

# 来曲唑对暗纹东方鲀性腺分化及相关基因表达的影响

汪奇<sup>①</sup> 郭正龙<sup>②</sup> 李延伸<sup>①</sup> 云丹<sup>①</sup> 黄波<sup>①</sup> 周忠良<sup>①\*</sup>

① 华东师范大学生命科学学院 上海 200062; ② 江苏中润农业发展有限公司 南通 226634

**摘要:** 为了解雌激素在鱼类雌性性别分化中的作用, 在克隆暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 性腺 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因部分序列基础上, 采用不同浓度芳香化酶抑制剂来曲唑 (letrozole, LE) (0、25、125、625、3 125  $\mu\text{g/L}$ ) 处理暗纹东方鲀初孵仔鱼, 每个平行组各 20 尾鱼, 观察 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因的表达情况和组织学变化。RT-PCR 结果显示: 25  $\mu\text{g/L}$  LE 实验组中样本 *CYP19A* 和 *DMRT1* 表达水平与对照组相比无显著差异; LE 125  $\mu\text{g/L}$  以上各浓度组中约 30% 的样本同时表达 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因, 且随着 LE 浓度增加, *CYP19A* 表达量下调, 而 *DMRT1* 表达量上调; 组织学研究表明, 125  $\mu\text{g/L}$  LE 以上各实验组样本中可见由雌性向雄性转变的间性体性腺。孵化后 56 d, 125  $\mu\text{g/L}$  LE 实验组样本中约有 20% 显示雌性; 625  $\mu\text{g/L}$  LE 实验组样本显示表型雄性和间性体, 未见雌性; 最高浓度 3 125  $\mu\text{g/L}$  LE 组中所有样本均显示表型雄性, *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因表达与对照组雄性相同。上述结果说明, 抑制内源雌激素合成可使暗纹东方鲀仔稚鱼 *CYP19A* 基因表达下调, 同时 *DMRT1* 基因表达上调, 并发生雄性化性逆转。

**关键词:** 性别分化; 暗纹东方鲀; 来曲唑

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2012)05-16-08

## Effects of Letrozole on Gonadal Differentiation and Related Gene Expression in Gonad of *Takifugu obscurus*

WANG Qi<sup>①</sup> GUO Zheng-Long<sup>②</sup> LI Yan-Shen<sup>①</sup> YUN Dan<sup>①</sup>  
HUANG Bo<sup>①</sup> ZHOU Zhong-Liang<sup>①\*</sup>

① School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062;

② Jiangsu Zhongrun Agricultural Development Co, Ltd, Nantong 226634, China

**Abstract:** In order to elucidate the role of estrogen in the female sex differentiation of *Takifugu obscurus*, partial sequences of *CYP19A* and *DMRT1* cDNA in gonad of *T. obscurus* were cloned respectively. *T. obscurus* flies were exposed to 0, 25, 125, 625, 3 125  $\mu\text{g/L}$  aromatase inhibitor letrozole (LE) to investigate the *CYP19A* and *DMRT1* gene expression and histological changes. RT-PCR results showed that the *CYP19A* and *DMRT1* expression level in 25  $\mu\text{g/L}$  LE group did not differ from that of the control. In about 30% of the samples exposed to 125  $\mu\text{g/L}$  or higher LE, both *CYP19A* and *DMRT1* genes were expressed. With the increase of LE concentration, the *CYP19A* expression level decreased, while the *DMRT1* expression level increased. Histologically, the samples treated with 125  $\mu\text{g/L}$  or higher LE exhibited visible intersex gonads during their sex reversal from female to male. Fifty-six days after hatching, about 20% of the samples treated with 125  $\mu\text{g/L}$  LE

**基金项目** 上海自然科学基金项目 (No. 08ZR1407300);

\* 通讯作者, E-mail: zhouzl@mail.ecnu.edu.cn;

**第一作者介绍** 汪奇, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水生动物生态毒理学; E-mail: qiaomei13@163.com.

收稿日期: 2012-02-28, 修回日期: 2012-04-18

showed phenotypic female; the samples treated with 625  $\mu\text{g/L}$  LE showed phenotypic male and intersex, without phenotypic female; all samples treated with 3 125  $\mu\text{g/L}$  LE showed phenotypic male, and their *CYP19A* and *DMRT1* expression levels were consistent with those of the control males. Conclusion: Inhibition of endogenous estrogen synthesis allows *CYP19A* expression downregulation, and *DMRT1* expression upregulation in *T. obscurus* fly, and the occurrence of female-to-male reversal.

**Key words:** Sex differentiation; *Takifugu obscurus*; Letrozole

大多数鱼类性别决定不仅受性别基因的影响,而且受环境的影响。最终可能分化形成与基因不一致的表型性别<sup>[1-4]</sup>。实验证明,性别形成阶段体内雌雄激素比例是决定鱼类表型的直接原因<sup>[5-6]</sup>。应用芳香化酶抑制剂处理可导致 *CYP19A* 基因表达下调,诱导石斑鱼 (*Epinephelus merra*) 提前向雄性转变<sup>[7]</sup>,也可以诱导部分雌雄异体种类仔稚鱼发生雄性性逆转<sup>[8-14]</sup>。但是在青鳉 (*Oryzias latipes*) 的研究中没有发现类似的结果<sup>[15-16]</sup>。由此可见,鱼类的性别形成机制是复杂的。鱼类单性培育是水产养殖业提高效益的重要途径,芳香化酶抑制剂 (aromatase inhibitors, AI) 诱导鱼类雄性化机制的研究,不仅是鱼类性别控制理论的基础,更有生产实际意义,需要更多实验数据加以论证。

暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 俗称淡水河豚,是长江中下游重要的水产资源,由于卵巢、肝和血液有剧毒而影响养殖和开发<sup>[17]</sup>。在人工养殖条件下雄性河豚低毒,有很好的开发前景。本研究以暗纹东方鲀初孵仔鱼为实验对象,研究芳香化酶抑制剂来曲唑 (letrozole, LE) 对仔稚鱼雄性化诱导以及 *CYP19A*、*DMRT1* (doublesex and mab-3-related transcription factor 1) 基因表达变化,以期探索单雄性暗纹东方鲀诱导的可行性提供基础数据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物和实验设计** 暗纹东方鲀初孵仔鱼由江苏省南通市江苏中润农业发展有限公司提供。所有实验用鱼均为人工授精的初孵仔鱼,驯养一周后进行实验。

实验共设置 5 个处理浓度组:0、25、125、625、3 125  $\mu\text{g/L}$  来曲唑(1-[双(4-氰基苯基)甲

基]-1,2,4-三氮唑),丙酮作为助溶剂,对照组为 10  $\mu\text{L/L}$  的丙酮。每个浓度处理组设 3 个平行,实验在水族箱(75 cm × 55 cm × 48 cm)中进行,加入试液约 80 L,随机放入实验鱼 200 尾左右。实验期间每天喂食 3 ~ 4 次,换 1/3 试液,持续增氧,水体温度控制在 (27 ± 1) °C。暴露期为 49 d,分别在 14 dah (孵化后天数)、28 dah、42 dah 和 56 dah 取样,每个平行组每次取样 20 尾。平均体长 0.5 cm 以下时,取整条仔鱼;平均体长 0.5 ~ 4.0 cm 时,整体剖腹切头去尾,留取肛门左右 2 ~ 3 mm 段;平均体长 4 cm 以上时,只取性腺。用于组织切片研究的样品经 Bouin 液固定后转至 70% 乙醇保存,分子研究的样品经液氮处理后 -70 °C 保存待用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 暗纹东方鲀性腺 *CYP19A*、*DMRT1* 引物设计** 根据 GenBank 中已有的红鳍东方鲀 (*T. rubripes*, AB330136.1)、金头鲷 (*Sparus aurata*, AAL27699)、青鳉 (AAP83449)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, AAB16814) *CYP19A* 基因,以及红鳍东方鲀 (NM\_001037949)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*, AAP84972)、罗非鱼 (XP\_003444528)、青鳉 (AAL02165) *DMRT1* 基因的核苷酸序列,运用 Primer Premier 5 针对同源性高的区段序列分别设计 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因简并引物。以暗纹东方鲀成鱼性腺的 cDNA 为模板,PCR 扩增。选择条带单一清晰的目的基因片段回收后,上海生工工程技术公司克隆测序,所得序列与 GenBank 核酸数据库中的已知序列进行 Blastx 同源性分析。根据确定的暗纹东方鲀 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因的 cDNA 序列,设计特异引物(表 1)用于基因表达研究。

表 1 暗纹东方鲀 *CYP19A* 和 *DMRT1* 引物及参数  
Table 1 Primer design and parameters

引物 Primer	引物序列(5' - 3') Primer sequence	产物长度(bp) Length of amplified fragment
<i>CYP19A</i>	F: CACCAAAGCTCTGACGG R: AACCGAACGGCTGAAAGT	836
<i>DMRT1</i>	F: CAGGATGCCCAAGTGCT R: CGCTAAAGATGGGTGGG	605
<i>β-actin</i>	F: AAGGAGAAGCTGTGCTACGT R: TCGTTGCCGATGGTGAT	122

F: 正向; R: 反向。F: Forward; R: Reverse.

**1.2.2 RT-PCR** 首先用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 提取样品的性腺总 RNA, 之后用 PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time 试剂盒 (TaKaRa) 把 RNA (200 ng) 反转录成 cDNA, 然后用 Premixtaq 试剂盒 (TaKaRa) 进行 RT-PCR。

**1.2.3 性腺组织学观察** 常规石蜡切片, 厚度 6 μm, H. E 染色, 光镜下观察性腺发育状况并统计性别比例。

**1.3 数据分析** 采用 SPSS 软件单因子方差分析 (ANOVA) 及 Tukey 法检验对照组和处理组间是否有显著性差异, 结果以平均值 ± 标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 LE 对 *CYP19A* 和 *DMRT1* 表达的影响

从仔鱼孵化后 7 d (dah) 开始 LE 处理实验, 统计对照组与实验组暗纹东方鲀 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因的特异性表达 (表 2)。对照组和

低浓度 (25 μg/L LE) 处理组中, 约 50% 样本单一表达 *CYP19A* 基因, 另外 50% 样本则单一表达 *DMRT1* 基因, 呈现明显的性二态。125 μg/L LE 组中, 单一表达 *CYP19A* 的样本下降至 20% 左右, 约 30% 样本既表达 *CYP19A*, 也表达 *DMRT1*。随着 LE 浓度升高, 单一表达 *CYP19A* 的样本数依次下降, 当浓度为 625 μg/L、3 125 μg/L 时, *CYP19A* 表达率下降至 0。在最高浓度 3 125 μg/L LE 组中, 随着时间的延长 (从 14 ~ 56 dah), 同时表达 *CYP19A* 和 *DMRT1* 的样本由 30% 下降至 0, 单一表达 *DMRT1* 的样本由 70% 上升至 100%。

**2.2 LE 对 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因相对表达量的影响** 以暗纹东方鲀 *β-actin* 为内参, 计算实验终点 (56 dah) 所有实验组暗纹东方鲀性腺 *CYP19A* 和 *DMRT1* 的相对表达量 (图 1)。对照组 (图 1A) 和 25 μg/L LE 组 (图 1B) 中, 这 2 种基因表达量出现明显的二态性 (♀: 高 *CYP19A*, 低 *DMRT1*; ♂: 低 *CYP19A*, 高 *DMRT1*)。随着 LE 浓度的上升, 125 μg/L 和 625 μg/L 组的部分样本出现 *CYP19A* 和 *DMRT1* 基因同时表达 (图 1C: 3 ~ 5 泳道; 图 1D: 1 ~ 4 泳道); 当 LE 浓度达 3 125 μg/L 时, 100% 的样本单一表达 *DMRT1* 基因 (图 1E)。图 1F 显示, LE 可导致暗纹东方鲀性腺 *CYP19A* 基因表达量下调, 而且存在剂量依赖的抑制关系。LE 浓度为 125 μg/L 和 625 μg/L 时, 样本中 *CYP19A* 基因表达量显著低于对照组雌性样本; LE 浓度为 3 125 μg/L 时, 所有样本 *CYP19A* 基因的表达量与对照组雄性样本相

表 2 暴露于 LE 中暗纹东方鲀性腺 *CYP19A*、*DMRT1* 表达率 ( $n = 10$ )

Table 2 Expression of *CYP19A* and *DMRT1* in gonad of *Takifugu obscurus* exposed to LE

LE 浓度 Concentrations of LE (μg/L)	表达率 Expression rate (%)											
	14 dah			28 dah			42 dah			56 dah		
	C	D	C + D	C	D	C + D	C	D	C + D	C	D	C + D
对照组 Control	40	60	0	40	60	0	50	50	0	50	50	0
25	50	50	0	50	50	0	40	60	0	40	60	0
125	20	40	40	20	40	40	20	50	30	20	50	30
625	0	60	40	0	60	40	0	70	30	0	60	40
3 125	0	70	30	0	80	20	0	80	20	0	100	0

dah: 孵化后的天数。dah: Days after hatching. C: *CYP19A*; D: *DMRT1*; C + D: *CYP19A* + *DMRT1*.

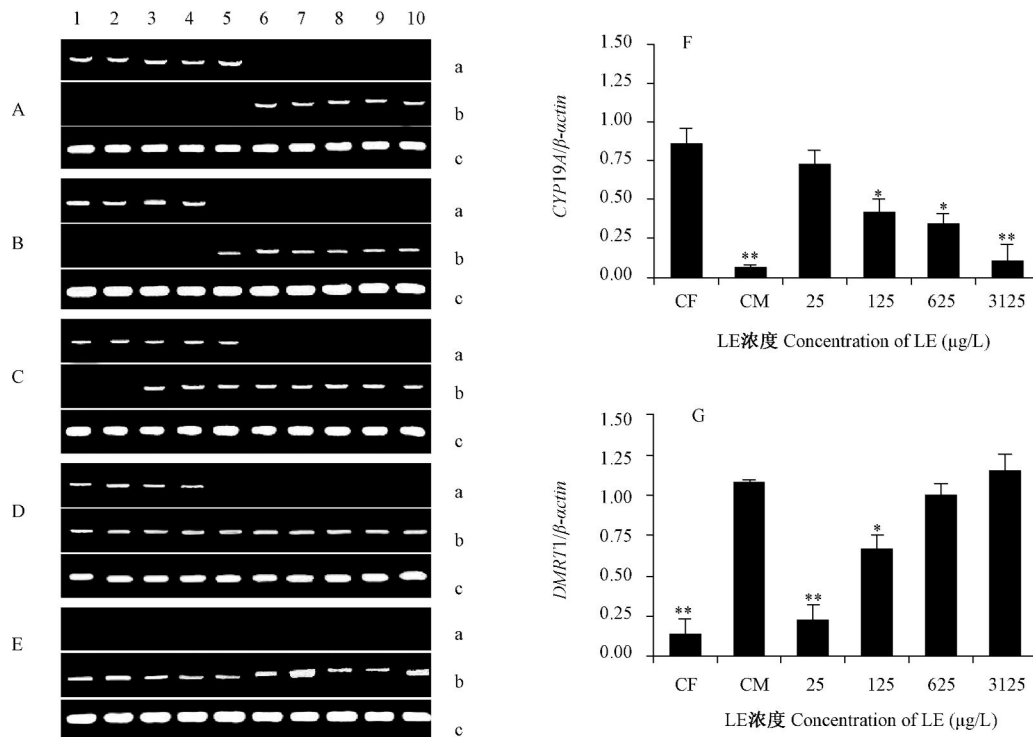


图1 LE处理对暗纹东方鲀性腺 *CYP19A*、*DMRT1* 表达的影响 ( $n = 10$ )

Fig. 1 Expression level of *CYP19A* and *DMRT1* in gonad of *Takifugu obscurus* exposed to LE

A、B、C、D、E: 对照组、25、125、625、3125  $\mu$ g/L LE 实验组; F、G: *CYP19A*/ $\beta$ -actin、*DMRT1*/ $\beta$ -actin 的相对表达量。

CF、CM: 对照组雌性, 对照组雄性; a、b、c: *CYP19A*、*DMRT1*、 $\beta$ -actin 基因;

\* 表示与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

A, B, C, D and E are control, 25, 125, 625, 3125  $\mu$ g/L LE; F, G: Relative expression level of *CYP19A*/ $\beta$ -actin, *DMRT1*/ $\beta$ -actin; CF, CM: control female, control male; a, b, c. Represent the *CYP19A*, *DMRT1*,  $\beta$ -actin gene;

\* Means significant difference compared to the control group ( $P < 0.05$ );

\*\* Means extremely significant difference compared to the control group ( $P < 0.01$ ).

近。*DMRT1* 基因表达与 *CYP19A* 相反 (图 1G), 随着 LE 浓度的上升, 样本中 *DMRT1* 表达量明显上升; 当 LE 浓度为 625  $\mu$ g/L 以上时, 所有样本的 *DMRT1* 表达量与对照组雄性样本无显著性差异。

**2.3 LE 对暗纹东方鲀性别比例的影响** 在 42 dah 时暗纹东方鲀性腺的组织分化已完成。实验组样本中除正常的精巢 (图 2A) 和卵巢 (图 2B) 外<sup>[18]</sup>, 还有间性体存在 (图 2C)。间性体特征是性腺组织中原始卵巢腔被填充 (异常腔隙), 卵原细胞退化, 精原细胞出现, 即发生由雌性向雄性的性逆转现象。

根据组织学研究统计 (表 3): 对照组和 25  $\mu$ g/L LE 浓度组样本中精巢和卵巢各占 50% 左右。随着 LE 浓度升高, 雌鱼百分比均有下降。在 125  $\mu$ g/L LE 浓度组中, 雌鱼的百分比下降至 30%, 约 20% 样本成为间性体; 在 625  $\mu$ g/L LE 浓度组样本中未见典型的卵巢组织, 即雌鱼百分比降至 0, 37% 为间性体, 其余为样本的性腺精巢, 即雄性; 在 3125  $\mu$ g/L LE 高浓度组中, 样本的 20% 为间性体, 80% 为精巢 (雄性)。至 56 dah 时, 3125  $\mu$ g/L LE 高浓度组样本 100% 显示为雄性, 但其他各浓度组中性别没有很大变化。

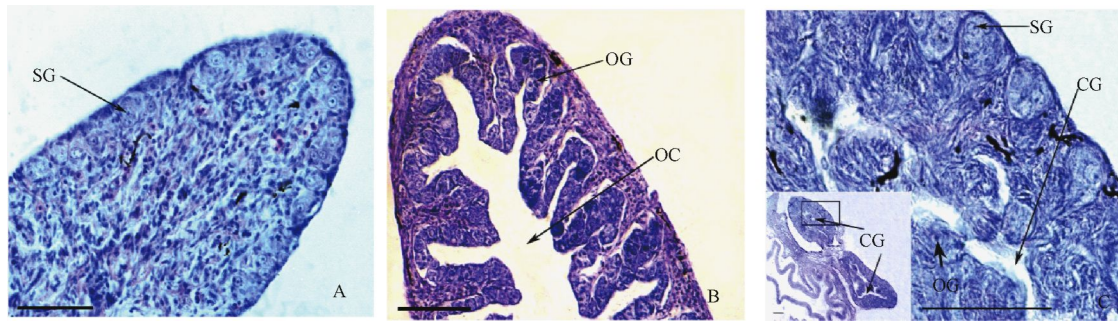


图 2 LE 处理对暗纹东方鲀性腺结构的影响

Fig. 2 The effects of LE on the gonad of *Takifugu obscurus*

A. 正常雄性性腺; 精原细胞 (SG); B. 正常雌性性腺; 卵原细胞 (OG), 原始卵巢腔 (OC);

C. 间性体性腺; 异常腔隙 (CG); 标尺 = 500 μm。

A. Normal male gonad; Spermatogonium (SG); B. Normal female gonad; Oogonium (OG), Ovarian cavity (OC);

C. Intersex gonad; Abnormal cavity gap (CG); Bar = 500 μm.

表 3 LE 处理的暗纹东方鲀性别比例

Table 3 Sex ratio of *Takifugu obscurus* exposed to LE

鱼生长阶段 Stage of fish	LE 浓度 (μg/L) Concentrations of LE	样本数量 (尾) Number of samples studied (ind)	性别比例 Sex composition (%)		
			♀	♂	间性体 Intermediate
42 dah	0	20	50	50	0
	25	20	40	60	0
	125	20	30	50	20
	625	24	0	63	37
	3 125	20	0	80	20
56 dah	0	24	42	58	0
	25	20	40	60	0
	125	20	20	50	30
	625	24	0	67	33
	3 125	24	0	100	0

### 3 讨论

鱼类的性别决定机制复杂多样, 有环境性别决定型和基因性别决定型等多种类型。无论是哪种性别决定机制, 在鱼类性别分化或转变过程中, 性激素都起着关键的诱导作用。雌激素是雌性诱导者, 促使卵巢分化; 雄激素是雄性诱导者, 促使精巢的分化<sup>[19]</sup>。大量雌激素诱导雌性化实验证明雌激素在卵巢分化中具有诱导作用<sup>[20]</sup>。动物体内的内源雌激素是由内源雄激素转化而来, P450 芳香化酶 (P450arom) 是催化该反应的关键酶, 可使雄烯二酮或睾酮氧化脱去 19-甲基, 转变成雌酮或雌二醇, 控制着体内雌雄性激素的平衡<sup>[21-22]</sup>。实验研究证明, 暴

露于 AI 可诱导大鳞大马哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)<sup>[10]</sup>、虹鳟 (*O. mykiss*)<sup>[11]</sup>、罗非鱼<sup>[11-12]</sup>、斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[13-14]</sup> 等多种鱼类仔鱼发生雄性化逆转。LE 是新一代的 AI, 暗纹东方鲀处理于 125 μg/L LE 中, 约 70% ~ 80% 的基因型雌性仔稚鱼逆转为表型雄性, 625 μg/L LE 中则发生 100% 的雄性化逆转。因此, 芳香化酶抑制剂来曲唑在雌雄异体鱼类的性逆转过程中起重要作用。

与哺乳动物不同, 鱼类中存在 2 种不同基因编码的 P450 芳香化酶, 分别存在于性腺和中枢神经系统。中性腺 P450 芳香化酶<sup>[23]</sup> 由 *CYP19A* (*Cyp1a*) 基因编码。不同实验中, AI 对 *CYP19A* 基因表达的影响不一样。Sun 等<sup>[24]</sup>

报道,100  $\mu\text{g/L}$  以上浓度 LE 处理 72 h 可导致青鲈卵巢 *CYP19A* 基因表达上调,且显著高于对照,出现明显的补偿性调节。本实验结果则与此相反,处理于 LE 中,暗纹东方鲀仔稚鱼 *CYP19A* 表达明显受到抑制,并有浓度依赖关系。在 AI 对罗非鱼<sup>[12]</sup>、斑马鱼<sup>[13-14]</sup>、红鳍东方鲀<sup>[25]</sup> 等种类仔稚鱼雄性化诱导实验中,*CYP19A* 基因表达也受到抑制,与本实验结果一致。可以推断鱼类处于不同发育阶段的生理特点以及处理时间会影响实验结果。Sun 等<sup>[24]</sup> 的实验是鱼类处于卵巢发育阶段,卵母细胞发育以及肝合成卵黄蛋白原等生理活动需要高水平的雌激素维持。P450 芳香化酶活性受到 AI 抑制时,体内雌激素量突然下降,短时间内 *CYP19A* 表达水平的提高可能是补偿反应。本实验以及其他种类的 AI 处理诱导雄性逆转实验都是在生命的早期阶段,实验鱼正处在性别形成时期。雌性性腺的形成和维持需要高水平的雌激素,P450 芳香化酶受到抑制后,体内雌激素合成通路受阻,雄激素水平则上升,性腺转向雄性方向发育。因此,*CYP19A* 表达下调是雌性退化的反馈性调节结果,是雌性性腺退化的分子标记之一。

*DMRT1* 是目前发现从果蝇到人都具有的与性别相关基因。在罗非鱼<sup>[26]</sup>、青鲈<sup>[27]</sup>、斑马鱼<sup>[28]</sup>、黑鲷<sup>[29]</sup>、石斑鱼<sup>[30-31]</sup> 和红鳍东方鲀<sup>[32]</sup> 等多种鱼类中均发现 *DMRT1* 仅在性腺中表达,且在精巢中的表达量高于卵巢。本实验结果显示,暗纹东方鲀仔稚鱼 *DMRT1* 基因表达呈现两性差异,表明该基因可能与精巢发育相关。在小鼠 (*Mus musculus*) 中敲除 *DMRT1* 基因的研究发现,缺乏 *DMRT1* 的雄性小鼠出生后精巢退化,睾丸中的雄性细胞转变成雌性细胞,最终睾丸会变成卵巢<sup>[33]</sup>。说明 *DMRT1* 不仅与精巢形成有关,而且是雄性性别维持的关键基因。本实验中,暗纹东方鲀仔稚鱼的 *DMRT1*,无论表达个体数还是表达水平都与 LE 浓度成正比,与组织学研究结果一致。因此,*DMRT1* 被认为是精巢的标志性基因,在雄性性逆转中可认为是精巢形成的分子标记。

大多数雌雄异体鱼类具有性别逆转敏感期,即性别分化发生的可塑性仅发生在孵化后的一段时间内<sup>[34]</sup>。本实验结果支持这一观点,在仔稚鱼早期阶段,处理于 125 ~ 625  $\mu\text{g/L}$  LE 中,基因型雌性样本的 *CYP19A* 基因表达下调与 *DMRT1* 表达上调同时进行,在同一样本的 RT-PCR 电泳图上可明显观察到这 2 个基因同时表达的条带,同时在组织切片中可以看到性腺由卵巢向精巢转变过程。这种转变在极高浓度组 3 125  $\mu\text{g/L}$  LE 的 56 dah 样品中已经消失,取而代之的是 *DMRT1* 单一表达和精巢发育。因此,在性逆转敏感期内 *CYP19A* 和 *DMRT1* 同时表达是抗雌激素化合物诱导雄性化性逆转过程的分子标志。在雌激素化合物诱导的雌性化逆转过程中是否会有同样的分子标志有待进一步研究。

本实验表明,芳香化酶抑制剂来曲唑可使暗纹东方鲀仔稚鱼性别分化过程中 *CYP19A* 基因表达下调,*DMRT1* 基因表达上调,发生雄性化逆转。逆转百分率与来曲唑浓度有关。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 桂建芳,周莉,吴清江,等. 鱼类性别和生殖的遗传基础及其人工控制. 北京: 科学出版社, 2007: 1 - 247.
- [ 2 ] Piferrer F, Blázquez M, Navarro L, et al. Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 142(1/2): 102 - 110.
- [ 3 ] Lee K H, Yamaguchi A, Rashid H, et al. Germ cell degeneration in high-temperature treated pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Sexual Development*, 2009, 3 (4): 225 - 232.
- [ 4 ] Jin Y X, Shu L J, Huang F Y, et al. Environmental cues influence EDC-mediated endocrine disruption effects in different developmental stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 254 - 260.
- [ 5 ] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 2002, 208(3/4): 191 - 364.
- [ 6 ] Blázquez M, González A, Papadaki M, et al. Sex-related

- changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 158(1): 95 – 101.
- [ 7 ] 李广丽, 刘晓春, 林浩然. 17 $\alpha$ -甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响. *水产学报*, 2006, 30(2): 145 – 151.
- [ 8 ] Wang J J, Liu X L, Wang H P, et al. Expression of two cytochrome P450 aromatase genes is regulated disrupting chemicals in rare minnow *Gobiocypris rarus* juvenile. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2010, 152(3): 313 – 320.
- [ 9 ] Sellin-Jeffries M K, Conoan N H, Cox M B, et al. The anti-estrogenic activity of sediments from agriculturally intense watersheds: assessment using *in vivo* and *in vitro* assays. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(1/2): 189 – 198.
- [ 10 ] Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, et al. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *Journal of Experimental Zoology*, 1994, 270(3): 255 – 262.
- [ 11 ] Guiguen Y, Baroiller J F, Ricordel M J, et al. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development*, 1999, 54(2): 154 – 162.
- [ 12 ] Kwon J Y, McAndrew B J, Penman D J. Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. *Journal of Fish Biology*, 2002, 60(3): 625 – 636.
- [ 13 ] McAllister B G, Kime D E. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 2003, 65(3): 309 – 316.
- [ 14 ] Uchida D, Yamashita M, Kitano T, et al. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2004, 137(1): 11 – 20.
- [ 15 ] Kawahara T, Yamashita I. Estrogen-independent ovary formation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. *Zoological Science*, 2000, 17(1): 65 – 68.
- [ 16 ] Suzuki A, Tanaka M, Shibata N. Expression of aromatase mRNA and effects of aromatase inhibitor during ovarian development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 2004, 301(3): 266 – 273.
- [ 17 ] 成庆泰. 我国的河鲀和它的毒素. *生物学通报*, 1954, (8): 17 – 19.
- [ 18 ] 李延伸, 戴奇, 郭正龙, 等. 暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*) 性别分化的组织学及芳香化酶基因表达研究. *复旦学报: 自然科学版*, 2011, 50(5): 645 – 653.
- [ 19 ] Yamamoto T O. Sex differentiation// Hoar W S, Randall D J. *Fish Physiology*. vol. 3. London: Academic Press, 1969: 117 – 175.
- [ 20 ] Piferrer F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 2001, 197(1/4): 229 – 281.
- [ 21 ] Schulz R W, de França L R, Lareyre J J, et al. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 390 – 411.
- [ 22 ] Ankley G T, Bencic D C, Breen M S, et al. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquatic Toxicology*, 2009, 92(3): 168 – 178.
- [ 23 ] Huang W, Zhou L, Li Z, et al. Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (*Cyp19a1a*) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 307(1/2): 224 – 236.
- [ 24 ] Sun L W, Shao X L, Chi J, et al. Transcriptional responses in the brain, liver and gonad of Japanese rice fish (*Oryzias latipes*) exposed to two anti-estrogens. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2011, 153(4): 392 – 401.
- [ 25 ] Rashid H, Kitano H, Lee K H, et al. Fugu (*Takifugu rubripes*) sexual differentiation: CYP19 regulation and aromatase inhibitor induced testicular development. *Sexual Development*, 2007, 1(5): 311 – 322.
- [ 26 ] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G J, et al. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Development Dynamics*, 2008, 237(1): 297 – 306.
- [ 27 ] Kobayashi T, Matsuda M, Kajiura-Kobayashi H, et al. Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Development Dynamics*, 2004, 231(3): 518 – 526.

- [28] Guo Y Q, Cheng H H, Huang X, et al. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3): 950–957.
- [29] He C L, Du J L, Wu G C, et al. Differential *Dmrt1* transcripts in gonads of the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Cytogenetic and Genome Research*, 2003, 101(3/4): 309–313.
- [30] Xia W, Zhou L, Yao B, et al. Differential and spermatogenic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, 263(1/2): 156–172.
- [31] Zhou L, Gui J F. Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(2): 181–193.
- [32] Yamaguchi A, Lee K H, Fujimoto H, et al. Expression of the *DMRT* gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2006, 1(1): 59–68.
- [33] Matson C K, Murphy M W, Sarver A L, et al. *DMRT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature*, 2011, 476(7358): 101–104.
- [34] Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(3): 352–366.

## 《动物学杂志》投稿注意事项

### 1 稿件的投寄

请登录本刊网站(dwzz. ioz. ac. cn)注册投稿,或通过本刊的电子信箱投寄(E-mail: journal@ ioz. ac. cn; Word文件作附件),同时邮寄打印稿一份。打印稿小四号字 1.5 倍行距单面打印。作者在投稿的同时务必出具公函或作出承诺,稿件不能一稿多投和侵权。

### 2 论文的格式要求

**题目** 应言简意赅。中文题目字数一般不超过 20 个字;英文题目不超过 10 个实词,实词首字母大写。

**作者** 署名人应是对论文的全部或部分内容做出主要贡献,并能对文章内容负责的人。

**单位** 应写作者单位的标准全称及所在地和邮编。

**摘要** 中文摘要放在文首。内容包括:研究目的、方法、结果(主要数据)和结论。用第三人称叙述。英文摘要放在中文摘要下面,其内容应与中文摘要相对应或略详于中文摘要。

**关键词** 一般为 3~5 个,中英文对应,分别列在中英文摘要下面。

**前言** 结合文摘阐述国内外相关研究领域的发展状况及本研究的目的和意义。

**正文** 材料与方法对材料的来源及方法的出处应详细陈述;结果的数据要完整,微观形态的稿件应有实验照片作为依据;文字叙述要简洁明了,与图表内容相互呼应;讨论应依据前言的内容、结果的数据、现象展开讨论,以达到解决问题或得出结论的目的。

**全文书写规格** 文中请使用国家颁布的法定计量单位和符号及规范化的名词、术语。文中首次出现的英文缩写词,应先写出中文名称后,再在括号内写出英文全称和缩写词。物种名称在文中第一次出现时应附拉丁学名(种属名用斜体,属名首字母大写)。名词术语的用法文中应前后一致。

①小标题:应简短准确、层次清楚。各级标题一律采用阿拉伯数字连续编码,左顶格编排,如“1”(一级标)、“1.1”(二级标)、“1.1.1”(三级标)。

②图表:力求精选,反应同一数据的图与表不能重复。其序号一律采用阿拉伯数字编码,在文中引用处注明。线条图应用计算机绘制;照片图要求反差适中、层次清晰。显微及电镜照片,应注明长度标尺和放大倍数。

**参考文献** 应列出与本文直接有关的中外文主要文献。本刊文献的著录格式采用顺序编码制,即以文献在文中出现的先后顺序连续编码,加方括号标注在文中引用处,文后文献表的文献要与文中一致,并按文中出现的顺序排列,多名作者在列出前三名作者后加“等”。具体格式要求为:

(下转第 40 页)