

性类固醇激素雌二醇、睾酮对半滑舌鲷雌、雄、伪雄鱼生长性能的影响

王佳林^{1,2}, 杨英明^{1,3}, 杨倩^{1,2}, 王娜^{1,3}, 陈松林^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所/青岛海洋科学与技术国家实验室/海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东青岛 266071)

摘要: 多种鱼类包括半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 都存在性别大小异形现象, 这种生长二态性可能与性类固醇激素和生长轴相关基因的相互作用有关。笔者课题组前期已通过转录组学分析发现性类固醇激素可能参与半滑舌鲷性别大小异形调控过程。为探究性类固醇激素对半滑舌鲷不同性别生长差异的影响, 该研究对 16 月龄雌、雄、伪雄鱼进行了雌二醇、睾酮激素注射处理, 并对其生长数据进行统计, 且对半滑舌鲷生长激素 1 (Growth hormone 1, *gh1*)、胰岛素样生长因子 1 (Insulin-like growth factor 1, *igf1*) 和细胞因子信号转导抑制因子 (Suppressor of cytokine signaling 3, *socs3*) 3 个基因进行了定量分析。结果表明, 两种性类固醇激素对半滑舌鲷不同性别个体的生长均具有抑制作用。激素处理后, *gh1*、*igf1* 在脑、肝脏中的表达量总体呈下降趋势, *socs3* 在肌肉和肝脏中的表达量显著上升。该研究探讨了性类固醇激素对半滑舌鲷不同性别生长性能的影响, 为深入研究性类固醇激素调控鱼类性别大小异形现象提供了参考。

关键词: 半滑舌鲷; 性类固醇激素; 性别大小异形; *gh1*; *igf1*; *socs3*

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Effects of sex steroid hormones (estradiol and testosterone) on growth traits of female, male and pseudo-male Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WANG Jialin^{1,2}, YANG Yingming^{1,3}, YANG Qian^{1,2}, WANG Na^{1,3}, CHEN Songlin^{1,3}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology/Marine Fisheries Science and Food Production Process Function Laboratory, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao 266071, China)

Abstract: A variety of fish, including Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), have sexual size dimorphism, and this growth dimorphism may be related to the interaction of sex steroid hormones and growth axis-related genes. For the early stage of this study, transcriptomics analysis has found that sex steroid hormones might be involved in the growth regulation of Chinese tongue sole. In order to explore the effect of sex steroid hormones on the growth difference of different sexes of Chinese tongue sole, we injected 16-month-old female, male and pseudo-male fish with estradiol and testosterone hormones, and measured the growth hormone 1 (*gh1*),

收稿日期: 2021-01-15; 修回日期: 2021-03-29

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31873037); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2020TD20)

作者简介: 王佳林 (1996—), 男, 博士研究生, 研究方向为水产生物技术。E-mail: 529947529@qq.com

通信作者: 王娜 (1980—), 女, 博士, 研究员, 从事海水鱼类细胞培养及功能基因组学研究。E-mail: wangna@ysfri.ac.cn

insulin-like growth factor 1 (*igf1*) and suppressor of cytokine signaling 3 (*socs3*) for quantitative analysis. The results reveal that the two sex steroid hormones had inhibitory effects on the growth performance of individuals of different sexes of Chinese tongue sole. After the treatment, the expressions of *gh1* and *igf1* in the brain and liver showed an overall downward trend, and the expression of *socs3* in the muscle and liver increased significantly, indicating that the growth performance of fish had declined. By exploring the effects of sex steroid hormones on the growth performance of different sexes of Chinese tongue sole, we provide references for the in-depth study of sex steroid hormones in the regulation of fish sex size abnormalities.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; Sex steroid hormones; Sexual size dimorphism; *gh1*; *igf1*; *socs3*

自然界中许多鱼类存在性别大小异形现象,即雌雄个体的生长速度不同导致的个体大小差异,并且这种现象在鱼类性腺开始发育直至成熟这一阶段尤为明显。例如尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 等鱼类的雄性个体比雌性个体大,而鲤 (*Cyprinus carpio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 等鱼类的雌性个体则表现出生长速度快、个体大的特点^[1]。

半滑舌鲷属于鲽形目、舌鲷科、舌鲷属,俗称鲷米、鲷目,是一种近海温水大型底栖鱼类,主要分布于我国渤海、黄海沿岸^[2]。半滑舌鲷由于味道鲜美、肉质细嫩、营养丰富,深受消费者欢迎,市场价值极高,已成为我国海水鲆鲽鱼类三大养殖品种之一,其养殖前景非常广阔^[3]。近年来的养殖实践和研究发现,半滑舌鲷雌雄个体在生长速率上存在很大差别,21月龄时,半滑舌鲷雌性个体平均体质量约为600g,而雄性个体平均体质量仅为190g,只达到雌性体质量的1/3^[4]。值得一提的是,半滑舌鲷在早期生长过程中存在性逆转情况,即在自然养殖条件下有些遗传雌性半滑舌鲷在高温等环境刺激下会逆转为生理雄性,即伪雄鱼^[5]。伪雄鱼和雄鱼类似,表现出生长缓慢的特点,这一问题严重制约了半滑舌鲷养殖产业的可持续发展。因此,亟需开展半滑舌鲷不同性别间生长差异的分子机制研究。

哺乳动物与模式生物中的研究表明,生长的性别二态性与动物体内的性类固醇激素、生长轴系统 (Growth hormone/insulin-like growth factor 1, GH/IGF1) 的相互作用有关^[6]。生长激素 (Growth hormone, GH) 是由垂体分泌的重要激素,已证实动物机体生长、骨骼发育及调控代谢方面发挥关键作用^[7],半滑舌鲷中也发现该基因在雌雄个体间存在显著的表达二态性^[8]。胰岛素样生长因子 (In-

ulin-like growth factor 1, IGF1) 是受 GH 刺激后在肝脏产生的重要因子,可以促进骨骼和肌肉的生长^[9]。细胞因子信号传导抑制因子3 (Suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3) 参与多种细胞因子和生长因子的负调控过程,并且内源性和外源性雌激素可以增加大鼠体内 *Socs3* 基因的表达^[10-12]。此外, Gabrielsson 等^[13] 发现使用雌二醇 (17 β -estradiol, E2) 处理大鼠 (*Rattus norvegicus*), 可使大鼠肝脏生长激素受体 (Growth hormone receptor, GHR) mRNA 表达水平提高。Domené 等^[14] 则发现雌二醇处理后家兔 (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) 肝脏 GHR 表达水平降低。此外,在不同的物种中,性类固醇激素会诱导促生长激素释放激素 (Growth hormone releasing hormone, GHRH) 和生长抑素释放抑制因子 (Somatotropin release inhibiting factor, SRIF) 释放模式不同,进而导致了性别特异性生长激素分泌模式的产生^[15-16]。

性类固醇激素对鱼类的生长性能也具有显著影响^[17]。例如, E2 显著抑制黄颡鱼的生长,睾酮 (17 α -Methyltestosterone, T) 显著促进雌鱼生长,但抑制雄鱼生长^[18]。在尼罗罗非鱼中, E2 明显促进雌鱼的生长,但对雄鱼的生长无显著影响,而 T 则对雌、雄鱼的生长均有显著性影响^[19]。通过注射 T 刺激麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*) 可以使幼鱼的生长速度显著减慢,且对雄鱼的抑制作用要强于雌鱼,此外,研究人员还发现, T 可以在一定程度上抑制麦穗鱼免疫系统的功能^[20]。

笔者前期已开展了半滑舌鲷生长-生殖轴重要组织 (脑、垂体、性腺、肝脏) 的转录组学研究,发现类固醇生物合成通路中的 24-脱氢胆固醇还原酶 (Delta24-sterol reductase, *dchr24*)、7-脱氢胆固醇还原酶 (Delta7-sterol reductase, *dchr7*) 等基因在半滑舌鲷雌性肝脏中呈显著上调趋势^[21],暗示胆固醇依赖的性类固醇激素也可能参与半滑舌鲷性别大小异形现象的调控过程。为探究性类固醇激素对半滑舌鲷生长性能的影响,笔者同时对半滑舌鲷雌

鱼、雄鱼、伪雄鱼进行了 E2、T 激素注射处理实验, 并对其体长、体宽、体质量等生长数据进行测量, 在注射 1 个月后取生长-生殖轴组织进行荧光定量 PCR (Real-time PCR, RT-PCR) 分析, 比较了两种性类固醇激素对雌、雄、伪雄鱼半滑舌鲷生长性能的影响, 并选取了半滑舌鲷 3 个生长相关基因 *gh1*、*igf1*、*socs3* 进行定量分析, 以探究类固醇激素处理半滑舌鲷后对其生长相关基因表达量的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼均采购于山东日照半滑舌鲷良种养殖场, 选取 16 月龄, 体质健康、无机体损伤的普通半滑舌鲷成鱼。整个实验过程中均使用自然海水养殖, 盐度约为 30, 溶氧 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上, pH 曝气后约为 8.15, 水温约为 $12.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 每日投喂饲料 3 次。

1.2 实验方法

1.2.1 半滑舌鲷生理雄鱼的遗传性别鉴定 剪取 288 条生理雄鱼的鳍条, 加入 $200 \mu\text{L}$ $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 煮沸 10 min 后, 加入 $20 \mu\text{L}$ pH 8.0 的 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCL, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 获得 288 条生理雄鱼的模板 DNA。取 $2 \mu\text{L}$ 上清用于后续 PCR 检测。引物采用刘洋等^[22]开发的半滑舌鲷性别特异标记引物 (*cs-sex-F*: CCTAAATGATGGATGTAGATTCTGTC, *cs-sex-R*: GATCCAGAGAAAATAAACC CAGG)。PCR 反应体系为 $10 \times \text{Buffer}$ $5.0 \mu\text{L}$, dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $4.0 \mu\text{L}$, 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $4.0 \mu\text{L}$, *rTaq* DNA 聚合酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$, 模板 DNA ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $5.0 \mu\text{L}$, ddH₂O $33.5 \mu\text{L}$, 混匀后离心。PCR 扩增程序为 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 34 个循环。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳 (180 V, 15 min) 鉴定遗传性别, 伪雄鱼可扩增出 169 bp 和 134 bp 2 条目的条带, 雄鱼只能扩增出 1 条 169 bp 的目的条带^[22]。

1.2.2 激素注射处理 分别取半滑舌鲷雌鱼、雄鱼以及伪雄鱼各 90 尾开展激素处理实验。共设置 9 组, 包括雌二醇处理雌鱼组 (FE)、雌二醇处理雄鱼组 (ME)、雌二醇处理伪雄鱼组 (PME)、睾酮处理雌鱼组 (FT)、睾酮处理雄鱼组 (MT)、睾酮处理伪雄鱼组 (PMT)、对照雌鱼组 (FC)、对照雄鱼组 (MC)、对照伪雄鱼组 (PMT)。每组鱼的数量均为 30 尾。将 E2、T (Solarbio 公司) 溶解于无水乙醇后, 再以体积比 1 : 10 与玉米油混合, 参考罗非

鱼、虹鳟等雌雄激素注射相关文献^[19,23], 按照 *m* (激素) : *m* (体质量) 为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 注射到鱼体腹腔中。每 7 天注射 1 次, 连续注射 3 周, 每次注射前测量体质量、体长等生长数据。对照组仅注射体积比为 1 : 10 混合的无水乙醇 : 玉米油。

1.2.3 生长性能分析 根据测量的生长数据计算本次实验不同组别半滑舌鲷的体质量绝对生长率 (Absolute growth rate W, AGR_W , %) 和体长绝对生长率 (Absolute growth rate L, AGR_L , %)。计算公式为:

$$\text{AGR}_W = (W_2 - W_1) / W_1 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{AGR}_L = (L_2 - L_1) / L_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中 W_1 为初始体质量, W_2 为实验后体质量; L_1 为初始体长, L_2 为实验后体长。

1.2.4 生长相关基因表达量分析 本次实验利用 RT-PCR 的方法检测 *gh1*、*igf1*、*socs3* 在正常条件下半滑舌鲷生长相关组织中的表达水平和 E2、T 处理之后生长相关组织中表达模式的变化。以 β -*actin* 基因作为内参, 每个样品设置 3 个生物学重复, 具体 RT-PCR 引物参照表 1。其反应体系则参照 TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒说明书, 利用 ABI 7500 Fast Real-time (Applied Biosystems, 美国) 程序进行定量分析。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *gh1*、*igf1*、*socs3* 基因的相对表达量, 所得数据均采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 遗传性别鉴定结果

对 288 条半滑舌鲷生理雄鱼进行遗传性别鉴定, 结果检测出 104 条伪雄鱼和 184 条遗传雄鱼, 部分鉴定结果见图 1。

表1 荧光定量PCR分析所用引物
Table 1 Primers for real-time PCR

NCBI 检索号 NCBI No.	引物 Primer	序列 (5'-3') Primer sequence
103393304	<i>β-actin-F</i>	GCTGTGCTGTCCCTGTA
	<i>β-actin-R</i>	GAGTAGCCACGCTCTGTC
103387754	<i>gh1-F</i>	CCGAAGTGAAGTGAAGAAA
	<i>gh1-R</i>	CTGAGCAAGCAGGTGAAG
103382578	<i>igf1-F</i>	TCGCATCTCATCTCTTTCTT
	<i>igf1-R</i>	ATACAGCACATCGCACTCTTG
103381769	<i>socs3-F</i>	GTCCGACCAGATTTAGCC
	<i>socs3-R</i>	TACCTTTGCCACTCACATAA

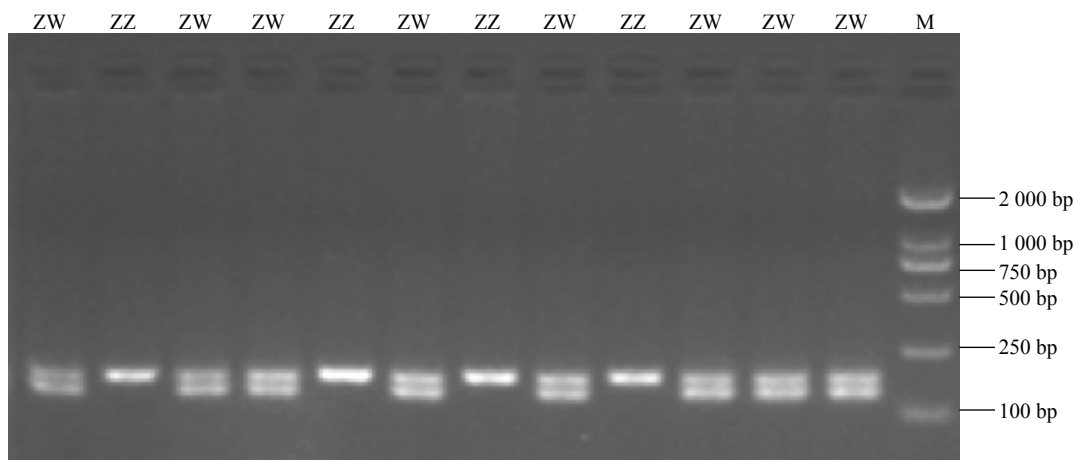


图 1 半滑舌鲷伪雄鱼鉴定电泳结果 (部分)

ZW. 伪雄鱼; ZZ. 雄鱼; M. DL2000 DNA Marker

Figure 1 Electrophoresis results of pseudo-male identification of *C. semilaevis* (partial)

ZW. Pseudo males; ZZ. Males; M. DL2000 DNA Marker

2.2 类固醇激素注射后生长性能分析

本实验结果显示, 相比于对照组, E2 和 T 对雌、雄鱼和伪雄鱼的体质量增长均具有显著抑制作用 ($P < 0.05$); 从体长绝对生长率来看, E2 对雌鱼和伪雄鱼的体长增长有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 对雄鱼无显著抑制作用 ($P > 0.05$), 而 T 仅对伪雄鱼的体长增长有显著抑制作用 ($P < 0.05$)。体质量绝对生长率与体长绝对生长率分别见图 2、图 3, 具体生长数据见表 2。

2.3 激素处理后对生长相关基因表达量影响

2.3.1 脑组织中 *gh1* mRNA 表达量变化 经过 T 注射处理之后, 与对照组相比, *gh1* mRNA 在

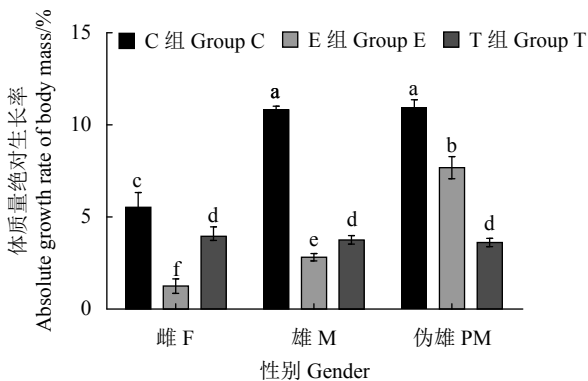


图 2 性类固醇激素处理后体质量绝对生长率对比

C. 对照组; E. 雌二醇处理组; T. 睾酮处理组; 标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Figure 2 Comparison of absolute growth rate of body mass after treatment with sex steroid hormones

C. Control group; E. Estradiol treated group; T. Testosterone treated group; different letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

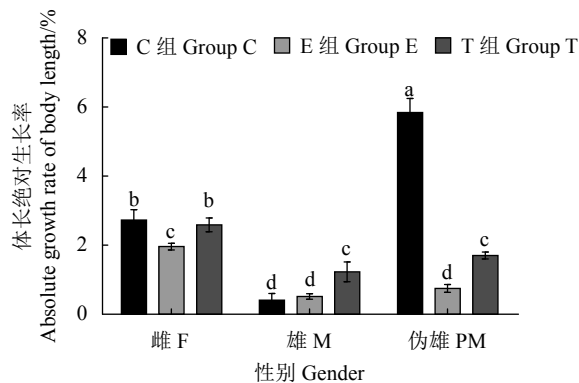


图 3 性类固醇激素处理后体长绝对生长率对比

Figure 3 Comparison of absolute growth rate of body length after treatment with sex steroid hormones

雌、雄、伪雄鱼脑中的表达量均显著降低 ($P < 0.05$), 且三者的表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。经过 E2 注射处理之后, *gh1* mRNA 在雌、雄鱼脑中的表达量显著降低 ($P < 0.05$), 且雌、雄鱼之间表达量无显著性差异 ($P > 0.05$), 但在伪雄鱼脑中表达量显著升高 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.3.2 肝脏中 *igf1* mRNA 表达量变化 经过 T 注射处理之后, 与对照组相比, *igf1* mRNA 在雌鱼肝脏中的表达量显著降低 ($P < 0.05$), 在伪雄鱼肝脏中表达量显著升高 ($P < 0.05$), 在雄鱼肝脏中的表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。E2 注射处理之后, *igf1* mRNA 在雌、雄、伪雄鱼肝脏中的表达量均显著降低 ($P < 0.05$), 且三者表达量无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 5)。

2.3.3 肝脏中 *socs3* mRNA 表达量变化 经过 T 注射处理之后, 雌、雄、伪雄鱼肝脏中 *socs3* mRNA

表2 对照组、E处理组和T处理组生长参数比较

Table 2 Comparison of growth parameters between control group, E treatment group and T treatment group $\bar{X}\pm SD; n=30$

组别 Group	性别 Gender	初始体质量 Initial body mass/g	实验后体质量 Body mass after treatment/g	初始体长 Initial body length/cm	实验后体长 Body length after treatment/cm	体质量绝对 生长率 Absolute growth rate W/%	体长绝对 生长率 Absolute growth rate L/%
对照组 Control group	雌 F	734.38±83.84 ^a	775.00±77.47 ^a	48.67±2.56 ^a	51.63±2.50 ^a	5.53±0.08 ^c	2.73±0.03 ^b
	雄 M	134.39±19.99 ^b	148.93±20.37 ^b	30.26±1.67 ^b	30.38±1.35 ^b	10.82±0.02 ^a	0.41±0.19 ^d
	伪雄 PM	148.90±22.28 ^b	165.24±21.48 ^b	29.60±2.14 ^b	31.33±1.26 ^b	10.97±0.04 ^a	5.84±0.41 ^a
E处理组 E treatment group	雌 F	778.76±94.05 ^a	788.46±73.24 ^a	48.97±2.81 ^a	51.56±2.71 ^a	1.25±0.10 ^f	1.96±0.06 ^c
	雄 M	133.75±20.57 ^b	137.52±19.99 ^b	29.80±1.07 ^b	29.95±1.39 ^b	2.82±0.02 ^e	0.52±0.04 ^d
	伪雄 PM	154.83±27.14 ^b	166.73±30.73 ^b	30.18±2.40 ^b	30.41±2.16 ^b	7.69±0.06 ^b	0.75±0.11 ^d
T处理组 T treatment group	雌 F	721.45±69.85 ^a	750.00±78.54 ^a	48.35±2.07 ^a	51.24±2.15 ^a	3.96±0.22 ^d	2.59±0.04 ^b
	雄 M	147.16±14.76 ^b	152.70±19.03 ^b	30.10±1.47 ^b	30.47±1.53 ^b	3.76±0.03 ^d	1.23±0.29 ^c
	伪雄 PM	159.72±26.19 ^b	165.52±24.65 ^b	30.18±1.90 ^b	30.70±2.11 ^b	3.63±0.13 ^d	1.70±0.10 ^c

注: 同一处理组、不同性别鱼之间的比较或同一性别鱼、不同处理组之间的比较; 标有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Comparison between fish of the same treatment group and different sexes or comparison between fish of the same sex and different treatment groups. Different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

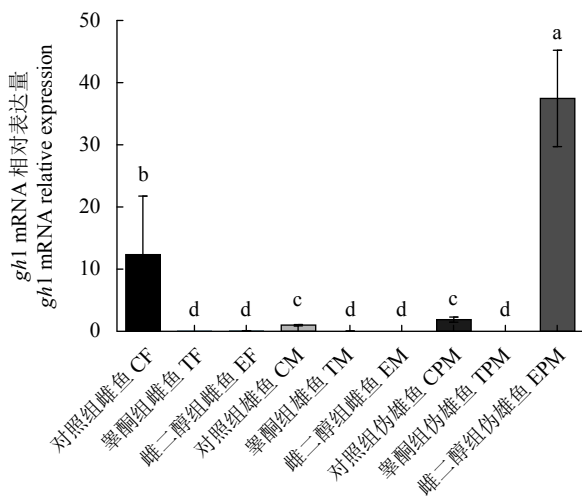


图4 睾酮、雌二醇处理后 $gh1$ mRNA在半滑舌鲷不同性别脑组织中表达量的变化

Figure 4 Change of $gh1$ mRNA expression in brain tissues of different sexes of *C. semilaewis* after T and E2 treatments

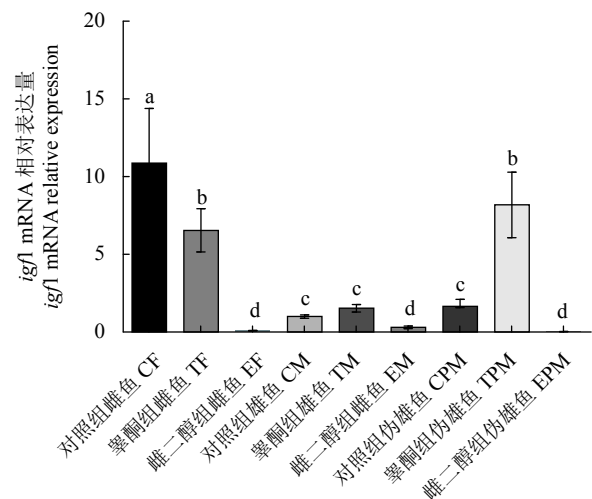


图5 睾酮、雌二醇处理后 $igf1$ mRNA在半滑舌鲷不同性别肝脏中表达量的变化

Figure 5 Change of $igf1$ mRNA expression in liver of different sexes of *C. semilaewis* after T and E2 treatments

的表达量较对照组均显著上升 ($P<0.05$), 且雌鱼相较于雄、伪雄鱼, 其表达量有显著性差异 ($P<0.05$), 而雄鱼和伪雄鱼之间的表达量差异不显著 ($P>0.05$)。E2 处理之后, 雄鱼与雌鱼肝脏中 $socs3$ mRNA 的表达量较对照组有显著上升 ($P<0.05$), 且二者之间的表达量有显著性差异 ($P<0.05$)。而伪雄鱼相较于对照组则无显著性差异 ($P>0.05$, 图 6)。

2.3.4 肌肉中 $socs3$ mRNA 表达量变化 同肝脏组织中的表达模式类似, 经过 T 注射处理之后, $socs3$ mRNA 在雌、雄、伪雄鱼肌肉中的表达量相较于对照组均显著上升 ($P<0.05$), 且雌鱼与雄、伪雄鱼之间的表达量有显著差异 ($P<0.05$), 而雄鱼与伪雄鱼之间表达量差异不显著 ($P>0.05$)。经过 E2 注射处理之后, $socs3$ mRNA 在雄鱼和伪雄鱼肌

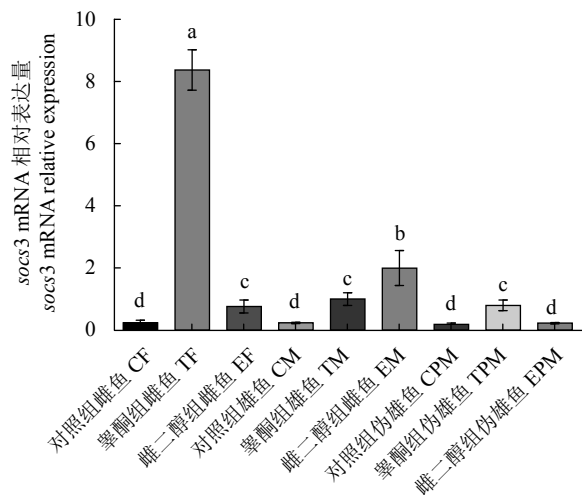


图6 睾酮、雌二醇处理后socs3 mRNA在半滑舌鲷不同性别肝脏中表达量的变化

Figure 6 Change of *socs3* mRNA expression in liver of different sexes of *C. semilaevis* after T and E2 treatments

肉中的表达量相较于对照组显著上升, 在雌鱼中的表达量显著下降 ($P < 0.05$), 且雄鱼与伪雄鱼之间表达量差异不显著 ($P > 0.05$, 图7)。

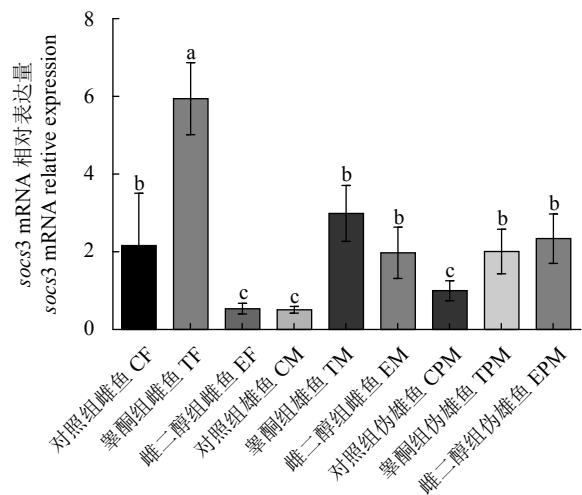


图7 睾酮、雌二醇处理后socs3 mRNA在半滑舌鲷不同性别肌肉中表达量的变化

Figure 7 Changes of *socs3* mRNA expression in muscle of different sexes of *C. semilaevis* after T and E2 treatments

3 讨论

对哺乳动物的性类固醇激素研究较多, 研究发现对家兔^[24]、大鼠^[25]注射性类固醇激素后, 实验个体内的生长激素水平发生明显变化。对鱼类的研究也发现 E2 可以提高金鱼 (*Carassius auratus*)、虹鳟^[26]血清中的生长激素水平; 在黄颡鱼、尼罗罗非鱼等具有生长二态性的典型物种中发现 T、E2 等性类固醇激素对其生长确实有一定的影响,

且这些影响存在明显的性别差异。

本实验中, E2 与 T 对半滑舌鲷个体均有生长抑制作用。参照鱼类生长调控研究相关结果^[7,10,27-28], 本实验选取半滑舌鲷生长轴相关基因 *gh1*、*igf1*、*socs3* 进行荧光定量 PCR 分析, 探究了半滑舌鲷不同性别鱼体在性类固醇激素处理后其生长相关基因 mRNA 在不同组织中表达量的变化。本实验中 *gh*、*igf1* 两个生长正调控基因在 T、E2 激素注射后的实验组中均呈现类似的下降趋势, 暗示 Gh/Igf1 系统可能是激素处理后生长性能下降的重要原因。研究发现, 二氢睾酮 (Double hydrogen testosterone, DHT) 的刺激可以使虹鳟血浆中的 Igf1 浓度显著升高^[29]。本研究也发现雌雄激素处理后 *socs3* mRNA 的表达量在半滑舌鲷肝脏和肌肉中均表现出显著增加趋势, 该负调控因子的上调可能是激素处理后生长缓慢的原因之一。另外, 在 T 处理后的伪雄鱼肝脏和 E2 处理后的伪雄鱼脑组织中, 分别观察到了 *igf1* 和 *gh1* mRNA 表达量的显著上调, 暗示伪雄鱼体内可能存在异于雌、雄鱼的生理生长以及应激调控机制。

性类固醇激素对动物生长性能的影响机制可能是多方面的。1) 性类固醇激素可能通过影响动物的进食与消化系统, 进而改变其生长性能。Kalianan 等^[30]的研究表明, 性类固醇激素与小鼠 (*Mus musculus*) 肠道微生物群之间存在相互作用。2) 注射性类固醇激素后, 鱼类生长相关的激素水平、受体浓度均会发生改变, 导致其生长速度发生变化^[31-32]。如在哺乳动物研究中发现雌雄激素、性类固醇合同通路关键基因 *Dhcr24* 及 *Igf1* 系统之间可能存在复杂的调控关系^[33]。雌雄激素对 *Dhcr24* 的影响是通过结合到其启动子上的雌雄激素结合位点来实现的^[34-35], 同时, 雌激素受体与 *Igf1* 系统也被证实在大脑中具有紧密关联^[36]。本研究在半滑舌鲷转录组数据中也鉴定到性类固醇合同通路关键基因 *dhcr24* 等在雌性肝脏中的上调表达, 因此, 深入研究半滑舌鲷中雌雄激素、*dhcr24* 基因及 *Igf1* 系统之间可能存在的关联机制, 将有助于更好地理解鱼类性别生长二态性的分子机理。

另外, 本研究中实验鱼的年龄较大及冬季养殖水温过低等, 可能也是影响实验结果的重要因素。后续实验将对注射实验的鱼龄等进行优化, 并考虑结合性类固醇激素投喂实验, 同时控制环境因素变

量, 进一步探究性类固醇激素对鱼类生长差异的影响。

参考文献:

- [1] 梅洁, 桂建芳. 鱼类性别异形和性别决定的遗传基础及其生物技术操控 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1198-1212.
- [2] 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术研究 [J]. 海洋水产研究, 2005, 26(5): 9-16.
- [3] 陈松林, 李仰真, 张静, 等. 半滑舌鲷快速生长及高雌性家系的筛选 [J]. 水产学报, 2013, 37(4): 481-488.
- [4] JI X S, LIU H W, CHEN S L, et al. Growth differences and dimorphic expression of growth hormone (GH) in female and male *Cynoglossus semilaevis* after male sexual maturation[J]. Mar Genom, 2011, 4(1): 9-16.
- [5] 季相山, 陈松林, 马洪雨, 等. 半滑舌鲷养殖群体中自然性逆转伪雄鱼的发现 [J]. 水产学报, 2010, 34(2): 322-327.
- [6] WEHRENBURG W B, GIUSTINA A. Basic counterpoint: mechanisms and pathways of gonadal steroid modulation of growth hormone secretion[J]. Endocr Rev, 1992, 13(2): 299-308.
- [7] 代向燕, 张玮, 卓子见, 等. 鱼类生长的神经内分泌调控 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(12): 1213-1226.
- [8] MA Q, LIU S, ZHUANG Z, et al. Genomic structure, polymorphism and expression analysis of the growth hormone (GH) gene in female and male half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Gene, 2012, 493(1): 92-104.
- [9] NELSON L E, SHERIDAN M A. Regulation of somatostatins and their receptors in fish[J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 142(12): 117-133.
- [10] STUDZINSKI A L, ALMEIDA D V, LANES CARLOS F C, et al. SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2009, 161(1): 67-72.
- [11] KHAN M G M, GHOSH A, VARIYA B, et al. Hepatocyte growth control by SOCS1 and SOCS3[J]. Cytokine, 2019, 121: 154733.
- [12] 殷艳蓉, 袁炜, 贺明, 等. 17 β -雌二醇通过 SOCS3 抑制泡沫细胞形成的机制初探 [J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(12): 1531-1537.
- [13] GABRIELSSON B G, CARMIGNAC D F, FLAVELL D M, et al. Steroid regulation of growth hormone (GH) receptor and GH-binding protein messenger ribonucleic acids in the rat[J]. Narnia, 1995, 136(1): 209-217.
- [14] DOMENÉ H M, MARÍN G, SZTEIN J, et al. Estradiol inhibits growth hormone receptor gene expression in rabbit liver[J]. Mol Cell Endocrinol, 1994, 103(1/2): 81-87.
- [15] BRIAN J H, CHRISTINA M D, STEVEN B C, et al. Non-genomic convergent and divergent signalling of rapid responses to aldosterone and estradiol in mammalian colon[J]. Steroids, 2002, 67(6): 483-491.
- [16] HAZEM A H, WILLIAM J E, ALLEN T, et al. Estrogen and androgen elicit growth hormone release via dissimilar patterns of hypothalamic neuropeptide secretion[J]. Steroids, 2001, 66(2): 71-80.
- [17] MANDIKI S N M, BABIAK I, BOPOPI J M, et al. Effects of sex steroids and their inhibitors on endocrine parameters and gender growth differences in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) juveniles [J]. Steroids, 2005, 70(2): 85-94.
- [18] 王凌云, 齐飘飘, 陈敏, 等. 性类固醇激素对黄颡鱼雌雄生长二态性的影响 [J]. 水生生物学报, 2020, 44(2): 379-388.
- [19] 马细兰, 张勇, 陈勇智, 等. 性类固醇激素 E2、MT 对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 雌、雄生长差异的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(6): 1487-1493.
- [20] WANG J, ZHOU J L, YANG Q, et al. Effects of 17 α -methyltestosterone on the transcriptome, gonadal histology and sex steroid hormones in *Pseudorasbora parva*[J]. Theriogenology, 2020, 155(10): 88-97.
- [21] WANG N, WANG R, CHEN S L. Transcriptomics analysis revealing candidate networks and genes for the body size sexual dimorphism of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Funct Integr Genomics, 2018, 18(10): 327-339.
- [22] 刘洋, 陈松林, 高峰涛, 等. 半滑舌鲷性别特异微卫星标记的 SCAR 转化及其应用 [J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(6): 787-792.
- [23] CLEVELAND B M, WEBER G M. Effects of sex steroids on expression of genes regulating growth-related mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Gen Comp Endocrinol, 2015, 216: 103-115.
- [24] YU Y M, DOMENÉ H M, SZTEIN J, et al. Developmental changes and differential regulation by testosterone and estradiol of growth hormone receptor expression in the rabbit[J]. Eur J Endocrinol, 1996, 135(5): 583-590.
- [25] BORSKI R J, TSAI W, DEMOTT F R, et al. Regulation of somatic growth and the somatotrophic axis by gonadal steroids: primary effect on insulin-like growth factor I gene expression and secretion[J]. Endocrinology, 1996, 137(8): 3253-3259.
- [26] HOLLOWAY A C, LEATHERLAND J F. Effect of gonadal steroid hormones on plasma growth hormone concentrations in sexually immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 105(2): 246-254.
- [27] REINECKE M. Insulin-like growth factors and fish reproduction[J]. Biol Reprod, 2010, 82(4): 656-661.
- [28] PÉREZ S J, SIMÓ M P, NAYA C F, et al. Somatotrophic axis regulation unravels the differential effects of nutritional and environmental factors in growth performance of marine farmed fishes[J].

- Front Endocrinol (Lausanne), 2008, 9(10): 682-689.
- [29] CLEVELAND B M, WEBER G M. Effects of steroid treatment on growth, nutrient partitioning, and expression of genes related to growth and nutrient metabolism in adult triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2016, 56(10): 1-12.
- [30] KANAKARAJU K, RUAIRI C R, KIERA M, et al. Estrogen-mediated gut microbiome alterations influence sexual dimorphism in metabolic syndrome in mice[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 20-25.
- [31] MEINHARDT U J, HO K Y. Modulation of growth hormone action by sex steroids[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2006, 65(4): 413-422.
- [32] MARTYNIUK C J, BISSEGER S, LANGLOIS V S. Current perspectives on the androgen 5 alpha-dihydrotestosterone (DHT) and 5 alpha-reductases in teleost fishes and amphibians[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2013, 194(12): 264-274.
- [33] PERI A, DANZA G, BENVENUTI S, et al. New insights on the neuroprotective role of sterols and sex steroids: the seladin-1/DH-CR24 paradigm[J]. *Front Neuroendocrin*, 2009, 30(2): 119-129.
- [34] LUCIANI P, DELEDDA C, ROSATI F, et al. Seladin-1 is a fundamental mediator of the neuroprotective effects of estrogen in human neuroblast long-term cell cultures[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(9): 4256-4266.
- [35] NELSON P S, CLEGG N, ARNOLD H, et al. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11890-11895.
- [36] MENDEZ P, WANDOSELL F, GARCIA S, et al. Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms[J]. *Front Neuroendocrin*, 2006, 27(4): 391-403.