

半滑舌鳎脑芳香化酶基因 cDNA 克隆及表达分析

邓思平^{1,2}, 陈松林^{1,*}, 刘本伟¹, 徐建勇¹, 田永胜¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 为研究脑型芳香化酶(P450aromB)在半滑舌鳎性别分化中的作用, 采用同源克隆策略, 从半滑舌鳎脑分离了2184 bp长的脑型芳香化酶的全长cDNA, 该基因编码498个氨基酸。氨基酸序列和系统发育分析表明, P450aromB属于脑型P450arom, P450aromB的氨基酸序列与其他鱼类脑型P450arom的同源性较高(48.3%—66.1%), 与性腺型P450arom的同源性较低(34.2%—49.9%), 与自身的性腺型芳香化酶同源性为45.1%。RT-PCR分析表明: P450aromB mRNA的表达具有明显组织特异性, P450aromB只在性腺、脑、鳃和皮肤中表达, 且脑中表达量远高于性腺, 而在雌雄鱼的其他组织中都不表达。经过甲基睾酮浸浴处理和高温诱导半滑舌鳎由雌性性反转为雄性后, 脑中P450aromB的表达量降低, 这些结果表明P450aromB参与了半滑舌鳎的性腺分化和性别决定过程。

关键词: 半滑舌鳎; 芳香化酶; cDNA克隆; 表达

中图分类号: Q959.486; Q786; Q344 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2008)01-0017-08

Molecular Cloning, Characterization and Expression Analysis of Brain P450arom in Half-smooth Tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis* Gunther

DENG Si-ping^{1,2}, CHEN Song-lin^{1,*}, LIU Ben-wei¹, XU Jian-yong¹, TIAN Yong-sheng¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China; 2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstracts: The 2184bp full-length brain P450 aromatase (termed P450aromB) cDNA encoding a protein of 498 amino acid residues was isolated from the brain of the half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*) by using homologous cloning to clarify the role in sex differentiation. Sequence and phylogenetic analyses showed that the tongue sole P450aromB belonged to brain P450arom subfamilies. The putative P450aromB amino acid residues shared 48.3%—66.1% sequence affinity with other fish brain P450arom, and shared 34.2%—49.9% sequence affinity with ovarian P450arom of other fish. The RT-PCR analysis revealed that P450aromB mRNA was expressed at a high proportion in the brain and gills but less in the gonads and skin, but not in other tissues. However, the P450aromB decreased in the brain of sex-reversed males, treatment by Methyltestosterone or at high temperatures. These results suggested that the P450aromB is involved in the course of gonad development and sex determination in tongue soles.

Key words: Half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*); P450aromB; cDNA cloning; Expression

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Gunther)属于鲽形目(*Pleuronectiformes*), 舌鳎科(*Cynoglossidae*), 舌鳎属(*Cynoglossus Buchanan* Hamiltou), 暖温性近海底层鱼类, 半滑舌鳎具有活动范围小、营养等级低、食性温和、个体大、生长快等优良性状, 是近

年来新开发的一种理想的增养殖对象。但半滑舌鳎雌性个体和雄性个体, 在生长速率上存在巨大差别, 其雌性个体比雄性个体大2—3倍, 由于雄性个体生长过慢, 降低了半滑舌鳎的养殖产量, 增加了养殖成本, 因而严重影响了半滑舌鳎苗种的推广及

收稿日期: 2007-09-16; 接受日期: 2007-12-25

基金项目: 国家863计划项目(2006AA10A403); 山东省泰山学者工程项目; 山东省农业良种工程重大项目

*通讯作者(Corresponding author), 陈松林, Tel: 0532-85844606, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

第一作者简介: 邓思平(1974—), 男, 讲师, 博士, 从事海洋生物学研究, E-mail: dengsp@gdou.edu.cn

养殖产业的形成，因此开展半滑舌鳎性别决定机制研究，探索半滑舌鳎全雌育种技术，对于半滑舌鳎养殖产业的发展具有重要意义和应用价值。

芳香化酶(P450arom)是类固醇激素代谢中的一种重要酶类，属于细胞色素P450家族中的一员，广泛存在于大多数脊椎动物的脑和垂体中，它可催化某些雄激素转化为雌激素(Simpson et al, 1994)，是雌激素生物合成中的关键酶。在大多数哺乳动物中，P450arom由CYP19单基因编码，但在鱼类中却发现了两种不同基因编码的P450arom，即性腺型芳香化酶（P450aromA）和脑型芳香化酶（P450aromB），它们以明显不同的形式分别存在于性腺和脑中(Kishida et al, 2001; Dalla Valle et al, 2002; Tchoudakova et al, 1998)。在鱼类中最显著的特征是脑型芳香化酶的活性比其他脊椎动物如小鼠、老鼠和人的脑中活性高100—1000倍，这与脑中产生的雌二醇与许多生理和行为有关，包括在中枢神经系统发育过程中脑的分化(Lephart et al, 1996)。在鱼类中P450aromB的分布是组织特异和细胞特异的、是中枢雌二醇生物合成的决定物。一些研究认为其也参与了性腺分化的调节(Trant et al, 2001)。在性别分化过程中芳香化酶的研究主要着眼于性腺型酶的变化，这些结果证实了P450aromA参与了雌激素生物合成和卵巢分化，但P450aromB的作用则不明确。在鱼类有关雌激素对脑型芳香化酶的调节以及雄激素诱导性逆转过程中性腺型芳香化酶的表达变化情况报道较多，而有关雄激素在硬骨鱼中的作用和雄激素与脑型芳香化酶的表达报道较少。本研究采用同源克隆方法从半滑舌鳎脑中分离了该鱼的P450aromB全长cDNA，分析其分子结构、在雌雄性组织中mRNA的分布情况，利用已建立的半滑舌鳎遗传性别鉴定技术(Chen et al, 2007)，分析甲基睾酮(methyltestosterone, MT)和温度诱导性逆转后的表达情况，以分析其与性别决定的关系。

1 材料与方法

1.1 组织制备、RNA和DNA提取

半滑舌鳎取自于山东海阳国家863计划海水养殖种子资源北方基地，分别取二龄鱼脑、性腺、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、皮肤、心肌、肠、头肾、鳃、皮肤、小肠和眼后立即投入液氮保存，随后转于-80℃低温冰箱保存以用于组织RNA提取。并在孵化后25—100 d采用每升水中含有20—100 μg浓度

的甲基睾酮进行浸浴处理和28℃、32℃高温诱导半滑舌鳎性逆转，并在7月龄时取其性腺用Bouin's固定液固定，同时取肝脏采用酚：氯仿法提取基因组DNA。

1.2 表型性别和遗传性别鉴定

对取出的性腺作石蜡切片，经各级乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋，作连续横切切片，Hematoxylin Eosin染色，Olympus光学显微镜观察性腺显微结构鉴定其表型性别。用提取的肝脏DNA作为模板，根据已分离得到的雌性特异片断所设计的一对特异引物进行PCR遗传性别鉴定(Chen et al, 2007)。

1.3 引物

克隆半滑舌鳎 P450aromB 基因序列及检测组织表达所用引物见表 1。P450aromB(fw1) 和 P450aromB(rv1)是根据已经发表的其他鱼类的脑型 P450arom 的保守序列合成的一对简并引物，以脑 RNA 为模板，用于扩增半滑舌鳎鱼 P450aromB 中间保守片断；P450arom(fw2)和 P450aromB(fw3)是根据简并引物得到的序列合成的两条特异引物，分别用来扩增 P450aromB cDNA 3'末端和 5'末端。P450aromB(fw4)、P450aromB(rv4)是根据已知的全长 cDNA 合成的一对特异引物，用于检测各组织的 P450aromB 特异表达水平，扩增长度为 458 bp。β-actin 引物对的扩增长度为 204 bp，所有引物均由北京 Invitrogen 生物有限公司合成。

1.4 RNA的提取和cDNA的合成

分别称取 0.1 g 半滑舌鳎的脑、性腺、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、皮肤、心肌、肠、头肾、鳃、皮肤、小肠和眼组织，利用 Trizol 试剂(Invitrogen)一步法提取总 RNA。cDNA 利用 M-MLV 反转录酶(Promega)合成； RACE-Ready-cDNA 利用 BD SmartTM RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)合成，-20℃冰箱保存备用。

1.5 SMART-RACE扩增和RT-PCR扩增

SMART-RACE-PCR 扩增按照 Smart™ RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)的说明书进行。RT-PCR 反应条件：94℃ 30s, 57℃ 30s, 72℃ 60s, 35个循环，最后72℃延伸10min。

1.6 中间保守序列和RACE产物的纯化、克隆及测序

简并引物P450aromB(fw1)、P450aromB(rv1)的扩增产物和50 μL的3'-RACE和5'-RACE产物，经1%

的琼脂糖凝胶电泳, 切下目的片段, 用QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN)回收试剂盒, 按说明书提供的方法进行纯化。将回收产物按3:1的比例与pMD18-T(Takara)载体进行连接反应。连接产物5 μL用于转化 *Escherichia coli* DH5α, 根据蓝白斑原理, 筛选白色菌斑, 提取质粒, 经 *Eco*R I 和 *Hind*III 酶切鉴定插入片段大小后, 在上海Invitrogen生物有限公司测序。

1.7 序列分析

将所得序列登录NCBI用BLAST对测序结果进行同源性检索。用Dnaman 5.1分析所得半滑舌鳎P450arom cDNA序列以及开放阅读框。用DNAstar进行多序列比较, 用MEGA3.1中的Neighbor-joining (NJ) 方法构建进化树。

2 结 果

2.1 P450aromB cDNA 克隆和测序

根据其他鱼的脑型 P450arom 保守序列设计的简并引物 P450aromB(fw1)和 P450aromB(rv1), 扩增得到 457 bp 的 cDNA 片段, 经 BLAST 分析为 P450aromB 基因。根据所得的片段设计基因特异引物 P450arom(fw2)和 P450arom(fw3)分别进行 3'-和 5'-RACE。扩增产物克隆、测序后, 经 Dnaman 分析去除重叠序列和接头序列后得到 2184 bp 的全长 cDNA 序列 (GenBank Accession No.: EF198239; 图 1)。半滑舌鳎 P450aromB cDNA 由 1497 bp 编码区, 113 bp 的 5'UTR 区和 574 bp 的 3'UTR 区组成, 并且具有脊椎动物典型的加尾信号 AATAAA 和 Poly (A) 尾巴。

2.2 P450aromB 同源性比较和系统发生比较

半滑舌鳎 P450aromB 基因的开放阅读框编码 498 个氨基酸, 蛋白质预测的分子量约为 80.598 KD。与其他芳香化酶相似, 半滑舌鳎芳香化酶也包含 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 2)。用 DNAstar 比较该氨基酸序列 (ABM90641) 与其他鱼类、鸡、鼠和人的 P450arom 氨基酸序列, 与其他鱼类脑型同源性为 48.3%—66.1%, 与其他鱼类性腺型芳香化酶同源性为 34.2%—49.9%。与青鱈 (AAP83449)、舌齿鲈(AAM95455)、细棘海猪鱼 (AAR37047)、金鱼 (BAA23757) 和 斑马鱼 (AAK00642) 的脑型芳香化酶同源性较高, 分别为 66.1%、64.7%、62.6%、48.8% 和 48.3%。与金鱼 A(GenBank Accession No.: BAA23758)、斑点叉尾鮰 (AAB32613)、斑马鱼 (AAK00643)、鲤鱼 (ABF82249)、细棘海猪鱼 (AAR37048) 和 牙鲆 (BAA74777) 同源性较低, 分别为 49.9%、49.2%、48.1%、46.7%、45.9% 和 45.4%。而与自身的性腺型芳香化酶(ABL74474)同源性仅为 45.1%。与老鼠 (BAA00551)、鸡 (AAA48738) 和人 (BAA00001) 的芳香化酶亲缘性较远, 分别为 40.5%、42.1 和 40.5%的同源性。

从系统发生树可见 (图 3), 鱼类与其他生物的 P450arom 明显不同, 而鱼类的 P450arom 又可分为性腺型 P450arom 和脑型 P450arom 两种类型, 本研究从半滑舌鳎脑中中分离的芳香化酶属于鱼类脑型 P450aromB 一支。

表 1 克隆和组织表达半滑舌鳎鱼脑型芳香化酶 (P450aromB) 基因序列所用引物
Tab. 1 Primers used for cloning and tissue expression of *Cynoglossus semilaevis* P450aromB

引物 Primer	序列 Sequence	碱基位置 Position(bp)
P450aromB(fw1)	5'-YGCVACVGAGYTBATMTTGC-3'	934—954
P450aromB(rv1)	5'-CRAABGGCTGGAAGWARCGA-3'	1373—1393
P450aromB(fw2)	5'-AGGGAACCAACATCATTCTAACATCGG-3'	1270—1297
P450aromB(fw3)	5'-CTCACTTCCACTTCAGGGTGCTGTTCA-3'	1066—1093
P450aromB(fw4)	5'-TGCAACAGAGCTCATCTTG-3'	935—955
P450aromB(rv4)	5'-CGAAGGGCTGAAAGAAGCGA-3'	1373—1393
β-actin(fw)	5'-GTAGGTGATGAAGCCCAGAGCA-3'	
β-actin(rv)	5'-CTGGGTCATCTTCTCCCTGT-3'	

图 1 半滑舌鳎脑芳香化酶 cDNA 序列和推导的氨基酸序列
Fig. 1 cDNA and predicted amino-acid sequences of the *Cynoglossus semilaevis* P450aromB

阴影部分示 Poly (A) 尾巴；末端的加尾信号 aataaa 用斜体加下划线表示；下划线示起始密码子 ATG；*示终止密码子；小写字母示 5' - 和 3' -UTR。

The polyA signal is shaded in gray; the terminal *aataaa* signal is underlined with italic in the 3' -end; the start codon ATG is underlined; the stop codon is indicated by an asterisk; the lowercase indicated 5' and 3' UTR.

<i>Cynoglossus semilaevis</i> B	-----MEELLNSSLVSDTLSKLTLVFLLLLCT-TWTRTKQSDIP	44
<i>Cynoglossus semilaevis</i> A	MDHIPGCNLPMSPVGLDMTSELVSVPNVTAPCSVFTAATRLVLICLLVA--WSHTEKIAVP	65
<i>Paralichthys olivaceus</i> A	MDRIPACDLAMTPVGLGAALGDLVSTSPNATAVRTPGISVASRTLILLCVLLVA--WSHTDRTV	65
<i>Carassius auratus</i> B	-----MEEVLGTVNAATVQVTLMALTTLILLHRIFT-AKNWRNQSVP	47
<i>Danio rerio</i> B	-----MMEHVVKDAVNIGAVVQGTLLLTGTLMLLHRIFG-VKNWRNQSALP	48
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> B	-----MLPLETLTTGPVWVDTVSGVTILLLLLFLFT-AWSRTPNSHIP	45
<i>Oryzias latipes</i> B	-----MIQQEVTQLDELFHSVSVQTLFLLLLMLLFLFINTWRQSHLSHIP	45
<i>Cynoglossus semilaevis</i> B	GPSFLAGLGPVLSYTRFIWTGIGTASNNYKKYGVSTRVWINGEETLILSRSTEYHVLSVHYTAR	111
<i>Cynoglossus semilaevis</i> A	GPFCLGLGPPLSYVRFIWTGIGTASNNYNDKYGDIVRVWINGEEXLIVSRSRSPVHVQLRSGNYCSR	132
<i>Paralichthys olivaceus</i> A	GPPFCGLGPPLSYVRFIWTGIGTACNNYKKYGDIVRVWIDGEETLILSRASAIVHVLKNGHYTSR	132
<i>Carassius auratus</i> B	GPGWLLGLPVLMSYRFLWMGIGTACNNYNEKYGSIARVWINGEETFILSKSSAVYHVLSKNNYTGR	114
<i>Danio rerio</i> B	GPGWWLGLPVLMSYRFLWMGIGTACNNYNEKYGSIARVWINGEETFILSKSSAVYHVLSKNNYTGR	115
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> B	GPSFLAGLGPILSYRSRFIWTGIGTASNNYKKYGSIVRVWIKGEETLILRSRSSAVYHIMKSPHYTAR	112
<i>Oryzias latipes</i> B	GPSFLAGLGPVLSYARFIWMGIGTACNNYKKYGSIVRVWINGEETLILRSSEYYHVLSAHTYSR	112
<i>Cynoglossus semilaevis</i> B	FGSKIGLQCIGMEKGIGIFNGDVSLWKKVRTYFSKALTGPALQRTVAICVDSTAELHNLLQEVTDSS	178
<i>Cynoglossus semilaevis</i> A	FGSKQGLKCLGMHGERGLIFNNNNVWLKKIRTYFSKALTGPGLQGTLVFCVSSMQTHLDDLDL---	196
<i>Paralichthys olivaceus</i> A	FGSKQGLSCIGMYERGIIFNNNNVSLWKVIRTHFTRALTGPGQLKQTVTVECVVSSTQTHLDDLDGLG---	196
<i>Carassius auratus</i> B	FASKKGQCLGIGMEFGQIIFNSNMALWKVVRTYFTKALTGPGLQKSVDVCVSATNQNLVQLEFTDHS	181
<i>Danio rerio</i> B	FASAKGLQCIGMFEGQIIFNSNIAKWKKVRTYFTKALTGPGLQKSVEVCVSATNRQLDVLQLEFTDAS	182
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> B	FGSKTGLQCIGMEGRGIIFNNNDVPLWRKLRTYFSKALTGPQTLQGTVVAICVSSTAKHLGLQDMTDS	179
<i>Oryzias latipes</i> B	FGSQKGLQCIGMDGRGIIFNCVDPLWKKTRMYFSKALSGPSLQRTVGICVSSTAKHLARLQDVTDS	179
<i>Cynoglossus semilaevis</i> B	GHVDALNLLRAIVVDISNRFLRVLNVKDLLIKHHYFETWOTVLIKPDLFFKIGWLYDRHKAAQ	245
<i>Cynoglossus semilaevis</i> A	-HVDVLGLLRCVTWDISNRFLGCPVNEKELLVKIQQYFETWQSVL1KPDVVFKLDWIHQHQRQAQ	262
<i>Paralichthys olivaceus</i> A	-HVDVLSLLRCVVWDISNRFLDVPINEKEKLLVKILKYFDTWOTVLIKPDIYFKFDWIHQHRAAVQ	262
<i>Carassius auratus</i> B	GHVDVLNLLRC1IVVDVSNRLFLRIPLENKE DLLIKHRYFSTWQAVL1QPDFVFRRLNFVYKKYHLAAK	248
<i>Danio rerio</i> B	GHVDVLNLLRC1IVVDVSNRLFLRIPLENKE KELLKIHRYFSTWQTVL1QPDFIFFKLDFVYRKYHLAAK	249
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> B	GHVDTLNLLRAIVVDISNRFFLRVPLNEKDLLMKIQNYFETWQTVL1KPDIFFFK1GWLWYKHRAAQ	246
<i>Oryzias latipes</i> B	GHVDALNLLRAIVVDISNRFLRVLNPNEKELLQKIHNYFETWQAVL1KPDVFFKMGWLYNHKRAAQ	246
<i>Cynoglossus semilaevis</i> B	ELQDSMENLLELRKMINESEKIDDDIDFATELIFFAQNHIGELSADVYRQCVLEMVIAAPDTLSISLF	312
<i>Cynoglossus semilaevis</i> A	ELQRSIGELVEQKRREVEHAEKLD-DIDFPTTELIFFAQTRGELESQEDVTCQCVLEMVIAAPDTLSISLF	328
<i>Paralichthys olivaceus</i> A	ELHDAIGDLVEQKRDRVEQADKLD-NINFTTGLIFFAQNHIGELSADVYRQCVLEMVIAAPDTLSISLF	328
<i>Carassius auratus</i> B	ELQDEMGLKVEQKRQAINNMEKLD-ETDFATELIFFAQNHIDELSVDDVYRQCVLEMVIAAPDTLSISLF	314
<i>Danio rerio</i> B	ELQDEMGLKVEQKRQAINNTEKLD-EMDFATELIFFAQNHIDELSVDDVYRQCVLEMVIAAPDTLSISLF	315
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> B	ELQUMMESLJEMKQRQIINESEKIDDDIDFATELIFFAQNHIGELSADVYRQCVLEMVIAAPDTLSISLF	313
<i>Oryzias latipes</i> B	ELQDSMESLJELIKRMINEAEKIDDDIDFATELIFFAQNHIGELSADVYRQCVLEMVIAAPDTLSISLF	313
<i>Cynoglossus semilaevis</i> B	FMLVLLKQHPEVEVRLVEEMNTVKNENPGENINYQSLTTLLENFINESLRFHPPVDFTMKALEDDV	379
<i>Cynoglossus semilaevis</i> A	FMLUULLKQHPDVELKLLQEDITVGERNLNRDLPKLQVLETFINECLRFQPVDFTMKALESDDII	395
<i>Paralichthys olivaceus</i> A	FMLUULLKQNPDVELQLLREIDTVGERLQNLQDQLQVLESDFINECLRFHPPVDFSMRRALSDDII	395
<i>Carassius auratus</i> B	FMLUULLKQNSVVEEQIVQEIQSQJIGERDVEASDLQQLNVLERFIKESLRFHPPVDFIMRQSLDDYI	381
<i>Danio rerio</i> B	FMLUULLKQNSAVEEQIVQEIQSQJIGSRDVEASDLQQLNVLERFIKESLRYHPPVDFIMRQSLDDYI	382
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> B	FMLUULLKQNPDEVELRIVEEMNTVSNEKAENIHSQSLNVLENFINESLRFHPPVDFTMKALEDDV	380
<i>Oryzias latipes</i> B	FMLUULLKQNPDVELQVVEEMNSVLDKATESIDYESLRVLESFINESMRHFPPVDFTMKALEDDEI	380
<i>Cynoglossus semilaevis</i> B	EGMAIKKGTNIIILNIGLMHKTEFFPKPDKDEFNLENFDKTVPNRFFOPFGCCPGRSCVGKHI	446
<i>Cynoglossus semilaevis</i> A	EGYQVPKGTNIIILNTGRMHRTDLFCKPNEFSLNFERKTPRLRFOPFGCCPGRSCVGKHI	462
<i>Paralichthys olivaceus</i> A	DGYRVPKGNTNIIILNTGRMHRTEFFCKPNEFRLDNFETKAPRRYFOPFGCCPGRSCVGKHI	462
<i>Carassius auratus</i> B	DGYRVAKGNTNIIILGRMHKSEFFQKPNFENLENFENTVPSRYFOPFGCCPGRACVGKHI	448
<i>Danio rerio</i> B	DGYRVAKGNTNIIILGRMHKTEFFKPKNEFLENFENTVPSRYFOPFGCCPGRACVGKHI	449
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> B	E GTKIRKGNTNIIINMGLMHKTEFFPKPKEFSLSNFDTKVPSSRFOPFGCCPGRSCVGKRI	447
<i>Oryzias latipes</i> B	E GTKIRKGNTNIIILNIGLMHKTEFFPKPTEFSLANFEKTVPSRFOPFGCCPGRSCVGKHI	447
<i>Cynoglossus semilaevis</i> B	LVTLLSHYTVCPRGCSLSSIRQTNLSQLQPVEDEHS---LTMRFIPRTTQPTQE	498
<i>Cynoglossus semilaevis</i> A	LVTLLSQFCVCCHQGLTLDSPKTNLSQLQPVEEEQEAQHLSMTFLPRKGIIHSKADPLHKYAC	526
<i>Paralichthys olivaceus</i> A	LVTLLSQYSCVCPHEGLTLDCLPQTNNLSQLQPVEHQAEPHLNMRFLRQGRGSWQTL	518
<i>Carassius auratus</i> B	LVTLLSRFTVCPRHGCTVSTIKQTNNLSQLQPVEEDPDS---LAMRFIPRSQNIGCDPHLGKETQE	510
<i>Danio rerio</i> B	LVTMLSRFTVCPRHGCTISTIKQTNNLSQLQPVEEDPDC---LAMRFIPRAONSGETADNRTSKE	511
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> B	LITLLSRFTVCPRLSSIRQTNLSQLQPVEDEHS---LAMRFIPRTTHIDDNSEGVGPTEL	508
<i>Oryzias latipes</i> B	LITLLSRFTVCPRGCTLNSIRQTNLSQLQPVEDEHS---LTMRFIPRTSQPHLT	499

图 2 半滑舌鳎 P450aromB 氨基酸序列(ABM90641)与其他脊椎动物 P450arom 氨基酸序列的比较

Fig. 2 Alignment of amino acid *Cynoglossus semilaevis* P450aromB (ABM90641) with other vertebrate

预测的 I -螺旋区、芳香化酶特异的保守区和血红素结合区，分别用灰色、粗体和框表示。

The putative regions of I-helix, aromatase specific substrate binding region and heme-binding region are shown in gray, boldface and boxes, respectively.

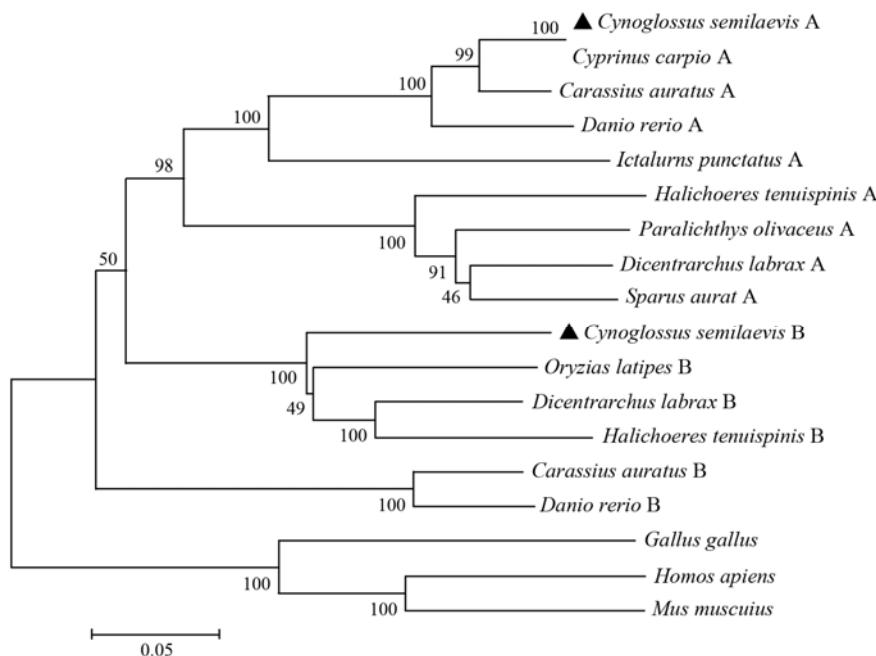


图 3 基于 NJ 法构建的半滑舌鳎型芳香化酶和其他物种的芳香化酶系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Cynoglossus semilaevis* and other organisms P450arom from P450aromB amino acid sequence based on NJ method

置信度(bootstraps)1000 检验各分支的置信度,A 表示性腺型芳香化酶, B 表示脑型芳香化酶。

Distances are used to construct the phylogenetic tree and bootstrap values based on 1000 re-sampling replicates. The ovarian P450arom and the brain P450arom are shown by A and B, respectively.

2.3 P450aromB的组织表达

以P450aromB(fw4)、P450aromB(rv4)为引物, RT-PCR结果表明, 半滑舌鳎二龄鱼P450aromB只在性腺、脑、鳃和皮肤中表达, 且脑中表达量高于性腺, 鳃中表达量高, 而肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、心肌、肠、头肾、小肠、眼组织中都未见P450aromB表达(图4)。

2.4 P450aromB 在性逆转鱼中的表达

经过甲基睾酮处理(图5)发生性逆转的个体中, 脑中P450aromB的表达量虽降低, 但与对照相比并没有显著差别。而在温度诱导性逆转的个体中P450aromB的表达明显降低(图6)。

3 分析与讨论

芳香化酶几乎存在于所有脊椎动物的脑和性腺中, 是体内催化雄激素转化为雌激素的关键酶(Simpson et al, 1994), 对于性腺发育、性别决定和性别分化的方向具有明显的影响。与哺乳动物只有一种芳香化酶不同, 在许多硬骨鱼中都发现具有卵巢型和脑型两种芳香化酶(Kishida et al, 2001; Dalla

Valle et al, 2002; Tchoudakova et al, 1998), 本文从半滑舌鳎脑中分离了P450aromB, 通过氨基酸序列的同源性及系统发生分析可知, 半滑舌鳎P450aromB与其他鱼类的脑型P450arom同源性较高, 与其他鱼类性腺型P450arom同源性较低, 因而本文从脑中分离的P450arom属于鱼类脑型P450arom。在所比较的几种鱼类中, 与通过半滑舌鳎的P450aromB所得到的聚类结果相似, 半滑舌鳎与青鳉、舌齿鲈、细棘海猪鱼的亲缘关系最近, 与金鱼、斑马鱼、斑点叉尾鮰的亲缘关系较远, 与老鼠、鸡和人亲缘关系最远, 这与这些生物传统分类方法一致。半滑舌鳎芳香化酶氨基酸序列也包含有其他芳香化酶保守的I—螺旋区、芳香化酶特异保守区和血红素结合区, 这表明P450aromB可能也与其他生物的芳香化酶功能相类似。

与金鱼和虹鳟类似(Callard et al, 1997; Belvedere et al, 1998), 半滑舌鳎P450aromB也在脑和性腺表达, 但脑中表达量高于性腺。在硬骨鱼类中, P450aromB主要在脑、下丘脑、视网膜等神经组织中表达, 一般认为参与了中枢神经系统的发育

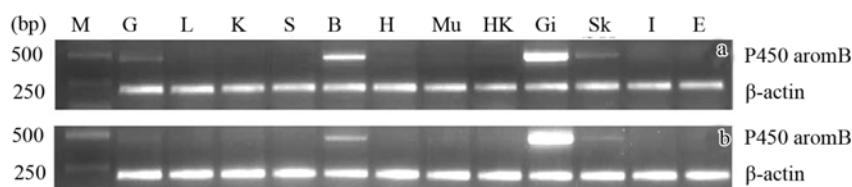


图 4 二龄半滑舌鳎雌鱼 (a) 雄鱼 (b) P450aromB 基因的组织表达

Fig. 4 RT-PCR analysis of P450aromB expression from various tissues of two year old female(a) and male(b) *Cynoglossus semilaevis*

M: DL2000 DNA marker; G: 性腺; L: 肝脏; K: 肾脏; S: 脾脏; B: 脑; H: 心肌; Mu: 肌肉; HK: 头肾; Gi: 鳃; Sk: 皮肤; I: 小肠; E: 眼球。

M, DL2000 DNA marker ; G, gonad; L, liver; K, kidney; S, spleen; B, brain; H, heart; Mu, muscle; HK, head kidney; Gi, gill; Sk, skin; I, intestine; E, eye.

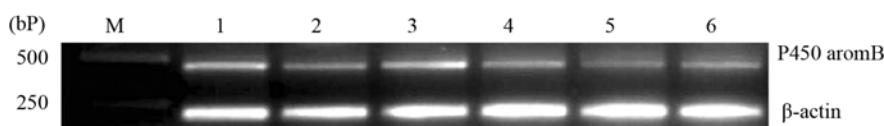


图 5 甲基睾酮诱导半滑舌鳎性逆转后脑中 P450aromB 的表达

Fig. 5 RT-PCR analysis of P450aromB expression in the gonads of sex-reversed *Cynoglossus semilaevis* by Methyltestosterone exposure

1: 雌性对照; 2: 雄性对照; 3: 甲基睾酮处理正常雌性; 4: 甲基睾酮处理正常雄性; 5—6: 甲基睾酮处理性逆转雄性。

1: Female of control; 2: Male of control; 3: Male of Methyltestosterone exposure; 4: female of Methyltestosterone exposure; 5-6: Male of sex reverse by Methyltestosterone.

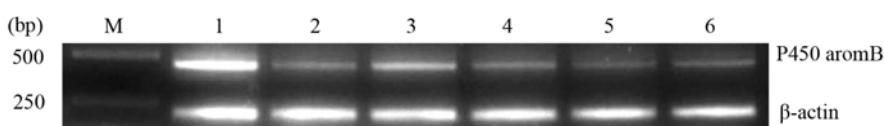


图 6 高温诱导半滑舌鳎性逆转后脑中 P450aromB 的表达

Fig. 6 RT-PCR analysis of P450aromB expression in the gonads of sex-reversed *Cynoglossus semilaevis* treatment by temperature

1: 雌性对照; 2: 雄性对照; 3: 高温处理正常雌性; 4: 高温处理正常雄性; 5—6: 高温处理性逆转雄性。

1: Female of control; 2: Male of control; 3: Male of high temperature treatment; 4: female of high temperature treatment; 5-6: Male of sex reverse by high temperature treatment.

(Kishida & Callard, 2001)和性行为的调节(Bjerselius et al, 2001)。P450aromB 还参与了舌齿鲈和斑马鱼的性腺分化 (Trant, 2001)。脑芳香化酶可能还参与了脑—脑垂体—性腺轴的生理繁殖活动(Cavaco et al, 2001)。此外，在皮肤和鳃中也发现具有表达，特别是鳃中表达量非常高，脑型芳香化酶在鳃中表达的报道目前仅见在虹鳟有报道 (Dalla Valle et al, 2002)。在鳃中虽有睾酮转化为 5α-二氢睾酮和雄烯二酮的生物转化 (Leguen et al, 2000) 以及 α 雌激素受体存在 (Rogers et al, 2000)，然而在鳃中表达的芳香化酶的生理功能仍不清楚。

雌激素处理斑马鱼和金鱼中发现 P450aromB 表达增强，这可能与其 5-侧翼启动子区存在雌激素

应答元件 EREs 有关 (Kishida et al, 2001; Lephart, 1996)。有关芳香化酶抑制剂影响脑型芳香化酶表达也有报道，斑马鱼长期的芳香化酶抑制剂 letrazole 处理减少脑芳香化酶的表达(Yukinori et al, 2004)。黑鲷短期注射芳香化酶抑制剂 fadrozole 和 1,4,6-androstatriene-3, 17-dione 显著抑制脑中芳香化酶的活性但不抑制性腺中的芳香化酶的活性 (Lee et al, 2001)。

我们运用 AFLP 方法从半滑舌鳎基因组中分离了雌性特异的片断，根据已分离得到的雌性特异片断所设计的一对特异引物进行 PCR，建立了遗传性别鉴定技术(Chen et al, 2007)，应用该技术研究基因表达变化情况有利于阐明基因与性逆转的关系。甲

基睾酮在诱导硬骨鱼类雄性化过程中性腺芳香化酶降低,但脑型芳香化酶的报道较少,在斜带石斑鱼中,MT处理P450aromB在下丘脑的表达上升,脑垂体变化不大(Zhang, 2004),罗非鱼中表达量升高。在斑马鱼采用低浓度MT可诱导其雄性化,但浓度较高浓度的MT连续处理引起斑马鱼雌性化,脑芳香化酶上升,这种现象表明在脑中存在雌二醇对芳香化酶的反馈抑制效应(Kishida et al, 2001; Kishida & Callard, 2001)。在本研究中,采用每升水中含有20—100 μg浓度在25—100 d浸浴处理发现

甲基睾酮对半滑舌鳎的脑芳香化酶的表达影响不大,造成这种现象的原因可能与所采用的激素处理方法不同和剂量以及所取脑部位不同有关。

温度对性腺型芳香化酶的报道较多,而对脑型的报道较少。P450aromB在尼罗罗非鱼中受水温的调节,在引起雌性的温度中mRNA水平升高,而在引起雄性的水温时表达量降低(Tsai et al, 2003)。这与我们的研究结果类似,表明温度影响了脑中芳香化酶的表达,进而影响了性腺分化。

参考文献:

- Belvedere L P, Dalla Valle A, Lucchetti A, Ramina S, Vianello L, Colombo.1998. Extraglandular expression of genes encoding steroidogenic cytochromes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)[J]. *Ann N Y Acad Sci*, **839** (1): 559-589.
- Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsen H, Mayer I, Dimberg K. 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -estradiol[J]. *Aquat Toxicol*, **53**: 139-152.
- Callard GV, Tchoudakova A. 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish[J]. *J Steroid Biochem & Mol Biol*, **61** (3-6) : 387-392.
- Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish[J]. *J Steroid Biochem & Mol Biol*, **79**: 305-314.
- Cavaco JE, Baal J, Dijk W, Hassing GA, Goos HJ, Schulz RW. 2001. Steroid hormones stimulate gonadotrophs in juvenile male African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. *Biol Reprod*, **64**: 1358-1365.
- Chen SL, Li J, Deng SP, Tian YS, Wang QY, Zhuang ZM, Sha ZX, J Xu JY. 2007. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Mar biotechnol*, **9**(2): 273-280.
- Dalla Valle L, Ramina A, Vianello S, Belvedere P, Colombo L. 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) [J]. *J Steroid Biochem & Mol Biol*, **82**:19-32.
- Kishida M, Callard G. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Denio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development[J]. *Endocrinol*, **142**:740-749.
- Lee YH, Du JL, Yen FP, Lee CY, Dufour S, Huang JD, Sun LT, Zhang CF. 2001. Regulation of plasma gonadotropin II secretion by sex steroids, aromatase inhibitors, and antiestrogens in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker[J]. *Comp Biochem Physiol*, **129B**:399-406.
- Leguen I, Carlsson C, Perdue-Durand E, Prunet P, Part P, Cravedi JP. 2000. Xenobiotic and steroid biotransformation activities in rainbow trout gill epithelial cells in culture[J] *Aquat Toxicol*, **48** (2/3): 165-176.
- Lephart ED. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450[J]. *Brain Res Rev*, **22**(1):1-26.
- Rogers SA, Llewellyn L, Wigham T, Sweeney GE. 2000. Cloning of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) estrogen receptor- α [J]. *Comp Biochem Physiol B*, **125** (3): 379-385.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham L. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis[J]. *Endocr Rev*, **15**: 342-355.
- Tchoudakova A, Callard G. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinol*, **139**: 2179-2189.
- Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung AR. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*) [J]. *J Exp Zool*, **290**: 475-483.
- Tsai CL, Wang LH, Chang CF, Kao CC. 2000. Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*[J]. *J Neuroendocrinol*, **12**: 894-898.
- Yukinori K, Allen RP, John MT. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles[J]. *Aquatic Toxicology*, **69**: 25-34.
- Zhang Y. 2004. Cytochrome P454 aromatases in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*): cDNA cloning and regulation of expression[D]. Ph. D. thesis, University of Sun Yat-sen. [张 勇. 2004. 斜带石斑鱼P450芳香化酶基因克隆及其表达调节的研究. 中山大学博士学位论文.]