

doi: 10.7541/2013.136

性类固醇激素对胡子鲶性分化的影响

李广丽^{1,2} 邓思平^{1,2} 王文达^{1,2} 孙 晶^{1,2} 吴天利^{1,2} 师尚丽^{1,2} 朱春华^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025; 2. 广东海洋大学, 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室, 湛江 524025)

摘要: 研究采用组织学和荧光实时定量PCR方法, 检测17 α -甲基睾酮(17 α -MT)和17 β -雌二醇(17 β -E₂)对胡子鲶(*Clarias fuscus*)性腺组织学、性别比率以及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: 在出膜后2—30日龄, 17 α -MT(50、100和200 μ g/L)浸浴、17 β -E₂(100、200和300 μ g/g)投喂处理对成活率无显著影响, 但中、高剂量(100和200 μ g/L)17 α -MT显著抑制卵巢发育, 促进精巢发育, 卵巢腔出现时间分别推迟4d和6d, 初级卵母细胞出现时间分别推迟8d和9d, 而初级精母细胞出现时间则分别提前3d和5d, 且雄性率分别达70%和76%, 显著高于50 μ g/L组和对照组($P < 0.05$)。相反, 中、高剂量17 β -E₂(200和300 μ g/g)处理使卵巢腔出现时间分别提前2d和3d, 初级卵母细胞出现时间分别提前1d和3d, 初级精母细胞出现时间分别推迟3d和7d, 而雌性率分别达74%和78%, 显著高于100 μ g/g组和对照组($P < 0.05$)。此外, 在性腺分化期, 17 α -MT促进*Cyp19a1b*但抑制*Foxl2*的表达, 而17 β -E₂促进*Cyp19a1b*和*Foxl2*的表达。结果显示*Cyp19a1b*不是引起胡子鲶性分化的直接因素, 但可能通过“下丘脑-垂体-性腺轴”对胡子鲶性分化过程产生间接影响; 而*Foxl2*直接参与胡子鲶的性分化, 即17 α -MT和17 β -E₂分别通过抑制和促进*Foxl2*的表达来影响雌激素的生物合成, 从而调控胡子鲶性分化的方向。

关键词: 胡子鲶; 性分化; 17 α -甲基睾酮; 17 β -雌二醇; *Cyp19a1b*; *Foxl2*

中图分类号: Q344⁺.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)06-1020-08

具有双向潜力的未分化性腺经过程序性发生一系列变化, 发育成精巢或卵巢, 并出现第二性征的过程称为性分化; 性别决定则是指决定性分化的机制, 是性分化的基础。与高等脊椎动物不同, 鱼类的性别决定除受遗传因素(遗传型性别决定, GSD)的控制外, 外部环境因素(环境性别决定, ESD)如温度、外源激素等也可在不同程度上影响其性别^[1]。在正常条件下, 大多数鱼类的性别主要决定于基因型, 其性分化和发育过程受到内在因素和外部环境的调控^[2], 并通过脑(下丘脑)-垂体-性腺轴内分泌系统实现^[3]。

在鱼类性分化与发育过程中, 芳香化酶基因(cytochrome P450 aromatase, *Cyp19*: 卵巢型 *Cyp19a1a*, 脑型 *Cyp19a1b*)、类固醇生成因子-1(Steroidogenic factor 1, *sfl*)、剂量敏感性反转-先天

性肾上腺发育不良基因(Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1, *dax1*)、翼状螺旋/叉头转录因子2(Winged helix/forkhead transcription factor 2, *Foxl2*)、Doublesex和Mab-3相关转录因子1(Doublesex and Mab-3 related transcription factor 1, *Dmrt1*)、抗苗勒管激素(Anti-müllerian hormone, *amh*)和Y染色体性别决定区相关高速泳动族框因子9(SRY-related high mobility group-box gene 9, *sox9*)等基因发挥重要作用。其中, *Foxl2*和*Dmrt1*分别是迄今在硬骨鱼类中发现的最为重要的卵巢和精巢促进基因, 它们通过调节*Cyp19*的表达来控制雌激素水平, 直接影响非哺乳类脊椎动物特别是硬骨鱼类性分化的方向, 在鱼类性别决定和分化中起重要作用^[4]; 而*Cyp19a1a*和*Dmrt1*的表达分别被认为是非哺乳类脊椎动物雌性

收稿日期: 2012-07-30; 修订日期: 2013-05-16

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)资助

作者简介: 李广丽(1967—), 女, 吉林延边人; 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—), E-mail: zhuch@gdou.edu.cn

别分化开始的重要标志^[5, 6]。

已证明, 性类固醇激素可定向诱导鱼类性分化。通常, 在鱼类性分化的不稳定期内(一般为性分化之前某一段时间), 雄激素诱导雌性化, 而雌激素诱导雌性化。如 40 $\mu\text{g/g}$ 的 17 β -雌二醇(17 β -E₂)处理出膜后 3—20d 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)可获得全雌后代^[7], 而 260—1000 ng/L 的 17 α -甲基睾酮(17 α -MT)浸浴斑马鱼(*Danio rerio*), 可使其出现显著的雄性化, 并获得一定比例的兼性鱼^[8]。现已发现在鱼类卵巢和精巢中存在雌、雄激素受体(ER 及 AR), 并且它们能够分别被雌激素和雄激素所诱导^[5]。此外, 在激素诱导性分化过程中, 也发现某些性别相关基因如 *Cyp19a1a*、*Dmrt1*、*Foxl2* 等表达量发生显著变化^[9, 10]。因此, 激素诱导性分化可能是由于激素与特殊的受体结合, 促使其特定性别相关基因的转录与表达, 从而导致性分化。

胡子鲶(*Clarias fuscus*)是我国南方大面积养殖的淡水经济鱼类之一, 其适应性强, 营养价值高, 目前在广东、广西、福建形成规模化养殖产业, 市场潜力巨大。在同等养殖条件下, 雌、雄胡子鲶生长速度存在显著差异, 雄鱼生长速度远远高于雌鱼, 且市场售价普遍高于雌鱼。因此, 单雄或高比例雄性胡子鲶的养殖可以有效加快群体生长速度, 提高产量及经济效益。目前, 本实验室已探明胡子鲶性分化关键时期^[11], 克隆了 *Cyp19a1b* 和 *Dmrt1* 基因全长及其表达^[12, 13]。在此基础上, 本研究拟以不同剂量 17 α -MT 和 17 β -E₂ 处理处于性分化不稳定期内的胡子鲶, 检测激素对性腺组织学、性别比率及 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 表达的影响, 旨在揭示激素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, 其后续成果开发应用可望产生重大的经济效益和社会效益。

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

17 α -MT 和 17 β -E₂ 购自 Sigma 公司, Trizol Reagent 购自 Invitrogen, M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega, *Taq*TM、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, 购自上海生工生物有限公司。

1.3 实验设计

将 17 α -MT 以无水乙醇溶解后, 分别配制成浓度分别为 50、100 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的溶液; 17 β -E₂ 以无水乙醇溶解后, 与人工饲料拌和分别配制成 100、200 和 300 $\mu\text{g/g}$ 的药饵, 4℃ 冰箱保存备用。

实验期间仔鱼置于 320 $\text{cm} \times 200 \text{ cm} \times 100 \text{ cm}$ 水泥池中饲养。水温(26 $\pm$ 1)℃, pH 7.2, 自然光照, 充氧泵 24h 不间断充气以保持溶氧充足。

出膜后 2d 仔鱼, 分别浸浴在 3 个不同浓度的 17 α -MT 溶液中, 另设 3 个处理组分别投喂不同浓度的 17 β -E₂ 药饵。对照组和浸浴组每天投喂冰鲜饵料。每个处理组均设 1 平行, 每条约 500 尾。30d 后统计成活率, 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—2d 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、第 18、第 24 和第 30 天, 200 $\mu\text{g/L}$ 17 α -MT 浸浴组和 300 $\mu\text{g/g}$ 17 β -E₂ 投喂组随机取 4 尾仔鱼, 液氮保存以用于检测性腺分化过程中 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 基因表达情况。

1.4 方法

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, 切片厚度为 6—8 μm , HE 染色, Leica DM 60008 显微镜观察并拍照。

性分化时期 *Cyp19a1b* 及 *Foxl2* 基因表达 根据本实验室已获得的 *Cyp19a1b* 基因全序列以及 *Foxl2* 部分序列, 分别设计 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公司合成。

对液氮保存的每一尾仔鱼分别提取总 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℃ 30s, 1 循环; PCR 反应: 95℃ 5s, 55.9℃/54.9℃ 5s, 72℃ 10s, 39 循环, 融解曲线温度为 65—95℃。

1.5 数据处理

根据荧光实时定量 PCR 测得的 *Ct* 值, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算胡子鲶 *Cyp19a1b* 及 *Foxl2* 性分化过程

中的表达量,以胡子鲇 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(Mean $\pm$ 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

2.1 性类固醇激素对性分化的影响

17 α -MT 抑制胡子鲇卵巢分化但促进精巢分化。对照组、低(50 μ g/L)、中(100 μ g/L)和高(200 μ g/L)浓度处理组卵巢腔出现时间分别为 16(图版 I-1)、16、20 和 22d(图版 I-2),大量卵原细胞出现时间分别为 18、18、24 和 25d,而初级卵母细胞出现时间分别为 22、22、30 和 31d。相反,经 17 α -MT 处理后,对照组、低、中、高浓度组大量精原细胞出现时间分别为 30(图版 I-4)、30、28 和 26d(图版 I-5),初级精母细胞出现时间分别为 40、40、37 和 35d。

17 β -E₂ 促进胡子鲇卵巢分化但抑制精巢分化。低(100 μ g/g)、中(200 μ g/g)、高浓度(300 μ g/g)组,卵巢腔出现时间分别为 16、14 和 13d(图版 I-3),初级卵母细胞出现时间分别为 22、20 和 19d。相反,低、中、高浓度组大量精原细胞出现时间分别为 30、35 和 35d(图版 I-6),初级精母细胞出现时间分别为

40、43 和 47d。

2.2 性类固醇激素对成活率和性别比率的影响

胡子鲇对照组成活率为 88%,不同浓度 17 α -MT 处理后成活率为 83.6%—86.6%,经 17 β -E₂ 处理后成活率为 84%—88.4%。 χ^2 检验表明,药物处理对胡子鲇成活率无显著影响($P > 0.05$)。

药物处理显著影响胡子鲇性别比率(表 2)。低(50 μ g/L)、中(100 μ g/L)、高(200 μ g/L)浓度 17 α -MT 处理后,各组胡子鲇雄性率分别为 54%、70%和 76%,其中低浓度组与对照组(44%)相比无显著差异,但中、高浓度组雄性率显著高于对照组($P < 0.05$)。相反,经低(100 μ g/g)、中(200 μ g/g)、高(300 μ g/g)浓度 17 β -E₂ 处理后,胡子鲇雌性率分别为 66%、74%和 78%,中、高浓度组雌性率显著高于对照组和低浓度组($P < 0.05$)。

2.3 性类固醇激素对 *Cyp19a1b* 及 *Foxl2* 基因表达的影响

经 17 α -MT (200 μ g/L)和 17 β -E₂(300 μ g/g)处理后,胡子鲇 *Cyp19a1b* 的表达量均显著高于对照组(个别除外,图 1)。17 α -MT 处理后,*Cyp19a1b* 的表达量在出膜后 18d 达最高,此后逐渐降低($P < 0.05$);但 17 β -E₂ 处理后,*Cyp19a1b* 的表达量在出膜后 12 d 最高,并显著高于此后各时间点($P < 0.05$)。

表 1 检测胡子鲇 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 表达所用引物

Tab. 1 Primers for expressions of *Cyp19a1b* and *Foxl2* in *C. fuscus*

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	碱基位置 Position (bp)
P1	ACGCTGTCCATCAGTCTGTTCT	90—111
P2	CAGGATGGAAACGCAGAGATT	247—267
P3	CGGAAATCTCTCTTCGGTG	89—108
P4	GCTCCCGCTCGTCATTG	216—233
β -actinF	ACCGCCGCTCTTCCTC	145—261
β -actinR	TTCCACAGGACTCCATACCCAG	259—280

表 2 17 α -MT 和 17 β -E₂ 对胡子鲇性别比率的影响

Tab. 2 Effects of 17 α -methyltestosterone and 17 β -estradiol on the sex rate of *C. fuscus*

处理 Treatment (μ g/L)	雄性率 Male ratio (%)	雌性率 Female ratio (%)	χ^2	P
对照	44	56	0	1
17 α -MT	50	54	0.014	0.131
	100	70	6.928	0.018
	200	76	10.67	0.004
	100	66	1.053	0.089
17 β -E ₂	200	74	3.569	0.034
	300	78	5.472	0.016

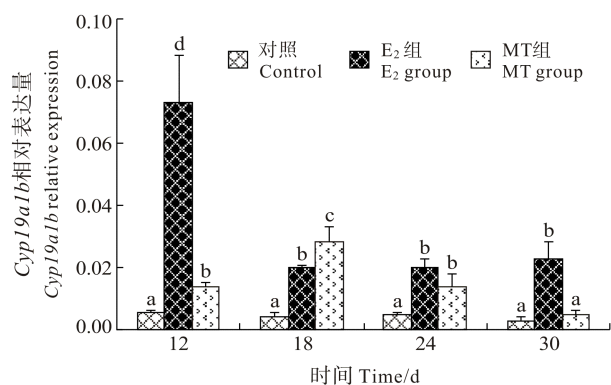


图1 17 β -雌二醇和17 α -甲基睾酮对胡子鲶性分化时期 *Cyp19a1b* 表达的影响

Fig. 1 Effects of 17 β -E₂ and 17 α -MT on *Cyp19a1b* expression during the sex differentiation of *C. fuscus*

$n=4$, 不同字母表示各组间差异显著($P<0.05$); 下同

$n=4$, Different letter indicates significant difference among groups ($P<0.05$); the same applies below

经17 β -E₂处理后, 出膜后18d, 胡子鲶 *Foxl2* 的表达显著提高($P<0.05$), 而其他时间与对照组无显著差异(图2)。但17 α -MT处理后, 各时期胡子鲶 *Foxl2* 的表达均显著降低($P<0.05$)。

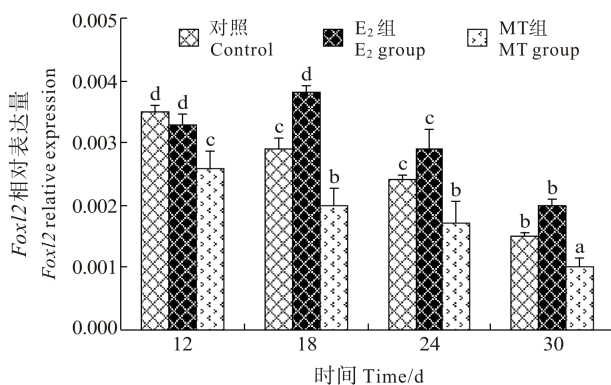


图2 17 β -雌二醇和17 α -甲基睾酮对胡子鲶性分化时期 *foxl2* 表达的影响

Fig. 2 Effects of 17 β -E₂ and 17 α -MT on *foxl2* expression during the sex differentiation of *C. fuscus*

3 讨论

3.1 性类固醇激素对胡子鲶性分化及性别比率的影响

鱼类早期性别可以通过其性腺形态学及细胞学上的某些特征(如微血管的位置、性腺横切面的形状、卵巢腔和精细管、以及初级卵母细胞和精母细胞的出现等)作为判定依据。对胡子鲶而言, 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]。但经17 α -MT和17 β -E₂处理后, 随处理剂量不同, 胡子鲶性分化时间发生变化。中(100 μ g/L)、高(200 μ g/L)浓度17 α -MT使卵巢腔的出现分别推迟4d和6d, 初级卵母细胞的出现分别推迟8d和9d, 而初级精母细胞出现分别提前3d和5d; 相反, 中(200 μ g/g)、高(300 μ g/g)浓度17 β -E₂使卵巢腔的出现分别提前了2d和3d, 初级卵母细胞的出现分别提前了1d和3d。姚道霞等发现, 17 β -E₂促使黄颡鱼卵巢分化提前7d, 精巢分化推迟14d^[14], 促使半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵巢分化提前约5d, 精巢分化推迟20d^[15]。相反, 经17 α -MT处理后, 黄颡鱼精巢分化明显早于对照组^[14], 并促进雌雄间体黄鲢(*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^[16]。已知在鱼类性腺发育的早期阶段, 雌激素和雄激素对垂体GTH均具有正反馈作用^[3], 因此外源性17 β -E₂可能通过正反馈作用, 促使内源性雌激素分泌增加, 雌激素进而刺激肝脏合成卵黄蛋白原, 加快胡子鲶卵巢分化进程。17 α -MT促使精巢分化过程加快, 可能直接源于17 α -MT使GTH升高, 促使雄激素合成和分泌增加, 直接刺激原始生殖细胞分化和增殖。而17 α -MT促使卵母细胞退化, 可能是由于17 α -MT降低芳香化酶的表达, 导致内源性E₂总量降低造成的^[17]。

在诱导鱼类性分化或性逆转实验中, 诱导效果主要取决于三个关键, 即处理时机、处理剂类型和处理剂量, 以及处理的持续时间^[18]。在本实验中, 处于性分化不稳定时期的胡子鲶经低浓度药物处理后, 后代性别比率与对照组无显著差异, 但较高浓度处理后性别比率显著偏离1:1, 分别获得高比例的雄性(17 α -MT)和雌性(17 β -E₂)后代。同样的现象在多种鱼类中也得到证实, 如17 β -E₂ (10 μ g/g)处理未分化的大西洋庸鲈(*Hippoglossus hippoglossus*), 得到74%的雌性率^[19]; 处理孵化后10d的黄颡鱼(剂量为0.02‰), 雌性率达到83.6%^[14], 但剂量为40 μ g/g时得到100%的全雌后代^[7]。17 α -MT (20-100 μ g/L)处理半滑舌鲷, 得到近似100%的雄性后代^[20]; 处理虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)受精卵13周(剂量为3 mg/L), 雄性率达80%^[21]。在本研究中, 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, 胡子鲶后代性别比率与处理激素浓度呈正相关也证明了此推测。此外, 经激素处理后, 对照组与处理组成活率并无显著差异, 表明本实验所用

激素剂量在胡子鲇可承受的阈值范围内。由此可以推测,适当增加激素处理剂量可获得更高比例的雄性或雌性后代。

3.2 性类固醇激素对胡子鲇 *cyp19a1b* 及 *foxl2* 基因表达的影响

在鱼类中,目前已发现由两种不同基因编码的芳香化酶。其中 *cyp19a1a* 主要参与雌激素生物合成和卵巢分化,在性分化中起主要作用^[22],而 *cyp19a1b* 主要参与中枢神经系统发育过程中脑的分化和性行为的调节^[23],也有报道表明其可能参与性分化的调节^[24]。

本实验发现,经 17α -MT 和 17β -E₂ 处理后,胡子鲇 *cyp19a1b* 显著增加,此现象与 17β -E₂ 对黑头鱼 (*Pimephales promelas*)^[25] 和斑马鱼^[26], 17α -MT 对金鱼 (*Carassius auratus*)^[27] 和赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)^[28] *Cyp19a1b* 表达的研究结果一致,暗示 *Cyp19a1b* 对鱼类精巢及卵巢发育均有重要作用。此外,在性分化过程中, 17α -MT 和 17β -E₂ 处理后 *cyp19a1b* 的表达模式明显不同。性分化前, 17β -E₂ 处理组 *cyp19a1b* 的表达量最高,随后保持高于对照组的含量,此现象与 E₂ 主要参与硬骨鱼类雌性状态维持的生理功能相一致^[29]。但 17α -MT 处理后, *cyp19a1b* 的表达量在卵巢分化开始时最高,随后逐渐降低,在 30d 与对照组持平。推测该结果可能是由于部分 MT 被芳香化为雌激素,进而由雌激素调节 *Cyp19a1b* mRNA 的表达。同时, 17α -MT 通过提高脑部芳香化酶活性,将脑部雄激素转化为雌激素,完成脑的性分化^[28]。

许多研究表明,雌、雄激素可以影响 *Dmrtl*、*Foxl2* 和 *cyp19a* 的表达^[30]。在南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 幼鱼全雌种群性分化敏感时期, 17β -E₂ 处理使脑和性腺 *Foxl2* mRNA 表达显著升高,而芳香化酶抑制剂 Fadrozole(F)、雌激素受体拮抗剂 Tamoxifen(Tam)以及 F+Tam 处理则使其下降^[30]。对虹鳉的研究表明,雌激素上调 *Foxl2* mRNA 表达;而雄激素首先抑制 *Foxl2*、*Cyp19a1a* 等卵巢分化相关基因,随后抑制早期卵子发生相关的重要基因,诱导其雄性化^[9]。在本实验中, 17β -E₂ 上调 *Foxl2* mRNA 表达,而 17α -MT 下调 *Foxl2* mRNA 表达,此结果与性腺组织学结果相一致。在罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 性腺分化早期, *Foxl2* 可提高 *Cyp19a* 转录水平^[5],本实验结果与之一致,暗示 *Foxl2* 通过芳

香化酶调节 E₂ 的产生量,从而影响性腺分化。

综上所述, 17α -MT 抑制胡子鲇卵巢发育,促进精巢发育,使雄性率增加; 17β -E₂ 促进胡子鲇卵巢发育,抑制精巢发育,使雌性率增加;同时, 17α -MT 促进 *Cyp19a1b* 但抑制 *Foxl2* 的表达,而 17β -E₂ 促进 *Cyp19a1b* 和 *Foxl2* 的表达。可以认为, *Cyp19a1b* 不是引起胡子鲇性腺分化的直接因素,但 *Foxl2* 直接参与胡子鲇的性腺分化,即 17α -MT 和 17β -E₂ 分别通过抑制和促进 *Foxl2* 的表达来影响雌激素的生物合成,从而调控胡子鲇性腺分化的方向。

参考文献:

- [1] Ospina-Alvarez N, Piferrer F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change [J]. *Public Library of Science One*, 2008, **3**(7): 1—11
- [2] Baroiller J F, D'Cotta H. Environment and sex determination in farmed fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology*, 2001, **130**(4): 399—409
- [3] Lin H R. Fish Physiology (2nd) [M]. Guangzhou: Guangdong High Education Press. 2007, 205—212 [林浩然. 鱼类生理学(第二版), 广州: 广东高等教育出版社. 2007, 205—212]
- [4] Wang D S, Zhou L Y, Kobayashi T. Doublesex-and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia [J]. *Endocrinology*, 2010, **151**(3): 1331—1340
- [5] Delvin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. *Aquaculture*, 2002, **208**(3—4): 191—364
- [6] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, **165**(3): 352—366
- [7] Park I S, Jung H K, Sung H C. Sex differentiation and hormonal sex reversal in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco* [J]. *Aquaculture*, 2004, **232**(1—4): 183—193
- [8] Baron D, Coequet J, Xia X, et al. An evolutionary and functional analysis of *Foxl2* in rainbow trout gonad differentiation [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, **33**: 705—715
- [9] Baron D, Houlgate R, Fostier A, et al. Expression profiling of candidate genes during ovary-to-testis trans-differentiation in rainbow trout masculinized by androgens [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, **156**(2): 369—378
- [10] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene

- expression in a teleost, tilapia [J]. *Cytogenetic Genome Research*, 2003, **101**(3—4): 289—294
- [11] Wang W D, Zhu C H, Deng S P, *et al.* Occurrence and differentiation of gonad in *Clarias fuscus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(5): 993—997 [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. 水生生物学报, 2012, **36**(5): 993—997]
- [12] Sun J, Li G L, Zhu C H, *et al.* Molecular cloning and expression of *Cyp19a1b* cDNA in *Clarias fuscus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, **19**(3): 408—415 [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. 中国水产科学, 2012, **19**(3): 408—415]
- [13] Deng S P, Wang J J, Wu T L, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of *Dmrt1* in *Clarias fuscus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(4): 610—617 [邓思平, 王静杰, 吴天利, 等. 胡子鲶 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及其表达分析. 水生生物学报, 2012, **36**(4): 610—617]
- [14] Yao D X. Sex differentiation and hormonal sex reversal of *Pelteobagrus fulvidraco* [D]. Thesis for Master of Science, Northeast Forestry University, Harbin. 2007 [姚道霞. 黄颡鱼性分化及激素诱导性转化研究. 硕士学位论文, 东北林业大学, 哈尔滨. 2007]
- [15] Zhang X Y, Liu H J. Effects of 17β -Estradiol on sex differentiation and growth in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, **40**(6): 67—72 [张晓彦, 刘海金. 17β -雌二醇对半滑舌鲷性分化和生长的影响. 东北农业大学学报, 2009, **40**(6): 67—72]
- [16] Zhuo X L, Zou J X, Cui K, *et al.* The influence of exogenous methyl testosterone on the gonad developmental process of female and intersexual *Monopterus albus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(6): 861—867 [卓孝磊, 邹记兴, 崔科, 等. 外源性甲基睾丸酮对雌性和间性黄鳝性腺发育的影响. 水生生物学报, 2008, **32**(6): 861—867]
- [17] Li G L, Liu X C, Lin H R. Effects of 17α -methyltestosterone on sex reversal in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, **30**(2): 145—150 [李广丽, 刘晓春, 林浩然. 17α -甲基睾丸酮对赤点石斑鱼性逆转的影响. 水产学报, 2006, **30**(2): 145—150]
- [18] Nakamura M, Kobayashi T, Chang X T, *et al.* Gonadal sex differentiation in teleost fish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1998, **281**(5): 362—372
- [19] Hendry C I, Martin-Robichaud D J, Benfey T J. Hormonal sex reversal of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. *Aquaculture*, 2003, **219**(1—4): 769—782
- [20] Chen S L, Deng S P, Ma H Y, *et al.* Molecular marker-assisted sex control in *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Aquaculture*, 2008, **283**(1—4): 7—12
- [21] Johnstone R, Simpson T H, Youngson A F. Sex reversal in salmonid culture: Part II. The progeny of sex-reversal rainbow trout [J]. *Aquaculture*, 1979, **18**: 13—19
- [22] 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]. *Experimental Zoology*, 1994, **270**(3): 255—262
- [23] Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsen H, *et al.* Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17β -estradiol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, **53**(2): 139—152
- [24] Trant J M, Gavasso S, Ackers J, *et al.* Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*) [J]. *Experimental Zoology*, 2001, **290**(5): 475—483
- [25] Halm S, Pounds N, Maddix S, *et al.* Exposure to exogenous 17β -oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, **60**(3—4): 285—299
- [26] 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
- [27] Gelinas D, Pitoc G A, Callard G V. Isolation of goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1998, **138**(1—2): 81—93
- [28] Li G L, Liu X C, Lin H R. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgens on the sex inversion of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2006, **32**(1): 25—33
- [29] Liley N, Stacey N E. Hormones, Pheromones and Reproductive Behaviour in Fish [M]. In: Hoar W S, Randall D J (Eds.), *Fish Physiology*. New York: Academic Press. 1983, 1—63
- [30] Wu R F. Clone, expression of *Foxl2* gene and its function on sex differentiation on *Silurus meridionalis* [D]. Thesis for Master of Science. Southwest University, Chongqing. 2007 [吴瑞凤. 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. 硕士学位论文, 西南大学, 重庆. 2007]

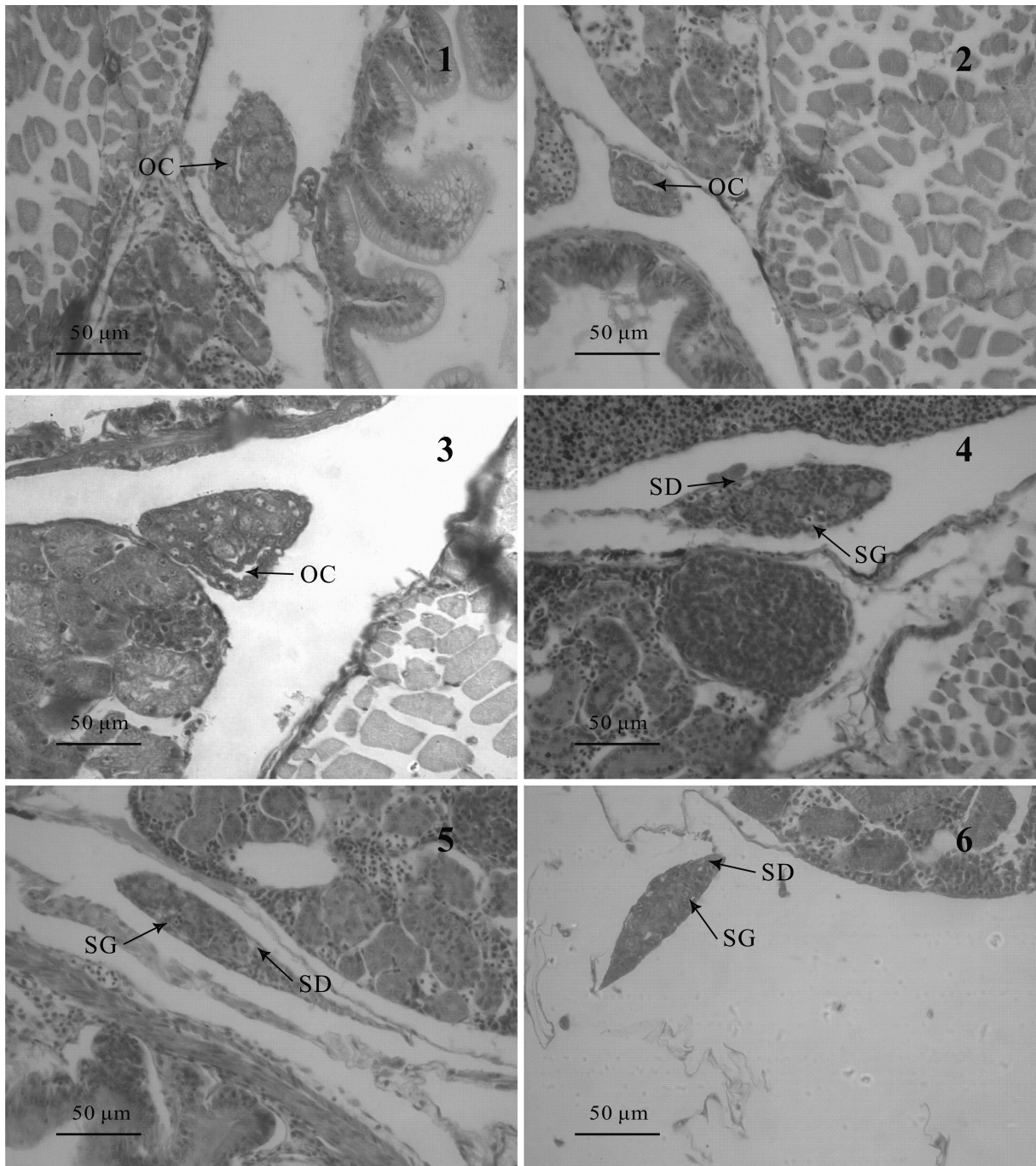
EFFECTS OF SEX STEROID HORMONES ON SEX DIFFERENTIATION OF *CLARIAS FUSCUS*

LI Guang-Li^{1,2}, DENG Si-Ping^{1,2}, WANG Wen-Da^{1,2}, SUN Jing^{1,2}, WU Tian-Li^{1,2},
SHI Shang-Li^{1,2} and ZHU Chun-Hua^{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, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: *Clarias fuscus*, a common freshwater fish in China, was selected as our experiment material. Two-day juvenile *C. fuscus* was divided into two groups. They were immersed in different doses of 17 α -methyltestosterone (50, 100, and 200 μ g/L 17 α -MT) or fed with 17 β -estradiol (100, 200, and 300 μ g/g 17 β -E₂) for 30 days. Effects of 17 α -MT and 17 β -E₂ on survival rate, sex ratio, gonad histology, and *Foxl2* and *Cyp19a1b* expressions were examined by morphologic observation, histology and Real time fluorescent quantitative PCR during its period of sex differentiation (2—30d after hatching). The results showed that 17 α -MT and 17 β -E₂ had no influence on survival rate but affected sex ratio and the time of gonadal differentiation. Doses of 17 α -MT at 100 and 200 μ g/L produced more males (70% and 76%, respectively) than 50 μ g/L 17 α -MT (54%) did ($P<0.05$), but no significant difference in sex ratio was observed between the 50 μ g/L 17 α -MT treated group and the control group (56%). In addition, the former accelerated the occurrence of primary spermatocytes for three and five days, but deferred that of ovarian cavity for four and six days, and primary oocytes for eight and nine days, respectively. In contrast, doses of 17 β -E₂ at 200 and 300 μ g/g produced more males (74% and 78%, respectively) than the control group ($P<0.05$), but no significant difference in sex ratio was observed between the 100 μ g/g 17 β -E₂ treated group (66%) and the control group (56%). Dose of 17 β -E₂ at 200 and 300 μ g/g accelerated the occurrence of ovarian cavity for two and three days, and primary oocytes for one and three days, respectively, but deferred that of primary spermatocytes for three and seven days. The expressions of *Foxl2* and *Cyp19a1b* showed that dose of 200 μ g/L 17 α -MT increased the expression of *Cyp19a1b* but inhibited that of *Foxl2*. However, dose of 300 μ g/g 17 β -E₂ increased the expression both of *Cyp19a1b* and *Foxl2*. The results suggested that *Foxl2* but not *Cyp19a1b* involved in mediating sex differentiation directly in *C. fuscus*, and 17 α -MT inhibited but 17 β -E₂ promoted the expressions of *Foxl2* to influence the estrogen biosynthesis, which controlled the sex differentiation. However, *Cyp19a1b* played an indirect role on sex differentiation by acting on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Key words: *Clarias fuscus*; Sex differentiation; 17 α -MT; 17 β -E₂; *Cyp19a1b*; *Foxl2*

图版 I 17α -MT 和 17β -E₂ 对性分化的影响Plate I Effects of 17α -methyltestosterone and 17β -estradiol on the sex differentiation of *C. fuscus*

1. 对照组 16 日卵巢; 2. 200 $\mu\text{g/L}$ 17α -MT 组 22 日卵巢; 3. 300 $\mu\text{g/g}$ 17β -E₂ 组 14 日卵巢; 4. 对照组 30 日精巢; 5. 200 $\mu\text{g/L}$ 17α -MT 组 26 日精巢; 6. 300 $\mu\text{g/g}$ 17β -E₂ 组 35 日精巢

1. Ovary on day 16 after hatching; 2. Ovary on day 22 treated by 17α -MT; 3. Ovary on day 13 treated by 17β -E₂; 4. Testis on day 30 after hatching; 5. Testis on day 26 treated by 17α -MT; 6. Testis on day 35 treated by 17β -E₂

OC 示卵巢腔; SG 示精原细胞; SD 示输精管

OC showing ovarian cavity; SG showing spermatogonia; SD showing spermatogenic duct