

三倍体虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)卵巢分化 及滞育的调控机制研究*

徐革锋¹ 牟振波² 陈怀发³ 黄天晴⁴ 王炳谦¹ 谷伟¹
户国¹ 韩英⁴

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 哈尔滨 150070; 2. 西藏自治区农牧科学院水产科学研究所 拉萨 850032;
3. 黑龙江省水生动物资源增殖保护站 哈尔滨 150018; 4. 东北农业大学动物科技学院水产系 哈尔滨 150030)

摘要 尽管与性别决定和分化的相关基因在二倍体虹鳟中已被鉴定出来, 如 *Cyp19a1a*、*Foxl2*、*Dmrt1*、*Amh* 和 *Sox9*, 但关于三倍体雌性虹鳟独特性腺表型及其相关性控制基因的表达规律仍未得到深入研究, 尤其是早期卵巢发育阻滞导致的生殖细胞去分化特征。因此, 本研究以三倍体雌性虹鳟性腺发育中起重要调控作用的特异候选基因作为重点研究对象, 辅助性腺体细胞与生殖细胞分化方向的组织学证据和类固醇激素表达规律, 验证了各基因间的级联调控关系。结果表明, 虹鳟三倍体与二倍体卵巢的分化特征基本一致。虹鳟二倍体与三倍体性腺分别在 84dpf 和 98dpf 就已分化为卵巢。但三倍体虹鳟卵巢分化存在障碍, 早期发育停滞, 卵原细胞及其滤泡细胞数量有限。*Foxl2* 和 *Cyp19a1a* 在二倍体虹鳟卵巢和精巢中均有表达, 它们在卵巢中表达量均呈逐渐升高趋势, 但在精巢中的表达量非常低; 这两个基因在雌性三倍体虹鳟性腺中的表达呈先升高后降低的趋势, 其表达量均在 8 月龄时期达到最大。*Dmrt1*、*Amh* 和 *Sox9* 在二倍体精巢和雌性三倍体卵巢中的表达均呈不断上调趋势, 这些基因上调可能与血清睾酮含量的增加相关, 因为在 10 月龄时期这两种鱼的血清含量相对较高, 而这三个基因在二倍体虹鳟卵巢中的表达却呈下调趋势。因此本研究认为, 维持鱼类卵巢分化需要持续高水平的雌激素, 这可能是脊椎动物进化过程中的一个保守特征。可以推断雌性三倍体虹鳟卵巢滞育将导致其体细胞去分化, 这对于 *Cyp19a1a* 表达及雌二醇合成存在抑制作用。因为这些雌激素是用来维持它们分化和继续发育的, 可能产生一个负反馈圈, 之后去分化会增强。

关键词 虹鳟; 三倍体; 雌性通路; 卵巢分化

中图分类号 Q953; S965 **doi:** 10.11693/hyhz20161000221

雌雄异体鱼类的性别决定是由基因(遗传)、环境或是两者共同作用驱动(Devlin *et al*, 2002; Volff *et al*, 2007; Penman *et al*, 2008)。在绝大多数哺乳动物中, 雄性都是通过 Y 染色体遗传的。*Sry* 是第一个在哺乳动物 Y 染色体上发现的基因, 已被证明是精巢分化与发育的必要条件(Koopman *et al*, 1990; Sinclair *et al*, 1990), 在该基因被确定为主要性别决定基因的同时,

也发现其他基因参与了性别分化的级联调节(Brennan *et al*, 2004), 但 *Sry* 基因在其他物种的性别决定机制中尚未被发现(Capel, 2000; Graves, 2002), 这表明性别决定机制在不同种类脊椎动物间不具有明显的进化保守性。与性别决定相反, 决定鱼类性别分化的相关基因和基因网络显示出高度的保守性, 即使是不同种类(Munger *et al*, 2009; Herpin *et al*,

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项, HSY201601 号, HSY201404 号; 黑龙江省自然科学基金面上项目, C2016069 号。徐革锋, 博士, 副研究员, E-mail: xgffish@hotmail.com

通讯作者: 韩英, E-mail: hanying_606@163.com

收稿日期: 2016-10-14, 收修改稿日期: 2016-10-25

2011; Piferrer, 2011)。与其他脊椎动物一样, 鱼类性腺有两大功能, 即配子发生和类固醇激素合成, 性腺主要的合成产物是性甾体, 雄性激素包括睾酮(T)、11 β -羟雄烯二酮和 11-酮基睾酮, 雌性激素主要是雌二醇(E₂)。雄性激素和雌性激素分别与雄性和雌性的性腺分化有关。但雌激素主要是性分化和保持雌性特征的必要条件, 而雄激素目前认为是雄性分化的结果(Piferrer *et al*, 2012)。值得注意的是, 很多基因在两两性性腺分化中都存在, 只是表达程度不同。另外, 统计近些年的研究成果可知, 鱼类性腺分化期大部分调控因子主要可以归为以下几类: 类固醇生成酶、性类固醇激素受体、转录因子和生长因子, 但随着研究的深入还发现其他因子存在(Penman *et al*, 2008)。这些基因中, 类固醇性腺芳香化酶(*Cyp19a1a*)和转录因子 *Foxl2* 占据显著地位。芳香化酶可催化雄激素转化为雌激素, 该生理过程不可逆, 由此确保两种激素的平衡。目前研究认为, 大部分非哺乳脊椎动物的雌性分化依赖 *Cyp19a1a* 定向诱导, 该反应通过一个正反馈回路实现, 主要调控基因为转录因子 *Foxl2*; 而在雄性分化中 *Cyp19a1a* 的表达会被抑制(Guiguen *et al*, 2010)。Wang 等(2010)的研究认为, 抑制 *Cyp19a1a* 是通过增加 *Dmrt1* 实现的; 而转录因子在鱼类种群间相对保守, 是 *Cyp19a1a* 的调节器。大多遗传型性别决定种类脊椎动物具有单一性别决定机制, 而 *Dmrt1* 的增量调节主要通过以下这个途径实现: 包括一个雄性主要决定基因或一个联合基因 *Sox9*, 或者在多因子机制中通过几种雄性促进基因的叠加效应来实现(Piferrer *et al*, 2012)。

雄性虹鳟的三倍体(Lincoln *et al*, 1984; 韩英等, 2010a)与二倍体性腺有相同的功能和形态, 然而, 雌性三倍体虹鳟是一个例外, 尽管它们能够存活, 但它们卵巢滞育。与二倍体卵巢相比, 三倍体虹鳟卵巢呈线状, 并且缺少相应数量的初级卵母细胞(Lincoln *et al*, 1984; Krisfalusi *et al*, 1996)。这说明三倍体虹鳟卵巢与精巢的发育存在着本质区别。早期研究认为, 由于第三套染色体在配子形成过程中扰乱了初始减数分裂, 阻滞了卵原细胞的发育, 因此导致了三倍体虹鳟卵巢发育停滞(Krisfalusi *et al*, 1999)。韩英等(2010b)的研究还发现, 在 17 月龄左右时三倍体雌性虹鳟呈现类雄性化发育趋势(卵巢出现了去分化、再分化的异常现象), 但该特殊现象与普遍认为的鱼类在性腺分化后, 其生殖细胞已失去了性别可塑性的观点相悖。因此, 认为是三倍体虹鳟的卵原细胞胞囊化扰乱

了雌性生殖细胞与其体细胞之间的互作, 导致滤泡细胞发育及其性类固醇激素合成通路受阻, 进而中断了睾酮转变为雌二醇的芳香化途径, 最终由于雌激素的缺失开启了卵巢转向雄性化的调控通路。然而, 对于三倍体虹鳟卵巢滞育的这种生理学解释仍无法令人满意, 尤其在三倍体虹鳟卵巢分化及滞育过程中, 雌性化通路的性腺特异基因与性类固醇激素间的联合调控机制, 以及相关基因的级联调控模式是怎么样的, 到目前为止仍不得而知。目前, 一些与性别决定和分化相关的基因已经在虹鳟中被鉴定出来, 包括 *Cyp19a1a*、*Foxl2*、*Dmrt1*、*Amh* 和 *Sox9* 等(Marchand *et al*, 2000; Vizziano *et al*, 2007, 2008a, b; Orrego *et al*, 2010)。尽管 Xu 等(2016)初步报道了不同发育阶段三倍体雌性虹鳟的上述基因的级联调控关系, 但对于其卵巢分化及早期滞育的调控机制尚未进行报道。我们检测了卵巢分化及其滞育早期三倍体雌性虹鳟的 *Cyp19a1a*、*Foxl2*、*Dmrt1*、*Amh* 和 *Aox9* 的相对表达量, 并分析了各基因间的级联调控模式以及在雌性化通路中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组和采样

遗传上全雌性三倍体(XXX)虹鳟和正常雌性二倍体(XX)虹鳟从黑龙江水产研究所获得。30dpf (Days post fertilization)发眼卵放置在 10 ℃ 水中, 溶解氧为 8mg/L, 然后转入到实验设备中即 0.3m³ 的水族箱内, 具有再循环给水系统, 水温 10±0.2 ℃, 恒定光周期(12L : 12D)。在 65—68dpf 时期, 仔鱼开始集中上浮, 开口摄食后分组(每日饱和投喂商业饵料): 实验组全为雌性三倍体(XXX), 对照组为雌性二倍体(XX), 各试验组均设三个平行组。从上浮仔鱼至 4 月龄, 每 14d 采集样本一次, 用于确定性腺分化时间, 每次采集仔鱼 30 尾, 放于液氮罐内冻存后, -80 ℃ 超低温冰箱保存, 用于 RNA 提取和 real time RT-PCR 分析; 幼鱼期(5—10 月龄)每次采集样品 10 尾, 分 5 尾放于液氮罐内冻存, 用于 RNA 提取和 real time RT-PCR 分析, 5 尾分别用 Bouin's 固定(用于组织学切片观察)和 2.5%戊二醛固定(用于电镜观察), 7—10 月龄采集血液。

1.2 RNA 提取与转录

用 TRIzol 试剂提取 RNA。RNA 数量和质量是通过紫外吸光度在 260 和 280nm 的 Evolution 260 BIO 分光光度计(Thermo, 美国)测定。吸光度比值为

260/280nm, 超出 1.7—2.1 范围的样品将被排除。样品 RNA 的完整性通过生物分析仪 2100 专家系统(安捷伦科技公司, 圣克拉拉, 美国)验证, 所有的样本 RIN 值都在 8—10。根据制造商的说明, 500ng, 总 RNA 30 μ L 反应体系, 使用反向转录核心工具酶 (98 $^{\circ}$ C, 10s; 52 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 1min), 反转录成 cDNA, 用 10 倍的核酸酶自由水将 cDNA 稀释。

1.3 实时 PCR

根据二倍体虹鳟的 *Cyp19a1a*、*Foxl2*、*Dmrt1*、*sox9* 和 *Amh* 序列作为模板, 利用 Primer 5.0 软件分别设计特异引物(表 1), 检测二倍体虹鳟和雌性三倍体虹鳟性腺组织中基因的表达式量情况, 并根据 GenBank 中二倍体虹鳟的 β -actin 基因序列设计内参引物(表 1)。实时荧光定量 PCR(ddCt 法)结果测定, 用 ABI

7500 Realttime PCR 仪(Applied Biosystems, USA)进行相对定量分析。使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa, Japan)试剂盒, 依照说明书反应为 20 μ L 体系, 包括: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 \times), 10 μ L; PCR Forward Primer (10 μ mol/L), 0.4 μ L; PCR Reverse Primer (10 μ mol/L), 0.4 μ L; ROX Reference Dye (50 \times) \times 3, 0.4 μ L; cDNA 模板, 2.0 μ L; dH₂O, 6.8 μ L。反应程序为 95 30s; 95 5s, 60 34s, 40 个循环; 95 15s, 60 1min, 95 15s。每个引物的效率 (Baron *et al*, 2005a, b, c), 由 cDNA 样本(RNA 反转录得到)连续稀释测得, 重复 3 次。各基因转录水平通过 β -actin(内参)的表达式量进行评定。将荧光定量 PCR 检测结果导出, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算得到基因定量表达结果(Bogerd *et al*, 2001)。

表 1 实时定量 PCR 引物序列
Tab.1 The nucleotide sequences of the real-time PCR primers

基因符号	基因名称	GenBank 序列号	Forward Sequence	Reverse Sequence
<i>Cyp19a1a</i>	Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1a	BX083177	CTCTCTCTCATACTCAGGTT	AGAGGAACTGCTGAGTATGAAT
<i>Foxl2</i>	Forkhead box L2	CA341688	TGTGCTGGATTTGTTTTTGT	GTGTCGTGGACCATCAGGGCCA
<i>Dmrt1</i>	Doublesex and mab-3-related transcription factor 1	AF209095	GGACACCTCTACTACAACCTCT	GTTCGGCATCTGGTATTGTTGGT
<i>Sox9</i>	SRY-box containing gene 9	AB006448.1	ATGCAGGTGCCCAAGGCTCA	CTCTGGCTGGGGCTCATATA
<i>Amh</i>	Anti-Mullerian hormone	BX865284	GCCACCATCTACAACCTGCCAGG	TGCTCATCCAACCTCCACCACCT
β -actin	Beta-actin	AJ438158	ATCCTGACGGAGCGCGTTACAGC	TGCCCATCTCCTGCTCAAAGTCCA

1.4 性激素测定

尾椎静脉采血, 制备血清, -80 保存待测。根据解剖和切片结果, 对照标记, 选取雌性血样, 采用放射免疫法测定 Estradiol-17 β (E₂)和 Testosterone (T)含量, 放免试剂盒为北京华英生物技术研究所生产 (125I-Na 为英国 Amersham 公司生产, 17 β -E₂ 和 T 抗原及抗体为美国 SIGMA 公司生产)。

2 结果与分析

2.1 三倍体虹鳟卵巢分化

在 98dpf 时期, 三倍体虹鳟已分化出卵巢结构(图 1a), 其中具有明显的卵原细胞(图 1b, 细胞核: 三角符号)和鞘膜细胞(图 1a, 箭头); 卵原细胞胞质中具有大量圆形和带形的线粒体, 偶见高尔基体(图 1c), 且细胞核较小, 具有 2 个核仁。在 84dpf 时期, 二倍体虹鳟卵巢分化速度较快, 卵巢中具有大量典型的卵泡结构(图 1d), 卵原细胞大量增殖, 且具有多个核仁(图 1e), 胞质细胞器大量增殖, 高尔基体较为发达

(箭头), 线粒体多位长带状(图 1f, 三角形)。但随后的发育对三倍体虹鳟卵泡形成和卵细胞增殖均非常不利, 在 154dpf(4 月龄), 雌性三倍体虹鳟性腺整体表现为 期卵巢结构(图 1g), 卵泡结构明显(图 1h, 箭头), 但卵巢组织间存在大量空隙, 绝大部分区域为无法区分的体细胞组织。在 4 月龄时期, 二倍体虹鳟卵巢已进入到卵母细胞发育时期(— 时期卵巢), 细胞核变小(图 1i, 三角形), 核仁清晰(图 1i, 箭头), 滤泡层内层为扁平的滤泡细胞(图 1j, 三角形), 外层为鞘膜细胞(图 1j, 箭头)。

2.2 三倍体虹鳟滞育期卵巢

在 5—7 月龄时期, 三倍体雌性虹鳟卵巢组织发育停滞(图 2a), 卵细胞始终停留在卵原细胞时期, 且核仁数量较少, 细胞形态不规则, 卵巢组织间隙充满了大量鞘膜细胞。8—9 月龄时期, 三倍体虹鳟卵巢结构开始疏松化, 有大面积的空隙出现(图 2b), 超微结构显示, 个别的空隙存有大量微绒毛, 而有些空隙间有膜状物存在(图 2c)。10 月龄时期, 三倍体虹鳟卵巢

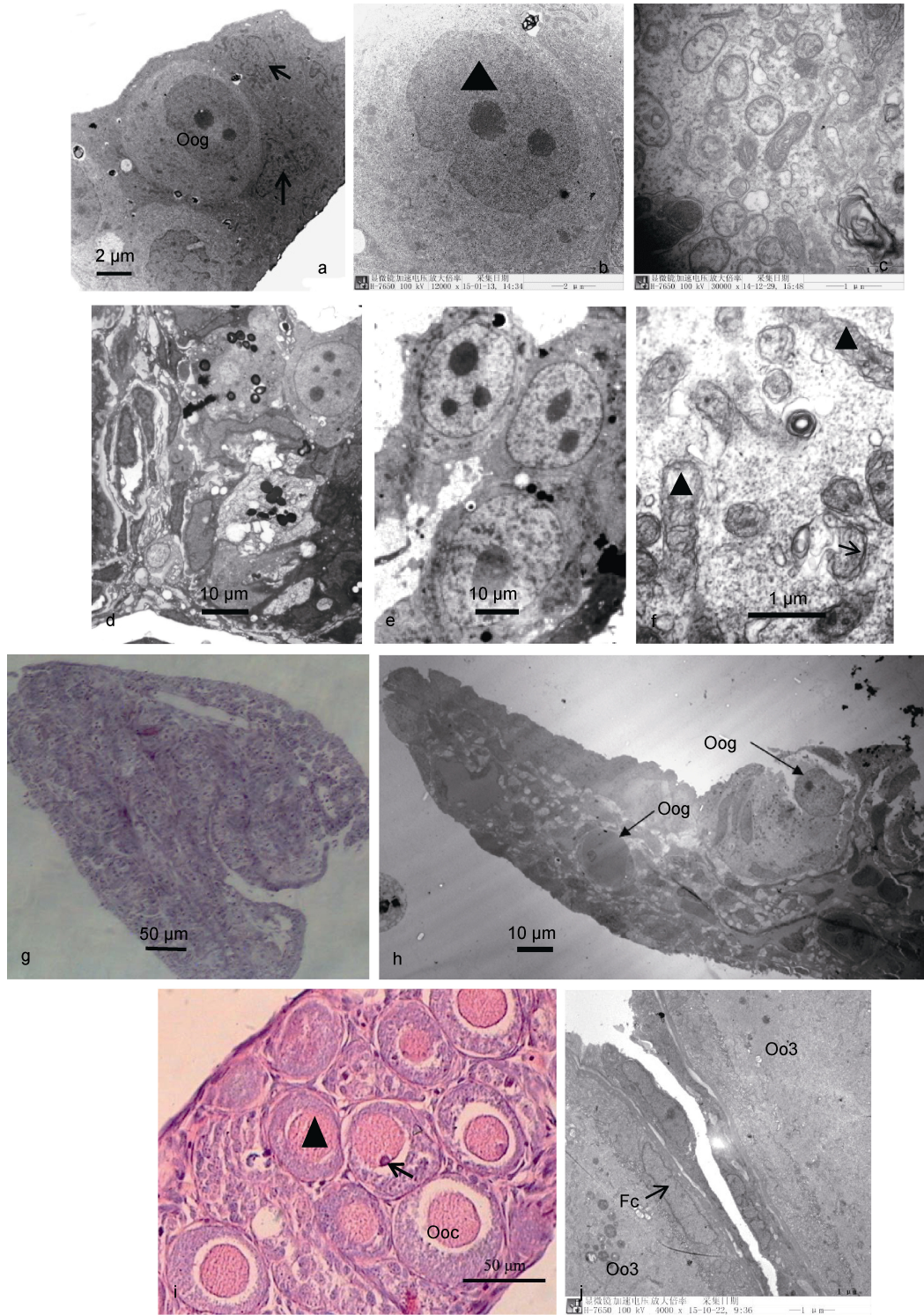


图 1 二倍体和三倍体虹鳟卵巢分化期结构

Fig.1 The gonadal morphology of diploid and triploid female rainbow trout in developmental period
注: Oog: oogonium; Ooc: oocyte; Fc: follicle cells; Oo3: phase III oocyte

发生了退化, 卵巢结构空泡化更加明显, 间质空隙较大(图 2d, 箭头)、卵原细胞开始重吸收(图 2e, 箭头), 胞质内线粒体大量瓦解, 鞘膜细胞不断萎缩(图 2e,

三角形), 甚至消失, 卵巢组织进入衰败期, 结缔组织发达, 出现了大量不能区分性质的生殖细胞群。该时期后期, 绝大部分空隙均被微绒毛所占据(图 2f), 卵

巢组织内存在庞大的膜系统(图 2g, 三角形), 具有大量深染致密颗粒(图 2g, 箭头), 类似于蛋白质在性腺外周聚集。在 5—10 月龄时期, 二倍体虹鳟卵巢具有典型的产卵小板结构, 每个产卵板上分布有数量

不等的卵原细胞, 其数量在短时期内大量增殖(图 2h), 并不断发育成初级卵母细胞和次级卵母细胞(实相卵母细胞)(图 2i)。该时期的最主要特征——卵母细胞发育及其滤泡细胞层的形成。

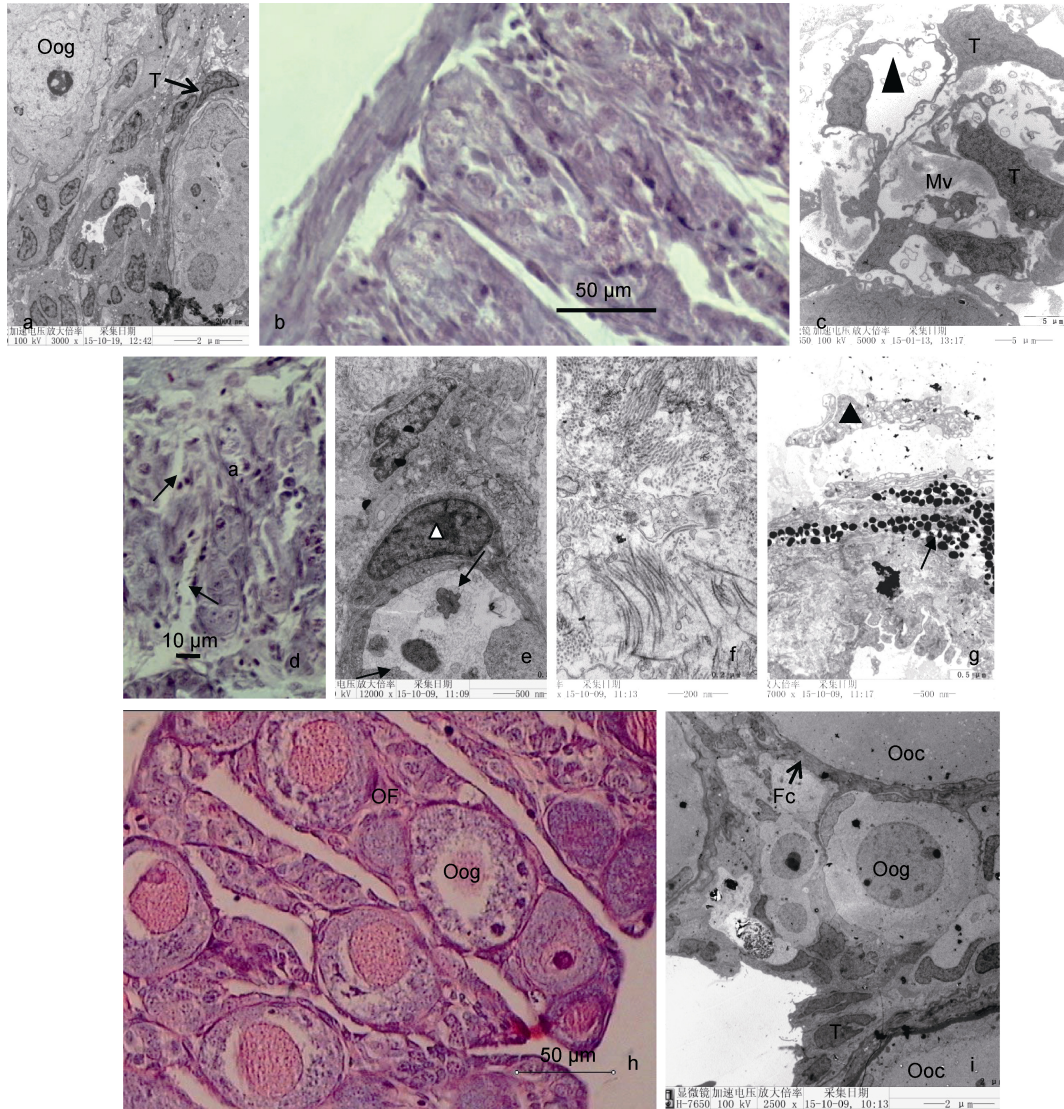


图 2 三倍体虹鳟滞育期卵巢形态结构

Fig.2 The gonadal morphology of triploid female rainbow trout in development arrest period

注: Oog: oogonium; T: theca cells; Mv: microvilli; Ooc: oocyte; Fc: follicle cells; Oo3: phase III oocyte; OF: ovigerous fold

2.3 三倍体(XXX)虹鳟卵巢 *Cyp19a1a*、*Foxl2*、*Dmrt1*、*Amh* 和 *Sox9* 的表达分析

Foxl2 和 *Cyp19a1a* 在二倍体虹鳟卵巢和精巢中均有表达, 它们在卵巢中表达量均呈逐渐升高趋势, 但精巢中的表达量非常低(图 3a, 图 3b); 这两个基因在雌性三倍体虹鳟性腺中的表达呈先升高后降低趋势, 其表达量均在 8 月龄时期达到最大(图 3a, 图 3b)。 *Dmrt1*、*Amh* 和 *Sox9* 在二倍体精巢和雌性

三倍体性腺中的表达均呈不断上调的趋势, 但这些基因在二倍体精巢中的表达量显著高于在雌性三倍体中的表达(图 3c, 图 3d, 图 3e), 这三个基因在二倍体虹鳟卵巢中的表达呈下调趋势(图 3c, 图 3d, 图 3e)。

2.4 三倍体(XXX)虹鳟性类固醇激素(E₂和T)的变化趋势

在 10 月龄时期, 雌性二倍体与三倍体虹鳟的血

液 E_2 差异不显著($P>0.05$), 但雄性二倍体血液 E_2 显著低于前两者($P<0.05$); 雄性二倍体虹鳟显著高于雌性

三倍体虹鳟的血液 T 含量, 且雌性二倍体虹鳟的血液 T 含量显著低于前两者($P<0.05$)(图 4a, 图 4b)。

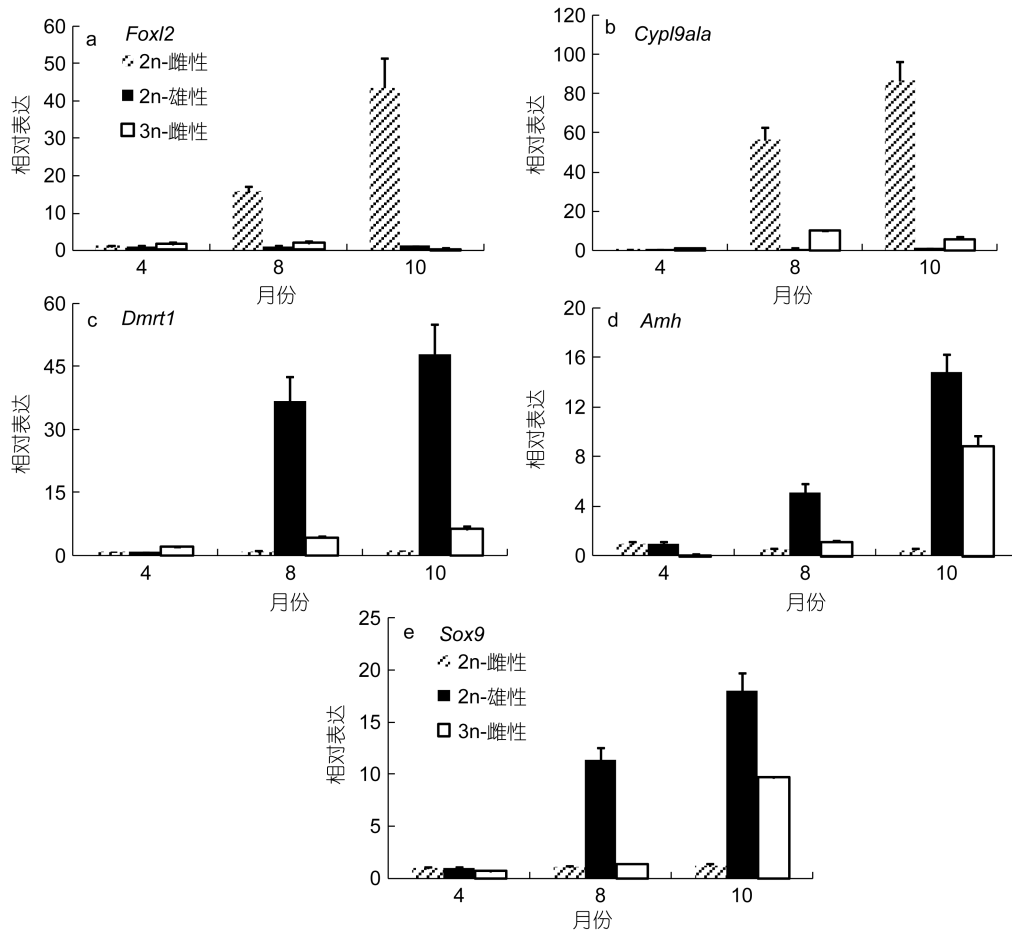


图 3 雌性 3n 体(XXX)虹鳟和 2n 体(XX, XY)虹鳟不同月龄的基因表达结果

Fig.3 The gene expression profiles in gonads of 3n (XXX) and 2n (XX, XY) rainbow trout

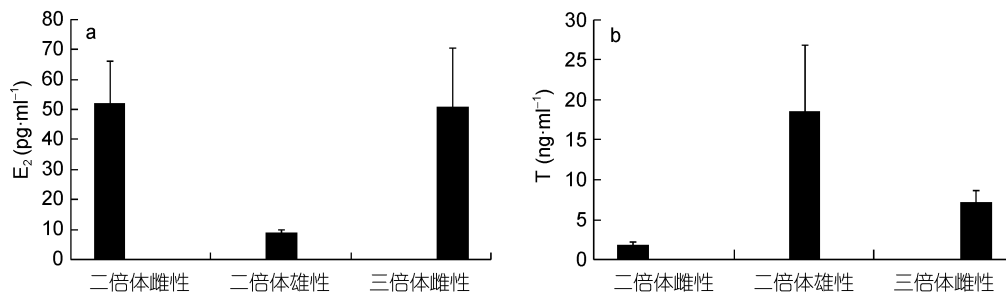


图 4 10 月龄雌性 3n 体(XXX)虹鳟和 2n 体(XX, XY)虹鳟血液 E_2 和 T 含量对照结果

Fig.4 Sex steroid levels of 3n (XXX) and 2n (XX, XY) rainbow trout at 334dpf

3 讨论

众所周知, 虹鳟的性别分化由性染色体所决定, 其自仔鱼首次接受外源性食物之时即开始进入性腺分化时期(Thorgaard *et al.*, 1979; Van Den Hurk *et al.*, 1981)。但鱼类与哺乳动物的性别决定机制存在极大

不同, 而且具有重塑机制, 因为早期大量研究表明, 性类固醇激素对于鲑科鱼类性别分化及性腺发育起关键调节作用, 外源性类固醇激素能将性分化期鱼类的遗传性别表型所逆转(Johnstone *et al.*, 1978; Goetz *et al.*, 1979; Donaldson *et al.*, 1982; Yamazaki, 1983)。本研究发现, 虹鳟的二倍体与三倍体卵巢分化

时间前后相差不大,但分化速度存在差异,三倍体虹鳟卵巢分化速度较慢,其卵细胞及其滤泡细胞的数量远远低于二倍体的,且三倍体的卵细胞及其滤泡细胞形态不规则。尽管三倍体雌性虹鳟能够分化出典型卵巢结构,但卵原细胞及其滤泡细胞数量有限。早期研究认为,雌性三倍体虹鳟卵巢分化失常与第三套染色体干扰了初级卵母细胞第一次减数分裂有关(Thorgaard *et al*, 1979; Chourrout *et al*, 1986)。显然这个结果无法令人满意,尽管在三倍体卵巢发育过程中确实发生了生殖细胞与性腺体细胞互作机制失常的情况,但在该过程性腺特异基因的调控以及与性类固醇激素的协同作用并未被考虑到,可能基因调控在发生性逆转过程中起到了更为关键作用。

虹鳟即便多出一套染色体也能够生存和繁殖,这一点是其他脊椎动物做不到的,四倍体(Carrasco *et al*, 1998)和三倍体(Lincoln *et al*, 1984; Benfey *et al*, 1986)虹鳟精巢与二倍体虹鳟的有相同功能和形态,然而,三倍体雌性虹鳟是一个例外,尽管它们能够存活,且卵巢可以正常分化,但幼鱼发育至5—7月龄时,三倍体虹鳟卵巢仍停滞在Ⅰ期,形态呈线状,颜色透明;而同时期二倍体卵巢已经发育至Ⅱ期,卵巢中聚集这大量卵母细胞和滤泡细胞。该时期三倍体虹鳟卵巢中缺乏卵母细胞,鞘膜细胞不断减少,且形态不规则,卵巢组织间隙出现大量微绒毛,个别卵泡开始空泡化。本研究通过大量观察中发现,从仔鱼上浮开始至5月龄阶段,三倍体卵巢发育非常缓慢,几乎维持在分化末期形态,但卵原细胞及其附属滤泡细胞结构退化严重,这与Krisfalusi等(1999)关于三倍体雌性虹鳟性腺发育的研究结果相一致。虹鳟三倍体与二倍体卵巢形态相比,三倍体卵巢呈线状,并且缺少初级卵母细胞,这与早期研究结果相一致(Thorgaard *et al*, 1979; Lincoln *et al*, 1984; Krisfalusi *et al*, 1996)。本研究发现,在4月龄之前,三倍体雌性虹鳟卵巢就未见清晰可辨认的滤泡细胞层,这说明卵巢组织只有鞘膜细胞在发挥功能,由于缺少滤泡细胞,导致卵细胞与脑垂体性腺轴的联系被切断,因而使得其卵巢始终停滞在早期发育阶段。

有研究报道,在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Ijiri *et al*, 2008)、虹鳟(Baron *et al*, 2005a, b, c; Vizziano *et al*, 2007, 2008b)、鮡(*Gobiocypris rarus*) (Cao *et al*, 2012)和大西洋鳕(*Gadus morhua*) (Haugen *et al*, 2012)卵巢分化过程中, *Cyp19a1a*、*Foxl2* 和 *Bmp4*(Baron *et al*, 2005c; Vizziano *et al*, 2007)等基因

表达量显著上调,但在诱导雌性虹鳟雄性化过程中这些基因被强烈抑制(Baron *et al*, 2007, 2008; Vizziano *et al*, 2008a),尤其是 *Foxl2a*, 在鸟类(Hudson *et al*, 2005)和鱼类(Baron *et al*, 2004; Nakamoto *et al*, 2006; Wang *et al*, 2007)卵巢分化中该基因具有高度保守特征。本研究发现,在幼年期,三倍体雌性虹鳟血清雌二醇含量与二倍体雌性的无显著性差异($P>0.05$),但前者同时期 *Cyp19a1a* 和 *Foxl2* 的表达量显著低于后者,这可能与卵巢体细胞与卵细胞间的互作关系被切断有关。已有大量研究表明,鱼类的雌激素能够强烈诱导 *Foxl2* 表达(Vizziano *et al*, 2007),而且 *FOXL2/Foxl2* 能够上调 *CYP19a/Cyp19a1a* 的表达(Baron *et al*, 2004; Wang *et al*, 2007),因此这两个基因形成了一个正反馈回路。Baron 等(2005c)的研究结果很好地证明了上述观点,即一些雌鱼性腺特异候选基因(如 *Foxl2a*、*Foxl2b* 和 *Cyp19a1a* 等)在雄激素处理时都快速、强烈的被抑制。鱼类雌激素调节 *Foxl2* 的表达以及 *FOXL2/Foxl2* 正向调节 *CYP19/Cyp19a1a*, 这强有力的支持了 *Foxl2* 和雌激素之间具有一个短的正反馈回路的假说(Wang *et al*, 2007; Yamaguchi *et al*, 2007)。*Dmrt1* 被认为是与硬骨鱼类(Koopman *et al*, 2003; Raghuvver *et al*, 2009; Herpin *et al*, 2011)精巢分化密切相关的基因,在鱼类性别分化及发育过程中起着重要作用。Vizziano 等(2007, 2008a)和 Baron 等(2008)的研究表明,雄性化处理除了早期下调雌性相关特异基因,还包括诱导精巢支持细胞中 *Amh*、*Sox9* 和 *Dmrt1* 等雄性特异基因表达上调。本研究发现, *Dmrt1*、*Amh* 和 *Sox9* 在雌性三倍体虹鳟幼鱼阶段呈逐渐上调趋势,且随着睾酮含量的增加,这三个基因的表达显著高于同期在雌性二倍体虹鳟中的表达。在雌性三倍体虹鳟幼鱼早期 *Amh* 和 *Sox9* 表达量低,可能与该时期的雌激素和 *Cyp19a1a* 对它们的抑制有关。Guan 等(2000)和 Baron 等(2008)在利用雄激素处理雌性虹鳟逆转为雄性的研究中也发现类似结果,他们认为,雄激素处理能有效诱导 *Amh* 和 *Sox9* 持续高表达。在使用外源性雄激素处理雌性虹鳟向雄性转变过程中,雄激素显著抑制,并下调了 *Cyp19a1a* 的表达,从而导致了内源性雌激素含量降低,进而使得性腺向雄性化转变。而在雌性三倍体中, *Foxl2* 和 *Cyp19a1a* 表达量下调的诱因不是内源性雌激素含量降低,而是不断升高的雄激素(睾酮),并且睾酮显著上调了雄性特异基因表达,尤其与精巢发育密切相关的基因 *Amh* 和 *Sox9*。因此,说

明性类固醇激素在雌性三倍体虹鳟性腺过程中可能都扮演着重要角色。

总之,在所有脊椎动物研究中,CYP19a 是一种典型体细胞酶,且维持着性腺中 *Cyp19a1a* 表达和内源性血清雌二醇合成,并与体细胞分化状态直接相关。而影响体细胞分化状态的因素可能也依次调控了雌激素合成和卵巢分化结果。在对老鼠卵巢分化的研究发现,雌激素是维持卵巢体细胞分化的必要条件(Britt *et al*, 2003)。因此,维持卵巢分化需要持续高水平的雌激素,这可能是脊椎动物进化过程中的一个保守特征。可以推断雌性三倍体虹鳟卵巢滞育将导致其体细胞去分化,这对于 *Cyp19a1a* 表达及雌二醇的合成存在抑制作用。因为这些雌激素是用来维持它们分化和继续发育的,这可能产生一个负反馈圈,之后去分化会增强。最近有研究表明,通过芳香化酶抑制剂(ATD)处理雌鱼,可使已经分化成雌性的鱼发生雄性化逆转(Nakamura *et al*, 2003; Bhandari *et al*, 2006; Ogawa *et al*, 2008), 这清楚的表明持续高水平雌激素对于维持卵巢分化所起到的决定性作用(或妨碍自生的精巢分化)。

参 考 文 献

- 韩 英, 刘 蔓, 张澜澜等, 2010a. 三倍体雄性虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 生殖发育研究. 东北农业大学学报, 41(7): 94—99
- 韩 英, 刘 蔓, 张澜澜等, 2010b. 三倍体雌性虹鳟卵巢发育的类雄性化趋势. 中国水产科学, 17(4): 739—744
- Baron D, Cocquet J, Xia X H *et al*, 2004. An evolutionary and functional analysis of *FoxL2* in rainbow trout gonad differentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33(3): 705—715
- Baron D, Batista F, Chaffaux S *et al*, 2005a. *Foxl2* gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman. *Reproduction Nutrition Development*, 45(3): 377—382
- Baron D, Fostier A, Breton B *et al*, 2005b. Androgen and estrogen treatments alter steady state messengers RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Molecular Reproduction and Development*, 71(4): 471—479
- Baron D, Houlgatte R, Fostier A *et al*, 2005c. Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biology of Reproduction*, 73(5): 959—966
- Baron D, Houlgatte R, Fostier A *et al*, 2008. Expression profiling of candidate genes during ovary-to-testis trans-differentiation in rainbow trout masculinized by androgens. *General and Comparative Endocrinology*, 156(2): 369—378
- Baron D, Montfort J, Houlgatte R *et al*, 2007. Androgen-induced masculinization in rainbow trout results in a marked dysregulation of early gonadal gene expression profiles. *BMC Genomics*, 8: 357
- Benfey T J, Solar I I, De Jong G *et al*, 1986. Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115(6): 838—840
- Bhandari R K, Nakamura M, Nagahama Y, 2006. Estrogen is essential for the maintenance of female sex in fish. *Journal of Experimental Zoology A*, 305A: 111
- Bogerd J, Blomenröhr M, Andersson E *et al*, 2001. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of Reproduction*, 64(6): 1633—1643
- Brennan J, Capel B, 2004. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, 5(7): 509—521
- Britt K L, Findlay J K, 2003. Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202(1—2): 11—17
- Cao M X, Duan J D, Cheng N N *et al*, 2012. Sexually dimorphic and ontogenetic expression of *dmrt1*, *cyp19a1a* and *cyp19a1b* in *Gobiocypris rarus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 162(4): 303—309
- Capel B, 2000. The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*, 92(1): 89—103
- Carrasco L A P, Doroshov S, Penman D J *et al*, 1998. Long-term, quantitative analysis of gametogenesis in autotriploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Reproduction & Fertility*, 113(2): 197—210
- Chourrout D, Chevassus B, Krieg F *et al*, 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females-potential of tetraploid fish. *Theoretical and Applied Genetics*, 72(2): 193—206
- Devlin R H, Nagahama Y, 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208(3—4): 191—364
- Donaldson E M, Hunter G A, 1982. Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1): 99—110
- Goetz F W, Donaldson E M, Hunter G A *et al*, 1979. Effects of estradiol-17 β and 17 α -methyltestosterone on gonadal differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 17(4): 267—278
- Graves J A M, 2002. The rise and fall of *SRY*. *Trends in Genetics*, 18(5): 259—264
- Guan G J, Kobayashi T, Nagahama Y, 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (*Doublesex/Mab-3*)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(3): 662—666

- Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F *et al*, 2010. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3): 352—366
- Haugen T, Almeida F F L, Andersson E *et al*, 2012. Sex differentiation in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): morphological and gene expression studies. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10: 47
- Herpin A, Scharl M, 2011. *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish. *FEBS Journal*, 278(7): 1010—1019
- Hudson Q J, Smith C A, Sinclair A H, 2005. Aromatase inhibition reduces expression of *FOXL2* in the embryonic chicken ovary. *Developmental Dynamics*, 233(3): 1052—1055
- Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T *et al*, 2008. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biology of Reproduction*, 78(2): 333—341
- Johnstone R, Simpson T H, Youngston A F, 1978. Sex reversal in salmonid culture. *Aquaculture*, 13(2): 115—134
- Koopman P, Loffler K A, 2003. Sex determination: the fishy tale of *Dmrt1*. *Current Biology*, 13(5): R177—R179
- Koopman P, Münsterberg A, Capel B *et al*, 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348(6300): 450—452
- Krisfalusi M, Cloud J G, 1996. Effects of exogenous estradiol-17 β on early growth and gonadal development of diploid and triploid female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental Genetics*, 19(4): 302—303
- Krisfalusi M, Cloud J G, 1999. Gonadal sex reversal in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Zoology Part A*, 284(4): 466—472
- Lincoln R F, Scott A P, 1984. Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 25(4): 385—392
- Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H *et al*, 2000. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1493(1—2): 180—187
- Munger S C, Aylor D L, Syed H A *et al*, 2009. Elucidation of the transcription network governing mammalian sex determination by exploiting strain-specific susceptibility to sex reversal. *Genes & Development*, 23(21): 2521—2536
- Nakamoto M, Matsuda M, Wang D S *et al*, 2006. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(1): 353—361
- Nakamura M, Bhandari R K, Higa M, 2003. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1—4): 113—117
- Ogawa S, Akiyoshi M, Higuchi M *et al*, 2008. 'Post-sex differentional' sex reversal in the female common carp (*Cyprinus carpio*). *Cybiurn*, 32(S2): 102—103
- Orrego R, McMaster M, Van Der Kraak G *et al*, 2010. Effects of pulp and paper mill effluent extractives on aromatase CYP19a gene expression and sex steroid levels in juvenile triploid rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 97(4): 353—360
- Penman D J, Piferrer F, 2008. Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Reviews in Fisheries Science*, 16(S1): 16—34
- Piferrer F, 2011. Endocrine control of sex differentiation in fish. In: Farrell A P ed. *Encyclopedia of Fish Physiology, from Gene to Environment*, Vol.2. San Diego: Academic Press, 1490—1499
- Piferrer F, Ribas L, Díaz N, 2012. Genomic approaches to study genetic and environmental influences on fish sex determination and differentiation. *Marine Biotechnology*, 14(5): 591—604
- Raghuvver K, Senthilkumaran B, 2009. Identification of multiple *dmrt1s* in catfish: localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyltestosterone treatment. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42(5): 437—448
- Sinclair A H, Berta P, Palmer M S *et al*, 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281): 240—244
- Thorgaard G H, Gall G A E, 1979. Adult triploids in a rainbow trout family. *Genetics*, 93(4): 961—973
- Van Den Hurk R, Slof G A, 1981. A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell and Tissue Research*, 218(3): 487—497
- Vizziano D, Randuineau G, Baron D *et al*, 2007. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental Dynamics*, 236(8): 2198—2206
- Vizziano D, Baron D, Randuineau G *et al*, 2008a. Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. *Biology of Reproduction*, 78(5): 939—946
- Vizziano D, Baron D, Mahè S *et al*, 2008b. Estrogen treatment up-regulates female genes but does not suppress all early testicular markers during rainbow trout male-to-female gonadal transdifferentiation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 41(5): 277—288
- Volff J N, Nanda I, Schmid M *et al*, 2007. Governing sex determination in fish: regulatory pushes and ephemeral dictators. *Sexual Development*, 1(2): 85—99
- Wang D S, Kobayashi T, Zhou L Y *et al*, 2007. *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. *Molecular Endocrinology*, 21(3): 712—725
- Wang D S, Zhou L Y, Kobayashi T *et al*, 2010. *Doublesex*- and *Mab-3*-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in tilapia. *Endocrinology*, 151(3): 1331—1340

- Xu G F, Huang T Q, Jin X *et al*, 2016. Morphology, sex steroid level and gene expression analysis in gonadal sex reversal of triploid female (XXX) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1): 193—202
- Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T *et al*, 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and *Foxl2* are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(4): 935—940
- Yamazaki F, 1983. Sex control and manipulation in fish. *Aquaculture*, 33(1—4): 329—354

THE REGULATORY MECHANISM OF OVARY DIFFERENTIATION AND ABORTION OF TRIPLOID FEMALE RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS*

XU Ge-Feng¹, MOU Zhen-Bo², CHEN Huai-Fa³, HANG Tian-Qing⁴, WANG Bing-Qian¹,
GU Wei¹, HU Guo¹, HAN Ying⁴

- (1. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences Institute of Fishery Sciences, Lasa 850032, China;
3. Enhancement and Conservation Station of Aquatic Animal Resources of Heilongjiang Province, Harbin 150018, China;
4. College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Although the genes of sex determination and differentiation of rainbow trout have been identified, such as *cyp19a1a*, *foxl2*, *dmrt1*, *amh* and *sox9*, specific gonadal morphology and regulatory mechanism of sex-specific genes of triploid female rainbow trout (RBT, *Oncorhynchus mykiss*), especially in the early developmental period, have not been fully studied, to which this research was carried out in association with histologic evidence and steroid hormone expression patterns during the development of somatic cells and germ cells. Results demonstrate that the ovary differentiation characteristics for diploid and triploid female rainbow trout were largely the same. The gonads of diploid and triploid female rainbow trout began to differentiate at 84dpf (days post fertilization) and 98dpf, respectively. However, there were obstacles in the differentiation of triploid female RBT gonads. The early development showed stagnation, the oogonium and follicle cells were scarce. For sex specific gene expression, both *foxl2* and *cyp19a1a* expressed in ovary and testis of diploid RBT, and their expressions increased gradually in ovary, while the expression levels were very low in testis. The expression increased at first to the maximum at 274dpf and then decreased. The expressions of *dmrt1*, *amh*, and *sox9* constantly intensified, due probably to the increase in serum T level. At 334dpf, T level was higher in diploid and triploid female serum and the three genes expressions showed a tendency of decrease in diploid RBT ovary. Therefore, a high-level estrogen could maintain fish ovary differentiation, which may be a conservative character in the evolutionary process of vertebrate. The ovary abortion of triploid female RBT could lead to gonadal dedifferentiation, which may inhibit the *cyp19a1a* expression and estradiol synthesis. The inhibition could generate a negative feedback loop after which the dedifferentiation could be strengthened.

Key words rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*; triploid; female pathway; ovary differentiation