

四川裂腹鱼脑型芳香化酶 *Cyp19b* 基因组织分布及温度对其表达水平的影响

何勇凤 朱永久 郭威 杨德国* 吴兴兵

中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业部淡水生物多样性保护重点实验室 武汉 430223

摘要: 为研究脑型芳香化酶基因 *Cyp19b* 在四川裂腹鱼 (*Schizothorax kozlovi*) 早期性别分化中的作用, 采用 RACE 方法从四川裂腹鱼脑中扩增得到该基因 cDNA 全长序列, 并应用荧光定量 RT-PCR 技术测定该基因 mRNA 的相对表达量, 探讨该基因在不同规格四川裂腹鱼鳃、脑、心、肝、脾、肾、肌肉、精巢、卵巢组织中的表达差异, 以及温度对其早期仔鱼阶段该基因表达的影响。四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因的 cDNA 全长序列共 3 021 bp, 共编码 507 个氨基酸, 属于脑型芳香化酶基因; 四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因编码的氨基酸序列与其他鱼类脑型芳香化酶基因编码的氨基酸序列同源性可达 70% 以上, 而与性腺型芳香化酶基因编码的氨基酸序列同源性较低, 为 64% 左右; 四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因仅在脑组织中表达, 具有比较高的组织特异性, 且随着个体的增长, 逐渐呈现显著的雌雄差异; 对不同温度处理 12 日龄仔鱼 6 d 后, 低温 (10°C 和 14°C) 能显著促进 *Cyp19b* 基因表达量的升高, 但高温 (26°C) 却对其表达量无显著影响。由此推测, 脑型芳香化酶基因 *Cyp19b* 可能在低温导致四川裂腹鱼雌性化过程中发挥着重要作用。

关键词: 四川裂腹鱼; *Cyp19b*; 组织表达; 温度

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 02-281-10

Tissue Distribution of Brain Aromatase Gene *Cyp19b* in *Schizothorax kozlovi* and Temperature Effects on Its Expression

HE Yong-Feng ZHU Yong-Jiu GUO Wei YANG De-Guo* WU Xing-Bing

Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture of China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: Previous studies by authors indicated that low temperature could result in more females of *Schizothorax kozlovi* during the early developmental stage. In order to elucidate the role of *Cyp19b* in sex differentiation of *S. kozlovi*, the full length cDNA of *Cyp19b* was cloned from the brain of *S. kozlovi* by using rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. Relative mRNA expression levels of *Cyp19b* were determined by using quantitative real-time PCR (RT-PCR). Then the differences of *Cyp19b* mRNA

基金项目 中国水产科学研究院长江水产研究所所长基金项目, 现代农业人才支撑计划项目 (No. 2130106);

* 通讯作者, E-mail: yangdg@yfi.ac.cn;

第一作者介绍 何勇凤, 女, 博士; 研究方向: 鱼类生态学和保护遗传学; E-mail: heyf@yfi.ac.cn。

收稿日期: 2015-07-31, 修回日期: 2015-10-15 DOI: 10.13859/j.cjz.201602014

expression levels in gills, brain, heart, liver, spleen, kidney, muscle, testis and ovary among different body-sized groups were discussed, while temperature effects on its expression during the larval stage of *S. kozlovi* were evaluated. The full length cDNA of *Cyp19b* was 3 021 bp, which encoded 507 amino acids and belonged to brain aromatase gene; the deduced amino acid sequence of *Cyp19b* of *S. kozlovi* had more than 70% identity compared with brain aromatase genes of other teleost fishes, but only around 64% when compared with gonadal aromatase genes of other teleost fishes. The mRNA expression of *Cyp19b* of *S. kozlovi* only appeared in brain but not in other tissues, presenting relatively high tissue specificity. One-Way Analysis of Variance (ANOVA) revealed that the mRNA expression levels of *Cyp19b* were not significantly different between females and males in small body-sized samples (mean standard length was 12 cm), but gradually showed significant difference between females and males in large body-sized samples (mean standard length was 26 cm) (Fig. 3). Larvae at 12 days of hatching were cultured in five different temperature groups, and ANOVA revealed that six days later the mRNA expression levels of *Cyp19b* were significantly increased by low temperature (10°C and 14°C), but not influenced by high temperature (26°C) (Fig. 4). The present results suggest that brain aromatase gene *Cyp19b* may play important roles in the feminization of *S. kozlovi*, which is affected by low temperature during the early developmental stage.

Key words: *Schizothorax kozlovi*; *Cyp19b*; Tissue expression; Temperature

四川裂腹鱼 (*Schizothorax kozlovi*), 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 裂腹鱼属裂尻鱼亚属 (*Racomia*) (乐佩琦等 2000), 是处于原始等级的裂腹鱼类 (曹文宣等 1981), 也是长江上游的特有鱼类, 仅分布于我国长江上游的金沙江、雅砻江、赤水河上游和乌江上游等青藏高原和云贵高原海拔较低的边缘地区 (伍律等 1989, 乐佩琦等 2000, 吴金明等 2010)。它生长缓慢, 性成熟较迟, 存在雄鱼较雌鱼早成熟现象, 繁殖力低 (陈永祥等 1997)。同时, 它也是一种亚冷水性鱼类, 其野外适宜的生存温度范围一般为 7 ~ 24°C。目前由于受过度捕捞、水质污染及水利水电工程修建等人类活动的影响, 四川裂腹鱼适宜的栖息、繁殖、摄食和洄游场所已遭到严重破坏, 其种群数量、遗传多样性以及分布区域正在急剧减少, 生态稳定性已渐脆弱 (邹习俊 2009, 陈永祥 2013)。作者前期研究发现低温 (10°C) 会导致四川裂腹鱼群体性比失衡。随着近年来全球气候的不断变化, 极端温度逐渐呈现, 四川裂腹鱼作为长期适应于亚洲高原边缘地区亚高寒环境的冷

水性鱼类, 更易受温度变化的影响, 其种群发展的稳定性和可持续性受到严重威胁。

鱼类的性别决定与分化是一个可塑的发育过程, 在其早期发育阶段, 通常易受到众多环境因素的影响, 如水体温度、光照、pH、溶氧以及养殖密度等, 其中温度是最主要的环境影响因素 (Devlin et al. 2002, Baroiller et al. 2009)。芳香化酶 (aromatase) 作为雌激素生物合成中的关键限速酶, 其基因的表达及活性在鱼类生殖细胞的发生、性别分化及性腺发育成熟等过程中起到重要作用, 尤其在温度对鱼类性别分化影响过程中起到了关键性作用 (D'Cotta et al. 2001, Ijiri et al. 2008, Navarro-Martín et al. 2011, Shen et al. 2014)。在硬骨鱼类中, 芳香化酶至少由两种基因编码, 即性腺型芳香化酶基因 (*Cyp19a*) 和脑型芳香化酶基因 (*Cyp19b*), 且鱼类脑中的芳香化酶表达量通常是哺乳动物兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) 脑的 100 ~ 1 000 倍 (Pasmanik et al. 1988)。鱼类脑型芳香化酶基因 *Cyp19b* 主要分布于脑和垂体中 (Piferrer et al. 2005), 具有明

显的时间和空间分布特异性 (Piferrer et al. 2005, 邓思平等 2008, 曹梦西等 2009, 孙晶等 2012)。

本研究采用 RACE 方法从四川裂腹鱼脑中分离克隆了 *Cyp19b* 基因 cDNA 的全长序列, 应用荧光定量 RT-PCR 技术分析了该基因在不同组织和不同规格个体中的表达模式, 以及不同温度对其仔鱼期 mRNA 表达量的影响, 旨在探讨四川裂腹鱼脑型芳香化酶 *Cyp19b* 基因在其早期性别分化中的作用, 为深入研究其温度依赖型性别分化机制奠定基础, 并为其资源保护和利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

实验所用四川裂腹鱼成鱼和初孵仔鱼均取自毕节市水产技术推广站, 初孵仔鱼的培育温度为 16~17℃, 12 日龄时运输回中国水产科学研究院长江水产研究所武汉研究中心, 平衡温度后放入不同温度 (10℃、14℃、18℃、22℃ 和 26℃) 循环水养殖系统中培育, 每个温度组 3 个平行, 分别于 12 日龄和 18 日龄每个平行取样 3 尾用于荧光定量 PCR 检测 *Cyp19b* 基因在仔鱼阶段的表达情况。

基因克隆所用样本为雌性四川裂腹鱼成鱼的整个脑组织; 实时荧光定量 RT-PCR 所用样本为两种不同规格四川裂腹鱼的鳃、脑、心、肝、脾、肾、肌肉、精巢、卵巢组织样品, 以及不同温度组四川裂腹鱼仔鱼全鱼样本。所取样本立即投入液氮进行保存, 随后转入 -80℃ 冰箱中保存, 用于 RNA 提取。两种不同规格四川裂腹鱼体长和体重差别较大, 其中, 小规格雌性和雄性个体体长分别为 (11.73 ± 1.20) cm 和 (12.68 ± 0.91) cm, 体重分别为 (25.68 ± 6.24) g 和 (32.58 ± 7.13) g ($n = 4$); 大规格雌性和雄性个体体长分别为 (25.83 ± 2.41) cm ($n = 4$) 和 (26.47 ± 3.53) cm ($n = 3$), 体重分别为 (266.05 ± 74.38) g ($n = 4$) 和 (274.00 ± 113.18) g ($n = 3$)。性腺组织学切片显示,

小规格雌性和雄性个体性腺发育均处于 I 期, 大规格雌性和雄性个体性腺发育分别处于 II 期和 III 期。

1.2 基因克隆

采用 Trizol Reagent (Invitrogen, USA) 提取样品总 RNA, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 利用 NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) 测定样品 RNA 的浓度和纯度。以总 RNA 为模板, 以 OligodT₁₈ 为引物, 按照 Revert-Aid 第一链 cDNA 合成试剂盒 (Thermo Scientific) 说明书合成样品 cDNA 第一链。

根据 GenBank 中多种鱼类 *Cyp19b* 基因保守区域设计简并引物 (*Cyp19b*-P, 表 1), 以上述第一链 cDNA 为模板, PCR 扩增 *Cyp19b* 基因的核心序列。然后, 根据已得到的核心序列设计 5'-RACE 引物 (*Cyp19b*-5'-P1, P2, P3, 表 1) 和 3'-RACE 引物 (*Cyp19b*-3'-P1, P2, 表 1), 分别根据 5'-RACE cDNA 快速扩增试剂盒 (Invitrogen, USA) 和 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, USA) 说明书进行 PCR 扩增反应, 获得 5'-RACE 和 3'-RACE 产物。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 2 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 切下目的片段, 利用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, German) 回收试剂盒进行纯化。将回收产物连接到 pMD18-T (Takara, 大连) 载体, 连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞进行扩大培养, 经鉴定后将阳性克隆测序。

1.3 序列分析

采用 DNASTar 软件将核心序列、5'-RACE 序列和 3'-RACE 序列进行拼接, 得到四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因的全长 cDNA 序列。运用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性分析。运用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>) 寻找开放阅读框。采用 DNAMAN 软件推导四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基

因相应的氨基酸序列，并将其氨基酸序列与其他物种如硬骨鱼类、两栖类、鸟类和哺乳类等氨基酸序列进行多重比对。采用 MEGA 6.0 软件构建四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因的邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统进化树，并进行 1 000 次 bootstraps 验证。

1.4 实时荧光定量 PCR

利用 Real-time PCR 法检测 *Cyp19b* 基因在四川裂腹鱼的不同组织、不同规格以及不同温度条件下仔鱼阶段的表达情况。采用 Dnase I 处理各样品的总 RNA，以 OligodT₁₈ 为引物反转录合成样品 cDNA 第一链。根据获得的 *Cyp19b* 基因的全长 cDNA 序列设计荧光定量 PCR 特异性引物 (*Cyp19b*-RT-PCR, 表 1)，以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。同时，以 β -actin 为内参基因，采用其特异性引物 (β -actin-RT-PCR, 表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μ l，含 10 μ l Power SYBR Green PCR 预混液、上游和下游引物各 0.25 μ mol/L 和 5 μ l 模板。PCR 反应条件为：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；95 $^{\circ}$ C 10 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，40 个循环；65 $^{\circ}$ C 5 s，95 $^{\circ}$ C 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因的相对表达量。

1.5 统计分析

采用 STATISTICA 软件中单因素方差分析

(ANOVA) 及 Duncan's 多重比较检验法对不同组织、不同规格、不同温度组四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因相对表达量进行统计学分析，显著水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因 cDNA 全长序列

利用 DNAStar 软件拼接后，得到四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因的 cDNA 全长序列，GenBank 登录号为 KT285553。该基因全长 3 021 bp，其中开放阅读框 (open reading frame, ORF) 1 524 bp，5'非翻译区 (5'-UTR) 115 bp，3'非翻译区 (3'-UTR) 1 382 bp，3'-UTR 区具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 Poly (A) 尾 (图 1)。该基因共编码 507 个氨基酸，推算的蛋白质相对分子质量约为 57.8 ku。该氨基酸序列具有细胞色素 P450 家族典型的保守区序列，与其他芳香化酶类似，四川裂腹鱼芳香化酶也包含 I-螺旋区 (I-helix region)、芳香化酶特异保守区 (aromatase specific substrate binding region) 和血红素结合区 (heme-binding region) (图 1)。

2.2 四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因同源性分析

四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因编码的氨基酸序列与其他鱼类脑型芳香化酶基因编码的氨基酸

表 1 克隆和表达四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因序列所用引物

Table 1 Primers used for cloning and expression of *Schizothorax kozlovi Cyp19b*

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>Cyp19b</i> -P	TGGTKRYTGGGYCTNGGBCC AGKATGSCYTTTCRTCATMACCAT	扩增中间片段 Fragment PCR
<i>Cyp19b</i> -5'-P1	CAAACCTCCCAGTGTA	5' RACE PCR
<i>Cyp19b</i> -5'-P2	CTTTGATCCAGACCCGAGCA	5' RACE PCR
<i>Cyp19b</i> -5'-P3	TTTTCGTTGTAGTAGTTGCATG	5' RACE PCR
<i>Cyp19b</i> -3'-P1	CTACCGAGTGGCGAAGGGGACGAAC	3' RACE PCR
<i>Cyp19b</i> -3'-P2	ACCGTCCCAGTCGTTACTTCCAGC	3' RACE PCR
<i>Cyp19b</i> -RT-PCR	TTCTGCGCTGTATCGTTGTG CCCATTTCATCCTGCAGCTC	用于荧光定量 PCR Relative real-time PCR
β -actin-RT-PCR	TAGCCTCTCTCGGTCAGGAT ACACTGTGCCCATCTACGAG	用于荧光定量 PCR Relative real-time PCR

```

1  acctcgggatgatgggacgatgaaacggcatgctgagctgctgaacagcacattaaatgaagcggatgcagatctaaagaggtgcacaaggtgctgctgagatgctg
116 ATGATGGAGCAGGTCTCAAAGATACGGTAAACATCGCCACAGCGGTGACAGGGAACGCTGCTGGTGTGACT
1  M M E Q V V K D T V N I A T A V Q G T L L V L T
188 GGGACATTACTGCTGATTCTGTCACAGAATATTAACAGCCAAGAATTGGAGGAACCAATCAGCTGTCCCA
25  G L L L L L L H R I L E T A K N W R N Q S A V P
260 GGTCCAGTTGGTGGTGGTCTCGGCCAGTTATGAGCTACAGCAGGTTCTGTGGATGGGATCGGCTCC
49  G P G W W L G L G P V M S Y S R F L W M G I G S
332 GCATGCACTACTACAACGAAAAATATGGCAGCATTGCTCGGGTCTGGATCAAAGGAGAAGAGACCTTTATA
73  A C N Y Y N E K Y G S I A R V W I K G E E T F I
404 CTTAGCAAGTCTCTGCCGTGTATCATGTTCTGAAGAGCAGTAATTACACTGGGAGTTTGGCAGTAAAAAA
97  L S K S S A V Y H V L K S S N Y T G R F A S K K
476 GGTCTGCAGTGCATCGGCATGTTTGAACAAGCATTATCTTCAACAGCAACATCGCATTGTGGAATAAAGTG
121 G L Q C I G M F E Q G I I F L N S N I A L W L K V
548 AGAACATATTTACCAAAGCTCTTACAGTCCGGTCTCCAGAAGTCAGTATGATGTGTGTGTCAGCGCAACC
145 R T Y F T K A L T G P G L Q K S V D V C V S A T
620 AACAAACAGCTTGACATCCTGCAGGAGTTACAGACCTCAGACATGTGGATGTACTCAATCTTCCGCGC
169 N K Q L D I L Q E F T D H S G H V D V L N L L R
692 TGATCGTGTGGATGTTTCAATAGACTCTTCTAAGAATCCCTCTAATGAGAAAAGACTTCTGATAAAG
193 C I V V D V S N R L F L R I P L N E K D L L I K
764 ATCCACCGTATTTTCAGTACCTGGCAGACGGTCTCATAACAGCCAGACATTTTCTCAGACTAAACTTTGTG
217 I H R Y F S T W Q T V L I Q P D I F F R L N F V
836 TACAAAAAATACCACCTGGCAGCAAAAAGAGTGCAGGATGAAATGGGAAAGCTTGTGGAGCAAAAGCGACAG
241 Y K K Y H L A A K E L Q D E M G K L V E Q K R Q
908 GCCATCAATAACATGGAGAAGCTGGAAGAGACAGACTTCGCAACAGAGCTGATATTTGCTCAGAACCACGAT
265 A I N N M E K L E E T D F A T E L I F A Q N H D
980 GAGTGTCTGCGGATGACGTGAGGCAGTGTGTGTCGAGATGGTGTGTCGCGCTCCAGACCCCTCCATC
289 E L S A D D V R Q C V L E M V I A A P D T L S I
1052 AGTCTGTTCTTCATGCTTCTCTGCTGAAGCAGAAGTCCGTCGTGGAGGAGCAGATCGTACAGGAGATACAA
313 S L L F F M L L L L K Q N S V V E E Q I V Q E I Q
1124 TCTCAGATAGCGAGCGGGATGTAGAGTCCGGCCAGCTGCAGAACCTGAATGTTCTAGAGCGCTTATCAAA
337 S Q I G E R D V E S A D L Q N L N V L E R F I K
1196 GAGTCTATGAGGTTCCATCCGGTGGTGGACTTCATCATGAGACAGGCTCTGGAGGACGACTCCATCGATGGC
361 E S M R F H P V V D F I M R Q A L E D D S I D G
1268 TACCGAGTGGCGAAGGGGACGAACCTCATCTGAACATCGGACGCATGCACAAGTCTGAGTTCTTCAAAAAA
385 Y R V A K G T N L I L N I G R M H K S E F F K K
1340 CCAACGAATTCAACTTGGAGAACCTTGAAGAACCAGTCCAGTCTTACTTCCAGCCGTTCCGGCTGCGGC
409 P N E F N L E N F E N T V P S R Y F Q P F G C G
1412 CCGCGGGCCTCGCTCGGGGAGCACATCTCTATGGTGTGACAAAGGCCATCCTGGTGGACCTGTTGTCGAGA
433 P R A C V G E H I S M V M T K A I L V T L L S R
1484 TTCACGGTTCATCTCTGTCACGGTGCACCGTCAAGCAGACCAACAACCTCTCCATMGACGCC
457 F T V P R H G C T V S T I K Q T N N L S M Q P
1556 GTGGAAGAGGATCCCGACTGCTGGCCATGCGCTTATTCCACGCGCTCAGAATATCCACGGAGAACCACAC
481 V E E D P D C L A M R F I P R A Q N I H G E P H
1628 CTGAGCGCCTAA
505 L S A *
1640 aaacacaggaatgatacctttagaggtgcggagtaattctctcatcaaaaatgttcagtgggctctatgtcaagactgcattgttttacttactatacacaacagttgaaact
1740 acctcaaaactgatcataccagtcgcctgcgacacagacatactgaccaatactgacatatacatgaggtgacttttggaggatggttaccaggggatgactgtctgtggtt
1840 gattactacccctatgcttccaaccgtaagacctgttcttgcgaacacaaatgaatatttttctaaagccgggagatttctgcacctgcatggacagcaatgcaactga
1940 cttcaagcgcgacagggcgtagtaaggacactgttaaaatcacactaaattttcataaaaatgacgttgaaccactgatgacatggaatatttgacagtgcttaccgacttctgtg
2040 cctgatctttagtctgtgctgctcggggtcagaaagctcttgatttcaggggtggtgattagtgccggagttgcatgttgggtgaaactccctttaaagtgtctctagc
2140 tcacctcaaaaaagtttagttttagtctgacataaggcaatgacaacaaacacatcagttttgacatgactaactacataactaaagtattttgctgacttatttaa
2340 ataaaaftaaatgtatctttagtctgccaactaatcaactaccaagttaacataaaaatggcattcacacccctttaaactcaatgtgacgtttaaactacattaaatgagaaagaat
2440 ttatttctggaattgactgtattgaaaaagtgatgtagtaccagaatggaatgagtgaggaggcgtcaaaaaatgagtgatgttggatgatacaatacaaaaaagatga
2540 atgatgcttaagaatgaaacagtcgttattttatgaaagattgaaacaaacttttggataatgtgcaactaaagtaaatgggtgctgttttgttattgtttataaaaaata
2740 atctacagatgcaactgttgggtgactgtattacgcaactgagaaactaaagaaatatttaacagaataaactaagaactatttaataagactgaaatagatgataattatgaaa
2840 ataaccgaaatattgatgccgttgcactgcttgcggaatgcgaaactactctgttttctccaataaagtgtaccgataactaactatgataaahhtacatttgaaaaa
2940 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 1 四川裂腹鱼脑型芳香化酶 *Cyp19b* 基因 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA and deduced amino-acid sequences of the *Schizothorax kozlovi* brain aromatase gene *Cyp19b*

阴影部分示 Poly (A) 尾巴；末端的加尾信号 aataaa 用虚线框表示；粗体示起始密码子 ATG；*示终止密码子；小写字母示 5'- 和 3'- 非翻译区；实线框、实线下划线和虚线下划线分别表示预测的 I-螺旋区、芳香化酶特异的保守区和血红素结合区。

The poly-A signal is shaded in gray; the terminal aataaa signal is in dashed box; the start codon ATG is bold; the stop codon is indicated by an asterisk; the lowercase indicates 5'- and 3'- UTR; the putative regions of I-helix, aromatase specific substrate binding region and heme-binding region are shown in solid-line box, solid underline and dotted line, respectively.

序列同源性可达 70%以上, 如与鲤 (*Cyprinus carpio*, GenBank: EU375456)、鲫 (*Carassius auratus*, GenBank: AB009335)、稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*, GenBank: GU220393)、斑马鱼 (*Danio rerio*, GenBank: AF183908) 和黑头软口鲮 (*Pimephales promelas*, GenBank: AJ277866) 等鲤形目鱼类脑型芳香化酶同源性较高, 可达 90%以上, 与黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*, GenBank: AY649789)、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*, GenBank: AF417239)、南方鲇 (*Silurus meridionalis*, GenBank: AY325907) 和胡子鲇 (*Clarias fusus*, GenBank: JN859189) 等鲇形目鱼类的脑型芳香化酶同源性分别为 72%、75%、72% 和 71%; 而与鲤 (GenBank: EU375455)、鲫 (GenBank: AF020704)、稀有鮡鲫 (GenBank: GU220394)、斑马鱼 (GenBank: AF226620)、斑点叉尾鮰 (GenBank: S75715)、黄颡鱼 (GenBank: AY871802)、南方鲇 (GenBank: AY325908)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*, GenBank: AB531496)、黄鳢 (*Monopterus albus*, GenBank: EU252487) 等的性腺型芳香化酶同源性则仅在 64% ~ 65% 之间。四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因编码的氨基酸序列与其他脊椎动物芳香化酶同源性更低, 如与爪蟾 (*Xenopus laevis*, GenBank: AB031278)、鸡 (*Gallus gallus*, GenBank: NM_001001761)、鼠 (*Mus musculus*, GenBank: NM_007810) 和人 (*Homo sapiens*, GenBank: BC035959) 的同源性仅在 55% ~ 57% 之间。

在邻接系统发育树中, 所有鱼类聚为一支, 其他脊椎动物聚为另一支, 鱼类芳香化酶又分为 A 和 B 两个类群 (图 2)。本研究克隆的四川裂腹鱼芳香化酶基因片段属于 B 类, 为脑型芳香化酶基因 (图 2)。四川裂腹鱼脑型芳香化酶与鲤、鲫、斑马鱼、稀有鮡鲫等鲤形目鱼类的亲缘关系较近, 这与鱼类物种类群划分关系基本一致。

2.3 四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因的组织表达

通过 Real-time PCR 方法检测 *Cyp19b* 基因

在不同规格四川裂腹鱼各组织中的表达水平, 显示 *Cyp19b* 基因仅在脑组织中有表达, 而在鳃、肌肉、肝、脾、肾、心、性腺组织中均无表达, *Cyp19b* 基因在脑组织中的平均相对表达量为 9.69 ± 8.89 。

ANOVA 分析结果显示, 脑组织中 *Cyp19b* 基因的相对表达量在四川裂腹鱼不同规格个体之间存在显著性差异。其中, 在小规格鱼的雌雄个体之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 而在大规格雌雄个体之间表现出显著性差异 ($P < 0.05$); 并且, 随着体长的增长, 大规格雄性个体脑组织中 *Cyp19b* 基因的相对表达量较小规格个体呈现显著性升高 ($P < 0.05$), 而两种规格雌性个体变化不大 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.4 不同温度条件下四川裂腹鱼仔鱼 *Cyp19b* 基因表达

ANOVA 分析结果显示, 与 12 日龄时相比, 经过不同温度处理 6 d 后, 18 日龄四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因 mRNA 的相对表达量在 10°C、14°C 和 22°C 组均出现了显著性升高 ($P < 0.05$), 而在 18°C 和 26°C 组未出现显著性变化 ($P > 0.05$)。同时, 在 18 日龄时, *Cyp19b* 基因 mRNA 的相对表达量在 10°C 组、14°C 组、22°C 组之间均无显著性差异 ($P > 0.05$), 在 18°C 组与 26°C 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 但 10°C、14°C 和 22°C 组与 18°C 组、26°C 组之间均呈现显著性差异 ($P < 0.05$) (图 4)。

3 讨论

鱼类脑型芳香化酶基因的表达具有明显的时空特异性, 如生殖季节与非生殖季节之间、不同发育阶段之间、不同组织之间均存在差异 (洪万树等 2000, 邓思平等 2008, 曹梦西等 2009, 孙晶等 2012), 且不同物种脑型芳香化酶基因的表达模式有所不同。本研究中四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因仅在脑中表达, 而在其他组织中均无表达, 相比于其他鱼类, 表现出较高的组织特异性, 如 *Cyp19b* 基因在半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 的脑和性腺中均有表

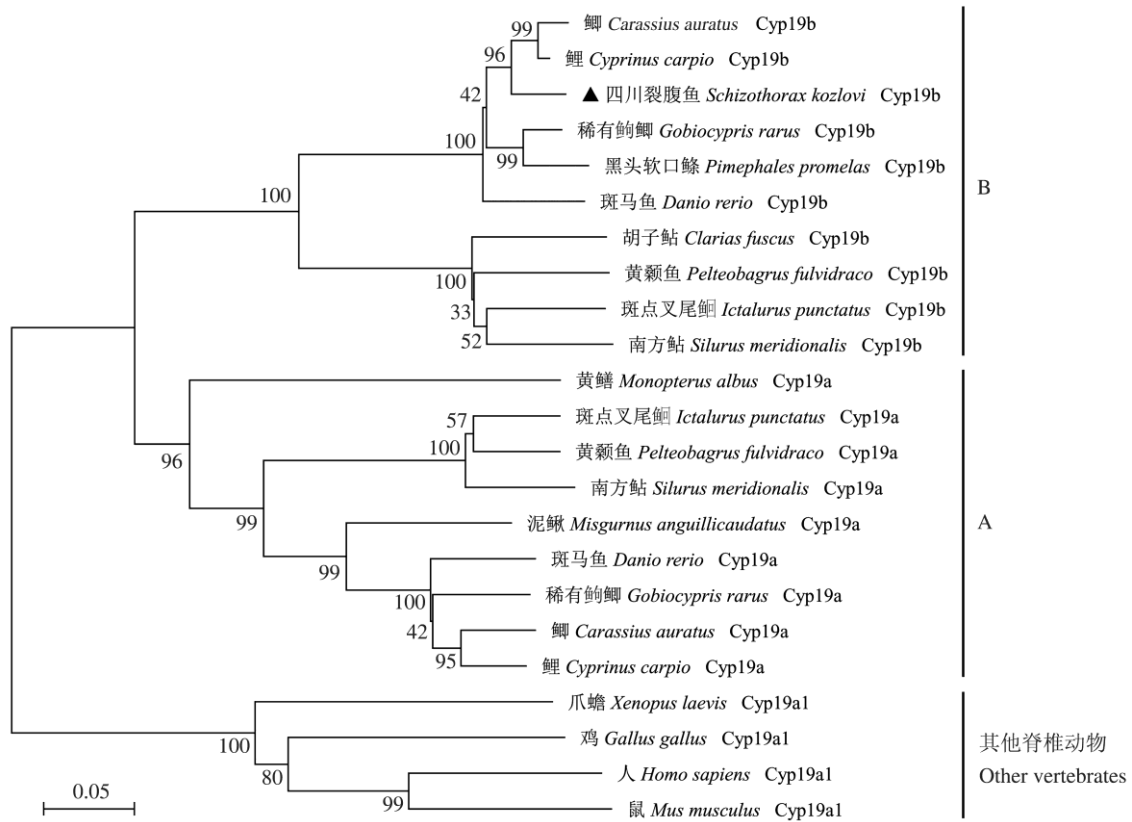


图 2 基于邻接法构建的四川裂腹鱼脑型芳香化酶和其他物种的芳香化酶系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid sequences of *Schizothorax kozlovi* brain aromatase gene *Cyp19b* and other organisms aromatase genes based on neighbor-joining (NJ) method

图中▲表示本文研究对象,各分支上的数字表示1000次bootstrap验证后现分支树出现的频率,标尺表示氨基酸序列之间差异的数字尺度。

▲ in the figure represents the target study object in the present study, the numbers presented at each branch point represent the frequencies with which the tree topology presented here was replicated after 1 000 bootstrap iterations, the scale represents the number of amino acid sequences changed.

达(邓思平等 2008),在胡子鲇脑、性腺和肝中有表达(孙晶等 2012),在稀有鮡鲫脑、性腺、鳃、肾和肠中有表达(曹梦西等 2009),在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)脑、性腺、心、鳃、肌肉、血液、肾、肠、脾等多种组织中均有表达(Chang et al. 2005)。同时,四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因的表达在小规格(体长约为 12 cm)雌雄个体间并没有出现显著性差异,但随着体长的增长,表现出显著的雌雄差异。这与四川裂腹鱼所处的发育阶段不同有关,大规格(体长约为 26 cm)雌性和雄性个体分

别达到了性腺发育 II 期和 III 期,而小规格雌雄个体则均处于性腺发育 I 期,即随着性腺的发育,脑中 *Cyp19b* 基因的表达呈现显著升高,这与其他鱼类表现出一致性(Anderson et al. 1988, Vizziano-Cantonnet et al. 2011)。在诸多鱼类中,雄性个体脑型芳香化酶基因的高表达通常与雌激素受体的高表达显著相关(Menuet et al. 2005, Vizziano-Cantonnet et al. 2011),但它们之间的因果关系仍未可知。

在诸多动物体内,脑型芳香化酶主要分布于下丘脑和边缘系统的特定核团,主要与性行

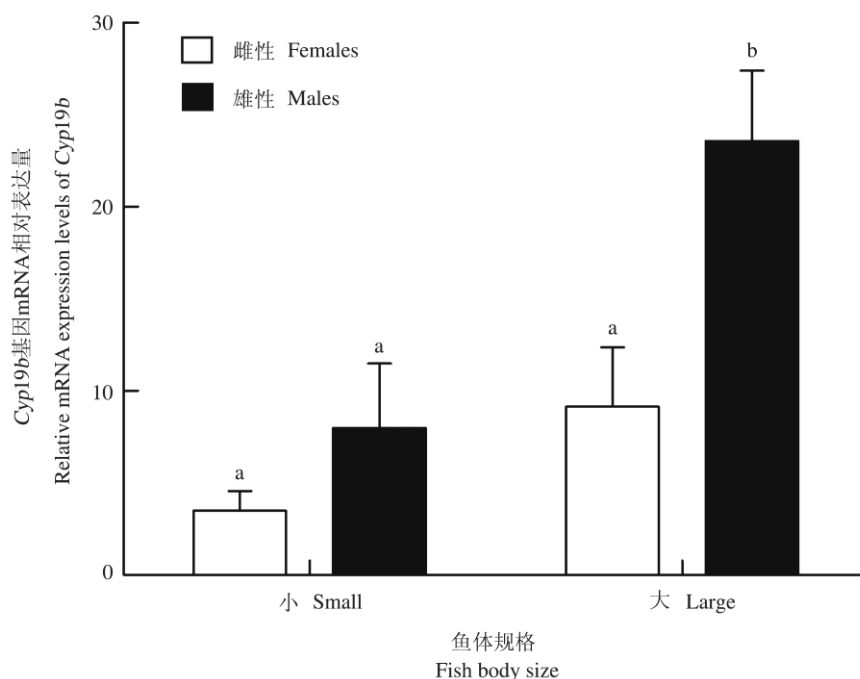


图3 两种规格四川裂腹鱼脑组织中 *Cyp19b* 基因 mRNA 相对表达量

Fig. 3 Relative mRNA expression levels of *Cyp19b* in the brain of *Schizothorax kozlovi* in the two different body size groups

图中相同字母表示无显著性差异, 不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

The same letters in the figure present no significant difference, while different letters present significant difference ($P < 0.05$).

为和繁殖功能相关; 也分布于基底前脑、海马、豆状核、中脑缝等部位, 参与学习、记忆、情绪调节等功能 (张吉强等 2001, Menuet et al. 2005, Piferrer et al. 2005)。研究表明, 在硬骨鱼类中, 脑型芳香化酶主要参与脑-垂体-性腺轴所介导的一系列生殖生理过程, 在维持个体内分泌系统的稳定以及发育过程中发挥重要作用 (Nocillado et al. 2007, 董德梅 2009)。四川裂腹鱼脑型芳香化酶在脑中的具体定位及功能还有待于进一步深入研究。

鱼类芳香化酶基因的表达受到多种因素的影响, 包括 cAMP 刺激因子、核受体家族成员 SF-1、性激素、温度等, 其基因表达的上调或下调在鱼类性别分化过程中起到了重要作用, 其中尤以性腺型芳香化酶 *Cyp19a* 基因的研究较多, 而关于脑型芳香化酶 *Cyp19b* 基因的研究报道较少 (Kitano et al. 1999, Chang et al.

2005, Sawyer et al. 2006, Smith et al. 2013, Li et al. 2014)。有研究报道, 自然水温 (27°C) 条件下, 尼罗罗非鱼雌鱼脑型芳香化酶的活性比雄鱼高, 但高温 (35°C) 诱导条件下, 雌鱼和雄鱼脑型芳香化酶的活性均显著下降, 说明高温对脑型芳香化酶活性具有抑制作用 (D'Cotta et al. 2001)。但本研究结果表明, 低温 (10°C) 对四川裂腹鱼脑型芳香化酶 *Cyp19b* 基因的表达具有显著的促进作用, 而高温 (26°C) 未表现出明显的抑制作用。值得注意的是, 与未经温度处理组相比, 22°C 组 *Cyp19b* 基因的表达也呈现显著性升高, 其原因尚未得知, 需进一步深入研究。同时, 作者还发现低温 (10°C) 能促进四川裂腹鱼群体发生雌性化趋势 (未发表数据)。然而目前仅有研究表明, 温度对性腺型芳香化酶 *Cyp19a* 基因表达的影响是与其启动子甲基化水平有关, 高温会导致

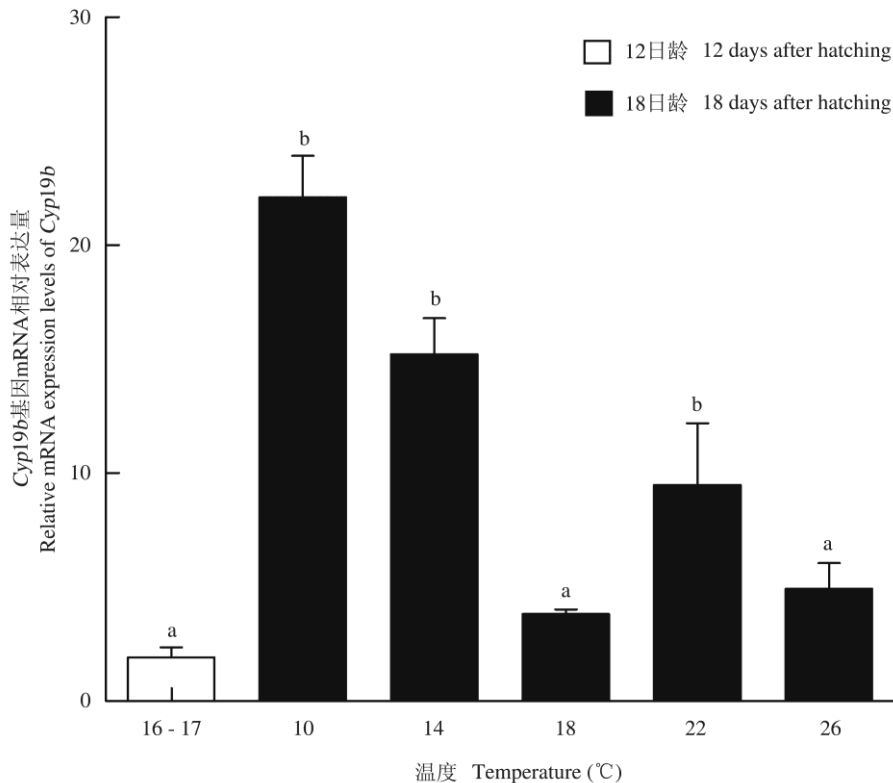


图 4 温度处理前后四川裂腹鱼仔鱼 *Cyp19b* 基因 mRNA 的相对表达量

Fig. 4 Relative mRNA expression levels of *Cyp19b* gene of *Schizothorax kozlovi* larvae before and after temperature changed

图中相同字母表示无显著性差异, 不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$)。

The same letters in the figure present no significant difference, while different letters present significant difference ($P < 0.05$).

其基因启动子甲基化水平的升高而引起其表达量的下调, 低温导致其基因启动子的去甲基化而引起其表达量的上调 (Navarro-Martín et al. 2011, Piferrer 2013, Shao et al. 2014)。但温度对脑型芳香化酶 *Cyp19b* 基因表达的影响机制仍未可知, 是否也会受此表观遗传调控机制的影响还有待深入研究。

本研究成功克隆获得了四川裂腹鱼 *Cyp19b* 基因的全长 cDNA 序列, 并通过分析 *Cyp19b* 基因在不同规格个体鳃、脑、心、肝、脾、肾、肌肉、性腺组织中的表达特征, 及其在仔鱼阶段对不同温度的响应特征, 推测其可能在低温导致四川裂腹鱼雌性化中发挥了重要作用, 从而为深入研究四川裂腹鱼温度依赖型

性别分化机制奠定了基础。

参 考 文 献

- Anderson E, Borg B, Lambert J G. 1988. Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *General and Comparative Endocrinology*, 72(3): 394-401.
- Baroiller J F, D'Cotta H, Saillant E. 2009. Environmental effects on fish sex determination and differentiation. *Sexual Development*, 3(2/3): 118-135.
- Chang X T, Kobayashi T, Senthilkumaran B, et al. 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 141(2): 101-115.
- D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, et al. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation

- of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*, 59(3): 265–276.
- 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.
- 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.
- Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, et al. 1999. Suppression of P450 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 olivaceus*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 23(2): 167–176.
- Li C G, Wang H, Chen H J, et al. 2014. Differential expression analysis of genes involved in high-temperature induced sex differentiation in Nile tilapia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 177/178: 36–45.
- Menuet A, Pellegrini E, Brion F, et al. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *Journal of Comparative Neurology*, 485(4): 304–320.
- Navarro-Martín L, Viñas J, Ribas L, et al. 2011. DNA methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genetics*, 7(12): e1002447.
- Nocillado J N, Elizur A, Avitan A, et al. 2007. Cytochrome P450 aromatase in grey mullet: cDNA and promoter isolation; brain, pituitary and ovarian expression during puberty. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 263(1/2): 65–78.
- Pasmanik M, Callard G V. 1988. Changes in brain aromatase and 5 α -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology*, 122(4): 1349–1356.
- Piferrer F. 2013. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Developmental Dynamics*, 242(4): 360–370.
- Piferrer F, Blázquez M. 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31(2/3): 215–226.
- Sawyer S J, Gerstner K A, Callard G V. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147(2): 108–117.
- Shao C W, Li Q Y, Chen S L, et al. 2014. Epigenetic modification and inheritance in sexual reversal of fish. *Genome Research*, 24(4): 604–615.
- Shen Z G, Wang H P. 2014. Molecular players involved in temperature-dependent sex determination and sex differentiation in teleost fish. *Genetics Selection Evolution*, 46: 26.
- Smith E K, Guzmán J M, Luckenbach J A. 2013. Molecular cloning, characterization, and sexually dimorphic expression of five major sex differentiation-related genes in a Scorpaeiform fish, sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 165(2): 125–137.
- Vizziano-Cantonnet D, Anglade I, Pellegrini E, et al. 2011. Sexual dimorphism in the brain aromatase expression and activity, and in the central expression of other steroidogenic enzymes during the period of sex differentiation in monosex rainbow trout populations. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2): 346–355.
- 曹梦西, 杨玉慧, 江文波, 等. 2009. 稀有鮎鲫脑芳香化酶 cDNA 片段的克隆与表达分析. *水生生物学报*, 33(4): 748–755.
- 曹文宣, 陈宜瑜, 武云飞, 等. 1981. 裂腹鱼类的起源和演化及其与青藏高原隆起的关系 // 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 青藏高原隆起的时代、幅度和形式问题. 北京: 科学出版社, 118–130.
- 陈永祥. 2013. 四川裂腹鱼 (*Schizothorax kozlovi* Nikolsky) 种质特征及其遗传多样性研究. 雅安: 四川农业大学博士学位论文.
- 陈永祥, 罗泉笙. 1997. 四川裂腹鱼繁殖生态生物学研究 V: 繁殖群体和繁殖习性. *毕节师范高等专科学校学报*, (1): 1–5.
- 邓思平, 陈松林, 刘本伟, 等. 2008. 半滑舌鲷脑芳香化酶基因 cDNA 克隆及表达分析. *动物学研究*, 29(1): 17–24.
- 董德梅. 2009. 草鱼脑芳香化酶的 cDNA 克隆、启动子分离与转录活性的调控. 成都: 电子科技大学硕士学位论文.
- 洪万树, 方永强. 2000. 鱼类芳香化酶活性研究的进展. *水产学报*, 24(3): 285–288.
- 孙晶, 李广丽, 朱春华, 等. 2012. 胡子鲇脑型芳香化酶基因全长 cDNA 克隆及表达. *中国水产科学*, 19(3): 408–415.
- 吴金明, 赵海涛, 苗志国, 等. 2010. 赤水河鱼类资源的现状与保护. *生物多样性*, 18(2): 162–168.
- 伍律, 李德俊, 郑建州, 等. 1989. 贵州鱼类志. 贵阳: 贵州人民出版社.
- 乐佩琦, 陈毅锋, 曹文宣, 等. 2000. 中国动物志: 硬骨鱼纲 鲤形目 下卷. 北京: 科学出版社.
- 张吉强, 蔡文琴. 2001. 脑内芳香化酶表达的定位、调控及意义. *生理科学进展*, 32(2): 107–111.
- 邹习俊. 2009. 四川裂腹鱼核型及遗传多样性研究. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文.