

鱼类性别决定与分化相关基因研究进展

Research progress on the study of sex determination and differentiation relateds to gene of fish

文爱韵^{1,2}, 尤 锋¹, 徐永立¹, 张培军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

中图分类号: Q321.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)01-0074-07

在脊椎动物系统进化中, 鱼类处于承前启后的关键地位。与高等脊椎动物相比, 鱼类的性别决定机制具有原始性、多样性和易变性, 并具有所有脊椎动物的性别决定方式, 存在从雌雄同体到雌雄异体的各种性别类型, 性逆转在鱼类也是较为常见的现象, 因此鱼类性别决定机制研究对于整个脊椎动物类群性别决定机制的形成及进化途径的揭示有非常重要的理论价值。而且鱼类的性别发育是以遗传因素为基础, 并受到自身内分泌调节和外界环境的影响, 是三者相互作用的结果, 故其性别决定与分化没有一个普遍的模式, 给性别决定与分化带来了一定难度。但随着分子生物学技术的迅猛发展, 近20年来有关鱼类性别决定与分化机理及性别相关基因的研究已经取得了相当大的进展。作者根据现有文献资料, 对鱼类性别决定与分化相关基因的研究动态和进展作一综述, 并对目前存在的热点问题进行了探讨, 以期今后鱼类性别决定与分化相关基因深入研究提供参考。

鱼类性别决定的特点有: 性染色体组成形式多样; 在亲缘关系较近的种类中, 可能会具有完全不同的性染色体类型; 在少数具有初步异型性染色体分化的鱼类中, 个别鱼类(如青鳉和鲑鳟鱼类等)已经鉴定或定位出性别决定候选基因, 可以认为其性别是由性别决定基因所控制的。但对绝大部分鱼类来说, 性别决定基因还有待寻找与证实, 性别决定还只能从“遗传”而不是基因的角度解释。雌核发育和雄核发育可以帮助在“遗传”上确定一种鱼类的染色体性别决定类型; 一些鱼类还可发生天然性逆转。鱼类性别决定机制包括两种: 一种是由位于多条染色体上的多基因决定的多因子剂量效应所决定, 另一种是由具有差异并含有一个或少量专一性的性别基因的性染色体决定。鱼类性别分化是指未分化性腺在个体发育过程中分

化成为卵巢和精巢, 其性分化机制是以性别决定为前提, 在基因控制以及外源激素、温度、pH 和光照强度等各种环境因素的作用下完成的。

20 世纪 90 年代初在人类 Y 染色体上发现了性别决定基因 *Sry* (sex determining region on Y chromosome)^[1], 进而发现了一个新的 *Sox* 基因家族, 促进了以哺乳类为代表的动物性别决定和分化机制和级联模式的研究^[2,3]。近年来随着哺乳类相关研究的发展, 鱼类的性别决定与分化相关基因的研究也开展了起来, 鉴于此, 作者首先对哺乳类的性别决定与分化相关基因研究进展进行简要概述, 并由此进一步对鱼类性别决定与分化相关基因研究现状及存在的问题进行较为详尽的阐述。

1 哺乳类性别决定与分化相关基因研究

在哺乳类性别分化研究中, 已经发现有很多基因在性腺发育、性别决定和分化过程中发挥重要作用(表 1)^[3], 这些基因包括编码转录因子的 *Lhx9*, *Wt1*, *Sf1*, *Dax1*, *Gata4*, *Dmrt1* 和 *Sox9* 基因, 以及涉及细胞间信号传导的 *Amh(Mis)*, *Wnt4* 和 *Dhh* 基因等, 并由此构建了其性别决定和分化基因调控网络的初步模型^[2], 其中 AMH 等因子是雄性发育的关键因子, 其各自的上下游调节途径为该调控网络的中心途径, DAX1 等因子是抑制雄性发育所需的基因产物, 并确保中心途径不在雌性性腺中起作用, *Sf1* 等因子则可同时作为中心途径的正调节因子和雄性发育的抑制因子。

收稿日期: 2007-07-10; 修回日期: 2007-11-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571445); 国家 863 计划资助项目(2006AA10A404)

作者简介: 文爱韵(1984-), 女, 四川成都人, 硕士, 研究方向为海水鱼类的分子遗传学研究, E-mail: waybio@hotmail.com

表 1 哺乳类已鉴定的性别决定与分化相关基因及其功能

基因	表达	功能	参考文献
<i>Sf1</i>	雌雄	性腺的早期建立和类固醇合成基因的调节	[4~6]
<i>Wt1</i>	雌雄	性腺和肾脏早期建立,可能调节 <i>Sry</i> 的表达	[7, 8]
<i>Lim1</i>	雌雄	性腺的早期建立	[9]
<i>Emx2</i>	雌雄	性腺的早期建立	[10]
<i>Lhx9</i>	雌雄	性腺的早期建立	[11]
<i>Sox9</i>	雄	Sertoli 细胞的分化,精巢发育的启动	[12, 13]
<i>Mis(Amh)</i>	雄	Mullerian 管的抑制	[14~18]
<i>Dhh</i>	雄	Sertoli-myoid 和 Sertoli-leydig 相互作用的调节,雄性精细胞的发育	[19, 20]
<i>Fgf9</i>	雄	雄性性腺的增殖	[21]
<i>M33</i>	未知	精巢发育	[22]
<i>Dmrt1</i>	雄	出生后输精管的维持	[23~25]
<i>Dax1</i>	雌	雌性性腺的发育	[26, 27]
<i>Wnt4</i>	雌	抑制 Leydig 细胞在雌性性腺中的分化	[28]
<i>Gata4</i>	雌雄	性腺的早期建立	[2]
<i>Bmp8b</i>	雄	不清楚	[2]

哺乳类中, *Dmrt1* 基因在性腺发育早期阶段的雄性和雌性性腺中表达,后期变为在精巢中特异表达,在出生后有维持输精管正常生理状态的作用。孤独核受体家族成员剂量敏感性别逆转相关的 X 染色体区域 1 (*Dax1*) 基因^[3, 29]和 *Wnt4* 基因仅在雌性性腺中表达。*Wnt4* 基因的作用是抑制卵巢中 Leydig 细胞的分化, *Dax1* 基因则在卵巢发育过程中发挥作用^[2, 31]。高浓度的 *Wnt4* 蛋白使 β -链状蛋白磷酸化作用被抑制,从而使其稳定地进入细胞核,在与淋巴增强结合因子 (LEF 或称 T 细胞特异因子, TCF) 和低浓度的 Sf1 蛋白 (类固醇形成因子 1, 是类固醇合成基因的调节因子, 对于性腺的早期建立有重要作用) 的共同作用下, 激活表达 *Dax1* 蛋白, 进而与 Sf1 蛋白结合, 并招募其它抑制因子, 共同作用抑制 Sf1 蛋白调节的性腺发育和性激素合成所需基因 (如细胞色素 P450 基因家族的 *Cyp17*, *Cyp19*, *Cyp21*, *Cyp11a1*, *Amh*, *Dhh* 和 3- β -羟基类固醇脱氢酶基因 *Hsd*) 的表达^[30, 31], 其中, *Dhh* 基因产物是 Sertoli-肌样细胞间, Sertoli-Leydig 细胞间相互作用的调节因子, 并对雄性精细胞的发育有重要作用。*Sf1* 和 *Dax1* 基因有确保生精小管肌样细胞和 Leydig 细胞正常分化的作用。雄性胎儿中, *Amh* 在雄性性腺的 Sertoli 细胞中表达, 对雌性生殖管原基

缪勒管有抑制作用, 并可抑制芳香化酶基因 *P450arom* mRNA 的转录, 在精巢分化中有重要作用。*Amh* 于精巢分化起始时开始在精巢的 Sertoli 细胞中表达, 并持续到缪勒管被抑制以后; 于出生后开始在前滤泡细胞的粒层细胞中表达, 并在生殖期一直保持低水平表达^[2, 31]。

对于哺乳类性别决定与分化相关基因及分子机制已研究得较为清楚, *Sry* 作为雄性性别决定的主效基因, 其表达产物将启动下游一系列雄性性别相关基因如 *Sox9*, *Dmrt1* 和 *Amh* 等的表达, 促使在 *Sf1*, *Wt1* 和 *Gata4* 基因作用下由中胚层发育而来的具双向分化潜能的生殖嵴分化为雄性性腺, 而在缺乏 *Sry* 基因时, 则在双倍 *Dax1* 基因作用下发育成为雌性性腺。

2 鱼类性别决定与分化相关基因研究

由于鱼类在脊椎动物中的特殊进化地位, 其性别决定研究一直受到重视, 随着分子生物学技术的发展, 有关鱼类性别决定机理及性别相关基因的研究已经取得了初步进展^[29], 但主要集中在淡水鱼类青鳉、斑马鱼和罗非鱼中, 海水鱼类则研究较少, 研究的基因主要有芳香化酶基因、*Sox9*、*Dmrt1* 基因, 另外, *Dax1*, *Wt1*, *Foxl2*, *Sf1*, *Amh* 和 *Tra2* 基因也有零星报道。

2.1 芳香化酶基因 (*P450arom* 或 *Cyp19*)

下丘脑、脑垂体和性腺通过相互调节,促进和制约着鱼类生殖细胞的发生、性别分化和性腺发育成熟及其繁殖活动,下丘脑产生促性腺激素释放激素(GnRH)可刺激脑垂体分泌促性腺激素(GtH)作用于性腺,促使性腺组织产生类固醇激素直接作用于生殖细胞,引起生殖细胞发育成熟和排卵,同时,类固醇激素也会反馈抑制 GnRH 和 GtH 的分泌。在类固醇激素的代谢过程中,需要多种酶参与催化,其中一种酶称为芳香化酶(aromatase),在其中起着关键的作用,能够催化某些雄激素(如睾酮和雄烯二酮)转化为雌激素^[32]。卵巢芳香化酶 *P450aromA* 存在于卵泡的颗粒细胞中,垂体分泌的促卵泡激素(FSH)与颗粒细胞的受体结合,刺激颗粒细胞增长,并促进颗粒细胞合成芳香化酶,垂体分泌的黄体生成素(LH)能与内膜细胞结合,促进内膜细胞将乙酸和胆固醇合成雄烯二酮,雄烯二酮经扩散作用进入颗粒细胞,在颗粒细胞内被芳香化成雌激素,雌激素分泌到卵泡液和血液中,促进卵泡发育^[33-35]。*P450aromA* 能促使肝脏合成卵黄蛋白原,加速卵子发育早中期物质能量的积累,保证了卵母细胞的卵黄生成和积累,使得卵子的发育能够正常地进行,其活性对鱼类卵母细胞的发育有重要作用,但过高的活性对卵子发育后期则有抑制作用^[32]。精巢的发育和分化是在垂体分泌的 LH 和 FSH 调控下,通过 Sertoli 细胞、Leydig 细胞和生殖细胞的相互作用完成的。雄鱼血清中较低的雌激素主要是由于脑芳香化酶 *P450aromB* 将循环中的雄激素芳香化,参与某些神经内分泌活动,但在虹鳟、斑点鲷和大西洋鲑的精巢中检测到很高的 *P450arom* mRNA 表达,可能 *P450arom* 在雄鱼中也具有重要的生理作用。鱼类体内芳香化酶的活性不仅与雌激素的生成量有关,而且也会影响促性腺激素的分泌,虹鳟体内促性腺激素的含量随芳香化酶活性的提高而增加。

2.2 *Sox9* 和 *Dmrt1* 基因

控制发育的基因家族 *Sox* 和 *Dmrt* 一方面参与了许多组织、器官的形成及相关功能的维持,另一方面对性别决定又有重要的作用, *Sox* (*Sry*-related box) 基因家族编码含有可结合 DNA 的高迁移率基团 HMG 的转录因子,而 *Dmrt* 基因家族则编码锌指样的结合 DNA 的基序 DM-domain 的转录因子。在非哺乳类脊椎动物,由 *Sox9* 和 *Dmrt1* 基因等决定性别的分化发育。对鱼类进行性别决定与分化分子机制研究时,也很早就有很多研究者从这两个基因入手。

Sox 基因家族成员在进化上一般都十分保守,在雌、雄基因组中均存在,但作为其代表的 *Sry* 基因却有着明显区别,其不同物种间有较大差异,并非在雌、雄基因组中均存在^[36]。在脊椎动物中已报道的 40 多个 *Sox* 基因中, *Sox9* 已被证实是参与性别决定的基因。根据其它脊椎动物中报道的 *Sox* 基因序列设计兼并引物,已在虹鳟^[37]、青鳉^[38]、泥鳅和大鳞副泥鳅^[39,40] 中克隆和研究了鱼类 *Sox* 同源基因。在两种泥鳅 *Sox8* 和 *Sox9* 基因的保守性分析中,未发现性别特异性的杂交带。这两种基因被初步定位在大鳞副泥鳅的 2 个端部着丝粒染色体上。Northern 杂交分析表明 *Sox9* 在大鳞副泥鳅精巢中高表达,表明该基因与精巢形成和分化有关。Liu 等从鳊鲮中克隆到了 *Sox9*。Yokoi 等也从青鳉中分离出 *Sox9*, Northern 杂交和原位杂交分析发现其主要在成鱼的卵巢中表达,而在睾丸中的表达用 RT-PCR 的方法才能检测到,说明在青鳉的性腺发育中, *Sox9* 有着与其它脊椎动物的不同作用^[41]。在鲈鱼中已经克隆出 12 种 *Sox* 基因,分别属于 *Sox* 基因家族中的 *SoxB*, *SoxC*, *SoxE* 和 *SoxF* 亚型。以 *Sox* 同源盒设计探针,在雌雄罗非鱼中进行 PCR 扩增,结果发现两者都有扩增带,且无差异,说明此序列在进化中较保守,但在其性别决定中的作用还不能明确。在斑马鱼、泥鳅、黄鳝等的雌雄鱼中也都扩增得到了无差异的 *Sox* 同源片段。

Dmrt 基因家族已在青鳉、斑马鱼、大马哈鱼、斑剑尾鱼、罗非鱼、虹鳟、黑鲷、黄膳、河豚和新月鱼等多种鱼类中发现^[42-44],其成员的组织发育时期表达特异性在一些鱼类中也有报道^[45,46],但有关调节其表达的调控因子、机制以及其下游受其直接调控的基因还很少有报道, *Dmrt1*, *Dmrt2* 和 *Dmrt3* 位于一个连锁群上,而 *Dmrt4* 位于另一个连锁群上^[47]。鱼类中,这一基因家族的功能是变化很大的。在青鳉中, *Dmrt1* 基因有两个拷贝,一个位于常染色体上与 *Dmrt2*, *Dmrt3* 连锁,命名为 *Dmrt1a*,另一个位于 Y 染色体上命名为 *Dmrt1bY* 即 *Dmy*。 *Dmy* 基因是青鳉中调控雄性发育的主要基因^[42],在其胚胎发育、幼鱼及成鱼阶段都表现为雄性特异性表达。在其它鱼类中尚没有发现 *Dmy* 的存在,但在很多鱼类中都克隆到了位于常染色体上的 *Dmrt1* 基因^[43,44],并发现与雄性性别分化有关。 *Dmrt4* 在罗非鱼中被描述为卵巢特异性的基因 *Dmo*,而青鳉中其在精巢和许多其它组织中也表达。该基因家族的表达谱在鱼的不同发育时期不尽相同,并有明显的组织特异性,与性别分化有着一定的联系。 *Dmrt1a* (或 *Dmrt1*) 在受精之后孵化出膜进入幼鱼阶段之前的胚胎发育时期

没有表达,在幼鱼正在分化的性腺和成鱼精巢中强表达,而在成鱼卵巢中表达较弱。*Dmrt2* 在受精之后胚胎发育时期的体节中胚层中表达,在幼鱼正在分化的性腺和成鱼精巢中强表达,而在成鱼卵巢中表达较弱。*Dmrt3* 的表达存在瞬时模式,在胚胎发育时期某一阶段的正在发育的神经管、后脑及脊索中表达,在幼鱼正在分化的性腺和成鱼精巢中强表达,而在成鱼卵巢中没有表达。*Dmrt4* 在胚胎发育早期的嗅基板及神经外胚层起源的端脑,胚胎发育后期的鼻凹中表达,在胚胎发育时期的耳基板中也有弱表达,在幼鱼正在分化的性腺和成鱼精巢中强表达,而在成鱼卵巢中没有表达^[48]。*Dmrt1* 或青鲷特有性别决定基因 *Dmy* 编码产物可能直接或通过 Sf1 间接结合到 *Cyp19a* 基因的启动子,下调 *Cyp19a* 基因的表达^[49]。

2.3 *Dax1*, *Wt1*, *Foxl2* 和 *Sf1* 基因

Dax1, *Wt1*, *Foxl2* 和 *Sf1* 四种基因在鱼类中发现都与芳香化酶基因的表达有关,参与了其转录调控。在青鲷成鱼卵巢中,*Dax1* mRNA 只在后卵黄囊检测到,而未在前卵黄囊和卵黄囊检测到,在成鱼精巢中未检测到 *Dax1* mRNA,相反,*Foxl2*, *Sf1*, 细胞色素基因 *P450c17* 和芳香化酶基因 *P450arom* 同时在卵黄囊中表达,而未在后卵黄囊中表达,*Dax1* 蛋白能够抑制和下调 Sf1 和 Foxl2 蛋白介导的 *P450arom* 在青鲷卵黄囊中的表达,另一方面,*Dax1* mRNA 没有在性别分化早期的雄鱼和雌鱼中检测到^[50]。在罗非鱼中,*Wt1*, *Sf1* 和 *Foxl2* 基因也都对芳香化酶基因 *Cyp19a* 基因的转录具有调控作用^[51]。由于鱼类特有的基因组复制,其具有两个 *Wt1* 拷贝 (*Wt1a* 和 *Wt1b*),它们都有多种不同的选择性剪接产物,且从胚胎期开始就在肾脏和性腺中表达(在孵后 3 d 的雌雄性腺表达,5 d 达到峰值,且表现出明显的性别差异)。*Wt1* 蛋白可能直接调节或通过不同类型、甚至不同的剪切形式在雌雄性腺中分别调节 *Foxl2* 和 *Dmrt1* 的表达间接调节 *Cyp19a* 基因的表达和雌激素的生成。Sf1 蛋白是 *Cyp19a* 基因转录的重要激活因子,Foxl2 蛋白的可能直接或通过 Sf1 蛋白间接结合到 *Cyp19a* 基因的启动子,上调 *Cyp19a* 基因的表达。Foxl2 蛋白既能直接与 *Cyp19a* 启动子结合,又能与 Sf1 蛋白发生直接相互作用^[52],增强 Sf1 蛋白激活的 *Cyp19a* 基因转录^[51,53]。

2.4 *Tra2* 和 *Amh* 基因

在鱼类中,除了上述几种研究报道较清楚性别相关基因外,还有两种基因与性别分化的关系正

在研究之中。Shiraishi 等在青鲷中发现了 *Tra2* (果蝇性别决定中的重要调控因子)的同源物 *Tra2a* 和 *Tra2b* 基因,他们同时在性别分化以前的两性生殖细胞中表达,是否与青鲷的性别分化有关还有待于进一步研究^[54]。抗缪勒管激素基因 (*Amh*) 也称缪勒管抑制物基因 (*MIS*),编码一种属于转移生长因子 (TGF-)超家族的糖蛋白,其在不具有缪勒管的鱼类的性别分化中的作用研究的还不多。

3 鲟、鳊鱼性别决定与分化相关基因研究

鲟、鳊鱼雌雄两性差别很大,研究其性别决定与分化的机制,确定性别决定与分化相关的基因,并以此为基础,对其实施性别控制,具有重要的理论和实践意义。更进一步,在实际生产中,养殖单性群体,获得大规模商品鱼,在同等养殖条件下,能大大提高单位面积的产量,创造可观的经济价值。

对于鲟、鳊鱼性别决定与分化机制和相关基因的研究还很少,现已有报道克隆出牙鲟 *P450arom* 基因全长,并发现在性别分化前的两性性腺中 *P450arom* mRNA 水平没有差异,而性别分化开始后,其 mRNA 水平在雌性中迅速升高,在雄性中则略有下降,*P450arom* mRNA 在卵巢和脾中强表达,在精巢和脑中弱表达,表明 *P450arom* 基因的表达与雌性性别分化相关^[55]。另外,有报道在牙鲟精巢中可以检测到 *Amh* mRNA,而在其卵巢、脑、心脏、肝脏和脾脏中都没检测到^[56]。最近在牙鲟中已克隆到 *Foxl2*, *Fshr* 和 *Lhr* 基因的 cDNA 序列,并进行了表达和功能分析,结果表明 FSH 信号途径(包括 cAMP 类似物和 FSHR)可激活 *Cyp19a1* 的表达,FOXL2 蛋白可能直接或通过与 SF1 蛋白相互作用间接激活 *Cyp19a1* 的表达^[57]。

4 问题与展望

近年来,新的研究思路以及新的分子细胞生物学和分子遗传学研究方法不断成熟,对鱼类性别决定的分子基础研究将会有很大促进作用。下列一些方面的问题需要今后研究得以关注:对有性染色体分化的鱼类,重点研究对象将是 Y 染色体上性别决定基因(如 *Dmy*)的调控与功能研究;ZW/ZZ 型性别决定基因的研究也应予以重视;而对更多种没有性染色体分化的鱼类,要开发和利用灵敏的方法扫描基因组,筛选 DNA 片段,克隆性别相关基因,获得性别特异性的探针,研究这类鱼类性别决定在分子水平上的模式并进行性别遗传鉴定,运用定量 RT-PCR、SSH (suppression subtractive hybridiza-

tion)等方法开展性别分化前后基因差异表达(differential display)的研究。DNA array 和 SA GE(serial analysis of gene expression)等高通量筛选方法今后也有可能逐步应用于鱼类性别决定的分子遗传研究^[36], 这为挖掘性别决定与分化相关的新基因奠定了基础。

Sox 基因家族成员 *Sry* 基因在哺乳类中与性别决定密切相关, 但 *Sry* 基因在鱼类中还没有克隆到, 仅发现该家族中的 *Sox9* 基因可能与鱼类性别决定与分化相关, 其在鱼类性别决定中的功能以及与鱼类其它性别决定后选基因的相互作用还需进一步实验研究证实。

芳香化酶作用及基因表达的研究显示, *P450* 芳香化酶基因显然是影响性腺分化的较直接因素, 研究该基因表达的调控应该是鱼类性别决定分子机制的重要部分。有关鱼类性别基因的研究中, 除了芳香化酶的作用比较明确外, 其他尚不清楚, 或者对某些鱼有作用, 而对另一些鱼则没有作用。在鱼类性别决定研究中, 选择、培养雌核发育、雄核发育个体, 收集定向发育的雌雄鱼, 比较其性别分化过程中的差异基因, 应是可行的。随着育种技术、分子生物学技术的发展、完善, 鱼类性别决定的分子机制一定能得到阐明^[58]。

鱼类性别决定除受基因控制外, 温度、外源性激素等环境因素也能起到一定作用。从牙鲆的研究结果来看, 温度可能是通过影响芳香化酶基因的表达而对性别分化起作用, 但除了温度外, 其它环境因子对鱼类性别决定和分化的影响还尚无人涉足, 如外源性激素在鱼类性别控制中应用较多, 但有关其分子机制研究几乎还是空白, 因此有必要加强。

总之, 随着研究的不断深入, 可以预期鱼类性别决定和分化相关的分子机制将得到阐明, 相关基因和蛋白及其相互作用的分子调控网络模型也将建立, 这些将为鱼类性别控制和遗传操作提供理论依据。

参考文献:

[1] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. **Nature**, 1990, 346: 240-245.

[2] Lovell-Badge R, Canning C, Sekido R. Sex-determining genes in mice: building pathways[A]. Chadwick D, Goode J. The Genetics and Biology of Sex Determination: Novartis Foundation Symposium(244)[C]. Chichester: Wiley, 2002. 4-22.

[3] Tilmann C, Capel B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination [J]. **Recent**

Prog Horm Res, 2002, 57: 1-18.

[4] Luo X, Ikeda Y, Parker K L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation[J]. **Cell**, 1994, 77(4): 481-490.

[5] Ikeda Y, Shen W H, Ingraham H A, et al. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases[J]. **Mol Endocrinol**, 1994, 8(5): 654-662.

[6] Ikeda Y, Swain A, Weber T J, et al. Steroidogenic factor 1 and *Dax-1* colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development[J]. **Mol Endocrinol**, 1996, 10(10): 1 261-1 272.

[7] Rackley R R, Flenniken A M, Kuriyan N P, et al. Expression of the Wilms tumor suppressor gene *WT1* during mouse embryogenesis [J]. **Cell Growth Differ**, 1993, 4(12): 1 023-1 031.

[8] Kreidberg J A, Natoli T A, McGinnis L, et al. Coordinate action of *Wt1* and a modifier gene supports embryonic survival in the oviduct [J]. **Mol Reprod Dev**, 1999, 52(4): 366-375.

[9] Shawlot W, Behringer R R. Requirement for *Lim1* in head-organizer function[J]. **Nature**, 1995, 374(6 521): 425-430.

[10] Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, et al. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2* [J]. **Development**, 1997, 124(9): 1 653-1 664.

[11] Birk O S, Casiano D E, Wassif C A, et al. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation[J]. **Nature**, 2000, 403(6 772): 909-913.

[12] Cameron F J, Hageman R M, Cooke-Yarborough C, et al. A novel germ line mutation in *sox9* causes familial campomelic dysplasia and sex reversal [J]. **Hum Mol Genet**, 1996, 5(10): 1 625-1 630.

[13] Kent J, Wheatley S C, Andrews J E, et al. A male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination [J]. **Development**, 1996, 122(9): 2 813-2 822.

[14] Josso N, Picard J Y. Anti-Mullerian hormone[J]. **Physiol Rev**, 1986, 66(4): 1 038-1 090.

[15] Donahoe P K, Cate R L, MacLaughlin D T, et al. Mullerian inhibiting substance: gene structure and mechanism of action of a fetal regressor [J]. **Recent Prog Horm Res**, 1987, 43: 431-467.

[16] Behringer R R, Cate R L, Froelick G J, et al. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance[J]. **Nature**, 1990, 345(6 271): 167-170.

[17] Behringer R R, Finegold M J, Cate R L. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development[J]. **Cell**, 1994, 79(3): 415-425.

[18] Munsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse

- anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation[J]. **Development**, 1991, **113**(2): 613-624.
- [19] Bitgood M J, Shen L, McMahon A P. Sertoli cell signaling by desert hedgehog regulates the male germline[J]. **Curr Biol**, 1996, **6**(3): 298-304.
- [20] Clark A M, Garland K K, Russell L D. Desert hedgehog (*Dhh*) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules[J]. **Biol Reprod**, 2000, **63**(6): 1 825-1 838.
- [21] Colvin J S, Green R P, Schmahl J, et al. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9[J]. **Cell**, 2001, **104**(6): 875-889.
- [22] Katoh R, Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, et al. Male-to-female sex reversal in *M33* mutant mice [J]. **Nature**, 1998, **393**(6 686): 688-692.
- [23] Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes[J]. **Nature**, 1998, **391**(6 668): 691-695.
- [24] Raymond C S, Kettlewell J R, Hirsch B, et al. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development[J]. **Dev Biol**, 1999, **215**(2): 208-220.
- [25] Raymond C S, Murphy M W, O'Sullivan M G, et al. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation [J]. **Genes Dev**, 2000, **14**(20): 2 587-2 595.
- [26] Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, et al. *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination[J]. **Nature**, 1998, **391**(6 669): 761-767.
- [27] Yu R N, Ito M, Saunders T L, et al. Role of *Ahch* in gonadal development and gametogenesis[J]. **Nat Genet**, 1998, **20**(4): 353-357.
- [28] Vainio S J, Itaranta P V, Perasaari J P, et al. *Wnts* as kidney tubule inducing factors[J]. **Int J Dev Biol**, 1999, **43**(5): 419-423.
- [29] 李静, 陈松林, 温海深. 鱼类性别相关基因及性别特异标记的研究进展[J]. 海洋水产研究, 2006, **27**(4): 90-95.
- [30] Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, et al. *Dax-1* (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad[J]. **Mol Endocrinol**, 2003, **17**(4): 507-519.
- [31] Park S Y, Meeks J J, Raverot G, et al. Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development [J]. **Development**, 2005, **132**(10): 2 415-2 423.
- [32] 洪万树, 方永强. 鱼类芳香化酶活性研究的进展[J]. 水产学报, 2000, **24**(3): 285-288.
- [33] Trant J M, Gavasso S, Ackers J, et al. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*CYP19a* and *CYP19b*) in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. **J Exp Zool**, 2001, **290**(5): 475-483.
- [34] 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.
- [35] Tong S I C, Chiang E F, Hsiao P H, et al. Expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes[J]. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 2001, **79**(1-5): 299-303.
- [36] 童金苟, 朱嘉濠, 关海山. 鱼类性别决定的遗传基础研究概况[J]. 水产学报, 2003, **27**(20): 169-176.
- [37] Ito M, Ishikawa M, Suzuki S. A rainbow trout *SRF*-type gene expressed in pituitary glands [J]. **FEBS Lett**, 1995, **377**: 37-40.
- [38] Fukada S, Tanaka M, Lwaya M. The *Sox* gene family and its expression during embryogenesis in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*) [J]. **Dev Growth Differ**, 1995, **37**: 379-385.
- [39] Zhou R, Cheng H, Zhang Q, et al. *SRF*-related genes in the genome of the rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. **Genet Sel Evol**, 2002, **34**: 129-137.
- [40] Zhou R, Liu L, Guo Y, et al. Similar gene structure of two *Sox9a* genes and their expression patterns during gonadal differentiation in a teleost fish, rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. **Mol Reprod Dev**, 2003, **66**(3): 211-217.
- [41] Yokoi H, Kobayashi T, Tanaka M, et al. *Sox9* in a teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*): Evidence for diversified function of *Sox9* in gonad differentiation [J]. **Mol Reprod Dev**, 2002, **63**(1): 5-16.
- [42] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. **Nature**, 2002, **417**: 559-563.
- [43] Guan G, Kobayashi T, Nagahama Y. Sexually dimorphic expression of types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2000, **272**: 662-666.
- [44] Kondo M, Froschauer A, Kitano A, et al. Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. **Gene**, 2002, **295**: 213-222.
- [45] Marchand O, Goroum M, D'Cotta H, et al. *DMRT1* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. **Biochim et Biophys Acta**, 2000, **1493**(1-2): 180-187.

- [46] Guo Y, Cheng H, Huang X, *et al.* Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1* [J]. **Biochem Biophys Res Co**, 2005, 330: 950-957.
- [47] Volff J N, Zarkower D, Bardwell V J, *et al.* Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans [J]. **J Mol Evol**, 2003, 57(1): 241-249.
- [48] Winkler C, Hornung U, Kondoa M, *et al.* Developmentally regulated and non sex-specific expression of autosomal *dmrt* genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*) [J]. **Mech Develop**, 2004, 121: 997-1005.
- [49] 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* [EB/OL]. <http://www.bioreprod.org/cgi/rapidpdf/bioreprod.107.064246v1,2007-10-17>.
- [50] Nakamoto M, Wang D S, Suzuki A, *et al.* Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles [J]. **Mol Reprod Dev**, 2007, 74(10): 1239-1246.
- [51] Nakamoto M, Matsuda M, Wang DS, *et al.* Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. **Biochem Biophys Res Co**, 2006, 344(1): 353-361.
- [52] Wang D S, Kobayashi T, Zhou L Y, *et al.* Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 [J]. **Mol Endocrinol**, 2007, 21(3): 712-725.
- [53] Pannetier M, Fabre S, Batista F, *et al.* FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development [J]. **J Mol Endocrinol**, 2006, 36: 399-413.
- [54] Shiraishi E, Imazato H, Yamamoto T, *et al.* Identification of two teleost homologs of the Drosophila sex determination factor, transformer-2 in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. **Mech Develop**, 2004, 121: 991-996.
- [55] Luckenbach J A, Early L W, Rowe A H, *et al.* Aromatase cytochrome P450: cloning, intron variation, and ontogeny of gene expression in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) [J]. **J Exp Zool Part A**, 2005, 303(8): 643-656.
- [56] Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, *et al.* Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. **Biochem Biophys Res Co**, 2004, 322: 508-513.
- [57] Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, *et al.* Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. **Biochem Biophys Res Co**, 2007, 359(4): 935-940.
- [58] 戈贤平, 夏德全, 俞菊华. 鱼类性别决定的研究进展 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(4): 371-374.

(本文编辑:刘珊珊)