

文章编号: 1000-0615(2004)02-0113-06

17 β 雌二醇诱导鲷雌性化的机制

方永强¹, 张为民², 翁幼竹¹, 刘丽丽¹

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 用原位杂交和免疫细胞化学技术, 对服用 17 β 雌二醇实验组和对照组幼年鲷脑各部和性腺进行芳香化酶的定位。结果发现, 芳香化酶转录物和特异性蛋白在幼年鲷端脑(嗅球和大脑)、间脑、中脑和小脑是丰富的。在性别未分化时, 芳香化酶免疫活性细胞在幼鲷脑各部的分布密度有显著的差异。在嗅球, 对照组芳香化酶免疫阳性细胞的分布密度高于实验组, 而在间脑、中脑和小脑实验组免疫阳性细胞数量比对照组多 1~3 倍, 特别是下丘脑视前区芳香化酶的免疫阳性细胞数量尤占优势, 提示芳香化酶在幼年鲷性分化中可能起关键的作用。另外, 在性分化后, 芳香化酶免疫活性还定位在卵巢颗粒细胞和精巢间质细胞与足细胞。同时, 免疫阳性物质也定位在卵巢和精巢的生殖细胞。这些结果揭示了 17 β 雌二醇诱发幼鲷雌性化的机制可能是通过芳香化酶的介导, 本研究首次提供形态学新的证据。最后, 文中还讨论了芳香化酶在鲷性腺发育中可能的生理作用。

关键词: 鲷; 17 β 雌二醇; 诱导; 雌性化

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

The mechanism of estradiol-17 β inducing female sex differentiation in *Mugil cephalus*

FANG Yong-qiang¹, ZHANG Wei-min², WENG You-zhu¹, LIU Li-li¹

(1. Third Institute of Oceanography, State Oceanography Administration, Xiamen 361005, China;

2. School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: *In situ* hybridization and immunocytochemical techniques for aromatase localization in each region of brain and gonads in the experimental group (treated with 17 β -E₂ diet) and control group (without E₂ treatment) of young grey mullets were carried out. The results show that aromatase transcript and specific protein were abundant in the telencephalon (olfactory bulb and cerebrum), diencephalon, mesencephalon and cerebelli of young grey mullets. The distributive density of aromatase immunoreactive cells in each region of brain had obvious difference in the sex undifferentiated period between experimental group and control group. In olfactory bulb, the distributive density of aromatase immunoreactive cells in the control group was higher than that in experimental group, but the density of positive cells in the diencephalon, mesencephalon, and cerebelli in the experimental group were about 1-3 times higher than that in the control group, and the density of aromatase immunoreactive cells showed dominance in the preoptic area of hypothalamus, especially. This suggests that

收稿日期: 2003-03-17

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(30070598); 福建省重中之重资助项目

作者简介: 方永强(1937-), 男, 福建云霄人, 研究员, 主要从事海洋动物生殖内分泌学研究。Tel: 0592-2195277, E-mail: fant98@public.xm.fj.cn

aromatase may play a key role in the sex differentiation of young grey mullets. In addition, after sex differentiation aromatase immunoreactivity was localized in the granular cells of ovary and Leydig cells and Sertoli cells of testis. At the same time, aromatase immunopositive substance also distributed in the germ cells of ovary and testis. These results revealed that the mechanism of 17β -E₂ inducing feminization may be mediated by aromatase. The study will provide for the first time a new proof. Finally, the physiological role of aromatase in the gonadal development was discussed in the paper.

Key words: *Mugil cephalus*; estradiol- 17β ; induction; feminization

在探讨 17β 雌二醇 (estradiol- 17β , E₂) 诱发雌性化的机制中^[1,2], 虽已发现 17β 雌二醇通过正反馈机制可促进鲮脑垂体促性腺激素细胞提早发育成熟, 并进入分泌活动^[3], 初步揭示 E₂ 的重要作用, 但仍未找到 E₂ 诱发鲮雌性化的确凿机制。现有资料^[4,5] 指出, 芳香化酶 (aromatase) 是类固醇激素合成路线中催化雄激素 (如睾酮和雄烯二酮) 转变为雌激素的关键酶。它广泛存在于脊椎动物 (从鱼类到哺乳类) 的脑和垂体中, 但在鱼类 (金鱼和鳉科鱼类) 脑和垂体中水平比其它脊椎动物高出 100 倍, 并认为是性别分化的一种调节开关。为此, 取实验组 (服药 1 个月幼鲮) 和对照组 (不服药) 性腺尚未分化幼鲮脑和性分化后雌雄脑和性腺进行芳香化酶的原位杂交和免疫细胞化学研究, 目的在于揭示 17β 雌二醇诱发鲮性分化的机制。我们的研究结果首次发现 17β 雌二醇诱导实验组丘脑下部视前区芳香化酶免疫活性细胞的数量明显多于对照组, 为 E₂ 诱发鲮性分化机制提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

鲮 (*Mugil cephalus* L) 购自从厦门海区捕获的野生苗, 体长 3.1~5.0 cm, 体重 0.68~1.20 g, 放在龙海市福建省水产研究所苗种繁殖中试基地的土池中养殖至幼鲮。取服用含有 17β 雌二醇饲料达 1 个月的实验组与对照组 (饲料中不含激素) 各 20 尾, 雌雄鲮各 10 尾。全部实验材料都是先在实验室暂养 3 d, 用丁香酚麻醉, 小心仔细取出脑 (从端脑至后脑) 和性腺, 分别在不含醋酸 Bouin 和 Bouin-Holland 氏液中, 4℃ 固定 24 h (性腺例外), 然后按常规梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 连续纵切或横切, 厚 5~6 μm, 分别用于免疫细胞化学染色反应和 H-E 染色, 前者确定芳香化酶免疫活性细胞在脑各部的定位及其分布, 后者用于确定幼

鲮脑各部的的位置及其相互关系, 并参照 Hibiya 氏^[6]《鱼类组织学图谱》第三章神经系统中关于脑各部的划分及脑神经核团的特征, 尤其是下丘脑各部的精确定位, 在熟悉了解鲮脑各部神经细胞特点之后, 才进行芳香化酶在脑各部位的分布研究。

1.2 原位杂交的样品制备

鲮脑在新配制 4% 多聚甲醛溶液中, 在 4℃ 固定 24 h, 过夜, 接着在 4℃ 系列酒精脱水 (用 10% DEPC 处理水配制), 最后在 4℃ 二甲苯过夜, 石蜡包埋, 连续纵切或横切, 厚 6 μm, 裱贴在预先用多聚赖氨酸处理的载玻片上。

1.3 原位杂交及其显色

组织切片脱蜡至水, 进入用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水配制磷酸盐缓冲液 (PBS) 中 5 min, 然后在新配制 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶中, 在 37℃ 消化 1~2 min, 后加入预杂交液, 在 37℃ 持续 4 h, 接着切片孵育在杂交缓冲液含有人工合成鱼类芳香化酶 mRNA 寡核苷酸探针 ($1.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 在湿盒中 42℃ 过夜。杂交后切片用 $2\times$ 氯化钠和柠檬酸三钠配制的缓冲液 (SSC)、 $0.5\times$ SSC、 $0.2\times$ SSC 在 37℃ 分别冲洗 15 min, 在生物素化鼠抗地高辛抗体 (1:500 稀释), 在室温湿盒中孵育 2 h, 切片在 $0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 中冲洗 4 次, 5 min, 滴加 SABC (链霉亲和素-生物素复合物), 在 37℃ 孵育 20 min, 最后, 滴加生物素化过氧化物酶在 37℃ 孵育 20 min, 杂交信号在 DAB (3',3'-二氨基联苯胺) 溶液孵育 20~30 min 后显色。在光镜下 ($\times 400$) 观察实验组和对照组脑各部各 5 张切片, 计数 0.25mm^2 阳性杂交细胞的平均数量, 判断实验组和对照组芳香化酶阳性细胞的分布密度及数量的差异。

阴性对照如下设置: (1) 将切片用 RNA 酶进行预处理后杂交; (2) 以不含探针的杂交液进行杂交; (3) 用正常小鼠血清取代小鼠抗地高辛抗体进

行杂交。

1.4 免疫细胞化学反应

脑组织和性腺切片脱蜡水化后, 放入含 0.3% H_2O_2 甲醇液中 10 min, 除去内源性过氧化物酶活性, 接着按免疫细胞化学染色方法(SABC法), 组织切片滴加第一抗体鼠抗人胎盘芳香化酶抗体(1:300 稀释), 在 4℃ 孵育 36~42 h, PBS 洗 3 次。用羊抗鼠 IgG (1:100 稀释) 室温孵育 30 min, 滴加 SABC (1:100) 室温孵育 30 min, 最后在 DAB 中用 10~30 min 完成抗原显色。

阴性对照: 省去一抗或用正常小鼠血清替代一抗孵育切片。

2 结果

原位杂交和免疫细胞化学的结果显示, 芳香化酶杂交信号和免疫阳性细胞为深棕色, 背景轻黄或不着色, 免疫阳性细胞容易识别鉴定。两种阴性对照显示阴性反应。

2.1 芳香化酶在性分化前幼年鳊脑各部的分布

性分化前芳香化酶在脑各部定位的结果揭示, 芳香化酶转录物和蛋白广泛地分布在实验组和对照组鳊脑各部, 包括端脑(嗅球和大脑)、间脑、中脑和小脑。脑各部免疫活性细胞主要定位在嗅球中神经细胞体、大脑半球中部与外侧、间脑中

下丘脑视前区、中脑视顶盖及其下方纵隆突和小脑体, 免疫阳性物质沿胞膜分布, 显深棕色, 核不着色(图版-1, 2, 3)。统计实验组和对照组芳香化酶免疫活性细胞在脑各部的分布密度, 发现两组在各部之间有显著差异(表 1)。从表中可看出: (1) 实验组从端脑的前端嗅球开始至小脑体, 芳香化酶免疫活性细胞密度逐步上升, 在小脑体最长达 $137.1 \text{ cell} \cdot 0.25 \text{ mm}^{-2}$, 而对照组则从嗅球开始有较高密度, 尔后至中脑逐渐下降, 到小脑体又上升; (2) 比较实验与对照组在性分化前脑各部芳香化酶免疫阳性细胞的分布密度, 除对照组在嗅球多于实验组以及在小脑两组分布密度没有显著差异外, 其余各部出现显著的差异, 在大脑、间脑和中脑实验组芳香化酶免疫阳性细胞数量和免疫反应强度均比对照组多和强。这里特别要指出, 在间脑的下丘脑视前区比对照组多 2.6 倍(图版-4, 5)。

2.2 性分化后鳊脑各部芳香化酶的分布

从表 2 看出, 性分化后雌雄鳊芳香化酶在脑各部的分布密度仍存在显著的差异, 尤其是雌鱼在嗅球、大脑半球和下丘脑视前区芳香化酶免疫阳性细胞数量多于雄鱼, 达 1.5~7 倍, 但免疫强度则不同于性分化前, 雌雄没有显著差异。

表 1 芳香化酶免疫活性细胞在性分化前幼鳊脑各部的分布密度

Tab. 1 The density of aromatase immunoreactive cells in each region of brain

in the young grey mullets before sex differentiation

cell $\cdot 0.25 \text{ mm}^{-2}$

	嗅球 olfactory bulb	大脑半球 cerebral hemisphere	间脑视前区 diencephalon pre-optic area	中脑纵隆突 torus longitudinalis of mesencephalon	小脑体 corpus cerebelli
实验组 exp. group	54.5	70.0	71.2	107.0	8137.1
对照组 cont. group	71.6	44.0	27.3	38.3	115.1

表 2 芳香化酶免疫活性细胞在雌雄鳊脑各部分布密度的比较

Tab. 2 The density of aromatase immunoreactive cells in each region of brain in female

and male grey mullets

cell $\cdot 0.25 \text{ mm}^{-2}$

	嗅球 olfactory bulb	大脑半球 cerebral hemisphere	间脑视前区 diencephalon pre-optic area	中脑纵隆突 torus longitudinalis of mesencephalon	小脑体 corpus cerebelli
雌性 female	123.3	119.3	64.7	76.7	197.0
雄性 male	17.4	84.7	39.0	55.2	248.8

2.3 芳香化酶在鳊性腺的分布

芳香化酶免疫活性物质分别定位在卵原细胞

胞核, 显强的免疫阳性, 胞质显免疫阴性, 而小生长期卵母细胞则定位在胞质和核仁膜(图版-6),

核质免疫阴性反应。在大生长期卵母细胞芳香化酶免疫阳性定位在卵被膜和卵黄泡膜上。在精巢,芳香化酶免疫阳性物质定位在精原细胞和初级精母细胞,而次级精母细胞、精子细胞和精子则免疫阴性。另外,芳香化酶免疫活性还定位在卵巢颗粒细胞(图版-7),以及精巢的间质细胞和足细胞(图版-8)。

3 讨论

原位杂交和免疫细胞化学研究一致揭示芳香化酶组织特异性定位在性分化前后鲮鱼嗅球、大脑、间脑、中脑和小脑等各部分,芳香化酶的转录物及其蛋白在脑各部神经细胞胞质表达,表明鲮鱼像大多数脊椎动物一样,芳香化酶在脑内有广泛分布。

在硬骨鱼类,雄激素和雌激素是担负着雄性和雌性性别分化的物质。长期以来,一直令人费解的问题是外源性类固醇激素是如何启动鱼类的性分化。如果假设外源性类固醇激素能够模拟内源性类固醇激素的作用,起着自然性别的诱导者,那么,类固醇激素如 17β 雌二醇又是如何诱导鱼类的性分化?虽然有许多资料证明芳香化酶是鱼类卵巢分化的关键酶^[7],作为性别分化的一种调节开关^[5],并通过在饲料中添加芳香化酶抑制剂于性分化前的鱼类,达到人为定向控制鱼类性别的目的。还证明芳香化酶确实在性分化中起作用,这在鱼类和爬行类已得到证实^[4,8,9]。然而,这些学者的研究却未能回答 17β 雌二醇是如何影响脑和性腺中芳香化酶的免疫活性,而明了这个问题,也许能够回答 E_2 影响性分化的机制。因此,本研究发现幼鲮在性分化前服用 17β 雌二醇1个月后,实验组和对照组脑各部芳香化酶免疫活性细胞的分布密度和免疫强度在脑各部有显著差异,尤其是在下丘脑视前区实验组和对照组分布密度相差2.6倍。这种差别对于揭示在幼鲮性分化机制中芳香化酶所起的关键作用,具有十分重要的生理意义。理由是:(1)下丘脑视前区已公认是调节鱼类生殖功能的内分泌中枢^[10],芳香化酶通过催化雄激素转变为雌激素影响该中枢的生理活动;(2)Trant等^[11]在斑马鱼幼鱼发现有两种细胞色素P450芳香化酶基因(CYP19a和CYP19b),在大多数情况下性腺形式CYP19a基因比脑形式CYP19b更为丰富,而CYP19b基因可能

与性别分化相关。理由是这种基因属性腺外启动子,含有雌激素应答元件,而性腺启动子CYP19a则缺乏这些元件,对雌激素不应答。由此使我们有理由认为用鱼类特异性芳香化酶mRNA寡核苷酸探针进行原位杂交,芳香化酶在视前区表达,提示很有可能是属于CYP19b基因形式的芳香化酶,直接参与性别分化。因此,我们认为 17β 雌二醇诱导幼鲮性分化机制是通过芳香化酶介导实现的。至于视前区芳香化酶是如何通过基因机制启动性分化,这是十分复杂的问题,仍有待深入研究。

其次,我们对对比性分化前后雌雄鲮脑中芳香化酶免疫活性的分布密度依然是雌性大于雄性,尤其是雌雄鲮鱼端脑嗅球芳香化酶分布密度相差7倍,而且在性分化前后也相差约有2.5倍,这种差异的意义在于,它表明端脑嗅球中芳香化酶的生理作用更为突出,Callard等^[12]证实循环雄激素首先必须先先在脑内(现已查明主要在端脑,如嗅球)通过芳香化酶催化转变为雌激素才能对脑垂体促性腺激素分泌细胞起反馈调节。至于中脑和小脑芳香化酶的作用仍有待研究。另外,芳香化酶在鲮性腺的表达,除证实Lanzino等^[13]和Young等^[14]分别在大鼠和鱼类发现芳香化酶存在卵巢颗粒细胞和精巢足细胞与间质细胞外,还表明鲮卵巢颗粒细胞以及精巢的间质细胞,可能还有足细胞在类固醇激素合成路线中芳香化酶起着重要的作用,关于芳香化酶在生殖细胞的存在及其作用,仍然需要进一步研究。

参考文献:

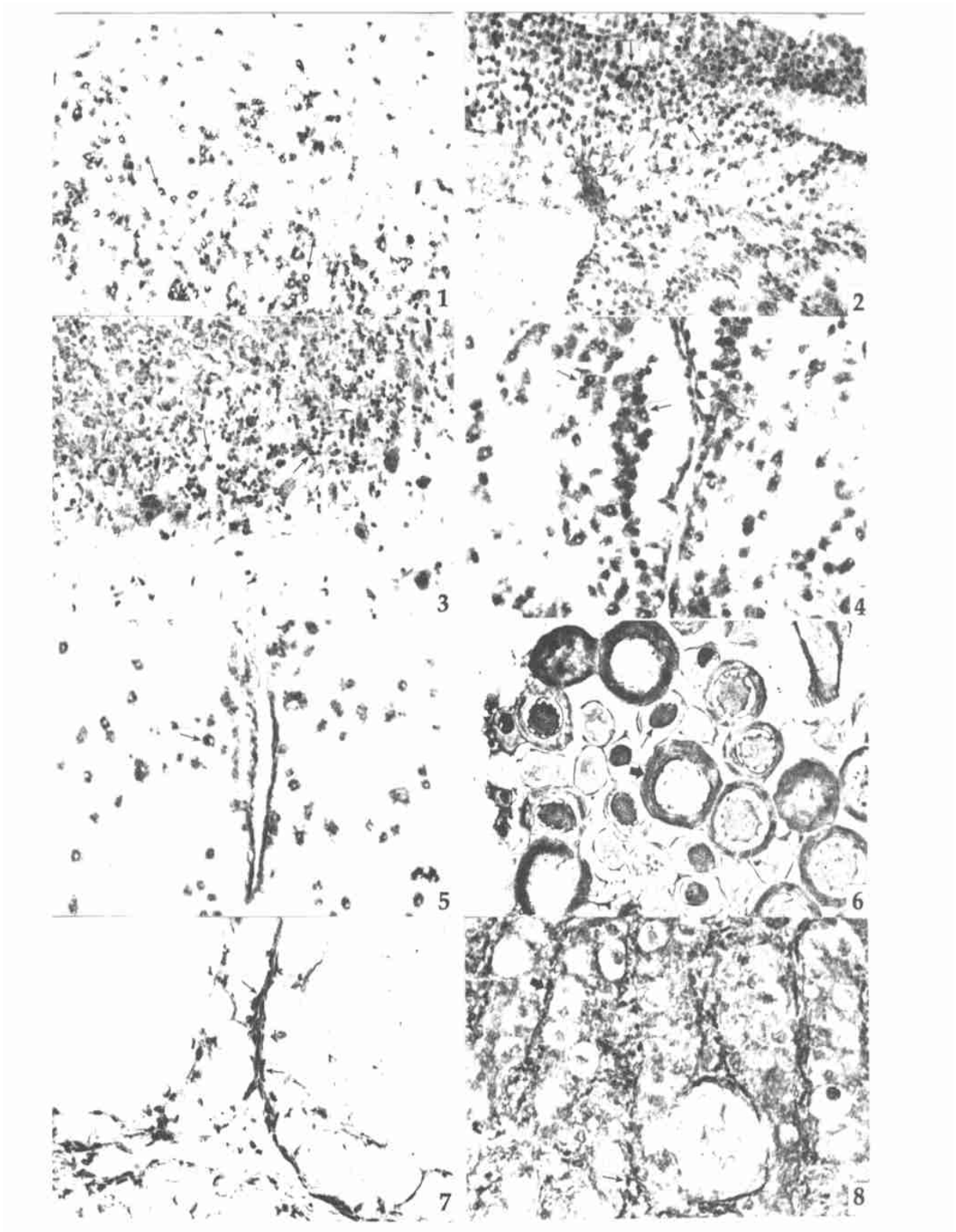
- [1] Fang Y Q, Weng Y Z, Lin J Z, et al. Studies on the cultivation of all female in *Mugil cephalus* [J]. J Fish China, 2001, 25(2): 131-135. [方永强,翁幼竹,林君卓,等.全雌鲮培育的研究[J].水产学报,2001,25(2):131-135.]
- [2] Weng Y Z, Lin J Z, Fang Y Q, et al. Further study on all female cultivation of juvenile grey mullet *Mugil cephalus* [J]. J Ocean Taiwan Strait, 2001, 20(4): 547-551. [翁幼竹,林君卓,方永强,等.全雌鲮培育的进一步研究[J].台湾海峡,2001,20(4):547-551.]
- [3] Lin J Z, Weng Y Z, Fang Y Q. Effect of 17β estradiol on secretory activity of gonadotropin cells in grey mullet (*Mugil cephalus*) [J]. J Ocean Taiwan Strait, 2002, 21(4): 452-456. [林君卓,翁幼竹,方永强. 17β 雌二醇对鲮鱼脑垂体促性腺激素细胞分泌活动的影响[J].台湾海峡,2002,21(4):452-456.]

- [4] Hong W S, Fang Y Q. Advances on aromatase activity in fish [J]. J Fish China, 2000, 24(3): 285- 288. [洪万树, 方永强. 鱼类芳香化酶活性研究进展 [J]. 水产学报, 2000, 24(3): 285- 288.]
- [5] Pierrer F, Zanuy S, Larillo M, *et al.* Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males [J]. J Exp Zool, 1994, 270: 255- 262.
- [6] Hibiya T. An atlas of fish histology: normal and pathological features [M]. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York, 1985. 32- 41.
- [7] Guiguen Y, Ricordel M J, Fostier A. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): *in vivo* treatments, aromatase gene expression [J]. J Exp Zool, 1998, 281: 506- 512.
- [8] Richard-Mercier N, Dorizzi M, Desvages G, *et al.* Endocrine sex reversal of gonads by the aromatase inhibitor letrozole (CGS 20267) in *Emys orbicularis*, a turtle with temperature-dependent sex determination [J]. Gen Comp Endocrinol, 1995, 100: 314- 326.
- [9] Afonso L O B, Campbell P M, Iwama G K, *et al.* The effects of the aromatase inhibitor fadrozole and two polynuclear aromatic hydrocarbons on sex steroid secretion by ovarian follicles of coho salmon [J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 106: 169- 174.
- [10] Peter R E, Yu K L. Neuroendocrine regulation of ovulation in fish: basic and applied aspects [J]. Review in Fish Biology and Fisheries, 1997, 7: 173- 197.
- [11] Trant J M, Gavasso S, Ackers J, *et al.* Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*) [J]. J Exp Zool, 2001, 290: 475- 483.
- [12] Callard G V, Petro Z, Ryan K J. Biochemical evidence for aromatization of androgen to estrogen in the pituitary [J]. Gen Comp Endocrinol, 1981, 44: 359- 364.
- [13] Lanzino M, Catalano S, Genissel C, *et al.* Aromatase messenger RNA is derived from the proximal promoter of the aromatase gene in Leydig, Sertoli and germ cells of the rat testis [J]. Biol Reprod, 2001, 64: 1439- 1443.
- [14] Young G, Kagawa H, Nagahawa Y, *et al.* Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation [J]. Biol Reprod, 1983, 29: 310- 315.

图版说明 Explanation of Plate

1. 实验组幼鳕原位杂交显示芳香化酶免疫活性(箭头)在端脑嗅球表达, $\times 400$; 2. 实验组幼鳕原位杂交显示芳香化酶免疫活性细胞(箭头)分布在中脑, $\times 400$; 3. 实验组幼鳕原位杂交显示芳香化酶免疫活性细胞(箭头)分布在小脑, $\times 400$; 4. 实验组原位杂交显示幼鳕下丘脑视前区高的芳香化酶免疫活性细胞(箭头)分布密度, $\times 550$; 5. 对照组原位杂交显示幼鳕下丘脑视前区低的芳香化酶免疫活性细胞(箭头)分布密度, $\times 550$; 6. 芳香化酶免疫阳性物质分布在卵原细胞胞核(细箭头)和早期卵母细胞胞质(粗箭头)与核仁膜, 而卵原细胞胞质和卵母细胞核质免疫阴性反应, $\times 400$; 7. 芳香化酶免疫活性定位在鳕卵巢颗粒细胞(箭头), $\times 400$; 8. 芳香化酶免疫活性定位在鳕精巢足细胞(细箭头)和间质细胞(粗箭头), $\times 400$

1. In the experimental group, aromatase immunoreactive cells expressed in the olfactory bulb of telencephalon by *in situ* hybridization in young grey mullet, $\times 400$; 2. In the experimental group, aromatase immunoreactive cells distributed in mesencephalon by *in situ* hybridization in young grey mullet, $\times 400$; 3. In the experimental group, aromatase immunoreactive cells distributed in cerebelli by *in situ* hybridization in young grey mullet, $\times 400$; 4. In the experimental group, the preoptic area of hypothalamus in young grey mullet showed high intensity of aromatase immunostaining by *in situ* hybridization, $\times 550$; 5. In the control group, the preoptic area of hypothalamus in young grey mullet showed low intensity of aromatase immunostaining by *in situ* hybridization, $\times 550$; 6. Aromatase immunopositive substance distributed in the nucleus of oogonia (thin arrow) and the cytoplasm (thick arrow) and nucleolar membrane of early oocyte, but the cytoplasm of oogonia and nucleolar cytoplasm of oocyte showed immunonegative reaction, $\times 400$; 7. Aromatase immunoreactivity were localized in the granular cell of ovary in grey mullet, $\times 400$; 8. Aromatase immunoreactivity were localized in the Sertoli cell (thin arrow) and Leydig cell (thick arrow) of testis in grey mullet $\times 400$



图版 Plate