

雄烯二酮对赤点石斑鱼内分泌及性腺发育的影响*

舒 琥^{1,2} 张 勇¹ 刘晓春¹ 李广丽^{1,3} 林浩然^{1,4**}

1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 水生经济动物研究所和广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 510275
2. 广州大学生命科学学院, 广州 510405
3. 广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524025
4. 海南大学海洋学院, 海口 570228

摘 要 采用腹部埋植法, 应用连续组织切片技术、放射免疫测定方法和半定量 RT-PCR 技术, 检测了间隔 30 d 3 次埋植不同剂量 (高剂量 H: 100 $\mu\text{g/g}$ 体重, 低剂量 L: 10 $\mu\text{g/g}$ 体重) 的雄烯二酮 (4-androstene-3, 17-dione, ADSD) 诱导 2 龄赤点石斑鱼性腺发育过程中血清性类固醇激素含量、芳香化酶表达和活性的变化。结果显示: 第 1 次埋植 ADSD 后 30 d 即可诱导雌性赤点石斑鱼发生不同程度的性逆转, 性腺成熟指数明显下降, 性腺中卵细胞退化, 精原细胞增殖, 出现大量精母细胞和精子细胞, 第 1 次埋植 ADSD 后 30 d 经轻微挤压腹部有 10% (低剂量组) 和 15% (高剂量组) 的鱼可排精; 第 2 次埋植后 30 d 明显提高性逆转效果, 排精率分别达到 80% 和 86.7%, 性逆转雄鱼的精巢在组织结构上与正常雄鱼精巢一样, 精子活力与正常雄鱼相同, 对照组鱼卵巢发育良好; 第 3 次埋植后 30 d 排精率分别为 90% 和 80%, 埋植 ADSD 后性腺芳香化酶 (P450_{aromA}) 表达和活性显著降低, 脑芳香化酶 (P450_{aromB}) 表达显著升高, 前脑芳香化酶活性显著升高, 血清 T, 11-KT 水平显著高于对照组, 而血清 E₂ 水平先升高, 然后逐渐降低。说明血清 T, 11-KT 水平增加, 性腺芳香化酶表达及活性降低在控制雌雄同体的赤点石斑鱼的性转化和精子发生中起重要作用 [动物学报 52 (2): 316–327, 2006]。

关键词 赤点石斑鱼 雄烯二酮 性逆转 性类固醇激素 芳香化酶表达和活性

Effects of ADSD implantation on endocrine and gonadal development in red-spotted grouper *Epinephelus akaara**

SHU Hu^{1,2}, ZHANG Yong¹, LIU Xiao-Chun¹, LI Guang-Li^{1,3}, LIN Hao-Ran^{1,4**}

1. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals, and Guangdong Province Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China
2. School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China
3. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, Guangdong, China
4. College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China

2005-08-22 收稿, 2005-11-21 接受

* 国家海洋 863 项目 (No.2001AA621010, No.2003AA603011), 国家自然科学基金项目 (No.39970586), 广东省科技计划项目 (No.A3050201)、(No.2003C20308), 教育部科学技术研究重点项目 (No.02150) 资助 [This research was funded by the grants from State Ocean 863 Project (No.2001AA621010, 2003AA603011), the National Natural Science Foundation of China (No.39970586), Guangdong Provincial Scientific and Technical Program (No.A3050201), (No.2003C20308), Leading Program of State Education Ministry (No. 02150)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: ls32@zsu.edu.cn

© 2006 动物学报 Acta Zoologica Sinica

Abstract Through the detection methods of histology, radioimmunoassay (RIA) and RT-PCR, the effects of various dose of ADSD via implantation on sex steroid contents, aromatase expression and activity in 2-year-old red-spotted grouper *Epinephelus akaara* were examined. Groupers were divided into three groups, one implanted with high 4-androstene-3, 17-dione (ADSD, 100 $\mu\text{g/g}$ body weight), the second with low ADSD (10 $\mu\text{g/g}$ body weight) and the third without ADSD once 30d for 3 months. The results indicated sex inversion in ADSD-implanted group. Fish implanted with ADSD once (for 30 d) showed significantly lower GSI and complete degradation of oocytes and developing testicular tissues. ADSD induced females to develop into functional males, these males had testes, which were similar in structure from those of normal males. Spermiating rates of induced males in ADSD-implanted group as follows: 15%, 86.7% and 80% (high dose group), or 10%, 80% and 90% (low dose group) at the 30 d, 60 d, and 90d, respectively, and the sperm motility was the same between the control and ADSD-implantation, while all fish in the control were still female with developing ovaries. Aromatase expression and activity decreased significantly in the gonad, increased significantly in fore-brain, respectively, after ADSD implanted. Serum estradiol-17 β (E_2) levels began to increase after ADSD-implantation, then decreased gradually in ADSD-treated group, while serum levels of testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) concentration increased significantly. The results suggest that the increase of serum T, 11-KT levels and gonadal aromatase expression and activity may be important to the controlled male phase in protogynous red-spotted grouper, *E. akaara* [*Acta Zoologica Sinica* 52 (2): 316–327, 2006].

Key words *Epinephelus akaara*, ADSD, Sex reversal, Sex steroid hormone, Aromatase expression and activity

赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 是我国沿海地区重要的海水经济鱼类, 具有病害少、生长快、肉质鲜美、营养丰富等特点, 深受消费者的喜爱, 是很好的养殖对象。目前, 养殖所需的种苗主要依靠捕捞天然鱼苗及进口种苗, 由于种苗供不应求, 养殖受到极大的限制。赤点石斑鱼是一种雌性先熟的雌雄同体鱼类, 存在性转化现象 (Tanaka et al., 1990a), 雄鱼的生殖腺系数极小, 影响受精卵的质量, 且自然海区大个体的雄性亲鱼很难捕获, 因而人工繁殖时常会遇见难以同时得到功能性雄性和雌性亲鱼的问题, 给种苗生产造成很大困难。为解决实际生产中雄性鱼缺乏问题, 国内外学者在石斑鱼的性转化方面做了许多研究, 分别在赤点石斑 (方永强等, 1992; 洪万树等, 1994)、巨石斑 (*Epinephelus tauvina*) (杨家驹等, 1996; 邹记兴等, 2000)、点带石斑 (*Epinephelus coioides*) (Yeh et al., 2003)、鲑点石斑 (*Epinephelus fario*) (Kou et al., 1988) 等成功诱导性转化, 但用于诱导性转化的药物均为 17 α -甲基睾酮, 虽然产生一定效果, 却未能阐述促进石斑鱼性别转化的生殖内分泌调控机理。

雄烯二酮 (4-androstene-3, 17-dione, ADSD) 是睾酮 (T) 生物合成的前体, 可转变为睾酮, 睾酮再转化为 11-酮基睾酮 (11-KT), 而睾酮和 11-酮基睾酮与精巢发育和精子生成有密切的关系。芳香化酶是类固醇激素代谢中的一种重要酶类, 它可催化某些雄激素 (如睾酮和雄烯二酮) 转化为雌激素, 是雌激素生物合成中的关键酶和限速酶。研究表明, 鱼类脑和垂体中的芳香化酶水平比其他脊椎动物高出 100–1 000 倍 (Galland et al., 1981), 而性腺中芳香化酶活性直接与体内雌激素的生成量有

关 (Monod et al., 1992), 赤点石斑鱼脑芳香化酶有广泛的组织分布, 脑和垂体的表达量很高, 性腺芳香化酶表达主要集中于垂体和性腺 (李广丽等, 2004), 有关赤点石斑鱼性别转化过程中的分子机制和生殖内分泌调控机理尚不清楚。本研究采用不同剂量的雄烯二酮埋植 2 龄赤点石斑鱼, 运用放射免疫测定方法和酶联免疫测定方法测定赤点石斑鱼性转化过程中血清 T、 E_2 和 11-KT 水平的变化, 并运用 RT-PCR 技术检测脑和性腺组织中的 P450aromA 和 P450aromB mRNA 的表达, 研究性类固醇激素、芳香化酶表达及活性变化和性腺发育变化之间的关系, 探讨赤点石斑鱼性别转化过程中生殖内分泌调控机理, 为解决石斑鱼大批量种苗人工繁育问题提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 亲鱼的选择

2 龄雌性赤点石斑鱼购于广东大亚湾水产试验中心附近海域网箱, 平均体重 360.6 g (248–454 g), 平均体长 24.5 cm (22.5–27.5 cm), 随机分组饲养在该中心的网箱 (长 2 m \times 宽 2 m \times 高 2.5 m) 中, 海水盐度 30–33, 水温 (20–28.5 $^{\circ}\text{C}$), 自然光照。

1.2 实验设计及缓释剂制备和埋植

实验鱼被随机分为三组, 每组 20 尾, 采用腹部埋植方式, 高剂量组 (H) 和低剂量组 (L) 分别埋植含 ADSD 的药条, 对照组 (C) 埋植等量的不含 ADSD 的药条。实验所用雄烯二酮为美国 Sigma 公司产品。将 ADSD 与硅橡胶 (Silastic382, Dow Corning Corporation, USA) 以 1:2 的比例均匀混合, 加入适量凝固剂混匀后, 涂于铝制模板

上, 自然晾干, 制成 $1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$ 药条, 用经消毒的解剖刀在鱼体腹部的肌肉划一小口, 然后用镊子将药条放进腹腔, 伤口涂四环素或红霉素软膏以防感染。高剂量组埋植 ADSD 的剂量为 $100 \mu\text{g/g}$ 体重, 低剂量组为 $10 \mu\text{g/g}$ 体重, 间隔 30 d 埋植 1 次, 共 3 次。整个实验持续 90 d。实验鱼 100% 存活。

1.3 样品的采集处理及性类固醇激素含量测定

雌性亲鱼在实验开始后 0、2、10、20、30、45、60、75、90 d, 随机从实验组和对照组中各取 5 尾, 从尾静脉抽血, 血液 4°C 放置 4–6 h 后, $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min, 取上清液 (血清), -25°C 保存, 用于性类固醇激素的测定。同时在埋植 ADSD 后 0、30、60 d 各组随机取 5 尾鱼解剖, 迅速取脑和性腺置于液氮中急冻, 保存于 -80°C , 用于芳香化酶活性测定。同时称量性腺重 (GW) 和肝重 (LW), 分别计算性腺成熟系数 (Gonadosomatic index, $\text{GSI} = \text{GW}/\text{BW} \times 100\%$)、肝体指数 (Hepatic somatic index, $\text{HSI} = \text{LW}/\text{BW} \times 100\%$)。性腺用波恩氏液固定, 做常规组织学切片, 切片厚度 $6-8 \mu\text{m}$, HE 染色, OLYMPUS-BX40 型显微镜观察并拍照。

每隔 30 d 轻微挤压腹部检查排精率和精液量, 计算精子活力, 同时通过生殖孔插管抽取性腺组织检查性腺发育情况, 性腺发育分期参照 Yeh et al. (2003)。

精液量用体积表示, 误差 $\pm 0.01 \text{ ml}$; 精子密度用人工精浆 ($100 \text{ mmol/L NaCl} + 13.4 \text{ mmol/L KCl} + 83.3 \text{ mmol/L glycine} + 26.2 \text{ mmol/L NaHCO}_3$) 将精液稀释 1 000 倍后, 用血球计数板在显微镜 ($\times 400$) 下观察计数, 再算出精液密度。精子活力的计算参照 Chambeyron et al. (1990) 的方法稍加修改, 以精子在自然海水 (盐度为 33) 中激活比例表示, 即任意记数 100 个以上的精子, 根据活动精子数占精子总数的比例将精子活力分为 6 个等级: I 级, 活动精子比例 $< 1\%$; II 级, 活动精子比例为 $1\% - 25\%$; III 级, 活动精子比例为 $25\% - 50\%$; IV 级, 活动精子比例为 $50\% - 75\%$; V 级, 活动精子比例为 $75\% - 90\%$; VI 级, 活动精子比例为 $90\% - 100\%$ 。每次实验取 5 尾石斑鱼的精液, 每个精液样品重复观察 3–5 次, 取平均值。

血清性类固醇激素雌二醇 (E_2)、睾酮 (T) 水平采用放射免疫测定方法 (RIA) 进行测定, 11-酮基睾酮 (11-KT) 采用酶联免疫测定方法

(EIA) 进行测定。 E_2 、T 放射免疫测定。试剂盒购自北京中国北方生物技术研究所, 11-KT 试剂盒购自 Cayman 公司, 实验按照试剂盒说明进行。

1.4 芳香化酶表达和活性的测定

采用半定量 RT-PCR 分析方法检测赤点石斑鱼性腺组织中芳香化酶 P450_{arom} 表达的变化, 以 beta-actin 作为检测 P450_{arom} mRNA 表达的内标。提取赤点石斑鱼性腺组织 RNA, 经 DNase I (Invitrogen, Amplification Grade) 处理后, 按照 ThermoScript™ RT-PCR 试剂盒说明, 用 $1 \mu\text{g}$ RNA 进行反转录, 性腺芳香化酶 P450_{arom} 所用的 PCR 引物为 HO-ARF3 和 HO-ARR2 (表 1), 扩增产物为 386 bp, beta-actin 所用的 PCR 引物为 β -actin F 和 β -actin R (表 1), 扩增产物为 664 bp。PCR 反应体系为 $20 \mu\text{l}$, PCR 程序为 94°C 预变性 3 min, 然后 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 24–36 个循环后 72°C 延伸 10 min, 不同循环数 PCR 扩增获得的产物在琼脂糖凝胶 (1.7%) 上电泳, 用 Bio-Rad GEL DOC2000 分析电泳图像信号强度, 选取最大扩增量一半时 PCR 循环数用作随后的半定量 RT-PCR 分析, 即 P450_{arom} 所用的循环数为 30 (beta-actin 所用的循环数为 24)。根据上面建立的方法, 分别对芳香化酶和 beta-actin 进行半定量 RT-PCR, 分别取 $4 \mu\text{l}$ 的 P450_{arom} 和 beta-actin 的 RT-PCR 产物在同一块琼脂糖凝胶 (1.7%) 上电泳, 然后结果表示为 P450_{arom}A/beta-actin。

表 1 赤点石斑鱼 P450_{arom} 检测组织表达所用引物

Table 1 Primers used for expression analysis of *Epinephelus akaara* cytochrome P450_{arom}

引物 Primer	序列 Sequence	碱基位置 (bp) Position
HB-ARF3	5'-TGACACCTGGCAAA-CAGTTC-3'	nt 841–860
HB-ARR3	5'-GATGGT-GTCGTCTCCAGAG-3'	nt 1 305–1 324
HO-ARF3	5'-GGAGACATGTGA-GAGTCTGGATC-3'	nt 363–386
HO-ARR2	5'-TGACAGGTA-CATCCAGGAAGAGTC-3'	nt 709–732
β -actinF	5'-GATCATGTTCGA-GACCTTCAACAC-3'	nt 461–484
β -actinR	5'-TCCGATCCAGACA-GAGTATTTACG-3'	nt 1 101–1 124

芳香化酶活性以 ^3H 标记的雄烯二酮 ($\text{I}\beta\text{-}^3\text{H-A}$) $\text{I}\beta\text{-C}$ 上的 ^3H 因芳香化作用, 特异性失去 ^3H 而形成的 $^3\text{H}_2\text{O}$ 量来衡量。测定方法参照文献 (Chang et al., 1998), 稍加改进。取贮存于 -80°C 的脑和性腺, 用 pH 7.4 的磷酸钾缓冲液在冰浴中匀浆, 匀浆液以 1 000 g 在 4°C 离心, 取上清液加 100 μl 辅因子溶液和 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的 $^3\text{H-A}$ (936.1TBq/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, Inc., Boston), 反应液在 28°C 反应 80 min, 加入 10% 三氯乙酸 (内含活性碳 80 mg/ml) 终止反应, 重复两次以除去多余的未反应的 $^3\text{H-A}$ 。所得上清液用液闪仪测定放射性强度, 并用 Bio-Bad 蛋白质分析试剂盒 (Bio-Bad Corporation) 测定蛋白质含量。芳香化酶活性表示为 $^3\text{H}_2\text{O}$ pmol/mg Protein/h。

1.5 数据处理

实验数据用平均值 \pm 标准误表示, 数据分析采用 SPSS12.0 统计软件包中的单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan's 多重比较分析。当 $P < 0.05$ 时, 差异显著。

2 结 果

2.1 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼性腺发育和性转化状况

根据性腺发育状况我们将赤点石斑鱼性腺发育

和性转化过程分为 6 个时期 (雌性: F1 - F3 期, 兼性期 I; 雄性: M1 - M2 期。) (图版 I)。埋植 ADSD 后赤点石斑鱼性腺发育和性转化状况如表 2, 对照组鱼均处在雌性期, 在第 1 次埋植后 30 d, 对照组性腺为 F2 - F3 期卵巢 (图版 I: 1, 2-A), 而 ADSD 处理组, 高低剂量组均处于兼性期 (I), 并发生不同程度的性逆转, 卵母细胞退化, 精原细胞大量增殖, 出现大量精母细胞和精子细胞 (图版 I: 3)。部分鱼已可挤出精液。30 d 后第 2 次埋植 ADSD, 高剂量组 100% ($n = 15$) 转化为功能性雄鱼 (M1 期), 低剂量组 93% ($n = 14$) 转化为功能性雄鱼 (M1 期), 性逆转雄鱼的精巢在组织结构上与正常雄鱼精巢 (图版 I: 4) 一样, 此时在精巢小叶里充满大量的精子 (图版 I: 5), 轻微挤压腹部可排精。高剂量组的排精率为 86.7%; 低剂量组 80% 排精; 60 d 后第 3 次埋植 ADSD, 高剂量组排精率为 80%, 有 20% 达到 M2 期 (精子已排出) (图版 I: 6), 低剂量组 100% ($n = 10$) 转化为功能性雄鱼并 90% 排精。且精子的密度没有显著差异, 分别为对照组 (7.35 ± 0.65) $\times 10^9$ 个/ml, 高剂量组 (8.6 ± 0.6) $\times 10^9$ 个/ml, 低剂量组 (5.35 ± 0.3) $\times 10^9$ 个/ml, 精子活力与正常雄鱼相似 (对照组为正常发育的雌性鱼)。

表 2 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼性腺发育特征处在 6 个时期的鱼数

Table 2 Number of fish at six stages according to the gonadal tissue during the time course of ADSD implantation (from day 0) in the grouper *E. akarae*

埋植剂量 Implanted dose $\mu\text{g/g}$	埋植后时间 Day after implantation														
	0 d			30 d			60 d			90 d					
	性腺分期 Development stage*														
	F1	F2	F3	I	F3	I	M1	M2	Male (%)	F3	F4	F5	M1	M2	Male (%)
0	20	15	5		15				0	2	5	3			0
10	20			20		1	14		93				10		100
100	20			20			15		100				8	2	100

* F1: 雌性 1。F2: 雌性 2。F3: 雌性 3。I: 兼性期。M1: 雄性 1。M2: 雄性 2。M (%): (雄性 1 + 雄性 2) (%)。

* F1: Female 1. F2: Female 2. F3: Female 3. I: Intersex-transitional. M1: Male 1. M2: Male 2. M (%): (M1 + M2) (%)。

2.2 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼 GSI、HSI 的变化

表 3 所示, 埋植 ADSD 90 d 后, 对照组赤点石斑鱼具有较高的性腺指数 (Gonadosomatic indices, GSI), 分别为 $0.67\% \pm 0.0763\%$ (0 d)、 $0.752\% \pm 0.0477\%$ (30 d)、 $1.375\% \pm 0.624\%$ (60 d)、 $0.599\% \pm 0.188\%$ (90 d), 其中第 1 次埋植后 60 d, 对照组的 GSI 最高, 为 $1.375\% \pm 0.624\%$, 而此时 ADSD 埋植组的 GSI 分别为高剂量 (0.088%

$\pm 0.0164\%$)、低剂量 ($0.087\% \pm 0.0046\%$), 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 同样第 1 次埋植后 90 d, ADSD 处理组的 GSI 均显著低于对照组 (分别为高剂量鱼 $0.0655\% \pm 0.0099\%$, 低剂量鱼 $0.0709\% \pm 0.018\%$); 肝体指数 (Hepatosomatic indices, HSI) 除第 90 d 的对照组显著高于 ADSD 处理组外, 其它时间对照组和处理组没有显著差异。

表 3 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼在性腺发育和性转化过程中 GSI 和 HSI 的变化

Table 3 Changes of GSI and HSI in grouper *E. akaara* after 90 d ADSD (high and low) implantation

	埋植后时间 (d) Days after implantation	分组 Group		
		对照 Control (C)	高剂量组 High dose (H)	低剂量组 Low dose (L)
性腺指数 (%)	0	0.67 ± 0.0763 ^b	0.67 ± 0.0763 ^b	0.67 ± 0.0763 ^b
Gonadosomatic indices	30	0.752 ± 0.0477 ^b	0.615 ± 0.053 ^b	0.426 ± 0.039 ^b
	60	1.375 ± 0.624 ^c	0.088 ± 0.0164 ^a	0.087 ± 0.0046 ^a
	90	0.599 ± 0.188 ^b	0.0655 ± 0.0099 ^a	0.0709 ± 0.018 ^a
肝体指数 (%)	0	1.078 ± 0.108 ^a	1.078 ± 0.108 ^a	1.078 ± 0.108 ^a
Hepatosomatic indices	30	1.219 ± 0.108 ^{ab}	0.962 ± 0.108 ^a	1.367 ± 0.154 ^{ab}
	60	1.106 ± 0.141 ^a	0.844 ± 0.197 ^a	0.96 ± 0.039 ^a
	90	1.608 ± 0.109 ^b	0.92 ± 0.078 ^a	1.075 ± 0.167 ^a

各值为平均值 ± 标准误, 不同上标字母表示差异显著, $P < 0.05$, Duncan 氏检验, $n = 5$, 下同。

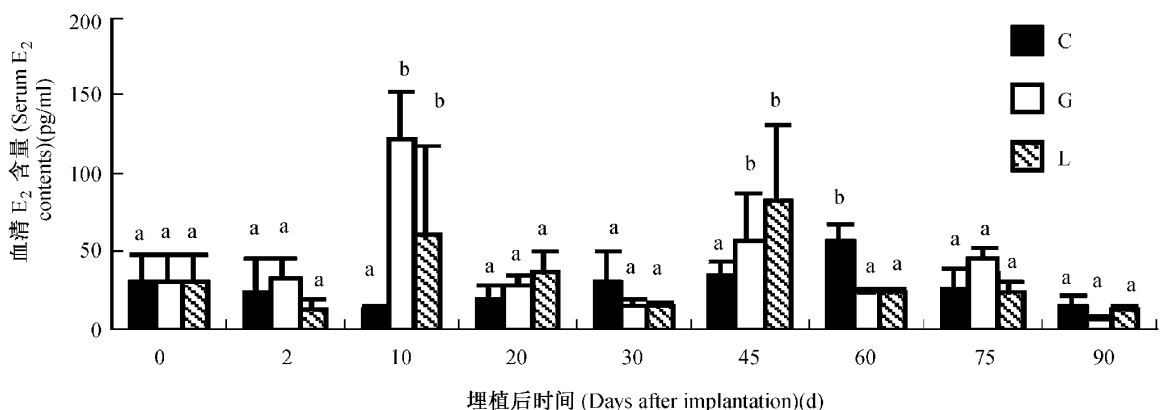
Data are represented as mean ± SE, values with different superscripts indicate a significant difference, $P < 0.05$, Duncan's multiple range test, $n = 5$, the same below.

2.3 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼在性转化过程中血清性类固醇激素的变化

间隔 30 d 3 次埋植 ADSD 诱导赤点石斑鱼性转化的过程中, 血清 E_2 含量变化如图 1 所示, 第 1 次埋植后 10 d 和第 2 次埋植后 15 d 埋植 ADSD 组的血清 E_2 含量显著高于对照组, 而第 2 次埋植后 30 d 的对照组的 E_2 含量显著高于埋植组, 此时对照组的 GSI 为 $1.375\% \pm 0.624\%$ 显著高于 ADSD 埋植组。而此时的卵巢发育已到 F3 期 (如图版 I: 3)。

间隔 30 d 3 次埋植 ADSD 90 d 后赤点石斑鱼在性转化过程中血清 T 含量的变化见图 2, 高低剂量组血清 T 含量在埋植后均显著高于对照组。

间隔 30 d 3 次埋植 ADSD 90 d 后赤点石斑鱼在性转化过程中血清 11-KT 含量的变化如图 3 所示, ADSD 高剂量组血清 11-KT 含量在第 1 次埋植后第 2 d 显著高于对照组, 然后下降, 第 10 d 最低, 随后缓慢上升, 到第 60 d 达到最高峰, 然后下降, 但均显著高于对照组。低剂量组的血清 11-KT 含量均显著高于对照组。

图 1 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼在性转化过程中血清 E_2 含量的变化

C: 对照组。H: 高剂量组。L: 低剂量组。

Fig. 1 Changes of serum E_2 contents during sex reversal by ADSD implantation in *E. akaara*

C: Control. H: High dose. L: Low dose.

2.4 埋植 ADSD 对赤点石斑鱼在性转化过程中脑和性腺芳香化酶活性的影响

埋植 ADSD 后高低剂量组前脑芳香化酶活性

显著升高 (图 4A, $P < 0.05$), 而中脑和后脑芳香化酶活性略有升高, 但各脑区芳香化酶活性的变化不明显, 与对照组相比无显著差异 (图 4B, C)。

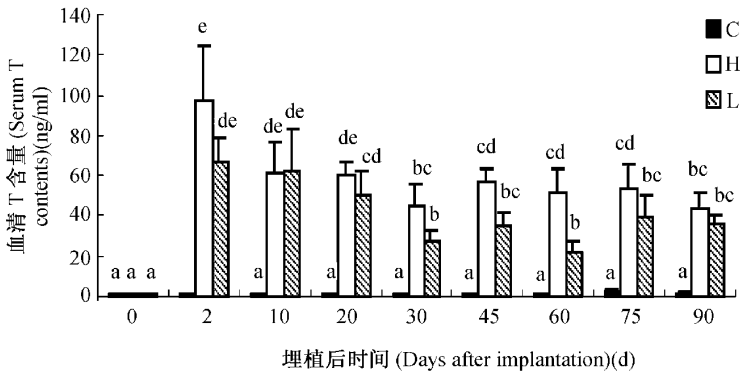


图 2 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼在性转化过程中血清 T 含量的变化

C: 对照组。H: 高剂量组。L: 低剂量组。

Fig.2 Changes of serum T levels during sex reversal by ADSD implantation in *E. akaara*

C: Control. H: High dose. L: Low dose.

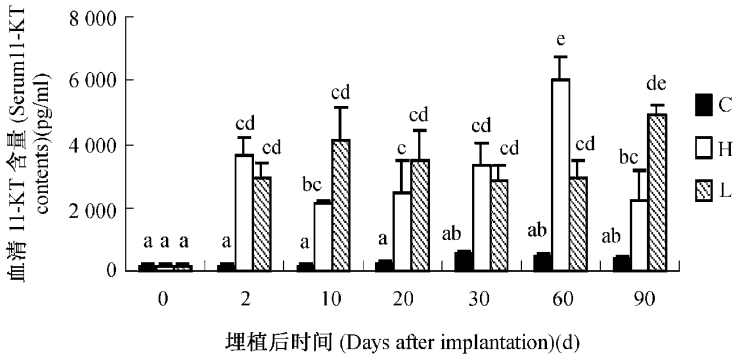


图 3 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼在性转化过程中血清 11-KT 含量的变化

C: 对照组。H: 高剂量组。L: 低剂量组。

Fig.3 Changes of serum 11-KT levels during sex reversal by ADSD implantation in *E. akaara*

C: Control. H: High dose. L: Low dose.

性腺芳香化酶活性下降, 和对照组相比差异显著 (图 4D, $P < 0.05$)

2.5 赤点石斑鱼芳香化酶 P450 mRNA 在下丘脑、垂体和性腺组织中的表达

2.5.1 赤点石斑鱼芳香化酶 P450aromB mRNA 在下丘脑和垂体中的表达

赤点石斑鱼下丘脑芳香化酶 P450aromB mRNA 表达结果如图 5 所示, 埋植 ADSD 后第 90 d, 对照组下丘脑芳香化酶 P450aromB mRNA 的表达有所升高, 但与实验开始 (0 d) 没有显著差异; 而高低剂量组下丘脑芳香化酶 P450aromB mRNA 的表达均显著升高, 与对照组差异显著。

赤点石斑鱼垂体芳香化酶 P450aromB mRNA 表达结果如图 6 所示, 埋植 ADSD 后第 90 d, 高剂量组垂体芳香化酶 P450aromB mRNA 的表达有所升高, 而低剂量组垂体芳香化酶 P450aromB mRNA 的表达则略有降低。但高低剂量组与对照组之间没有显著差异。

2.5.2 赤点石斑鱼芳香化酶 P450aromA mRNA 在性腺和垂体中的表达

赤点石斑鱼垂体芳香化酶 P450aromA mRNA 表达结果如图 7 所示, 埋植 ADSD 后第 90 d, 高低剂量组垂体芳香化酶 P450aromA mRNA 的表达有所降低, 而对照组垂体芳香化酶 P450aromA mRNA 的表达则略有降低, 但高低剂量组与对照组之间没有显著差异。

赤点石斑鱼性腺芳香化酶 P450aromA mRNA 表达结果如图 8 所示, 埋植 ADSD 后第 90 d, 对照组性腺芳香化酶 P450aromA mRNA 的表达量有所升高, 并处于较高水平, 但与实验开始 (0 d) 没有显著差异; 而高低剂量组性腺芳香化酶 P450aromA mRNA 的表达均明显受到抑制, 表达量显著降低, 明显低于对照组。

3 讨论

在 20 世纪 70 年代, Reinboth (1970) 首先对

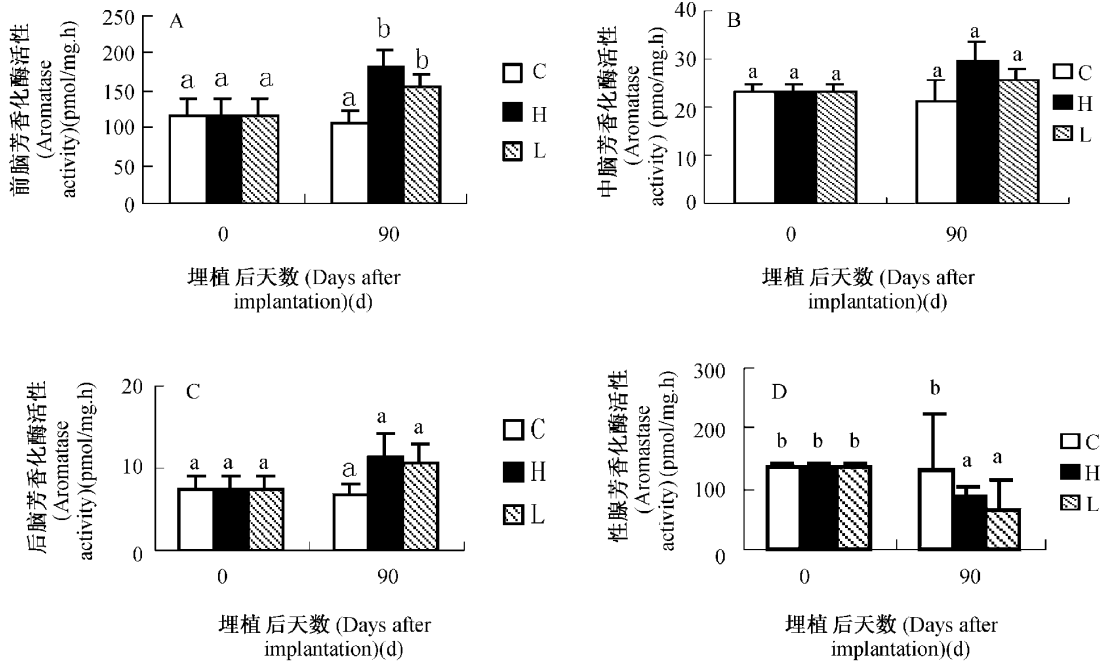


图 4 埋植 ADSD 对前脑 (A)、中脑 (B)、后脑 (C) 和性腺 (D) 芳化酶活性的影响

C: 对照组. H: 高剂量组. L: 低剂量组.

Fig.4 Aromatase activity in forebrain (A), midbrain (B), hindbrain (C) and gonad (D) in *E. akaara* by ADSD implantation

C: Control. H: High dose. L: Low dose.

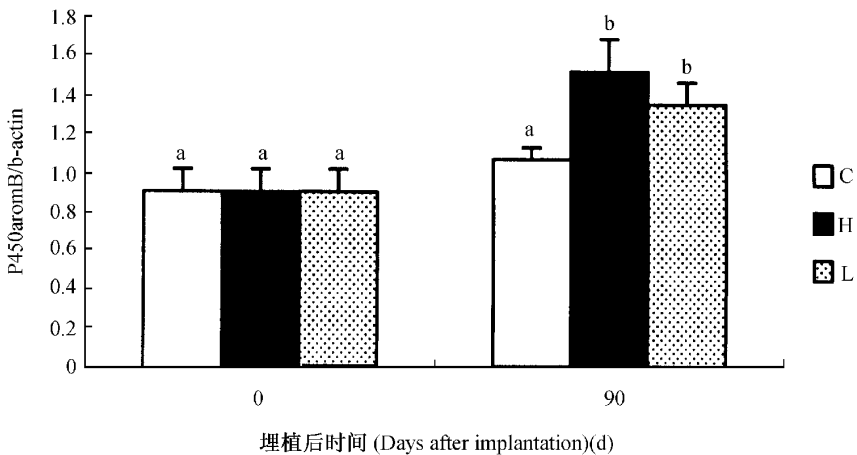
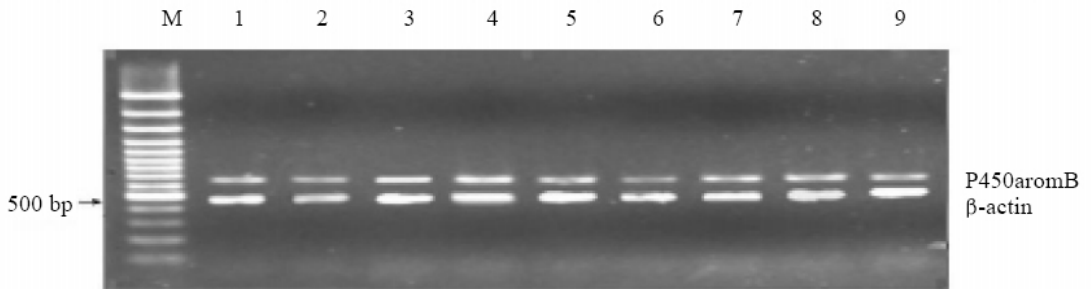


图 5 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼下丘脑芳香化酶 P450aromB mRNA 表达 (30 循环)

1-3: 对照组. 4-6: 高剂量组. 7-9: 低剂量组.

Fig.5 The expression of aromatase P450aromB in hypothalamus by ADSD implantation in *E. akaara* (30 cycles)

1-3: Control. 4-6: High dose. 7-9: Low dose.

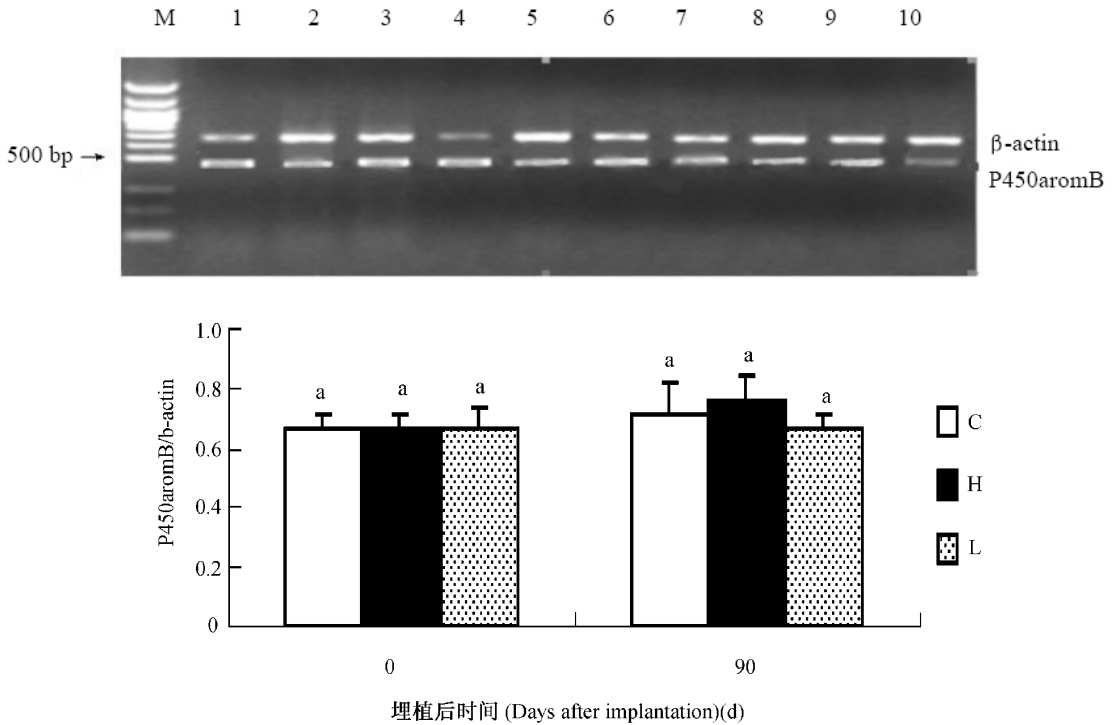


图 6 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼垂体芳香化酶 P450aromB mRNA 表达 (30 循环)

1-3: 对照组。4-6: 高剂量组。7-10: 低剂量组。

Fig.6 The expression of aromatase P450aromB in pituitary by ADSD implantation in *E. akaara* (30 cycles)

1-3: Control. 4-6: High dose. 7-10: Low dose.

雌雄同体、雌性先熟的海洋鱼类用雄激素处理诱发性别转化和提早成熟做过评论。此后，国内外不少学者开始从事石斑鱼的性别转化方面的研究。Chen et al. (1977) 在饲料中添加甲基睾酮 (17 α MT) 投喂 3 龄巨石斑鱼一年, Chao and Lim (1991) 通过埋植 MT 4 个月诱导巨石斑鱼性别转化, Yeh et al. (2003) 通过埋植多种雄性激素 (T、11-KT、MT、TP) 及雄性激素混合埋植 90 d 诱导点带石斑鱼性别转化为功能性雄鱼, 方永强等 (1992) 在饲料中添加甲基睾酮 (17 α MT) 投喂 2-3 龄赤点石斑鱼 58 d, 洪万树等 (1994) 在饲料中添加甲基睾酮 (17 α MT) 投喂 2-4 龄赤点石斑鱼 50 d, 均能诱导性别转化, 获得功能性雄鱼。但是有关雄性激素是如何诱导性别转化以及性别转化过程中内分泌调节机理确少见报道, 特别是埋植 ADSD 诱导赤点石斑鱼性别转化过程中的内分泌调节机理尚未见报道。本文研究除对上述研究提供佐证外, 更重要的是首次较详细地阐明了埋植 ADSD 对赤点石斑鱼性别转化过程中性类固醇激素含量及芳香化酶表达活性的影响。

本研究表明, 雌性赤点石斑鱼比性别转化后的雄鱼具有较高的 GSI 和 HSI, 性别转化后功能性雄鱼的

性腺显著小于对照组, 这同自然状况下的雄鱼的精巢发育状况是一致的。这表明赤点石斑鱼在性别转化过程中性腺是逐渐由大变小, GSI 逐渐降低。但与方永强等 (1992) (发现性别转化鱼 GSI 比对照组大一倍)、洪万树等 (1994) (性别转化鱼 GSI 先升后降) 不同, 我们认为导致这种差异的原因可能是不同的处理方法所致, 前者采用投喂的方法, 药物吸收慢、累积药量少, 性腺中卵母细胞的发育尚未被完全抑制; 而本文采用的埋植法, 在开始出现一个释药高峰后, 药物保持持续稳定的释放, 同时药条在鱼体的腹腔便于吸收, 因此高含量的雄性激素使卵母细胞发育较快受到抑制。

从性腺发育看, 对照组鱼在 90 d 内的性腺逐渐发育成粗短而饱满的卵巢, 组织切片观察结果是生殖细胞由 I 时相的卵母细胞发育成 IV 时相的卵母细胞 (见图版 I: 1, 2)。实验组 (无论高低剂量组) 在埋植处理 30 d 后精巢已经正在形成, 而卵巢则逐渐退化, 组织切片观察结果是除可见到 II 时相卵母细胞外, 出现了各期生精细胞, 其中以精子细胞为主 (见图版 I: 3)。精细胞的出现并进行有丝分裂, 标志着外源激素 ADSD 已经启动了精巢

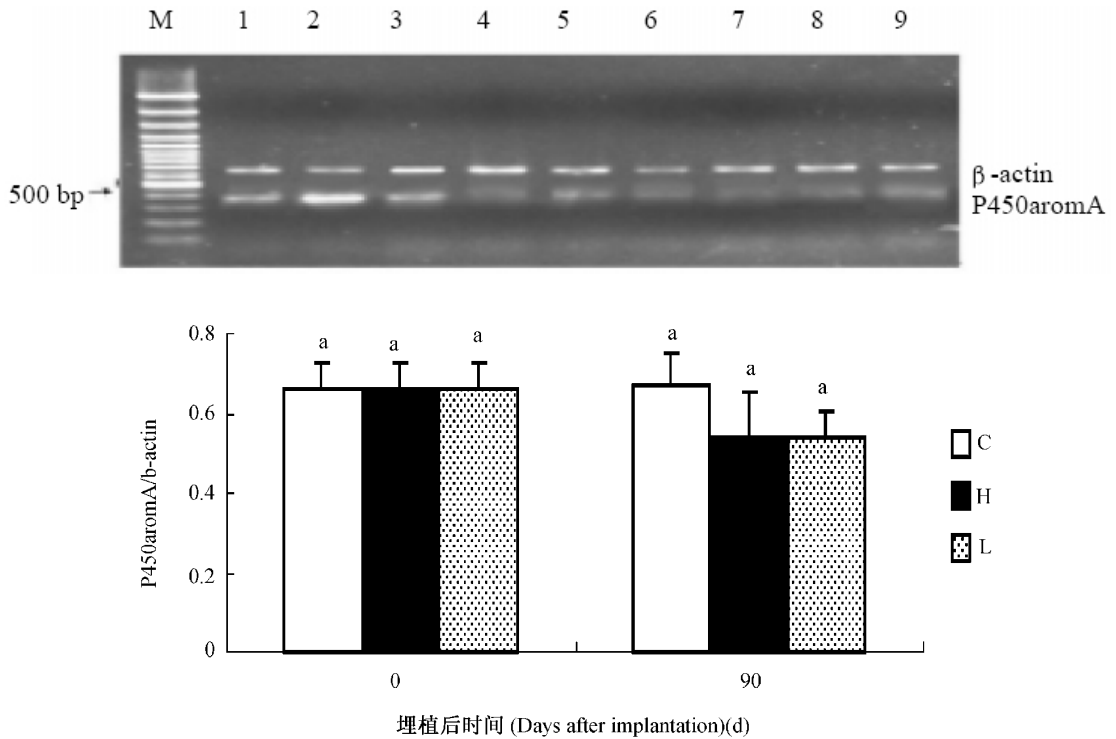


图7 埋植 ADSD 90 d 后赤点石斑鱼垂体芳香化酶 P450aromA mRNA 表达 (30 循环)

C: 对照组。H: 高剂量组。L: 低剂量组。样品编号见图6。

Fig.7 The expression of aromatase P450aromA in pituitary by 90d ADSD implantation in *E. akaara* (30 cycles)

C: Control. H: High dose. L: Low dose. The sample sheet as Fig.6

的发育, 激发生精活动, 实验鱼已逐步向功能性雄鱼转变。60 d 后, 实验组性腺已经全由精巢占据, 组织切片观察结果是性细胞主要为精原细胞和精子细胞及精子 (见图版 I : 5), 同正常成熟雄鱼精巢发育一致 (见图版 I : 4)。可见, 已经成功转为功能性雄鱼, 且逐渐成熟。90 d 后, 实验组性腺已经发育得很成熟, 组织切片观察结果是大部分精子已排出 (见图版 I : 6)。这与自然雄性赤点石斑鱼的排精情况一致。从精子的密度和活力结果看与对照组没有显著差异。

我们的研究表明, 赤点石斑鱼在性逆转过程中血清性类固醇激素 T 和 11-KT 发生显著变化。两者 (T 和 11-KT) 均显著高于对照组鱼。其中, 高、低剂量组鱼血清 T 含量的变化趋势基本一致, 都是在第一次埋植后两天 T 含量快速升高然后缓慢降低并维持在较高水平; 高低剂量组血清 T 含量在埋植后均显著高于对照组。说明 T 和 11-KT 参与了性逆转; 埋植 ADSD 后血清 T 和 11-KT 含量显著升高, 可能是因为 ADSD 是 T 生物合成的前体, 埋植的 ADSD 在赤点石斑鱼体内转化为 T; 同时埋植 ADSD 可促进赤点石斑鱼 GnRH 和 GtH

的合成和分泌 (Lin et al., 1998)。由于间隔 30 d 3 次埋植 ADSD, 药物的缓释作用使得 ADSD 埋植组鱼血清维持相对稳定的较高的 T 含量, 从而启动赤点石斑鱼雌性性腺内雄性生殖细胞的发育, 而雄激素 T 通过对脑和性腺芳香化酶活性及其表达的调节提高了 GnRH 和 GtH 水平, 抑制性腺芳香化酶活性及其表达, 促使卵母细胞退化、生精细胞的增殖和分化, 完成性逆转。而血清 E₂ 含量在两次埋植后 10-15 d 显著升高可能是由于部分外源 ADSD 被芳香化的结果。

我们在实验中发现, 埋植 ADSD 后血清 11-KT 含量显著升高, 特别是在已经性转化为功能性雄鱼的第 60 d 和第 90 d, 说明 11-KT 的含量是与精子发生和排精成正相关的。与 Johnson et al. (1998) 发现雄性黑缘石斑鱼在繁殖季节血清 T 和 11-KT 含量显著升高是一致的。这表明赤点石斑鱼在性逆转过程中, 11-KT 可能比 T 起到更直接的作用。

Naftolin et al. (1971, 1975) 认为, 雄激素对脑组织的作用是由脑组织内的芳香化酶将雄激素转化为雌激素 (主要是雌二醇) 而实现的。Tsai et al. (2000) 在罗非鱼性别分化的特定时间用 MT 处

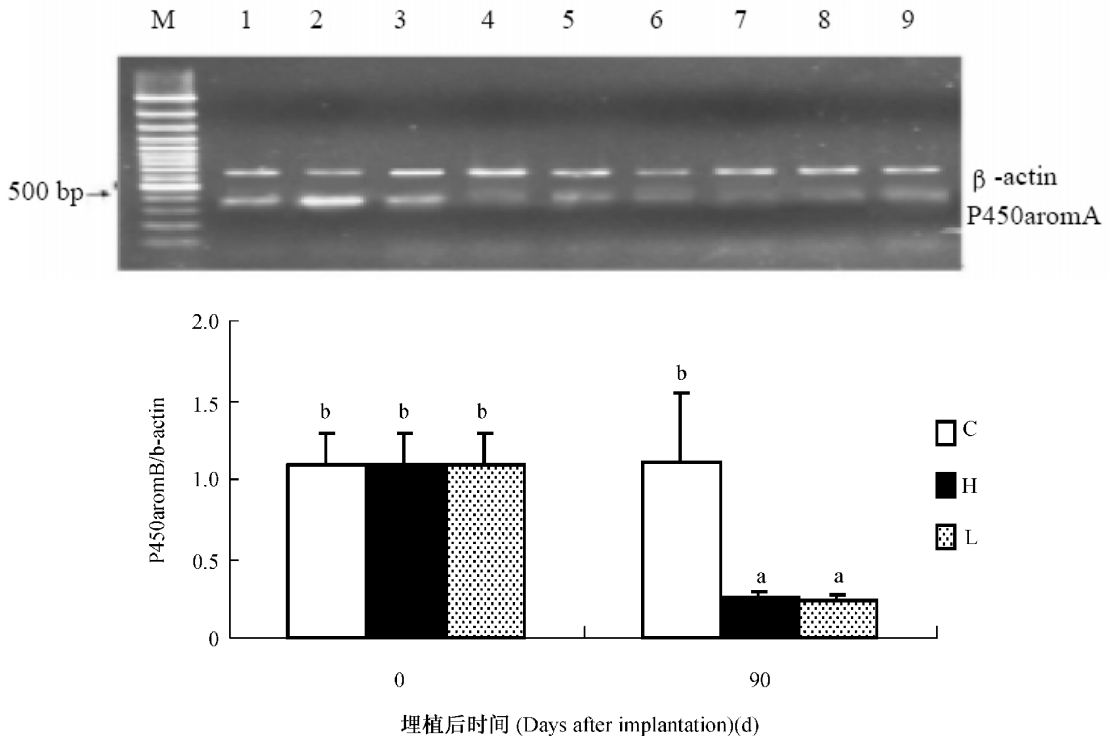


图 8 埋植 ADSD 后赤点石斑鱼性腺芳香化酶 P450aromA mRNA 表达 (30 循环)

C: 对照组。H: 高剂量组。L: 低剂量组。样品编号见图 5。

Fig.8 The expression of aromatase P450aromA in gonad by ADSD implantation in *E. akaara* (30 cycles)

C: Control. H: High dose. L: Low dose. The sample sheet as Fig.5.

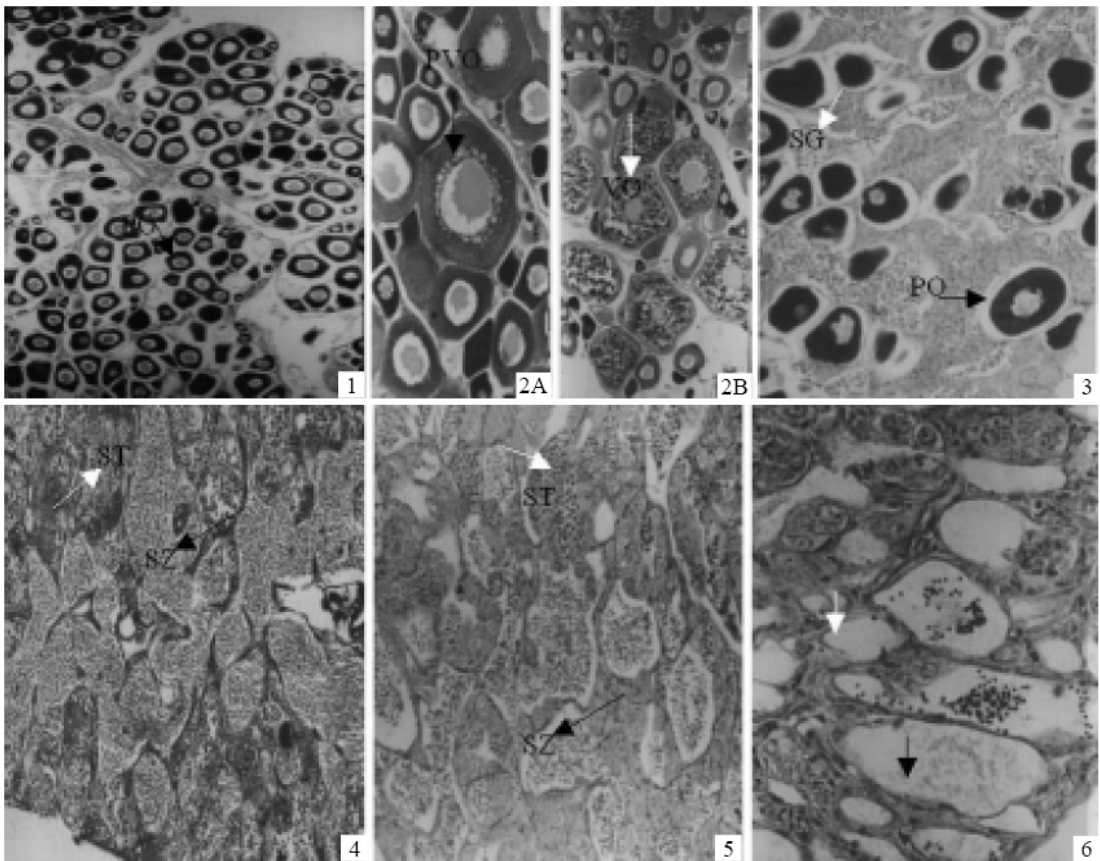
理, 也发现脑芳香化酶表达的显著性升高, 认为 MT 是通过刺激脑芳香化酶的升高从而影响到性别分化的。Zhang et al. (2004) 认为, 在斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 中, MT 可能直接作用于脑及垂体, 促进了脑部 GnRH 和垂体 GtH 的合成与分泌, 有效的促进性腺中雄性生殖细胞的发育, 促进性反转。下丘脑中芳香化酶的表达和血清中 T 的变化趋势相同, 因此, 下丘脑中芳香化酶表达也可能是由于血清 T 的刺激导致升高, 产生雌激素使斜带石斑鱼脑发生性转变。Kitano et al. (2000) 在日本鲷中发现 MT 会抑制性腺芳香化酶表达, 从而诱导基因型的雌鱼性转变为功能性的雄鱼。我们的研究表明埋植 ADSD 后第 90 d 高低剂量组前脑芳香化酶活性显著升高, 性腺芳香化酶活性显著下降; ADSD 埋植组下丘脑芳香化酶 P450aromBmRNA 的表达均显著升高, 性腺芳香化酶 P450aromBmRNA 的表达均明显受到抑制, 表达量显著降低, 明显低于对照组。提示 ADSD 诱导赤点石斑鱼性转化的途径可能是: 1) ADSD 在赤点石斑鱼体内直接转化为 T 和 11-KT, 促进性腺中雄性生殖细胞的发育; 2) ADSD 直接作用于

脑及垂体, 促进了脑部 GnRH 和垂体 GtH 的合成与分泌, 有效的促进性腺中雄性生殖细胞的发育, 促进性反转; 3) ADSD 通过刺激脑芳香化酶的升高或抑制性腺芳香化酶的活性从而影响到性别分化的。

参考文献 (References)

- Chambeyron F, Zohar Y, 1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquac.* 90: 345-352.
- Chang CF, Lin BY, 1998. Estradiol-17 β stimulates aromatase activity and reversible sex change in protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii*. *J. Exp. Zool.* 280: 165-173.
- Chao TM, Lim LC, 1991. Recent developments in the breeding of grouper (*Epinephelus* spp.) in Singapore. *Singap. J. Prim. Ind.* 19: 78-93.
- Chen FY, Chow M, Chow TM, 1977. Artificial spawning and larval rearing of the grouper *Epinephelus tauvina* (Forsk.) in Singapore. *Singap. J. Prim. Ind.* 5: 1-21.
- Fang YQ, Lin GM, Qi X, Hong GY, 1992. Effects of 17 α -methyltestosterone on sex reversal in *Epinephelus akaara*. *J. Fish. China* 16 (2): 171-174 (In Chinese).
- Galland GV, Peter Z, Ryan KJ, 1981. Estrogen synthesis *in vitro* and *in vivo* in the brain of a marine teleost *Myoxocephalus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 29: 14-20.
- Hong WS, Zhang QY, Gong MJ, Lin WX, Shangguan BM, 1994. Masculinization of red grouper *Epinephelus akaara* induced by exogenous hormone. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait* 4 (13): 374-379 (In Chinese).
- Johnson AK, Thomas P, Wilson JRRR, 1998. Seasonal cycles of go

- nadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus mprio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. *J. Fish Biol.* 52: 502–518.
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe SI, 2000. Aromatase inhibitors and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetic female to phenotypic males and suppression of P450 Aromatase gene expression in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Mol. Reprod.* 56 (1): 1–5.
- Kou CM, Ting YY, Yeh SL, 1988. Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper *Epinephelus fario*. *Aquaculture* 74: 113–126.
- Li GL, Liu XC, Zhang Y, Bei JX, Lin HR, 2004. Cloning and expression of two cytochrome P450 aromatase genes in red-spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Acta Zool. Sinica* 50 (5): 791–799 (In Chinese).
- Lin HR, Xie G, Zhang LH, Wang XD, Chen LX, 1998. Artificial induced of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Bull. Fr. Peche. Piscic.* 349: 163–176.
- Monod GA, Mones D, Fostier A, 1992. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular estradiol secretion by imidazole fungicides in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Int Sym. on responses of marine organisms to pollutants.* Woods Hole MA USA 35 (1–2): 153–167.
- Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z, 1971. Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human fetuses, *J. Endocrinol.* 51: 795–796.
- Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M, White RJ, Takaoka Y, Wolin L, 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Rec. Prog. Horm. Res.* 31: 295–314.
- Reinboth R, 1970. Intersexuality of fishes. *Memoirs of the Society of Endocrinology* 18: 515–543.
- Tanaka H, Hirose K, Hattori K, 1990a. Sexual maturation and sex reversal in red-spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquac.* 17: 1–15.
- Tsai CL, Wang LH, Chang CF, Kao CC, 2000. Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J. Neuroendocrinol.* 12 (9): 894–898.
- Yang JJ, Huang ZY, Xiao YX, Li QX, 1996. Artificial induction of sex reversal in the grouper *Epinephelus tauvina* (Forskål). *Tropic Oceanol.* 15 (4): 75–79 (In Chinese).
- Yeh SL, Kuo CM, Ting YY, Chang CF, 2003. Androgens stimulate sex change in protogynous grouper *Epinephelus coioides*: spawning performance in sex-changed males. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C.* 135: 375–382.
- Zhang Y, Zhang WM, Zhang LH, Zhu TY, Tian J, Li X, Lin HR, 2004. Two distinct cytochrome P450 aromatases in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*: cDNA cloning and differential mRNA expression. *The Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology* 92 (1–2): 39–50.
- Zou JX, Hu CQ, Huang ZY, Xiao YX, Yang JJ, Liu ZL, 2000. Exogenous mixed-hormonal induction of precocious sex reversal in the grouper *Epinephelus tauvina* (Forskål). *High Technology Letters* 10 (1): 5–9 (In Chinese).
- 方永强, 林秋明, 齐 襄, 洪桂英, 1992. 17 α -甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响. *水产学报* 16 (2): 171–174.
- 洪万树, 张其永, 公茂军, 林伟雄, 上官步敏, 1994. 外源激素诱导赤点石斑鱼雄性化. *台湾海峡* 13 (4): 374–379.
- 李广丽, 刘晓春, 张 勇, 贝锦新, 林浩然, 2004. 赤点石斑鱼两种芳香化酶 cDNA 的克隆及表达的组织特异性. *动物学报* 50 (5): 791–799.
- 杨家驹, 黄增岳, 肖耀兴, 李庆欣, 1996. 人工诱导巨石斑鱼性逆转的研究. *热带海洋* 15: 75–79.
- 邹记兴, 胡超群, 黄增岳, 肖耀兴, 杨家驹, 刘志龙, 2000. 外源混合激素诱导巨石斑鱼性逆转的研究. *高技术通讯* 1: 5–9.



1. 雌性 1: 1 时相卵母细胞, 初级卵母细胞 (箭头)。×200

2A. 雌性 2: 2 时相卵母细胞, 卵黄生成前期 (箭头)。×400

2B. 雌性 3: 卵黄生成期 (箭头)。×200

3. 兼性期: 精原细胞和初级卵母细胞 (箭头) 混合。×400

4. 成熟精巢, 精子细胞和精子 (箭头)。×400

5. 雄性 1: 精子细胞和精子 (箭头)。×400

6. 雄性 2: 精子已排出 (箭头)。×400

PO: 初级卵母细胞。SG: 精原细胞。SC: 精母细胞。ST: 精子细胞。SZ: 精子。VO: 卵黄生成卵。

1. Female phase1 (F1): Oocytes of phase 1, primary oocytes (PO) (arrow). ×200

2-A. Female phase 2 (F2): Oocytes of phase 2, the presence of previtellogenic (cortical alveolar) oocytes (PVO) (arrow). ×400

2-B. Female phase3 (F3): the presence of vitellogenic (yolk globular) oocytes (VO) (arrow). ×200

3. Intersex-transitional phase (I): the mix of male germ cells (spermatogonia, SG) and primary oocytes (PO) in the gonadal tissue (arrow). ×400

4. Mature testis: mainly spermatid (ST), and spermatozoa (SZ) (arrow). ×400

5. Male phase 1 (M1): mainly spermatid (ST), and spermatozoa (SZ) (arrow). ×400

6. Male phase 2 (M2): no spermatozoa (arrow). ×400

PO: Primary oocyte. SG: Spermatogonia. SC: Spermatocyte. ST: Spermatid. SZ: Spermatozoa. VO: Vitellogenic oocyte.