

Doi:10.20062/j.cnki.CN 37-1453/N.2023.02.002

# 性类固醇激素在近江牡蛎性腺发育周期的分布特征

朱妍<sup>1,2</sup>,王文静<sup>2,3</sup>,夏苏东<sup>1</sup>,刘志鸿<sup>2,4</sup>,孙秀俊<sup>2,4</sup>,周丽青<sup>2,4</sup>,张秀梅<sup>5</sup>,吴彪<sup>2,4</sup>

(1.天津农学院 天津市水产生态及养殖重点实验室,天津 300384; 2.中国水产科学研究院 黄海水产研究所,山东 青岛 266071;  
3.上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心,上海 201306;  
4.青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室,山东 青岛 266273;  
5.烟台市海洋经济研究院,山东 烟台 264003)

**摘要:**性类固醇激素在脊椎动物的性别分化、生长发育、生殖代谢等过程中发挥着重要的生理作用,但是目前对软体动物性类固醇激素的了解还十分有限。本研究结合组织学方法根据性腺发育状态将近江牡蛎性腺划分为三个组别,即前期(I期)、中期(II期)和后期(III期),并利用酶联免疫吸附测定(ELISA)分析了孕酮、睾酮、雌二醇三种重要的性类固醇激素在性腺三个时期的变化特征。结果表明:性腺中孕酮、睾酮和雌二醇含量范围分别是22.2~346.6 pg·g<sup>-1</sup>、1.9~28.7 pg·g<sup>-1</sup>和23.2~258.1 pg·g<sup>-1</sup>;且平均含量雌二醇>孕酮>睾酮,分别为所测激素总含量的57%、40%和3%。近江牡蛎卵巢中孕酮含量在I期和III期显著高于精巢,精巢中睾酮含量在I期显著高于卵巢,卵巢中雌二醇含量在II期和III期显著高于精巢。三种激素含量的变化在雌雄间和不同发育阶段都具有明显差异,表明性类固醇激素在近江牡蛎性别分化以及性腺发育过程中发挥了重要作用。该研究结果丰富了性类固醇激素在双壳贝类中的研究资料,可为制定近江牡蛎苗种繁育策略提供参考。

**关键词:**近江牡蛎;性类固醇激素;性腺发育

**中图分类号:**S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-8020(2023)02-0107-08

性类固醇激素是一类与特异性雄激素或雌激素受体相互作用从而对机体性腺发育进行调节的甾体激素,其中孕酮(progesterone, P)、睾酮(testosterone, T)和雌二醇(estradiol, E<sub>2</sub>)是参与生殖调控的主要性类固醇激素<sup>[1-4]</sup>。越来越多的研究表明,性类固醇激素在生物性别分化、性腺发育以及内稳态维持等多种生理过程中发挥重要作用<sup>[5-7]</sup>。

在脊椎动物中,性类固醇激素的研究较多,水产动物中大多数集中在鱼类。性类固醇激素能够调节鱼类的生长,也可直接或间接调控鱼类的性别分化等生理过程。据报道,在条斑星鲽(*Verasper moseri*)和绿背菱鲽(*Rhombosolea tapirina*)卵巢发育过程中,雌二醇和睾酮呈现出不同程度的变化,出现峰值时正值性腺发育启动

卵黄沉积的关键时期<sup>[8-9]</sup>;文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)性腺发育过程与性类固醇激素的含量密切相关,在卵巢发育后期睾酮含量下降,随着精巢发育成熟雌二醇含量减少<sup>[1]</sup>;在施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)中性类固醇激素的分泌量直接反应其性腺发育的状况<sup>[10]</sup>。相对于脊椎动物,性类固醇激素在无脊椎动物中有关的研究相对较少,主要集中在性类固醇及其主要代谢酶、以及生殖调节方面<sup>[11-12]</sup>。有研究发现:在虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)的生长期存在性类固醇激素的性别二态分布<sup>[13]</sup>;栉孔扇贝(*Chlamys farrieri*)的雌二醇和睾酮浓度会随着性腺发育成熟而升高,产卵前达到最高,产卵后迅速下降<sup>[14]</sup>;缢蛏(*Sinonovacula constricta*)性腺中的雌二醇和睾酮含量在配子发生前略有增加,表明它们参与了缢

收稿日期:2022-10-19;修回日期:2022-12-20

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2021XT0101);山东省重点研发计划(2021LZGC028);青岛海洋科学与技术试点国家实验室山东省专项经费(2021QNLMO50103)

通信作者简介:吴彪(1982—),男,研究员,硕士研究生导师,博士,研究方向为贝类种质资源、遗传育种、苗种繁育与养殖。E-mail:wubiao@ysfri.ac.cn

蛭的配子发生周期的启动<sup>[15]</sup>。这些都说明性类固醇激素在贝类生殖调控中可能发挥着重要的作用<sup>[16-18]</sup>。

目前,性类固醇激素在长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和福建牡蛎(*C. angulata*)中有所报道,雌二醇和睾酮在雌性和雄性的性成熟期分别增加,然后在产卵后明显下降,这些报道说明,性类固醇激素可能在贝类性腺发育过程中发挥着重要的作用。但是目前还未见近江牡蛎(*C. ariakensis*)的相关报道。近江牡蛎隶属软体动物门,瓣鳃纲,珍珠贝目,牡蛎科,巨牡蛎属,是广温、广盐性的海洋双壳类,自然种群多栖息于我国南北沿海的河口区<sup>[19-20]</sup>。近江牡蛎生长速度较快、成活率高,具有较好的养殖潜力<sup>[21]</sup>。为了解性类固醇激素在近江牡蛎性腺发育过程中发挥的作用,本研究采用酶联免疫吸附(ELISA)检测了近江牡蛎性腺三个发育时期三种主要性类固醇激素含量,并分析了其在性腺发育过程中的含量及变化规律,为研究性类固醇激素在贝类性腺发育过程中的作用提供了参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用近江牡蛎采自山东省东营海域野生群体。将采集的活体运回实验室暂养 24 h 后,选取活性较好的个体取性腺组织用于切片分析和性类固醇激素测定。将性腺一部分用 Bouin 氏液固定 24 h 后,保存于 70%乙醇进行石蜡切片并统计性腺发育时期;剩余性腺用液氮冷冻后保存于 -80 ℃,用于后续性类固醇激素测定。

### 1.2 组织学分析及性腺发育时期判定

将 Bouin 氏液固定后的性腺样品从 70%乙醇中取出,参照周锋祺等<sup>[22]</sup>的方法略作修改进行石蜡切片 HE(苏木精-伊红)染色,主要步骤如下:将固定好的样品利用二甲苯进行脱蜡,梯度乙醇脱水至 75%乙醇后,苏木精染色,自来水反蓝,流水冲洗,酸水分色,梯度乙醇脱水,伊红染色,95%乙醇冲洗,100%乙醇脱水,二甲苯透明,最后使用中性感胶封片,用显微镜观察切片并拍照,判定近江牡蛎雌雄以及性腺组织的发育时期。

### 1.3 性类固醇激素的提取

根据组织切片中性腺的发育特征结果将所取样品分成性腺发育前期(I期)、中期(II期)和后期(III期)三组,并区分雌雄个体。每组取雌雄个体各 3 个,利用二氯甲烷液液萃取法提取性类固醇激素<sup>[13]</sup>。具体步骤如下:取 0.2 g 性腺组织,用超纯水匀浆 2 次,每次 2 min;再使用超声波细胞破碎仪将组织匀浆破碎后,加入 400 μL 浓度为 25 mmol · L<sup>-1</sup>的 HCl,涡旋 2 min 并于 40 ℃水浴孵育 15 min;孵育结束后,加入 1.25 mL 0.07 mol · L<sup>-1</sup>的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,再向匀浆液中加入 14 mL 二氯甲烷,涡旋 2 min 后将匀浆液于 6000 r · min<sup>-1</sup>离心 10 min,使水和有机相分离,将下层有机相转移到 50 mL 离心管中,用氮吹仪在室温下将有机相中的二氯甲烷吹干,得到固态残留物,并用 500 μL ELISA 试剂盒(Cayman, USA)中的 ELISA buffer 将其溶解。

### 1.4 性类固醇激素测定

使用 ELISA 试剂盒测定雌雄性腺组织中孕酮、睾酮和雌二醇的含量,每个样品设置两个平行,实验步骤参照说明书进行。采用 Multiskan<sup>TM</sup> FC 酶标仪(Thermo Fisher, 美国)测定吸光度(OD 值),用 Cayman 公司提供的 ELISA Double 表格计算样品中的激素浓度。类固醇含量的定义为每克性腺湿重的类固醇含量(pg · g<sup>-1</sup>)。

### 1.5 数据统计分析

不同时期性类固醇激素含量的差异显著性分析采用单因素方差分析法(one-way ANOVA);同一时期雌雄性腺中性类固醇激素的差异显著性使用独立样本 t 检验;三种激素含量之间的关系通过 Pearson 相关分析法获得。显著性水平均设定为  $P < 0.05$ ,极显著水平为  $P < 0.01$ 。

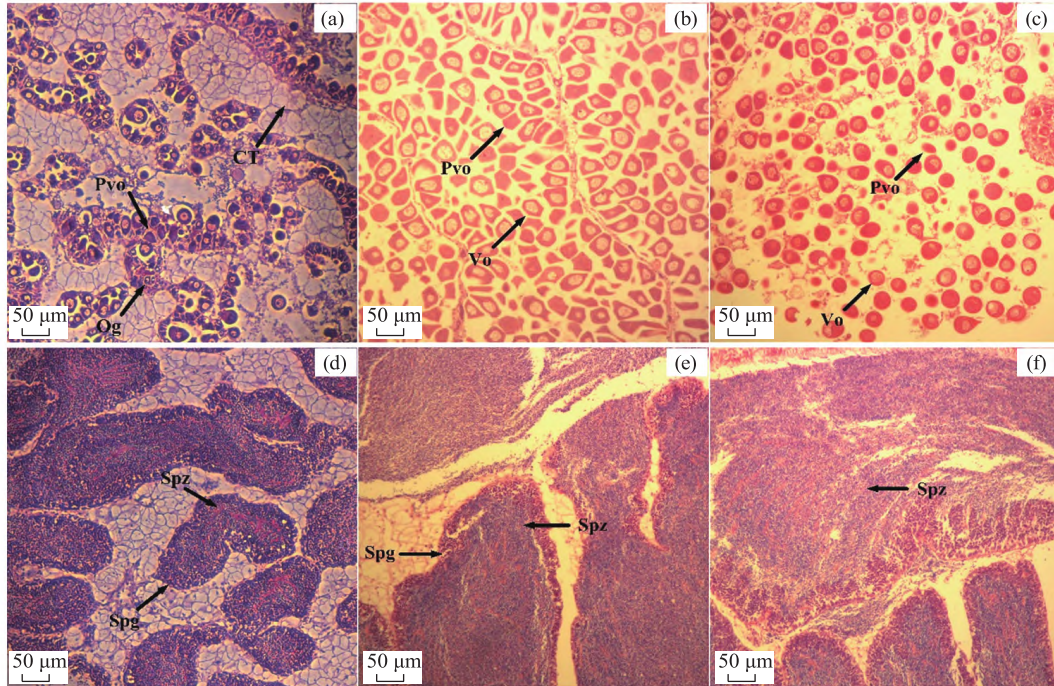
## 2 结果与分析

### 2.1 性腺发育时期的判定

根据近江牡蛎性腺发育特点,将样品划分成为三个组别,即为性腺发育前期(I期)、中期(II期)和后期(III期)。如图 1 所示, I 期为增殖期前后的性腺组织,此时性腺已经启动发育且

逐渐呈饱满状,性腺中的结缔组织逐渐减少,在雌性滤泡壁上可观察到附着着的卵母细胞和少量的成熟卵子,在雄性滤泡中观察到精细胞和部分成熟精子;Ⅱ期为成熟期前后的性腺,性腺已呈饱满状,在雌性卵巢的滤泡中充满大量游离的成熟卵子,这些卵子的形状呈现不规则的变化,滤泡壁上

还附着少量的卵母细胞,雄性精巢的滤泡中精子紧密排列;Ⅲ期是排放期前后的性腺,性腺开始萎缩,结缔组织开始增多,滤泡变小,滤泡间的距离变大,卵巢中的滤泡破碎,大量的成熟卵子排出,出现很多空腔的滤泡,精巢滤泡由于精子的排出呈现大小不一样的现象。



注:雌性:(a) I期;(b) II期;(c) III期;雄性:(d) I期;(e) II期;(f) III期。

CT:结缔组织;Og:卵原细胞;Pvo:前卵母细胞;Vo:卵母细胞;Spg:精原细胞;Spz:精子;标尺:50 μm。

图1 近江牡蛎性腺三个不同发育时期的切片

Fig.1 Sections from three different gonadal developmental stages of *C. ariakensis*

## 2.2 性类固醇激素含量分析

三种性类固醇激素含量在近江牡蛎性腺三个不同发育时期的变化如图2所示。如图2((a)~(c))所示,孕酮、睾酮、雌二醇在卵巢和精巢中的含量及其随性腺发育的变化均具有明显差异。

卵巢中孕酮含量范围是  $73.3 \sim 346.6 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,精巢中是  $22.2 \sim 60.4 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。三个时期样品中, I期和III期的孕酮含量在卵巢和精巢中极显著差异( $P < 0.01$ )。卵巢中, I期和III期之间无显著差异,而II期与III期之间存在显著差异( $P < 0.05$ );精巢中孕酮的含量在三个时期之间的差异均未达到显著水平。

睾酮在卵巢中的含量范围是  $1.9 \sim 8.0 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,精巢中为  $3.6 \sim 28.7 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。睾酮的含量在I期和II期精巢中均高于卵巢,而在III期中的含量低

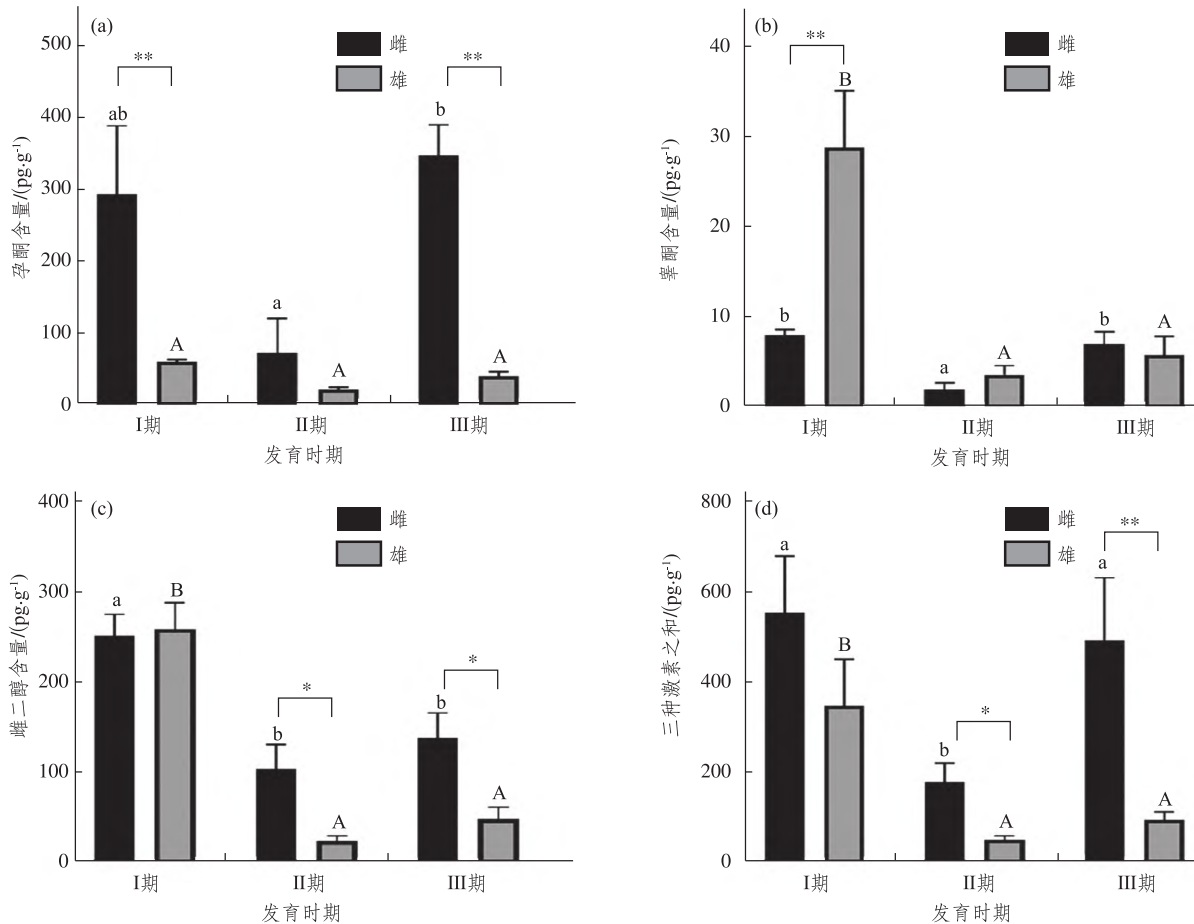
于卵巢;其中, I期的差异达到极显著水平( $P < 0.01$ ), II期和III期未达到显著水平。卵巢中I期、III期的含量显著高于II期( $P < 0.05$ );而精巢中I期极显著高于II期、III期( $P < 0.01$ )。

雌二醇在卵巢、精巢中的含量范围分别是  $103.0 \sim 251.1 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和  $23.2 \sim 258.1 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。雌二醇在II期和III期卵巢中的含量高于精巢,在I期精巢中的含量高于卵巢;其中I期没有显著差异, II期和III期有显著差异( $P < 0.05$ )。卵巢中, I期雌二醇的含量显著高于II期和III期( $P < 0.05$ );而II期和III期精巢中雌二醇的含量极显著低于I期( $P < 0.01$ )。

图2(d)是性腺不同发育时期三种激素的总含量,卵巢中三种激素总量范围是  $178.2 \sim 551.9 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,精巢中是  $49.0 \sim 347.2 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。三种激素在卵巢中的总含量都高于精巢,但在III期卵巢中三种

激素总含量极显著高于精巢( $P < 0.01$ ),在 II 期卵巢中激素含量之和显著高于精巢( $P < 0.05$ )。随着性腺发育,卵巢和精巢中的三种激素含量之和均呈现先降低再升高的趋势。卵巢中, I 期和

III 期激素含量之和显著高于 II 期( $P < 0.05$ );而 I 期精巢中激素含量之和显著高于 II 期和 III 期( $P < 0.05$ )。



注：“\*”表示精巢和卵巢之间存在显著差异( $P < 0.05$ ),“\*\*”表示精巢和卵巢之间存在极显著差异( $P < 0.01$ );图中不同小写字母代表不同时期雌性的激素含量差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母代表不同时期雄性的激素含量的差异显著( $P < 0.05$ )。

图 2 性类固醇激素在近江牡蛎性腺发育时期的含量

Fig.2 Sex steroid hormones concentrations in the gonadal development stages of *C. ariakensis*

近江牡蛎卵巢和精巢中三种激素含量的相关性分析结果如表 1 所示。在卵巢中,只有孕酮和睾酮显著相关( $P < 0.05$ ),而雌二醇和其它两种激

素的相关性未达到显著水平,而在精巢中,孕酮和睾酮显著相关( $P < 0.05$ ),雌二醇和睾酮极显著相关( $P < 0.01$ ),孕酮和雌二醇的相关性不显著。

表 1 近江牡蛎卵巢和精巢中三种性类固醇激素之间的相关性

Tab.1 Correlation between the three sex steroid hormones in the ovaries and testis of *C. ariakensis*

	孕酮/雌二醇	雌二醇/睾酮	孕酮/睾酮
卵巢	0.241	0.010	0.885 *
精巢	0.677	0.970 **	0.722 *

注：“\*”表示 Pearson 相关系数显著( $P < 0.05$ ),“\*\*”表示 Pearson 相关系数极显著( $P < 0.01$ )。

### 2.3 三种激素占比在性腺发育过程中的变化特征

为了研究三种激素之间的比例关系及其变化

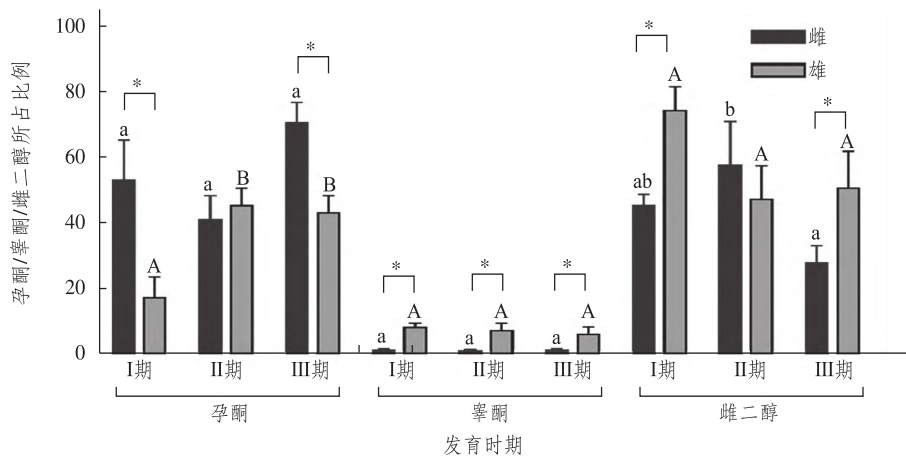
特征,图 3 展示了孕酮、睾酮和雌二醇占三种激素总含量的百分比,分别为 40%、3%和 57%。卵巢中,孕酮所占比例范围是 41.1%~70.6%,而精巢

则为17.4%~45.4%; I期和III期卵巢孕酮所占比例均高于精巢, II期则低于精巢, 其中I期和III期达到显著差异( $P<0.05$ ), II期差异不显著。随着性腺发育, 卵巢和精巢中的孕酮所占比例发生明显变化。卵巢中孕酮所占比例: III期(70.6%)> I期(53.1%)> II期(41.1%), 三组之间均无显著差异; 精巢中孕酮所占比例: II期(45.4%)> III期(43.1%)> I期(17.4%), I期与II期和III期之间均存在显著差异( $P<0.05$ ), 而II期与III期之间没有显著差异。

三种激素含量中, 睾酮占比最低。卵巢中睾酮所占比例在I期最高(1.4%), II和III期相同(1%), 三组之间均无显著差异; 与卵巢中比例不同, II期精巢中睾酮占比最高(45%), III期次之

(41%), I期最低(17%), 三组之间也无显著差异。精巢中睾酮所占比例在I期、II期和III期显著高于卵巢( $P<0.05$ )。卵巢和精巢中睾酮的比例随性腺发育变化不明显。

雌二醇在卵巢和精巢中所占比例范围分别是27.9%~57.8%和47.3%~74.4%, 且I期和III期精巢均显著高于卵巢( $P<0.05$ ), II期卵巢则高于精巢。不同发育时期, 卵巢和精巢中雌二醇占比发生明显变化。雌二醇在卵巢中所占比例为: II期(57.8%)> I期(45.5%)> III期(27.9%), II期和III期之间存在显著差异( $P<0.05$ ), I期和II期、III期差异不显著; 而精巢中: I期(74.4%)> III期(50.7%)> II期(47.3%), 三个时期之间均未达到显著差异。



注: “\*”表示精巢和卵巢之间存在显著差异( $P<0.05$ ), “\*\*”表示精巢和卵巢之间存在极显著差异( $P<0.01$ ); 图中不同小写字母代表不同时期雌性的激素所占比例的表达差异( $P<0.05$ ), 不同大写字母代表不同时期雄性的激素所占比例的表达差异( $P<0.05$ )。

图3 不同性类固醇激素占比在近江牡蛎性腺发育时期的变化

Fig.3 Variations of the percentage of three sex steroid hormones in the gonadal developmental stages of *C. ariakensis*

## 2.4 激素相对比值的变化情况

本研究进一步探究了孕酮/睾酮、雌二醇/孕酮、雌二醇/睾酮随性腺发育的变化特征。如图4(a)所示, 卵巢中, 孕酮/睾酮范围是36.7~49.6, 精巢中则是2.1~7.0, 且三组中卵巢均极显著高于精巢( $P<0.01$ )。精巢和卵巢中孕酮/睾酮都呈现出逐步上升的趋势。

卵巢中雌二醇/孕酮范围是0.4~1.4, 精巢中则是1.0~4.3; 雌二醇/孕酮在I期精巢中极显著高于卵巢( $P<0.01$ ), 在III期精巢中显著高于卵巢( $P<0.05$ )。卵巢中, II期显著高于III期( $P<0.05$ ), I期和II期、III期之间没有显著差异; 而精巢中I期分别与II期和III期之间存在极显著差

异( $P<0.01$ ) (见图4(b))。

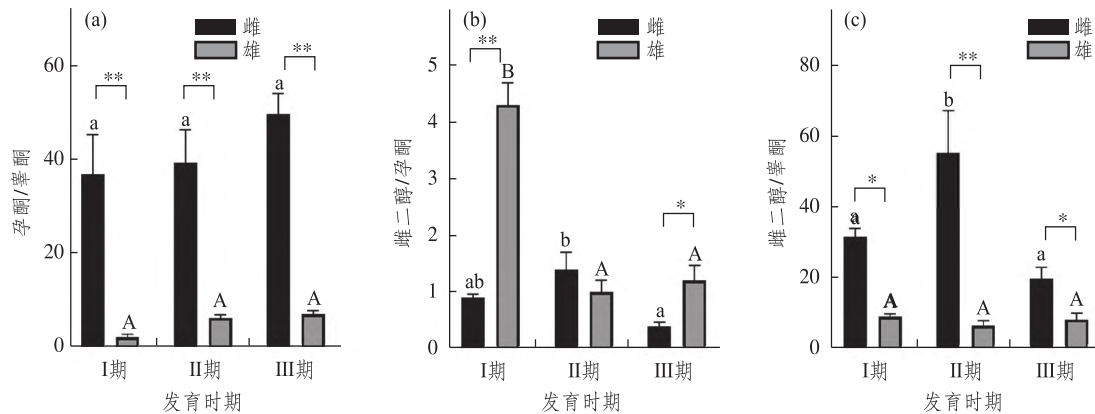
从图4(c)可以看出, 卵巢中雌二醇/睾酮范围是19.6~55.2, 精巢中是6.5~9.0。三个时期中, 雌二醇/睾酮在卵巢中均高于精巢, 其中在II期的差异极显著( $P<0.01$ ), I期和III期差异显著( $P<0.05$ )。卵巢中, II期显著高于I期和III期( $P<0.05$ ); 而精巢中三组差异均不显著。

## 3 讨论

性类固醇激素在脊椎动物的性别分化、生长发育、生殖代谢等过程中发挥着重要的生理作用, 但在软体动物中研究相对较少<sup>[23]</sup>。过去的三十年里, 在软体动物中也相继发现了许多参与类固

醇代谢过程的酶,而且在许多双壳贝类中也已报道了雌二醇、睾酮和孕酮等性类固醇激素的存在,包括虾夷扇贝、缢蛏、砂海螂(*Mya arenaria*)、福建牡蛎和长牡蛎<sup>[15-17,24-26]</sup>。在本研究中,我们使用

ELISA 试剂盒检测了近江牡蛎三个性腺发育时期雌雄个体性类固醇激素的含量并分析了性类固醇激素在性腺发育过程中的变化规律。



注:“\*”表示精巢和卵巢之间存在显著差异( $P < 0.05$ ),“\*\*”表示精巢和卵巢之间存在极显著差异( $P < 0.01$ );图中不同小写字母代表不同时期雌性的激素比值差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母代表不同时期雄性的激素比值差异显著( $P < 0.05$ )。

图4 孕酮/睾酮、雌二醇/孕酮和雌二醇/睾酮比值在近江牡蛎发育时期的水平

Fig.4 The levels of progesterone/testosterone, estradiol/progesterone and estradiol/testosterone in the gonadal developmental stages of *C. ariakensis*

在本研究中,近江牡蛎性腺中的孕酮、睾酮和雌二醇的含量变化范围分别为 22.2~346.6、1.9~28.7 和 23.2~251.8  $\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。虾夷扇贝性腺中孕酮的含量为 6.52  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ,而睾酮和雌二醇的则分别是 1.02 和 2.71  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。三种激素在沟纹蛤仔(*Scrobillaria plana*)性腺中的含量依次是 2.46、0.38 和 0.24  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ <sup>[23,27]</sup>。比较分析可以发现,三种激素的含量在虾夷扇贝、沟纹蛤仔和近江牡蛎中差异较大,这与之前报道的结论基本一致<sup>[28-29]</sup>。在近江牡蛎性腺发育的三个时期,睾酮和雌二醇在雌雄个体中的含量差别较大,雌性中孕酮和雌二醇含量高,而雄性中睾酮含量高。已有的研究表明,鱼类血液中性类固醇激素含量的高低能直接反映出其性别分化和性腺发育状况,在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)体内性类固醇激素 11-酮基睾酮和雌二醇在雄鱼血清中的含量高于雌鱼;不同发育时期的金钱鱼(*Scatophagus argus*)雌鱼血清中的雌二醇的含量均高于雄鱼,而雌鱼血清中睾酮的含量均低于雄鱼。类似的现象也出现在缢蛏和福建牡蛎等软体动物中<sup>[27]</sup>,缢蛏的相关研究发现,卵巢中雌二醇的含量高于精巢,而精巢中睾酮的含量高于卵巢,并且雌二醇和睾酮在性腺成熟过程中含量会升高,但在产卵后显著下降,表明雌二醇和睾酮激素参与了缢蛏的

性腺发育和繁殖活动<sup>[24]</sup>;同样,福建牡蛎卵巢中雌二醇的含量显著高于精巢,而精巢中睾酮的含量显著高于卵巢<sup>[15]</sup>。这些研究表明,雌二醇和孕酮在雌性中的含量较高,而睾酮在雄性中的含量较高,推测性类固醇激素也可能参与了近江牡蛎的性别分化以及性腺发育。

在本研究中,I期和III期精巢和卵巢中孕酮含量较高,而在II期孕酮含量相对较低。出现这种变化趋势的原因有可能是,I期是性腺开始发育的阶段,III期是性腺下一个发育周期开始之前的阶段,孕酮在类固醇合成中作为雄激素和雌激素的前体物质,需要较高含量来转化为其他两种激素<sup>[29-30]</sup>。在I期,雌二醇和睾酮含量均处于高水平,II期后显著下降,III期后开始恢复到较高水平,提示雌二醇和睾酮可能参与了性腺发育过程的调节。性类固醇激素的变化与近江牡蛎的生殖周期相关,这表明性类固醇激素在其生殖调节中发挥着重要作用。

综上,本研究测定了近江牡蛎性腺不同发育时期性类固醇激素的浓度,并分析了其在性腺发育过程中的变化规律,研究结果为深入认识性类固醇激素在近江牡蛎繁育过程中的作用提供了参考资料,对科学制定近江牡蛎的苗种繁育策略具有重要作用。

## 参考文献:

- [1] 方永强,翁幼竹,胡晓霞,等.性类固醇激素及其受体在文昌鱼性腺和神经系统中的分布[J].动物学报,2001(4):398-403.
- [2] 罗明坤,赵金良,李传阳,等.尼罗罗非鱼卵巢发育过程中性类固醇激素与卵黄蛋白原含量变化及 Vtg mRNA 表达特征[J].中国水产科学,2015,22(6):1123-1132.
- [3] 谢庆平.SF-1 是尼罗罗非鱼性类固醇激素生成、性腺发育以及性别分化所必需的关键因子[D].重庆:西南大学,2016.
- [4] 王腾飞,张鼎元,郭春阳,等.养殖银鲳性腺发育规律和性类固醇激素变化[J].水产学报,2017,41(2):198-211.
- [5] 何飞翔.金钱鱼雌雄性腺转录组分析及性类固醇激素水平的研究[D].湛江:广东海洋大学,2019.
- [6] GUIGUEN Y, FOSTIER A, PIFERRER F, et al. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(3):352-366.
- [7] 刘建国.栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)性类固醇激素和 17 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 8 在性腺发育过程中的潜在作用[D].青岛:中国海洋大学,2014.
- [8] 倪娜,柳学周,徐永江,等.条斑星鲽卵巢发育规律和性类固醇激素周年变化研究[J].渔业科学进展,2011,32(3):16-25.
- [9] SUN B, PANKJURST N W. Patterns of oocyte growth, vitellogenin and gonadal steroid concentrations in greenback flounder[J]. Fish Biology, 2004, 64(5):1399-1412.
- [10] 孙大江,曲秋芝,王丙乾,等.施氏鲟不同年龄性腺发育与性类固醇激素浓度关系[J].中国水产科学,2004(4):307-312
- [11] SIAH A, PELLERIN J, BENOSMAN A, et al. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 132(2):499-511.
- [12] SCOTT A P. Is there any value in measuring vertebrate steroids in invertebrates? [J]. General and Comparative Endocrinology, 2018, 265:77-82.
- [13] 谢欣冉,张玲玲,孙红振,等.性类固醇激素在虾夷扇贝性腺发育周期的分布[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2019,49(7):20-25.
- [14] LIU J, ZHANG Z, ZHANG L, et al. Variations of estradiol-17 $\beta$  and testosterone levels correlated with gametogenesis in the gonad of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) during annual reproductive cycle [J]. Canadian Journal of Zoology, 2014, 92(3):195-204.
- [15] YAN H W, LI Q, LIU W G, et al. Seasonal changes of oestradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in the gonad of the razor clam *Sinonovacula constricta* (Lamarck, 1818) [J]. Journal of Molluscan Studies, 2011, 77(2):116-122.
- [16] GAUTHIER-CLERC S, PELLERIN J, AMIARD J, et al. Estradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle [J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 145(2):133-139.
- [17] NI J B, ZENG Z, KE C H, et al. Sex steroid levels and expression patterns of estrogen receptor gene in the oyster *Crassostrea angulata* during reproductive cycle [J]. Aquaculture, 2013(376/377/378/379):105-116.
- [18] LIU W G, LI Q, KONG L F, et al. Estradiol-17 $\beta$  and testosterone levels in the cockle *Fulvia mutica* during the annual reproductive cycle [J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 2008, 42(4):417-424.
- [19] 刘星宇.近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)盐度适应与分化机制[D].北京:中国科学院大学,2019.
- [20] 陈子桂.近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)家系早期生长发育比较及性腺发育、生殖周期研究[D].南宁:广西大学,2011.
- [21] 李美琪,郭昕竺,李辉尚,等.“十三五”以来中国牡蛎产业发展形势分析与对策研究[J].中国食物与营养,2020,26(8):9-13.
- [22] 周锋祺,谢庆平,楼宝,等.17 $\beta$ -雌二醇浸浴对小黄鱼早期生长及性腺发育的影响[J].浙江海洋大学学报(自然科学版),2018,37(4):302-307.
- [23] CROLL ROGER P, WANG C D. Possible roles of sex steroids in the control of reproduction in bivalve molluscs [J]. Aquaculture, 2007, 272(1/2/3/4):76-86.
- [24] OSADA M, TAWARAYAMA H, MORI K, et al. Estrogen synthesis in relation to gonadal development of Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis*: gonadal profile and immunolocalization of P450 aromatase and estrogen [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2004, 139(1):123-128.
- [25] JANER G, LAVADO R, THIBAUT R, et al. Effects of 17 $\beta$ -estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Marine Environmental Research, 2004, 58(2/3/4/5):443-446.

- [26] CURIEUX-BELFEND O, MOSLEMI S, MATHIER M, et al. Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas*: evidence for 17 $\beta$ -HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 78(4):359-366.
- [27] KETATA I, GUERMAZI F, REBAI T, et al. Variation of steroid concentrations during the reproductive cycle of the clam *Ruditapes decussatus*: a one year study in the gulf of Gabès area [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2007, 147(2):424-431.
- [28] MATSUMOTO T, OSADA M, OSAWA Y, et al. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1997, 118(4):811-817.
- [29] REIS-HENRIQUES M A, LE GUELLEC D, REMY-MARTIN J P, et al. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. By gas chromatography and mass spectrometry [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1990, 95(2):303-309.
- [30] 郭振义, 谢欣冉, 李亚娟, 等. 性类固醇激素在虾夷扇贝成体组织中的分布 [J]. 水产科学, 2021, 40(4):523-529.

## Distribution of Sex Steroid Hormones in the Gonad of *Crassostrea ariakensis* During the Reproductive Cycle

ZHU Yan<sup>1,2</sup>, WANG Wenjing<sup>2,3</sup>, XIA Sudong<sup>1</sup>, LIU Zhihong<sup>2,4</sup>, SUN Xiujun<sup>2,4</sup>,  
ZHOU Liqing<sup>2,4</sup>, ZHANG Xiumei<sup>5</sup>, WU Biao<sup>2,4</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory of Aquatic Ecology and Aquaculture College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China;

4. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science

and Technology, Qingdao 266273, China; 5. Yantai Marine Economic Research Institute, Yantai 264003, China)

**Abstract:** Sex steroid hormones play important roles in the processes of sex differentiation, growth, reproduction, metabolism, and development in vertebrates, but the understanding of sex steroid hormones in mollusk is still very limited now. In this study, according to the histological section observation results, the gonad of *Crassostrea ariakensis* at three different developmental stages including prophase (stage I), metaphase (stage II) and anaphase (stage III) were collected for detection of sex steroid hormones by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), three sex steroid hormones including progesterone, testosterone and estradiol were obtained. The results showed that the contents in gonads of progesterone ranged from 22.2 pg · g<sup>-1</sup> to 346.6 pg · g<sup>-1</sup>, testosterone from 1.9 pg · g<sup>-1</sup> to 28.7 pg · g<sup>-1</sup>, and estradiol from 23.2 pg · g<sup>-1</sup> to 258.1 pg · g<sup>-1</sup>. The hormone content showed estradiol > progesterone > testosterone, which accounted for 57%, 40% and 3% of the total content of the sex steroids, respectively. Progesterone content in the ovaries were significantly higher than those in the testis at stages I and III, while that in the testis were significantly higher than in the ovaries at stage I, and that in the ovaries were significantly higher than in the testis at stages II and III. The three hormones content changes varied significantly in different sex and gonadal different developmental stages, indicating that sex steroid hormones may play important roles in sex differentiation as well as in gonadal development. These findings may help us to understand the changing pattern and mode of action of sex steroid hormones in the gonad development of oysters, and further provide a reference for the seedling breeding and artificial breeding of *C. ariakensis*.

**Keywords:** *Crassostrea ariakensis*; sex steroid hormone; gonadal development

(责任编辑 李维卫)