

许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)卵子发生及妊娠过程中雌激素、芳香化酶及其受体的变化规律*

徐小杰^{1, 2, 3, 4} 王学颖^{1, 2, 3} 周莉^{1, 2, 3, 4} 刘清华^{1, 2, 3①} 李军^{1, 2, 3①}

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071; 2. 中国科学院海洋大科学研究中心 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室 青岛 266237; 4. 中国科学院大学 北京 100049)

摘要 雌二醇是鱼类卵巢分泌的主要的性类固醇激素之一, 在脊椎动物卵子发生、性别分化、卵黄形成、生理免疫以及中枢神经系统调节等生理过程中发挥重要的作用。许氏平鲷营胎生繁殖, 且经过漫长的卵黄积累期和妊娠期, 这一特殊的生殖方式使得它受到了国内外学者的广泛关注。通过分析雌二醇合成及作用密切相关的 *cyp19a* 和 *Era* 在许氏平鲷卵巢上的定位、*cyp19a* 和 *cyp19b* mRNA 在不同卵巢发育时期及不同组织中的表达以及不同发育期的卵巢中雌二醇含量变化, 发现在卵巢发育的过程中, 许氏平鲷体内雌二醇含量的峰值出现在 IV 期和体节期。并且 *cyp19a* 和 *cyp19b* 在卵巢中均有表达且在不同的卵巢发育期表达量不同。在卵黄积累的过程中, *cyp19a* 和 *cyp19b* 在 IV 期的表达量最高, 在妊娠时体节期表达量最高。不仅如此, 在 V 期卵巢的滤泡层、基质和囊胚期的滤泡胎盘中检测到了强烈的 *Era* 的信号。这些结果说明雌二醇在胎生鱼类卵子发生及妊娠过程中均起到非常重要作用。这一研究为深入解析许氏平鲷胎生生殖特性积累了资料。

关键词 许氏平鲷; 滤泡胎盘; 雌激素; 雌激素受体; 芳香化酶

中图分类号 Q492; S917 **doi:** 10.11693/hyhz20210200054

雌二醇是鱼类卵巢分泌的主要的性类固醇激素之一, 在脊椎动物卵子发生、性别分化、卵黄形成、生理免疫以及中枢神经系统调节等生理过程中发挥重要的作用(Lubzens *et al*, 2010; McCarthy, 2010; Eick *et al*, 2011)。雌二醇的合成需要膜细胞层和颗粒层共同完成。首先胆固醇进入到膜细胞层, 胆固醇被 CYP11A1 酶催化后, 孕烯醇酮和孕酮进行 17 α -羟基化, 再分别通过 C21、17-羟基途径先后得 17 α -羟基孕酮和雄烯二酮。然后雄烯二酮被转化为雄激素被转运到颗粒层中, 在芳香化酶(P450arom)的作用下被转化成雌二醇(Miller *et al*, 1997; Kagawa, 2013)。

芳香化酶由 *cyp19* 基因编码, 属于细胞色素 P450

家族, 是催化雄激素向雌激素转化的一种关键酶。在硬骨鱼中, 芳香化酶基因存在两种亚型: P450arom A 和 450arom B, 分别主要表达于性腺和脑中, 被称为性腺芳香化酶和脑芳香化酶(Tchoudakova *et al*, 1998)。雌激素需要与分布在细胞膜和细胞核内的雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合才能发挥作用(Woods *et al*, 2009)。在目前的硬骨鱼类的研究中, 人们已经证实, 雌激素与雌激素受体结合可以起到促进卵黄蛋白原产生的作用, 从而维持卵母细胞的正常发育(Flouriot *et al*, 1996; Sabo-Attwood *et al*, 2004; Nelson *et al*, 2010)。并且在对大黄鱼的研究中, Chen 等(2015)推测 ER α 和 ER β 1 可能参与卵巢发育和排卵等过程。

* 国家重点研发计划, 2018YFD090125 号, 2018YFD090124 号; 山东省重点基金, ZR2020KC038 号; 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助, CARS-47 号; 山东省农业重大应用技术创新项目, SD2019YY011 号; 山东省重大科技创新计划, 2019JZZY020710 号; 国家海洋水产种质资源库项目资助。徐小杰, 硕士研究生, E-mail: xxj6978@163.com

通信作者: 李军, 研究员, E-mail: junli@qdio.ac.cn; 刘清华, 研究员, E-mail: qinghualiu@qdio.ac.cn

收稿日期: 2021-02-23, 收修改稿日期: 2021-04-08

许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) 隶属于鲷形目 (Scorpaeniformes)、鲷科 (Scorpaenidae)、平鲷属 (*Sebastes*), 是一种重要的海洋经济鱼种, 广泛分布于中国、日本和韩国海域。许氏平鲷营胎生繁殖, 且经过漫长的卵黄积累期和妊娠期, 这一特殊的生殖方式使得它受到了国内外学者的广泛关注。Mori 等(2003)、Shi 等(2011)、Kwon 等(2013)对许氏平鲷卵巢发育过程中雌二醇的含量变化进行过一定的研究, 但是他们对于处于妊娠期的许氏平鲷的研究较少。本文选取了 II、III 至孵化前共 7 个发育期, 通过分析 *cyp19a* 和 *Era* 在许氏平鲷卵巢上的定位、*cyp19a* 和 *cyp19b* mRNA 在不同卵巢发育时期及不同组织中的表达以及不同发育期的卵巢中雌二醇含量变化, 分析许氏平鲷卵巢发育、卵黄积累及其妊娠过程中从卵巢组织结构变化、雌激素水平, 芳香化酶及雌激素受体的表达规律, 为深入解析许氏平鲷胎生生殖特性积累资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用许氏平鲷(*Sebastes schlegelii*)来自青岛南山市场, 从 9 月到次年 5 月每月购买; 所用大菱鲆从威海圣航水产科技有限公司获得, 从 3 月到 7 月每月采集。取样之前, 使用麻醉剂(MS-222, Sigma, St. Louis, MO)将所有鱼麻醉, 然后收集每条鱼的脑、心脏、鳃、肾脏、肝脏、脾脏、肠道以及二分之一的卵巢等组织保存在液氮中用于后续的分 子实验。四分之一的卵巢组织在 Bouin's 液中固定 24 h, 然后置换到 70%的酒精中保存用于后续的组织学观察; 另外四分之一的卵巢组织在多聚甲醛中固定 24 h, 然后置换到 70%的酒精中保存用于后续的原位杂交实验。除此之外, 从静脉中抽取血液样品到抗凝管中, 4 °C 保存

24 h 后 16 000 g 离心 10 min, 将上清液保存在-80 °C 用于后续的激素测定。

1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

将保存在液氮中组织样品取出, 使用 SPARK easy tissue/cell RNArapid extraction kit (SparkJade, China)试剂盒并参考其说明书进行 RNA 的提取。提取后进行 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 并在 260 nm 和 280 nm 的紫外光谱下测定浓度, 然后使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, Japan)进行反转录, 使终浓度统一为 1 000 ng/μL。然后稀释至 100 ng/μL, 置于-20 °C 中保存备用。

1.3 组织学

固定好的卵巢样品经过梯度酒精脱水(70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%)、复水环节被包埋到石蜡中。修整蜡块后, 用 Leica 2235 切片机进行连续切片, 切片厚度为 5 μm。然后进行苏木精-伊红(H.E)染色, 染好色的切片置于 NikonENi (Japan)下观察处于不同发育期的卵巢的组织形态, 文章中卵母细胞的卵子发育过程参考史丹等(2011)和 Grier 等(2009)的研究分为五个时期。

1.4 原位杂交

Era 和 *cyp19a* 的 cDNA 序列从本实验室的转录组数据中获得。第一轮 PCR 扩增以稀释后的浓度为 100 ng/μL 卵巢组织的 cDNA 作为模板, 上下游分别使用 F 和 R 引物(*Era*-F/R, *cyp19a*-F/R)。第二轮扩增以第一轮扩增的产物为模板, 上下游分别使用 F 和 R-T7 引物(*Era*-F/ISH-RT7, *cyp19a*-F/ISH-RT7), 得到的产物进行纯化后, 用 DIG RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim, Germany)合成探针, 进行原位杂交实验。表 1 中列出了合成探针过程中所用的引物。

表 1 引物名称及序列

Tab.1 The names of the primers and the sequences

引物名称	引物序列(5'—3')
<i>Era</i> -F	CCAGGCTTGCCGTCTTAG
<i>Era</i> -R	ATGGTGACCTCGGTGTAG
<i>Era</i> -ISH-RT7	TAATACGACTCACTATAGGG ATGGTGACCTCGGTGTAG
<i>cyp19a</i> -F	TTCACCATGCGTAAAGCCCT
<i>cyp19a</i> -R	GGCTGCTGAGAGAGGTTGTT
<i>cyp19a</i> -ISH-T7R	TAATACGACTCACTATAGGGGGCTGCTGAGAGAGGTTGTT
<i>cyp19b</i> -F	ACCGCCGTTCTGCTTCTACT
<i>cyp19b</i> -R	TCCTTTTCGTTGAGCGGCAC
18S-F	CCTGAGAAACGGCTACCACAT
18S-R	CCAATTACAGGGCCTCGAAAG

1.5 半定量(RT-PCR)

以采集到的体节期的脑、心脏、鳃、肾脏、肝脏、脾脏、肠道和卵巢以及整个发育期的卵巢样品分别作为模板, 针对两个基因设计不同的引物(*cyp19a*-F/R, *cyp19b*-F/R), 并选用 18S 作为内参照进行一同进行 PCR 扩增, 所用引物同样列在表 1 中。PCR 扩增体系为: 模板 cDNA 0.5 μ L、KOD ONE 酶 12.5 μ L、上下游引物各 0.75 μ L、无菌水 10.5 μ L。反应程序: 98 $^{\circ}$ C 反应 10 s, 68 $^{\circ}$ C 反应 10 s, 35 循环。

1.6 激素测定

将采集的血清样品从-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出, 按照 Iodine [125I] Radioimmunoassay (RIA) kits (Beijing, China) 的说明书对许氏平鲈雌激素的含量进行测定。该方法与雌激素的结合率高, 对其他甾体的交叉反应性低, 对大多数循环甾体的交叉反应性小于 0.1%。

1.7 数据统计与分析

使用 Spss22.0 中的 Duncan's 法对实验数据进行处理和分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 许氏平鲈卵巢在整个发育期的形态变化

见图 1。许氏平鲈的卵巢中含有丰富的间质细胞, 当卵巢发育至 II 期的时候, 卵巢内以 2 时初级相卵母细胞为主。2 时相初级卵母细胞体积较小且形状不规则,

呈多边形, 胞质呈强嗜碱性, 核质均匀且着色较浅。此时的卵母细胞没有发育出清晰的滤泡层结构, 细胞外仅有一层滤泡细胞结构。一般在 11 月的时候, 许氏平鲈的卵巢发育至 III 期, 此时卵巢内以 3 时相卵母细胞为主。3 时相卵母细胞被生殖上皮包围, 呈圆球形, 滤泡细胞发展成 2 层。滤泡细胞包绕着卵母细胞, 形成独立的卵泡结构。卵母细胞皮质部分出现体积大于皮层小泡的油球, 以后油球数目逐渐增多。雄鱼与雌鱼的交配就发生在这一阶段, 交配后, 精子进入到雌鱼的卵巢腔内。当卵巢发育到 IV 期的时候, 一般是 1 月, 卵巢内充满 4 时相卵母细胞。4 时相卵母细胞较 3 时相卵母细胞体积进一步增大, 卵黄颗粒数量迅速增多, 卵黄颗粒体积迅速增大, 滤泡层被压缩变窄。当卵巢内以 5 时相卵母细胞为主时, 卵巢发育处于 V 期(史丹等, 2011)。经过了漫长的卵黄积累过程, 在这一时期, 卵母细胞已充分发育成熟, 细胞内充满成熟卵黄颗粒, 部分卵黄颗粒开始融合, 滤泡层破裂。卵子受精后, 颗粒层脱离透明带(ZP), 与周围的膜细胞层混合, 形成屏障。随后, 它们迅速迁移、侵入周围组织并迅速扩张, 形成滤泡胎盘以支持胚胎发育。在妊娠期早期, 随着胚胎的发育, 滤泡胎盘进一步发育和扩张。当胚胎发育至囊胚期的时候, 胚胎周围包绕着丰富的呈折叠状的滤泡胎盘。随着胚胎

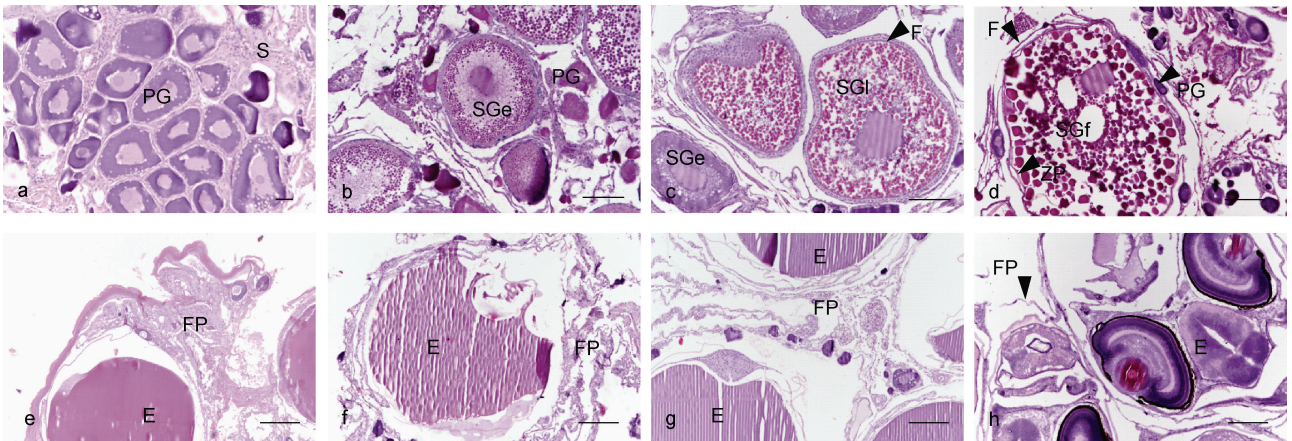


图 1 许氏平鲈卵巢在整个发育期的组织学观察

Fig.1 Histology of the black rockfish ovary development

注: a. II 期卵巢, 卵巢内主要为形态不规则的 2 时相早期卵母细胞; b. III 期卵巢, 卵巢内主要为 3 时相卵母细胞, 呈圆球形, 两层滤泡细胞已经出现; c. IV 期卵巢, 卵巢内主要为 4 时相卵母细胞, 卵母细胞体积进一步增大; d. V 期卵巢, 卵巢内主要为 5 时相卵母细胞, 卵母细胞充分发育, 部分卵黄颗粒出现融合, 滤泡层被挤压变窄; e. 卵裂期, 颗粒细胞与卵母细胞分离, 滤泡层(颗粒层, 鞘细胞层, 基底膜)与周围的上皮细胞和基质细胞混合, 形成滤泡胎盘; f. 囊胚期, 滤泡胎盘变得更为丰富且广泛折叠; g. 体节期, 滤泡胎盘进一步向外扩张且变得疏松; h. 孵化前期, 视野内只能观察到极少的滤泡胎盘。

PG: 2 时相卵母细胞(处于初级生长期的卵母细胞); SGe: 3 时相卵母细胞(次级卵母细胞发育早期); SGl: 4 时相卵母细胞(次级卵母细胞发育晚期); SGf: 5 时相卵母细胞(次级卵母细胞发育成熟期); FP: 滤泡胎盘; F: 滤泡层; E: 胚胎; S: 间质细胞。比例尺=200 μ m

的继续发育, 滤泡胎盘逐渐变得疏松。当胚胎发育到体节期的时候, 滤泡胎盘结构较囊胚期疏松, 到了孵化前期, 视野内只能观察到极少的滤泡胎盘的存在。

2.2 *cyp19a* 和 *Era* 在许氏平鲷卵巢中的定位

当许氏平鲷的卵巢发育到 III 期和 IV 期的时候, *cyp19a* 在滤泡层上有信号, 并且特异的表达在颗粒细胞上(图 2a, 2b)。在 V 期卵巢中可以观察到, *cyp19a* 的

信号变得极其微弱(图 2c), 在囊胚期则观察不到信号(图 2d)。 *Era* 在 III 期和 IV 期卵巢中检测不到信号(图 2e, 2f), 当卵巢发育至 V 期的时候, 在 5 时相卵母细胞的滤泡层上可以观察到非常明显的信号, 除此之外, 滤泡层外面的基质细胞也可以检测到信号表达(图 2g)。在囊胚期, *Era* 的阳性信号出现在滤泡胎盘中并且依然非常明显(图 2h)。图 2(a1)为正义探针的杂交结果。

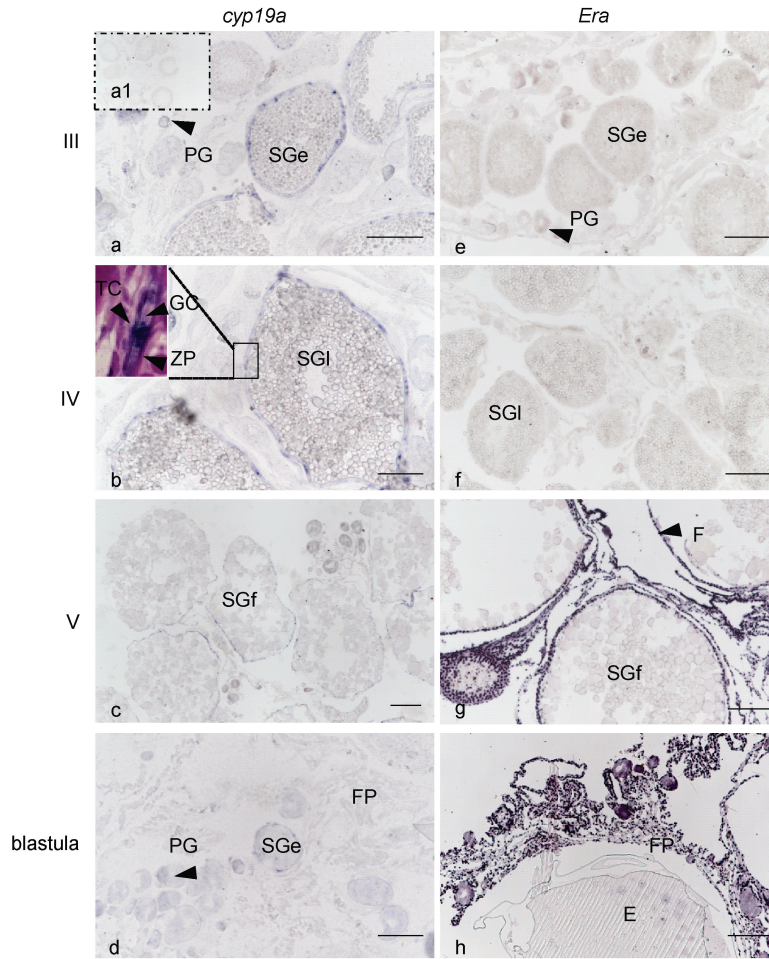


图 2 *cyp19a* 和 *Era* 的原位杂交结果

Fig.2 *In situ* hybridization results of *cyp19a* and *Era*

注: a—d. *cyp19a* 在卵巢中的原位杂交结果; e—h. *Era* 在卵巢中的原位杂交结果。PG: 2 时相卵母细胞(处于初级生长期的卵母细胞); SGe: 3 时相卵母细胞(次级卵母细胞发育早期); SGI: 4 时相卵母细胞(次级卵母细胞发育晚期); SGf: 5 时相卵母细胞(次级卵母细胞发育成熟期); FP: 滤泡胎盘; F: 滤泡层; E: 胚胎; TC: 鞘细胞; GC: 颗粒细胞; ZP: 透明带。比例尺=200 μm

2.3 *cyp19a* 和 *cyp19b* mRNA 在不同组织中及不同卵巢发育时期的表达

见图 3。在同一条鱼的不同组织中, *cyp19a* 仅在卵巢和脑中有表达, 且在卵巢中的表达量明显高于脑。 *cyp19b* 在卵巢、脾脏、脑和肝脏中都有表达, 其中脑的表达量最高, 卵巢、脾脏和肝脏中微弱表达。在许氏平鲷整个卵巢发育时期, *cyp19a* 在 III 期、IV

期、V 期、囊胚期和体节期均有表达, III 期、IV 期和体节期的表达要强于 V 期和囊胚期, 孵化前期没有表达。 *cyp19b* 在整个卵巢发育过程中只在 III 期、IV 期和体节期有表达, 且体节期的表达强于 IV 期, III 期的条带极其微弱, 在 V 期、囊胚期和孵化前期没有表达。并且整体来看, 在同一时期, *cyp19a* 的表达要强于 *cyp19b*。

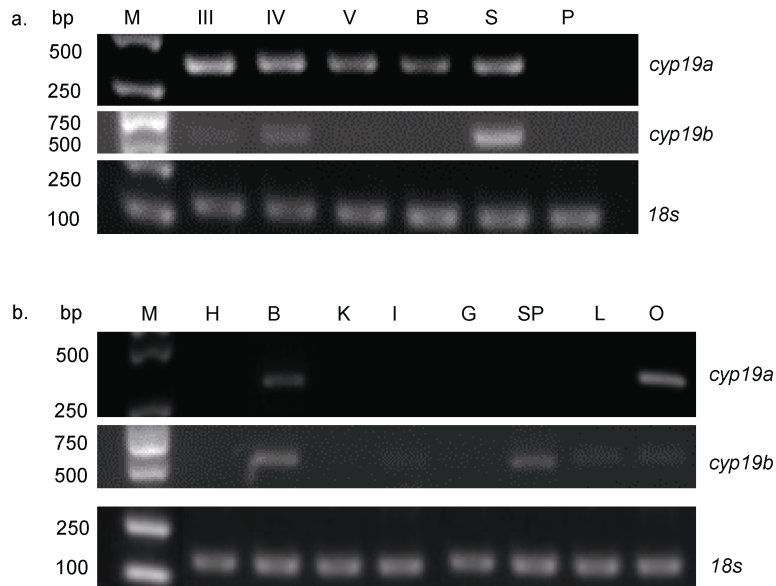


图3 *cyp19a* 和 *cyp19b* 的表达情况

Fig.3 The expression of *cyp19a* and *cyp19b*

注: a. *cyp19a* 和 *cyp19b* 在不同卵巢发育时期的表达; b. *cyp19a* 和 *cyp19b* 在雌鱼不同组织发育时期的表达。M: marker; III: III 期卵巢; IV: IV 期卵巢; V: V 期卵巢; B: 囊胚期; S: 体节期; P: 孵化前期; H: 心脏; B: 脑; K: 肾; I: 肠; G: 鳃; SP: 脾; L: 肝脏; O: 卵巢

2.4 不同发育期的卵巢中雌二醇含量变化

见图 4。在 II 期和 III 期卵巢中, 雌二醇含量处于较低的水平。当许氏平鲉雌鱼卵巢发育至 IV 期的时候, 雌二醇含量极速升高, 达到峰值。此后出现回落, 在体节期再次上升, 回归到峰值水平, IV 期和体节期时许氏平鲉体内的雌二醇含量显著高于其他时期。整体看来, 许氏平鲉妊娠期体内的雌二醇的含量保持在较高的水平。大菱鲆在卵子发生过程中体内的雌二醇含量变化趋势与许氏平鲉基本一致, 从 III 期发育到 IV 期的时候, 雌二醇含量极速上升, 然后在 V 期出现回落。

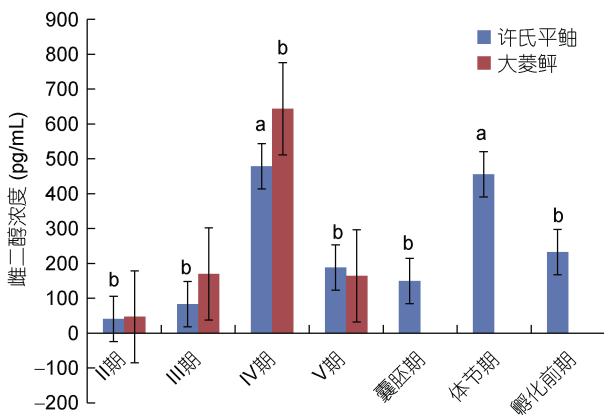


图4 不同发育期的卵巢中雌二醇含量变化

Fig.4 Changes of estradiol content in ovaries at different developmental stages

注: 数据均表示平均数±标准误, 图中标有不同的字母表示存在显著性差异($P < 0.05$, Duncan 氏多重比较)

3 讨论

许氏平鲉雌鱼在卵子发生过程中的组织学形态与卵生鱼类相似(朱亮华等, 2018)。当卵巢发育至 II 期的时候, 卵巢内以 2 时初级相卵母细胞为主。2 时相初级卵母细胞体积较小且形状不规则, 呈多边形, 胞质呈强嗜碱性, 核质均匀且着色较浅。此时的卵母细胞没有发育出清晰的滤泡层结构, 细胞外仅有一层滤泡细胞结构。当卵巢发育至 III 期的时候, 卵巢内以 3 时相卵母细胞为主。3 时相卵母细胞被生殖上皮包围, 呈圆球形, 滤泡细胞发展成 2 层。卵母细胞皮质部分出现体积大于皮层小泡的油球, 以后油球数目逐渐增多。当卵巢发育到 IV 期的时候, 卵巢内充满 4 时相卵母细胞。4 时相卵母细胞较 3 时相卵母细胞体积进一步增大, 卵黄颗粒数量迅速增多、体积迅速增大, 滤泡层被压缩变窄。当卵巢发育至 V 期时, 卵母细胞已充分发育成熟, 细胞内充满成熟卵黄颗粒, 部分卵黄颗粒开始融合。

但是许氏平鲉卵子发生过程与卵生鱼类不同的地方在于, 当卵巢发育到 III 期的时候, 滤泡层发育为 2 层, 生殖上皮包绕住了 3 时相卵母细胞, 形成了许多独立的卵泡。雌鱼和雄鱼在这一时期交配, 交配后精子散落的分布在卵巢腔内。独立的卵泡通过茎状结构分别与基质相连, 使得每个卵泡与精子接触的概率大致相同, 并且卵泡能够从基质以及包绕在滤

泡层上的血管中直接获得营养, 减少了卵子之间的竞争, 从而保证受精和营养吸收效率。

受精后, 我们在组织学上并没有发现胚胎外的 2 细胞结构, 说明滤泡层在受精前或者受精过程中就已经破裂, 这与 Bretschneider 等(1947)的研究结果一致。此后, 滤泡层迅速增殖并侵入周围的结缔组织, 变得高度肥大, 广泛折叠和高度血管化, 并在囊胚期迅速形成滤泡胎盘。该结构在形态上非常类似于哺乳动物绒毛膜尿囊胎盘的一部分(Grove *et al*, 1994; Laksanawimol *et al*, 2006; Kwan *et al*, 2015)。

在许氏平鲷卵子发生的过程中, 血浆中雌二醇的含量不断增加, 这与史丹等(2011)的研究结果一致。并且我们发现, 当卵巢发育到 IV 期的时候, 许氏平鲷体内的雌二醇含量显著高于其他时期, 达到峰值。由于 Shi 等(2011)将 IV 期和 V 期的雌二醇含量合并到一起, 所以并没有非常突出的高于 II 期和 III 期, 但在整个卵子发育期仍然呈现上升趋势, 进一步印证了雌二醇具有促进卵黄蛋白原产生从而促进卵巢发育的作用。这一结果与一些卵生鱼类, 如: 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) (赵会宏等, 2003)、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*) (刘付永忠, 2004)、双棘黄姑鱼(*Nibea diacanthus*) (沈卓坤等, 2007)等研究结果相同。在胚胎发育的过程中, 当胚胎发育至体节期的时候, 血浆中雌二醇的含量再次上升达到一个小高峰, 同时 *cyp19a*、*cyp19b* 的表达也高于囊胚期, 我们推测这可能说明雌二醇对母体维持妊娠具有一定的支撑作用。

雌激素必须与雌激素受体结合才能发挥作用, 我们通过追踪 *Era* 在许氏平鲷卵巢上的定位发现, 在 III 期和 IV 期卵巢上没有检测到 *Era* 的信号。当卵巢发育到 V 期的时候, 在滤泡层和基质中都出现了强烈的阳性信号, 并且在囊胚期的时候信号依然非常明显。硬骨鱼类和哺乳类 *ERa* 在 DNA 结合区和配体结合区高度保守, 这两个功能域的可相似性分别达到 90%和 60%。在哺乳动物中, *ERa* 主要在子宫、乳腺、卵巢以及输卵管中表达(Couse *et al*, 1997), 因此我们推测许氏平鲷的滤泡胎盘可能与哺乳动物的胎盘存在某些功能上的相似性。

cyp19a 在雌性许氏平鲷中仅在卵巢和脑中有表达, 且在卵巢中的表达量高于脑。这与 Wen 等(2014)的研究结果基本相似, 他们认为 *cyp19a* 仅在许氏平鲷的卵巢中有表达, 这可能与所采用的样品处于不同的发育时期或者实验时所用的 PCR 循环数不同有

关。这与金鱼(*Carassius auratus*) (Tchoudakova *et al*, 1998)、斑马鱼(*Denio rerio*) (Kishida *et al*, 2001)在其他外周组织也有表达的研究结果也有所不同, 这些差异可能与不同鱼类之间物种差异以及发育时期的不同有关。但无论在哪种鱼类中, *cyp19a* 在卵巢中的表达量都是最高的, 这也说明了 *cyp19a* 在维持卵巢发育方面具有重要的作用。*cyp19b* 在卵巢、脾脏、脑和肝脏中都有表达, 其中脑的表达量最高, 卵巢、脾脏和肝脏中微弱表达, 这与杨艳平等(2012)的研究结果基本相似, 他们认为 *cyp19b* 在脑、卵巢、脾脏和头肾中表达, 这可能与样品处于不同的发育时期有关。我们的研究结果与三斑石斑鱼(*Epinephelus trimaculatus*) (陈华谱等, 2012)的结果相同。在卵巢发育的不同时期, 在许氏平鲷整个卵巢发育时期, *cyp19a* 在 III 期、IV 期、V 期、囊胚期和体节期均有表达, III 期、IV 期和体节期的表达要强于 V 期和囊胚期, 孵化前期没有表达。这与 Wen 等(2014)等的结果一致, 在他们的研究结果中, 从 7 月到 9 月、11 月次年 1 月以及 3 月, *cyp19a* 的表达量基本相同, 5 月时表达量有所下降。我们对于发育时期的划分要更为清晰, 并且对妊娠时期的许氏平鲷卵巢中 *cyp19a* 的表达量进行了补充。*cyp19b* 在整个卵巢发育过程中只在 III 期、IV 期和体节期有表达, 且体节期的表达强于 IV 期, III 期的条带极其微弱。在 V 期、囊胚期和孵化前期没有表达。这与杨艳平等(2012)和 Kwon 等(2013)的研究结果基本一致, 杨艳平等(2012)只研究了卵子发生期和退化期, 在卵子发生期 *cyp19b* 只在 III 期和 IV 期表达; Kwon 等(2013)的研究结果显示 *cyp19b* 在卵黄积累期和妊娠期都有表达, 这同样与我们的实验结果吻合, 只是我们对卵黄积累期和妊娠期进行了进一步的细化, 发现 *cyp19b* 在整个卵巢发育过程中只在 III 期、IV 期和体节期有表达。我们认为 *cyp19b* 在体节期的高表达或许是作为雌二醇来源的一个补充, *cyp19a* 和 *cyp19b* 在体节期的高表达共同导致了雌二醇在处于体节期的许氏平鲷体内有较高含量这一结果, 由此我们推测 *cyp19b* 对许氏平鲷卵巢的发育同样发挥着重要的作用。

4 结论

本文分析了与雌二醇合成及作用密切相关的 *cyp19a* 和 *Era* 在许氏平鲷卵巢上的定位, 芳香化酶 *cyp19a*、*cyp19b* mRNA 在不同组织中和不同卵巢发育时期的表达, 以及不同发育期的卵巢中雌二醇含量

变化。首先,在V期卵巢的滤泡层、基质和囊胚期的滤泡胎盘上都检测到了强烈的 *Era* 的信号。其次, *cyp19a* 和 *cyp19b* 在卵巢中均有表达且在不同的卵巢发育期表达量不同。在卵黄积累的过程中, *cyp19a* 和 *cyp19b* 在IV期的表达量最高,在妊娠过程中则是体节期表达量最高。除此之外,在卵巢发育的过程中,许氏平鲷体内雌二醇含量的峰值分别出现在IV期和体节期。这些结果说明雌二醇在胎生鱼类卵子发生及妊娠过程中均起到非常重要的作用。本文从雌激素的角度出发,结合许氏平鲷卵巢自身的组织学结构特点,就许氏平鲷卵巢发育及其胎生的生殖方式提供了新的解读,为许氏平鲷胎生这一特殊的生殖方式的研究提供了新的思路。

参 考 文 献

- 史丹,温海深,杨艳平,2011. 许氏平鲷卵巢发育的周年变化研究. 中国海洋大学学报, 41(9): 25—30
- 朱亮华,孙敏,张鼎元等,2018. 黑鲷卵巢发育的组织学研究. 应用海洋学学报, 37(2): 255—262
- 刘付永忠,2004. 环境因子对赤点石斑鱼繁殖的影响. 广州: 中山大学博士学位论文
- 杨艳平,温海深,史丹等,2012. 许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*)CYP19B基因cDNA克隆及在生殖周期中的表达分析. 海洋与湖沼, 43(2): 370—375
- 沈卓坤,郑剑辉,陈怀定等,2007. 双棘黄姑鱼血清性类固醇激素的周年变化. 广东海洋大学学报, 27(3): 16—19
- 陈华谱,舒琥,肖丹等,2012. 三斑石斑鱼(*Epinephelus trimaculatus*)两种芳香化酶cDNA的克隆及其表达的组织特异性. 海洋与湖沼, 43(6): 1218—1226
- 赵会宏,刘晓春,刘付永忠等,2003. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化. 中山大学学报(自然科学版), 42(6): 56—59, 63
- Bretschneider L H, De Witt J J D, 1947. Sexual Endocrinology of Non-Mammalian Vertebrates. Amsterdam: Elsevier
- Chen S H, Pu L L, Xie F J *et al*, 2015. Differential expression of three estrogen receptors mRNAs in tissues, growth development, embryogenesis and gametogenesis from large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. General and Comparative Endocrinology, 216: 134—151
- Couse J F, Lindzey J, Grandien K *et al*, 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. Endocrinology, 138(11): 4613—4621
- Eick G N, Thornton J W, 2011. Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor. Molecular and Cellular Endocrinology, 334(1/2): 31—38
- Flouriot G, Pakdel F, Valotaire Y, 1996. Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. Molecular and Cellular Endocrinology, 124(1/2): 173—183
- Grier H J, Uribe-Aranzabal M C, Patino R, 2009. The ovary, folliculogenesis, and oogenesis in teleosts. In: Jamieson B G M ed. Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes). New York: CRC Press, 25—78
- Grove B D, Wourms J P, 1994. Follicular placenta of the viviparous fish, *Heterandria formosa*: II. Ultrastructure and development of the follicular epithelium. Journal of Morphology, 220(2): 167—184
- Kagawa H, 2013. Oogenesis in teleost fish. Aqua-BioScience Monographs, 6(4): 99—127
- Kishida M, Callard G V, 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology, 142(2): 740—750
- Kwan L, Fris M, Rodd F H *et al*, 2015. An examination of the variation in maternal placenta across the genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae). Journal of Morphology, 276(6): 707—720
- Kwon J Y, Kim J, 2013. Differential expression of two distinct aromatase genes (*cyp19a1a* and *cyp19a1b*) during vitellogenesis and gestation in the viviparous black rockfish *Sebastes schlegelii*. Animal Cells & Systems, 17(2): 88—98
- Laksanawimol P, Damrongphol P, Kruatrachue M, 2006. Alteration of the brood pouch morphology during gestation of male seahorses, *Hippocampus kuda*. Marine and Freshwater Research, 57(5): 497—502
- Lubzens E, Young G, Bobe J *et al*, 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. General and Comparative Endocrinology, 165(3): 367—389
- McCarthy M M, 2010. How it's made: organisational effects of hormones on the developing brain. Journal of Neuroendocrinology, 22(7): 736—742
- Miller W L, Auchus R J, Geller D H, 1997. The regulation of 17, 20 lyase activity. Steroids, 62(1): 133—142
- Mori H, Nakagawa M, Soyano K *et al*, 2003. Annual reproductive cycle of black rockfish *Sebastes schlegelii* in captivity. Fisheries Science, 69(5): 910—923
- Nelson E R, Habibi H R, 2010. Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. Endocrinology, 151(4): 1668—1676
- Sabo-Attwood T, Kroll K J, Denslow N D, 2004. Differential expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol. Molecular and Cellular Endocrinology, 218(1/2): 107—118
- Shi D, Wen H S, He F *et al*, 2011. The physiology functions of estrogen receptor α (ER α) in reproduction cycle of ovoviviparous black rockfish, *Sebastes schlegelii* Hilgendorf. Steroids, 76(14): 1597—1608
- Tchoudakova A, Callard G V, 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. Endocrinology, 139(4): 2179—2189
- Wen H S, Wu W J, Yang Y P *et al*, 2014. Molecular physiology

mechanism of cytochrome P450 aromatase-regulating gonad development in ovoviviparous black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture Research*, 45(10): 1685—1696
Woods M, Kumar A, Barton M *et al*, 2009. Localisation of

estrogen responsive genes in the liver and testis of Murray rainbowfish *Melanotaenia fluviatilis* exposed to 17 β -estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 303(1/2): 57—66

CHANGES OF ESTROGEN, AROMATASE AND ESTROGEN RECEPTOR DURING OOGENESIS AND GESTATION OF *SEBASTES SCHLEGELII*

XU Xiao-Jie^{1, 2, 3, 4}, WANG Xue-Ying^{1, 2, 3}, ZHOU Li^{1, 2, 3, 4}, LIU Qing-Hua^{1, 2, 3}, LI Jun^{1, 2, 3}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Estradiol is one of the main sex steroid hormones secreted from fish ovaries. It plays an important role in the physiological processes of vertebrate oogenesis, sex differentiation, yolk formation, physiological immunity, and central nervous system regulation. *Sebastes schlegelii* is a viviparous fish, and has a long period of yolk accumulation and pregnancy. This special reproductive mode has drawn attention from international scholars. The location of *cyp19a* and *Era*, which are closely related to the synthesis and role of estrogen on the ovary of black rockfish, the expression of *cyp19a* and *cyp19a1b* mRNA in different ovarian development stages and different tissues, and the level of estradiol in ovaries at different development stages were analyzed. Results show that in the process of ovarian development, the peak of estradiol content in black rockfish appeared in stage IV and somite. In addition, both *cyp19a* and *cyp19b* were expressed in the ovary and the expression levels were different in different ovarian development stages. *cyp19a* and *cyp19b* showed the highest expression levels at stage IV during oogenesis, and somatic period during gestation. In addition, strong *Era* signals were detected on the follicular layer, stroma at stage V of the ovary and the follicular placenta at blastocyst stage. These results provide a new interpretation to the ovarian development and viviparous reproductive strategy of black rockfish.

Key words black rockfish *Sebastes schlegelii*; follicular placenta; estrogen; estrogen receptor; P450aromatase