

潘帆, 孙振南, 李文雅, 等. 香鱼 *Foxl2* 基因克隆及甲基睾酮对其表达的影响 [J]. 江苏农业学报, 2025, 41(8): 1583-1591.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.08.015

香鱼 *Foxl2* 基因克隆及甲基睾酮对其表达的影响

潘帆^{1,2}, 孙振南^{1,2}, 李文雅^{1,2}, 王宏艳^{1,2}, 邵鑫斌³, 马建忠³, 李明云^{1,2}, 苗亮^{1,2}
(1. 宁波大学农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学水产生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315832; 3. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325005)

摘要: 为探究香鱼性腺发育及生殖机能调控机制, 本研究拟克隆香鱼 *Foxl2* (Forkhead transcription factor gene 2) 基因, 检测成鱼不同组织中 *Foxl2* 的表达情况, 分析腹腔注射不同质量浓度 (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 甲基睾酮 (MT) 对香鱼脑和性腺中 *Foxl2* 基因表达水平的影响。结果表明: 香鱼 *Foxl2* 基因开放阅读框 (ORF) 碱基序列长度为 918 bp, 编码蛋白质由 305 个氨基酸组成, 含典型的叉头 (Forkhead) 结构域; 多重序列比对结果显示, 各种脊椎动物间 *Foxl2* 蛋白保守性较高, 特别是 Forkhead 结构域高度保守; 系统进化树中香鱼 *Foxl2* 蛋白与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) *Foxl2* 蛋白、大西洋鲑 (*Salmo salar*) *Foxl2* 蛋白优先聚为 1 支, 说明它们进化关系较近。*Foxl2* 基因在香鱼卵巢中高表达, 雌鱼与雄鱼的脑和鳃中较低表达, 精巢及其他组织中无表达。腹腔注射甲基睾酮后 1 d, 不同质量浓度处理雌鱼卵巢中 *Foxl2* 基因相对表达量显著上调, 但脑中 *Foxl2* 基因相对表达量无显著变化, 且卵巢中 *Foxl2* 基因相对表达量增加幅度与 MT 质量浓度呈负相关, 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 质量浓度处理雄鱼脑中 *Foxl2* 基因相对表达量显著升高, 精巢中 *Foxl2* 基因始终无表达。上述结果说明, *Foxl2* 在香鱼性腺中呈性别二态性表达, 外源性激素显著影响香鱼卵巢中 *Foxl2* 基因相对表达量。本研究结果为探究 *Foxl2* 基因功能及香鱼性别调控机制提供了基础。

关键词: 香鱼; *Foxl2*; 甲基睾酮; 基因表达

中图分类号: Q958.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)08-1583-09

Cloning of *Foxl2* gene and the influence of methyltestosterone on its expression in sweetfish *Plecoglossus altivelis*

PAN Fan^{1,2}, SUN Zhennan^{1,2}, LI Wenya^{1,2}, WANG Hongyan^{1,2}, SHAO Xinbin³, MA Jianzhong³, LI Mingyun^{1,2}, MIAO Liang^{1,2}

(1. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Key Laboratory of Aquacultural Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315832, China; 3. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325005, China)

Abstract: In order to explore the regulation mechanism of gonadal development and reproductive function in *Plecoglossus altivelis*, the *Foxl2* (Forkhead transcription factor gene 2) gene of *Plecoglossus altivelis* was to be cloned in this study, and the expression of *Foxl2* gene in different tissues of adult fish was targeted for detecting. The effects of intraperitoneal injection of different mass concentrations (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) of methyltestosterone (MT) on the expression level of *Foxl2* gene in brain and gonad of *Plecoglossus altivelis* were to be analyzed. The results showed that the open reading frame (ORF) of *Foxl2* gene was 918 bp in length, and the protein encoded was composed of 305 amino acids and contained a typical Forkhead domain. Multiple sequence alignment showed that *Foxl2* proteins were highly conserved among various vertebrates,

收稿日期: 2025-01-17

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目 (LGN20C190009); 中央引导地方科技发展资金项目 (2023ZY1056)

作者简介: 潘帆 (2000-), 女, 安徽池州人, 硕士研究生, 主要研究方向为水产养殖。(E-mail) 1564105203@qq.com

通讯作者: 苗亮, (E-mail) miaoliang@nbu.edu.cn

the Forkhead domain was exceptionally highly conserved. In the phylogenetic tree, *Plecoglossus altivelis* Foxl2 protein was preferentially clustered with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Foxl2 protein and Atlantic salmon (*Salmo salar*) Foxl2 proteins, indicating that they had close evolutionary relationships. *Foxl2* gene was highly expressed in the ovary of *Plecoglossus altivelis*, and was lowly expressed in the brain and gill of female and male fish, but was not expressed in testis or other tissues. One day after intraperitoneal injection of methyltestosterone, the relative expression of *Foxl2* gene in ovary of female fish treated with different mass concentrations was significantly up-regulated, but there was no significant change in the relative expression of *Foxl2* gene in brain. The increase of relative expression of *Foxl2* gene in ovary was negatively correlated with MT mass concentration. The relative expression of *Foxl2* gene in brain of male fish treated with 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was significantly increased, while *Foxl2* gene in testis was always not expressed. The above results indicate that *Foxl2* gene is expressed in sexual dimorphism in the gonads of *Plecoglossus altivelis*, and exogenous hormones significantly affect the relative expression of *Foxl2* gene in the ovary of *Plecoglossus altivelis*. The results of this study provide a basis for exploring the function of *Foxl2* gene and the sex regulation mechanism of *Plecoglossus altivelis*.

Key words: *Plecoglossus altivelis*; *Foxl2*; methyltestosterone; gene expression

香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 是鲑形目 (Salmoniformes)、鲑亚目 (Salmonoidei)、香鱼科 (Plecoglossidae)、香鱼属 (*Plecoglossus*) 的一种小型名贵经济鱼类。自 20 世纪 80–90 年代香鱼人工育苗技术和养殖技术逐步成熟后, 香鱼养殖产业的规模在中国浙江、福建等地呈增加趋势。香鱼为一年生鱼类, 秋季繁殖后陆续死亡, 虽然可以通过水温、光照等措施延缓其性成熟, 但其销售期仍无法覆盖全年^[1]。养殖上雌性香鱼更具优势, 而雄性香鱼生长速度慢而且进入繁殖期后鱼体消瘦、体色变暗, 导致商品价值下降^[2]。鱼类的性别决定因素多种多样, 性别分化调控机制复杂^[3–4], 香鱼的性别调控研究对于繁育全雌群体以提高养殖效益具有重要参考价值。目前在香鱼性腺发育、性别分化方面已有一些研究。Sasaki 等^[5]的研究结果表明, 利用 17- β 雌二醇处理香鱼幼鱼可以显著提高雌鱼比例; Watanabe 等^[6]和闫松松等^[7]分别对日本和中国香鱼群体的遗传多样性进行了分析, 发现了与性别连锁的扩增片段长度多态性 (AFLP) 标记。香鱼 *Dmrt1* 基因^[8]、*Cyp19* 基因^[9] 在卵巢分化和功能维持中发挥作用。注射甲基睾酮可引起雌、雄香鱼血清睾酮含量上升和雌二醇含量下降^[10]。随着高通量测序技术的出现, 香鱼性别形成的分子机制得到进一步研究。Li 等^[11]从雄性香鱼性别特异性 DNA 区域发现 *amhr2* 基因的一个拷贝 (*amhr2bY*) 与香鱼性别有关, 而 Nakamoto 等^[12]发现该基因功能缺失可导致雄性性腺发育为卵巢。

叉头框 (Forkhead box) 转录因子家族在动物雌性性腺分化及生殖细胞增殖中有重要作用^[13], 该家族蛋白质的代表性特征是具有一个高度保守的叉头

框结构域 (Forkhead domain)。叉头转录因子 2 (Forkhead transcription factor 2, Foxl2) 是叉头框 (FOX) 转录因子家族成员, 参与 *Cyp19* 等性别调控基因表达及生殖系统发育, 在性别分化、性腺发育及卵巢功能稳态维持中发挥关键作用^[13–14]。人、小鼠等哺乳动物 *Foxl2* 的表达起始于性别分化决定前的原始生殖细胞, 并贯穿于卵巢发育的整个过程^[15–16], *Foxl2* 突变可导致人和小鼠卵巢功能紊乱、早衰^[17–18]。目前研究者已对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[19]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[20]、乌鳢 (*Channa argus*)^[21]、白斑狗鱼 (*Esox lucius*)^[22]、泰国斗鱼 (*Bettas splendens*)^[23]、斑鳢 (*Channa maculata*)^[24]、三角鲂 (*Megalobrama terminalis*)^[25] 等鱼类 *Foxl2* 基因的特征及功能进行了研究, 并证实该基因参与性别分化和性腺发育。雌性个体缺失 *Foxl2* 后卵原细胞退化, *cyp19a1a* 基因表达水平降低, 血清雌激素含量下降, 性腺出现雄性化甚至完全性逆转^[26]。

针对香鱼 *Foxl2* 基因特征与功能研究较缺乏的现状, 本研究克隆了香鱼 *Foxl2* 基因 cDNA 序列并分析其特征, 检测其在雌性香鱼和雄性香鱼各组织中的表达水平, 并分析注射外源雄性激素甲基睾酮 (Methyltestosterone, MT) 对香鱼性腺和脑组织中 *Foxl2* 基因表达模式的影响, 以期对香鱼 *Foxl2* 基因的功能研究及性别调控提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及样品采集

本研究用香鱼购自浙江省宁波市宁海县西店毛天岗水产养殖场。外源雄性激素甲基睾酮 (MT) 购

自上海麦克林生化科技公司。试验前利用无水乙醇配制得到 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 3 个质量浓度的 MT 溶液。

选取 7 月龄、平均体重约 84.5 g 的雌性香鱼与雄性香鱼各 90 尾进行试验。随机选取雌鱼、雄鱼各 5 尾,用丁香酚麻醉后进行冰上解剖,得到雌鱼和雄鱼皮肤、心脏、肝、脾、肾、胃、肠、肌肉、鳃、脑、卵巢(雌鱼)、精巢(雄鱼)等组织样本,用于进一步的 *Foxl2* 基因表达水平检测。选取雌鱼和雄鱼各 60 尾进行不同质量浓度的 MT 腹腔注射试验。试验设 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 3 个 MT 质量浓度处理,每处理分别注射雌鱼和雄鱼各 20 尾,注射剂量为每尾 50 μL 。注射后的鱼放入容积约 400 L 的圆桶中养殖。在注射前(0 d)和注射后 1 d、3 d、5 d 进行取样,每次每组随机取雌鱼与雄鱼各 5 尾,用丁香酚麻醉后进行冰上解剖,得到香鱼性腺和脑组织样本,用于 *Foxl2* 基因表达水平检测。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

参照 Wang 等^[8]的方法提取香鱼皮肤、心脏、肝、脾、肾、胃、肠、肌肉、鳃、脑、卵巢(雌鱼)、精巢(雄鱼)等组织总 RNA,并反转录合成 cDNA。

1.3 *Foxl2* 基因克隆

从本单位建立的香鱼性腺转录组测序数据库中检索 *Foxl2* 序列并设计扩增引物,各引物名称、序列及用途见表 1。

用 3'-Full RACE Core Set with PrimeScriptTM RTase 试剂盒(日本 TaKaRa 公司产品)进行 3'-RACE(cDNA 末端快速扩增技术)反应。步骤如下:将卵巢总 RNA 反转录合成 cDNA 并与 3'RACE 接头(Adaptor)连接,用引物 3'-*Pa-foxl2*-Outer 和 3'RACE 外侧引物进行第 1 轮扩增,用引物 3'-*Pa-foxl2*-Inner 和 3'RACE 内侧引物进行第 2 轮扩增。其中 3'RACE 外侧引物和 3'RACE 内侧引物为试剂盒自带。PCR 反应体系构建及程序运行参数均参照试剂盒操作说明书。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的条带,连入 pET-28a 载体、转化入大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态菌株,筛选阳性克隆并测序,经序列拼接后获得香鱼 *Foxl2* 基因 cDNA 序列。DNA 引物合成及高通量测序由上海甬川生物科技有限公司完成。

1.4 序列分析及系统进化树构建

用 get ORF 工具(<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/getorf>)对所获香鱼的 *Foxl2* 基因

cDNA 序列预测开放阅读框(ORF)及其编码的氨基酸编码序列。用 BLAST 在线工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)检索 GenBank 数据库中 *Foxl2* 基因的同源序列,用 Clustalx 2.1 软件进行 *Foxl2* 蛋白氨基酸多重序列比对;设置自展值(*Bootstrap*)为 1 000,利用 MAGE 5.1 软件和邻接法(*Neighbour-joining*)构建系统进化树。

表 1 引物序列及用途

Table 1 Primer sequences and usage

引物名称	序列(5'→3')	引物用途
v- <i>Pa-foxl2</i> F	GTTCGACCTAGTGAGGAAGT	序列验证
v- <i>Pa-foxl2</i> R	CTGGCACTGCTGCTGTTATTGA	
3'- <i>Pa-foxl2</i> -Inner	ATTTACTTATTAGGCTTTGAGGCC	3'-RACE 内侧引物
3'- <i>Pa-foxl2</i> -Outer	AGAATGTGAAGTACGCGGT	3'-RACE 外侧引物
q- <i>Pa-foxl2</i> F	TGAGTCCCCTCAATGTGAAAG	表达检测
q- <i>Pa-foxl2</i> R	AGTGTTCCTCTCATGGTCC	
q- <i>Pa-β-Actin</i> F	TCGTGCGTGACATCAAGGAG	表达检测内参
q- <i>Pa-β-Actin</i> R	CGCACTTCATGATGCTGTTG	

RACE;cDNA 末端快速扩增。

1.5 *Foxl2* 基因的组织差异表达及 MT 处理后表达变化检测

参照杜静雅等^[27]的方法,以 β -actin 为内参基因,通过 RT-PCR 检测香鱼皮肤、心脏、肝、脾、肾、胃、肠、肌肉、鳃、脑、卵巢(雌鱼)、精巢(雄鱼)等组织中 *Foxl2* 基因表达情况。

以 β -actin 为内参基因,利用 SYBR[®] Premix *Ex Taq*TM 试剂盒(日本 TaKaRa 公司产品),进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR),检测注射 MT 后香鱼性腺和脑中 *Foxl2* 基因表达水平的变化。20 μL PCR 反应体系:SYBR[®] Premix *Ex Taq* 10 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ q-*Pa-foxl2* 正向引物和反向引物各 1 μL ,cDNA 模板 1 μL ,ddH₂O 7 μL 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[28]计算目的基因的相对表达量。各处理设 3 个重复。利用 SPSS 21.0 软件进行处理间差异显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 香鱼 *Foxl2* 基因序列特征

香鱼 *Foxl2* 基因 cDNA 碱基序列长度为 2 119 bp,包括 288 bp 的 5'端非编码区、918 bp 的开放阅读框(ORF)和 913 bp 的 3'端非编码区,预测该基

因编码的蛋白质含有 305 个氨基酸,并具有 111 个氨基酸组成的 Forkhead 结构域(图 1)。

1	GTTGGACCTAGTGAGGAAGTAAACCACAACCTGTGTTGCGCTCCATCAGAATCCAGTTTTAAAGTCTATTCTACGAGGAGACTGCCCGA	90
91	TGCCACTAAGCACCAGCTGAAACACAAAACAAGATTTCTCTGTGCGTAAGACGAGGCTCATTTTTCAATCTCATCTTGGGTTGCATCTCGAGTTGCTA	189
190	CTTCGGGAATACTTTTAACTGTTGATTCTGTGCCACAAGTGCACCTTATTCTCTATTTTCAGTAATGTACTGGATTAGTTTTGTTTTGTTGCGCA	288
289	ATGATGACAACCTACCAAAACCCGGAGGATGACGCAATGGCCTTGATGGTCCACGACCAACACTGCCAAAGATAAAGAACGACCCAAAGACGAGCCC	387
1	M M T T Y Q N P E D D A M A L M V H D T N T A K D K E R P K D E P	33
388	GTCTGGACAAGAGTTCGGAGAAAACGGACCCGCTCTCAGAAACCTCATATTCTATGTGCTCTCATAGCCATGGCCATTTCGAGAGAGCTCCGAAAAG	486
34	V L D K S S E K T D P S Q <u>K P P Y S Y V A L I A M A I R E S S E K</u>	66
487	CGCCTACTCTGTCGGTATTATCAGTACATATTAGCAAATCCCGTTCTACGAGAAAAATAAGAAAGGCTGGCAAAACAGTATTCGACACAACCTA	585
67	R L T L S G I Y Q Y I I S K F P F Y E K N K K G W Q N S I R H N L	99
586	AGTCTCAATGAATGCTCATCAAGGTGCCCGGGAGGGCGGCTGAGAGAAAAGGAAATTAAGTGGACCTCGATCCGGCGTTCGAGGACATGTTCCGAG	684
100	S L N E C F I K V P R E G G G E R K G N Y W T L D P A C E D M F E	132
685	AAGGGAACTACCGTAGGAGACGAGAATGAAGCGGCCCTTCAGACCTCCACCAACCCACTTCCAGCCAGGAAAATCACTCTTCGGTGGGGACGATAAC	783
133	<u>K G N Y R R R R R M K R P F R P P P T H F Q P G K S L F G G D G Y</u>	165
784	GGCTACCTGTCTCCACCAAGTACCTGCAGTCCAGCTTATGAATAACTCTTGGTCTCTTGGCAACCGCTACACCGATGCTCTATACCTCTGCCAG	882
166	G Y L S P P K Y L Q S S F M N N S W S L G Q P P T P M S Y T S C Q	198
883	ATGGCTGGTGGCAACGTGAGTCCCGTCAATGTGAAAGGACTGTCAGCTCCCTCTCTATAACCCGTACTCCGAGTGCAGAGCATGGCTCTCCCACT	981
199	M A G G N V S P V N V K G L S A P S S Y N P Y S R V Q S M A L P S	231
982	ATGGTGAACCTTACAACGGCATGAGCCATCACCACCACCCGACCCTCACCATCTCAGCAGCTGAGCCCCGCACTGCGGCACCTCCCCAGTCTCC	1080
232	M V N S Y N G M S H H H P H P H P Q Q L S P A T A A P P P V S	264
1081	TCAAGCAATGGAGCGGCCTTCAGTTTGCCTGCTCCCGCCAGCCTGCCGAACCTTCCATGATGCTGTTGCTGACTGGGACCATGAGAGCAAACACTCG	1179
265	S S N G A G L Q F A C S R Q P A E L S M M H C S Y W D H E S K H S	297
1180	GCATTACACAAGGATGATATTAGTTTACGAGGATGCTACTGTAAAATGGACTCTTAAAGAGAGTCTACTCTCTGTTTTCAAACAAGAACCAA	1278
298	A L H T R I D I *	305
1288	AGTATTTTTGAAGTGACAATATTCTGACGGGCTCTTTATATCCAGCTAATGTCTTGAAGGCAATATGGAGAAATGTAAGCATGGATGTTGAGATTATT	1377
1378	TTTTTAAGTGGAAAATGGAAGTAAGGGGCCATCGAGGACGATGAGGTAGCAGAACCTTCCGGGGCATTGACGACCAATGTTTGAGAGAAATCCG	1476
1477	TGTTTTTGTGGTTTTCAATATTTGTAAGGAAATGAAAGAAATATAAAACATTTTCGAGGTCCCAAGGAATAAGCGAGTTAATTAAT	1575
1576	TCAAGGGTGGTGTGATCATTATGCGTAATGACATCTCAAGTTTATAGAGCATACTATTACTGTTGCCACATTCAACAAAACACACACACACCCTA	1674
1675	AATTGCAATGGCTTTCATAACATTACTTAAGAGAGTGATAATTGAACTAGGACGTAATTAGGACATAGAATGTGAAGTGAAGCGGTTTCAGGTGAATTGT	1773
1774	TGATTCTTCCCATGTTTTCCAAAGTGACAAAGTCCATAGGCCATGACTTGCAGGTGGGAATAGAAAACCTTACATCATAACAAAGATATTTACTTC	1872
1873	AGGGGTCAATTTACTTATTAGGCTTGTAGGCCCTCGATAGAAAATGTTTGTGTTTCAAATAACACCAGACAGTGCAGATTAAGAAAAGAAAATTTCTTG	1971
1972	TTTATTTCTGCGTGTGTTTTATACATAACGTAATATATTTTGTCTATACATGTTGGGACCATGTTAAATAGCACTTTTTTCTGTTTTATAGTTT	2070
2071	TGTGAATTTCTT <u>AATAAA</u> CTGTAATTCTTTCAAAGTAAAAA	2119

灰色阴影为开放阅读框(ORF),*为终止密码子,双下划线为加尾信号 AATAAA,单下划线为叉头(Forkhead)结构域。

图 1 香鱼 *Foxl2* 基因 cDNA 序列及预测编码的氨基酸序列

Fig.1 cDNA sequence and predicted amino acid sequence of *Foxl2* gene of *Plecoglossus altivelis*

2.2 氨基酸序列比对和系统进化分析

经过 *Foxl2* 蛋白氨基酸序列的多重序列比对发现,脊椎动物各类群间 *Foxl2* 蛋白具有较高的保守性,且都含有 1 个高度保守的 Forkhead 结构域。香鱼 *Foxl2* 蛋白氨基酸序列与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 序列相似性最高,为 96.10%,与欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*)、尼罗罗非鱼、青鳉等几种鱼类的序列相似性均 >90%,与中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*)、鸡 (*Gallus gallus*)、人 (*Homo sapiens*) 的序列相似性为 75%~80% (图 2)。Foxl 蛋白系统进化树显示,所有成员聚为 3 个大簇 (*Foxl1*、*Foxl2*、*Foxl3*);在 *Foxl2* 大簇中,各种鱼类的 *Foxl2* 蛋白聚为一簇,香鱼与虹鳟、大西洋鲑进化关系较近,优先聚为 1 支 (图 3)。

2.3 *Foxl2* 基因在香鱼各组织中的表达

香鱼各组织中 *Foxl2* 基因表达水平的 RT-PCR 检测结果如图 4 所示。从图中可以看出,*Foxl2* 基因在香鱼卵巢中高表达,雌鱼和雄鱼的脑和鳃中均为较低表达;精巢以及雌鱼和雄鱼的皮肤、心、肝、脾、肾、胃、肠、肌肉等组织中均未检测到 *Foxl2* 基因表达。

2.4 外源性雄性激素对香鱼性腺中 *Foxl2* 基因表达的影响

注射 MT 后香鱼性腺、脑中 *Foxl2* 基因的相对表达量变化特征如表 2 所示。从表中可以看出,注射 MT 后 1 d, 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 质量浓度处理雌性香鱼卵巢 *Foxl2* 基因的相对表达量分别是注射前的 5.98 倍、3.32 倍和 2.42 倍,显著高于注射前,且相对表达量增加幅度与 MT 质量浓度呈负相

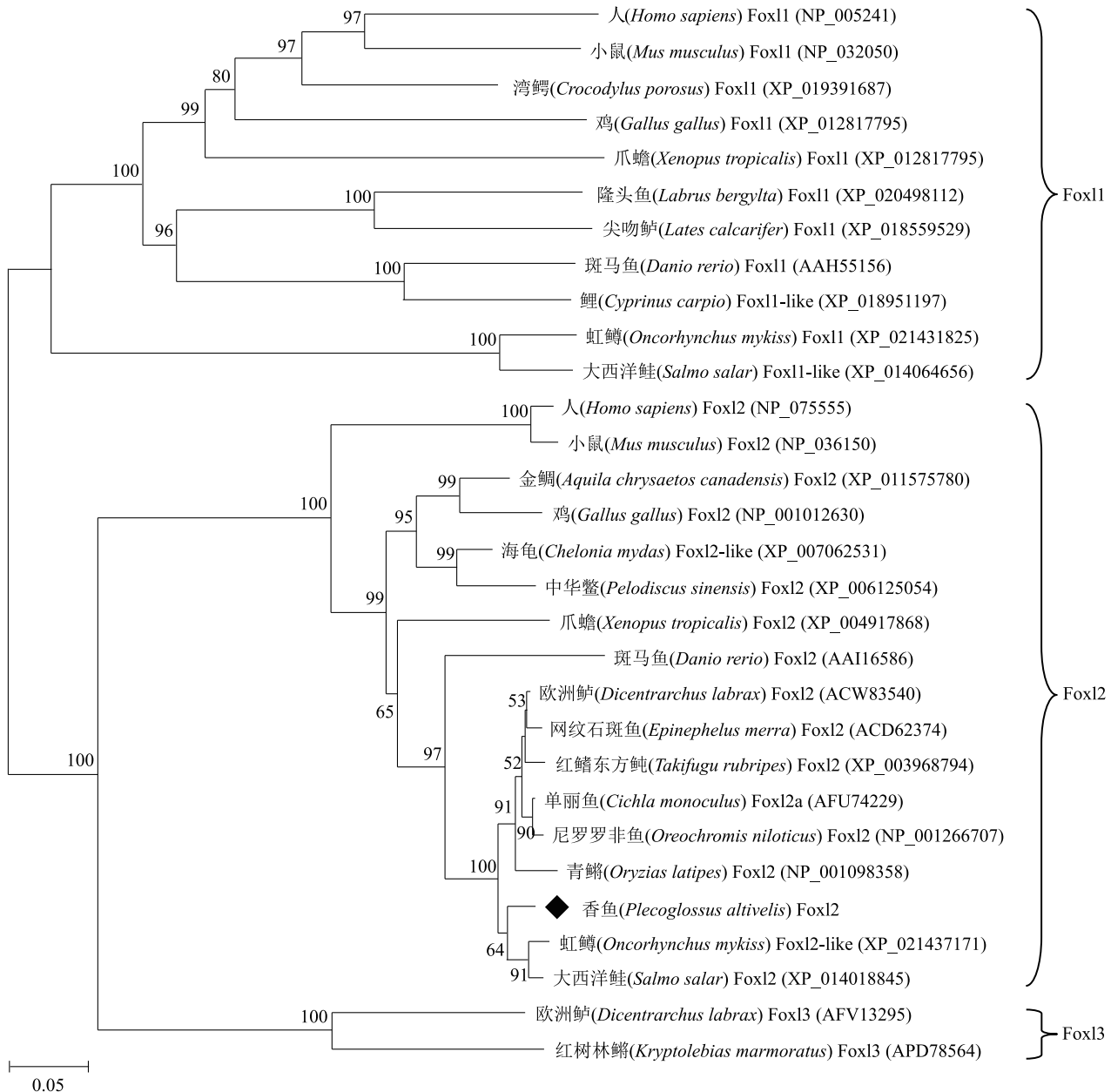


图 3 基于邻接法构建的香鱼与其他动物 Foxl2 蛋白的系统进化树

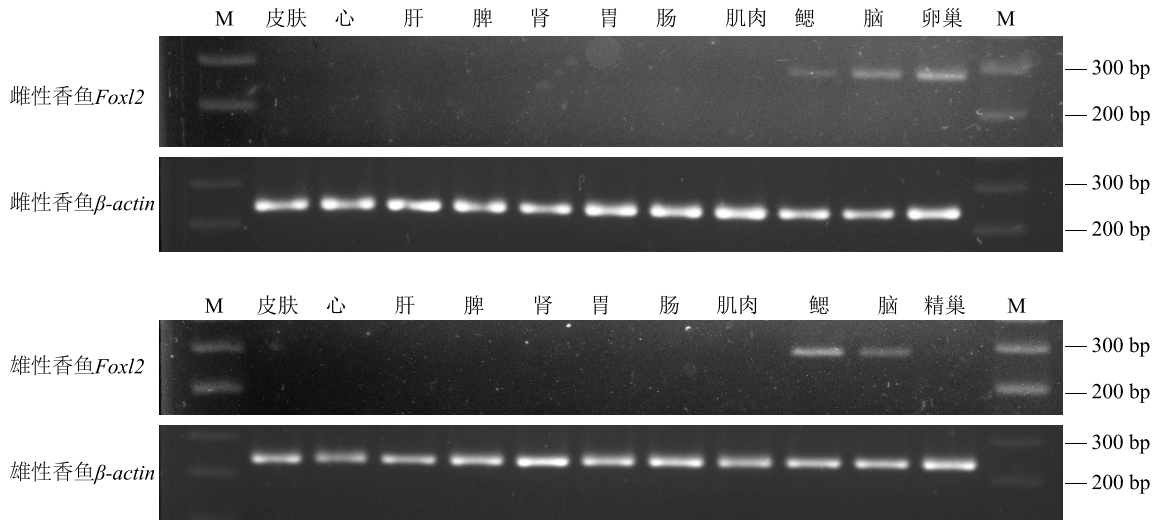
Fig.3 Phylogenetic tree of Foxl2 proteins based on neighbor-joining method in *Plecoglossus altivelis* and other animals

3 讨论

本研究获得了香鱼 *Foxl2* 基因 cDNA 碱基序列,其编码蛋白质具有 Fox 家族典型的叉头框结构域。多重序列比对结果显示,各种鱼类、爬行类、鸟类、哺乳类动物 Foxl2 蛋白叉头框结构域高度保守,该结构域对于 Foxl2 蛋白作为一种转录调控因子而进行的核内定位、特定 DNA 序列识别非常重要^[16]。构建的系统进化树中,香鱼 Foxl2 蛋白与虹鳟和大

西洋鲑优先相聚为 1 类,说明这 3 个动物之间进化关系较近,这与传统分类中胡瓜鱼目和鲑形目亲缘关系较近相一致。另外,在尼罗罗非鱼^[29]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[30]、大西洋鲑^[31]、欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[32]等鱼类中发现有 2 个 *Foxl2* 同源基因——*Foxl2a*、*Foxl2b*,一般认为这与鱼类进化中的基因组复制事件有关。但在革胡子鲶(*Clarias gariepinus*)^[33]、青鳉^[20]、南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[34]、朝鲜石斑鱼(*Sebastes schlegeli*)^[35]等鱼类

中均明确 *Foxl2* 基因是单拷贝的,香鱼基因组中是否存在 *Foxl2* 的同源基因还有待进一步研究。



M:DL1000 DNA marker。

图4 香鱼各组织中 *Foxl2* 基因的表达水平

Fig.4 The expression level of *Foxl2* gene in different tissues of *Plecoglossus altivelis*

表2 不同质量浓度甲基睾酮注射处理对香鱼 *Foxl2* 基因相对表达量的影响

Table 2 Effects of injection treatments with different methyltestosterone (MT) mass concentrations on the relative expression of *Foxl2* gene in *Plecoglossus altivelis*

MT 质量浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	注射后天数 (d)	不同组织中 <i>Foxl2</i> 基因相对表达量		
		卵巢	雌鱼脑	雄鱼脑
15	0	1.048 6bc	0.334 7a	0.334 5b
	1	6.275 5a	0.240 2a	0.766 6a
	3	0.430 8c	0.326 8a	0.435 9b
	5	1.067 4b	0.147 8a	0.621 4ab
75	0	0.914 0b	0.346 7a	0.327 8b
	1	3.037 5a	0.363 7a	0.582 9a
	3	0.443 8c	0.339 4a	0.483 1ab
	5	0.626 8bc	0.579 3a	0.451 4ab
150	0	0.900 2b	0.415 2a	0.410 6b
	1	2.182 4a	0.565 3a	0.219 2b
	3	0.505 7c	0.450 4a	0.404 5b
	5	0.444 4c	0.605 5a	0.763 4a

相同 MT 质量浓度的同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

不同鱼类 *Foxl2* 基因在性腺中的表达模式具有明显的性别差异。朝鲜石斑鱼^[35]、革胡子鲇^[33]、虹鳟^[36]、南方鲇^[34]、尼罗罗非鱼^[19]、斑鳢^[24]、泰国斗鱼^[23]、白斑狗鱼^[22]、四川裂腹鱼 (*Schizothorax kozlo-*

vi)^[37]、青鳉^[20]、三角鲂^[25]、欧洲鲈^[32] 等鱼类卵巢中 *Foxl2* 基因都是高表达,精巢中微弱表达甚至不表达,香鱼中亦是如此,且很多鱼类卵巢发育早期 *Foxl2* 基因就开始表达,产卵前和产卵期间表达量显著升高^[19,24,33,38-39],说明 *Foxl2* 基因参与卵巢分化及其功能维持。Li 等^[26] 利用转录激活因子样效应物核酸酶诱导尼罗罗非鱼 *Foxl2* 基因突变,发现基因突变后雌鱼的卵原细胞退化、性腺雄性化,甚至部分雌鱼发生性别逆转,说明 *Foxl2* 基因在卵巢发育中有重要作用。同时, *Foxl2* 基因在草胡子鲇雌鱼与雄鱼的脑垂体中都表达,且在雌鱼脑中的表达水平高于雄鱼脑,说明 *Foxl2* 参与脑垂体、性腺中性类固醇激素合成的调控^[33]。黄鳢 (*Monopterus albus*)^[39]、三斑海猪鱼 (*Halichoeres trimaculatus*)^[40] 等自发性逆转的鱼类卵巢、精巢及性逆转期的兼性性腺中 *Foxl2* 基因均表达,说明 *Foxl2* 基因在该类鱼中的功能与雌雄异体鱼类中有所差异。此外,部分鱼类除卵巢、脑外,鳃、肾、心、肝、脾等组织中 *Foxl2* 基因亦有表达^[24,33],说明不同物种 *Foxl2* 基因的组织表达模式有较大差异, *Foxl2* 基因可能还有其他一些功能。

Foxl2 基因在动物卵巢形成、发育、功能维持等方面具有重要作用,在卵泡发生、维持颗粒细胞活力以及调节下丘脑-垂体轴发育等过程中发挥重要作用^[41]。分泌性激素是卵巢的重要功能之一, *Foxl2*

基因参与性激素合成途径的调节。人类颗粒细胞中, *Foxl2* 负调控甾体激素酶的转录激活, 该酶能促进雄激素的合成^[42]。外源睾酮处理可提高光棘球海胆 (*Mseocentrotus nudus*) 和中华鳖卵巢 *Foxl2* 基因的表达水平^[43-44], 而外源雄激素处理却导致南方鲇、虹鳟卵巢 *Foxl2* 基因相对表达水平下降^[34,36], 这种差异可能与物种、卵巢发育阶段、激素处理浓度及方法等不同有关。本研究中, 香鱼注射不同质量浓度甲基睾酮后 1 d 卵巢中 *Foxl2* 基因相对表达量显著升高, 而注射后 3 d 卵巢中 *Foxl2* 基因相对表达量显著降低, 说明单次注射 MT 的效应时间有限, 若要引起性腺组织学改变可能需要使用缓释药剂或进行长时间的注射、投喂处理; 同时, 卵巢 *Foxl2* 基因相对表达量增加幅度与甲基睾酮质量浓度成反比, 说明激素作为高效能生物活性物质, 极微剂量即有明显效果, 使用时应严格控制剂量, 以防过高剂量带来的负作用。作为一种转录因子, *Foxl2* 可以调控 *Cyp19a1a*、*Sox9*、*steroidogenic factor-1 (SF-1)* 等基因的表达, 从而影响性激素合成、性腺发育过程^[36,42,45]。本研究中, 注射甲基睾酮后香鱼卵巢中 *Foxl2* 相对表达量上调, 说明外源性激素的注射会引起鱼体内源性激素代谢的变化。

4 结论

香鱼 *Foxl2* 基因 cDNA 序列含有 1 个 918 bp 的开放阅读框, 预测编码蛋白质由 305 个氨基酸构成, 含有典型的 Forkhead 结构域。多重序列比对显示各种动物的 *Foxl2* 蛋白保守性较高, 特别是 Forkhead 结构域高度保守, 构建的系统进化树中香鱼 *Foxl2* 蛋白与虹鳟、大西洋鲑优先聚为 1 类。香鱼 *Foxl2* 基因在雌性性腺中高表达, 在雌鱼与雄鱼脑、鳃中较低表达, 其他组织中不表达。腹腔注射甲基睾酮后 1 d, 不同质量浓度处理雌鱼卵巢中 *Foxl2* 基因相对表达量显著上调, 但脑中 *Foxl2* 基因相对表达量无显著变化, 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 质量浓度处理雄鱼脑中 *Foxl2* 相对表达量显著升高, 精巢中 *Foxl2* 基因始终无表达。

参考文献:

- [1] 吴海庆, 李明云, 陈炯, 等. 露天水泥池养殖香鱼高产高效技术[J]. 科学养鱼, 2009(7): 31-32.
- [2] 李明云, 徐善良, 吴洪喜. 香鱼生长特性及体型变化的研究[J]. 浙江水产学院学报, 1992, 11(1): 16-24.
- [3] SANDRA G E, NORMA M M. Sexual determination and differentiation in teleost fish[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2010, 20(1): 101-121.
- [4] 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.
- [5] SASAKI T, TAKASHIMA F, TAKAHASHI A. Sex differentiation and its manipulation in ayu[J]. Aquaculture Science, 1987, 34(4): 249-251.
- [6] WATANABE T, YAMASAKI K, SEKI S, et al. Detection of ayu sex-linked DNA markers using homologous clones[J]. Fisheries Science, 2004, 70(1): 47-52.
- [7] 闫松松, 苗亮, 李明云, 等. 香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) 养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析及性别特异性分子标记筛选[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 395-399.
- [8] WANG J H, MIAO L, LI M Y, et al. Cloning the *Dmrt1* and *DmrtA2* genes of ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mapping their expression in adult, larval, and embryonic stages[J]. Zoological Research, 2014, 35(2): 99-107.
- [9] WANG C Y, WANG J H, LI M Y, et al. The genomic structure and expression patterns of *Cyp19a1a* and *Cyp19a1b* genes in the ayu *Plecoglossus altivelis*[J]. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2014, 14: 785-793.
- [10] 侯红红. 外源雄性激素对香鱼性激素水平及性别调控相关基因表达的影响[D]. 宁波: 宁波大学, 2018.
- [11] LI S Y, XU L Q, SHI Y H, et al. Male-specific markers developed by next-generation sequencing confirmed an XX/XY sex-determination system in farmed ayu (*Plecoglossus altivelis*) [J]. Aquaculture, 2021, 541: 736822.
- [12] NAKAMOTO M, UCHINO T, KOSHIMIZU E, et al. A Y-linked anti-Müllerian hormone type-II receptor is the sex-determining gene in ayu, *Plecoglossus altivelis* [J]. PLoS Genetics, 2021, 17(8): e1009705.
- [13] CARLSSON P, MAHLAPUU M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism[J]. Developmental Biology, 2002, 250(1): 1-23.
- [14] BARON D, BATISTA F, CHAFFAUX S, et al. *Foxl2* gene and the development of the ovary: a story about goat, mouse, fish and woman[J]. Reproduction, Nutrition, Development, 2005, 45(3): 377-382.
- [15] PAILHOUS E, VIGIER B, CHAFFAUX S, et al. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats [J]. Nature Genetics, 2001, 29(4): 453-458.
- [16] COCQUET J, PAILHOUS E, JAUBERT F, et al. Evolution and expression of *FOXL2* [J]. Journal of Medical Genetics, 2002, 39(12): 916-921.
- [17] TANG S J, WANG X K, LIN L X, et al. Mutation analysis of the *FOXL2* gene in Chinese patients with blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome [J]. Mutagenesis, 2006, 21(1): 35-39.

- [18] PISARSKA M D, BAE J, KLEIN C, et al. Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(7):3424-3433.
- [19] WANG D S, KOBAYASHI T, ZHOU L Y, et al. Molecular cloning and gene expression of *Foxl2* in the Nile *Tilapia*, *Oreochromis niloticus* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 320(1):83-89.
- [20] NAKAMOTO M, MATSUDA M, WANG D S, et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344(1):353-361.
- [21] WANG D D, ZHANG G R, WEI K J, et al. Molecular identification and expression of the *Foxl2* gene during gonadal sex differentiation in northern snakehead *Channa argus* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(6):1419-1433.
- [22] 唐露, 胡琼, 赵瑞阳, 等. 白斑狗鱼 *FOXL2* 基因克隆及其表达 [J]. *贵州农业科学*, 2020, 48(5):97-101.
- [23] 任席林, 梁帅淇, 钟艳芳, 等. 泰国斗鱼 *Foxl2* 基因的分子克隆及组织表达模式 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(1):109-116.
- [24] 吴燕铎, 欧密, 高丹丹, 等. 斑鳢叉头框转录因子基因 *Foxl2* 的克隆表达及性类固醇激素刺激下的表达响应 [J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(1):49-60.
- [25] 唐红, 关文志, 许晓军, 等. 三角鲂 *Foxl2* 基因克隆和时空表达特征及 EE2 对其表达的影响 [J]. *浙江农业学报*, 2024, 36(8):1789-1799.
- [26] LI M H, YANG H H, LI M R, et al. Antagonistic roles of *Dmrt1* and *Foxl2* in sex differentiation via estrogen production in *Tilapia* as demonstrated by TALENs [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12):4814-4825.
- [27] 杜静雅, 苗亮, 李明云, 等. 香鱼 (*Plecoglossus altivelis*) *JNK1* 基因克隆及其在成熟卵过熟进程中的表达变化 [J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(4):921-929.
- [28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [29] DAI S F, QI S S, WEI X Y, et al. Germline sexual fate is determined by the antagonistic action of *dmrt1* and *foxl3/foxl2* in *Tilapia* [J]. *Development*, 2021, 148(8):dev199380.
- [30] 武宁宁, 刘翠, 汪惟超, 等. 牙鲆 *foxl3* 的分子特征、亚细胞定位及组织表达 [J]. *中国水产科学*, 2023, 30(4):406-414.
- [31] VON SCHALBURG K R, YASUIKE M, YAZAWA R, et al. Regulation and expression of sexual differentiation factors in embryonic and extragonadal tissues of Atlantic salmon [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12:31.
- [32] CRESPO B, LAN-CHOW-WING O, ROCHA A, et al. *Foxl2* and *foxl3* are two ancient paralogs that remain fully functional in teleosts [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, 194:81-93.
- [33] SRIDEVI P, SENTHILKUMARAN B. Cloning and differential expression of *FOXL2* during ovarian development and recrudescence of the catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 174(3):259-268.
- [34] LIU Z H, WU F R, JIAO B W, et al. Molecular cloning of doublesex and Mab-3-related transcription factor 1, forkhead transcription factor gene 2, and two types of cytochrome P450 aromatase in Southern catfish and their possible roles in sex differentiation [J]. *The Journal of Endocrinology*, 2007, 194(1):223-241.
- [35] MU W J, WEN H S, LI J F, et al. Cloning and expression analysis of *Foxl2* during the reproductive cycle in Korean rockfish, *Sebastes schlegelii* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(6):1419-1430.
- [36] BARON D, COCQUET J, XIA X H, et al. An evolutionary and functional analysis of *Foxl2* in rainbow trout gonad differentiation [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004, 33(3):705-715.
- [37] HE Y F, WANG X G, WU X B, et al. Expression profiles of *amh* and *foxl2* in *Schizothorax kozlovi*, and their response to temperature during the early developmental stage [J]. *Journal of Genetics*, 2018, 97(1):127-136.
- [38] FANG D, YANG X J, FENG X T, et al. *Foxl2* combined with *Cyp19a1a* regulate the spawning upstream migration in *Coilia nasus* [J]. *Gene*, 2019, 710:307-315.
- [39] HU Q, GUO W, GAO Y, et al. Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the rice-field eel *Monopterus albus* [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4:6884.
- [40] KOBAYASHI Y, HORIGUCHI R, NOZU R, et al. Expression and localization of forkhead transcriptional factor 2 (*Foxl2*) in the gonads of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus* [J]. *Biology of Sex Differences*, 2010, 1(1):3.
- [41] TUCKER E J. The genetics and biology of *FOXL2* [J]. *Sexual Development*, 2022, 16(2/3):184-193.
- [42] PARK M, SHIN E, WON M, et al. *FOXL2* interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced *CYP17* transcription in granulosa cells [J]. *Molecular Endocrinology*, 2010, 24(5):1024-1036.
- [43] 胡彪, 崔洲平, 魏金亮, 等. 外源性激素对光棘球海胆性别相关基因 *dmrt1*、*foxl2* 和 *boule* 表达的影响 [J]. *水产学杂志*, 2021, 34(4):1-6.
- [44] 高丽丽. 中华鳖 *Foxl2* 基因克隆与表达及温度和外源激素对其表达的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- [45] UHLENHAUT N H, JAKOB S, ANLAG K, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by *FOXL2* ablation [J]. *Cell*, 2009, 139(6):1130-1142.

(责任编辑:石春林)