

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00911

芳香化酶抑制剂来曲唑对胡子鲶性腺分化及相关基因表达的影响

李广丽^{1,2}, 邓思平^{1,2}, 孙晶^{1,2}, 王文达^{1,2}, 师尚丽^{1,2}, 朱春华^{1,2}

1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 南海水产经济动物增殖养殖广东普通高校重点实验室, 广东海洋大学, 广东 湛江 524025

摘要: 采用组织学和荧光实时定量 PCR 方法, 检测饲喂不同剂量芳香化酶抑制剂来曲唑(letrozole, 50、100 和 200 $\mu\text{g/g}$)对胡子鲶(*Clarias fuscus*)性腺组织学和性别比率的影响, 以及 200 $\mu\text{g/g}$ 来曲唑对性分化前后脑型芳香化酶基因(*Cyp19a1b*)和翼状螺旋/叉头转录因子 2(*Foxl2*)基因表达的影响, 结果表明, 50 $\mu\text{g/g}$ 剂量的来曲唑对胡子鲶性腺分化无显著影响; 但 100 $\mu\text{g/g}$ 和 200 $\mu\text{g/g}$ 剂量的来曲唑可促进胡子鲶精巢分化, 抑制卵巢分化, 卵巢腔最早出现时间和初级卵母细胞出现时间均分别推迟 3 d 和 6 d, 而初级精母细胞最早出现时间则分别提前 2 d 和 5 d, 且雄性率分别达 65.8%和 71.3%, 显著高于 50 $\mu\text{g/L}$ 组和对照组($P<0.05$)。胡子鲶性腺分化前(出膜后 12 d), *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 基因即开始表达, 性腺分化前后 *Cyp19a1b* 相对表达量无显著差异($P>0.05$), 但 *Foxl2* 相对表达量则随性分化而逐渐降低, 且来曲唑显著抑制性腺分化过程中 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 的表达($P<0.05$)。结果表明, 100 $\mu\text{g/g}$ 以上剂量的来曲唑可有效诱导胡子鲶分化为雄性; *Cyp19a1b* 可能不直接参与胡子鲶性腺分化, 但 *Foxl2* 直接参与此过程。

关键词: 胡子鲶; 性分化; 芳香化酶抑制剂; *Cyp19a1b*; *Foxl2*

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2013)05–0911–07

大部分鱼类的性别主要由基因型决定, 但外界环境对部分鱼类性别也存在一定的影响, 如温度、外源激素、pH、水质、社会因素等在不同程度上可影响鱼类的性别^[1]。大量研究已证明, 芳香化酶抑制剂(Aromatase Inhibitor, AI)可有效诱使性未分化的、基因型为雌性的雌雄异体鱼类发育成表型雄鱼^[2–3], 且雄性率与药物浓度存在明显的剂量依赖关系, 诱导获得的雄鱼精巢大小和组织结构与正常雄鱼无明显差异; 对于已完成性分化的雌雄同体鱼类^[4–5], AI 同样可有效促使其发生性逆转, 并获得可用于繁殖的成熟个体。

研究发现, 伴随性分化或性逆转过程, 芳香化酶基因(*Cyp19a1*)、DM-相关转录因子 1(DM-related transcription factor1, DM-*Dmrt1*)、翼状螺旋/

叉头转录因子 2(winged helix/forkhead transcription factor2, *Foxl2*)等基因的表达相应发生变化。如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在性分化之前, 脑中 *Cyp19a1b*(脑型芳香化酶)基因及芳香化酶活性即具有明显的性别差异表达模式^[6]; 同样, 性别尚未分化的黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)中也特异性地检测到了芳香化酶 mRNA 表达, 且 *Cyp19a1* 在分化的卵巢中持续表达, 在精巢中几乎不表达^[7]。而 *Foxl2* 被认为是卵巢分化通路上的重要基因, 在性腺形态学分化之前, *Foxl2* 就已在硬骨鱼类雌性性腺体细胞中差异性表达^[8], 参与鱼类的性腺分化。经 AI 处理后, 青鳉(*Oryzias latipes*)脑、垂体和性腺中芳香化酶活性或 *cyp19a1* mRNA 表达不同程度地降低^[9], 并且大多数种类 AI 对

收稿日期: 2013–01–29; 修订日期: 2013–04–02.

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划重点项目(桂科合 1140009-4).

作者简介: 李广丽(1967–), 女, 教授. 主要研究方向为水产经济动物繁殖生理学与内分泌学.

E-mail: guangli211@163.com

通信作者: 朱春华(1967–), 副教授. E-mail: zhuch@gdou.edu.cn

Cyp19a1a(卵巢型芳香化酶基因)的抑制效果要比对 *Cyp19a1b* 的抑制效果强^[10]。

在诱导性分化和性逆转的研究中,目前多采用类固醇型 ATD(雄烯二酮)、4-OHA(4-羟雄烯二酮)以及非类固醇型 Fadrozole 和来曲唑作为抑制剂药物。其中,来曲唑在选择性和抑制雌激素的强度上较法曲唑(Fadrozole)有很大的提高,且不会影响肾上腺激素的代谢,因此被广泛使用。本研究选取中国南方大面积养殖的雌雄生长速度存在显著差异(雄鱼生长快于雌鱼)的淡水经济鱼类——胡子鲶(*Clarias fuscus*)为研究对象,在已探明其性分化关键时期^[11]并获得 *Cyp19a1b* 基因全长^[12]的基础上,拟以不同剂量来曲唑处理处于性分化不稳定期的胡子鲶,检测来曲唑对其性腺组织学、性别比率及 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 基因表达的影响,旨在揭示 AI 诱导性分化的作用机制,丰富和完善鱼类性别调控理论,为胡子鲶单性育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胡子鲶仔鱼为广西玉林牧源渔牧有限公司同一批亲鱼繁殖孵化而来。

1.2 试剂

芳香化酶抑制剂来曲唑购自 Sigma 公司,Trizol Reagent 购自 Invitrogen, M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega, TaqTM、DL2000 DNA Marker 购自 Takara、SYBR 荧光定量 RT-PCR 测定试剂盒购自 Bio-Rad。其余均为国产分析纯试剂,购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.3 实验设计

将来曲唑以无水乙醇溶解后,与鲶人工饲料拌和分别配制成 50、100 和 200 μg/g 的药饵,4℃ 冰箱保存备用。

实验期间仔鱼置于 320 cm×200 cm×100 cm 水泥池中饲养。水温(26±1)℃, pH 7.2, 自然光照,充氧泵 24 h 不间断充气,保持水体溶解氧>6 mg/L。

出膜后 2 d 仔鱼,分别投喂不同含量的来曲唑药饵,对照组投喂不添加药物的饵料。每个处

理组均设 1 平行,每组约 250 尾。30 d 后,所有处理组的饲养方式调整至与对照组相同,并继续饲养至外观可分辨雌雄,统计性比。在处理期间,每 1~2 d 随机取 6 尾仔鱼 Bouin 氏液固定用于性腺发育的组织学观察。出膜后第 12 天、18 天、24 天和 30 天,从 200 μg/g 来曲唑投喂组随机取 4 尾仔鱼,液氮保存用以检测性腺分化过程中 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 基因的表达。

1.4 方法

1.4.1 组织学检测 Bouin 氏液固定后样品去头去尾,常规石蜡包埋,连续横切片,切片厚度为 6~8 μm, HE 染色, Leica DM 60008 显微镜观察并拍照。

1.4.2 性分化时期 *Cyp19a1b* 及 *Foxl2* 基因表达检测 根据本实验室已获得的 *Cyp19a1b* 基因全序列以及 *Foxl2* 部分序列,设计 P1、P2 和 P3、P4 引物对,分别用于检测 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 基因的表达。 β -actinF 和 β -actinR 作为内参引物用于 β -actin 基因的扩增(表 1)。所有引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

对液氮保存的每 1 尾仔鱼分别提取总 RNA,取 2 μg 总 RNA 进行反转录。取反转录产物 0.5 μL,分别以 P1 和 P2、P3 和 P4 为引物检测经药物处理后 *cyp19a1b* 和 *foxl2* 的表达,实验流程参照 Bio-Rad SYBR 荧光实时定量 PCR 测定试剂盒操作说明进行。PCR 反应程序为:预变性 95℃ 30 s, 1 个循环; PCR 反应: 95℃ 5 s, 55.9℃/54.9℃ 5 s, 72℃ 10 s, 39 个循环, 溶解曲线温度为 65~95℃。

表 1 检测胡子鲶 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 表达所用引物
Tab. 1 Primers for detecting expression of *Cyp19a1b* and *Foxl2* gene in *Clarias fuscus*

引物 primer	序列(5'-3') sequence (5'-3')	碱基位置/nt position
P1	ACGCTGTCCATCAGTCTGTTCT	90-111
P2	CAGGATGGAAACGCAGAGATT	247-267
P3	CGGAAATCTCTCTTCGGTG	89-108
P4	GCTCCCGCTCGTCATTG	216-233
β -actinF	ACCGCCGCCTCTTCCTC	145-261
β -actinR	TTCCACAGGACTCCATACCCAG	259-280

注: Y=C+T, V=A+C+G, B=G+C+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, H=A+C+T.

1.5 数据处理

根据荧光实时定量 PCR 测得的 C_t 值, 运用 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算胡子鲶 *Cyp19a1b* 及 *Foxl2* 性分化过程中的表达量, 以胡子鲶 β -actin 基因为内参, 校正两基因的相对表达量, 结果以平均值 $\pm$ 标准误 ($\bar{x}\pm SE$)表示。性比及成活率采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 卡方(χ^2)检验, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 来曲唑对胡子鲶性分化的影响

来曲唑促进胡子鲶精巢分化但抑制卵巢分化。对照组、低(50 $\mu\text{g/g}$)、中(100 $\mu\text{g/g}$)和高(200 $\mu\text{g/g}$)剂量处理组卵巢腔最早出现时间分别为出膜后 16(图 1a)、16、19 和 22 d(图 1b); 初级卵母

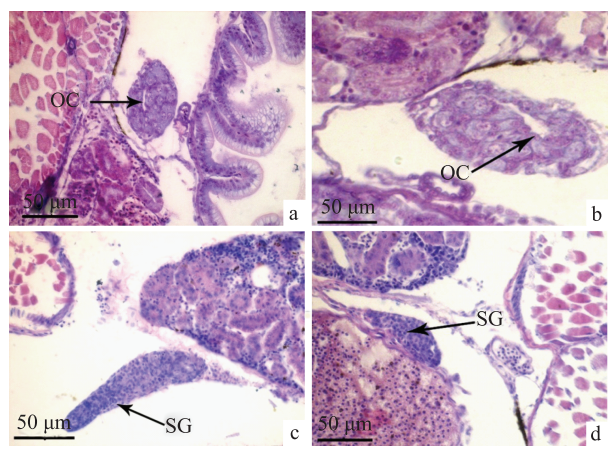


图 1 芳香化酶抑制剂来曲唑对胡子鲶性分化的影响
a. 对照组出膜后 16 d 卵巢; b. 200 $\mu\text{g/g}$ 来曲唑组出膜后 22 d 卵巢; c. 对照组出膜后 30 d 精巢; d. 200 $\mu\text{g/g}$ 来曲唑组 25 日精巢。OC: 卵巢腔; SG: 精原细胞。

Fig. 1 Effects of letrozole on sex differentiation of *Clarias fuscus*
a. Control ovary on day 16 after hatching; b. Ovary on day 22 treated by 200 $\mu\text{g/g}$ letrozole; c. Control testis on day 30 after hatching; d. Testis on day 25 treated by 200 $\mu\text{g/g}$ letrozole; OC: ovarian cavity; SG: spermatogonia.

细胞最早出现时间分别为出膜后 22、22、25 和 28 d。对照组大量精原细胞最早出现时间为 30 d(图 1c), 初级精母细胞最早出现时间为 40 d; 各剂量来曲唑处理组大量精原细胞最早出现时间分别为 30、28 和 25 d(图 1d), 初级精母细胞最早出现时间分别为 40、37 和 34 d。

2.2 来曲唑对胡子鲶成活率和性别比率的影响

药物处理显著影响胡子鲶性别比率(表 2)。经 50、100 和 200 $\mu\text{g/g}$ 来曲唑处理后, 各组胡子鲶雄性率分别为 65%、66%和 71%, 其中低浓度组(50 $\mu\text{g/g}$)与对照组(51%)相比无显著差异($P>0.05$), 但 100 $\mu\text{g/g}$ 和 200 $\mu\text{g/g}$ 来曲唑处理组雄性率显著高于对照组($P<0.05$), 且雄性率与处理剂量之间存在一定的剂量依赖关系。

2.3 芳香化酶抑制剂来曲唑对胡子鲶 *Cyp19a1b* 及 *Foxl2* 基因表达的影响

在整个性腺分化时期, 对照组胡子鲶 *Cyp19a1b* 表达量一直保持恒定, 而 *Foxl2* 表达量在出膜后 12 d 最高, 此后随性腺分化进程持续显著降低($P<0.05$)。200 $\mu\text{g/g}$ 来曲唑显著抑制 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 的 mPNA 表达($P<0.05$); 来曲唑处理后, *Cyp19a1b* 相对表达量在性腺分化前后无显著差异, 但 *Foxl2* 相对表达量则随时间而逐渐降低(图 2)。

3 讨论

3.1 芳香化酶抑制剂来曲唑对胡子鲶性分化及性别比率的影响

性腺形态学及细胞学上的某些特征可作为鱼类早期性别判定的依据, 如卵巢腔和输精管的形成分别是卵巢和精巢分化过程的重要标志, 而性母细胞的出现标志着细胞学分化的开始。对胡子

表 2 不同质量浓度来曲唑处理对胡子鲶性别比率的影响
Tab. 2 Effects of letrozole with different concentrations on the sex ratio of *Clarias fuscus*

处理组 traetment group	样本数 sample size	雄鱼数 number of males	雄性率/% male ratio	χ^2	P
对照 control	94	48	51	0.0000	1
50 $\mu\text{g/g}$	85	30	65	3.4002	0.065
100 $\mu\text{g/g}$	82	28	66	3.9314	0.047
200 $\mu\text{g/g}$	80	23	71	7.3593	0.007

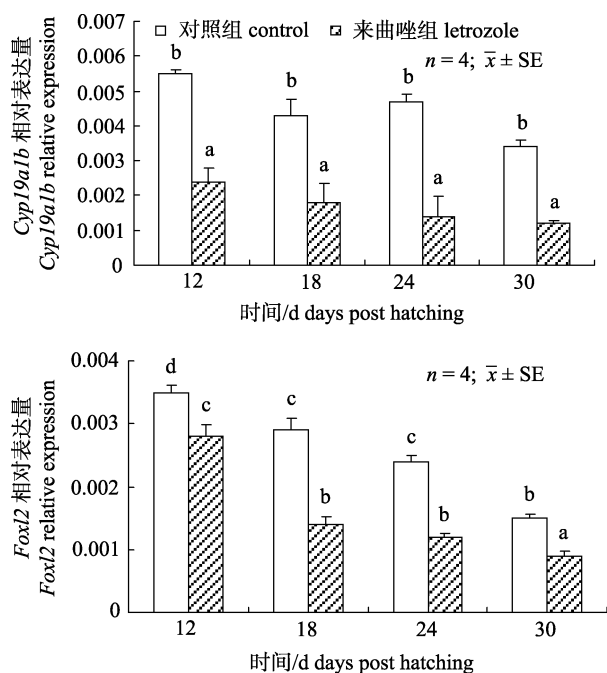


图 2 芳香化酶抑制剂来曲唑对胡子鲇性分化时期

Cyp19a1b 和 *Foxl2* 表达的影响

不同字母表示各组间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effects of aromatase inhibitor Letrozole on *Cyp19a1b* expression in the sex differentiation of *Clarias fuscus*
Different letter indicates significant difference among groups ($P < 0.05$)

鲇而言, 根据卵巢腔及精细管出现时间, 已初步判定其卵巢分化最早开始于出膜后 16 日龄, 而精巢分化最早开始于出膜后 30 日龄^[11]。但投喂来曲唑对胡子鲇幼鱼精巢和卵巢分化速度产生了不同影响。与对照组相比, 100 $\mu\text{g/g}$ 和 200 $\mu\text{g/g}$ 剂量的来曲唑可使胡子鲇精巢分化时间提前约 2~5 d, 卵巢分化推迟约 3~6 d, 但 50 $\mu\text{g/g}$ 来曲唑对胡子鲇幼鱼的性腺分化时间无明显影响。虽然目前尚未见来曲唑处理后导致其他鱼类卵巢或精巢分化时间滞后或提前的报道, 但经雌激素处理后, 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)卵巢分化提前 7 d, 精巢分化推迟 14 d^[13], 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵巢分化提前约 5 d, 精巢分化推迟 20 d^[14]; 相反, 雄激素处理则可有效促进雌雄间体黄鲢(*Monopterus albus*)早期的雄性生殖细胞发育, 促使雌性黄鲢卵母细胞退化^[15], 并加快黄颡鱼精巢分化^[13]。因此, 来曲唑可能通过抑制雌激素的生物合成, 导致肝卵黄蛋白原合成速度降低或合

成量减少, 从而推迟胡子鲇卵巢分化进程; 而精巢分化过程的加快可能源于来曲唑抑制雌激素的生物合成, 导致雄激素在体内浓度的升高, 直接刺激了原始生殖细胞分化和增殖。

本研究中, 100~200 $\mu\text{g/g}$ 剂量的来曲唑导致胡子鲇雄性率达 66%~71%, 与对照组存在显著差异, 且雄性率与处理剂量存在一定的剂量依赖关系。对暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)的研究发现, 初孵仔鱼经 25~3125 $\mu\text{g/L}$ 的来曲唑处理后, 125 $\mu\text{g/L}$ 以上剂量即可导致鱼类出现间性性腺, 625 $\mu\text{g/L}$ 剂量样本显示表型雄性和间性体, 未见雌性, 而剂量高达 3125 $\mu\text{g/L}$ 时所有样本表型均显示为雄性^[16]。同样的现象在多种鱼类中也得到证实, 如性未分化的大鳞大麻哈鱼(*Onchorhynchus tshawytscha*)只需在质量浓度为 10 mg/L 的 Fadrozole 溶液中浸泡 2 h, 原来具有雌性遗传基因的个体即发育成表型雄鱼^[2]; 基因型为雌性的性未分化的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)鱼苗用 Fadrozole 喂养 30 d 后, 雄性率达 90%以上, 且雄性率与抑制剂浓度存在明显的剂量依存关系^[3]; 在虾虎鱼(*Coryphopeterus nicholsii*)^[4]、石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[5]等鱼类中也观察到 AI 的诱导雄性效果。上述研究均证实, AI 在不同程度上降低了脑、垂体和性腺中芳香化酶活性或 *Cyp19a1* mRNA 表达, 阻碍类固醇激素的正常代谢途径, 使雌激素的生成量减少, 从而影响脊椎动物正常性分化和性腺发育, 使雄性率增加, 或使雌性动物转变成雄性。本研究中, 激素处理后单性性别后代未达到 100%, 可能是处理时间短或处理剂量低的原因, 但胡子鲇后代雄性比率与处理激素浓度呈剂量依赖关系。

3.2 芳香化酶抑制剂来曲唑对胡子鲇 *Cyp19a1b* 及 *Foxl2* 基因表达的影响

在斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)^[17]、尼罗罗非鱼^[18]和莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[19]等多种鱼类, 已发现 *Cyp19a1b* 在性分化开始前即开始表达, 且主要在脑中高表达, 推测 *Cyp19a1b* 可能主要参与脑的性分化或雌激素介导的神经雌激素合成。对胡子鲇的研究发现,

出膜后 12 d 即可检测到 *Cyp19a1b* 表达, 但分化过程中其相对表达量保持不变, 暗示 *Cyp19a1b* 可能是通过调节“下丘脑-垂体-性腺轴”活动而间接参与胡子鲶的性分化过程。同样, 在胡子鲶性分化前可检测到 *Foxl2* 表达, 出膜后 12 d 最高, 此后随性腺分化进程持续显著降低, 暗示 *Foxl2* 直接参与胡子鲶性腺分化过程。已有研究表明, *Foxl2* 在罗非鱼性腺分化早期就开始表达, 并直至成体^[20]; 而具有性逆转现象的石斑鱼在自然性逆转过程后期以及完成阶段 *Foxl2* 表达明显下降, 促使卵巢细胞的退化^[21]; 对南方鲇(*Silurus meridionalis*)的研究表明, *Foxl2* 通过影响雌激素的合成分别在脑和性腺两个层次上对性腺分化起重要作用^[22]。本研究结果与前人结果基本一致, 表明 *Foxl2* 对胡子鲶卵巢分化有重要的调节作用。

经芳香化酶抑制剂来曲唑处理后, 胡子鲶 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 相对表达量均显著降低。而南方鲇经 Fadrozole 处理后也显著抑制性腺分化时期 *Foxl2* 和 *Cyp19a1b* 表达^[22]。对青鳉的研究表明, 来曲唑浸泡青鳉雌性成鱼或受精卵后, 可抑制 *Cyp19a1b* 的表达, 并影响卵黄蛋白原在卵母细胞中的合成和积累, 抑制卵子发生^[23]; 斑马鱼(*Danio rerio*)长期用 letrozole 处理也可导致 *Cyp19a1b* 的表达水平降低^[24]。由于大多数 AI 对 *Cyp19a1a* 的抑制效果强于 *Cyp19a1b*^[10], 因此推测来曲唑处理后胡子鲶 *Cyp19a1a* 下降将更为显著。研究发现, *Foxl2* 与 *Cyp19a1* 表达在时空上高度相关, 皆在雌性胚胎性腺髓质表达, 且 *Foxl2* 上调 *Cyp19a1* 的表达^[25]。如在罗非鱼性腺分化早期, *Foxl2* 可提高 *Cyp19a1* 转录水平^[20], 且无论是在 mRNA 还是蛋白水平上, *Foxl2* 和芳香化酶都共同表达于雌性腺体细胞^[8]。因此推测, 芳香化酶抑制剂来曲唑通过降低 *Foxl2* 而抑制 *Cyp19a1* 转录水平, 进而妨碍雌激素正常的生物合成过程, 抑制卵巢分化。石蜡切片显示的胡子鲶卵巢分化推迟而精巢分化提前也印证了以上推测。

综上所述, AI 剂量与雄性率存在正相关, 100 $\mu\text{g/g}$ 以上剂量来曲唑可有效诱导胡子鲶分化为雄性; *Cyp19a1b* 可能不是引起胡子鲶性腺分化的

直接因素, 但 *Foxl2* 直接参与此过程。

参考文献:

- [1] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influence[J]. Aquaculture, 2002, 208: 191–364.
- [2] 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]. Exp Zool, 1994, 270(3): 255–262.
- [3] Kwon J Y, Haghpanah V, Kogson-Hurtado L M, et al. Masculinization of genetic female Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation [J]. Exp Zool, 2000, 287: 46–53.
- [4] Kroon F J, Liley N R. The role of steroid hormones in Protogynous sex change in the blackeye goby, *Coryphopterus nicholsii*(Teleostei:Gobiid)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2000, 118: 273–283.
- [5] 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.
- [6] Cantonnet D, Anglade I, Pellegrini E, et al. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations[J]. Gen Comp Endocrinol, 2011, 170: 346–355.
- [7] Wu G C, Tomy S, Nakamura M, et al. Dual roles of *Cyp19a1a* in gonadal sex differentiation and development in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Biol Reprod, 2008, 79: 1111–1120.
- [8] Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, et al. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. Biol Reprod, 2008, 78(2): 333–341.
- [9] Nakamoto M, Wang D S, Suzuki A, et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 344: 353–361.
- [10] 崔中立, 张沐新, 杨晓虹. 芳香化酶抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2010, 20(1): 17–24.
- [11] 王文达, 朱春华, 邓思平, 等. 胡子鲶性腺发生与分化组织学研究[J]. 水生生物学报, 2012, 36 (5): 993–997.
- [12] 孙晶, 李广丽, 朱春华, 等. 胡子鲶脑型芳香化酶基因全长 cDNA 克隆及表达[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 408–415.

- [13] 姚道霞. 黄颡鱼性分化及激素诱导性转化研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [14] 张晓彦, 刘海金. 17 β -雌二醇对半滑舌鲷性分化和生长的影响[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(6): 67–72.
- [15] 卓孝磊, 邹记兴, 崔科. 外源性甲基睾丸酮对雌性和间性黄鳝性腺发育的影响[J]. 水生生物学报, 2008, 32(6): 861–867.
- [16] 汪奇, 郭正龙, 李延伸, 等. 来曲唑对暗纹东方鲀性腺分化及相关基因表达的影响[J]. 动物学杂志, 2012, 47(95): 16–23.
- [17] Ganesan N, Tsai Y J, Chen C Y, et al. Developmental expression of genes involved in neural estrogen biosynthesis and signaling in the brain of the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* during gonadal sex differentiation [J]. Steroid Biochem Mol Biol, 2011, 127(3–5): 155–166.
- [18] Chang X T, Kobayashi T, Senthilkumaran B, et al. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 141(2): 101–115.
- [19] Esterhuysen M M, Helbing C C, Van Wyk J H. Temporal expression of two cytochrome P450 aromatase isoforms during development in *Oreochromis mossambicus*, in association with histological development [J]. Comp Biochem Physiol, 2008, 3 (4): 297–306.
- [20] Wang D S, Kobayashi T, Zhou L Y, et al. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 320: 83–89.
- [21] Alam M A, Kobayashi Y, Horiguchi R. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus merra*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2008, 157: 75–85.
- [22] 吴凤瑞, 王德寿. 南方鲇 *Foxl2* 基因克隆、表达及其在性腺分化中作用的初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [23] Kishida M, Callard G V. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development [J]. Endocrinology, 2001, 142 (2): 740–750.
- [24] Yukinori K, Allen R P, John M T. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish(*Danio rerio*) juveniles[J]. Aquatic Toxicol, 2004, 69: 25–34.
- [25] Hudson Q J, Smith C A, Sinclair A H. Aromatase inhibition reduces expression of *Foxl2* in the embryonic chicken ovary [J]. Dev Dynam, 2005, 233: 1052–1055.

Effects of aromatase inhibitor letrozole on sex differentiation and related gene expression in *Clarias fuscus*

LI Guangli^{1,2}, DENG Siping^{1,2}, SUN Jing^{1,2}, WANG Wenda^{1,2}, SHI Shangli^{1,2}, ZHU Chunhua^{1,2}

1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025, China;

2. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Higher Education Institutes, 524025, China

Abstract: In this study, *Clarias fuscus*, a common freshwater fish in China, were selected to determine the effects of an aromatase inhibitor on sex differentiation and related gene expression. Two-day-old juvenile *C. fuscus* were fed different doses of the aromatase inhibitor, letrozole (50, 100, and 200 µg/g diets) for 30 days. The effects of letrozole on sex ratio, gonad histology, and *Foxl2* and *Cyp19a1b* expression were examined by morphological observation, histology, and real-time fluorescent quantitative PCR during the period of sex differentiation (12–30 d after hatching). The results showed that letrozole doses of 100 µg/g and 200 µg/g produced more males (65.9% and 71.3%, respectively) than did a dose of 50 µg/g (64.7%) ($P < 0.05$). However, no significant difference in sex ratio was observed between the 50 µg/L 17 α -MT treated group and the control group (51.1%). In addition, letrozole accelerated the occurrence of primary spermatocytes for 2 and 5 days, but deferred that of ovarian cavity and primary oocytes for 3 and 6 days, respectively. Both *Cyp19a1b* and *Foxl2* were expressed prior to sex differentiation in *C. fuscus*. No difference was observed in the level of *Cyp19a1b* expression prior to and post sex differentiation (12–30 d after hatching). However, *Foxl2* expression decreased with gonadal differentiation. In addition, letrozole at dose of 200 µg/g inhibited the expression of both *Cyp19a1b* and *Foxl2* ($P < 0.05$). Our results suggest that letrozole doses above 100 µg/g could induce *C. fuscus* masculinization, and that *Cyp19a1b* is not directly involved in the process of gonadal differentiation but *Foxl2* is.

Key words: *Clarias fuscus*; sex differentiation; aromatase inhibitor; *Foxl2*; *Cyp19a1b*

Corresponding author: ZHU Chunhua. E-mail: zhuch@gdou.edu.cn