

## EE2 抑制斑马鱼雌性内源雌激素合成酶的表达\*

刘虹余, 蔡静, 饶剑军, 刘智皓

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校生物活性物质工程研究中心 重庆市高校动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

**摘要:**为探讨乙炔基雌二醇(EE2, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol)诱导斑马鱼(*Danio rerio*)雌性成鱼卵母细胞发育障碍的机制, 初步研究了斑马鱼雌激素和孕激素合成酶相关的基因 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 的组织表达模式和在滤泡发育过程中的表达模式, 并用定量 RT-PCR 的方法对上述基因在 EE2 处理条件下的表达变化进行了检测。结果发现 *P450c17-I*、*P450c17-II* 基因均主要表达于斑马鱼雌雄性腺, 而在滤泡发育过程中均呈不同程度下调趋势; EE2 处理后雌性卵巢中 *P450c17-I* 和 *cyp19a1a* 基因表达均显著上升 ( $p < 0.05$ ), 而 *P450c17-II* 基因的表达则没有显著变化。研究推测 EE2 可能通过上调内源雌激素的水平抑制后期卵母细胞的生长发育。

**关键词:**乙炔基雌二醇; 斑马鱼; 内源性激素; 基因表达

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2016)01-0024-05

内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)能改变动物体内源激素的合成、转运、代谢、排泄, 或改变它们与激素受体的结合, 从而影响激素功能和干扰动物的内分泌系统<sup>[1]</sup>。当前中国水体 EDCs 污染严重, 并持续恶化, 严重影响人类生殖健康<sup>[2-3]</sup>。有研究表明, EDCs 不仅能够干扰高等动物精子的产生和功能, 导致不育, 对低等脊椎动物(包括鱼类)同样有极大危害<sup>[4]</sup>。处于 EDCs 暴露的鱼类会出现性腺发育异常<sup>[5]</sup>、生殖能力下降<sup>[6]</sup>、配子发生障碍<sup>[7]</sup>等症状, 因此研究 EDCs 对鱼类的影响已迫在眉睫。

乙炔基雌二醇(EE2, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol)是一种常见的内分泌干扰物, 广泛存在于污染水体中, 具有强烈的雌激素效应, 比雌酮和雌二醇(E2, 17 $\beta$ -estradiol)高 5~10 倍<sup>[8]</sup>。大量研究表明 EE2 能严重影响雄性鱼类的繁殖活动及性腺发育, 而关于它影响雌性鱼类的研究较为少见。仅有的研究表明, EE2 能诱导雌性海湾海龙(*Syngnathus scovelli*)发生生殖障碍<sup>[9]</sup>; 也能使雌性青鳉(*Oryzias latipes*)成熟的卵母细胞减少或消失, 严重限制了它的排卵<sup>[10]</sup>。最近的研究发现, EE2 暴露 20 d 还能导致斑马鱼(*Danio rerio*)雌性成鱼卵母细胞同步化<sup>[11]</sup>。

雌激素和孕激素在鱼类雌性卵母细胞发育中均起重要作用, 而 *P450c17* 羟化酶是合成雌激素和孕激素的限速酶之一<sup>[12]</sup>。与四足类仅有 1 个 *P450c17* 基因不同, 由于鱼类特有的基因组复制现象, 硬骨鱼类具有由 2 个不同编码的 *P450c17* 基因, 即 *P450c17-I* 和 *P450c17-II*<sup>[13-14]</sup>。对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和青鳉的研究发现, 上述基因均表达于滤泡(Follicle)外层的体细胞中; *P450c17-I* 羟化酶主要参与性激素的合成, 而 *P450c17-II* 羟化酶则参与孕激素(17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -二羟黄体酮)的合成。

为了解 EE2 是否可能通过影响 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因的表达来改变内源性激素和孕激素水平, 进而导致斑马鱼卵母细胞同步化, 本研究分离了斑马鱼 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因, 研究了它们的组织表达模式和在滤泡发育过程中的表达模式; 同时分别用含量为 0.01, 0.1, 1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EE2 对斑马鱼雌性成鱼进行了 20 d 暴露处理, 利用定量 RT-PCR 的方法检测了 EE2 对斑马鱼 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因和雌激素合成关键酶基因 *cyp19a1a* 表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与处理

研究用斑马鱼雌性成鱼(120 d 大小)为自行繁殖获得, 处理前用曝气除氯后的自来水暂养于恒温循环水养殖系统中, 水温(27 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ 。从中随机选取 100 尾健康的雌性斑马鱼, 平均体质量(0.47 $\pm$ 0.11) g。实验中设立

\* 收稿日期: 2015-05-05 修回日期: 2015-09-17 网络出版时间: 2015-12-02 13:26

资助项目: 重庆师范大学校级项目(No. 13XLZ08); 重庆市大学生创新创业训练计划项目(No. 201410637027)

作者简介: 刘虹余, 女, 研究方向为鱼类生殖生理和分子内分泌, E-mail: 865731429@qq.com; 通信作者: 刘智皓, 副教授, E-mail: minenut@163.com

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20151202.1326.006.html>

1 个对照组(C),水体中含 0.05% DMSO;设立 3 个 EE2 处理组即 EE2-1、EE2-2 和 EE2-3,其中水体内 EE2 含量分别为 0.01,0.1,1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每组 25 条斑马鱼雌性成鱼养于 20 L 水中,每天喂食 3 次,持续增氧,连续处理 20 d,每天换水 1 次。水体温度控制在  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,光照周期为自然光周期。在处理 6,12,20 d,分别对实验鱼进行解剖取材,每组取 6 尾实验鱼卵巢,液氮速冻后,于  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。上述实验共重复 3 次。

### 1.2 斑马鱼 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 基因部分序列的克隆

解剖分离斑马鱼雌性卵巢,用 TRIzol 提取总 RNA,并用 DNase I 处理,去除基因组 DNA。用分光光度计(NanoDrop 2000)测量总 RNA 的质量及浓度,确保样品 RNA 的 OD260/OD280 在 1.8~2.0 范围内。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA,按照 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)说明书进行逆转录,合成第一链 cDNA。

用生物信息学方法获得斑马鱼 *P450c17-I*(KJ905722)、*P450c17-II*(EE111295)和 *cyp19a1a*(KF296362)基因的 cDNA 序列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),设计引物(引物序列见表 1)。利用已合成的第一链 cDNA 扩增相应 cDNA 的部分序列。扩增条件为:94  $^\circ\text{C}$  预变性 3 min;94  $^\circ\text{C}$  变性 30 s,56  $^\circ\text{C}$  退火 30 s,72  $^\circ\text{C}$  延伸 1 min,35 个循环;最终延伸 10 min。扩增片段在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色后,在凝胶成像系统上(Bio-RAD)分析。PCR 产物经回收(Geneview)、连接(pMD20-T, TaKaRa)、转化后测序验证(上海英骏生物技术公司)。

### 1.3 斑马鱼 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因的组织表达模式

将斑马鱼成鱼解剖后,迅速取出脾(SP)、肌肉(M)、心脏(H)、肾(K)、肠(D)、肝脏(L)、脑(B)、卵巢(O)和精巢(T)组织,用 TRIzol 提取总 RNA,并用 DNase I 处理,去除基因组 DNA。用分光光度计(NanoDrop 2000)测量总 RNA 的质量及浓度,确保样品 RNA 的 OD260/OD280 在 1.8~2.0 范围内。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA,按照 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)说明书进行逆转录,合成第一链 cDNA。

用斑马鱼 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 引物扩增相应的中间片段,研究 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因在斑马鱼各组织中的表达模式,以 *EF1 $\alpha$*  为内参,并分别用相应基因的质粒和蒸馏水为模板扩增的产物作为阳性和阴性对照。*P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因的扩增条件为:94  $^\circ\text{C}$  预变性 3 min;94  $^\circ\text{C}$  变性 30 s,56  $^\circ\text{C}$  退火 30 s,72  $^\circ\text{C}$  延伸 1 min,30 个循环;最终延伸 10 min。*EF1 $\alpha$*  扩增条件为:94  $^\circ\text{C}$  预变性 3 min;94  $^\circ\text{C}$  变性 30 s,60  $^\circ\text{C}$  退火 30 s,72  $^\circ\text{C}$  延伸 30 s,23 个循环;最终延伸 7 min。PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色后,在凝胶成像系统上进行分析。

### 1.4 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 基因在滤泡发生过程中的表达变化

随机挑选 10 条斑马鱼雌性成鱼,将其解剖后迅速取出卵巢置于  $1 \times \text{PBS}$  缓冲液(pH 值为 7.4)中,在解剖镜下将初级生长期(Primary growth,PG)、卵黄生成前期(Previtellogenic stage,PV)、卵黄生成早期(Early vitellogenic stage,EV)、卵黄生成中期(Midvitellogenic stage,MV)和完全生长期(Full-grown stage,FG)滤泡进行分离<sup>[15]</sup>,每组分离 60 枚,各时期分离 6 组平行样本。用 TRIzol 提取上述滤泡总 RNA,并用 DNase I 处理,去除基因组 DNA。用分光光度计(NanoDrop 2000)测量总 RNA 的质量及浓度,确保样品 RNA 的 OD260/OD280 在 1.8~2.0 范围内。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA,按照 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)说明书进行逆转录,合成第一链 cDNA。

用半定量 RT-PCR(Semi-quantitative RT-PCR)的方法检测斑马鱼 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 在滤泡发育各个时期的表达变化,并以 *EF1 $\alpha$*  为内参,反应条件参照上文 1.3 部分。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色后,用凝胶成像系统成像,并进行光密度分析(Quantity One, Bio-Rad)。数据用 6 个平行样的“平均值 $\pm$ 标准误”表示。结果用 SPSS 13.10 软件(SPSS, Chicago)进行方差分析和差异比较,差异显著性水平为  $p < 0.05$ 。柱形图用 GraphPad Prism 5(GraphPad Software, San Diego, CA)进行绘制。上述实验重复 3 次。

### 1.5 EE2 对斑马鱼 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 基因表达的影响

取出放置于  $-80^\circ\text{C}$  中备用的斑马鱼卵巢,用 TRIzol 提取总 RNA,并用 DNase I 处理,去除基因组 DNA。用分光光度计(NanoDrop 2000)测量总 RNA 的质量及浓度,确保样品 RNA 的 OD260/OD280 在 1.8~2.0 范围内。取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA,按照 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)说明书进行逆转录,合成第一链 cDNA。

表 1 研究中所用引物及其序列

Tab.1 Primers and their sequences used in the present study

引物名称	引物序列
P450c17-I-F	GGAGTCTGATGAGCCTGGTG
P450c17-I-R	GGATTGTGGACGAGGTAAGC
P450c17-II-F	GACCACCGACCTGTTGACTC
P450c17-II-R	CACCTGACCCTCTTTGCTG
<i>cyp19a1a</i> -F	GGACTGCCAGCAACTACTA
<i>cyp19a1a</i> -R	GTCTGCCAGGTGTCAAAG
<i>EF1<math>\alpha</math></i> -F	GATCACTGGTACTTCTCAGGCTGA
<i>EF1<math>\alpha</math></i> -R	GGTGAAAGCCAGGAGGGC

用定量 RT-PCR(real-time quantitative qRT-PCR)的方法,以 *EF1 $\alpha$*  为内参,检测上述基因在 EE2 处理后的表达变化,所用引物参考表 1。实验流程参照 Bio-Rad 公司的 SYBR 荧光实时定量 PCR 试剂盒说明书进行(20  $\mu$ L 体系);引物各 0.5  $\mu$ L,DDW 7  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L,2 $\times$ SYBR Green supermix 10  $\mu$ L。PCR 反应:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s;然后 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s,60  $^{\circ}$ C 退火 30 s,40 个循环;最后 65  $^{\circ}$ C 延伸 10 s,60 个循环(溶解曲线)。数据分析参照上文 1.4 部分。上述实验重复 3 次。

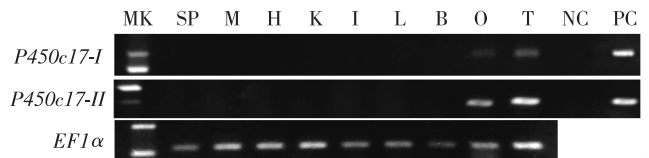
## 2 结果

### 2.1 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因的组织表达模式

组织表达模式的研究表明,在所研究的组织中,*P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因仅在斑马鱼性腺(O 和 T)中表达,而在其他非性腺组织中表达。其中,*P450c17-I* 基因的表达在 T 中略高于 O;而 *P450c17-II* 基因的表达则没有性别差异(图 1)。

### 2.2 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 基因在滤泡发生过程中的表达模式

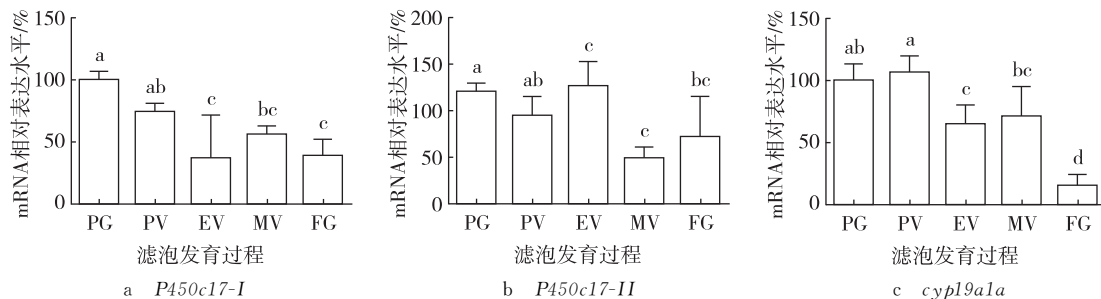
图 2 表明,*P450c17-I* 和 *cyp19a1a* 基因在斑马鱼滤泡发育的 PG 和 PV 期均有较高表达,从 EV 期开始两者表达显著下调( $p < 0.05$ ),且 *cyp19a1a* 基因在 FG 期表达量极低;而 *P450c17-II* 在 PG、PV 和 EV 期也呈高表达,但从 MV 期开始就显著下调( $p < 0.05$ )。上述基因在滤泡中的表达随卵母细胞的发育都呈下降趋势。不同的是,*P450c17-I* 和 *cyp19a1a* 在 EV 期显著下调( $p < 0.05$ ),而 *P450c17-II* 的下调(MV 期)晚于 *P450c17-I*。



注:SP-脾脏;M-肌肉;H-心脏;K-肾脏;I-肠;L-肝脏;B-脑;O-卵巢;T-精巢;NC-阴性对照;PC-阳性对照;EF1 $\alpha$  为内参。

图 1 斑马鱼 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因的组织表达模式

Fig. 1 Tissue expression patterns of *P450c17-I* and *P450c17-II* genes in zebrafish



注:不同小写字母表示差异显著( $p < 0.05$ ),下同。

图 2 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 基因在斑马鱼发育不同时期滤泡中的表达模式

Fig. 2 The expression patterns of *P450c17-I*, *P450c17-II*, and *cyp19a1a* genes during folliculogenesis in zebrafish

### 2.3 EE2 对 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 基因表达的影响

定量 RT-PCR 的结果显示:EE2 处理 20 d 的斑马鱼卵巢中,*P450c17-II* 基因表达没有显著变化;而 EE2-1 和 EE2-2 组 *P450c17-I* 基因表达则显著上升( $p < 0.05$ ),EE2-3 组无显著变化。不同的是,*cyp19a1a* 的表达则显著上升( $p < 0.05$ ),且呈剂量依赖效应。

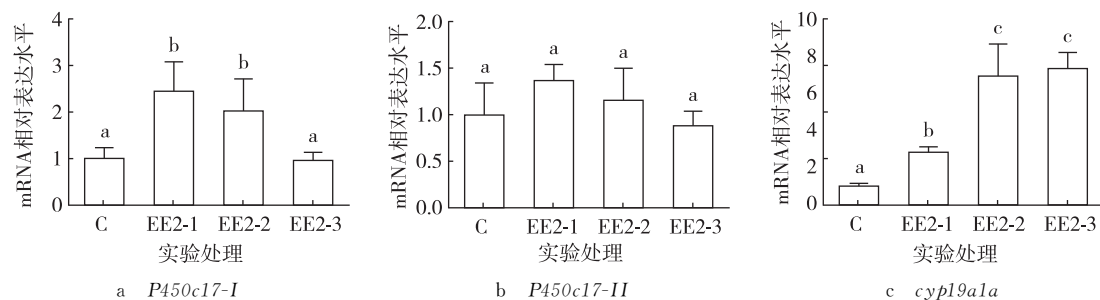


图 3 EE2 处理 20 d 对斑马鱼卵巢中 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 基因表达的影响

Fig. 3 Influences of EE2 on the expressions of *P450c17-I*, *P450c17-II*, and *cyp19a1a* genes in zebrafish ovary

## 3 讨论

EDCs 能作用于脊椎动物的内分泌系统,使之正常功能的发挥受到干扰,影响生殖健康。鱼类作为低等的脊



椎动物,对 EDCs 更加敏感;长期暴露在一定浓度的 EDCs 中鱼类会出现严重的生殖障碍,影响配子发生,甚至出现性逆转现象<sup>[16-17]</sup>。

EE2 是一种典型的 EDCs,能严重影响鱼类雄性性腺发育、分化和配子发生<sup>[18-19]</sup>,但有关它对雌性动物(包括鱼类)影响的报道极少。最近的研究发现,EE2 不仅对斑马鱼雄性性腺发育和配子发生有明显抑制作用,还能抑制雌性排卵<sup>[20]</sup>。经 EE2 处理后的斑马鱼雌性,出现卵巢退化、缩小,卵母细胞数量剧减等情况;此外,新生卵母细胞发育也受到抑制,并出现卵母细胞同步化。因此,EE2 可能会严重干扰斑马鱼卵巢发育和卵子发生。同时有研究表明,用 EE2 处理后,斑马鱼雌性卵巢中与鱼类减数分裂和卵母细胞发育密切相关的基因如 *scp3* 和 *igf3* 的表达均显著下调( $p < 0.05$ ),暗示 EE2 处理后斑马鱼卵母细胞发育和减数分裂被抑制<sup>[11]</sup>。由于卵母细胞的发育和成熟与内源性类固醇激素和孕激素水平的稳定和协调密切相关,因而本研究考虑 EE2 可能通过改变斑马鱼雌性内源激素水平,抑制后期卵母细胞发育。*P450c17* 羟化酶则是性激素和孕激素合成的核心酶,它在四足类中只存在 1 个拷贝,而在硬骨鱼类中有 2 个拷贝——其中 *P450c17-I* 蛋白参与内源性激素的合成,*P450c17-II* 蛋白参与孕激素和可的松的合成。本研究发现,*P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因仅在斑马鱼的性腺中高量表达,与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的研究结果非常相似<sup>[13]</sup>,暗示两者也可能分别参与斑马鱼性腺中内源雌雄激素和孕激素的合成。

本研究还发现 *P450c17-I* 和 *P450c17-II* 基因可能分别在斑马鱼滤泡早期和后期的发育中起重要作用。其中 *P450c17-I*、*P450c17-II* 和 *cyp19a1a* 均在滤泡发育早期高量表达。不同的是,*P450c17-I* 和 *cyp19a1a* 基因在 EV 期表达量显著下调( $p < 0.05$ ),FG 期表达量极低,而 *P450c17-I* 和 *cyp19a1a* 基因在 EV 期表达量达到峰值,MV 期表达量才出现显著下调( $p < 0.05$ ),这与在马苏大马哈鱼(*Oncorhynchus rhodurus*)中发现的结果一致<sup>[21]</sup>。由于 *P450c17-I* 和 *cyp19a1a* 基因表达量出现下调的时期与 *P450c17-II* 基因表达量出现峰值的时期相吻合,因此可以推测,雌激素和孕激素在早期虽均高表达,但雌激素先于孕激素出现下调,因此,内源雌激素和孕激素可能呈拮抗效应。

对上述基因在 EE2 处理后的表达变化的分析发现,实验鱼 *P450c17-II* 基因在处理期间未发生显著变化,因此 EE2 不太可能通过抑制孕激素的合成抑制卵母细胞的发育。不同的是,*P450c17-I* 基因的表达总体显著上调( $p < 0.05$ ),而 *cyp19a1a* 基因的表达在 EE2 处理后急剧上调(在 EE2-2、EE2-3 组上调了 7~8 倍)。因此可以推测,EE2 处理后 *P450c17-I* 基因表达的上调,尤其是 *cyp19a1a* 基因表达的急剧上调必然会导致斑马鱼雌性内源雌激素水平的大幅上升。已有研究表明,EE2 处理后斑马鱼卵巢早期卵母细胞同步化,但后期卵母细胞发育明显抑制<sup>[11]</sup>;而雌激素不仅对早期卵母细胞发育起重要作用,还能抑制后期卵母细胞的发育和成熟<sup>[22]</sup>。总之,本研究推测,EE2 可能通过上调雌激素合成酶 *P450c17-I* 和 *cyp19a1a* 基因的表达,升高内源雌激素水平,导致斑马鱼雌性成鱼早期卵母细胞同步化和后期卵母细胞发育受阻,而与 *P450c17-II* 基因的表达无关。

## 参考文献:

- [1] Ropero A B, Alonso-Magdalena P, Ripoll C, et al. Rapid endocrine disruption: environmental estrogen actions triggered outside the nucleus[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 102(1): 163-169.
- [2] Jiang W, Yan Y, Ma M, et al. Assessment of source water contamination by estrogenic disrupting compounds in China [J]. Journal of Environmental Sciences, 2012, 24(2): 320-328.
- [3] Giesy J P, Kannan K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife[J]. Environmental Science & Technology, 2001, 35(7): 1339-1342.
- [4] 尹德玉, 汝少国, 田华. 环境内分泌干扰物对鱼类性别决定的影响研究进展[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(4): 467-474. Yin D Y, Ru S G, Tian H. Advances in effects of endocrine disrupting chemicals on sex determination of fish[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(4): 467-474.
- [5] 朱敏. DES 和 EE2 对黄颡鱼性腺发育和配子发生的影响 [D]. 重庆: 重庆师范大学, 2013. Zhu M. The influence of DES and EE2 on the gonadal development and gametogenesis of yellow catfish[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2013.
- [6] 沈万赞, 周忠良, 李祥军. 双酚 A 和壬基酚长期暴露对斑马鱼繁殖的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(B09): 59-64. Shen W Y, Zhou Z L, Li X J. Effects of long term exposure to bisphenol A and nonylphenol on the reproduction of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(B09): 59-64.
- [7] 孟顺龙, 宋超, 范立民, 等. 水体中环境内分泌干扰物 (EDCs) 污染现状及其对鱼类的生殖危害[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(1): 202-208. Meng S L, Song C, Fan L M, et al. Source water pollution by environmental endocrine disruptors (EDCs) and the serious impact on fish reproductive [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2013, 29(1): 202-208.
- [8] Thorpe K L, Cummings R I, Hutchinson T H, et al. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(6): 1142-1149.

- [9] Rose E, Paczolt K A, Jones A G. The effects of synthetic estrogen exposure on pre mating and post mating episodes of selection in sex-role-reversed Gulf pipefish[J]. *Evolutionary Applications*, 2013, 6(8): 1160-1170.
- [10] Lee P Y, Lin C Y, Chen T H. Environmentally relevant exposure of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol impairs spawning and reproductive behavior in the brackish medaka *Oryzias melastigma*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 85(2): 338-343.
- [11] 郭学鸣, 李英文, 尹盼, 等. EE2 抑制斑马鱼卵巢发育和卵母细胞发生[J]. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 2015, 32(3): 30-34.
- Guo X M, Li Y W, Yin P, et al. The inhibition of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development and oogenesis[J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science*, 2015, 32(3): 30-34.
- [12] Vélez L M, Heber M F, Ferreira S R, et al. Effect of hyperandrogenism on ovarian function [J]. *Reproduction*, 2015, 149(6): 15-41.
- [13] Zhou L Y, Wang D S, Kobayashi T, et al. A novel type of *P450c17* lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(9): 4282-4291.
- [14] Zhou L Y, Wang D S, Shibata Y, et al. Characterization, expression and transcriptional regulation of *P450c17-I* and *-II* in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362(3): 619-625.
- [15] Li J, Liu Z, Wang D, et al. Insulin-like growth factor 3 is involved in oocyte maturation in zebrafish[J]. *Biology of reproduction*, 2011, 84(3): 476-486.
- [16] Reinecke M. Insulin-like growth factors and fish reproduction[J]. *Biology of reproduction*, 2010, 82(4): 656-661.
- [17] Kime D E. *Endocrine disruption in fish*[M]. Germany: Springer, 1998.
- [18] Tokumoto T, Tokumoto M, Thomas P. Interactions of diethylstilbestrol (DES) and DES analogs with membrane progesterin receptor- $\alpha$  and the correlation with their non-genomic progesterin activities[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(7): 3459-3467.
- [19] Paul-Prasanth B, Shibata Y, Horiguchi R, et al. Exposure to diethylstilbestrol during embryonic and larval stages of medaka fish (*Oryzias latipes*) leads to sex reversal in genetic males and reduced gonad weight in genetic females [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(2): 707-717.
- [20] Xu H, Yang J, Wang Y, et al. Exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88(1): 1-8.
- [21] Yong G, Kagawa H, Nagahama Y. Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cell of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation[J]. *Biol Reprod*, 1983, 29(2): 310-315.
- [22] Pang Y, Thomas P. Role of G protein-coupled estrogen receptor 1, GPER, in inhibition of oocyte maturation by endogenous estrogens in zebrafish[J]. *Dev Biol*, 2010, 342(2): 194-206.

## Animal Sciences

### Inhibitory Effect of EE2 on the Expression of Genes Encoding Steroidogenic Enzymes Responsible for Estrogen Production in Zebrafish Female

LIU Hongyu, CAI Jing, RAO Jianjun, LIU Zhihao

(School of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** In order to elucidate the possible mechanisms of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) induced oogenesis dysplasia in zebrafish, tissue expression patterns and expressions during folliculogenesis of *P450c17-I*, *P450c17-II* and *cyp19a1a* genes, which were closely related to estrogen and progesterone production in zebrafish were analyzed. Meanwhile, the expressions of these genes in response to EE2 were also examined by quantitative RT-PCR. Results revealed that the expressions of both *P450c17-I* and *P450c17-II* were mainly expressed in gonads, with differential expression pattern during folliculogenesis. After EE2 exposures, the expressions of *P450c17-I* and *cyp19a1a* were significantly up-regulated in all the treated groups ( $p < 0.05$ ). Instead, the expression of *P450c17-II* remained unchanged. Therefore, we strongly suggested that the inhibition of EE2 on oogenesis of female zebrafish possibly through the up-regulation of endogenous estrogen level.

**Key words:** 17 $\alpha$ -ethynylestradiol; *Danio rerio*; endogenous hormone; gene expressions

(责任编辑 方 兴)