

赤点石斑鱼两种芳香化酶 cDNA 的克隆及其表达的组织特异性*

李广丽^{1,2} 刘晓春¹ 张勇¹ 贝锦新¹ 林浩然^{1**}

1. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广州 5102752
2. 湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025

摘要 以赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 脑垂体中提取的 RNA 为模板, 根据芳香化酶的保守序列设计引物, 利用 GeneRacerTM 技术, 克隆出两种芳香化酶即脑芳香化酶 (P450aromB) 和性腺芳香化酶 (P450aromA) 的 cDNA, 其全长分别为 1 901 bp (编码 509 aa) 和 1 833 bp (编码 518 aa)。序列分析结果表明, 赤点石斑鱼两种芳香化酶 cDNA 序列的同源性为 51.6%, 氨基酸序列之间同源性为 62.5%, 与斜带石斑鱼两种芳香化酶氨基酸同源性分别为 94.7% 和 97.9%。对 8 个科的 10 种鱼进行了分子系统进化树分析, 结果与根据传统的形态学和生化特征分类进化地位基本一致。以特异性引物扩增雌、雄赤点石斑鱼各种组织 (垂体、嗅球、端脑、下丘脑、中脑、后脑、延脑、心脏、肾脏、肝脏、脾脏、性腺、鳃、胃、肠、皮肤、脂肪、肌肉、头肾、胸腺、鳔), 以 β -actin 作内标比较各组织芳香化酶基因表达量的差异, 结果表明, 赤点石斑鱼脑芳香化酶 (P450aromB) 有广泛的组织分布, 脑和垂体的表达量很高, 各组织表达量有明显的雌、雄差异; 而性腺芳香化酶 (P450aromA) 表达主要集中于垂体和性腺, 且不论雌雄, 其性腺表达量均高于脑垂体, 和 P450aromB 的表达模式明显不同, 表现为在脑部, P450aromB 表达量高于 P450aromA, 而在性腺, P450aromA 表达量高于 P450aromB, 两种芳香化酶在脑垂体和性腺出现重叠表达 [动物学报 50 (5): 791 - 799, 2004]。

关键词 赤点石斑鱼 芳香化酶 cDNA 组织分布

Cloning and expression of two cytochrome P450 aromatase genes in red-spotted grouper *Epinephelus akaara**

LI Guang-Li^{1,2}, LIU Xiao-Chun¹, ZHANG Yong¹, BEI Jin-Xin¹, LIN Hao-Ran^{1**}

1. Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animal, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China
2. Fisheries college, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, Guangdong, China

Abstract The cDNA sequences encoding two distinct cytochrome P450 Aromatases, namely P450aromB and P450aromA, were isolated from pituitary of the red-spotted grouper *Epinephelus akaara* by GeneRacerTM. The P450aromA cDNA is 1 833 bp in length, and the open reading frame encodes a putative protein of 518 amino acids. The P450aromB cDNA is 1 901 bp in length, and the open reading frame encodes a putative protein of 509 amino acids. Sequence and phylogenetic analysis showed that these two P450arom genes of the red-spotted grouper are the orthologs of previously identified P450arom genes in the orange-spotted grouper, and results were similar to those analyzed by traditional morphology and biochemistry in their evolution status. The sequence analysis indicated that the cDNA sequence and the amino acids homogeneity between them were 51.6% and 62.5%, respectively, and the highest identity to orange-spotted grouper were 94.7% (P450aromB) and 97.9% (P450aromA). The expression of both P450aromA and P450aromB genes in different tissues of the red-spotted grouper were further examined using RT-PCR in 21 tissues be-

2004-03-22 收稿, 2004-04-24 接受

* 国家海洋 863 项目 (2001AA621010)、广东省科技计划项目 (A3050201)、教育部科学技术研究重点项目 (02105) 和国家自然科学基金项目 (39970586) 资助 [This research was funded by the grants from State Ocean 863 Project (No. 2001AA621010), Guangdong Provincial Scientific and Technical Program (No. A3050201), Leading Program of State Education Ministry (No. 02105), and the National Natural Science Foundation of China (No. 39970586)]

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

© 2004 动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

tween male and female fish. The expression in gonad (P450aromA > P450aromB) was opposite to that in brain (P450aromB > P450aromA), there were overlapping expression of the two genes in neural and gonadal tissues [*Acta Zoologica Sinica* 50 (5): 791 - 799, 2004].

Key words Red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*, Cytochrome P450 aromatase, cDNA, Tissue distribution

赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 为我国名贵的海产经济鱼类之一, 为雌雄同体, 雌性先熟鱼类, 存在性转化现象 (Tanaka et al., 1990a); 其肉质鲜美, 营养丰富, 经济价值甚高, 深受养殖户的欢迎, 但因没有足够数量的雌雄同步成熟亲鱼, 给人工繁殖造成很大的困难, 目前苗种仍主要来源于自然海区捕捞和进口, 严重制约其增殖事业的发展。因此, 获得数量充足的、雌雄同步成熟的亲鱼, 是海水鱼类养殖事业发展的关键。

芳香化酶是类固醇激素代谢中的一种重要酶类, 属于细胞色素 P450 家族中的一员, 广泛存在于大多数脊椎动物的脑和垂体中, 它可催化某些雄激素转化为雌激素, 是雌激素生物合成中的关键酶和限速酶。研究表明, 芳香化酶可以影响哺乳动物中枢神经系统的功能和发育, 调节神经内分泌和繁殖功能以及性行为 (Lephart, 1996), 并参与非哺乳动物性腺分化的调控 (Pifferrer et al., 1994), 很多实验已证实芳香化酶可控制多种鱼类的性别分化和性别转化 (Nakamara et al., 1998)。迄今为止, 已从虹鳟 (Tanaka et al., 1992)、鲫 (Tchoudakova et al., 1996)、青鳉 (Fukada, et al., 1996)、斑点鲷 (Trant, 1994)、斑马鱼 (Kishida and Callard, 2001)、日本鳗鲡 (Ijiri et al., 2003) 等淡水硬骨鱼和牙鲆 (Kitano et al., 1999)、欧洲舌齿鲈 (Valle et al., 2002a) 等海水硬骨鱼类的卵巢中克隆出性腺芳香化酶基因, 甚至软骨鱼类大西洋鲷中的芳香化酶基因也被克隆 (Ijiri et al., 2000)。此外, 在金鱼 (Tchoudakova et al., 1996; Gelinas et al., 1998)、斑马鱼 (Kishida et al., 2001; Callard et al., 2001)、虹鳟 (Valle et al., 2002b) 等鱼类中已克隆出芳香化酶基因的第二种形式——脑芳香化酶, 舌齿鲈脑中较低的芳香化酶活性也暗示着在这种鱼可能也存在着芳香化酶的第二种基因形式 (Valle et al., 2002a)。

本文应用 GeneRacer™ 方法, 克隆赤点石斑鱼脑芳香化酶 (P450aromB) 和性腺芳香化酶 (P450aromA) 的 cDNA 全长, 并比较这两种芳香化酶在不同性别赤点石斑鱼组织中的 mRNA 表达, 旨在深入研究赤点石斑鱼性腺发育、性分化和性逆转的分子机制及其基因调控, 为人工控制赤点石斑

鱼性别提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

所用赤点石斑鱼购自广东省水产厅大亚湾鱼种增殖中心的海水养殖基地, 雌雄鱼各 3 尾, 均为性成熟个体, 实验鱼经尾静脉取血后立刻取垂体、嗅球、端脑、下丘脑、中脑、后脑、延脑、心脏、肾脏、肝脏、脾脏、卵巢、鳃、胃、肠、皮肤、脂肪、肌肉、头肾、胸腺和鳔, 放入液氮中运回实验室, 存于 -80 °C 冰箱待用。

1.2 试剂

Ex Taq™ 和限制性内切酶 *EcoR* 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent、GeneRacer™ cDNA 克隆试剂盒和 DNase、Thermoscript™ RT-PCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司。E. Z. N. A. 质粒提取和胶回收试剂盒为 Omega 公司产品。pGEM T-easy 载体连接试剂盒购自 Promega 公司。其余均为国产分析纯试剂。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 由本实验室保存。

1.3 方法

1.3.1 引物 聚合酶链式反应 (PCR) 引物见表 1, P450arom 的简并引物根据基因库 (GENBANK) 中鱼类芳香化酶 P450arom 保守序列设计, -actin 引物序列参照斜带石斑鱼设计, 所有引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3.2 赤点石斑鱼芳香化酶 P450aromA 和 P450aromB cDNA 的克隆 利用 GeneRacer™ 试剂盒克隆两种芳香化酶 cDNA。以雌性赤点石斑鱼脑垂体为材料, 提取总 RNA 后, 进行反转录, 用简并引物 (HB-ARF1 和 HB-ARR1、HO-ARF1 和 HO-ARR1) 扩增赤点石斑鱼脑芳香化酶和性腺芳香化酶部分编码区域, 再根据所得序列, 设计特异性引物 (HB-ARF2 和 HB-ARR2、HO-ARF2 和 HO-ARR2), 配合 GeneRacer 5' Primer 和 3' Primer 克隆两种芳香化酶 cDNA, 实验参照 GeneRacer™ 试剂盒操作说明书进行。PCR 反应体系为 20 μl, 反应条件为预变性 94 °C 3 min, 变性 94 °C 30 s, 退火 (55 - 60) °C 30 s, 延伸 72 °C 60 s, 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。取 3 μl 产物于 1.4% 琼脂糖凝胶

表 1 克隆赤点石斑鱼 P450arom cDNA 序列及检测组织表达所用引物

Table 1 Primers used for cloning and expression analysis of *Epinephelus akaara* cytochrome P450arom

引物 Primer	序列 Sequence	碱基位置 (bp) Position
HB-ARF1	5 - WCSGCRTGCAACTACTATAA-3	nt 392 - 411
HB-ARR1	5 - GGCTGGAARWAACGWCKVGG-3	nt 1 442 - 1 461
HB-ARF2	5 - GTGCGTGCTGGA GATGGTGATTG-3	nt 1 072 - 1 094
HB-ARR2	5 - GCTGTTGAGCTCACACAGATTC-3	nt 663 - 684
HB-ARF3	5 - TGACACCTGGCAAACAGTTC-3	nt 841 - 860
HB-ARR3	5 - GATGGTGTCGTCTCCAGAG-3	nt 1 305 - 1 324
HO-ARF1	5 - CAGCCWGCAACTA YTA YAA Y-3	nt 334 - 353
HO-ARR1	5 - GYCTGGRTAAGAA YSTCATG-3	nt 1 580 - 1 599
HO-ARF2	5 - TCCTGCGTTGGCAAGCACATCG-3	nt 1 410 - 1 421
HO-ARR2	5 - TGACAGGTACATCCA GGAA GAGTC-3	nt 709 - 732
HO-ARF3	5 - GGA GACA TTGTGA GAGTCTGGATC-3	nt 363 - 386
GeneRacer 5 Primer	5 - GCACGAGGACACU GACAU GGACU GA-3	
GeneRacer 3 Primer	5 - GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3	
-actinF	5 - GATCATGTTCGAGACCTTCAACAC-3	nt 461 - 484
-actinR	5 - TCCGATCCA GACAGATTTACG-3	nt 1 101 - 1 124

上电泳, 进行割胶回收、载体连接、转化、提取质粒, 酶切鉴定后测序。

1.3.3 序列分析与进化树的构建 所获得的 cDNA 序列应用 DNA TOOL 6.0 进行拼接和推导氨基酸序列, 全长与国际基因库 (GENBANK) 中的芳香化酶序列进行相似性比较, 摘录 GENBANK 中一些已有鱼类的 P450arom 氨基酸序列, 用 CLUSTAL W 进行序列比较分析, 并用 PHYLIP 构建进化树。

1.3.4 芳香化酶在组织中 mRNA 表达 提取上述各组织 RNA 样品, 经 DNase (Invitrogen, Amplification Grade) 处理后, 按照 Thermoscript™ RT-PCR 说明, 用 1 μg RNA 进行反转录; 再以 0.6 μl 反转录产物为模板, 以 HB-ARF3 和 HB-ARR3、HO-ARF3 和 HO-ARR2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μl, PCR 程序为 94 预变性 3 min, 94 变性 30 s, 55 退火 30 s, 72 延伸 60 s, 35 个循环后 72 延伸 10 min。保持其他条件不变, 再以 40 个循环扩增 RT 产物, 对比 35 个循环, 检测芳香化酶在组织中 mRNA 表达情况。以 -actinF 和 -actinR 为引物, 上述 PCR 程序改为 30 个循环, 模板用 0.3 μl 反转录产物, 作为检测基因表达时的内标。取 4 μl RT-PCR 产物在 1.7% 琼脂糖凝胶上电泳, 用 BIO-RAD GEL

DOC2000 对电泳图像进行分析。

1.3.5 数据分析 用 3 个重复实验的平均值 ± 标准差表示雌鱼和雄鱼两种芳香化酶 mRNA 表达量, 数据分析采用 SPSS 统计分析软件 Duncan S 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 脑芳香化酶 (P450aromB) 和性腺芳香化酶 (P450aromA) cDNA 序列

芳香化酶 P450arom cDNA 全长通过 3 个有重叠部分的 PCR 片段拼接而成。内部片段以雌鱼脑垂体中提取的 RNA 为模板, 使用芳香化酶 P450arom 高度保守序列设计的简并引物, 得到大小为 1 070 bp 和 1 266 bp 的片段, 以此序列设计特异性引物, 利用 5、3 PCR 反应得到脑芳香化酶 (P450aromB: GENBANK 收录号为 AY547353) 和性腺芳香化酶 (P450aromA: GENBANK 收录号为 AY547354) cDNA 全长, 其中脑芳香化酶 (P450aromB) cDNA 序列全长 1 901 bp, 编码 509 个氨基酸, 含有 169 bp 5'-未翻译区 (UTR), 202 bp 3'-UTR。性腺芳香化酶 (P450aromA) cDNA 序列全长 1 833 bp, 编码 518 个氨基酸, 含有 69 bp 5'-UTR, 211 bp 3'-UTR。与 GENBANK 中的序列进行相似性比较, BLAST 结果表明, 赤点石

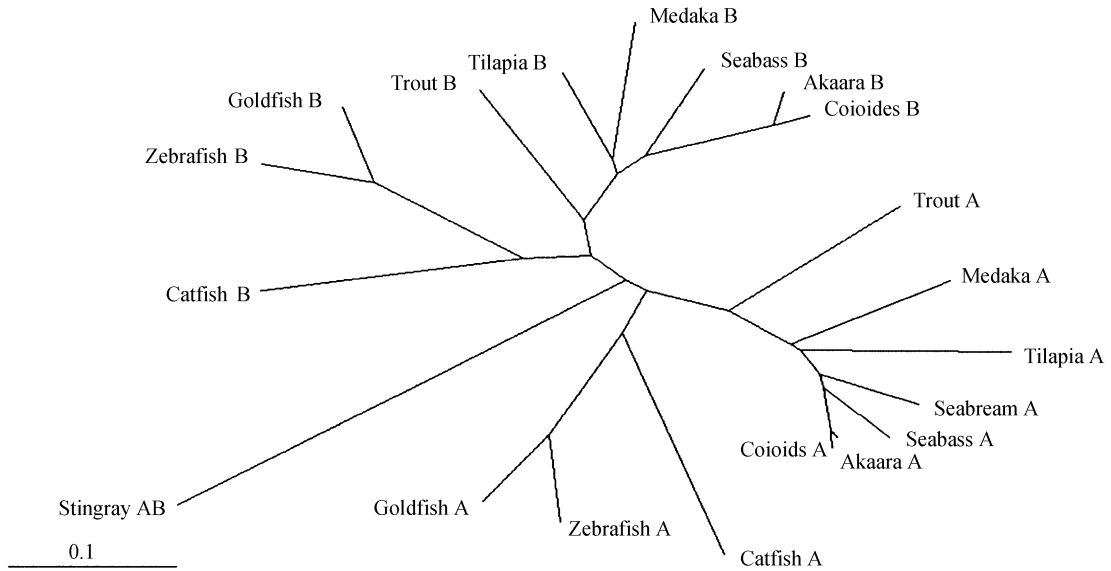


图 1 脑芳香化酶 (P450aromB) 和性腺芳香化酶 (P450aromA) 进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of fish P450arom proteins

斑鱼两种芳香化酶cDNA 序列的同源性为 51.6%，与其它鱼类 cDNA 序列的同源性达 50%以上，氨基酸序列之间同源性为 62.5%，与斜带石斑鱼同源性高达 94.7%和 97.9%。摘录 GENBANK 中一些已有鱼类的芳香化酶氨基酸序列：斜带石斑鱼/B (AAR97602)，斑马鱼/B (AA K00642)，金鱼/B (AAB39408)，虹鳟/B (CAC84574)，罗非鱼/B (AA G18458)，鲈鱼/B (AAM95455)，青鳉/B (AAP83449)，鲶鱼/B (AAP83132)，斜带石斑鱼/A (AAR97601)，斑马鱼/A (AA K00643)，金鱼/A (AAC14013)，虹鳟/A (1806325A)，罗非鱼/A (AAB16814)，鲈鱼/A (CAC43178)，青鳉/A (Q92087)，鲶鱼/A (AAP83133)，黑鲷/A (AAP23236)，大西洋鳉 A/B (AAF04617) 等进行序列比较，并构建进化树 (图 1)，结果与根据传统的形态学和生化特征分类进化地位基本一致。

2.2 赤点石斑鱼各种组织中芳香化酶 P450arom 的 mRNA 表达

2.2.1 脑芳香化酶 (P450aromB) 的 mRNA 表达

以 1 μg 上述各组织 RNA 样品为模板，用 HB-ARF3 和 HB-ARR3 为引物进行 PCR 反应 (35 个循环)，在雌、雄鱼的垂体、嗅球、端脑、下丘脑、中脑、性腺中扩增出一条 484 bp 的预期条带，雌鱼后脑有微弱条带，小于 100 bp 的非特异性条带为引物二聚体 (图 2)。而经 40 个循环的 PCR 程序后，只有延脑、雌鱼的肾脏、肌肉和雄鱼的后脑、

表 2 赤点石斑鱼各组织中脑芳香化酶 mRNA 表达量差异 (40 个循环)

Table 2 Tissue-specific difference of P450aromB in Epinephelus akaara (40 cycles)

组织 Tissue	雌鱼 Female	雄鱼 Male
垂体 Pituitary	1.253 ±0.051	1.140 ±0.147
嗅球 Olfactory bulb	1.320 ±0.071 *	0.071 ±0.018
端脑 Telencephalon	1.207 ±0.176	1.053 ±0.198
下丘脑 Hypothalamus	1.259 ±0.352 *	0.348 ±0.008
中脑 Midbrain	1.262 ±0.361	1.047 ±0.410
后脑 Hindbrain	0.399 ±0.057 *	
延脑 Medulla		
心脏 Heart	0.438 ±0.069	0.527 ±0.071
肾脏 Kidney		0.029 ±0.001 *
肝脏 Liver	0.393 ±0.065 *	3.746 ±0.429
脾脏 Spleen	0.654 ±0.109	0.953 ±0.292
性腺 Gonad	0.592 ±0.182	0.980 ±0.532
鳃 Gill	0.850 ±0.107 *	0.021 ±0.001
胃 Stomach	0.680 ±0.019	0.398 ±0.176
肠 Intestine	0.841 ±0.102 *	0.332 ±0.023
皮肤 Skin	0.702 ±0.068 *	
脂肪 Fat	0.054 ±0.009 *	
肌肉 Muscle		0.094 ±0.058 *
头肾 Head kidney	0.019 ±0.021 *	0.612 ±0.172
胸腺 Thymus	0.041 ±0.009 *	0.889 ±0.418
鳔 Air bladder	0.218 ±0.038 *	

数据表示为平均值 ±标准差，雌、雄鱼样本数各为 3 尾鱼，*表示雌、雄鱼间具有显著性差异 (P<0.05)。

Date as means ±SE with three males and females, * indicates significant differences between sexes (P<0.05).

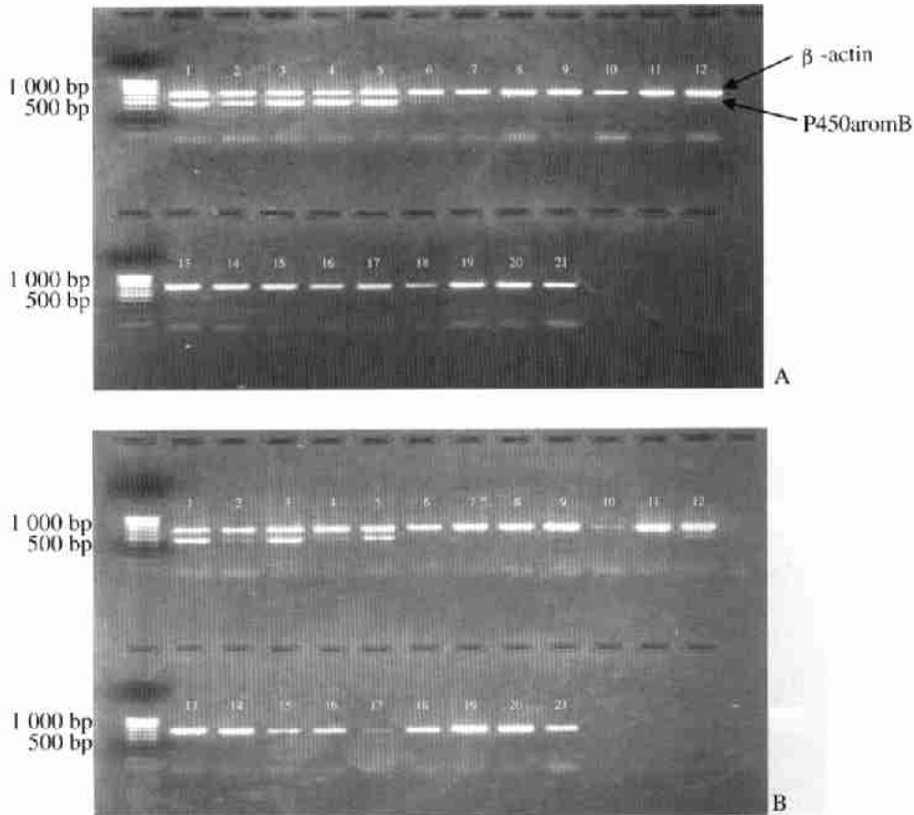


图2 赤点石斑鱼雌 (A)、雄 (B) 鱼各种组织中脑芳香化酶和 β -actin mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析 (35 循环) P450aromB 的扩增产物为 484 bp, β -actin 的扩增产物为 660 bp, 小于 100 bp 的非特异性条带为引物二聚体。

1: 垂体。2: 嗅球。3: 端脑。4: 下丘脑。5: 中脑。6: 后脑。7: 延脑。8: 心脏。9: 肾脏。10: 肝脏。11: 脾脏。12: 卵巢。13: 鳃。14: 胃。15: 肠。16: 皮肤。17: 脂肪。18: 肌肉。19: 头肾。20: 胸腺。21: 鳔。

Fig. 2 Semiquantitative RT-PCR analysis of the tissue distribution of P450aromB and β -actin mRNAs in male (B) and female (A) *Epinephelus akaara* (35 cycles)

The PCR product of P450aromB is 484 bp, the PCR product of β -actin is 660 bp. The band shorter than 100 bp is non-special primer dimer.

1: Pituitary. 2: Olfactory bulb. 3: Telencephalon. 4: Hypothalamus. 5: Midbrain. 6: Hindbrain. 7: Medulla. 8: Heart. 9: Kidney. 10: Liver. 11: Spleen. 12: Gonads. 13: Gill. 14: Stomach. 15: Intestine. 16: Skin. 17: Fat. 18: Muscle. 19: Head kidney. 20: Thymus. 21: Air bladder.

脂肪和鳔未出现 P450arom B (图 3), 表明在所检测组织中, 赤点石斑鱼脑芳香化酶有广泛的组织分布。用 β -actin 作内参, 计算各组织中 P450aromB 的表达水平, 结果 (表 2) 显示, 脑芳香化酶 mRNA 表达为雌性高于雄性, 且垂体和脑的表达高于其他组织, 表达水平存在明显的雌、雄差异。

2.2.2 性腺芳香化酶 (P450aromA) 的 mRNA 表达 换用 HO-ARF3 和 HO-ARR2 为引物进行 PCR 反应 (35 个循环), 仅在雌鱼的垂体、性腺、鳃、鳔和雄鱼的垂体、性腺、胃扩增出 386 bp 的预期条带 (图 4), 增加为 40 个循环后, 雌、雄鱼的中脑和雌鱼的心脏、头肾出现微弱条带 (图 5), 表明赤点石斑鱼性腺芳香化酶分布局限; 以 β -actin 作内参所得结果 (表 3) 表明, 雌性各组织中

表 3 赤点石斑鱼各组织性腺芳香化酶 mRNA 表达量差异 (40 个循环)

Table 3 Tissue-specific difference of P450aromA in *Epinephelus akaara* (40 cycles)

组织 Tissue	雌鱼 Female	雄鱼 Male
垂体 Pituitary	0.776 \pm 0.188	0.542 \pm 0.130
中脑 Midbrain	0.071 \pm 0.045	0.016 \pm 0.004
性腺 Gonad	1.050 \pm 0.045	0.922 \pm 0.373
鳃 Gill	0.395 \pm 0.19 *	
胃 Stomach		0.014 \pm 0.010 *
头肾 Head kidney	0.161 \pm 0.085 *	
鳔 Air bladder	0.449 \pm 0.246 *	

数据表示为平均值 \pm 标准差, 雌、雄鱼样本数各为 3 尾鱼, * 表示雌、雄鱼间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Data as means \pm SE with three males and females, * indicates significant difference between sexes ($P < 0.05$).

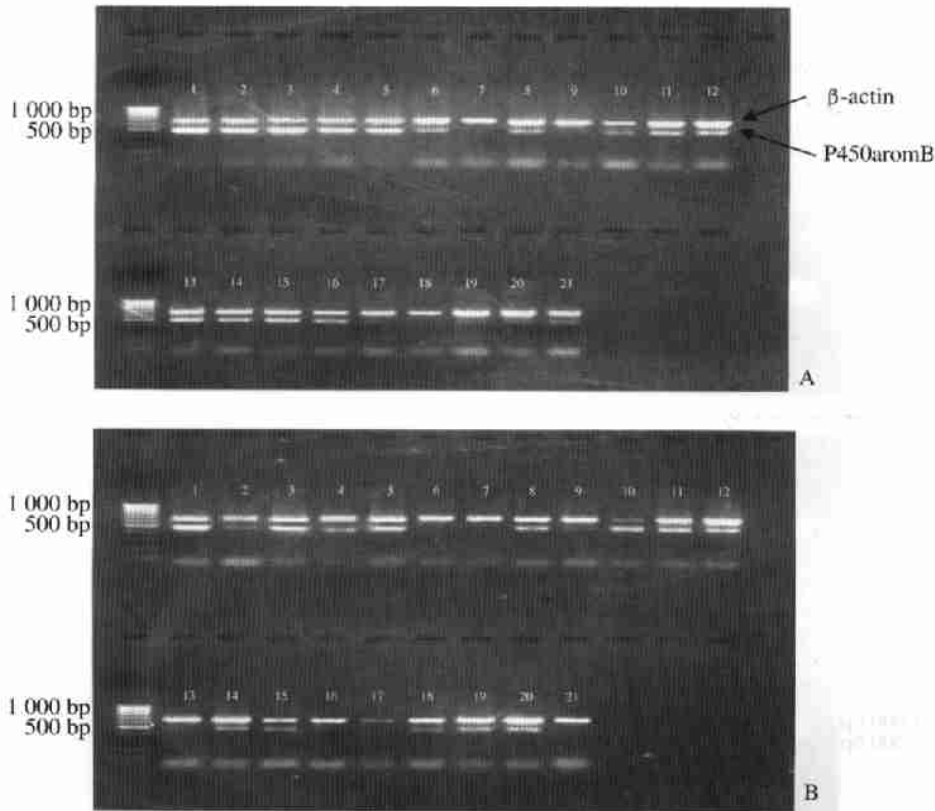


图3 赤点石斑鱼雌 (A)、雄 (B) 鱼各种组织中脑芳香化酶和 β -actin mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析 (40 循环) 样品编号见图 2。

Fig. 3 Semiquantitative RT-PCR analysis of the tissue distribution of P450aromB and β -actin mRNAs in male (B) and female (A) *Epinephelus akaara* (40 cycles)

The sample sheet as Fig. 2.

性腺芳香化酶 mRNA 表达水平明显高于雄性, 且性腺中 P450aromA mRNA 表达高于垂体和脑, 与 P450aromB mRNA 在这些组织中的表达恰好相反。

3 讨论

芳香化酶几乎在所有脊椎动物脑和性腺中存在 (Callard and Tchoudakova, 1997), 其 P450arom cDNA 在许多动物如哺乳动物 (Chen et al., 1988)、鸟类 (Silverrin et al., 2000)、啮齿动物 (Lephart et al., 1992) 及鱼类 (Tanaka et al., 1992; Trant, 1994; Kitano et al., 1999; Kishida and Callard, 2001; Valle et al., 2002a; Ijiri et al., 2003) 被克隆。但与人等大多数哺乳动物不同, 越来越多的证据表明, 在硬骨鱼类, 芳香化酶 P450arom 至少由 2 种 CYP19 基因编码, 即脑芳香化酶 P450aromB 和性腺芳香化酶 P450aromA, 它们以明显不同的形式分别存在于脑和性腺中 (Callard et al., 2001), 金鱼由一个基因编码脑芳

香化酶, 而斑马鱼由另一个或两个基因编码性腺芳香化酶 (Tchoudakova et al., 1996; Callard et al., 2001); 虹鳟中则发现有两种类型的 P450aromB (Valle et al., 2002b), 可能由一个或两个基因编码。我们的研究发现, 赤点石斑鱼在多种组织中都存在芳香化酶的两表达形式, 一种 1 901 bp, 另一种 1 833 bp, 分别编码 509 和 518 个氨基酸, 两种芳香化酶 cDNA 序列之间同源率为 51.6%, 氨基酸序列之间为 62.5%, 与已报道的硬骨鱼类如斑马鱼 (Kishida and Callard, 2001)、虹鳟 (Valle et al., 2002b)、金鱼 (Tchoudakova et al., 1996; Gelinas et al., 1998)、青鳉 (Fukada, et al., 1996) 同源性达 70% 以上, 与斜带石斑鱼 (本实验室未发表数据) 氨基酸同源性高达 94.7% (P450aromB) 和 97.9% (P450aromA), 表明芳香化酶在进化过程中高度保守。亲源分析结果表明, 赤点石斑鱼两种芳香化酶与软骨鱼类的亲缘关系最远, 而与黑鲷、欧洲舌齿鲈等鲈形目关系最近, 结

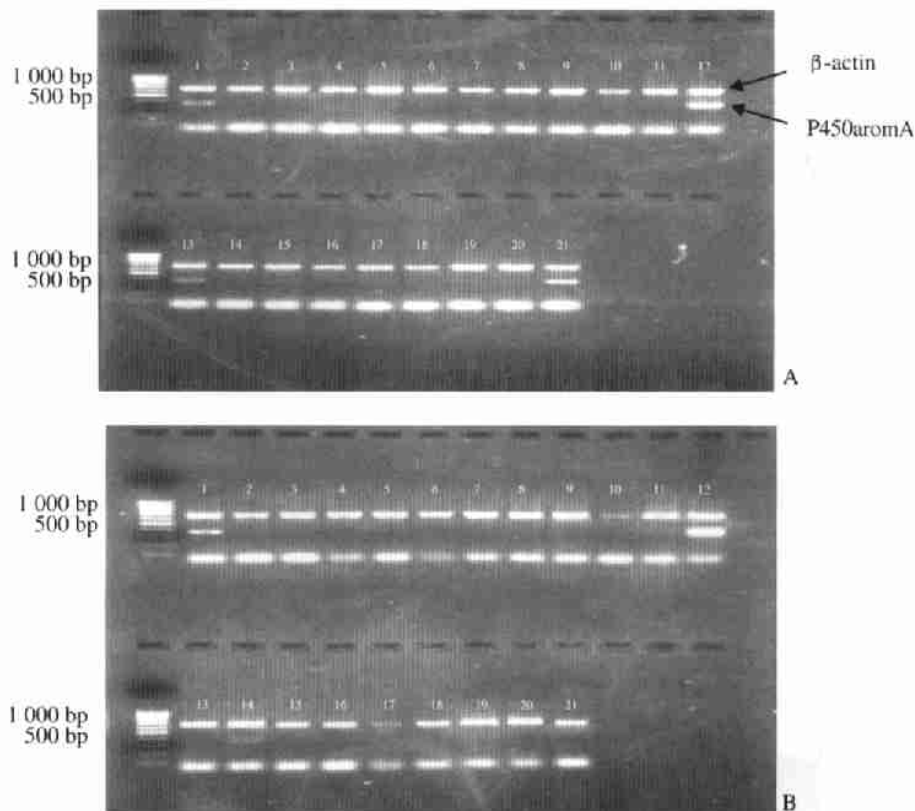


图 4 赤点石斑鱼雌 (A)、雄 (B) 鱼各种组织中性腺芳香化酶和 β -actin mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析 (35 循环) P450aromA 的扩增产物为 386 bp, β -actin 的扩增产物为 660 bp, 小于 100 bp 的非特异性条带为引物二聚体, 样品编号见图 2。

Fig. 4 Semiquantitative RT-PCR analysis of the tissue distribution of P450aromA and β -actin mRNAs in male (B) and female (A) *Epinephelus akaara* (35 cycles)

The PCR product of P450aromA is 386 bp, the PCR product of β -actin is 660 bp. The band shorter than 100 bp is non-specific primer dimer. The sample sheet as Fig. 2.

果与根据传统的形态学和生化特征分类的进化地位基本一致。

半定量 RT-PCR 是一种常用的检测组织表达分布的技术手段, 本实验以 β -actin 为内参照, 是基于 β -actin 的 mRNA 水平在多数器官组织和各类细胞培养中稳定表达, 并且在适宜的条件下进行多重 PCR 共扩增并不会改变细胞因子与 β -actin 的相对关系, 因此可作为用于衡量比较细胞内某些其他因子表达变化的参照指标 (吕枚等, 2002)。RT-PCR 检测发现, 两种芳香化酶 mRNA 在赤点石斑鱼垂体和性腺中有重叠表达, 但脑中 P450aromB 表达量高于 P450aromA, 而性腺中 P450aromA 表达量高于 P450aromB, 与斑马鱼和金鱼的研究结论相似 (Gelinas et al., 1998; Callard et al., 2001)。Tanaka et al. (1992) 和 Valle et al. (2001) 等克隆并分析了 P450aromA 在雌、雄虹鳟十种组织中的表达, 发现 P450aromA 在脑和肾脏 mRNA 表达

几乎相等, 而鳃、性腺等组织表达很弱; 相反, P450aromB 只在脑、性腺和鳃表达, 我们的结果与之有所不同。同时可以看到, 赤点石斑鱼两种芳香化酶 mRNA 表达有明显的雌、雄差异和组织差异, 在大多数组织中, 雌鱼 mRNA 明显高于雄鱼, 这点显然与芳香化酶的生理功能相关, 并与雌二醇增加金鱼和斑马鱼 P450aromB 的 mRNA 表达的研究结果相互印证 (Gelinas et al., 1998; Kishida and Callard, 2001)。用 RT-PCR 方法和 Northern 杂交检测日本鳗鲡 (Ijiri et al., 2003)、欧洲舌齿鲈 (Valle et al., 2002a)、大西洋鲑 (Ijiri et al., 2000) 性腺芳香化酶 (P450aromA) 和虹鳟 (Valle et al., 2002b) 脑芳香化酶 (P450aromB) 在多种组织中的表达水平, 在所检测鱼类中, 垂体、脑和性腺 (精巢、卵巢) 都有表达, 大西洋鲑的肾脏、虹鳟的鳃也有表达, 而日本鳗鲡的肝脏、脾脏、头肾、肾脏无表达, 表现出种群差异。González and

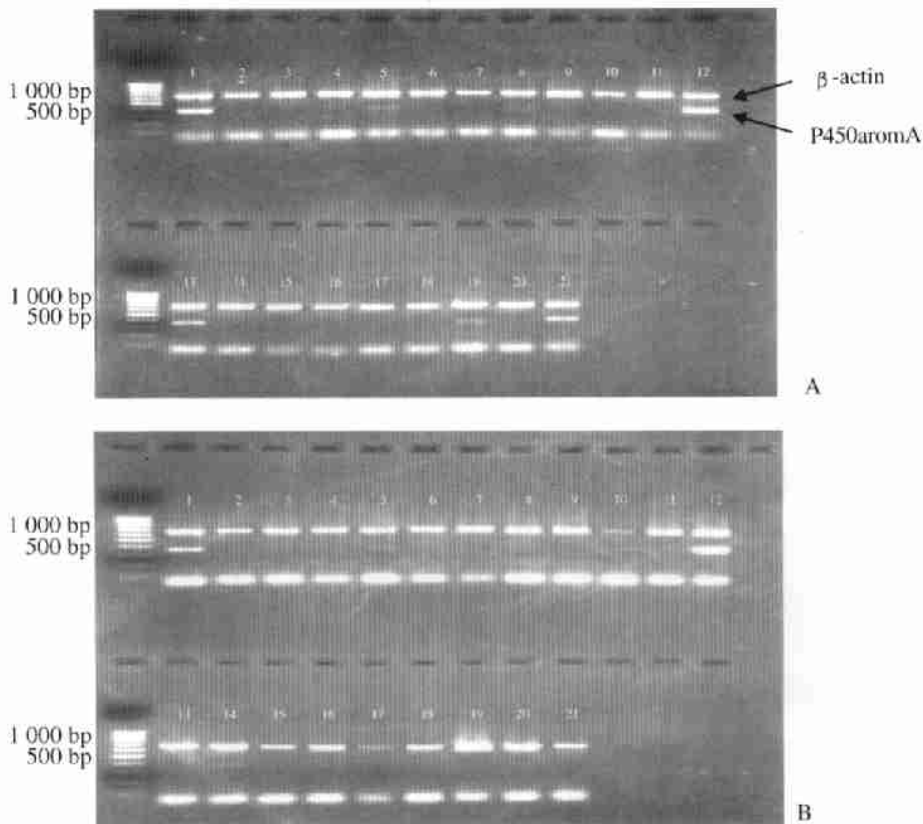


图5 赤点石斑鱼雌 (A)、雄 (B) 鱼各种组织中性腺芳香化酶和 β -actin mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析 (40 循环) 样品编号见图 2。

Fig. 5 Semiquantitative RT-PCR analysis of the tissue distribution of P450aromA and β -actin mRNAs in male (B) and female (A) *Epinephelus akaara* (40 cycles)

The sample sheet as Fig. 2.

Pifferrer (2003) 用芳香化酶活性大小衡量芳香化酶组织分布, 对欧洲舌齿鲈的研究表明, 芳香化酶主要集中在嗅球、端脑、下丘脑和垂体、卵巢等与繁殖控制有关的区域, 脑中芳香化酶活性 > 卵巢 > 脂肪 > 肝脏 > 头肾, 精巢、肝脏、鳃等其它组织的活性则可忽略不计, 但赤点石斑鱼精巢中也有很高的芳香化酶 mRNA 表达, 与虹鳟 (Tanaka et al., 1992)、斑点鲷 (Trant, 1994)、大西洋鲷 (Ijiri et al., 2000) 等研究结果相一致, 且鳃、鳔等非类固醇生成组织都检测到一定的表达量, 组织中有芳香化酶 mRNA 表达却检测不到活性, 可能与不同组织转录蛋白质的水平有关。

从赤点石斑鱼芳香化酶 mRNA 组织表达情况看, 凡与繁殖控制有关的区域如嗅球、端脑、下丘脑和垂体、卵巢等都具有较高的芳香化酶 mRNA 表达, 符合前人关于芳香化酶活性高低与生殖控制区域是一致的观点 (Callard et al., 1988)。在头肾、精巢、鳃、肝脏、胸腺等中检测到一定量的芳

香化酶 mRNA 表达, 与这些组织在雌激素代谢中的作用密切相关。已知鱼类的头肾具有形成类固醇激素的能力 (Borg, 1994), 而精巢在低等脊椎动物某一段自分泌和旁分泌调节中, 通过芳香化酶生成的雌激素在此阶段起重要的调节作用 (Callard, 1992); 在虹鳟 (Valle et al., 2002b) 和赤点石斑鱼的鳃中检测到两种形式的芳香化酶表达, 可能与鳃细胞具有将睾酮转化成 5-双羟睾酮和雄烷二酮的能力有关 (Leguen et al., 2000), 而且, 在大西洋鲷 (Rogers et al., 2000) 中, 利用 RT-PCR 技术在鳃细胞中也发现有雌激素 5-受体的存在, 但赤点石斑鱼鳃中形成雌激素的生理作用尚不清楚; 胸腺作为体内一种重要的免疫器官, 受到性激素特别是雌二醇的调控, 通过影响胸腺素的生成而调节免疫功能 (Kanda et al., 1999)。有关雌激素在肝脏中的作用在鱼类已了解的相当透彻, 肝脏中丰富的芳香化酶可以使循环血液中的雄激素转化成雌二醇, 而雌二醇可以影响很多生理活

动, 如刺激非哺乳性脊椎动物肝脏合成卵黄蛋白原、影响生殖细胞发育、性别决定等。

综上所述, 赤点石斑鱼多种组织中存在由两个基因编码的脑 (P450aromB) 和性腺 (P450aromA) 芳香化酶, 其核酸序列和氨基酸序列与已报道的鱼类同源性非常高。两种芳香化酶组织在脑垂体和性腺出现重叠表达, 并具有明显的雌、雄差异和组织特异性, 其 mRNA 表达模式为脑中 P450aromB 表达量高于 P450aromA, 性腺中 P450aromA 表达量高于 P450aromB。

致谢 对实验过程中田静、陈蓉等的帮助和支持表示衷心感谢。

参考文献 (References)

- Borg B, 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* C 109: 219 - 245.
- Callard GV, Specker JL, Knapp J, Nishioka RS, Bern HA, 1988. Aromatase is concentrated in the proximal pars distalis of tilapia pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 70 - 79.
- Callard GV, 1992. Autocrine and paracrine role of steroids during spermatogenesis: studies in *Squalus acanthias* and *Necturus maculosus*. *J. Exp. Zool.* 261: 132 - 142.
- Callard GV, Tchoudakova A, 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *J. Ster. Biochem. & Mol. Bio.* 61 (3 - 6): 387 - 392.
- Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E, 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J. Ster. Biochem. & Mol. Bio.* 79: 305 - 314.
- Chen S, Marc JB, Robert S, 1988. Human aromatase: cDNCloning, southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA* 7 (1): 27 - 38.
- Fukada S, Tanaka M, Matsuyama M, Kobayashi D, Nagahama Y, 1996. Characterization, and expression of cDNA encoding the medaka *Oryzias latipes* ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase. *Mol. Reprod. Dev.* 45 (3): 285 - 290.
- Gelinas D, Pitoc GA, Callard GV, 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P-450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 138: 81 - 93.
- González A, Pifferrer F, 2003. Aromatase activity in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 223 - 230.
- Ijiri S, Berard C, Trant JM, 2000. Characterization of gonadal and extragonadal forms of the cDNA encoding the Atlantic syngrey *Dasyatis sabina* cytochrome P-450 aromatase (CYP19). *Mol. and Cell. Endocrinol.* 164: 169 - 181.
- Ijiri S, Kazeto Y, Lokman PM, Adachi S, Yamauchi K, 2003. Characterization of a cDNA encoding P-450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130: 193 - 203.
- Kanda NK, Tsuchida TTY, Tamaki KH, 1999. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42: 328.
- Kishida M, Callard GV, 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish *Danio rerio* brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinol.* 142 (2): 740 - 750.
- Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, Nagahama Y, Abe SI, 1999. Suppression of P-450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceous*. *J. Mol. Endocrinol.* 23 (2): 167 - 176.
- Leguen I, Carlsson C, Perduran E, Prunet P, Part P, Crăvești JP, 2000. Xenobiotic and steroid biotransformation activities in rainbow trout gill epithelia cells in culture. *Aquat. Toxicol.* 48 (2/3): 165 - 176.
- Lephart ED, Simpson ER, McPhaul MJ, 1992. Brain aromatase cytochrome P450 messenger RNA levels and enzyme activity during prenatal and development in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 4: 29.
- Lephart ED, 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res. Reviews* 22: 1 - 26.
- Lü M, Fang PH, He HP, Zheng RX, Zhang ZY, Yang LP, Xiao Q, 2002. The study of oncogene-fos expression in papillary thyroid carcinoma by use of β -actin as a normalization parameter. *J. Tianjin Medical University*, 2 (1): 7 - 10 (In Chinese).
- Nakamura M, Kobayashi T, Chang X, Nagahama Y, 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 281: 362 - 372.
- Pifferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar II, Devlin RH, Donaldson EM, 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal functional males. *J. Exp. Zool.* 270: 255 - 262.
- Rogers SA, Llewellyn L, Wigham T, Sweeney GE, 2000. Cloning of Atlantic salmon *Salmo salar* estrogen receptor gene. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 125 (3): 379 - 385.
- Silverin B, Ballien M, Foidart A, Balhazart J, 2000. Distribution of aromatase activity in the brain and peripheral tissues of passerine and nonpasserine avian species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117: 34 - 53.
- Tanaka H, Hirose K, Hattori K, 1990a. Sexual maturation and sex reversal in red spotted grouper *Epinephelus akaara*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture* 17: 1 - 15.
- Tanaka M, Telecky TM, Fukada S, Adachi S, Chen S, Nagahama Y, 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 in the ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 8 (1): 53 - 61.
- Tchoudakova A, Callard GV, 1996. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* 139 (4): 2179 - 2189.
- Trant JM, 1994. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish *Ictalurus punctatus* form of cytochrome P450. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95 (2): 155 - 168.
- Valle LD, Ramina A, Belvedere P, Colombo L, 2001. Tissue distribution of cytochrome P450arom type in peripheral tissues and gonads of rainbow trout. In: Goos HJT, Rastogi RK, Vaudry H, Pierantoni P ed. *Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity*. Bologna: Monduzzi Editore, 1061 - 1067.
- Valle LD, Lunardi L, Colombo L, Belvedere P, 2002a. European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. cytochrome P450arom: cDNA encoding, expression and genomic organization. *J. Ster. Biochem. & Mol. Bio.* 80: 25 - 34.
- Valle LD, Ramina A, Vianello S, Belvedere P, Colombo L, 2002b. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P-450 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *J. Ster. Biochem. & Mol. Bio.* 82: 19 - 32.
- 吕枚, 方佩华, 何红鹏, 郑荣秀, 张志友, 杨立平, 肖茜, 2002. 以肌动蛋白为标准化参数在甲状腺乳头状癌中 c-fos 表达的研究. *天津医科大学学报* 2: 17 - 10.