

曹文怡, 易少奎, 杨楠, 等. 泥鳅 *cyp19a1* 基因克隆及其在倍性间的表达差异[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(4): 166-176.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.04.020

泥鳅 *cyp19a1* 基因克隆及其在倍性间的表达差异

曹文怡¹, 易少奎², 杨楠¹, 苏君晓¹, 罗双双¹, 高泽霞¹, 周小云¹

1. 华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁育教育部重点实验室, 武汉 430070;

2. 湖州师范学院生命科学学院, 湖州 313000

摘要 克隆并分析泥鳅 *cyp19a1a* 的全长 cDNA 和 5'侧翼序列, 用 qRT-PCR 技术比较 *cyp19a1a* 在二倍体、四倍体泥鳅组织间和倍性间的表达差异。结果发现, 泥鳅 *cyp19a1a* 的 cDNA 全长 1 905 bp, 包括 29 bp 的 5'TR、301 bp 的 3'UTR 和 1 575 bp 的 ORF 序列, 其氨基酸序列中存在 I-螺旋区、芳香化酶特异保守区以及血红素结合区等重要功能域。用 hiTAIL-PCR 克隆获得 2 040 bp 的 5'侧翼序列, 在该序列上预测到典型元件 TATA-box, 以及 C/EBP β 、SRV、ER、CREB、GR 等转录因子结合位点。12 月龄四倍体泥鳅的体长、体质量均显著高于二倍体, 但性腺发育明显滞后于二倍体。*cyp19a1a* 和 *cyp19a1b* 分别在二倍体、四倍体泥鳅的性腺和脑中的表达量最高。倍性间比较结果显示, *cyp19a1a* 在四倍体各组织中的表达均高于二倍体(除精巢外); *cyp19a1b* 在四倍体雌鳃脑中的表达量显著高于二倍体, 但在四倍体雄鳃脑中的表达量显著低于二倍体。综合分析上述结果, 四倍体中相对较高的 *cyp19a1a* 表达可能与其性腺所处发育时期有关, 较晚的性成熟有利于泥鳅将更多能量用于个体生长。由于 *cyp19a1* 及其催化产生的雌激素还可以通过 GH-IGF 通路调节鱼类的生长, 推测 *cyp19a1* 在泥鳅倍性间的差异表达可能与二倍体、四倍体间的生长生殖差异密切相关。

关键词 泥鳅; *cyp19a1*; 四倍体; 性腺发育; 基因表达; 生殖调控

中图分类号 Q 959.54 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)04-0166-11

作为脊椎动物中分布最广、种类最多的一个类群, 鱼类的性别决定机制有着原始性、多样性以及可塑性等特点, 同时存在雌雄异体、雌雄同体和单性群体等性别决定类型。但无论是哪种性别决定类型, 其下游的性别决定因素却都是相当保守的, 尤其是芳香化酶(aromatase), 可以催化雄激素转化为雌激素, 从而控制性腺发育甚至影响性别决定^[1]。细胞色素 P450 芳香化酶(P450arom)是由 *cyp19a1* 基因编码产生的。硬骨鱼类中存在 2 种 *cyp19a1* 基因亚型: *cyp19a1a* 和 *cyp19a1b*。*cyp19a1a* 主要在性腺中表达, 因此其编码产物称为性腺型芳香化酶(P450aromA); *cyp19a1b* 则主要在脑中表达, 其编码产物称为脑型芳香化酶(P450aromB)^[2]。近年来的研究发现, *cyp19a1a* 及其催化产生的雌激素不仅在卵巢分化与维持的过程中起到决定性的作用, 而且在精巢的分化中也起到了关键性的作用, *cyp19a1a* 上调对触发和维持卵巢分化是必需的, 而 *cyp19a1a* 的下调则是诱导精巢分化的一个必不可少

的环节^[3-4]。而 *cyp19a1b* 及其催化产生的雌激素与中枢神经系统发育期间的神经内分泌功能、性行为 and 性别分化密切相关^[5]。此外, 有研究发现, *cyp19a1b* 还可能对鱼类精巢的发育有重要的促进作用^[6]。

芳香化酶及其催化产生的雌激素, 还可以通过 GH-IGF 通路调节鱼类的生长发育。比如, 雌二醇可以调节虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[7]、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[8]、黄鲈(*Diplolprion bifasciatum*)^[9] 中 GH-IGF 通路相关基因的表达水平, 进而影响生长。

我国的野生泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)不仅有二倍体, 在长江流域还有大量的天然四倍体^[10]。四倍体泥鳅的体型明显大于二倍体, 具有显著的生长优势^[11]。通过诱导雌核发育和雄核发育, 研究人员发现, 这些四倍体泥鳅是由二倍体泥鳅通过染色体加倍产生的^[12]。天然四倍体泥鳅是我国特有的、非常珍贵的种质资源^[13], 不仅为泥鳅优

收稿日期: 2021-02-25

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900205)

曹文怡, E-mail: 1653254108@qq.com

通信作者: 周小云, E-mail: zhouxu@mail.hzau.edu.cn

良品种的培育提供了理想的原材料,还是研究多倍体脊椎动物的生物学和遗传学等的理想模型。鉴于 *cyp19a1* 既能调控鱼类的生殖发育,又能影响鱼类的生长代谢,因此,研究其在二倍体、四倍体泥鳅间的表达特点,可能对了解泥鳅倍性间生长和生殖差异有一定的参考价值。近期,笔者所在课题组发现,四倍体泥鳅的生殖发育明显滞后于二倍体,在相同的养殖环境下,二倍体泥鳅 1 龄即可性成熟并开始繁殖活动,而四倍体泥鳅 2 龄以后才能达到性成熟。我们推测,四倍体泥鳅的生长优势可能与其相对较晚的生殖发育有关。

本研究中,我们选择 12 月龄的二倍体、四倍体泥鳅为研究对象,克隆获得了泥鳅的 *cyp19a1a* 基因 cDNA 序列和 5'侧翼序列,并分析 *cyp19a1* 在泥鳅组织间和倍性间的表达特点和差异,研究其与泥鳅倍性间生长和生殖差异中的相关性,进而探讨四倍体泥鳅性腺发育较晚的分子机制,以期为鱼类生长和生殖的调控关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼来源

以野生二倍体、四倍体泥鳅为亲本,通过人工繁殖获得子一代,将其在相同环境下养殖,随机选取 12 月龄的二倍体、四倍体雌雄个体各 9 尾用于本研究。

1.2 DNA 和 RNA 的提取和检测

将试验鱼用 MS-222 (100 mg/L) 麻醉,测量体长、体质量后,分离脑、性腺、肌肉及肝脏,在液氮中速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存。用醋酸铵/异戊醇法提取各组织的 DNA,用 Trizol 法提取 RNA,分别用 1% 琼脂糖电泳和紫外分光光度计 (NanoDrop 2000, USA) 检测提取 DNA 和 RNA 的完整性和浓度。将每 3 个个体的 RNA 等量混合作为 1 个样本用于后续的基因表达分析。

1.3 *cyp19a1a* 基因的全长 CDS 和 5'侧翼序列克隆

基于笔者所在课题组前期对泥鳅全长转录组测序获得的 *cyp19a1a* 部分 cDNA 序列 (GenBank accession No. AB531496.1), 分别设计 5' RACE 和 3' RACE 引物 (表 1), 按照试剂盒 (TaKaRa, Japan) 的说明分别克隆其 5'-UTR 和 3'-UTR 序列, PCR 产物经胶回收、纯化、连接、转化、阳性克隆鉴定后,送武汉擎科生物技术有限公司测序。测序结果经比对

确认无误后,用 DNA Star 软件拼接得到 *cyp19a1a* 基因的全长 CDS 序列。

基于拼接获得的全长 CDS 序列,采用高效热不对称 PCR (high-efficient thermal asymmetric inter-laced PCR, hiTAIL-PCR) 技术扩增泥鳅 *cyp19a1a* 的 5'侧翼序列。具体方法为:将泥鳅 *cyp19a1a* 的 CDS 序列与斑马鱼的序列比对推测其第一外显子序列,然后在第一外显子序列上设计 3 条嵌套的特异性引物 (special primer, 简称 SP1, SP2, SP3) 作为下游引物,用 Liu 等^[14] 的 LAD1-5 长随机简并引物 (longer arbitrary degenerate primer) 作为上游引物 (表 1) 进行连续 3 轮 PCR 扩增。其中,第 1 轮 PCR 以泥鳅基因组 DNA 为模板,用 SP1 特异性引物与 LAD1-5 兼并引物组合进行扩增;然后将第 1 轮扩增产物稀释 40 倍作为第 2 轮 PCR 模板,用 SP2 与 AC1 组合扩增;随后将第 2 轮扩增产物稀释 10 倍作为第 3 轮 PCR 模板,用 SP3 与 AC1 进行扩增。第 3 轮 PCR 产物经胶回收、纯化、连接、转化、阳性克隆鉴定后,送武汉擎科生物技术有限公司测序。测序结果经人工检查确认无误后,用 DNASTar 软件拼接得到 *cyp19a1a* 基因的 5'侧翼序列。

1.4 *cyp19a1a* 基因 CDS 和 5'侧翼序列的生物信息学分析

对克隆获得的 CDS 序列,用 BioXM 2.6 导出氨基酸序列,用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质的三级结构,用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质的保守结构域,用 PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) 预测蛋白质的功能域。然后用 Clustal W (2.0) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 将泥鳅 *cyp19a1a* 基因编码的氨基酸序列与其他物种进行同源性比对。用 MEGA X 的邻位相连 (neighbor-joining, NJ) 法,将泥鳅 *cyp19a1a* 基因编码的氨基酸序列与其他脊椎动物的氨基酸序列进行比对,构建系统进化树。

用在线软件 NNPP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测 *cyp19a1a* 基因 5'侧翼序列的核心元件 (promoter core element, PCE) 和转录起始位点 (transcript start site, TSS), 用 AliBaba 2.1 (<http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) 和 Cister (<https://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>) 预测 5'侧翼序列上潜在的转录因子结合位点。

1.5 *cyp19a1* 在二倍体、四倍体泥鳅间的表达差异分析

根据克隆获得的 *cyp19a1a* 的 CDS 序列,用 Primer 5.0 软件设计 *cyp19a1a* 的 qRT-PCR 引物。为了解 *cyp19a1b* 与 *cyp19a1a* 的表达差异,本研究根据全长转录组测序获得的 *cyp19a1b* 部分 CDS 序列,设计 qRT-PCR 引物,并用泥鳅的 β -actin 序列 (AB200265.1)设计内参引物(表 1),比较 *cyp19a1b* 与 *cyp19a1a* 在泥鳅组织间和倍性间的表达差异。

将提取的总 RNA 用 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 反

转录为 cDNA。然后用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa, Japan),以二倍体、四倍体泥鳅各组织的 cDNA 为模板,在 ABI 7500 FAST Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)上检测 *cyp19a1a* 和 *cyp19a1b* 的表达水平。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量。

1.6 数据分析

用 SPSS 19.0 软件对数据结果进行统计学处理,用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 以及 Duncan's 多重比较进行显著性检验分析, $P < 0.05$ 为差异显著,用 Origin 9.0 软件作图。

表 1 泥鳅 *cyp19a1* 克隆和表达分析所用的引物

Table 1 Primers used for cloning and expression analysis of *cyp19a1* gene in *M. anguillicaudatus*

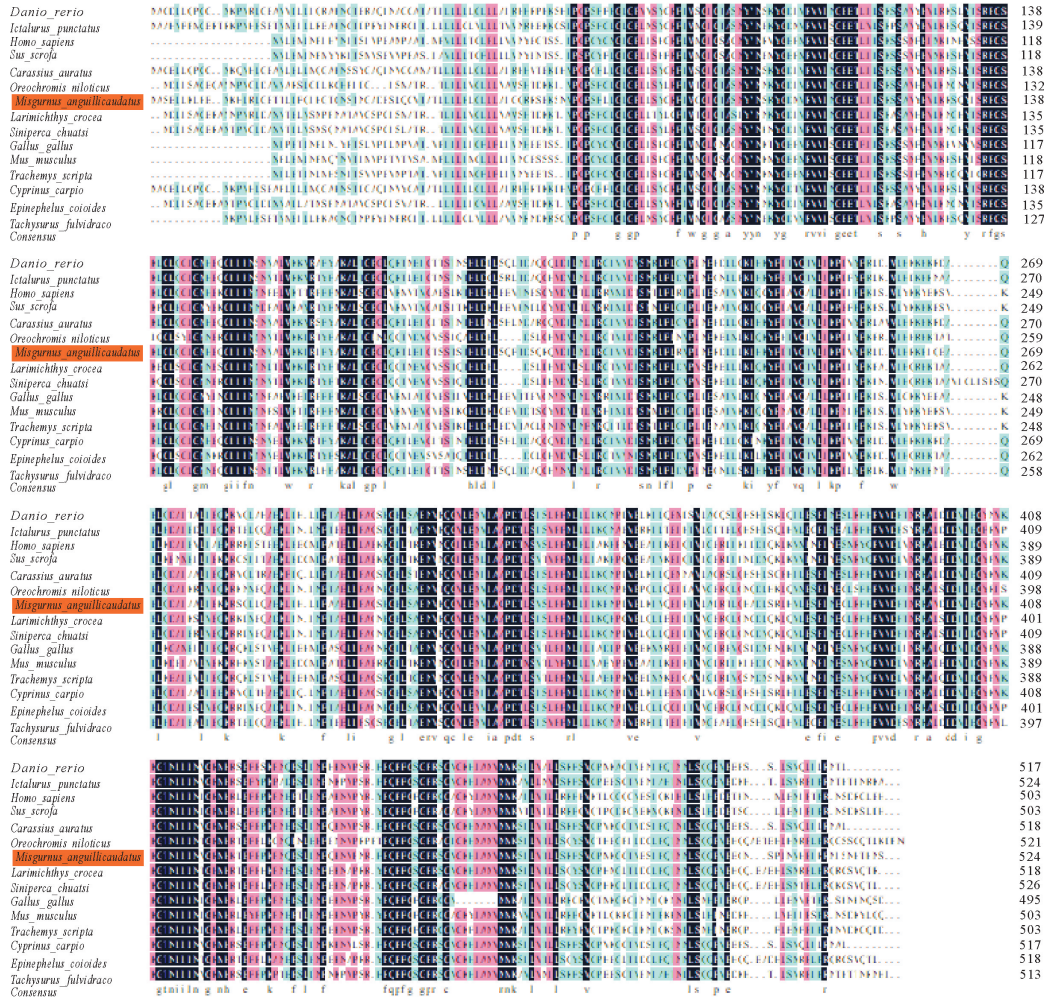
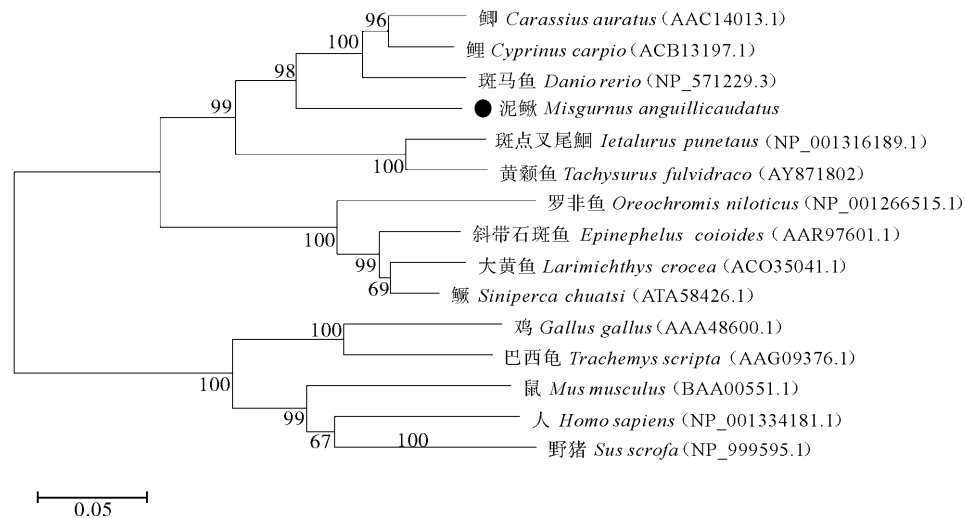
引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
GSP5'-O	TTTCATCAGCCCCATTTGTG	5'RACE-PCR
GSP5'-I	AAATCCACCGTAGTCTCCCC	
GSP3'-O	TGTCTCAGTTTCTGTGTGTCC	3'RACE-PCR
GSP3'-I	TAGCATCCCTCAAACCAACA	
<i>cyp19a1a</i> -F	ATGAAGCATTTGCGTCTC	qRT-PCR
<i>cyp19a1a</i> -R	CAGAGAAACAGCAGTAGTAATG	
<i>cyp19a1b</i> -F	ATTGCTCGGGTTTGAT	
<i>cyp19a1b</i> -R	GGTAGCGTTGACGGATA	
β -actin-F	CCCAAAGCCAACAGAGAAAAG	hiTAIL-PCR
β -actin-R	GGAAGAGCATAACCCTCGTAGAT	
LAD1-1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)N(G/C/A)NNNGGAA	
LAD1-2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)N(G/C/T)NNNGGTT	
LAD1-3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/A)(G/C/A)N(G/C/A)NNNCCAA	
LAD1-4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(G/C/T)(G/A/T)N(G/C/T)NNNCGGT	
LAD1-5	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGC(T/A/C)N(A/G/C)NNNCCAC	
AC1	ACGATGGACTCCAGAG	
<i>cyp19a1a</i> -SP1	TCTGACCGACGTTGTCCGA	
<i>cyp19a1a</i> -SP2	CTTTCATCGGCCCATTTGTGCTG	
<i>cyp19a1a</i> -SP3	GTAGTCTCCCGAGACGCAAATGCT	

2 结果与分析

2.1 泥鳅 *cyp19a1a* 基因的 CDS 序列特征

泥鳅 *cyp19a1a* 基因的 cDNA 序列全长为 1 905 bp,包括 29 bp 的 5'UTR 序列、301 bp 的 3'UTR 序列和 1 575 bp 的 ORF 序列,编码 524 个氨基酸的蛋白质,序列特征如图 1 所示。蛋白质保守结构域分析显示,泥鳅 *cyp19a1a* 基因编码的氨基酸序列分别在 46~55 位有 1 个低复杂度区 (low

complexity region),在 67~505 位有 1 个 P450 蛋白结构域 (Pfam domain)。用 PROSITE 对其功能域预测发现,在 449~458 位存在细胞色素 P450 半胱氨酸血红素-铁配体识别结合位点。此外,通过与其他物种进行比较发现,在泥鳅的 *cyp19a1a* 基因中也存在芳香化酶的 3 个高度保守片段,分别为 I-螺旋区 (与类固醇物质结合有关)、芳香化酶特异保守区以及血红素结合区 (图 1),这表明泥鳅的 *cyp19a1a* 基因具有性腺型芳香化酶基因的典型功

图 3 不同物种 *cyp19a1a* 氨基酸序列比对Fig.3 Alignment of deduced amino acid sequence of *cyp19a1a* between different species图 4 基于氨基酸序列的 *cyp19a1a* 基因系统进化分析Fig.4 Phylogenetic analysis of *cyp19a1a* gene based on its amino acid sequences

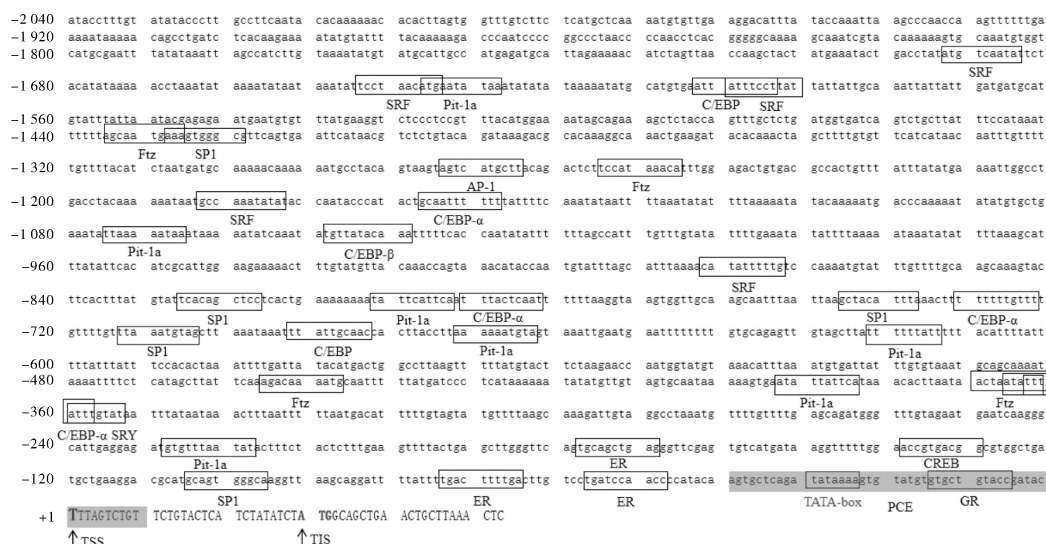


图 5 泥鳅 *cyp19a1a* 启动子区转录因子结合位点预测

Fig.5 Prediction results of transcription factor binding sites in *cyp19a1a* of *M. anquillicaudatus*

2.4 二倍体、四倍体泥鳅的生长和性腺发育比较

比较 12 月龄二倍体、四倍体泥鳅的体长和体质量参数,结果显示,四倍体泥鳅的雌雄个体均显著高于二倍体 ($P < 0.05$),表现出明显的生长优势(图 6)。卵巢组织的切片结果显示,12 月龄二倍体泥鳅卵巢主要为成熟期的卵母细胞(LMO),为Ⅳ期卵巢,而四倍体泥鳅的卵巢中主要为皮层滤泡期的卵母细胞(CAO)和早期的卵黄卵母细胞(EVO),为Ⅱ期卵巢。精巢组织切片结果显示,二倍体泥鳅的精巢中含有大量的精子细胞(Sz)和少量的精细胞(St),为Ⅳ期精巢,而四倍体泥鳅的精巢中含有部分精母细胞

(Sc)和大量的精细胞(St),为Ⅲ期精巢(图7)。

2.5 *cyp19a1a/b* 在二倍体、四倍体泥鳅组织间的表达差异分析

qRT-PCR 分析结果显示, *cyp19a1a* 在二倍体雌性泥鳅的卵巢中表达水平最高, 其次为肌肉和肝脏, 在脑中的表达量最低, 但其在雄性二倍体泥鳅肝脏和肌肉中的表达水平却显著高于雌性 ($P < 0.05$) (图 8A)。四倍体泥鳅与二倍体的表达模式基本一致 (图 8B)。*cyp19a1b* 在脑中的表达量显著高于其他组织, 且在雌性中的表达量显著高于雄性 ($P < 0.05$) (图 8C)。在二倍体泥鳅的肌肉和精巢中

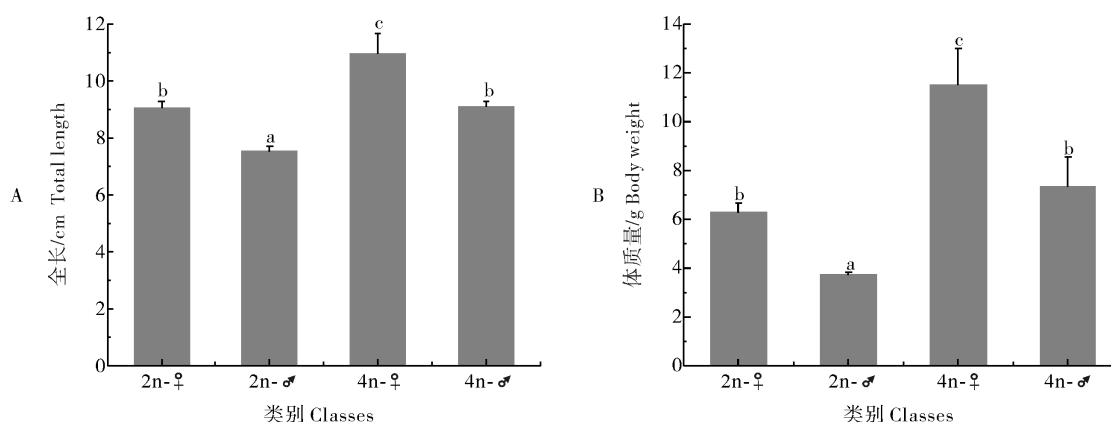
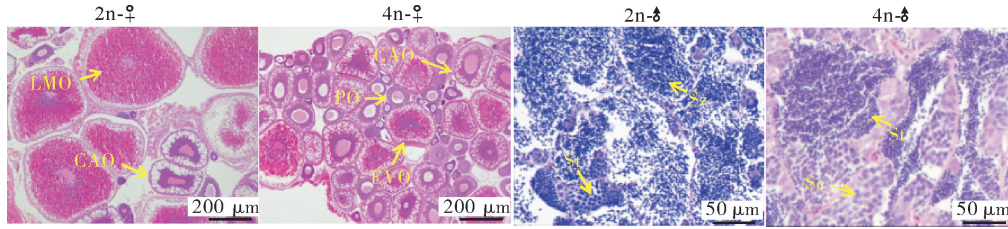


图 6 二倍体、四倍体泥鳅体长(A)和体质量(B)

Fig.6 Body length (A) and body weight (B) between diploid and tetraploid *M. anquillicaudatus*

柱形图上相同字母表示无显著性差异($P>0.05$),不同字母表示有显著性差异($P<0.05$)。下同。Same letters on the bar means no significantly different between each other ($P>0.05$), while different letters means significantly different ($P<0.05$).The same as below.



PO:初级卵母细胞; CAO:皮质滤泡期的卵母细胞; EVO:早期的卵黄卵母细胞; LMO:成熟期的卵母细胞; Sc:精母细胞; St:精细胞; Sz:精子细胞。PO:Primary oocytes; CAO:Cortical-alveolar oocytes; EVO:Early vitellogenic oocytes; LMO:Late/mature oocytes; Sc:Spermatocytes; St:Spermatids; Sz:Spermatozoa.

图7 二倍体、四倍体泥鳅卵巢和精巢发育阶段的组织学特征

Fig.7 Histological images of ovary and testis in diploid and tetraploid *M. anguillicaudatus* in developmental stages

也检测到 *cyp19a1b* 的表达,但其在肝脏和卵巢中的表达量很低(图 8C)。与二倍体相比, *cyp19a1b* 在四倍体泥鳅肌肉的表达量很低,几乎无法检测到(图 8D)。

2.6 *cyp19a1* 在雌雄泥鳅倍性间的表达比较

在雌性泥鳅中, *cyp19a1a* 在四倍体泥鳅脑、性腺、肌肉和肝脏 4 个组织中的表达水平都显著高于二倍体 ($P < 0.05$)(图 9A);而在雄性中, *cyp19a1a*

在性腺中的表达水平低于二倍体 ($P > 0.05$)(图 9B)。在雌性中, *cyp19a1b* 基因在四倍体泥鳅脑中的表达量显著高于二倍体(图 9C),但在雄性中其表达水平相反 ($P < 0.05$)(图 9D)。除此之外,在雌性中,二倍体 *cyp19a1b* 在肌肉中的表达水平高于四倍体 ($P > 0.05$)(图 9C);在雄性中,该基因在性腺、肌肉和肝脏组织中的表达模式均为二倍体高于四倍体 ($P > 0.05$)(图 9D)。

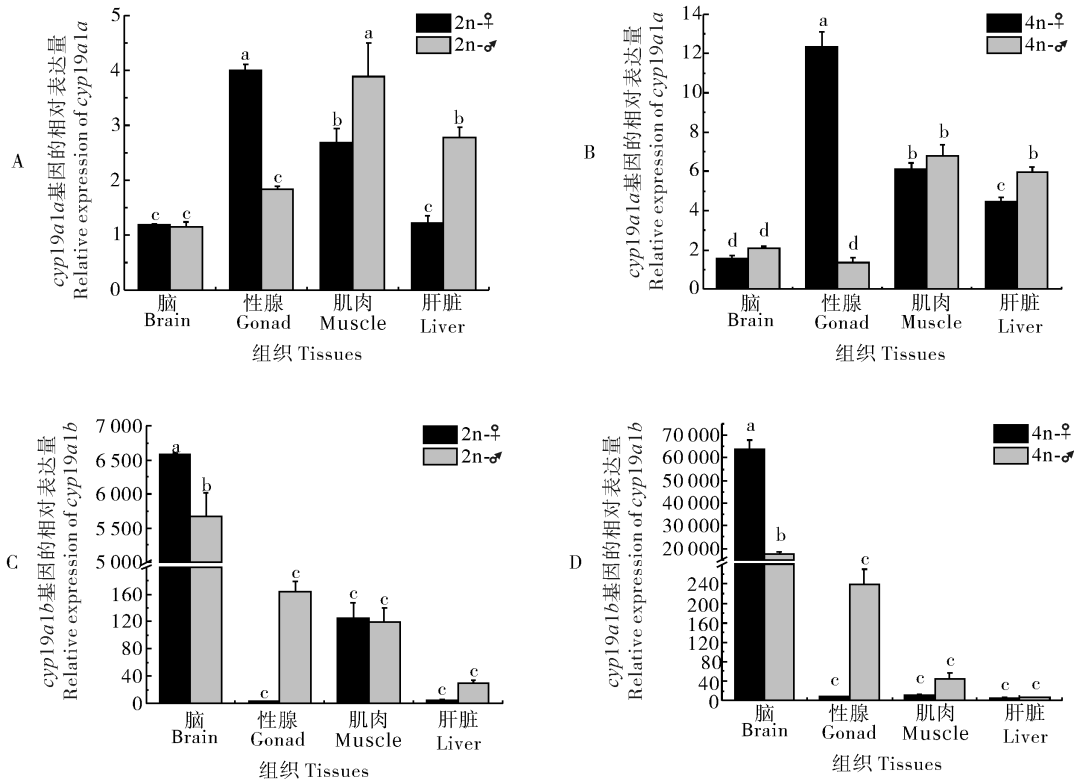
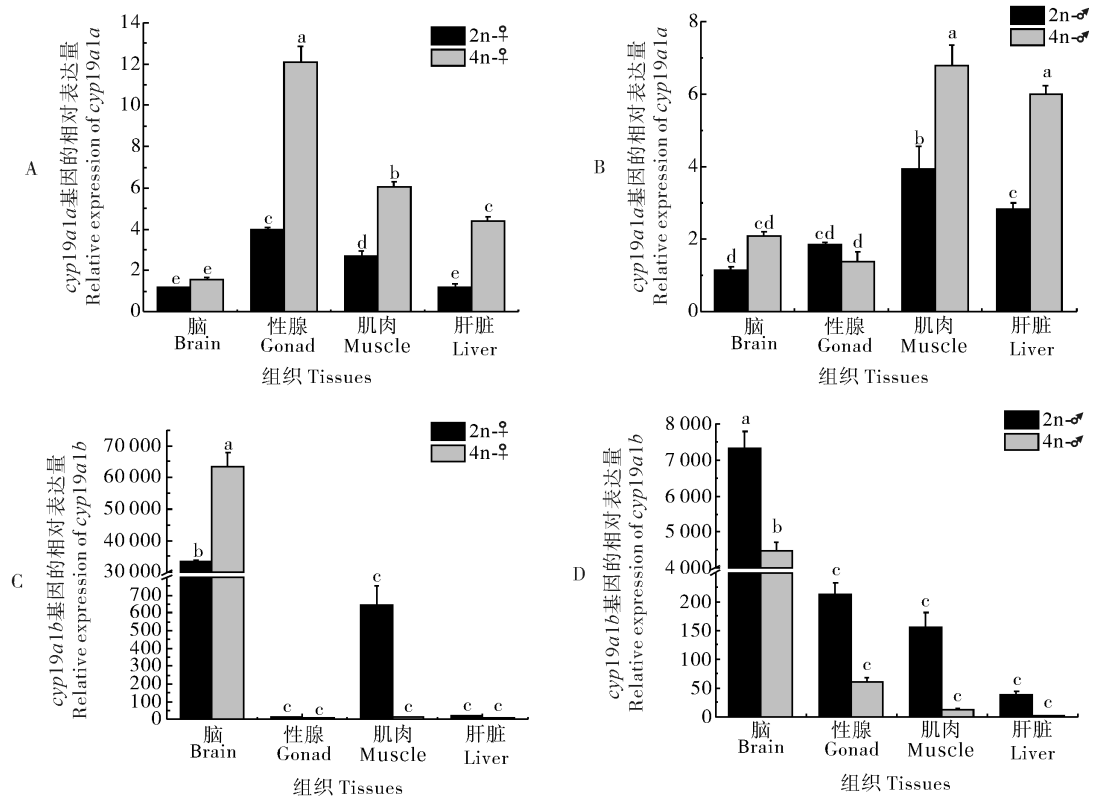


图8 *cyp19a1a*(A,B)和 *cyp19a1b*(C,D)在雌雄泥鳅组织间的表达比较

Fig.8 Expression of *cyp19a1a* (A,B) and *cyp19a1b* (C,D) between-tissue in *M. anguillicaudatus*

图9 *cyp19a1a* (A,B)和 *cyp19a1b* (C,D)在雌雄泥鳅不同倍性间的表达Fig.9 Expression of *cyp19a1a* (A,B) and *cyp19a1b* (C,D) between-ploidy in *M. anguillicaudatus*

3 讨论

3.1 泥鳅 *cyp19a1a* 基因的 5'侧翼序列特征

本研究中,我们在泥鳅 *cyp19a1a* 基因的 5'侧翼序列上预测到多个转录因子结合位点,其中包括 CREB 结合位点,该结合位点是硬骨鱼 *cyp19a1a* 启动子的保守特征^[15]。在 5'侧翼序列上,还发现有 GR(糖皮质激素受体)结合位点,研究发现,体内皮质醇(与鱼类压力最直接相关的激素)的增加可以通过与 *cyp19a1a* 启动子中的 GR 结合,下调 *cyp19a1a* 的表达,从而导致雌二醇(E₂)的生成迟缓并最终抑制卵巢分化^[16-18]。此外,还发现多个 ER 转录因子结合位点,推测 E₂与 ER(雌激素受体)结合后,可以直接作用于靶基因启动子区的雌激素应答元件,从而发挥对靶基因的转录调控作用^[19]。因此,泥鳅 *cyp19a1a* 的 5'侧翼序列上存在 *cyp19a1a* 基因的重要转录因子结合位点。

3.2 二倍体、四倍体泥鳅生长和性腺发育的比较分析

比较 12 月龄的二倍体、四倍体泥鳅的生长参

数,结果显示,四倍体泥鳅的体长和体质量均显著高于二倍体,具有明显的生长优势,这与已有的研究结果是一致的^[11]。同时,性腺切片的结果显示,在雌性和雄性中,四倍体泥鳅的性腺发育时期都明显滞后于二倍体。一般认为,生长和生殖之间存在着相互制约的关系,生长和生殖能量的分配存在着一个平衡^[20],我们推测,四倍体泥鳅的生长优势可能与其相对较晚的性腺发育有关。

3.3 *cyp19a1* 在二倍体和四倍体泥鳅组织间的表达特点

在二倍体、四倍体泥鳅中,*cyp19a1a* 均在卵巢中的表达量最高,且表达水平显著高于精巢 ($P < 0.05$),这是由于较高的 *cyp19a1a* 可以加速雌激素的合成,而雌激素在鱼类卵巢分化与维持等方面起着至关重要的作用^[21]。与 *cyp19a1a* 不同, *cyp19a1b* 在卵巢中几乎不表达,在精巢中的表达相对较高,这与东非慈鲷(Cichlidae)的研究结果类似^[6]。Robertson 等^[22] 对小鼠 (*M. musculus*) *cyp19a1b* 进行靶向破坏,发现缺乏芳香化酶的雄性小鼠在 4.5 个月到 1 a 之间会出现精子发生中断

的现象。由此推测, *cyp19a1b* 不仅参与了性腺分化过程中神经内分泌和代谢的过程, 对维持精巢的功能也发挥了重要的作用^[6]。

cyp19a1a 在泥鳅脑中的表达量较低, 这与其他鱼类中的研究结果一致^[5], 推测在脑中发挥主要功能的是 *cyp19a1b*。在金鱼 (*Carassius auratus*)^[23] 和鲤 (*C. carpio*)^[24] 中的研究发现, *cyp19a1b* 集中在基底前脑的生殖控制中心表达, 表明 *cyp19a1b* 及其催化产生的雌激素在发育和生殖过程中发挥着重要作用。在斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 的脑中, *cyp19a1b* 活性较高的区域还发现了促性腺激素释放激素 (GnRH) 神经元 (负责控制硬骨鱼类的性腺成熟), 推测 *cyp19a1b* 可能参与调节了脑-垂体-性腺轴 (HPG 轴), 直接或间接调节促性腺激素的分泌^[25]。

在泥鳅的肝脏中也检测到了 *cyp19a1* 的表达, 尤其是 *cyp19a1a*, 且其在雄鱼中的表达量高于雌性。类似的结果在人 (*H. sapiens*)^[26]、鲤^[24] 中也有报道。在鱼类中, 肝脏是性腺源性雌激素作用的主要靶标之一^[27], 当鱼类处在卵黄形成的高峰期, 肝脏中多量的芳香化酶可以通过促使循环血液中的雄激素转化为雌二醇, 进而刺激肝脏合成卵黄蛋白原^[28]。

3.4 *cyp19a1* 在二倍体、四倍体泥鳅间的表达及其与生长生殖差异的相关性

cyp19a1a 在卵巢和肝脏中, 以及 *cyp19a1b* 在脑中的表达水平均为四倍体高于二倍体, 推测原因可能与四倍体卵巢所处的发育阶段 (Ⅱ期) 有关。鱼类性别相关基因的表达与其性腺分化的发育阶段密切相关, 在乌鳢 (*Channa argus*)^[29] 和牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)^[3] 中, 均发现了 *cyp19a1a* 在卵巢发育未成熟时期的表达量显著高于成熟期的现象。推测其原因可能是由于芳香化酶是将雄激素转化为雌激素的限速酶, 雌激素可以促进肝脏中卵黄蛋白原的产生, 刺激卵母细胞中卵黄物质的积累, 从而在鱼类卵母细胞的发育中发挥重要作用。当卵巢处于分化阶段时, 肝脏内需要大量的雌激素来刺激卵黄蛋白原生成, 为正在发育的卵母细胞提供营养和功能物质^[28], 而芳香化酶是雌激素产生的必要条件, 因此, 此时 *cyp19a1a* 在四倍体泥鳅肝脏中的表达量也较高。Goto-Kazeto 等^[25] 研究发现, 脑中的 *cyp19a1b* 可能参与调节了脑-垂体-性腺轴 (HPG 轴), 进而调节硬骨鱼的性腺分化, 此时四倍体泥鳅

的卵巢处于发育阶段, 需要大量的类固醇激素来促进自身的性腺发育, 所以此时 *cyp19a1b* 在四倍体脑中的表达量较高。*cyp19a1a* 在二倍体泥鳅精巢中的表达量低于四倍体 ($P > 0.05$), 可能与四倍体泥鳅精巢所处的发育阶段有关, Kitano 等^[30] 认为, 精巢中 *cyp19a1a* 的低表达是精巢分化的先决条件。

生长参数及性腺组织学比较结果显示, 与二倍体泥鳅相比, 四倍体泥鳅生长快, 但性成熟明显滞后; 组织间和倍性间的基因表达分析结果显示, *cyp19a1a* 在四倍体泥鳅各组织中的表达量均高于二倍体 (除精巢外)。由于芳香化酶及其催化产生的雌激素, 不仅在鱼类的性别决定中发挥着关键性的作用, 还可以通过 GH-IGF 通路调节鱼类的生长发育。由此, 我们推测, 四倍体泥鳅高表达的 *cyp19a1a* 可以通过影响 IGF/GH 生长轴相关基因的表达水平进而促进四倍体泥鳅的生长。

参考文献 References

- [1] YU J H, TANG Y K, LI J L. Cloning, structure, and expression pattern of the P-450 aromatase gene in rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. Biochemical genetics, 2008, 46 (5/6): 267-280.
- [2] GUIGUEN Y, FOSTIER A, PIFERRER F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish [J]. General and comparative endocrinology, 2010, 165 (3): 352-366.
- [3] SI Y F, DING Y X, HE F, et al. DNA methylation level of *cyp19a1a* and *Foxl2* gene related to their expression patterns and reproduction traits during ovary development stages of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Gene, 2016, 575 (2): 321-330.
- [4] YIN Y K, TANG H P, LIU Y, et al. Targeted disruption of aromatase reveals dual functions of *cyp19a1a* during sex differentiation in zebrafish [J]. Endocrinology, 2017, 158 (9): 3030-3041.
- [5] CHIANG F, YAN Y L, TONG S K, et al. Characterization of duplicated zebrafish *cyp19* genes [J]. The journal of experimental zoology, 2001, 290 (7): 709-714.
- [6] BÖHNE A, HEULE C, BOILEAU N, et al. Expression and sequence evolution of aromatase *cyp19a1* and other sexual development genes in east African cichlid fishes [J]. Molecular biology and evolution, 2013, 30 (10): 2268-2285.
- [7] CLEVELAND B M, WEBER G M. Effects of sex steroids on expression of genes regulating growth-related mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. General and comparative endocrinology, 2015, 216: 103-115.

- [8] RILEY L G, HIRANO T, GRAU E G. Estradiol-17 β and dihydrotestosterone differentially regulate vitellogenin and insulin-like growth factor-I production in primary hepatocytes of the tilapia *Oreochromis mossambicus* [J]. Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology & pharmacology, 2004, 138(2): 177-186.
- [9] ROBERTS S, BARRY T, MALISON J, et al. Production of a recombinantly derived growth hormone antibody and the characterization of growth hormone levels in yellow perch [J]. Aquaculture, 2004, 232(1/2/3/4): 591-602.
- [10] 李丹阳, 罗丽飞, 曹文怡, 等. 雌激素受体基因对泥鳅雌雄和倍性生长差异的表达调控作用 [J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(6): 164-172. LI D Y, LUO L F, CAO W Y, et al. Regulation of *ER* genes expression on growth differences of sexes and diploids in *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(6): 164-172 (in Chinese with English abstract).
- [11] 李煜. GH/IGF 轴相关基因在二、四倍体泥鳅中的表达及 DNA 甲基化的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016. LI Y. Comparative studies on expression and DNA methylation of the GH/IGF axis genes in diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [12] ARAI K. Genetics of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*: recent progress and perspective [J]. Folia biologica, 2003, 51 (Suppl): 107-117.
- [13] 宋晓然, 詹凡玢, 王卫民. 泥鳅二倍体与四倍体 *trim63a* 基因的克隆及表达分析 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(5): 17-25. SONG X R, ZHAN FB, WANG W M. Cloning and Expression Analysis of *trim63a* in diploid and tetraploid *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 38(5): 17-25 (in Chinese with English abstract).
- [14] LIU Y G, CHEN Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. BioTechniques, 2007, 43(5): 649-650, 652, 654.
- [15] ZHANG Y, ZHANG S, LIU Z X, et al. Epigenetic modifications during sex change repress gonadotropin stimulation of *Cyp19a1a* in a teleost ricefield eel (*Monopterus albus*) [J]. Endocrinology, 2013, 154(8): 2881-2890.
- [16] YAMAGUCHI T, YOSHINAGA N, YAZAWA T, et al. Cortisol is involved in temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder [J]. Endocrinology, 2010, 151(8): 3900-3908.
- [17] YAMAGUCHI T, KITANO T. High temperature induces *cyp26b1* mRNA expression and delays meiotic initiation of germ cells by increasing cortisol levels during gonadal sex differentiation in Japanese flounder [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2012, 419(2): 287-292.
- [18] GOIKOETXEA A, TODD E V, GEMMELL N J. Stress and sex: does cortisol mediate sex change in fish? [J]. Reproduction (Cambridge, England), 2017, 154(6): R149-R160.
- [19] MENUET A, PELLEGRINI E, ANGLADE I, et al. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions [J]. Biology of reproduction, 2002, 66(6): 1881-1892.
- [20] CAO M X, CHEN J, PENG W, et al. Effects of growth hormone over-expression on reproduction in the common carp *Cyprinus carpio* L. [J]. General and comparative endocrinology, 2014, 195: 47-57.
- [21] DEVLIN R H, NAGAHAMA Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences [J]. Aquaculture, 2002, 208(3/4): 191-364.
- [22] ROBERTSON K M, O'DONNELL L, JONES M E E, et al. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (*cyp19*) gene [J]. PNAS, 1999, 96(14): 7986-7991.
- [23] CALLARD G V, DRYGAS M, GELINAS D. Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and *Retina* [J]. The journal of steroid biochemistry and molecular biology, 1993, 44(4/5/6): 541-547.
- [24] BARNEY M L, PATIL J G, GUNASEKERA R M, et al. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): sexual dimorphism and onset of ontogenic expression [J]. General and comparative endocrinology, 2008, 156(3): 499-508.
- [25] GOTO-KAZETO R, KIGHT K E, ZOHAR Y, et al. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish [J]. General and comparative endocrinology, 2004, 139(1): 72-84.
- [26] CONLEY A, HINSHELWOOD M. Mammalian aromatases [J]. Reproduction (Cambridge, England), 2001, 121(5): 685-695.
- [27] PIFERRER F, BLÁZQUEZ M. Aromatase distribution and regulation in fish [J]. Fish physiology and biochemistry, 2005, 31(2/3): 215-226.
- [28] GONZÁLEZ A, PIFERRER F. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle [J]. General and comparative endocrinology, 2003, 132(2): 223-230.
- [29] LIU H F, MU X J, GUI L, et al. Characterization and gonadal expression of *FOXL2* relative to *Cyp19a* genes in spotted scat *Scatophagus argus* [J]. Gene, 2015, 561(1): 6-14.
- [30] KITANO T, TAKAMUNE K, KOBAYASHI T, et al. 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*) [J]. Journal of molecular endocrinology, 1999, 23(2): 167-176.

Molecular cloning and differential expression of *cyp19a1* in tetraploid and diploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*

CAO Wenyi¹, YI Shaokui², YANG Nan¹, SU Junxiao¹,
LUO Shuangshuang¹, GAO Zexia¹, ZHOU Xiaoyun¹

1.College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/Key Laboratory
of Agricultural Animal Genetics,

Breeding and Reproduction, Ministry of Education, Wuhan 430070, China;

2.College of Life Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China

Abstract Tetraploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) exhibits superior growth performance but delayed reproductive development when compared with diploid individuals. To understand the potential molecular mechanism of this physiological difference between-ploidy, the full-length cDNA and 5'-flanking sequence of *cyp19a1a* in loach were cloned and analyzed, and the expression of *cyp19a1a* between-ploidy were compared using qRT-PCR method. The results showed that, the full-length cDNA of *cyp19a1a* was 1 905 bp, which contained a 29 bp 5'UTR, 301 bp 3'UTR and 1 575 bp ORF. Some important functional domains were predicted in the *cyp19a1a* protein, such as I-helix region, aromatase specific conservative region and heme-binding region. Using hiTAIL-PCR method, a 2 040 bp 5'-flanking sequence was cloned, and the typical function element TATA-box, as well as some important transcription factor binding sites such as SP1, AP-1, C/EBP β , SRY, ER, CREB, GR were predicted. At the age of 12 month, the body length and weight of tetraploids were significantly higher than those of diploids loach ($P < 0.05$). However, the gonadal development of tetraploids was delayed obviously. In both diploids and tetraploids, the *cyp19a1a* expression was the highest in the gonad, while *cyp19a1b* was the highest in the brain. The loach *cyp19a1a* exhibited higher expression in tetraploids than in diploids in all tissues except for the testis. The *cyp19a1b* expression in the brain was significantly higher in tetraploid female than in diploid female, while an opposite result was observed in male ($P < 0.05$). Combining all results obtained in the present study, it was suggested that the higher expression of *cyp19a1a* in tetraploids should be due to the special developmental stage of the gonads, and the delayed sexual maturity in tetraploids may partially contribute to its superior growth performance. In addition, as *cyp19a1a* and estrogen also regulate fish growth through the GH-IGF pathway, it is speculated that the differential expression of *cyp19a1a* between-ploidy might be related to the different growth performance and reproductive development of diploid and tetraploid loach.

Keywords *Misgurnus anguillicaudatus*; *cyp19a1*; tetraploid; gonadal development; gene expression; reproductive regulation

(责任编辑: 边书京)