

Sox9 基因在黄颡鱼卵巢发育周期的表达及 对热应激的响应

刘 淼¹ 温海深^{1,2*} 何 峰¹ 李吉方¹ 胡 建¹
张远青¹ 马瑞芹¹ 母伟杰¹ 祁保霞³

(¹ 中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

(² 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 无锡 214081)

(³ 内蒙古民族大学动物科学技术学院, 通辽 028000)

摘 要 采用半定量 PCR 的方法, 分别从时空表达、温度应激调控和血清雌二醇(Estradiol-17 β , E₂)水平 3 个方面, 共同研究雌性黄颡鱼 Sox9 基因的功能。结果表明, Sox9a1 基因在雌性黄颡鱼各组织中存在广泛的表达, 而 Sox9a2 则在脑和卵巢中有高表达(脑>卵巢), 胃中表达微弱。在卵巢年周期发育中, 卵巢中 Sox9a1 在 III 期时达到高峰, Sox9a2 则在 V 期时达到峰值; 脑中 Sox9a1 和 Sox9a2 表达的最大值均在 II 期, 后随着卵巢的发育表达水平显著下降。在热应激调控试验中, 卵巢中 Sox9a1 虽然对热应激存在响应, 但并没有出现 E₂ 相一致的变化趋势, 而 Sox9a2 的变化趋势与血浆中 E₂ 相同。虽然脑中 Sox9a1 和 Sox9a2 在卵巢年周期发育的表达变化出现下降的趋势, 但在热应激条件下, 脑中 Sox9a1 和 Sox9a2 在 II 期与 E₂ 的变化相反, 而 III 期到 VI 期与 E₂ 的变化相一致。该实验结果表明, 卵巢中 Sox9a1 可能不参与卵巢的年周期发育, Sox9a2 则参与卵巢发育的调控和 E₂ 的合成; 在脑中, 我们推测热应激可能改变了 Sox9 与雌激素的负调控关系, 但其机理需要更深入的研究。

关键词 Sox9 雌二醇 卵巢的年周期变化 热应激

中图分类号 S917.4;Q7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)04-0034-08

The expression of Sox9 during ovarian development and heat stress in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*

LIU Miao¹ WEN Hai-shen^{1,2*} HE Feng¹ LI Ji-fang¹ HU Jian¹
ZHANG Yuan-qing¹ MA Rui-qin¹ MU Wei-jie¹ QI Bao-xia³

(¹ Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Wuxi 214081)

(³ College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Nationality University, Tongliao 028000)

ABSTRACT Since the Sox9 plays a pivotal role during ovary development, the importance of two forms of Sox9 in the process of ovarian recrudescence in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* was analyzed. Tissue distribution pattern showed preferential expression of Sox9a2 in

农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室重点课题(BZ200709)资助

* 通讯作者。E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

收稿日期: 2011-09-21; 接受日期: 2011-10-24

作者简介: 刘 淼(1986-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类繁殖生理研究。E-mail: dalian.8899@163.com

brain and ovary (brain>ovary), and trace amounts was detected in stomach, while the extensive expression of *Sox9a1* was observed in several tissues. A semi-quantitative RT-PCR was developed to measure the mRNA levels. The high transcript levels of both isoforms in ovary were found in the reproductive phase of ovarian cycle, with the highest level in stage III for *Sox9a1* and V for *Sox9a2*. While the level of *Sox9* in brain dropped significantly from stage II. The phase-dependent rising of *Sox9a2* and Estradiol-17 β (E₂) in fish exposed to higher temperature revealed the stimulatory role of heat stress. Gene expression of *Sox9a1* in ovary was not consistent with E₂ level in serum of fish exposed to higher temperature. *Sox9* expression in brain was contrary to the level of E₂ in stage II. The expression level of *Sox9a1* and *Sox9a2* were closely related to level of serum E₂ in stage III~VI. Results demonstrated *Sox9a2* in ovary played a crucial role in the reproductive cycle of female yellow catfish, and *Sox9a1* in ovary was not involved in controlling the reproductive cycle. In addition, we inferred that temperature can affect the negative regulation between *Sox9* in brain and E₂, while the mechanism needs further research.

KEY WORDS *Sox9* Estradiol-17 β Ovarian cycle Heat stress

转录因子 *Sox9* 属于 HMG 蛋白家族(也被叫做 Sox)中的 E 亚科(Foster *et al.*, 1994)。有研究报道,在 小鼠的早期胚胎的卵巢细胞中,存在 *Sox9* 表达(Morais *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1996)。98d 大的人类胚胎的卵巢中,可以检测到微弱的 *Sox9* 的表达(Hanley *et al.*, 2000)。但通过 RT-PCR 检测哺乳动物成熟性腺 *Sox9* 的表达,只发现精巢中存在表达(Rodriguez-Mari *et al.*, 2005)。故推断 *Sox9* 不仅参与了精巢的分化和成熟,可能还与早期卵巢的发育有关系(Cecile *et al.*, 2006)。

在鱼类中,对于 *Sox9* 的研究仅限于斑马鱼 *Danio rerio*、青鳉 *Oryzias latipes*、鲈鱼 *Dicentrarchus labrax* 等少数几种鱼类(Chiang *et al.*, 2001; Masatoshi *et al.*, 2005; Malyka *et al.*, 2004)。与哺乳动物不同,在一些鱼类中分离和克隆了两种 *Sox9* 基因,命名为 *Sox9a1*(*Sox9a*)和 *Sox9a2*(*Sox9b*)两种类型,推测是在硬骨鱼发生时整个染色体复制事件而导致两种基因型的出现(Aomres *et al.*, 1998; Postlethwait *et al.*, 1998)。在 1~3 龄的史氏鲟 *Acipenser schrenckii* 精巢和卵巢中 *Sox9* 基因均表达,说明 *Sox9* 基因在史氏鲟性别分化过程中所起的作用不明显(陈金平等 2004)。且发现 *Sox9* 在成熟雌鱼的性腺中表达(Rodriguez-Mari *et al.*, 2005; Masatoshi *et al.*, 2005),表明鱼类 *Sox9* 有着与其他脊椎动物不同的作用。卵巢发育阶段,温度可以影响鱼类的性别分化和芳香化酶相关基因的表达(Bhandari *et al.*, 2006),且以前的研究中发现热应激可以影响鱼类性腺芳香化酶的活性(温海深等 2006)。已知 *Sox9* 是芳香化酶的上游调控基因,参与调控鱼类性别分化和芳香化酶的活性和雌激素的合成(de Santa Barbara *et al.*, 1998)。因此借此实验验证是否温度对 *Sox9* 表达存在影响。

黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* 是我国重要的淡水经济鱼类。目前,已经克隆得到黄颡鱼 *Sox9* 基因(俞菊华等 2005),但关于 *Sox9* 基因在其卵巢的繁殖周期中的生理功能,尤其是环境因素对其影响却鲜有报道。为进一步了解 *Sox9* 基因的生理作用,作者以雌性黄颡鱼为研究对象,测定黄颡鱼两种 *Sox9* 基因的时空表达;同时对每一卵巢发育期进行热应激试验,借助血清中 E₂ 含量的变化,探索 *Sox9* 基因 mRNA 的表达模式。验证 *Sox9* 对于黄颡鱼卵巢的周期性发育是否存在影响,探查硬骨鱼中 *Sox9* 基因生理功能与哺乳动物的差异,进一步完善 *Sox9* 基因生理功能的研究。

1 材料与方法

1.1 实验鱼类

2009 年 10 月~2010 年 10 月从山东某养殖场每 14d 从固定养殖池挑选 1 龄性成熟雌性黄颡鱼 10 尾。通

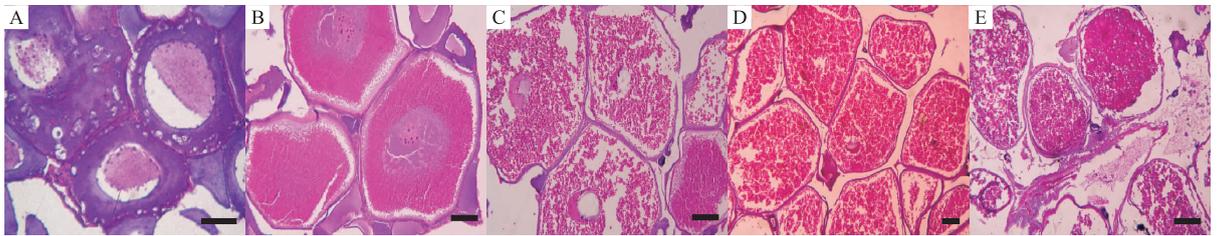
过 HE 染色判断性腺发育期,实验鱼体重 19.3~56.5 g,体长 10.8~14.8 cm。在多数鱼处于 II 期、III 期、IV 期、V 期和 VI 期的时期分别挑选 120 尾雌性黄颡鱼进行温度应激实验。实验鱼在实验室循环水系统里暂养 5d,流水充氧(溶解氧 ≥ 4 mg/L),人工调节光照(250 lx, 12 L: 12D),自然水温(15~22 $^{\circ}$ C,依据不同月份的自然水温),投喂人工饲料。暂养后,以环境温度为基准设定常温对照组,每上升 4~5 $^{\circ}$ C 设一温度应激组,设定 2~3 组(设定的应激温度和组数根据特定性腺分期所处月份的环境温度所定)。每组放置 30~40 条鱼进行试验,应激时间持续 24 h。

1.2 样品采集

实验结束后,从实验鱼尾静脉采集血液样品(采用 MS-222 进行麻醉,浓度为 1/30 000),分离血清(4 $^{\circ}$ C 储存 4~6h 后,16 000 r/min 离心 10 min,取上清液),-40 $^{\circ}$ C 保存。解剖后迅速取出卵巢、肝脏、胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾、脑 10 种组织,一部分组织用 Bouin's 液固定,用于组织切片,其余放在液氮中速冻,然后转移至 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存备用。

1.3 组织学实验方法

性腺用 Bouin's 液固定 24~36h 后,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡(熔点 54~56 $^{\circ}$ C)包埋,LEICA-RM2016 切片连续切片,厚度为 5~7 μ m。采用苏木精-曙红(H.E)染色,中性树脂胶封片,Nikon E200 型光学显微镜观察及显微摄影,对性腺进行组织学分期(图 1),挑选卵巢发育阶段相同的实验鱼进行 mRNA 表达及激素测定实验。



A: II 期,比例尺 = 24 μ m ; B: III 期,比例尺 = 70 μ m ; C: IV 期,比例尺 = 70 μ m ; D: V 期,比例尺 = 100 μ m ; E: VI 期,比例尺 = 70 μ m)

A: Stage II, bar = 24 μ m ; B: Stage III, bar = 70 μ m ; C: Stage IV, bar = 70 μ m ; D: Stage V, bar = 100 μ m ; E: Stage VI, bar = 70 μ m

图 1 黄颡鱼卵巢组织切片

Fig. 1 Histological photomicrographs of the ovary

1.4 试剂来源

本研究所用特异性引物均由上海生工生物技术公司合成。*Taq* 酶、DNase I (RNasefree)、Inhibitor、RNA 提取试剂 Trizol Reagent 购自 TAKARA 公司,M-MLV 购自 Promega 公司,普通琼脂糖凝胶、Marker 购自北京天根生化科技有限公司,其余为国产分析纯试剂。

1.5 分子生物学实验方法

1.5.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 -80 $^{\circ}$ C 保存的组织各 100mg,用 RNAiso Reagent 抽提总 RNA,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以 DNase I 酶去除基因组 DNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度。各组织 RNA 分别用 M-MLV 逆转录酶以 Oligo(dT)18 为引物合成 cDNA 第一链。合成的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5.2 *Sox9* mRNA 表达分析

每实验组选用 3~4 条发育阶段相同的雌性黄颡鱼(参与周期测定和热应激调控的实验鱼不重复),采用半

定量 RT-PCR 法, 来检测 *Sox9a1* 和 *Sox9a2* mRNA 在雌性黄颡鱼不同组织中的表达情况, cDNA 稀释(1:4) 后取 1 μ l 作为模板进行 PCR 扩增。以黄颡鱼 18s rRNA (张 娟等 2009) (表 1) 作为反应的内参照物。特异性引物利用 Primer 5.0 软件设计(表 1)。取 5 μ l 的 PCR 产物进行电泳。对电泳结果采用 Lane 1D 凝胶图像处理系统进行分析。

表 1 黄颡鱼 *Sox9* 基因 PCR 半定量表达所用引物

Table 1 Primers used for yellow catfish *Sox9* mRNA expression analysis

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence(5'-3')	退火温度 T _m (°C)	循环数 Cycle	备注 Note
18SF	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC	57	20	内源性基因表达
18SR	AGCAACTTTAATATACGCTATTGGAG			
<i>Sox9a1</i> F1	AGACCTGAAGCGAGAAGG	58	35	脑周期, 温度调控和空间表达
<i>Sox9a1</i> R1	GAAGGAACCGTAAGCCAC			
<i>Sox9a1</i> F2	CCAGACTACAAATACCAGC	59	35	性腺周期和温度调控
<i>Sox9a1</i> R2	ACGTCACGGAAGTCAAT			
<i>Sox9a2</i> F	GACTCTGGGCAAGTTATGG	60	30	<i>Sox9a2</i> 基因表达
<i>Sox9a2</i> R	CTTGAAGATGGCGTTGGT			

1.6 血清雌二醇含量测定

用¹²⁵I 放射性免疫测定方法(RIA)测量雌性黄颡鱼血清中雌二醇(E₂)的含量, 每组选用 7~8 条实验鱼进行激素测定, 其中参与周期测定和应激调控的实验鱼不重复。激素测定根据温海深等(2006)报道的方法进行。

1.7 数据分析

所得数据均表示为平均数±标准误(Mean±S. E.), 采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析并进行 Duncan 多重比较和 T 检验(当 $P < 0.05$ 时认为差异显著, 当 $P < 0.01$ 时认为差异极显著)。

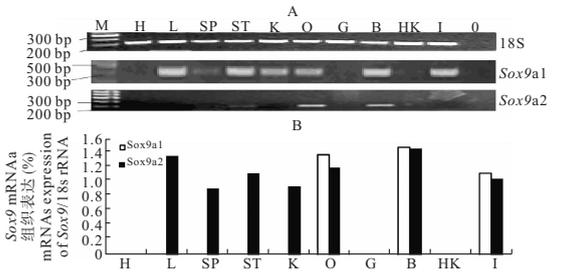
2 结 果

2.1 雌性黄颡鱼 *Sox9* 在各组织中的表达

通过 RT-PCR 方法检测 *Sox9a1* 和 *Sox9a2* 在雌性黄颡鱼心脏、肝、脾、胃、肾、卵巢、鳃、脑、头肾和肠 10 种组织中的表达。结果表明, 雌性黄颡鱼 *Sox9a1* 基因分别在肝脏、脾脏、胃、肾脏、卵巢、脑、肠中表达, 且在肝脏和脑中有较高量的表达, 其次是卵巢、胃、肠、脾脏和肾脏。*Sox9a2* 分别在卵巢和脑中存在表达, 且在脑中的表达量高于卵巢, 胃中表达十分微弱, 未检测出胃中有表达(图 2)。

2.2 雌性黄颡鱼卵巢发育周期中 *Sox9* 基因的表达水平及血清中雌二醇含量的变化

雌性黄颡鱼 E₂ 含量和 *Sox9* 的表达水平随着卵巢发育均出现相应的变化。根据对全年各项数据的统计, 雌性黄颡鱼 E₂ 的最高峰出现在 IV 期($P < 0.05$)。卵巢中 *Sox9a1* 高峰出现在 III 期; *Sox9a2* 在 V 期达到峰值($P < 0.05$)。脑中 *Sox9a1* 和 *Sox9a2* 均在 II 期出现峰值($P < 0.05$), 随着性腺的发育, 显著下降($P < 0.05$)(图 3)。



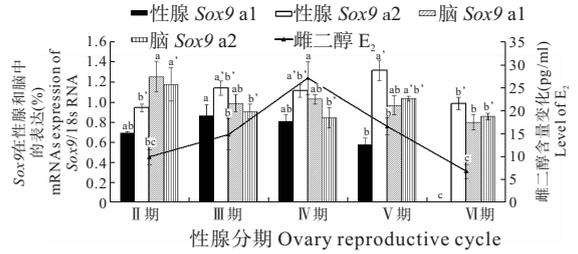
雌性黄颡鱼各组织 Various tissues of female yellow catfish

A. M.: DNA 分子量标准;H:心脏;L:肝脏;SP:脾;ST:胃;K:肾;O:卵巢;G:鳃;B:脑;HK:头肾;I:肠;0:阴性对照(以水为模板)

B. Sox9/18S mRNA 在组织中相对表达量

A. M: DNA molecular weight marker; H:Heart; L:Liver; SP:Spleen;ST:Stomach;K:Kidney;O:Ovary; G:Gill;B:Brain;HK:Head Kidney; I:Intestine;0:Control (using water as template)

图 2 Sox9 在雌性黄颡鱼各组织中的表达及相对表达量 Fig.2 The expression of Sox9 in female yellow catfish



数据均表示为平均数±标准误,图中标有不同的字母表示存在显著性差异(P<0.05, Duncan 氏多重比较)

Values are expressed as Mean ± Standard error of mean.

Different letters indicate significant difference (P<0.05, One-Way ANOVA, followed by Duncan's)

图 3 雌性黄颡鱼性腺发育周期中 Sox9 在性腺和脑的表达以及血清中雌二醇含量的变化

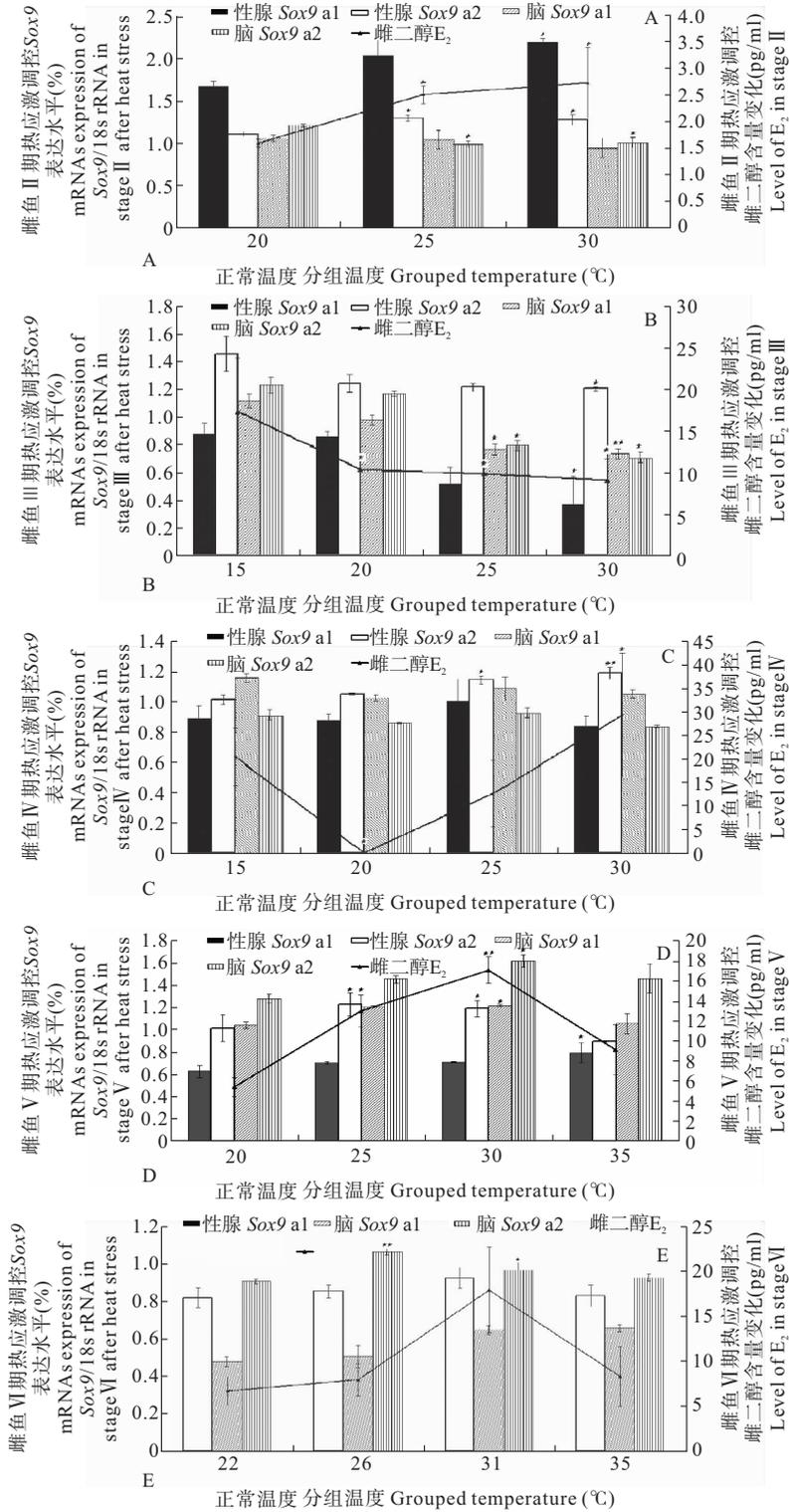
Fig.3 mRNA expression levels of Sox9 in ovary and brain and serum estradiol-17β level of female yellow catfish during reproductive cycle

2.3 Sox9 基因在雌性黄颡鱼各卵巢发育阶段热应激调控和血清雌二醇含量的变化

通过 RT-PCR 方法检测 Sox9 基因在雌性黄颡鱼各卵巢发育期的热应激表达和¹²⁵I 放射性免疫法测定血清中雌二醇的含量。结果表明,Sox9 在各发育阶段均有表达,随卵巢的发育,脑中 Sox9 基因表达对温度应激反应增强,卵巢中 Sox9 基因对温度应激反应减弱。在卵巢发育 II 期,卵巢中 Sox9 表达水平显著上升(P<0.05);而脑中 Sox9 的表达变化趋势与雌二醇相反,显著性降低,30℃处理组达到最低值(P<0.05)。卵巢发育 III 期,Sox9 在卵巢和脑中的表达趋势和血清中雌二醇相似,均在 15℃(常温对照组)出现最高值,随着热应激温度的升高而显著下降(P<0.05 或 P<0.01)。在 IV 期,雌二醇含量和性腺 Sox9a2 表达水平均在 30℃达到峰值(P<0.05),但雌二醇在 20℃低于检测值。而 Sox9 在脑中,以及 Sox9a1 在性腺中变化不显著,但脑中 Sox9 的变化趋势相似。V 期中,Sox9a2 在卵巢和脑中以及 Sox9a1 在脑中的表达趋势与雌二醇相似,均在 30℃达到最大值;但 Sox9a1 在卵巢的表达随着调控温度的提高而显著上升(P<0.05 或 P<0.01)。在卵巢发育 VI 期,脑中 Sox9a1 与卵巢中 Sox9a2 的表达水平与雌二醇的变化趋势相似,但脑中 Sox9a2 的表达在 31℃出现显著升高(P<0.05),26℃极显著升高(P<0.01)(图 4A~图 4E)。

3 讨论

本研究采用半定量 RT-PCR 的方法对雌性黄颡鱼 Sox9a1 和 Sox9a2 mRNA 组织表达进行分析。结果表明,Sox9a1 在雌性黄颡鱼的肝脏、脾脏、胃、肾脏、卵巢、脑、肠中均有表达,且在肝脏和脑中的表达高于其余组织。研究结果与俞菊华等(2005)相似,也与史氏鲟的研究结果相同(陈金平等 2004)。说明 Sox9a1 基因广泛存在于许多组织中,且哺乳动物 Sox9 的研究中也有类似的结果(Wegner 1999)。Sox9a2 基因分别在卵巢和脑中存在表达,且在脑中的表达量高于卵巢。徐跑(2006)对 Sox9a2 的系统进化分析发现,黄颡鱼的 Sox9a2 基因存在于一个特殊的分支,与其同源性最高的为斑马鱼 Sox9b 和鲤鱼 Cyprinus carpi Sox9b,平均为 67%。其中斑马鱼 Sox9b 为卵巢特异性表达,而鲤鱼 Sox9b 在脑和卵巢中存在表达,表达量为脑>卵巢,同时在肝脏、心脏和肾脏中也存在表达(Chiang et al. 2001; 杜启艳等 2005)。不同的表达结果是否与处于同一进化分支但彼此同源性较小有关,需要进一步探讨。黄颡鱼 Sox9a2 特殊性的进化位置和脑与卵巢中的特异性表达,说明它还可能参与除性别分化外的调控功能。



A. II 期; B. III 期; C. IV 期; D. V 期; E. VI 期

数据均表示为平均数 ± 标准误, 采用 T 检验方法, 标有 * 表示显著性差异 ($P < 0.05$) * * 表示极显著性差异 ($P < 0.01$)

A: Stage II; B: Stage III; C: Stage IV; D: Stage V; E: Stage VI

Values are expressed as Mean ± Standard error of mean. * indicate significant difference

(* : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$, One-Way ANOVA, followed by T-text)

图 4 *Sox9* 在雌性黄颡鱼每个卵巢发育阶段热应激表达量和血清中雌二醇含量的热应激调控变化

Fig. 4 The expression level of *Sox9* and serum estradiol-17 β level in female yellow catfish after the heat stress in every stage during reproductive cycle

在雌性黄颡鱼卵巢发育周期中, E_2 在Ⅳ期达到峰值, 这与中华乌塘鳢 *Bostrichthys sinensis* 的变化相一致(洪万树等 2009)。证明 E_2 诱导肝脏合成卵黄蛋白原, 促进卵母细胞卵黄的积累(林浩然 1999), 对性腺发育和卵细胞成熟等方面有重要作用。采用半定量 RT-PCR 分析 *Sox9* 在卵巢和脑中的变化, 发现 *Sox9a1* 在卵巢Ⅲ期表达量最高, 随着卵巢发育表达量急剧下降, 到Ⅵ期低于检测值。*Sox9a2* 的表达水平在Ⅴ期达到峰值, 与徐跑(2006)的研究结果相似。斑马鱼卵巢中 *Sox9a1* 在进入卵巢周期发育后出现显著性下降并伴随着芳香化酶表达量的上升, 表明 *Sox9a1* 参与卵巢的分化和卵巢成熟期前的发育(Chiang *et al.* 2001)。已知 *Sox9* 是芳香化酶的上游转录因子, 与芳香化酶存在负反馈作用(di Clemente *et al.* 1992; Rouiller-Fabre *et al.* 1998)。P450 芳香化酶(P450arom), 是雌激素生物合成中的唯一的关键酶和限速酶(Guiguen *et al.* 1999), 表明卵巢中 *Sox9* 与 E_2 的合成存在相关性(Uhlenhaut *et al.* 2009)。但是不同于其他脊椎动物, 在黄颡鱼中存在两种 *Sox9* 基因编码, 根据 *Sox9a1* 和 *Sox9a2* 在卵巢发育周期不同的变化趋势, 作者推测卵巢中 *Sox9a1* 参与卵巢的分化和卵巢的发育; *Sox9a2* 则可能参与卵巢的周年发育调控。脑中 *Sox9a1* 和 *Sox9a2* 的表达在Ⅱ期达到峰值, 随后显著性下降。大量研究证明, 脑中芳香化酶调控中枢神经雌二醇的合成, 参与了脑-脑垂体-性腺轴的生理繁殖活动(Cavaco *et al.* 2001; Kazeto *et al.* 2003), 且芳香化酶与 *Sox9* 存在负反馈调节作用。作者推测, *Sox9* 对脑性别的分化和脑的发育存在影响, 但是否还存在其他调控模式还需要进一步的研究。

对实验鱼进行热应激调控发现, 在不同的卵巢发育阶段, *Sox9* 基因存在不同的表达模式。Owen 等(2001)发现, HSP70 与 *Sox9* 基因存在紧密的相互作用, 通过 ATP 激活 *Sox9* 基因的转录通路, 这种激活作用不仅存在于性别分化时期, 而且存在于整个转录调控过程。这证明了热应激能够调控 *Sox9* 基因的表达, 但其表达模式差异性的作用机理尚不清楚。卵巢中 *Sox9a1* 的表达水平与 E_2 的变化趋势不同, 而 *Sox9a2* 的表达水平与 E_2 相似, 已知青鳉和斑马鱼中 *Sox9* 基因均具有两种形式, 与软骨生成有关, 但两种 *Sox9* 基因在斑马鱼中表达方式有差异, 说明这两种基因在组织发育过程中起着不同的作用, 但其相关的生理机制需要进一步研究(Masatoshi *et al.* 2005; Chiang *et al.* 2001)。从 *Sox9a1* 在卵巢中的表达发现, 虽然该基因受到热应激调控的影响, 但并没有参与 E_2 合成的调控, 作者推测卵巢中 *Sox9a1* 的调控作用只存在于性别的形成和性腺发育的早期阶段, 这和 *Sox9* 在哺乳类、鸟和龟性腺形成以及发育中具有重要作用的论证相一致(Moreno-Mendoza *et al.* 1999)。但在Ⅲ期发现, 卵巢中 *Sox9a1* 的表达水平与 E_2 相似, 这可能归因于所使用技术的敏感性。卵巢中 *Sox9a2* 与 E_2 相似的趋势, 进一步验证了上面的推测, 卵巢中 *Sox9a2* 参与卵巢周期发育并对血浆 E_2 的合成具有调控作用, 且似乎印证了 *Sox9a2* 基因在成熟的卵巢存在特异性表达的这一特点。在黄颡鱼脑中发现了一个奇特的现象, *Sox9* 随着卵巢的发育显著性下降, 但在热应激调控下, 除卵巢发育Ⅱ期, *Sox9* 的表达趋势与 E_2 相似。已经知道 E_2 与 *Sox9* 之间存在负反馈调节作用(Uhlenhaut *et al.* 2009), 但这种认识只限于性别分化和性腺早期发育阶段, 所以推测性腺发育Ⅱ期也存在相似的调节作用。已有研究表明, 存在一种与 *Sox9* 具有对立关系的雌激素信号因子, 可以使芳香化酶对 *Sox9* 存在上调作用(Britt *et al.* 2004; Couse *et al.* 1999; Dupont *et al.* 2003)。在进入卵巢发育阶段, 作者推测热应激使这种负反馈调节产生突变, 使芳香化酶与 *Sox9* 之间的关系转变成正反馈调节作用, 但这种推测需要蛋白水平上进行更深入的研究。

本研究通过时空、热应激调控表达并结合血清雌二醇水平共同研究 *Sox9* 基因的功能。推测 *Sox9a2* 参与性成熟阶段卵巢的雌二醇调控, 在脑中 *Sox9* 可能受到热应激调控的影响, 而参与卵巢雌二醇的合成。

参 考 文 献

- 陈金平, 袁红梅, 王 斌, 梁 冰, 张树义. 2004. 史氏鲟 *Sox9* 基因 cDNA 的克隆及在早期发育过程不同组织中的表达. 动物学研究, 25(6): 527~533
- 杜启艳, 常重杰, 王凤羽, 华慧颖. 2005. 鲤鱼中 *Sox9b* 基因的克隆和表达. 实验生物学报, 38(5): 397~403
- 洪万树, 吴秋艳, 张其永. 2009. 中华乌塘鳢血清性类固醇激素含量与性腺发育的关系及其季节变化. 厦门大学学报(自然科学版), 48(2): 274~277
- 林浩然. 1999. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社, 146~240, 188~191
- 温海深, 刘 森, 祁保霞, 何 峰, 李吉方, 史 丹, 马瑞芹, 胡 健, 母伟杰, 张远青. 2011. 雄性黄颡鱼芳香化酶基因 mRNA 在性成熟期组织

中表达分析. 渔业科学进展, 32(4):42~49

- 温海深, 宋海霞, 杨立廷, 马学坤, 高 玲. 2006. 外源激素对养殖牙鲆血浆睾酮和雌二醇含量的影响研究. 海洋学报(中文版), 28(4):115~120
- 徐 跑. 2006. 黄颡鱼性别相关基因 *Sox9*、*Ftz-F1* 和 *P450arom* 的研究. 见:南京农业大学博士学位论文
- 俞菊华, 李建林, 曹丽萍, 吴婷婷, 杨 弘. 2005. 黄颡鱼 *Sox9* 基因的分离及分析. 农业生物技术学报, 13(5):620~623
- 张 娟, 张其中, 张占会, 崔 森. 2009. 黄颡鱼 HSC70 基因及其组织表达分析. 水生生物学报, 33(3):426~433
- Aomres, A., Force, A., Yan, Y. L. *et al.* 1998. Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, 282:1 711~1 714
- Bhandari, R. K., Nakamura, M., Kobayashi, T. *et al.* 2006. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 145(1): 20~24
- Britt, K. L., Stanton, P. G., Misso, M. *et al.* 2004. The effects of estrogen on the expression of genes underlying the differentiation of somatic cells in the murine gonad. *Endocrinology*, 145(8): 3 950~3 960
- Cavaco, J. E., van Baal, J., van Dijk, W. *et al.* 2001. Steroid hormones stimulate gonadotrophs in juvenile male African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol. Reprod.* 64(5): 1 358~1 365
- Cecile, N., Safia, M., Philippe, B. *et al.* 2006. Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene. Expr. Patterns*, 6(7): 695~702
- Chiang, E. F., Pai, C., Wyatt, M. *et al.* 2001. Two *Sox9* genes on duplicated zebrafish chromosomes; expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev. Biol.* 231(1):149~163
- Couse, J. F., Hewitt, S. C., Bunch, D. O. *et al.* 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*, 286(5 448):2 328~2 331
- de Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B. *et al.* 1998. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human *anti-Müllerian hormone* gene. *Mol. Cell. Biol.* 18(11):6 653~6 665
- di Clemente, N., Ghaffari, S., Pepinsky, R. B. *et al.* 1992. A quantitative and interspecific test for biological activity of *anti-Müllerian hormone*: the fetal ovary aromatase assay. *Development*, 114: 721~727
- Dupont, S., Dennefeld, C., Krust, A. *et al.* 2003. Expression of *Sox9* in granulosa cells lacking the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta. *Dev. Dyn.* 226(1):103~106
- Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S. *et al.* 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, 372: 525~530
- Guiguen, Y., Baroiller, J. F., Ricordel, M. J. *et al.* 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod.* 54 (2):154~162
- Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M. *et al.* 2000. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* 91(1-2): 403~407
- Kazeto, Y., Goto-Kazeto, R., Place, A. R. *et al.* 2003. Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains; changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals. *Fish Physiol. Biochem.* 28(1-4):29~32
- Kent, J., Wheatley, S. C., Andrews, J. E. *et al.* 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*. 122: 2 813~2 822
- Malyka, G. B., Lynda, L., Constantinos, C. M. *et al.* 2004. Analysis of *Sox* gene family in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137(2):279~284
- Masatoshi, N., Aya, S., Masaru, M. *et al.* 2005. Testicular type *Sox9* is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333(3):729~736
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V. *et al.* 1996. *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14: 62~68
- Moreno-Mendoza, N., Harley, V. R., and Merchant-Larios, H. 1999. Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male-or female-promoting temperatures. *J. Exp. Zool.* 284(6):705~710
- Owen, J. M., and Vincent, R. H. 2001. Identification of an interaction between SOX9 and HSP70. *FEBS Letters*, 496(2-3):75~80
- Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A. *et al.* 1998. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* 18(4):345~349
- Rodriguez-Mari, A., Yan, Y. L., Bremiller, R. A. *et al.* 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish *anti-Müllerian hormone* (*amh*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development. *Gene. Expr. Patterns*, 5(5):655~667
- Rouiller-Fabre, V., Carmona, S., Merhi, R. A. *et al.* 1998. Effect of *anti-Müllerian hormone* on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. *Endocrinology*, 139(3): 1 213~1 220
- Uhlenhaut, N. H., Jakob, S., Anlag, K. *et al.* 2009. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 139(6):1 130~1 142
- Wegner, M. 1999. From head to toes: The multiple facets of Sox proteins. *Nucleic. Acids. Res.* 27(6): 1 409~1 420