合,氧原子加到雄激素分子上,将雄激素 A 环芳香化,脱去 19 位上的碳原子,并将 1 位上的羰基转化为羟基,从而使雄烯二酮和睾酮等雄激素分别转化为雌酮和雌二醇<sup>[9]</sup>。通过显微解剖或穿孔技术,对大脑芳香化酶活性分布研究发现,三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)间脑中芳香化酶的活性最高,尤其是在下丘脑室周区域,包括视束前核结节外侧核和垂体<sup>[10]</sup>。同样在欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)中,嗅球、中脑和下丘脑中的芳香化酶活性与脑垂体的接近,而视顶盖、小脑和髓质的活性则较低<sup>[8]</sup>。原位杂交结果表明,虹鳟 *Cyp19a1b* 在前脑的视周层、端脑、间脑和中脑表达较高,在某种程度上与珍鲢鱼(*Porichthys notatus*)相似,下丘脑、视前区和脑垂体杂交信号较强<sup>[11]</sup>,而在视周层的半规隆凸、视顶盖和第四脑室的杂交信号较弱,而脑芳香化酶的最终作用是将睾酮转化为雌二醇,这说明 *Cyp19a1b* 参与脑-垂体-性腺轴的介导过程,通过经典的内分泌调节通路影响鱼类性腺发育。

本研究选取全雌三倍体虹鳟为研究对象,以相同发育阶段的二倍体雌性虹鳟为对照,利用荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测受精后 31~68 dpf 阶段二倍体、三倍体雌性虹鳟脑组织中的 *Cyp19a1b*、

*Cyp11a1*、*Cyp17a1*、*Hsd3b1*、*Cyp11b2* 基因的表达,并通过酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分别检测二倍体、三倍体雌性虹鳟不同发育阶段脑芳香化酶的活性,以期探明三倍体雌性虹鳟性腺发育异常的关键原因及其作用途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

全雌性三倍体虹鳟发眼卵和同期二倍体鱼卵(二倍体和三倍体发眼卵均为雌性)置于黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站孵化,水温为  $10^{\circ}\text{C}$ ,待其破膜后转移至养殖车间饲养,水温平均为  $6^{\circ}\text{C}$ 。自 31~50 dpf 期间,每天采集 1 次鱼头组织,每次采集 3 份,每份 30 个鱼头组织;51~69 dpf 期间,每隔 2 天采集 1 次鱼头组织,每次同样为 3 份每份 30 个鱼头组织,采集的鱼头迅速置于液氮中保存。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 RNA 提取** 使用 Trizol 试剂(ambion 公司)提取总 RNA。利用琼脂糖凝胶电泳检查所提取的 RNA 片段完整性,并用 Analytik Jena 公司的 ScanDrop 核酸分析仪检测 RNA 浓度和纯度。

**1.2.2 cDNA 合成** 用 TOYOBO 公司的 Revertra Ace qPCR RT Kit 试剂盒按说明书要求操作,反转录体系为 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ RT Buffer(Reaction Buffer+  $\text{MgCl}_2$ + dNTPs),1  $\mu\text{L}$  Enzyme Mix,1  $\mu\text{L}$  Primer(Random Primer+Oligo(dT)Primer)根据实际测得的 RNA 浓度计算模板加入量,最后补 Rnase-free 水至 20  $\mu\text{L}$ 。设置  $37^{\circ}\text{C}$ ,15 min;  $98^{\circ}\text{C}$ ,5 min;进行 PCR 反应。将产物放置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.3 Real-time 荧光定量 PCR** 在 NCBI(美国国立生物技术信息中心)数据库中找到 *Cyp19a1b*、*Cyp11a1*、*Cyp17a1*、*Cyp11b2*、*Hsd3b1* 基因序列。用 Primer 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物(由 Invitrogen 公司合成),以  $\beta$ -actin 为内参(序列如表 1 所示)。荧光定量 PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,使用罗氏公司的 SYBR Green Master: SYBR Green 10  $\mu\text{L}$ ,上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,加  $\text{ddH}_2\text{O}$  至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:预变性  $95^{\circ}\text{C}$ ,10 min;  $95^{\circ}\text{C}$ ,10 s;  $60^{\circ}\text{C}$ ,30 s;共计 40 个循环。PCR 反应

表 1 荧光定量 PCR 引物序列  
Tab. 1 Nucleotide sequences of Real-time PCR primers

| 基因符号 gene symbol | 基因序列号 GenBank No. | 上游引物(5'-3') forward sequence (5'-3') | 下游引物(5'-3') reverse sequence (5'-3') |
|------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Cyp19a1b</i>  | AJ311938          | TGAGGAAGGCACTGGAAGATGAC              | GGCTGGAAGAAACGACTGGGC                |
| <i>Cyp11a1</i>   | S57305            | AACGCTGAGGCTTCATCCAGTT               | ACCAGAGTCCCACAAGGTATGT               |
| <i>Cyp11b2</i>   | AF217273          | ACGAAGTAGCGAGGGATT                   | GAAGCGGAAGAGGTCAGG                   |
| <i>Cyp17a1</i>   | X65800            | ACAGTAACCACAGACCTGTTG                | CCTACAGATAATCTTCTCGAT                |
| <i>Hsd3b1</i>    | S72665            | TACAGTGCCTGGAAGAGATCAGA              | ACCCTGTGAAGCTCACTGTATAA              |
| $\beta$ -actin   | AJ438158          | ATCCTGACGGAGCGCGGTTACAGC             | TGCCCATCTCCTGCTCAAAGTCCA             |

结束后, 分析溶解曲线, 检查反应特异性, 并对数据进行处理用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的表达量。

**1.2.4 ELISA 酶联免疫吸附测定** 使用鱼细胞色素 P450 19a1b 酶联免疫吸附测定试剂盒(根据实验要求交由生产厂家设计适用于虹鳉 CYP19A1B 的试剂盒, 上海江莱生物公司)对鱼脑芳香化酶活性进行测定。将采集到的样品每份分别取出 15 个鱼脑组织分别磨碎混匀成匀浆液, 5000×g 离心取上清, 之后按说明书操作进行, 用 Synergy2 多功能酶标仪(美国 BIOTEK 公司)在 450 nm 波长处测定 OD 值, 绘制标准曲线回归方程, 按曲线方程计算各样本浓度值。

**1.2.5 数据处理与分析** 使用 SPSS 19.0 进行数据处理, 利用 one-way 方差分析进行显著性检验,  $P<0.05$  为差异性显著。

2 结果与分析

2.1 芳香化酶通路基因在三倍体雌性虹鳉早期不同发育阶段的表达

分别提取 31~69 dpf 三倍体雌性虹鳉的脑组织 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳和 ScanDrop 核酸分析仪检测, RNA 片段完整性良好, 将 RNA 反转录得到 cDNA, 经内参  $\beta$ -actin 检测可用于荧光定量 PCR。实验结果如图 1、图 2 所示。二倍体和三倍体 *Cyp19a1b* 基因的表达量的整体趋势基本一致, 且在 35~45 dpf 时期该基因在二者脑组织中的表达均达到高峰, 但二倍体的表达量较三倍体高近 30 倍( $P<0.05$ ); 在 65 dpf 时, *Cyp19a1b* 基因在二倍体和三倍体中的表达量出现第二次高峰, 此时都与其自身第一次高峰的表达一致, 二倍体的表达量仍是三倍体的 30 倍( $P<0.05$ )(图 1a, 图 1c)。

在 30~50 dpf 时期, 二倍体虹鳉的 *Cyp11a1* 基因的表达量维持较高水平; 在 38 dpf 时, 三倍体虹鳉 *Cyp11a1* 基因表达量首次达到峰值, 较二倍体有所延迟, 之后开始下降, 在 49 dpf 时出现第二次高峰(图 1b, 图 1d)。

在 33~42 dpf 时期, 二倍体虹鳉的 *Hsd3b1* 基因表达量维持较高水平, 在 38 dpf 时出现高峰; 在 47~59 dpf 时期, 三倍体虹鳉 *Hsd3b1* 基因表达量较高, 高峰时期明显晚于二倍体, 且峰值低于二倍体虹鳉(图 2a, 图 2c)。35 dpf 时的二倍体和三倍体虹鳉 *Cyp11b2* 的基因表达量同时到达高峰, 但二倍体表达水平较三倍体高近 5 倍( $P<0.05$ ); 41~69 dpf 时期二倍体虹鳉 *Cyp11b2* 基因表达量开始下降并且维持在较平稳的水平, 此时间段内三倍体在 65 dpf 时出现小幅上升, 且表达量与同期二倍体水平一致(图 2b, 图 2d)。二倍体虹鳉 *Cyp17a1* 基因的表达量在 35~46 dpf 时逐渐上升, 在 45 dpf 时达到高峰之后直至 69 dpf 逐渐下降, 并且维持在较为平稳的水平上, 但是在相同的实验条件下未检测到同一时期三倍体虹鳉 *Cyp17a1* 基因的表达量(图 2e)。

2.2 脑芳香化酶在二、三倍体雌性虹鳉不同发育阶段的活性

在发育早期阶段, 二倍体与三倍体雌性虹鳉脑芳香化酶活性(CYP19A1B 酶)整体趋势大体一致, 在 40 dpf 时二者的脑芳香化酶活性到达高峰, 但在 40~60 dpf 时期, 二倍体雌性虹鳉脑芳香化酶活性显著高于同期三倍体雌性虹鳉, 尤其在 45 dpf 和 50 dpf 时, 二倍体该酶活性分别较三倍体的高 1.15 倍和 1.12 倍。在 62 dpf 时两条曲线交叉, 之后二者同时下降, 且活性相差较小(图 3)。

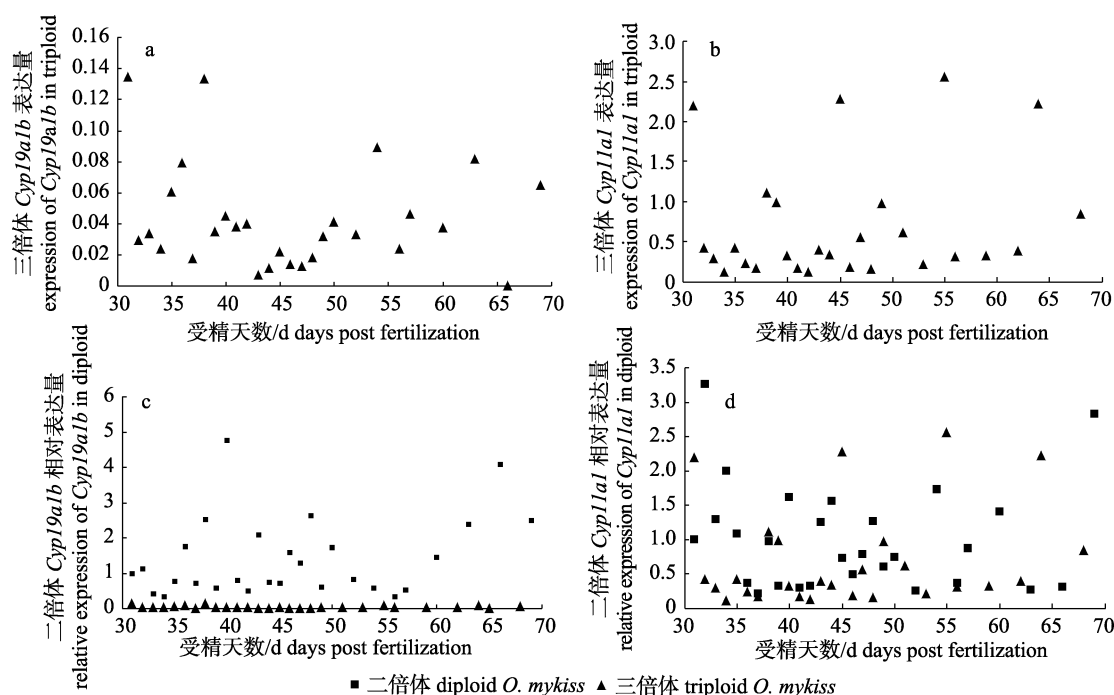


图 1 雌性三倍体虹鳟和二倍体虹鳟不同时间的基因表达结果

a. 三倍体虹鳟 *Cyp19a1b* 的表达量; b. 三倍体虹鳟 *Cyp11a1* 的表达量; c. 二倍体和三倍体虹鳟 *Cyp19a1b* 的相对表达量; d. 二倍体和三倍体虹鳟 *Cyp11a1* 的相对表达量. 每个数据对应 3 个样品, 每个样品做 3 次重复试验.

Fig.1 The gene expression profiles in gonads of triploid and diploid *Oncorhynchus mykiss*

a. Expression of *Cyp19a1b* in triploid *O. mykiss*; b. Expression of *Cyp11a1* in triploid *O. mykiss*; c. Relative expression of *Cyp19a1b* in triploid and diploid *O. mykiss*; d. Relative expression of *Cyp11a1* in triploid and diploid *O. mykiss*. Each data corresponds to three samples, and each sample is repeated three times.

### 3 讨论

虹鳟的性别由性别决定基因 *Sdy* (Y 染色体性别决定基因) 决定, 但同样又存在性别重塑机制<sup>[12]</sup>。性类固醇对虹鳟性腺发育至关重要, 通过外源性类固醇激素诱导能够将其性别逆转<sup>[14]</sup>。虹鳟仔鱼卵黄囊吸收完毕, 直到开始摄食外源性食物时, 其性腺开始分化, 此时影响性腺分化的 *Cyp11a1*、*Cyp19a1b*、*Cyp11b2*、*Cyp17a1*、*Hsd3b1* 等基因的表达量开始逐步发生变化<sup>[15-16]</sup>。在雌二醇生成的整个过程中, 第一步酶促反应开始于细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶(P450scc), 该酶由 *Cyp11a1* 基因编码, 所以 *Cyp11a1* 基因表达量可在一定程度上反映生物体内类固醇激素合成量。 $3\beta$ -HSD 是一种类固醇合成关键酶, 通过氧化和异构作用催化孕烯醇酮转化成孕酮, 经过这种氧化过程后类固醇由没有活性或活性较低的类固醇转化为活性较高的类固醇激素, 该过程能够诱导类固醇发挥生物作用<sup>[17]</sup>。*Cyp17a1* 能够编码 P450  $17\alpha$  羟化酶和

17, 20 裂解酶, 首先  $17\alpha$ -羟化酶催化孕酮或黄体酮转化成  $17\alpha$ -羟基孕酮<sup>[18]</sup>, 之后 17, 20 裂解酶催化  $17\alpha$ -羟基孕酮转化成雄烯二酮, 最后雄烯二酮在  $17\beta$ -HSD 作用下生成睾酮<sup>[19]</sup>。这时睾酮作为雌激素的前体物质, 最终由 *Cyp19a1b* 负责将其转化成雌二醇, 进而影响虹鳟的性腺分化, 也就是说 *Cyp19a1b* 的表达量直接关系到虹鳟的性腺分化和决定其性别(图 4)<sup>[20]</sup>。

$11\beta$ -羟化酶(由 *Cyp11b2* 编码)能够产生 11-氧化雄激素或类固醇底物, 而 11-氧化雄激素是促使鱼类性腺分化的天然类固醇<sup>[21]</sup>。*Cyp11a1* 是调节类固醇合成的上游基因, *Cyp11a1* mRNA 表达量的高低直接影响睾酮和雌二醇的生成<sup>[22]</sup>, *Cyp11a1* 在三倍体中的表达量峰值明显晚于二倍体, 这可能会对后续类固醇生成产生重要影响。相同的状况同样出现在 *Hsd3b1* 基因的表达中, 三倍体较二倍体的表达峰值延迟了近 7 d, *Hsd3b1* 基因编码的  $3\beta$ -羟化类固醇脱氢酶的缺少会导致孕酮、

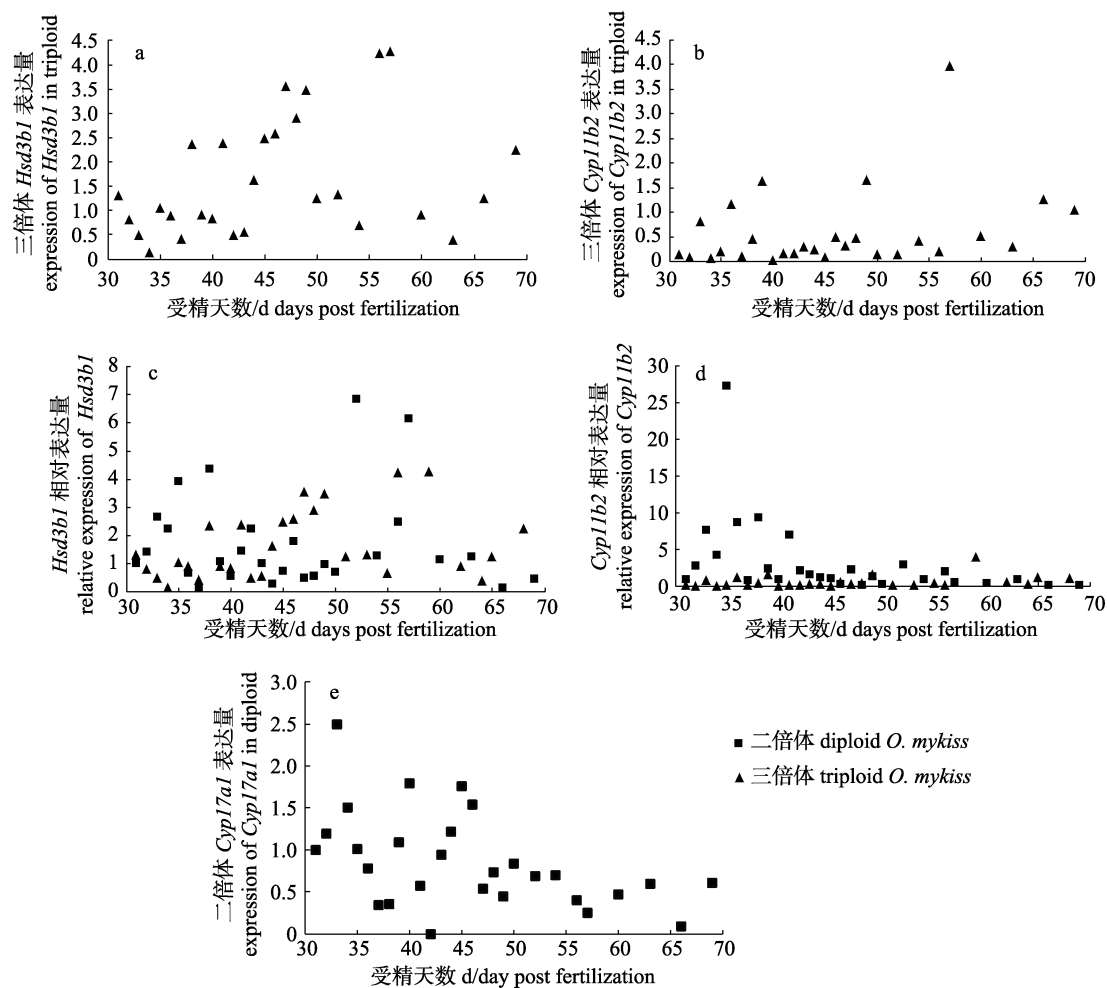


图 2 雌性三倍体虹鳉和二倍体虹鳉不同时间的基因表达结果

a. 三倍体虹鳉 *Hsd3b1* 的表达量; b. 三倍体虹鳉 *Cyp11b2* 的表达量; c. 二倍体和三倍体虹鳉 *Hsd3b1* 的相对表达量; d. 二倍体和三倍体虹鳉 *Cyp11b2* 的相对表达量; e. 二倍体虹鳉 *Cyp17a1* 的表达量. 每个数据对应 3 个样品, 每个样品做 3 次重复实验.

Fig.2 The gene expression profiles in gonads of triploid and diploid *Oncorhynchus mykiss*

a. Expression of *Hsd3b1* in triploid *O. mykiss*; b. Expression of *Cyp11b2* in triploid *O. mykiss*; c. Relative expression of *Hsd3b1* in triploid and diploid *O. mykiss*; d. Relative expression of *Cyp11b2* in triploid and diploid *O. mykiss*; e. Expression of *Cyp17a1* in diploid *O. mykiss*. Each data corresponds to three samples, and each sample is repeated three times.

17 $\alpha$ -羟基孕酮以及雄烯二酮的合成减少, 以至于影响睾酮和雌二醇的生成。雌二醇能够穿越哺乳动物子宫细胞膜, 与细胞膜上的雌激素受体结合, 随后雌激素受体构象发生改变, 二者形成复合体。形成复合体之后雌二醇对 DNA 的亲合力大大加强, 这个复合体从细胞质中转移到细胞核中与染色质结合, 使原来转录活性不太高的结构基因表现出极大的转录活性, 合成大量专一的 mRNA, 再合成大量的特异性蛋白质, 从而促进子宫生长<sup>[23]</sup>。睾酮的作用过程与雌二醇类似, 游离的睾酮会被转运送至目标组织细胞的细胞质中, 与雄激素受体结合, 或被 5 $\alpha$ -还原酶转化为血清

双氢睾酮(DHT), DHT 同样会与雄激素受体结合(这种结合更稳固, DHT 的雄性激素强度约是睾酮的 2.5 倍)。睾酮受体或血清双氢睾酮受体将进行结构性的转变, 并让它们进入细胞核, 与染色体 DNA 内特定的核苷酸结合, 结合的区域称为激素反应元件(HRE), 并影响某些基因的复制活动, 产生雄性激素效用<sup>[24]</sup>。尽管鱼类生理结构与哺乳动物不同, 但雌二醇和睾酮的作用机理与此类似, 所以雌二醇和睾酮的缺失必将导致鱼类性腺分化的迟缓。而对雌二醇产生直接作用的脑芳香化酶(由 *Cyp19a1b* 基因编码), 能够直接将睾酮转化成雌二醇, 本研究中二倍体和三倍体虹鳉 *Cyp19a1b*

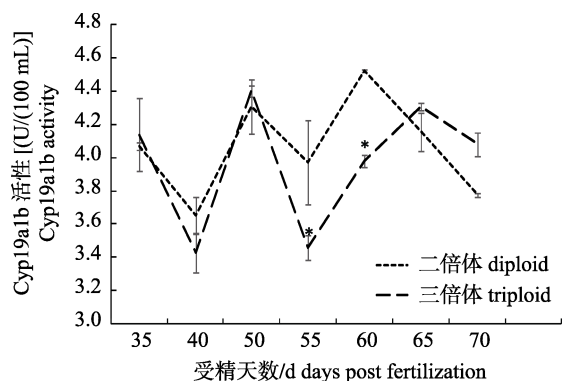


图 3 脑芳香化酶在二倍体、三倍体雌性虹鳟不同发育阶段的活性

\*表示二倍体与三倍体差异显著( $P < 0.05$ ).

Fig. 3 Aromatase activity in developing brains of *Oncorhynchus mykiss*

\* denotes significant difference between triploid and diploid *Oncorhynchus mykiss* ( $P < 0.05$ ).

基因的表达趋势在时间上是一致的,即在 35~50 dpf 阶段都维持在较高水平,但 *Cyp19a1b* 在三倍

体中表达量显著低于二倍体( $P < 0.05$ ),这可能是导致三倍体雌性虹鳟性腺分化迟缓的重要原因。在相同时间段内(31~69 dpf)二倍体的脑芳香化酶活性高于三倍体,尤其是在 45 dpf 和 50 dpf 该酶活性分别较三倍体高 1.15 倍和 1.12 倍。*Cyp19a1b* 基因的作用直接体现在脑芳香化酶上,而酶活性的高低最终影响雌二醇的合成,进而影响性腺发育。此外, Bourguiba 等<sup>[25]</sup>发现雄激素和雌激素对芳香化酶的调节具有很强的作用,雄激素能够上调芳香化酶的表达,而雌激素则能抑制其表达。这可能就是三倍体虹鳟在 36~47 dpf 之间 *Cyp19a1b* 的表达量下调,40~45 dpf 脑芳香化酶活性降低的原因。11 $\beta$ -羟化酶催化产生 11-氧化雄激素,其编码基因 *Cyp11b2* 在三倍体和二倍体虹鳟中存在显著性差异,尽管二者在时间上的表达趋势一致,但在性腺分化的关键时期(30~50 dpf)三倍体表达量显著性低于二倍体( $P < 0.05$ ),二者在 50~69 dpf

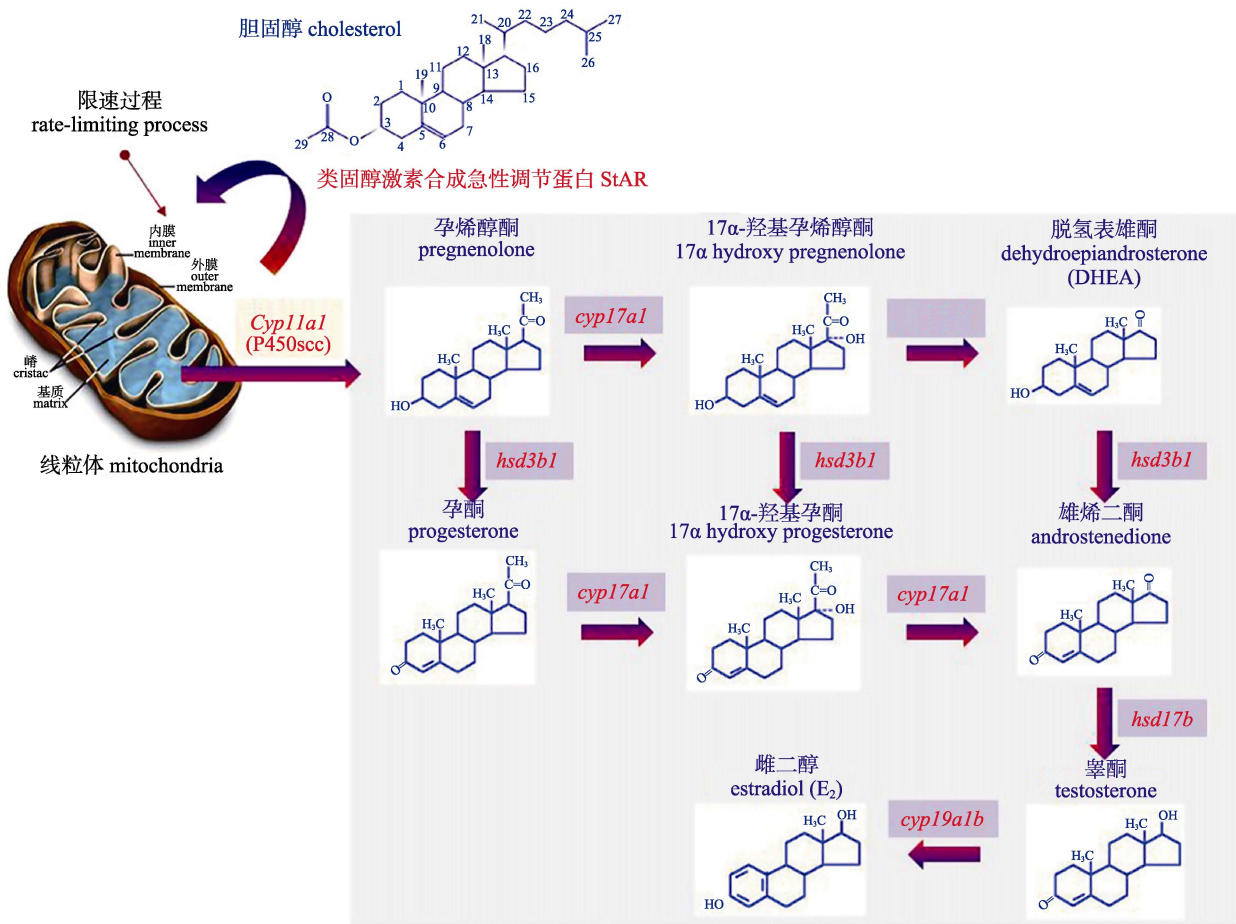


图 4 雌二醇合成通路<sup>[20]</sup>

Fig.4 The estradiol synthesis pathway<sup>[20]</sup>

阶段表达量相接近,但由于 *Cyp11b2* 在关键时期(30~50 dpf)的显著低表达最终造成三倍体虹鳟性腺分化的延迟。此外在相同生长环境和相同实验条件下,三倍体虹鳟中没有检测到 *Cyp17a1* 基因的表达,该基因在二倍体虹鳟中的表达同样是先上升后下降,35~45 dpf时维持在较高水平,之后逐渐下降。

通过 *Cyp11a1*、*Cyp11b2*、*Cyp17a1*、*Cyp19a1b* 和 *Hsd3b1* 基因的表达水平可以得出,影响虹鳟性腺分化是多种基因相互之间调控的结果,三倍体雌性虹鳟细胞色素等相关基因表达的异常,导致脑芳香化酶活性降低,最终可能导致性类固醇激素的合成与分泌出现异常。

#### 4 结论

相比于二倍体雌性虹鳟,三倍体雌性虹鳟脑组织中 *Cyp11a1*、*Cyp11b2*、*Cyp17a1*、*Cyp19a1b* 和 *Hsd3b1* 基因呈现低表达或延迟表达的趋势,这可能会造成性类固醇激素的合成减少或延迟,导致其性腺分化和发育受阻,这可能是三倍体雌性虹鳟性腺不能正常发育的重要原因之一。

#### 参考文献:

- [1] Liu G H, Hao Q R, Huang T Q, et al. Apoptosis in ovarian development of female triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the expression of ovarian development genes[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2016(17): 15-18, 287. [柳广昊, 郝其睿, 黄天晴, 等. 三倍体虹鳟卵巢发育中细胞凋亡与发育相关基因的表达[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(17): 15-18, 287.]
- [2] Do Rego J L, Seong J Y, Burel D, et al. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides[J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2009, 30(3): 259-301.
- [3] Yaron Z, Levavi-Sivan B. Hormonal control of reproduction and growth endocrine regulation of fish reproduction[J]. Encyclopedia of Fish Physiology, 2011, 15(1): 1500-1508.
- [4] Xu G F, Mou Z B, Chen H F, et al. The regulatory mechanism of ovary differentiation and abortion of triploid female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*[J]. Oceanologia et limnologia Sinica, 2017, 48(2): 358-367. [徐革锋, 牟振波, 陈怀发, 等. 三倍体虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)卵巢分化及滞育的调控机制研究[J]. 海洋与湖沼, 2017, 48(2): 358-367.]
- [5] MacLusky N J, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system[J]. Science, 1981, 211(4488): 1294-1302.
- [6] Simpson E R, Mahendroo M S, Means G D, et al. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis[J]. Endocrine Reviews, 1994, 15(3): 342-355.
- [7] Lephart E D. A review of brain aromatase cytochrome P450[J]. Brain Research Reviews, 1996, 22(1): 1-26.
- [8] González A, Piferrer F. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle[J]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 132(2): 223-230.
- [9] Wang H, Li X, Zhang Y H. Research perspectives of expression of CYP19 and aromatase activity regulation factors[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2010, 19(3): 304-308. [王慧, 李霞, 张育辉. CYP19 基因表达与芳香化酶活性调控因子的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(3): 304-308.]
- [10] Borg B, Timmers R J, Lambert J G. Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. I. Distribution and effects of season and photoperiod[J]. Journal of Experimental Biology, 1987, 47(2): 63-68.
- [11] Gonzalez A, Piferrer F. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle[J]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 132(2): 223-230.
- [12] Menuet A, Anglade I, Le Guevel R, et al. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor  $\alpha$ [J]. Journal of Comparative Neurology, 2003, 462(2): 180-193.
- [13] Ayaka Y, Barbara N, Eloige J, et al. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (*sdY*) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids[J]. Evolutionary Applications, 2013, 6(3): 486-496.
- [14] Feist G, Yeoh C G, Fitzpatrick M S, et al. The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 $\alpha$ -methyltestosterone and 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione[J]. Aquaculture, 1995, 131(1-2): 145-152.
- [15] Li M, Wu F, Gu Y, et al. Insulin-like growth factor 3 regulates expression of genes encoding steroidogenic enzymes and key transcription factors in the Nile tilapia gonad[J]. Biology of Reproduction, 2012, 86(5): 1-10.
- [16] Christelle D, Anne-Sophie G, Jean-Jacques L, et al. Differential expression patterns of three aromatase genes and of

- four estrogen receptors genes in the testes of trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2015, 82(9): 694-708.
- [17] Yang M J. Molecular cloning of goose *HSD3B1*, sequence analysis, and primary functional research in ovary follicle of goose[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2012. [杨明军. 鹅 *HSD3B1* 基因编码区克隆、序列分析及其在卵泡中的功能初探[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.]
- [18] Lavoie H A, King S R. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: *StARD1*, *CYP11A1* and *HSD3B*[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2009, 234(8): 880-907.
- [19] Chen X H, Qiu X M, Hao W W, et al. Expression of *CYP11a1* in different developmental phases of gonad in zebrafish *Danio rerio*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(1): 13-17. [陈孝红, 仇雪梅, 郝薇薇, 等. 斑马鱼 *CYP11a1* 基因在不同性腺发育时期的表达[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(1): 13-17.]
- [20] Nagarajan G, Aruna A, Chang C F. Neurosteroidogenic enzymes and their regulation in the early brain of the protogynous grouper *Epinephelus coioides* during gonadal sex differentiation[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 181: 271-287.
- [21] Liu S, Govoroun M, D'Carreras H, et al. Expression of cytochrome P45011b (11b-hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2000, 75(4-5): 291-298.
- [22] Shao K, Zhou J, Wu X X, et al. The developmental patterns and correlation of adiponectin receptors, *LRH*, *CYP11A1* and *StAR* mRNA expression in testis of Wannan Hua pig[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2011, 42(12): 1680-1685. [邵康, 周杰, 吴小雪, 等. 猪睾丸中脂联素受体与 *LHR*、*CYP11A1*、*StAR* 基因表达的发育变化及其相关性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(12): 1680-1685.]
- [23] Wang J Y. *Biochemistry* (third edition)[M]. Beijing: Higher Education Press, 2002: 567-570. [王镜岩. 生物化学(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 567-570.]
- [24] Fu H, Wen J F. Research of testin[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2006, 26(4): 367-368. [付华, 文继舫. 睾丸素的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(4): 367-368.]
- [25] Bourguiba S, Lanbard S, Carreau S. Steroids control the aromatase gene expression in purified germ cells from the adult male rat[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2003, 31(1): 83-94.

## Expression of cytochrome genes during the early gonadal development in triploid female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

XIANG Fusheng<sup>1,2,3</sup>, XU Gefeng<sup>2</sup>, GU Wei<sup>2</sup>, HUANG Tianqing<sup>2</sup>, LIU Chenbin<sup>2</sup>, WANG Bingqian<sup>2</sup>

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
3. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** The genes *Cyp19a1b*, *Cyp11a1*, *Cyp11b2*, *Cyp17a1*, and *Hsd3b1* play an important role in the steroidogenesis and gonadal differentiation of teleosts. Therefore, in this study, we chose triploid and diploid rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) at 31–68 days post fertilization (dpf) cultured in the same environment as object. In this study, triploid rainbow trouts were used as object and diploid rainbow trouts were used as controls to evaluate the expression of genes and the activity of CYP19A1B enzyme in the brain of rainbow trout. The real-time polymerase chain reaction results showed that the expression of *Cyp19a1b* in the diploid rainbow trout was up-regulated during 30–50 dpf and maintained a stable level during this period. Subsequently, during 50–56 dpf, the expression was down-regulated; during 56–68 dpf, the expression was up-regulated again. The expression of *Cyp19a1b* in the triploid rainbow trout was up-regulated during 30–35 dpf, down-regulated during 35–47 dpf, and then upregulated during 47–55 dpf; thereafter, until 68 dpf, the expression was maintained at a stable level. The expression of *Cyp11a1* in diploid rainbow trout peaked at 34 dpf and in triploid rainbow trout peaked at 38 dpf. The expression of *Hsd3b1* in the diploid rainbow trout was maintained at a high level during 33–42 dpf and its expression peaked at 38 dpf. The expression of *Hsd3b1* in the triploid rainbow trout was high during 47–59 dpf and peaked at 49 dpf. The expression of *Cyp11b2* in diploid rainbow trout peaked at 37 dpf, and then the expression was down-regulated. In the triploid rainbow trout, the peak value was recorded at 40 dpf, and then the expression was down-regulated, but the expression of *Cyp11b2* in the triploid rainbow trout was lower than that in the diploid rainbow at the same period. The expression of *Cyp17a1* in the diploid rainbow trout was up-regulated at 35–46 dpf and the peak value was recorded at 45 dpf, and then the expression was down-regulated until 69 dpf. However, under the same experimental conditions, the expression of *Cyp17a1* in the triploid rainbow trout was not detected. The results of enzyme-linked immunosorbent assay demonstrated that at 40 dpf, the activity of CYP19A1B enzyme in the diploid and triploid rainbow trout peaked, but during 40–60 dpf, the activity of CYP19A1B enzyme in the diploid rainbow trout was significantly higher than that in the triploid rainbow trout; especially at 45 dpf and 50 dpf, the activity of this enzyme in the diploid trout was 1.15 and 1.12 times higher than that in the triploid trout, respectively. The results suggest that one of the reasons for early gonadal differentiation delay in triploid rainbow trout is the expression of *Cyp19a1b*, *Cyp11a1*, *Cyp11b2*, *Cyp17a1*, and *Hsd3b1* is lower and later than those in the diploid rainbow trout. Moreover, estradiol cannot be synthesized normally in triploid rainbow trout, and therefore, gonadal differentiation is delayed.

**Key words:** *Oncorhynchus mykiss*; gonadal differentiation; brain aromatase; cytochrome

**Corresponding author:** WANG Bingqian. E-mail: wangbingqian@hrfri.ac.cn