

文章编号: 1674-5566(2024)01-0030-13

DOI: 10.12024/jsou.20230104062

omd基因对斑马鱼骨骼矿化的影响

王琪^{1,2}, 车金远^{1,2}, 鲍宝龙^{1,2}

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: *omd*基因编码骨调蛋白,可以调控人类骨骼的矿化。目前关于*omd*基因对鱼类骨骼矿化的作用尚不清楚。为了探究*omd*基因对鱼类骨骼的影响,调查了*omd*基因在斑马鱼不同发育阶段和不同组织的表达,并利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,成功构建斑马鱼*omd*基因突变体(*omd*^{-/-})。结果表明:*omd*基因在斑马鱼体内随着发育表达量逐渐增加,在脊柱和肌肉中表达较高;相比野生型斑马鱼,*omd*^{-/-}品系斑马鱼的骨骼形态和尾部肌肉结构未发现明显变化,脊柱的钙含量下调59.81%;与野生型相比,*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼平均游泳距离下降33.93%,平均游泳速度下降39.44%,相对静止的时间增加88.26%,游泳能力下降。这些结果表明,*omd*基因缺失影响斑马鱼脊柱的矿化,并在一定程度上影响了斑马鱼的活动能力。

关键词: *omd*; 斑马鱼; 骨骼; 骨骼矿化; 游泳

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

鱼类的骨骼主要由暴露在鱼体外的外骨骼和埋藏于皮下的内骨骼组成^[1]。鱼类骨骼的骨化方式分为两种,一种是软骨内骨化,包含膜质期、软骨期和骨化期。另一种是膜内骨化,包括膜质期和骨化期。不管是软骨内骨化还是膜内骨化,最后都需要经过骨化期,即骨骼矿化过程^[1]。骨骼矿化是指钙、磷等无机盐在一定条件下以羟基磷灰石晶体的形式沉积到类骨质中形成正常骨质,在骨骼形成中起着关键性的作用。有研究表明斑马鱼矿化异常会导致中轴骨矿化延迟^[2-4]。

Osteomodulin (OMD)是一种骨黏附素的异源蛋白,最初是从牛长骨中分离出来的硫酸盐角质素蛋白聚糖,是富含亮氨酸重复蛋白多糖家族的成员,参与矿化作用^[5]。目前对*omd*基因的研究仍然较少,NINOMIYA等^[6]发现OMD在成骨细胞中大量表达。LIN等^[7]发现随着人牙髓干细胞在体外培养时间增加,*omd*基因表达量也随之上调,沉默*omd*基因会使其矿化形成显著减少。在大鼠下颌骨缺损模型中,注射OMD会使缺损的骨骼有所恢复^[8]。*omd*基因在鱼类骨骼矿化中的作用

尚没有明确。

本文利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建了斑马鱼*omd*基因纯合敲除型*omd*^{-/-},以明确*omd*基因对斑马鱼骨骼矿化的影响。

1 材料与方法

1.1 斑马鱼饲养

所用的斑马鱼为实验室饲养的WT(野生型)品系,每天早晚(8:00 am, 18:00 pm)各投喂1次,斑马鱼养殖水温保持为28℃,具体养殖方法参考文献[9]。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光原位杂交

在斑马鱼*omd*基因编码区设计探针引物,在下游引物前加上T7启动子。以30 dpf(受精后第30天)的野生型斑马鱼cDNA为模板进行PCR扩增,PCR产物纯化后体外转录,合成原位杂交所需要的探针(表1)。

利用原位杂交固定液(4% PFA多聚甲醛溶液)固定3月龄野生型斑马鱼,取斑马鱼尾部,进行

收稿日期: 2023-01-11 修回日期: 2023-04-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32170514)

作者简介: 王琪(1997—),女,硕士研究生,研究方向为发育生物学。E-mail: 13752109175@163.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

脱水、石蜡包埋和石蜡切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后进行原位杂交。首先使用 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 10 min, 再用 1 mol/L 甘氨酸在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中处理 10 min, 然后置于预杂交液中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h, 后换成加入含有 0.1 ng/ μL 探针的杂交液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜。使

用去离子甲酰胺和 SSC 清洗后, 于 5% 山羊血清中室温下封闭 1 h。封闭结束后, 按体积比 1:500 的比例加入地高辛抗体, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。用 PBST (磷酸盐吐温缓冲液) 清洗 3 次, 每次 10 min, 然后用 iF488 显色液显色, 最后使用 DAPI 染料标记细胞核, 采用共聚焦显微镜 (Nikon) 拍照观察^[10]。

表 1 SgRNA 靶点序列和基因引物序列
Tab. 1 SgRNA target sequences and primer sequences for genes

引物名称 Primer	引物序列 Sequence	用途 Usage	退火温度 Tm/ $^{\circ}\text{C}$
Target- <i>omd</i>	taatacactactataGCCCCACC	敲除靶点	60
	AAAAAAGCCCGgttttagactagaa		
Oligo2	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACT		
	TTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCC	合成 gRNA	60
	TTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCT		
	AAAAC		
<i>omd</i> -GT-F	TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACA	靶点验证	55
	AGGAATGGAAG		
<i>omd</i> -GT-R	GTGTCTTCTACTACGCTTACAGATGTTTC	靶点验证	55
<i>omd</i> -F2	ACTTGGCCTCCGAGAGAGAT	PCR	60
<i>omd</i> -R2	CGGAAGGATAAGACGAGGG	PCR	60
<i>elf</i> -F	CTTCTCAGGCTGACTGTG	内参	60
<i>elf</i> -R	CTTCTCAGGCTGACTGTGC	内参	60
<i>omd1</i> -F	GGCTTCACTGAGGTCACCGA	探针合成	62
<i>omd1</i> -T7R	TAATACGACTCACTATAGGGGTGG		
	TCGCAATACATGGCC	探针合成	62

1. 2. 2 总 RNA 提取

分别提取 50 枚 1 dpf 的胚胎和 50 尾 5、10、15、20、25、30、35 和 45 dpf 仔鱼的总 RNA。成体斑马鱼不同组织的总 RNA 提取, 选用 3 月龄的野生型斑马鱼 15 尾, 分别取心脏、皮肤、脊柱、肌肉、鳃、背鳍、眼睛、卵巢、精巢、肠道和脑。比较 *omd* 基因在野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的表达差异, 选取 3 月龄的斑马鱼各 3 尾, 所取的组织为鱼体尾部组织。参照 Trizol 试剂说明书中提供的方法提取组织总 RNA^[11], 1% 琼脂凝胶电泳来衡量总 RNA 提取的完整性, 利用 Nanodrop 2000 仪器测定 RNA 浓度。

1. 2. 3 逆转录以及荧光定量 RT-qPCR

利用逆转录试剂盒 (R323-01-AA, 诺唯赞) 将 1 μg 总 RNA 反转成 cDNA。荧光定量 RT-qPCR 设置 3 个重复, 采用 20 μL 的体系, 利用 BIO-RED QPCR 仪器, 以 *elf* 作为内参基因 (所用引物 *elf*-F, *elf*-R), 对 *omd* 基因进行相对定量 (所用引物 *omd*-

F2, *omd*-R2)。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算, 使用 Prism 6 处理数据制作柱状统计图并且分析差异显著性^[12]。

1. 2. 4 CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 *omd* 基因

参考文献 [10, 13] 的方法, 先利用 UCSC 网站设计斑马鱼 *omd* 基因的敲除靶点, 引物序列见表 1。之后使用 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒 (NEB 公司) 对上步 PCR 产物进行体外转录, 用 RNA Clean & Concentrator Kit 试剂盒 (Zymo Research 公司) 纯化转录产物, 获得 sgRNA。然后采用 *Xba* I 酶 (NEB 公司) 对 T3 质粒 pT3TS-nCas9n, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下酶切 3 h, 使其线性化。用 PCR Purification Kit 试剂盒 (QIAGEN 公司) 纯化酶切产物。使用 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒 (NEB 公司) 对纯化产物进行体外转录。用 RNA Clean & Concentrator Kit 试剂盒 (Zymo Research 公司) 纯化转录产物, 获得 Cas9 mRNA。最后将 sgRNA 和

Cas9 mRNA 按照 25~50 pg sgRNA 和 150~300 pg Cas9 mRNA 的比例混合,通过显微注射方法将其注射到野生型斑马鱼 I 细胞期的胚胎中。将注射后经检测有效编辑的 F₀ 斑马鱼饲养至成年,利用毛细管电泳和分子克隆的方法构建突变体纯合品系^[15-16]。

1.2.5 石蜡切片

选取 3 月龄的 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼和野生型斑马鱼各 10 尾,用 4% PFA 在室温下固定过夜,每条鱼去除鳞片后切取尾部。经 PBS(磷酸盐缓冲液)清洗后,于梯度乙醇脱水、石蜡包埋。将斑马鱼肌肉沿着纵切方向进行切片,切片厚度 8 μm。最后利用伊红和苏木精进行 H.E 染色,显微镜拍照观察肌肉细胞形态,使用 Prism6 进行数据差异性分析^[10]。

1.2.6 骨骼染色

参考茜苏红钙着色法^[17],20 dpf、30 dpf、2 月龄、3 月龄的 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼和野生型斑马鱼各取 10 尾,使用 4% PFA 固定过夜;使用 PBS 清洗后去除鳞片,为保证后续染色时长一致,将 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼减掉尾鳍与野生型斑马鱼混合在一起。使用 1% KOH 和 3% H₂O₂ 混合成脱色液,将斑马鱼浸泡其中,利用强光照射直至无色,使用消化液在 37 °C 水浴锅中消化至透明,再用 0.1% 茜苏红进行染色,最后利用甘油梯度脱色。

1.2.7 骨骼形态测量

对 3 月龄的野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的鳞片、背鳍、脊柱、尾杆骨选定部位的骨骼形态进行统计,测量鳞片的周长、背鳍的周长、脊柱的纵向长度和横向长度、尾杆骨的周长,最后使用 Prism6 进行数据差异性分析。

1.2.8 钙含量测量

选取 3 月龄的野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼各 3 尾,分别选取距离尾部倒数第八根脊柱(去除上面的肌肉)以及它正上方的鳞片和尾杆骨、背鳍用双面胶固定在载玻片上,每个部位选取 3 个点,使用 Agilent icpms 固体元素分析机器,利用高能量的激光束经过聚焦后照射在试样表面,对试样表面进行微区剥蚀,产生的气溶胶由连接管引至 ICP 炬管(去除雾化器和雾室),送至等离子体中原子化并电离,最后通过质谱系统进行检测的原理,定点测定钙含量^[18]。

1.2.9 行为测试

选取 3 月龄的野生型和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼各 6 尾,参考文献[19]的方法,用直径为 36 cm 的正方形玻璃缸,加入 150 mL 水,每尾鱼在 ZebraTower(Viewpoint, 法国)设备下进行游泳行为监测 30 min,取中间的 24 min 使用分析软件(ZebraLab, Viewpoint, 法国)进行数据分析。设置运动分析参数:运动速度为 0 mm/s 的为静止,运动速度低于 20 mm/s 设定为低速运动,运动速度为 20~50 mm/s 设定为中速运动,运动速度超过 50 mm/s 设定为高速运动,视频每隔 3 min 自动保存一次,根据持续时间和运动距离,计算 24 min 内每条鱼游泳的平均速度,平均距离,以及相对静止的时间。

2 结果

2.1 *omd* 基因在斑马鱼早期发育阶段和成体不同组织的表达

RT-qPCR 结果显示,在斑马鱼早期发育过程中 1 dpf 到 15 dpf 表达量较低,与 20 dpf 相比较 15 dpf 上升大约 5 倍,*omd* 基因的 mRNA 表达水平整体呈上升趋势(图 1a)。

omd 基因在皮肤、肌肉和脊柱中大量表达,其中在皮肤中表达最高,在皮肤中的表达量是背鳍的 37 倍,在肌肉中的表达量是背鳍的 34 倍,在脊柱中表达量是背鳍的 23 倍。*omd* 基因在眼睛、鳃、肠道、脑、心脏、精巢以及卵巢中几乎不表达(图 1b)。

2.2 斑马鱼 *omd* 基因的空间表达模式

RNA 荧光原位杂交显示,*omd* mRNA 探针在红肌和脊柱中有很强的信号,在白肌中的信号相对较低。将肌肉和脊柱切片部位进行 40 倍放大,与对照图相比,iF488 标记 *omd* mRNA 探针在红肌和脊柱(主要是髓弓小骨、脉弓小骨)中有很强的信号(图版 I)。

2.3 利用 CRISPR/Cas9 成功构建斑马鱼 *omd* 基因突变品系

sgRNA 的靶点位于 *omd* 基因的第 3 个外显子上(图 2a)。通过毛细管电泳检测发现,野生型胚胎的 PCR 产物仅有一个较强的 308 bp 野生峰(图 2b),而注射组胚胎的 PCR 产物在 308 bp 野生峰周围出现多个峰。分子克隆筛选出非 3 倍数的基因突变 F₁ 斑马鱼,缺失 11 bp,氨基酸翻译提前终

止对应蛋白的表达改变(图2a)。通过对F₁斑马鱼进行自交、毛细管电泳检测后筛选到*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼(图2c)。通过RT-qPCR检测敲除效率,结果如图2d所示,与野生型斑马鱼相比,*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼的*omd*基因表达量极显著下调($P < 0.0001$),表明*omd*基因已经被成功敲除(图2d)。

2.4 *omd*基因敲除对斑马鱼尾部肌肉结构没有明显变化

对3月龄的野生型和*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼的尾部肌肉组织进行石蜡切片和H.E染色。如图所示,与野生型斑马鱼相比,*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼尾部肌肉结构未发现明显变化。对红肌和白肌的放大图进行统计分析后发现,与野生型斑马鱼相比,在 $0.62\ \mu\text{m} \times 0.72\ \mu\text{m}$ 的范围内*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼红肌数量均为35个左右,没有明显变化;白肌细胞数量均为71个左右,没有发现明显变化(图版II)。

2.5 *omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼脊柱的矿化程度受到明显影响

通过茜苏红钙着色法分别对20 dpf、30 dpf、2月龄、3月龄的*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼与野生型斑马鱼进行骨骼染色发现,与野生型斑马鱼相比,*omd*基因的敲除对斑马鱼整个发育过程的脊

柱矿化程度均有影响,并且*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼的脊柱随着发育,矿化程度下降越来越明显(图版III)。

2.6 *omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼骨骼形态没有明显变化

为了明确钙含量的变化是否与骨骼形态有关,对脊柱、尾杆骨、鳞片、鳍的选定位置的骨骼形态进行测定。结果显示,野生型斑马鱼脊柱选定部位的横向平均长度为 $821.34\ \mu\text{m}$,*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼的脊柱选定部位的横向平均长度为 $818.6\ \mu\text{m}$,无明显变化;野生型斑马鱼脊柱选定部位的纵向平均长度为 $1\ 071.7\ \mu\text{m}$,*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼的脊柱选定部位的纵向平均长度为 $1\ 070.7\ \mu\text{m}$,无明显变化;野生型斑马鱼鳞片选定部位的平均周长为 $3\ 589\ \mu\text{m}$,*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼的鳞片选定部位的平均周长为 $3\ 650\ \mu\text{m}$,无明显变化;野生型斑马鱼背鳍选定部位的平均周长为 $5\ 549.3\ \mu\text{m}$,*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼的背鳍选定部位的平均周长为 $5\ 527.7\ \mu\text{m}$,无明显变化;野生型斑马鱼尾杆骨选定部位的平均周长为 $3\ 418\ \mu\text{m}$,*omd*^{-/-}纯合敲除品系斑马鱼的尾杆骨选定部位的平均周长为 $3\ 414.7\ \mu\text{m}$,无明显变化(图版IV)。

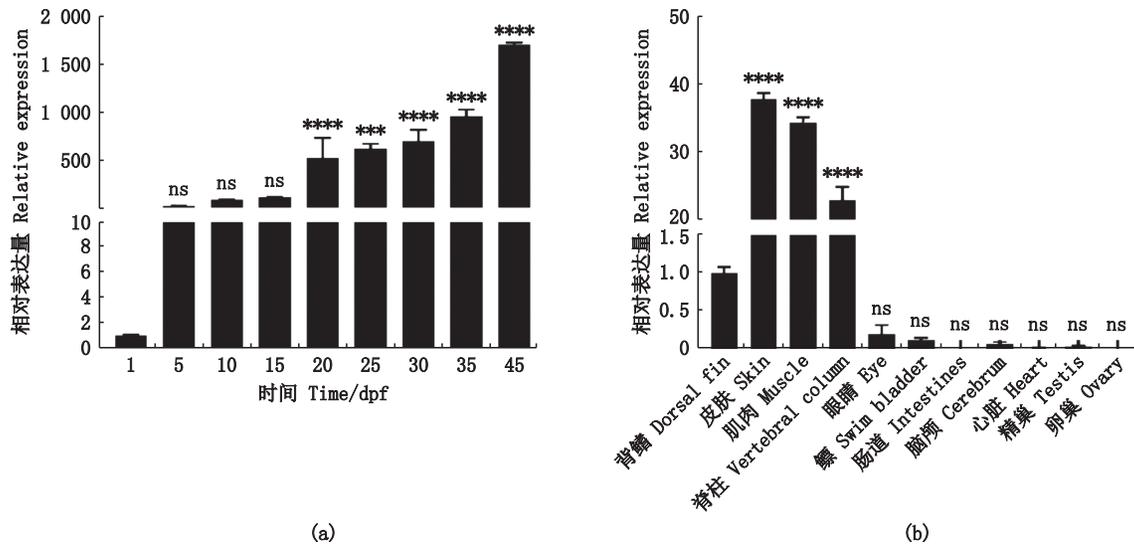
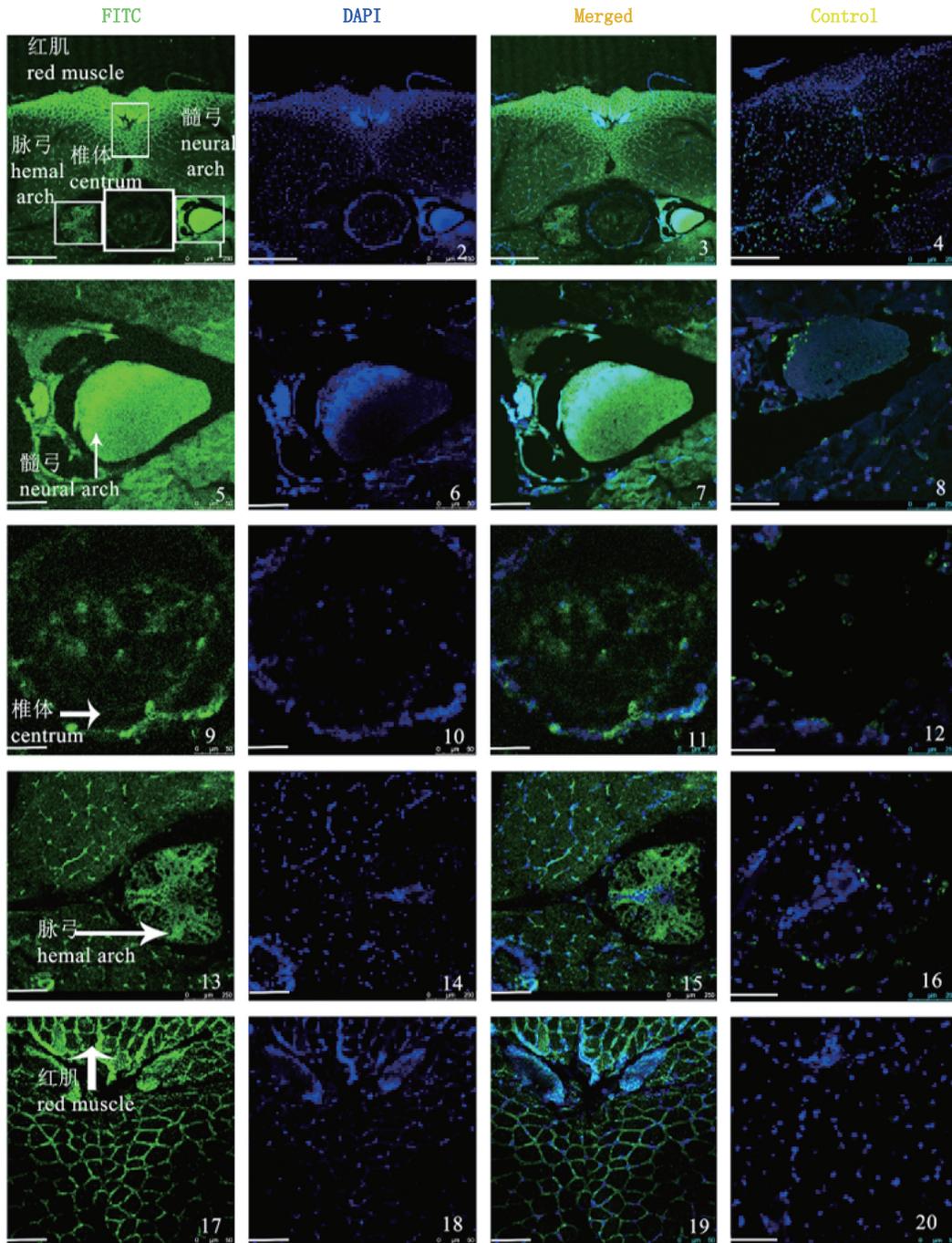


Figure 1 *omd* gene expression in zebrafish at early developmental stages (a) and in different tissues of the adult (b); In (a) figure, 1 dpf was used as the reference for comparative calculations, and in (b) figure, the dorsal fin was used as the reference for comparative calculations; **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, "ns" represents no significant difference.

Figure 1 *omd* gene expression in zebrafish at early developmental stages (a) and in different tissues of the adult (b); In (a) figure, 1 dpf was used as the reference for comparative calculations, and in (b) figure, the dorsal fin was used as the reference for comparative calculations; **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, "ns" represents no significant difference.

图1 *omd*基因在斑马鱼早期发育阶段和成体不同组织的表达

Fig. 1 *omd* gene expression in different tissues during early developmental stages and adult zebrafish

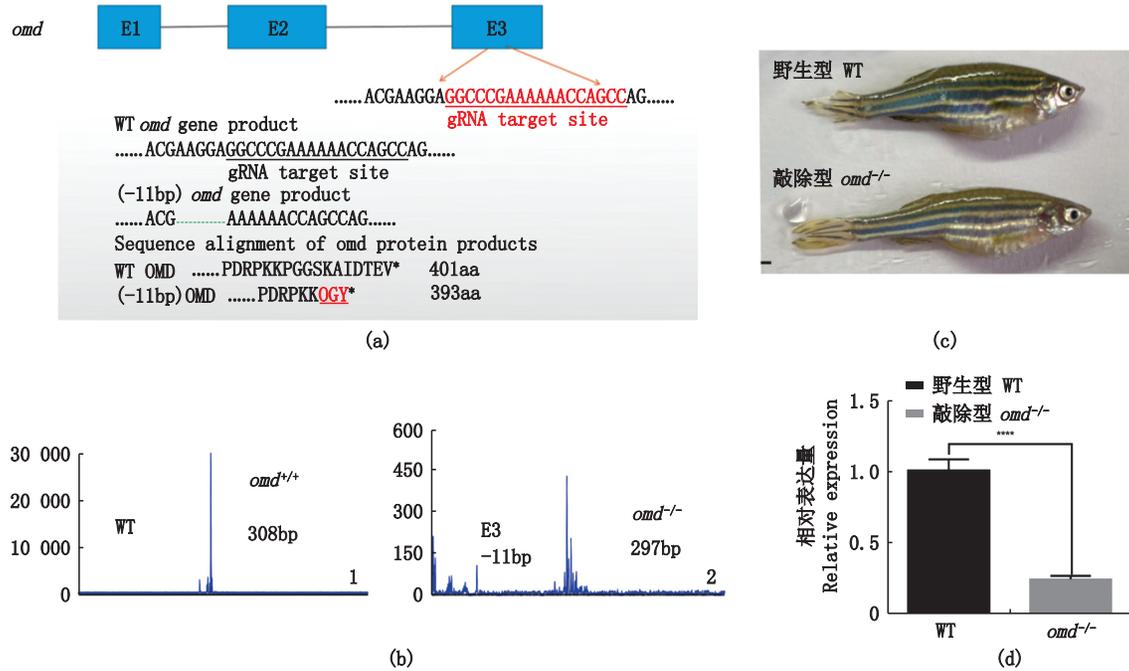


斑马鱼整体纵向切片中, iF488 为 FITC 通路标记 *omd* 基因的定位表达, DAPI 标记细胞核的定位表达, 以正义链为对照组; 1-4 图是共聚焦放大图, 比例尺 250 μm ; 5-8、9-12、13-16、17-20 分别为对应白色方框的髓弓、椎体、脉弓和红肌的共聚焦 40 倍放大图, 比例尺: 50 μm 。白色方框代表放大的区域。

In the whole zebrafish longitudinal section, iF488 was the localization expression of FITC-labeled *omd* gene, DAPI was the localization expression of the nucleus, and the sense strand was used as the control group. Numbers 1-4 are confocal magnifications with scale bars of 250 μm ; Numbers 5-8, 9-12, 13-16, and 17-20 are confocal 40 \times magnification images of the medullary arch, vertebral body, pulse arch, and red muscle corresponding to the white box, respectively; scale bar: 50 μm . The white box represents the enlarged area.

图版 I *omd* 基因的荧光原位杂交

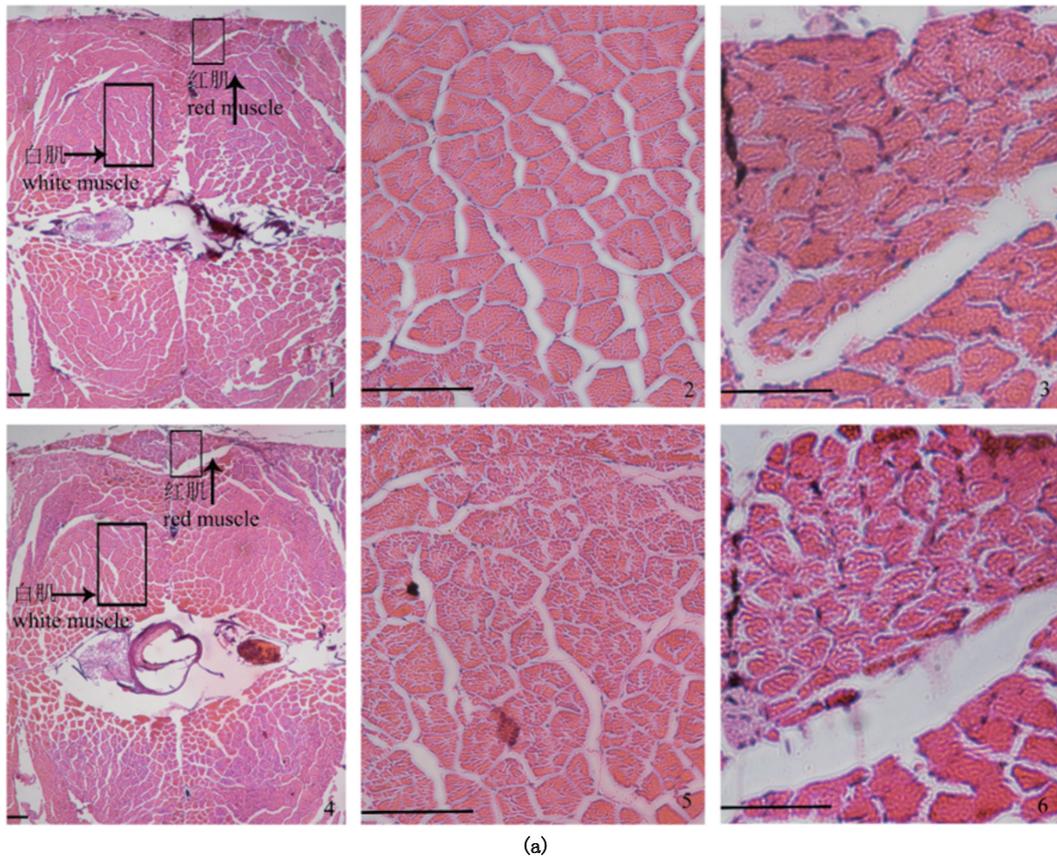
Plate I Fluorescence *in situ* hybridization for the *omd* gene

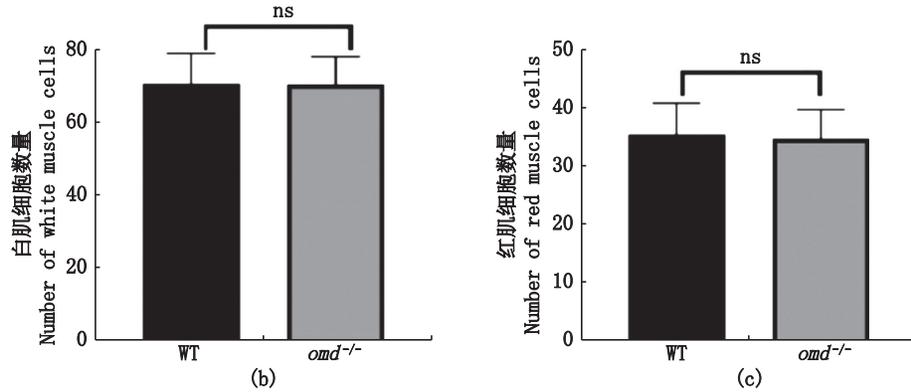


(a) *omd* 基因的敲除靶点,与野生型斑马鱼的基因和蛋白相比较敲除型的斑马鱼基因缺失 11 bp 以及蛋白表达终止;(b)1 号是野生型 308 bp,2 号是敲除靶点 E3 的结果为有效敲除;(c)野生型和 *omd*^{-/-} 纯合敲除型的斑马鱼;(d) *omd* 基因敲除验证。比例尺为 200 μm。****P < 0.000 1。

(a) Figure shows the *omd* gene knockout target, compared with the wild-type zebrafish gene and protein, the knockout zebrafish gene deletion 11 bp and protein expression termination; number 1 of (b) figure is wild-type 308 bp, and number 2 of (b) figure is effective knockout of E3; (c) Figure shows wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish; (d) Figure shows *omd* gene knockout validation. The scale bar is 200 μm, ****P < 0.000 1.

图 2 利用 CRISPR/Cas9 建立 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼家系
Fig. 2 CRISPR/Cas9-mediated *omd*^{-/-} zebrafish



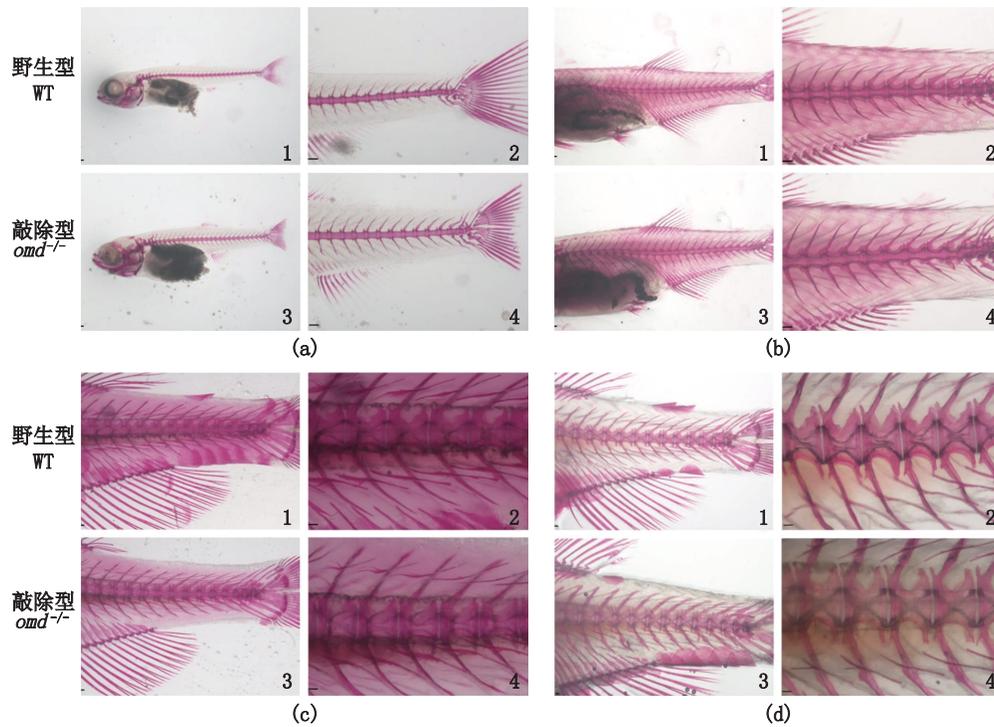


(a) 1号和4号分别是野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的纵切图, 2号和5号分别是野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼白肌的放大图, 3号和6号分别是野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼红肌的放大图; (b) 野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼白肌细胞数量统计; (c) 野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼红肌细胞数量统计。比例尺: 200 μm 。"ns"代表无显著性差异。

Numbers 1 and 4 of (a) figure are the longitudinal slices of wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish. Numbers 2 and 5 of (a) figure are the magnification plots of white muscle of wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish. Numbers 3 and 6 of (a) figure are the magnification plots of red muscle of wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish; (b) Figure shows count of white muscle cells in wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish; (c) Figure shows count of red muscle cells in wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish. The scale bar is 200 μm . "ns" represents no significant difference.

图版 II 野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的肌肉对比图

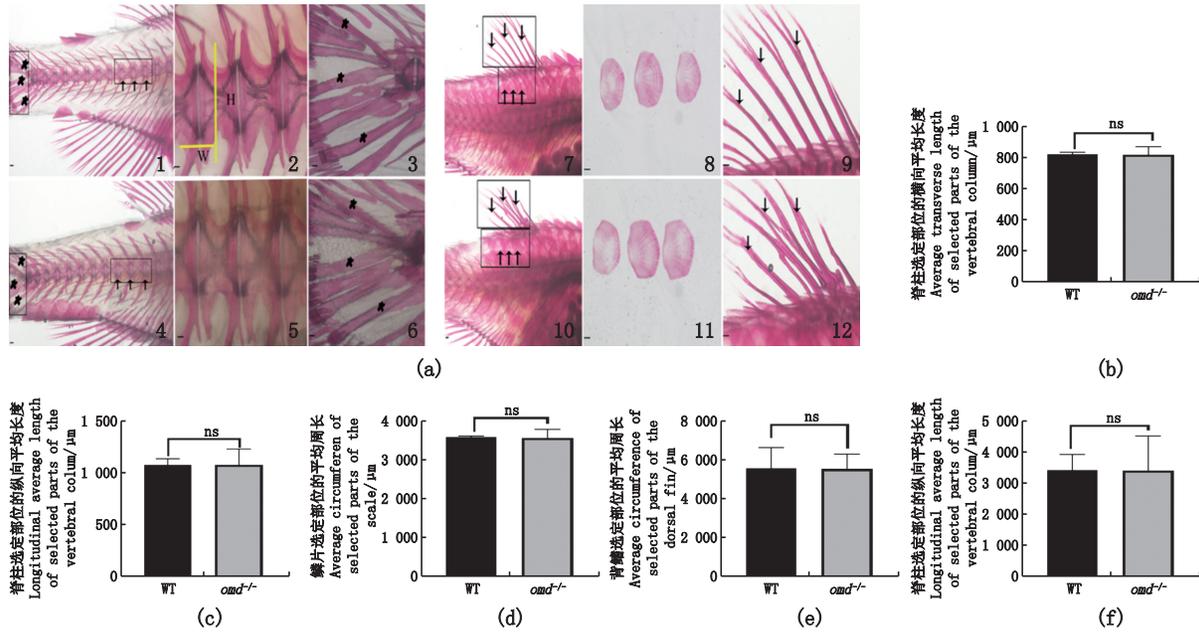
Plate II Muscle comparison of wild-type zebrafish and *omd*^{-/-} zebrafish



(a) 1号和3号是20 dpf的野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的整体图, 2号和4号分别是2倍的脊柱放大图; (b) 1号和3号是30 dpf的野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的整体图, 2号和4号分别是2倍的脊柱放大图; (c) 1号和3号是2月龄的野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的整体图, 2号和4号分别是2倍的脊柱放大图; (d) 1号和3号是3月龄的野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的整体图, 2号和4号分别是2倍的脊柱放大图。比例尺为200 μm 。Numbers 1 and 3 of (a) figure show the whole body of 20 dpf wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish, while numbers 2 and 4 of (a) figure show the vertebral column magnification of 2 \times ; Numbers 1 and 3 of (b) figure show the whole body of 30 dpf wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish, while numbers 2 and 4 of (b) figure show the vertebral column magnification of 2 \times ; Numbers 1 and 3 of (c) figure show the whole body of 2-month-old wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish, while numbers 2 and 4 of (c) figure show the vertebral column magnification of 2 \times ; Numbers 1 and 3 of (d) figure show the whole body of 3-month-old wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish, while numbers 2 and 4 of (d) figure show the vertebral column magnification of 2 \times . The scale bar is 200 μm .

图版 III 不同阶段野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的骨骼染色

Plate III Bone staining of wild-type zebrafish and *omd*^{-/-} zebrafish at different stages



(a) 脊柱、尾杆骨、鳞片、鳍的选定测量位置示意图；(b) 脊柱选定部位横向平均长度；(c) 脊柱选定部位纵向平均长度；(d) 鳞片选定部位的平均周长；(e) 背鳍选定部位的平均周长；(f) 尾杆骨选定部位的平均周长。比例尺：200 μm。"ns"代表无显著性差异。

(a) Figure shows a schematic of the selected measurement positions of vertebral column, tail rod bone, scales, and fins; (b) Figure shows the average transverse length of the selected part of the vertebral column. (c) Figure shows average longitudinal length of selected parts of vertebral column; (d) Figure shows average circumference of selected parts of the scale; (e) Figure shows average circumference of selected parts of the dorsal fin; (f) Figure shows average circumference of the selected part of the tail rod bone. The scale bar is 200 μm. "ns" represents no significant difference.

图版 IV 野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的不同部位骨骼形态测定
Plate IV Skeletal morphometry in different parts of wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish

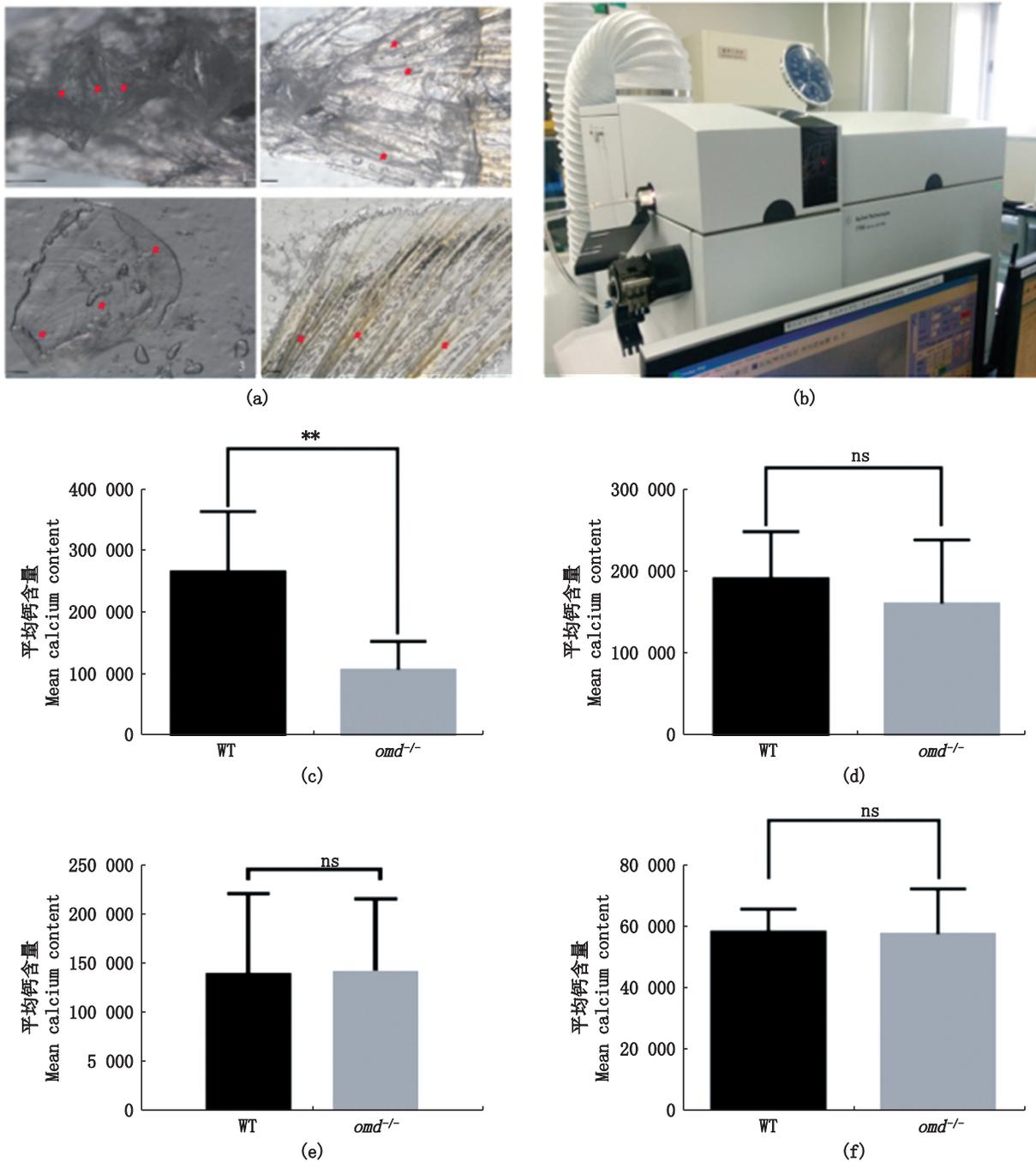
2.7 *omd* 基因缺失对骨骼中钙含量影响的测定

为了更加精确地测定野生型和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼骨骼的钙含量,利用固体元素分析法,对固定在载玻片上的脊柱、尾杆骨、背鳍和鳞片进行钙含量测定。结果显示,野生型斑马鱼背鳍的平均钙含量为 $(142\ 666.7 \pm 8\ 400) \times 10^{-6}$, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼背鳍的平均钙含量为 $(141\ 333.3 \pm 8\ 000) \times 10^{-6}$, 没有明显变化。野生型斑马鱼鳞片的平均钙含量为 $(57\ 333.33 \pm 6\ 400) \times 10^{-6}$, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼鳞片的平均钙含量为 $(57\ 250 \pm 6\ 000) \times 10^{-6}$, 没有明显变化。野生型斑马鱼脊柱的平均钙含量为 $(266\ 285.7 \pm 4\ 500) \times 10^{-6}$, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼脊柱的平均钙含量为 $(107\ 016.7 \pm 4\ 200) \times 10^{-6}$ 。与野生型斑马鱼相比, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼脊柱的平均钙含量显著下降 ($P < 0.01$), 脊柱平均钙含量下降 59.81%。野生型斑马鱼尾杆骨的平均钙含量为 $(191\ 333.3 \pm 3\ 600) \times 10^{-6}$, *omd*^{-/-} 品系斑马鱼尾杆骨的平均钙含量为 $(161\ 000 \pm 3\ 000) \times 10^{-6}$ 。与野生型斑马鱼相比, *omd*^{-/-} 纯合敲

除品系斑马鱼尾杆骨的平均钙含量以及脊柱平均钙含量下降 15.85%(图版 V)。

2.8 *omd* 基因敲除使得斑马鱼的游泳能力下降

通过对斑马鱼的游泳能力进行测试,发现与野生型斑马鱼相比 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼运动轨迹略简单。24 min 内野生型斑马鱼平均游泳距离为 7 091.6 mm, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼平均游泳距离为 4 685.5 mm, 与野生型斑马鱼相比, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼平均游泳距离下降 33.93% ($P < 0.05$); 24 min 内野生型斑马鱼平均游泳速度为 5.41 mm/s, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼平均游泳速度为 3.27 mm/s, 与野生型斑马鱼相比, *omd*^{-/-} 品系斑马鱼平均游泳速度显著下降 ($P < 0.01$), 平均游泳速度下降 39.44%; 24 min 内野生型斑马鱼相对静止时间为 4.9×10^{-3} s, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼相对静止时间为 4.2×10^{-2} s。与野生型斑马鱼相比, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼相对静止时间增加 ($P < 0.05$), 相对静止时间增加了 7.51 倍(图 3)。

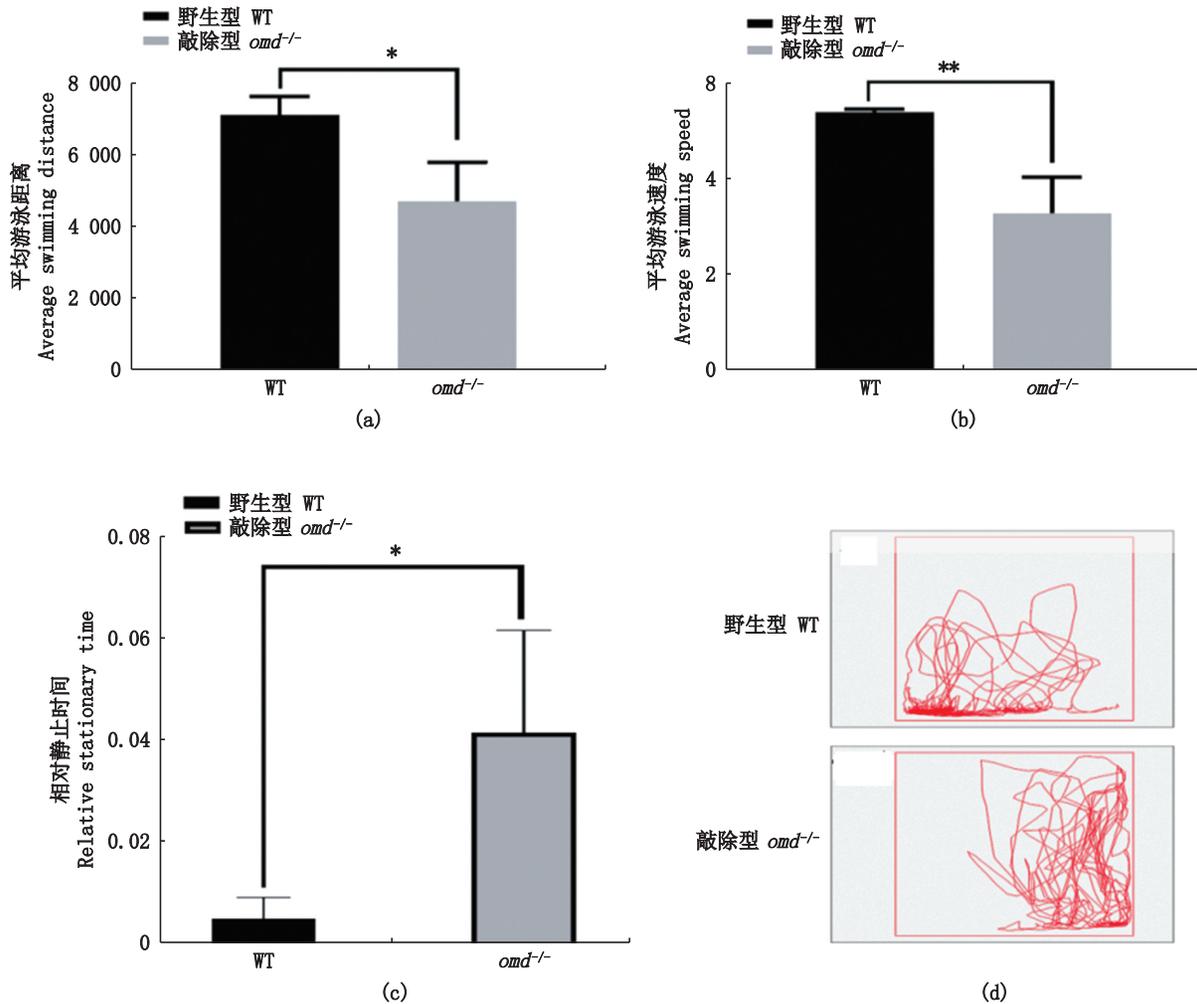


(a)图中1号的红色星号是选取测定的部位,(a)图中2号是斑马鱼的脊柱和尾杆骨的放大图,(a)图中3号是斑马鱼选取的鳞片放大图,(a)图中4号是斑马鱼的背鳍放大图;(b)测量斑马鱼钙含量的Agilent icpms固体元素分析仪;(c)斑马鱼脊柱选定部位平均钙含量统计结果;(d)斑马鱼尾杆骨选定部位平均钙含量统计结果;(e)斑马鱼背鳍选定部位平均钙含量统计结果;(f)斑马鱼鳞片选定部位平均钙含量统计结果。比例尺为200 μm 。红色星号代表选定测量钙含量的点;** $P < 0.01$,"ns"代表无显著性差异。

The red asterisk in number 1 of (a) figure is the selected part. Number 2 of (a) figure is the magnified view of the vertebral column and tail rod bone of zebrafish. Number 3 of (a) figure is the magnified view of the selected scales of zebrafish. Number 4 of (a) figure is the magnified view of the dorsal fin of zebrafish. (b) figure shows the Agilent icpms solid element analyzer measuring the calcium content of zebrafish. (c) Figure shows the average calcium content of selected parts of the zebrafish vertebral column; (d) Figure shows the statistical results of average calcium content in selected parts of zebrafish tail rod bone; (e) Figure shows the average calcium content of selected parts of zebrafish dorsal fin; (f) Figure shows the statistical results of average calcium content in selected parts of zebrafish scales. The scale bar is 200 μm . The red asterisk represents the point where the calcium content was selected for measurement; ** $P < 0.01$, "ns" represents no significant difference.

图版 V 野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的不同部位钙含量测定

Plate V Determination of calcium content in different parts of wild-type zebrafish and *omd*^{-/-} zebrafish



(a)野生型斑马鱼 WT 和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的平均游泳距离统计, 数据显示是平均值±标准差 ($n=6$, * $P < 0.05$); (b)野生型斑马鱼 WT 和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的平均游泳速度统计, 数据显示是平均值±标准差 ($n=6$, ** $P < 0.01$); (c)野生型斑马鱼 WT 和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的相对静止时间统计, 数据显示是平均值±标准差 ($n=6$, * $P < 0.05$); (d)野生型斑马鱼 WT 和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的运动轨迹。

(a) Figure shows the average swimming distance statistics of wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish, the data are shown as mean ± standard deviation ($n=6$, * $P < 0.05$); (b) Figure shows the average swimming speed statistics of wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish, the data are shown as mean ± standard deviation ($n=6$, ** $P < 0.01$); (c) Figure shows the relative immobility time statistics of wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish, and the data are shown as mean ± standard deviation ($n=6$, * $P < 0.05$); (d) Figure shows the motion trajectories of wild-type and *omd*^{-/-} zebrafish.

图3 3月龄的野生型斑马鱼和 *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼游泳行为比较

Fig. 3 Wild-type zebrafish and *omd*^{-/-} zebrafish swimming behavior monitoring at 3 months

3 讨论

3.1 *omd* 基因的表达模式

本文首次在斑马鱼中调查了 *omd* 基因的表达情况, 发现 *omd* 基因在斑马鱼体内随着发育时间的增加表达量也不断增加。LIN 等发现 *omd* 基因在骨细胞不断分化的过程中表达量上调^[7], 这种变化趋势表明随着斑马鱼生长过程中骨骼的增长导致 *omd* mRNA 的表达水平持续增高。NINOMIYA 等通过微阵序列分析发现, 在小鼠的骨骼、骨髓、外周血、髓核、皮肤、肌肉、脊髓和大

脑8个组织中, OMD 在骨骼中特异性表达^[6]。本文研究发现, *omd* 基因在斑马鱼的各个器官组织中差异性表达, 在皮肤、肌肉和脊柱中大量表达。*omd* 基因在斑马鱼皮肤上大量表达, 可能是因为在皮肤上面含有大量的鳞片。

3.2 *omd* 基因调控斑马鱼脊柱的矿化

本文研究发现 *omd* 基因在脊柱中大量表达, 与野生型斑马鱼相比, *omd* 基因的敲除对斑马鱼整个发育过程的脊柱矿化程度均有影响, *omd*^{-/-} 纯合敲除品系斑马鱼的脊柱矿化程度明显下降, 但是骨骼形态未发现明显变化。证明 *omd* 基因

的敲除影响骨骼矿化,不是通过骨骼形态导致的。研究表明,OMD被分泌到细胞外环境中,通过LRR(LRR是蛋白与蛋白之间相互作用的结构域)与BMP2相结合,促进BMP2锚定细胞表面受体BMPRI1A。BMPRI1A编码骨形成蛋白(BMPs)的1A型BMP受体,包括BMP2和BMP4,BMPRI1A在控制成骨细胞数量和软骨形成中起着重要作用。BMP2与BMPRI1A的结合,使得信号进一步向内传递,SMAD1/5磷酸化,转录出 $sp7$ 、 omd 、 $bmp2$ 等基因,促进骨骼的矿化^[20-22]。在斑马鱼中, omd 基因的缺失,导致BMP2与受体BMPRI1A结合减少,转录的骨骼矿化相关基因减少,骨骼矿化程度下降。但是 omd 基因缺失对背鳍和鳞片的骨骼矿化程度没有明显影响的原因有待进一步研究。

通过RT-qPCR结果显示 omd 基因在斑马鱼肌肉中表达量较高,但是与野生型斑马鱼相比 $omd^{-/-}$ 纯合敲除品系的斑马鱼尾部肌肉结构暂时未发现明显变化。研究表明,OMD是一种与I型胶原蛋白结合的新型蛋白,可以与胶原蛋白相互作用^[23],肌肉硬度与肌纤维和胶原蛋白有关^[24]。推测 omd 基因可能是影响了肌肉硬度。研究表明^[25],肌肉收缩过程中开关是钙离子,ATP提供动力。推测 omd 基因敲除可能导致肌肉中钙含量下降,影响肌肉的收缩。但具体的原因和变化趋势有待进一步研究。

通过RT-qPCR结果显示 omd 基因在皮肤中大量表达,可能是因为皮肤中含有大量鳞片,但本文研究发现, $omd^{-/-}$ 纯合敲除品系斑马鱼鳞片矿化程度未受影响。但有研究表明,钙离子(Ca^{2+})浓度在皮肤最外层的表皮平衡稳态过程中起着重要的调控作用,推测 omd 基因敲除可能导致皮肤中钙含量下降,进而影响表皮稳态^[26]。

3.3 omd 基因影响鱼类游泳

与野生型斑马鱼的游泳能力相比较, $omd^{-/-}$ 纯合敲除品系斑马鱼的平均游泳距离和平均游泳速度均明显下降,相对静止不动的时间增加,但 $omd^{-/-}$ 纯合敲除品系斑马鱼的尾部肌肉结构没有发生明显变化。所以 omd 基因可能不是通过影响肌肉而影响鱼类的游泳行为的。SUNIAGA等^[27]研究发现让斑马鱼在游泳隧道实验中接受了为期四周的加强运动,通过整合高分辨率分析,发现运动触发了快速的骨适应,骨形成的成

骨细胞、骨体积和矿化显著增加,运动与骨骼矿化存在一定的相关性。又有研究表明,在大鼠下颌骨缺损模型中,注射OMD会使缺损的骨骼有所恢复^[8]。所以推测可能由于斑马鱼 omd 基因的敲除导致脊柱中矿化程度下降,造成骨质疏松,使其运动能力下降、运动持久性减弱^[28]。

综上所述,本文研究了 omd 基因在斑马鱼体内的时空表达情况,明确了 omd 基因随着斑马鱼发育,骨细胞数目的增多表达量增加,在皮肤、肌肉和脊柱中大量表达。在斑马鱼中构建了 $omd^{-/-}$ 纯合敲除品系,敲除 omd 基因,斑马鱼的脊柱钙含量明显下降并且游泳能力减弱。本文为研究 omd 基因的功能以及调控方式奠定了基础,但 omd 基因的调控通路还有待继续深入研究。

参考文献:

- [1] 孟庆闻. 鱼类比较解剖 [J]. 北京: 科学出版社, 1987: 57-118.
MENG Q W. Comparative anatomy of fish [J]. Beijing: Science Press, 1987: 57-118.
- [2] KOMORI T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2 [J]. Cell Tissue Res, 2010, 339(1): 189-195.
- [3] LIU W, TOYOSAWA S, FURUICHI T, et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures [J]. J Cell Biol, 2001, 155: 157-166.
- [4] ACAMPORA D, MERLO G R, PALEARI L, et al. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal less-related gene Dlx5 [J]. Development, 1999, 126: 3795-3809.
- [5] TASHIMA T, NAGATOISHI S, SAGARA H, et al. Osteomodulin regulates diameter and alters shape of collagen fibrils [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 463(3): 292-296.
- [6] NINOMIYA K, MIYAMOTO T, IMAI J I, et al. Osteoclastic activity induces osteomodulin expression in osteoblasts [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2007, 362(2): 460-466.
- [7] LIN W, GAO L, JIANG W, et al. The role of osteomodulin on osteo/odontogenic differentiation in human dental pulp stem cells [J]. BMC Oral Health, 2019, 19(1): 22.
- [8] LIN W, ZHU X, GAO L, et al. Osteomodulin positively regulates osteogenesis through interaction with BMP2 [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2): 147.
- [9] 王燕飞, 徐义平, 鲍宝龙. 斑马鱼HCS基因全长cDNA序列及早期仔鱼阶段的空间表达 [J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(3): 321-327.

- WANG Y F, XU Y P, BAO B L. Full-length cDNA sequence of zebrafish *HCS* gene and its spatial expression in early larval stage [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(3): 321-327.
- [10] 顾叶丹,王冰琦,王宏杰,等. 斑马鱼 *hoxb4a* 在心脏发育中的功能 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(6): 1342-1350.
- GU Y D, WANG B Q, W H J, et al. Functional exploration of *hoxb4a* regulating cardiac development in zebrafish [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(6): 1342-1350.
- [11] 李育媚,廖永冠,鲍宝龙. 2-甲基异茨醇对斑马鱼氧化磷酸化及免疫相关基因表达的影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 309-317.
- LI Y M, LIAO Y G, BAO B L. Effects of exposure to 2-methylisoborneol on oxidative phosphorylation and immune-related genes expression in zebrafish [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(2): 309-317.
- [12] 王志远,李金库,李昀等. 花鲈 *ncc*、*nkcc* 基因在海、淡水适应中鳃组织的表达与定位分析 [J]. 水产学报, 2023, 47(8): 1-12.
- WANG Z Y, LI J K, LI Y. Expression and localization analysis of *ncc* and *nkcc* genes in gill tissue of Lateolabrax maculatus during salinity adaptation [J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(8): 1-12.
- [13] 高磊,黄亚娟, PENGLEE, 等. 斑马鱼 *nos2a* 基因的生长调控作用 [J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(4): 573-580.
- GAO L, HUANG Y J, PENGLEE, et al. Role of *nos2a* in regulating the growth of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(4): 573-580.
- [14] 廖永冠,李育媚,鲍宝龙. *opn1lw2* 基因在红光诱导斑马鱼皮肤色素细胞形成中的作用 [J]. 动物学杂志, 2021, 56(4): 608-616.
- LIAO Y G, LI Y M, BAO B L. The Role of *opn1lw2* in the Formation of Skin Pigment Cells in Zebrafish (*Danio rerio*) under Red Irradiation [J]. Chinese Journal of Zoology 2021, 56(4): 608-616.
- [15] MANSFIELD E S, ROBERTSON J M, VAINER M, et al. Analysis of multiplexed short tandem repeat (STR) systems using capillary array electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2010, 19(1): 101-107.
- [16] 庞天抒,车金远,范纯新,等. *MsxC* 基因在斑马鱼肌间刺和大侧肌发育中的作用 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 328-335.
- PANG T, CHE J Y, FAN CH X. Role of *MsxC* gene in the development of intermuscular bones and axial muscle in zebrafish [J]. Aquaculture and Fisheries, 2022, 31(2): 328-335.
- [17] WALKER M B, KIMMEL C B. A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae [J]. Biotechnic and Histochemistry, 2007, 82(1): 23-28.
- [18] LATKOCZY C, GUNTHER D. Enhanced sensitivity in inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for direct solid analysis using laser ablation (LA-ICP-SFMS) [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002, 17(10): 1264-1270.
- [19] 何雪,王雨果,鲍宝龙,等. 电压门控钠离子通道 *scn1Laa* 参与斑马鱼脑神经发育和运动行为调节的研究 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(5): 1057-1067.
- HE X, WANG YG, BAO BL. et al. Voltage-gated sodium channel *scn1Laa* is involved in the development of zebrafish cranial nerves and the regulation of motor behavior [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(5): 1057-1067.
- [20] JING J, REN Y, ZONG Z, et al. BMP receptor 1A determines the cell fate of the postnatal growth plate [J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(9): 895-906.
- [21] 刘倩,岳静伟,牛乃琪,等. 脊椎动物胚胎期脊椎的形成及信号通路调控机制 [J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(6): 1461-1470.
- LIU Q, YUE J W, NIU N Q, et al. Formation and signaling pathway regulation of vertebrate embryonic spine [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry, 2021, 52(6): 1461-1470.
- [22] 彭伟,张文娟,薛钰. 斑马鱼作为骨骼疾病模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(2): 248-253.
- PENG W, ZHANG W J, XUE Y. Research progress of zebrafish as a model of bone diseases [J]. Chinese Journal of Laboratory Zoology, 2019, 27(2): 248-253.
- [23] TASHIMA T, NAGATOISHI S, SAGARA H, et al. Osteomodulin regulates diameter and alters shape of collagen fibrils. [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 463(3): 292-296.
- [24] LIN W L, ZENG Q X, ZHU Z W. Different changes in mastication between crisp grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) after heating: The relationship between texture and ultrastructure in muscle tissue [J]. Food Research International, 2008, 42(2): 271-278.
- [25] EUN H L. Ca²⁺ channels and skeletal muscle diseases [J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2010, 103(1): 35-43.
- [26] TROLLINGER D R, ISSEROFF R R, NUCCITELLI R. Calcium channel blockers inhibit galvanotaxis in human keratinocytes [J]. Journal of cellular physiology, 2002, 193(1): 1-9.
- [27] SUNIAGA S, ROLVIEN T, VOM SCHRIDT A, et al. Increased mechanical loading through controlled swimming exercise induces bone formation and mineralization in adult zebrafish [J]. Sci Rep, 2018, 26, 8(1): 3646.
- [28] 刘栋,孙永明,华俊,等. 胸、腰椎骨质疏松性骨折患者

椎体骨铁含量、血清铁蛋白与骨密度的相关性 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10(2): 104-109.
LIU D, SUN Y M, HUA J, et al. Correlation among bone iron content, serum ferritin and bone mineral density in

patients with thoracolumbar fractures [J]. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research, 2017, 10 (2): 104-109.

The effect of *omd* gene on the bone mineralization in zebrafish

WANG Qi^{1,2}, CHE Jinyuan^{1,2}, BAO Baolong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The *omd* gene encodes osteomodulin, which regulates mineralization in human bone. However, the effect of *omd* gene on bone mineralization in fish is still unclear. To explore the effect of *omd* gene on fish skeleton, we investigated the expression of *omd* gene in different developmental stages and different tissues of zebrafish. Using CRISPR/Cas9 gene editing technology, we constructed *omd* gene knockout zebrafish (*omd*^{-/-}). The results showed that the expression of *omd* gene gradually increased with development in zebrafish, and the expression was higher in vertebral column and muscle. Compared with the wild-type zebrafish, no significant changes were found in bone morphology and tail muscle structure of *omd*^{-/-} zebrafish, and the calcium content of the vertebral column was down-regulated by 59.81%. Compared with the wild type, the average swimming distance and swimming speed of *omd*^{-/-} zebrafish decreased by 33.93% and 39.44%, respectively, while the relative stationary time increased by 88.26%, and the swimming ability decreased. These results suggest that the deletion of *omd* gene affects mineralization of the vertebral column of zebrafish and affects the mobility of zebrafish to a certain extent.

Key words: *omd*; zebrafish; bone; mineralization; swimming