

文章编号: 1674-5566(2023)03-0460-12

DOI:10.12024/jsou.20211003591

## *Cilp* 基因对斑马鱼肌间骨和脊椎发育的影响

杨笑星<sup>1,2,3,4</sup>, 佟广香<sup>2,3,4</sup>, 闫婷<sup>2,3,4</sup>, 董乐<sup>1,2,3,4</sup>, 孙志鹏<sup>2,3,4</sup>, 徐欢<sup>2,3,4</sup>,  
唐国盘<sup>5</sup>, 匡友谊<sup>2,3,4</sup>

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 农业农村部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 4. 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070; 5. 河南牧业经济学院, 河南 郑州 450046)

**摘要:** 为阐明 *cilp* 基因在斑马鱼椎骨和肌间骨发育中的作用, 利用 CRISPR/Cas9 建立斑马鱼 *cilp* 基因敲除纯合突变系 (*cilp*<sup>-/-</sup>), 对其进行骨骼表型的观察, 并进一步采用 qRT-PCR 分析 14 个骨骼发育相关基因在突变体胚胎发育阶段和成鱼骨骼中的表达水平变化。结果显示: 与野生型斑马鱼相比, 90 dph (Days post hatching) *cilp*<sup>-/-</sup> 斑马鱼的肌间骨数量显著减少了 10.27%, 而肌间骨的长度无明显变化; 同时突变体斑马鱼中椎骨发生异常融合及髓棘缺失。qRT-PCR 结果显示: 与野生型相比, *coll1a1a*、*sp7*、*smad4a* 和 *smad5* 基因在胚胎发育的整个时期都存在显著的差异, 在突变体成鱼尾部骨骼组织中 *bmp2a*、*bmp2b*、*smad5*、*sp7*、*runx2a*、*runx2b* 和 *bglap* 基因的表达量均显著低于野生型, 表明 *cilp* 基因敲除导致了 BMPs 和 SMADs 家族基因的表达水平下降, 并下调了下游的成骨细胞发育相关基因的表达量, 推测 *cilp* 功能缺失可能通过抑制 BMPs 信号通路影响成骨细胞分化和骨形成, 从而导致了肌间骨数量的减少和脊椎骨异常融合。

**关键词:** *cilp*; 斑马鱼; 骨骼发育; 肌间骨; RNA 荧光原位杂交

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

斑马鱼 (*Danio rerio*) 与其他高等脊椎动物相似, 体内骨骼包括软骨与硬骨, 骨骼发育有软骨内骨化和膜内骨化两种形式<sup>[1]</sup>。其头部骨骼、脊椎骨和肋骨都是由软骨内骨化形成的<sup>[2]</sup>; 然而肌间骨 (Intermuscular bones, IBs) 则是在中轴骨骼、支鳍骨和鳍条形成后, 由膜内骨化过程从肌腱组织直接骨化形成<sup>[3]</sup>。

肌间骨是鱼类遗传育种的重要性状, 伴随生物技术的快速发展, 对肌间骨的研究逐渐由形态学深入到分子水平。目前已有研究表明肌间骨的骨化与游泳行为<sup>[4-9]</sup>、生态环境<sup>[10]</sup>及倍性<sup>[11]</sup>相关, 其发育受到 TGF- $\beta$ 、Wnt、Hedgehog 等信号通路<sup>[12]</sup>的共同影响, 也与肌腱发育、骨骼发育关键基因存在密切关联, 如: 庞天抒等<sup>[13]</sup>发现 *msxC* 基

因缺失斑马鱼尾部肌间骨平均缩短了 15% 以上; NIE 等<sup>[14]</sup>和 KAGUE 等<sup>[15]</sup>发现 *scxa* 基因的缺失能够使斑马鱼中肌间骨数量显著减少 50% ~ 70%, 同时造成斑马鱼的肋骨矿化缺陷、游泳行为异常、肌肉体积较少等不良影响。

课题组前期对镜鲤 (*Cyprinus carpio*) 转录组数据分析<sup>[16]</sup>发现软骨中间层蛋白 (Cartilage intermediate layer protein, *cilp*) 在肌间骨、肌隔组织中显著高表达, 推测其可能与肌间骨发育相关。该基因在 1998 年被 LORENZO 等<sup>[17-19]</sup>和 NAKAMURA 等<sup>[20]</sup>从人类关节软骨中分离并克隆, 蛋白序列保守, 其酶活性在关节组织中最高。随后多数的研究<sup>[21-22]</sup>证明了 *CILP* 基因与骨关节炎及腰椎间盘的退化相关。在体外与小鼠体内

收稿日期: 2021-10-19

修回日期: 2022-02-22

**基金项目:** 国家重点研发计划 (2018YFD0900102); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020XT0102); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (HSY201802Z); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (HSY202108Q); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划 (2019GGJS258)

**作者简介:** 杨笑星 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类分子育种。E-mail: 1393072122@qq.com

**通信作者:** 匡友谊, E-mail: kuangyouyi@hrfri.ac.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>

研究中也证实了 *CILP* 基因的表达受骨形态发生蛋白 (Bone morphinism proteins, BMPs)、TGF- $\beta$  (Transforming growth factor-beta) 等的诱导<sup>[23-24]</sup>。目前针对 *CILP* 基因的研究大多集中在人类医学上,但该基因是否可影响鱼类肌间骨及主轴骨骼的发育还未有报道。

本研究以斑马鱼为模型,采用 CRISPR/Cas9 技术构建 *cilp* 基因敲除品系斑马鱼 (*cilp*<sup>-/-</sup>),通过骨骼染色和骨发育相关基因的 qRT-PCR 分析,探究 *cilp* 基因对斑马鱼肌间骨和脊椎骨发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究使用的 AB 品系和 Tg (Ola. sp7: nlsGFP) 品系斑马鱼均购买自国家斑马鱼资源中心 (<http://www.zfish.cn>),饲养于中国水产科学研究院黑龙江水产研究所斑马鱼养殖系统中,养

殖水温 27.0  $\pm$  1.0  $^{\circ}$ C, pH 7.5  $\pm$  0.5。每日 8:00 ~ 9:00 和 16:00 ~ 17:00 饲喂丰年虫,自由采食 2 h/d,光照时长 14 h,3 个月即可达到性成熟。

### 1.2 *cilp* 基因 RNA 荧光原位杂交

取 90 dph (Days post hatching) Tg (Ola. sp7: nlsGFP) 斑马鱼的尾部组织,处理后使用 leica UV1900 冷冻切片 (Leica, 德国) 沿肌肉横、纵断面切片,切片厚度 20  $\mu$ m。

RNA 荧光原位杂交采用 KISHI 等<sup>[25-26]</sup> 提出的方法进行,探针序列从 BELIVEAU 等<sup>[27]</sup> 设计的斑马鱼探针序列库中提取 (<https://oligopaints.hms.harvard.edu/genome-files>),交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成 (表 1)。使用 Alexa Fluor 532 荧光探针标记 *cilp* 基因, DAPI 染料 (Thermo Fisher, CA, USA) 标记细胞核。采用 Nikon Eclipse Ti 荧光倒置显微镜 (Nikon, 上海) 采集图片,同时利用 Image J 对图像进行 merge 处理。

表 1 *cilp* 基因原位杂交探针合成引物序列

Tab. 1 Sequences of probes used for *cilp* gene RNA in situ hybridization

染色体 Chr	起始位置 Start coordinate	结束位置 End coordinate	探针位置 Target coordinate	长度 Length/bp	探针序列 Target sequences
chr7	31161330	31161371	3'UTR	42	AACATGACACACTCATAAGAGCAGTCCCCTAGGGAATGGGTTTTAATACTCTC
chr7	31161456	31161495	exon9, CDS	40	CCTTTGGCTGCTGCCAGGTGCTGTGAGCTTCCTCTCTGTTTTAATACTCTC
chr7	31161496	31161535	exon9, CDS	40	CTCCGGTTACCTCTTCCTGCCGAGCACTCCAGCTGTGGTTTTAATACTCTC
chr7	31161651	31161695	exon9, CDS	45	ATCTGAGGTACCATCAAAGCAACGGCCAAGTGAATTTCTTTGGCTTTAATACTCTC
chr7	31161723	31161766	exon9, CDS	44	ATAGATACCATAAGTTGTGGCTAGAGGTCCAGAGGTGCAAGCATTTAATACTCTC
chr7	31161767	31161808	exon9, CDS	42	TGGTGAACATCATTGTGTCTATTTGACCGCCAGTGAAGTTTTAATACTCTC
chr7	31161865	31161906	exon9, CDS	42	TGAGGCATTACCTTCACAAGGGTCCGATCCACTCTGTCTGATTTAATACTCTC
chr7	31161957	31161997	exon9, CDS	41	TGCTTGTGTCATGTCTCGAATGCTTCTGTGTGCACGAATGCTTTAATACTCTC
chr7	31162540	31162582	exon9, CDS	43	CCATTTGGCCAGTAATGACACTGTCAAATCTACCCCAAGCCCTTTAATACTCTC
chr7	31162624	31162668	exon9, CDS	45	AGACTCATCAGCACTCCTTCAGTTTGCTCACTTGGCATGTATCGCTTTAATACTCTC
chr7	31163046	31163088	exon9, CDS	43	CGCTGCTGTGAAACATCCCTGGGGCTAGAAAAGTTACGCTGTTAATACTCTC
chr7	31163347	31163386	exon9, CDS	40	CGCTCTGTGTTTGTCCGACCTGGATTGAGAATGTGCCTTTTTAATACTCTC
chr7	31163450	31163489	exon9, CDS	40	CAGTATCTGCTGCCAGGCAGTCCACGAACGATAGCTTTTTAATACTCTC
chr7	31163490	31163529	exon9, CDS	40	TGTGTCCACACATGTTTGAACCACTGCGCTCACCACCTTTAATACTCTC
chr7	31164502	31164545	exon6, CDS	44	GGGGCACAGTTACTTGGTGTGAGCATGATTACTCAAGCTTGACCTTTAATACTCTC
chr7	31164546	31164587	exon6, CDS	42	ATCAGAGTACTGTTGCCATCAGGGCAGATTCCAGGGACTTGGTTTTAATACTCTC
chr7	31164670	31164711	exon6, CDS	42	CCCCAGCACTACGAAGTGCCTAAAACGGTATGATCCTGGCTTTAATACTCTC
chr7	31164712	31164754	exon6, CDS	43	ACATGCAGCCATCACATTCAGTGTTTACAGTCCCCACAATGCATTTAATACTCTC
chr7	31165245	31165284	exon5, CDS	40	CGTGGCATGGTGGACCATGGCATGATCTGGCCCTCAACACTTTAATACTCTC
chr7	31165359	31165400	exon5, CDS	42	GCAGGACACAGACTCCAATCTGACCACTGACCCCATATTCCTTTAATACTCTC
chr7	31166316	31166355	exon4, CDS	40	CACCGCTGGGTGAGCATGAACTCTTTCCCACTGCTGCGATTTAATACTCTC
chr7	31166360	31166399	exon4, CDS	40	GGATCCAGTCCGTTGCTCCGCTCCAGAGCTCCAGGAACCTTTAATACTCTC
chr7	31169066	31169105	exon2, CDS	40	TCCTGGCTCCCTGTAATGACTCCAACCTCCGGTAAAGATTTAATACTCTC

### 1.3 CRISPR/Cas9 敲除斑马鱼 *cilp* 基因

在 chopchop 网站 (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) 在线设计斑马鱼 *cilp* 基因敲除的靶点 (表 2)。参照曹顶臣等<sup>[28]</sup> 和唐国盘等<sup>[29]</sup> 提供的

方法进行 sgRNA 的体外合成、显微注射及检测突变,使用 *cilp*-F 和 *cilp*-R (表 2) 扩增包含靶点的 DNA 序列,采用 Sanger 测序确定突变等位基因。

表 2 sgRNA 靶序列及基因分型引物序列  
Tab. 2 sgRNA target sequences and primer sequences for genotyping

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Sequence(5'→3')	用途 Usage
<i>cilp</i> -Target	TTCTAATACGACTCACTATA GGCTCAGTTCGTAGTCTGGGGG GTTTTAGAGCTAGA	基因敲除
p17-gRNA-Scaffold	GTTTTAGAGCTATAAATAGCAAGTAAAAATAAGGCTAGT CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCGACTCGGTGC	基因敲除
<i>cilp</i> -F	TGGGGACTGTAAACAGTGAATG	基因分型
<i>cilp</i> -R	GACTTGGAAGTGTCCATTGTGA	基因分型

注:下划线所示碱基为 CRISPR/Cas9 靶位点序列。

Notes: The bases marked with underline are the sequences of the target site for CRISPR/Cas9.

#### 1.4 骨骼染色

斑马鱼骨骼染色参照杨建等<sup>[30]</sup>的阿尔新蓝-茜素红染色方法进行。随机选取 90 dph *cilp*<sup>-/-</sup>突变体和野生型斑马鱼各 10 尾,4% PFA 固定 24 h 后,进行骨骼染色。使用 OLYMPUS BX53 生物显微镜观察骨骼形态,使用 CellsensDimension 软件内计测工具包统计 *cilp*<sup>-/-</sup>突变体与野生型肌间骨数量,同时测量肌间骨最长分支的长度。

#### 1.5 基因表达分析

胚胎期基因表达分析:根据胚胎发育分期<sup>[31]</sup>,采集 *cilp*<sup>-/-</sup>突变体和野生型斑马鱼 6 hpf (Hours post fertilization,原肠胚期)、12 hpf(体节期)、24 hpf(咽囊期)、48 hpf(孵化期)、72 hpf(早幼期)等 5 个发育时期的胚胎样本。每个时期取 3 组平行样本,每个样本随机采集 10 粒受精卵,提取总 RNA。胚后期基因表达分析:选取 90 dph *cilp*<sup>-/-</sup>突变体和野生型斑马鱼成鱼各 6 尾,采集尾部骨骼和肌肉组织样本用于总 RNA 提取。用 Trizol(Thermo Fisher, CA, USA)提取总 RNA,使

用 NanoDrop 8000(Thermo Fisher, CA, USA)测定总 RNA 浓度与质量,选取 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.9 ~ 2.2、质量浓度在 200 ng/μL 以上的样本进行 qRT-PCR 分析,采用 Revert Aid<sup>TM</sup>第一链 cDNA 合成试剂盒(Thermo Fisher, CA, USA)反转录 cDNA。

以 *actb1* 为内参,采用 qRT-PCR 检测 14 个基因(*bmp2a*、*bmp2b*、*bmp6*、*runx2a*、*runx2b*、*sp7*、*colla1a*、*bglap*、*sost*、*smad1*、*smad5*、*smad4a*、*sox5*、*sox6*)的表达水平,用 Primer 3 Plus 在线设计扩增引物(表 3)。qRT-PCR 在 QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR 仪中进行(Thermo Fisher, CA, USA),PCR 体系设置为 10 μL,包括 5 μL 2 × Luna Universal qPCR Master Mix(NEB, MA, USA),0.5 μL 10 μmol/L 的正、反向引物,1 μL 50 ng/μL cDNA,3 μL nuclease-free 水。扩增程序:95 °C 预变性 60 s,95 °C 变性 15 s,60 °C 延伸 30 s,循环 40 次。

表 3 骨骼发育相关基因 qRT-PCR 引物序列  
Tab. 3 Primer sequences of skeletal development related genes for qRT-PCR

基因 Gene	NCBI 登录号 NCBI accession number	上游引物(5'→3') Forward primer	下游引物(5'→3') Reverse primer
<i>bmp2a</i>	NM_131359.1	GCCAGCAGAGCCAACACTAT	GCACTTGGCTTGTTAGCGA
<i>bmp2b</i>	NM_131360.2	CAGACTTCTGGACACCCGTC	GAAGGGAACGACTGACCCTC
<i>bmp6</i>	NM_001013339.1	TTCCCGGTCTACAGGCAAAC	TAATCCAGTCTGCCAGCTC
<i>smad1</i>	NM_131356.2	CTTCCGTAACCCACTCCACC	GATCTGAGCTGGATGGCGAA
<i>smad4a</i>	NM_001122700.1	CCTCATCATCAGAAGGGGCA	AGGGCACTTTGAAGTCTCG
<i>smad5</i>	NM_001346309.1	AGGCCCTTAGTAGCTCTGGG	GAGCCGAATGGATACTCGCA
<i>runx2a</i>	NM_212858.2	GCTTCATGCTGACCCAGAT	GGATGAGGACGGAGGTTTG
<i>runx2b</i>	NM_212862.2	ACATACGGTGCTCTTTGGCT	ACCTGCTTCATCTTACC
<i>colla1a</i>	NM_199214.1	ACTTGGCTCAACCAACTGA	GAAGTGAAGCCATCGGTCA
<i>sp7</i>	NM_212863.2	CGGGAGTCTTCTTGGGATT	TTTACCGTACACCTTCCCGC
<i>bglap</i>	NM_001083857.3	GAGTCAAACCTCTGCCAGTGC	TCACACACCTCTCGAAACT
<i>sost</i>	XM_021480342.1	CCTCAGAACTCAGCTGTCCG	TGCAACGGTAATCGGAGGAG
<i>sox5</i>	NM_001033585.1	AGAGGTTGACGGACATGCTG	TCCTGCTGCTTTACTGGG
<i>sox6</i>	NM_001123009.1	CCTGGCTCAAGTCAAGGAGG	TCCGATGGGACTGGTATGT
<i>actb1</i>	NM_131031.2	GATCAAGATCATGTGCTCCCCCT	GGCCATTTAAGGTGGCAACAG

注:退火温度均为 60 °C。

Notes: The annealing temperature of each pair of primers was 60 °C.

### 1.6 数据分析

采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[32]</sup> 评估 14 个骨骼发育相关基因的表达水平,使用 SPSS 软件进行 *t* 检验 (Student's *t*-test) 分析其在 *cilp*<sup>-/-</sup> 突变体与野生型斑马鱼胚胎发育各阶段和成鱼骨骼组织中的表达水平差异及肌间骨数量和长度的显著性差异。采用 R 语言 ggplot2 软件包绘制肌间骨数量和长度以及基因表达量分布图。

## 2 结果

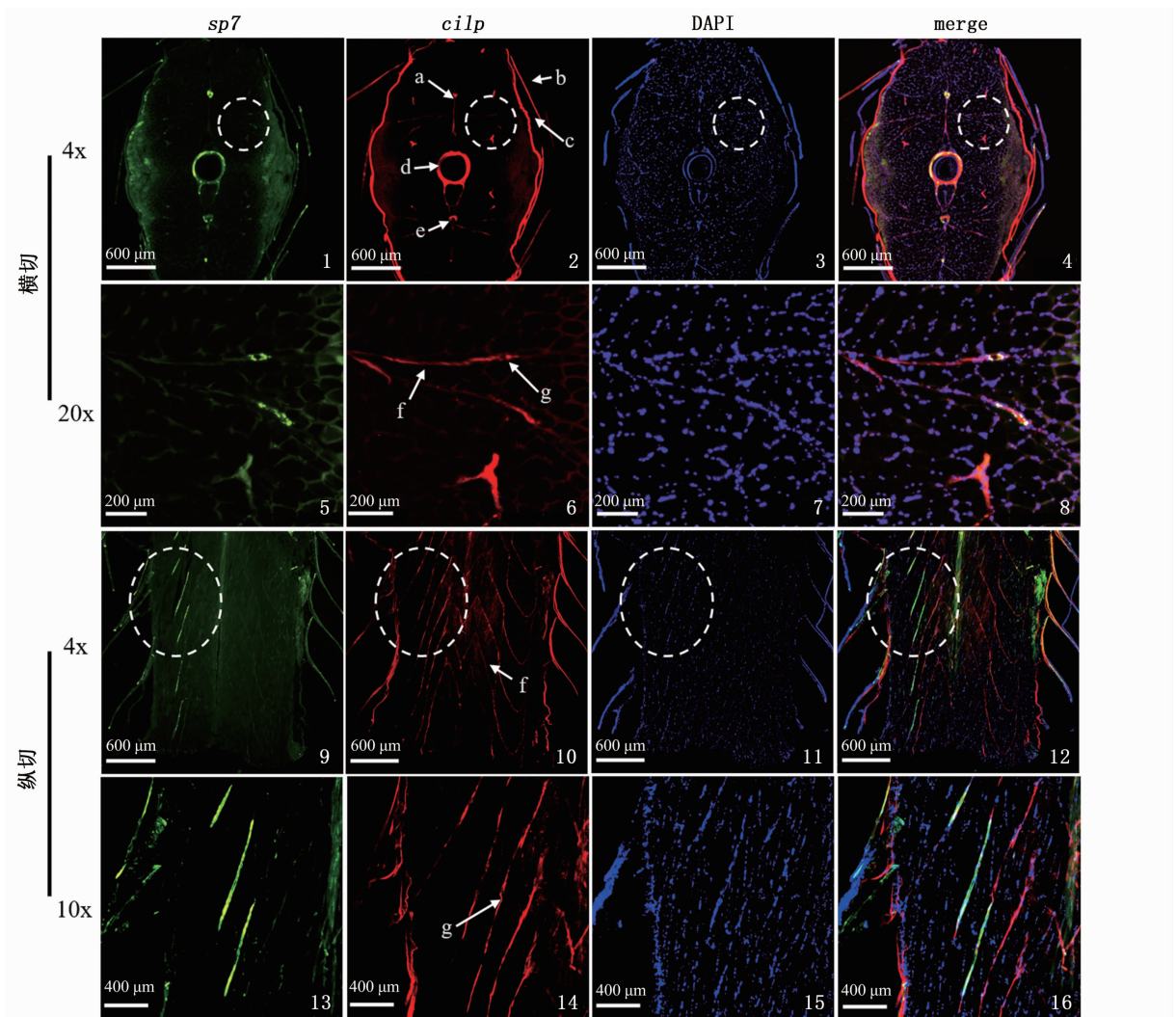
### 2.1 *cilp* 在野生型斑马鱼中的表达模式

RNA 荧光原位杂交 (图版) 横切结果显示, *cilp* 基因在鳞片、皮肤、脊椎骨、髓棘、脉棘、肌间

骨和肌隔组织中表达,且在脊椎骨和肌间骨组织表达量最高,并与成骨细胞标志基因 *sp7* 的表达重合(图版-merge)。纵切结果显示,肌间骨、肌隔、鳞片和皮肤组织均有较强的荧光信号,且在肌间骨组织中与 *sp7* 表达重合(图版-merge)。*cilp* 与成骨细胞标志基因 *sp7* 在肌间骨和椎骨组织中共表达,说明 *cilp* 可能与肌间骨和椎骨的发育有关。

### 2.2 *cilp*<sup>-/-</sup> 斑马鱼突变系构建

设计的 *cilp* 基因靶点位于第 6 个外显子 (Exon 6) 上[图 1(a)], 将由突变的 F<sub>0</sub> 亲本与野生型斑马鱼回交获得 F<sub>1</sub>。对 F<sub>1</sub> 进行检测,得到 2 个突变等位基因。经 Sanger 测序获得突变组碱基

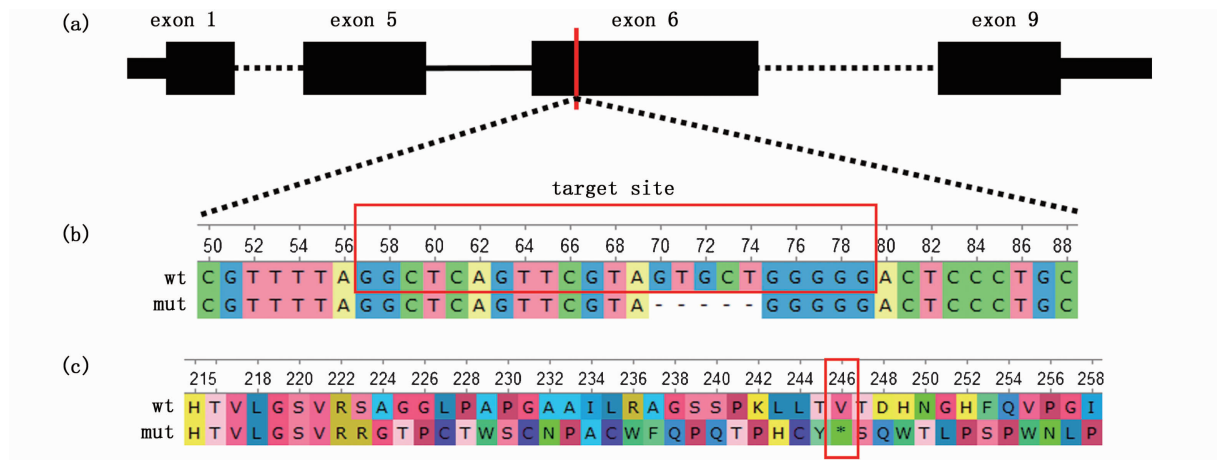


2、6、10、14 中的 a. 髓棘; b. 鳞片; c. 皮肤; d. 脊椎骨; e. 脉棘; f. 肌隔; g. 肌间骨; 1~4 和 9~12 中的虚线圆圈: 肌间骨放大部位。  
2、6、10、14. a. Neural spines; b. scales; c. skin; d. vertebra; e. haemal spines; f. myospetum; g. intermuscular bones; 1-4 and 9-12. The dashed circle indicated intermuscular bones which were observed with 20 × and 10 ×.

图版 斑马鱼尾部组织 *cilp* RNA 荧光原位杂交  
Plate RNA-FISH of *cilp* in zebrafish tail musculoskeletal tissue

序列,经比对得知其中 1 个等位基因(突变组 1)缺失 5 bp 造成移码突变[图 1(b)],蛋白质序列比对结果显示,从 223 号氨基酸处发生变异至 246 号氨基酸处出现终止密码子[图 1(c)];而另

1 个等位基因(突变组 2)缺失 3 bp 未产生移码突变(数据未显示)。将筛选出的突变组 1  $F_1$  自交,获得缺失 5 bp 的  $cilp^{-/-}$  突变系。



(a) Schematic diagram of  $cilp$  gene structure, the red vertical line represented the position of the target site for CRISPR/Cas9; (b) Mutated allele of  $cilp$ , the red box indicated sgRNA target site; (c) Amino acid sequence alignment, the red box indicated the stop codon in mutants;

wt. wild-type zebrafish; mut.  $cilp^{-/-}$  mutants.

图 1  $Cilp$  基因结构与位点突变示意图

Fig.1 Schematic diagram of  $cilp$  gene structure and mutation in target site

### 2.3 $cilp^{-/-}$ 骨骼表型变化

骨骼染色结果显示  $cilp^{-/-}$  突变体中尾鳍椎骨发育异常,且第 4 尾椎骨髓棘缺失[图 2(a-2)]。肌间骨数量及长度统计发现野生型斑马鱼肌间骨数量为 85 ~ 99 枚,平均为  $(91.50 \pm 4.95)$  枚;  $cilp^{-/-}$  突变体斑马鱼肌间骨数量为 72 ~ 90 枚,平均为  $(82.10 \pm 5.70)$  枚,对比得知  $cilp^{-/-}$  突变体中肌间骨数量减少了 10.27% [图 2(b)],显著少于野生型 ( $P < 0.01$ ),但  $cilp^{-/-}$  突变体中肌间骨长度与野生型相比无显著性差异[图 2(c)]。进一步统计了髓弓小骨及脉弓小骨的数目[图 2(a)],分析得知: $cilp^{-/-}$  突变体中髓弓小骨数目平均为  $(46.3 \pm 4.6)$  枚,野生型平均为  $(55.9 \pm 3.1)$  枚,显著减少 17.17%;  $cilp^{-/-}$  突变体中脉弓小骨数目平均为  $(36.4 \pm 2.7)$  枚,野生型平均为  $(35.5 \pm 2.0)$  枚,两者无显著差异。结果显示,  $cilp^{-/-}$  突变体斑马鱼尾椎骨异常融合,且肌间骨的数量显著减少。

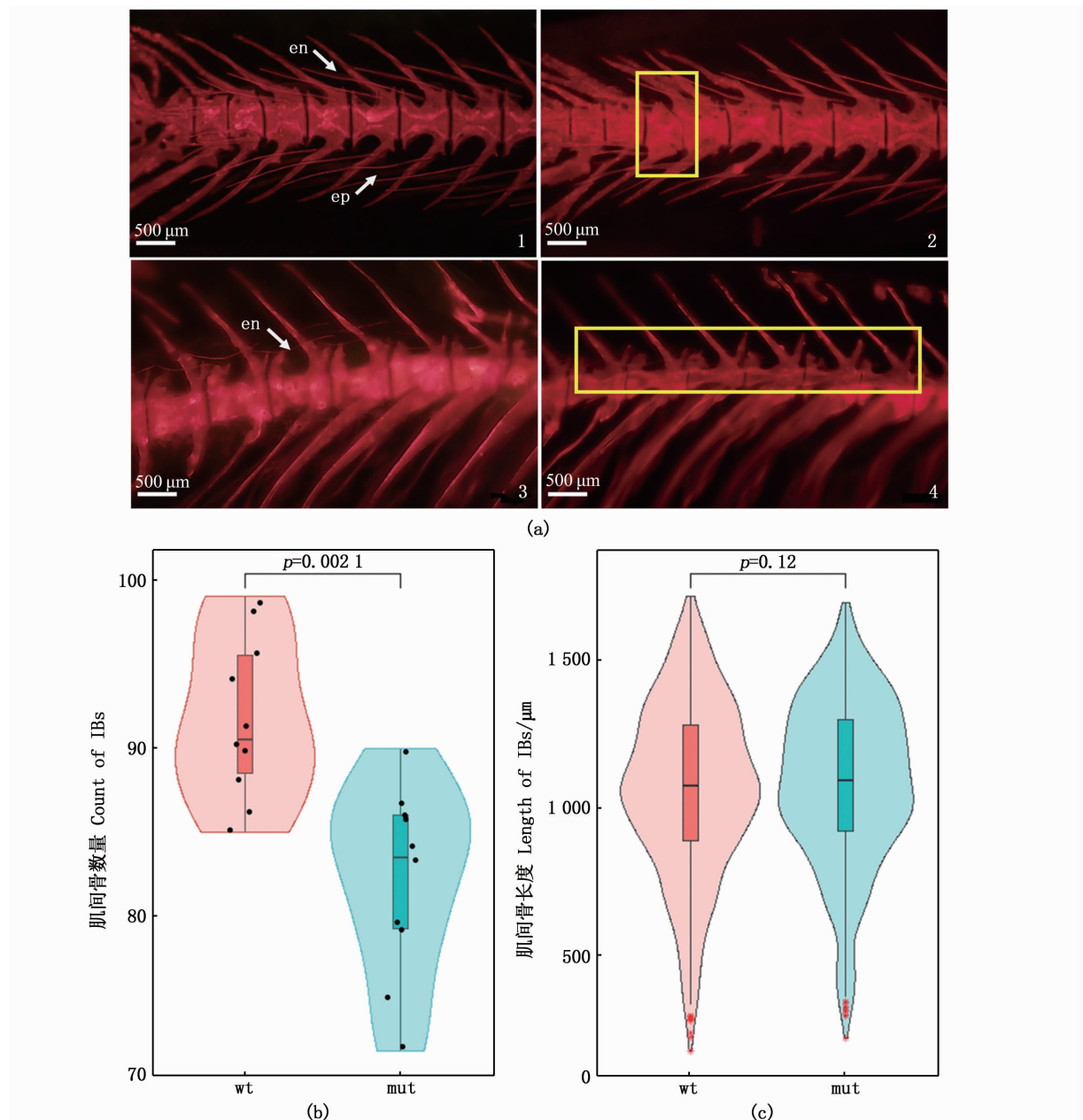
### 2.4 胚胎发育时期骨骼发育相关基因的表达

14 个骨骼发育相关基因在 5 个胚胎发育时

期的 qRT-PCR 结果(图 3)分析表明,原肠期(6 hpf),  $smad1$ 、 $runx2b$  和  $sox5$  基因在  $cilp^{-/-}$  突变体中的表达量显著高于野生型 ( $P < 0.05$ ),  $smad4a$ 、 $smad5$ 、 $coll1a1a$ 、 $sp7$  和  $bglap$  基因在突变体中的表达量都显著低于野生型 ( $P < 0.01$ ); 体节期(12 hpf),  $bmp2a$ 、 $bmp6$ 、 $smad4a$ 、 $smad5$ 、 $runx2b$ 、 $coll1a1a$ 、 $sp7$ 、 $bglap$ 、 $sost$ 、 $sox5$  和  $sox6$  基因在突变体中的表达水平平均显著高于野生型 ( $P < 0.01$ ); 咽囊期(24 hpf), 突变体中  $bmp6$ 、 $runx2a$  和  $sp7$  基因的表达量显著高于野生型 ( $P < 0.05$ ), 而  $smad4a$ 、 $smad5$ 、 $coll1a1a$ 、 $bglap$ 、 $sost$ 、 $sox5$  和  $sox6$  的表达量显著低于野生型 ( $P < 0.05$ ); 孵化期(48 hpf),  $bmp2a$ 、 $smad1$ 、 $smad4a$ 、 $smad5$ 、 $coll1a1a$ 、 $sp7$ 、 $sost$ 、 $sox5$  和  $sox6$  在突变体中的表达水平显著高于野生型 ( $P < 0.01$ ),  $runx2b$  和  $bglap$  基因在突变体中的表达水平显著低于野生型 ( $P < 0.05$ )。早期(72 hpf), 突变体中  $coll1a1a$  和  $sp7$  基因的表达量显著高于野生型 ( $P < 0.01$ ), 而  $bmp2a$ 、 $smad1$ 、 $smad4a$ 、 $smad5$ 、 $runx2b$ 、 $sost$ 、 $sox5$  和  $sox6$  的表达量则显著低于野生型 ( $P < 0.05$ )。根据以上

结果得知, *bmp2b* 在野生型和突变体的 5 个胚胎发育时期的表达量均无显著性差异, 而 *smad4a*、*smad5*、*sp7*、*coll1a1a* 和 *sox5* 在野生型和突变体的

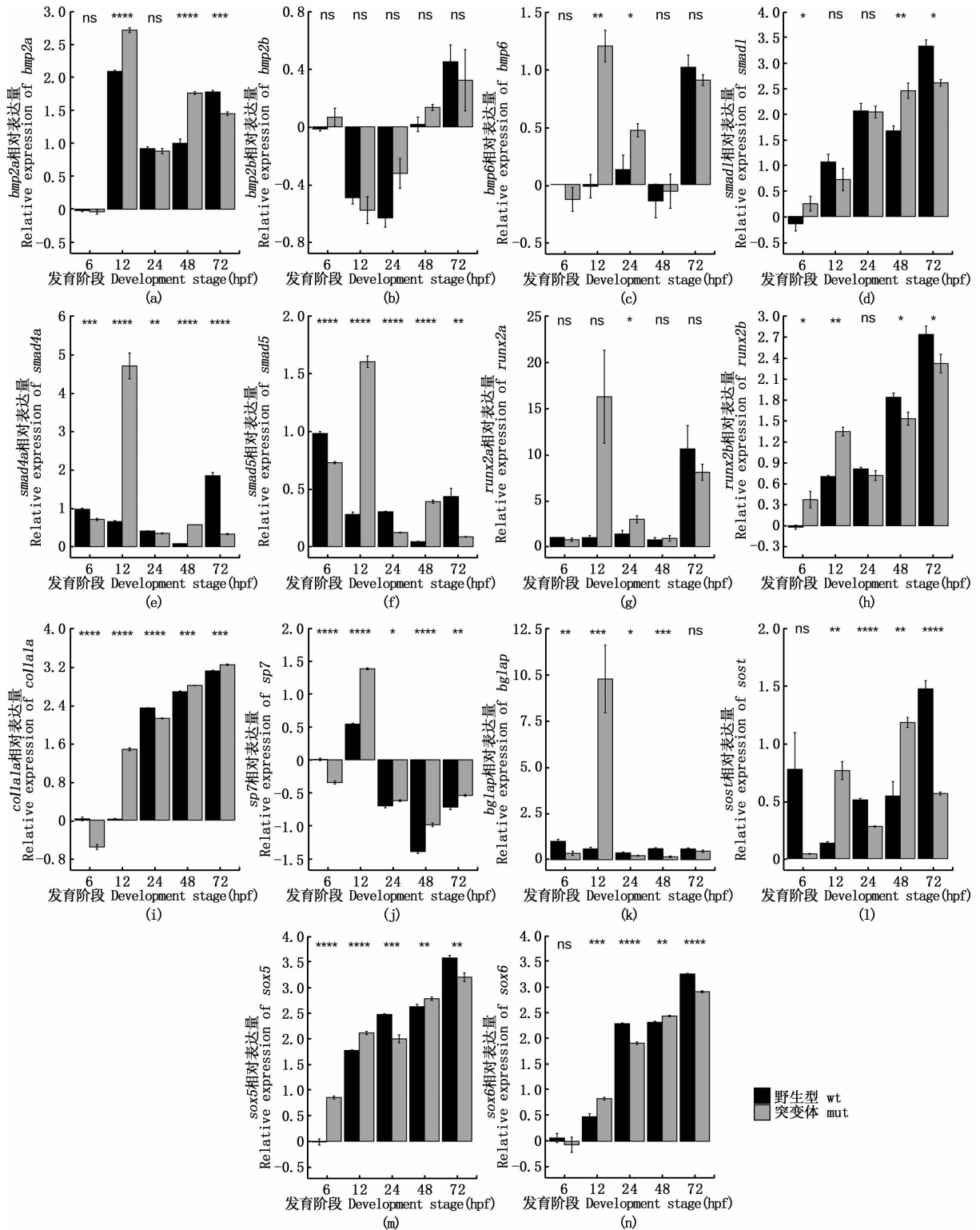
5 个胚胎发育时期的表达量均体现出显著性差异。



(a) 斑马鱼硬骨染色, 1 和 3 为野生型, 2 和 4 为突变体, en. 髓弓小骨, ep. 脉弓小骨, b 中方框是髓棘缺失部位, d 中方框内为肌间刺缺失部位; (b) 肌间骨数量比较; (c) 肌间骨长度比较; wt. 野生型; mut. *cilp*<sup>-/-</sup>。  
 (a) Bones staining in zebrafish, 1 and 3 are wild type, 2 and 4 are mutants, en. ossified epineurals, ep. ossified epipleurals, the box in b shows the abnormal fusion of the caudal vertebrae and the loss of the neural spines, the box in d shows where the disappearance of intermuscular bones; (b) Comparison on the count of intermuscular bones in *cilp*<sup>-/-</sup> mutants and wild-type zebrafish; (c) Comparison on the length of intermuscular bones in *cilp*<sup>-/-</sup> mutants and wild-type zebrafish; wt. wild-type zebrafish; mut. *cilp*<sup>-/-</sup> mutants.

图 2 斑马鱼 *cilp*<sup>-/-</sup> 突变体骨骼表型

Fig. 2 Phenotypes of the intermuscular bones and skeleton in zebrafish *cilp*<sup>-/-</sup> mutants



以 *actb1* 为内参, *bmp2a*、*bmp2b*、*bmp6*、*smad1*、*runx2b*、*coll1a1*、*sp7*、*sox5* 和 *sox6* 基因表达量以  $\lg(2^{-\Delta\Delta C_t})$  的均值  $\pm$  标准差 ( $n=3$ ) 表示, 其余基因的表达量采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的均值  $\pm$  标准差 ( $n=3$ ) 表示。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns, 表示无显著性差异。

The gene expression levels were normalized by the expression of reference gene *actb1*, the expression of *bmp2a*, *bmp2b*, *bmp6*, *smad1*, *runx2b*, *coll1a1*, *sp7*, *sox5* and *sox6* was presented as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ) of  $\lg(2^{-\Delta\Delta C_t})$ , whereas the gene expression of other genes was presented as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ) of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns = no significance.

图3 胚胎发育时期 14 个骨发育相关基因的表达水平

Fig. 3 Expressed levels of 14 genes related to bone development at 5 embryonic developmental stages

## 2.5 成鱼骨骼组织中骨骼发育相关基因的表达

14 个骨骼发育相关基因在成鱼骨骼组织中的表达量分析表明, *bmp2a*、*bmp2b*、*smad5*、*sp7*、*runx2a*、*runx2b* 和 *bglap* 基因在 *cilp*<sup>-/-</sup> 突变体骨骼组织中的表达量均显著低于野生型 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。其余基因在突变体中的表达水平与野生型无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

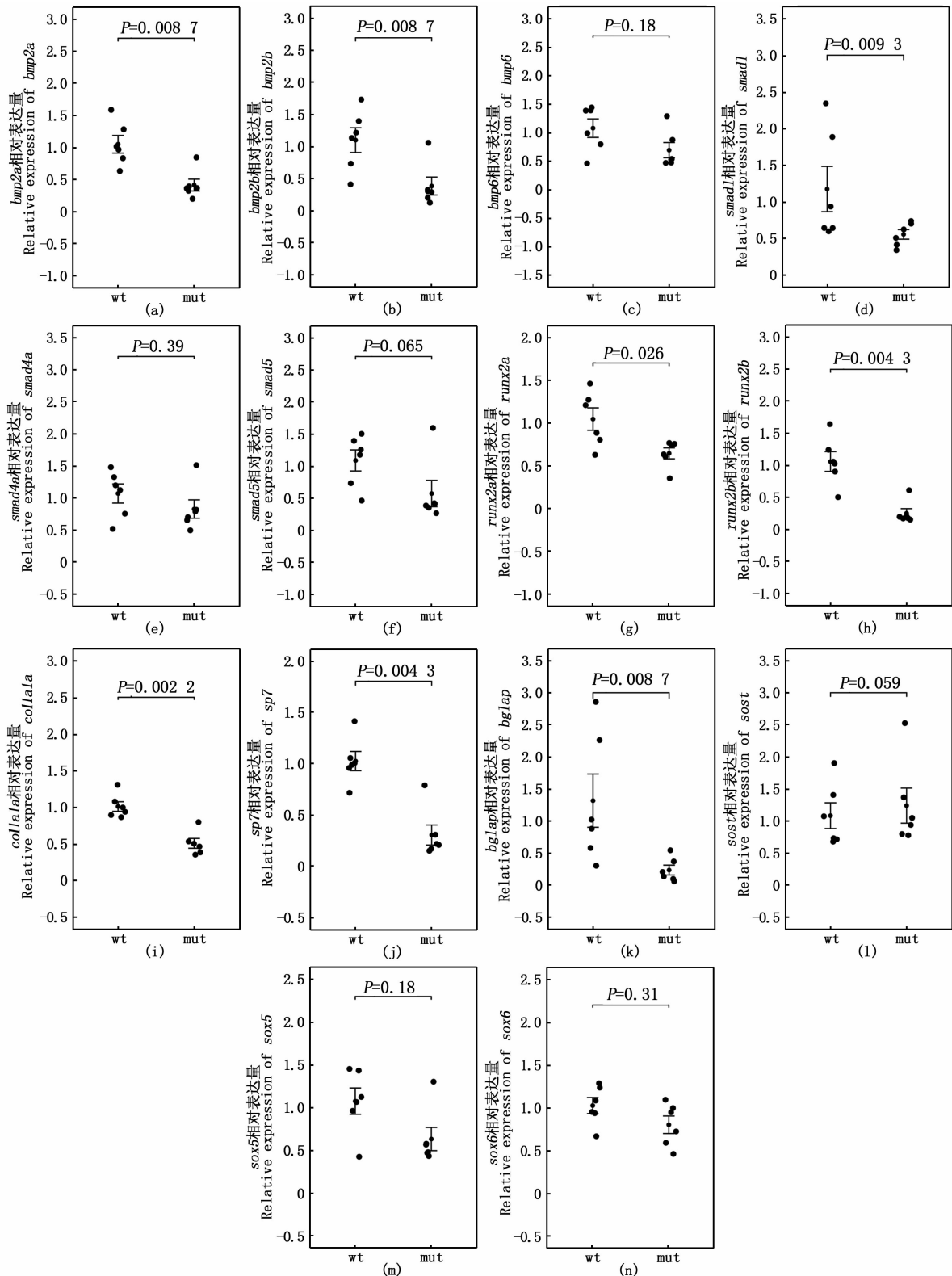
研究表明, *cilp* 基因在小鼠的关节软骨中间区域表达量最高, 在骨骼肌及心脏中也有表达<sup>[33]</sup>, 在许多骨骼退行性疾病及心脏纤维化疾病中发挥重要的作用<sup>[34-37]</sup>。本研究发现 *cilp* 基因在斑马鱼肌间骨、肌隔、脊椎骨及皮肤中表达, 并在肌间骨和椎骨组织中与成骨标志基因 *sp7* 共表达, 因此推测 *cilp* 基因与斑马鱼的椎骨和肌间骨的发育可能存在一定的相关性。经骨骼染色发现 *cilp*<sup>-/-</sup> 斑马鱼尾椎骨之间发生融合及髓棘缺失, 且肌间骨总数显著减少, 说明 *cilp* 基因与脊椎骨和肌间骨的发育有关。

骨骼的发育受到骨形态发生蛋白和 TGF- $\beta$  信号通路的调控, 主要包括 BMPs 家族和 SMADs 家族相关的基因。BMPs 家族能够诱导成骨、成软骨及成脂细胞的发育<sup>[38-39]</sup>。SMADs 蛋白家族 (Mothers against decapentaplegic protein, SMADs) 是 TGF- $\beta$  超家族的重要细胞因子, 研究表明, BMPs 信号通路的调控主要是依赖 SMADs 蛋白家族来引发细胞的应答<sup>[40-41]</sup>, 并调控下游基因 *runx2a*<sup>[42-43]</sup> 的表达。*runx2a* 作为一种成骨特异性转录因子, 其表达是间充质细胞向成骨细胞分化的重要标志, 它能够调控成骨细胞标志基因 *sp7*、*col1a1a*、*bglap*<sup>[44-45]</sup> 等基因的表达。本研究中选择的 14 个骨发育相关基因可以分为 6 类: BMP 信号通路的信号分子 (*bmp2a*、*bmp2b* 和 *bmp6*)、信号转导成员 (*smad1*、*smad4a*、*smad5*)、成骨细胞分

化和发育的关键转录因子 (*runx2a*、*runx2b*、*sp7*)、细胞外基质蛋白基因 (*col1a1a*、*bglap*)、骨细胞标志基因 *sost* 和软骨细胞发育分化调控基因 (*sox5* 和 *sox6*)。本研究中 5 个胚胎发育时期的基因表达分析表明, 除 *bmp2b* 外这 6 类基因在 *cilp*<sup>-/-</sup> 突变体胚胎中的表达量均发生了不同程度的显著性变化, 虽然它们的变化趋势并不一致, 但可以肯定的是 *cilp* 的敲除导致了 BMP 信号通路相关基因表达的紊乱, 从而影响了成骨细胞和软骨细胞发育相关调控基因的表达。本研究中 90 dph 成鱼骨骼组织的基因表达分析进一步表明, *bmp2a*、*bmp2b*、*smad5*、*runx2a*、*runx2b*、*sp7* 和 *bglap* 的表达量在 *cilp*<sup>-/-</sup> 突变体中均显著下调, 说明 *cilp* 基因敲除可能通过抑制 BMP 信号通路, 下调成骨细胞发育关键转录因子的表达, 从而影响了成骨细胞的发育。但 *sox5* 和 *sox6* 的表达量并未发生显著性变化, 说明 *cilp* 基因突变可能未影响软骨细胞的发育和分化, 仅作用于成骨细胞。结合 *cilp*<sup>-/-</sup> 突变体的椎骨异常融合和肌间骨数量显著减少的骨骼表型变化, 推测 *cilp* 基因功能缺失可能通过 BMP 信号通路影响成骨细胞的发育, 从而使椎骨异常融合和肌间骨数量减少。

综上, 本研究在斑马鱼中进行了 *cilp* 基因的空间表达定位分析, 明确了其在肌间骨和椎骨组织中与成骨细胞标志基因 *sp7* 共表达; 在斑马鱼上构建了 *cilp* 基因敲除纯合系, 发现敲除 *cilp* 基因使斑马鱼肌间骨的数量显著减少, 并造成了椎骨的异常缺失与融合。骨发育相关基因的表达分析表明, *cilp* 基因的敲除使 BMP 信号通路和成骨细胞发育相关基因表达紊乱, 推测 *cilp* 基因可能通过 BMP 信号通路影响脊椎骨和肌间骨的发育。本研究初步探索了 *cilp* 基因的功能, 为进一步研究鱼类骨骼和肌间骨发育的分子调控机制提供了科学依据。





以 *actb1* 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  的均值  $\pm$  标准差 ( $n=6$ ) 表示突变体与野生型斑马鱼 14 个骨骼发育相关基因表达水平; wt, 野生型; mut, *cilp*<sup>-/-</sup>。

The gene expression levels are normalized by the expression of reference gene *actb1*. Data are presented as Mean  $\pm$  SD of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ( $n=6$ ); wt, wild-type zebrafish; mut, *cilp*<sup>-/-</sup> mutants.

图 4 14 个骨发育相关基因在 90 dph 突变体和野生型斑马鱼骨骼组织的表达分析  
 Fig. 4 The expression levels of 14 genes related to bone development in bone tissues of 90 dph *cilp*<sup>-/-</sup> mutants and wild-type zebrafish

## 参考文献:

- [1] JAVIDAN Y, SCHILLING T F. Development of cartilage and bone[J]. *Methods in Cell Biology*, 2004, 76: 415-436.
- [2] 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 models of bone diseases [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2019, 27(2): 248-253.
- [3] 秉志. 幼鲤大侧肌隔骨针的观察[J]. *动物学报*, 1962, 14(2): 175-179.
- BING Z. On the myoseptal spines of the carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1962, 14(2): 175-179.
- [4] 柯中和, 张炜, 蒋燕, 等. 鲢肌间小骨发育的形态学观察[J]. *动物学杂志*, 2008, 43(6): 88-96.
- KE Z H, ZHANG W, JIANG Y, et al. Developmental morphology of the intermuscular bone in *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, 43(6): 88-96.
- [5] 万世明, 易少奎, 仲嘉, 等. 团头鲂肌间骨发育的形态学观察[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(6): 1143-1151.
- WAN S M, YI S K, ZHONG J, et al. Developmental and morphological observation of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1143-1151.
- [6] 陈琳, 田雪, 米佳丽, 等. 黄河鲤鱼肌间骨发育的形态学观察[J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(4): 481-489.
- CHEN L, TIAN X, MI J L, et al. Developmental and morphological study of intermuscular bones in *Cyprinus carpio haematopterus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(4): 481-489.
- [7] YAO W J, LYU Y P, GONG X L, et al. Different ossification patterns of intermuscular bones in fish with different swimming modes [J]. *Biology Open*, 2015, 4(12): 1727-1732.
- [8] 姚文杰, 龚小玲, 吕耀平, 等. 日本鳗鲡肌间小骨的骨化过程[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(6): 810-813.
- YAO W J, GONG X L, LYU Y P, et al. The ossificational process of the intermuscular bones in *Anguilla japonica* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(6): 810-813.
- [9] 聂春红, 陈祖萱, 戴彩娇, 等. 不同鱼类肌间骨的骨化模式研究[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(1): 131-137.
- NIE C H, CHEN Z X, DAI C J, et al. Ossification patterns of intermuscular bones in different fish species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(1): 131-137.
- [10] YANG K F, PAN X F, WANG X A, et al. Quantitative variation and morphotype of intermuscular bones in *Sinocyclocheilus cavefish* [J]. *Cave Research*, 2015, 1(2): 1-4.
- [11] 黎玲, 钟泽州, 曾鸣, 等. 不同倍性鱼肌间骨的比较分析[J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(3): 189-200.
- LI L, ZHONG Z Z, ZENG M, et al. Comparative analysis of intermuscular bones in fish of different ploidy [J]. *Science China: Life Sciences*, 2013, 56(4): 341-350.
- [12] NIE C H, WAN S M, LIU Y L, et al. Development of teleost intermuscular bones undergoing intramembranous ossification based on histological-transcriptomic-proteomic data [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(19): 4698.
- [13] 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 S, CHE J Y, FAN C X, et al. Role of *MsxC* gene in the development of intermuscular bones and axial muscle in zebrafish [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(2): 328-335.
- [14] NIE C H, WAN S M, CHEN Y L, et al. Loss of scleraxis leads to distinct reduction of mineralized intermuscular bone in zebrafish [J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2021, 6(2): 169-177.
- [15] KAGUE E, HUGHES S M, LAWRENCE E A, et al. Scleraxis genes are required for normal musculoskeletal development and for rib growth and mineralization in zebrafish [J]. *The FASEB Journal*, 2019, 33(8): 9116-9130.
- [16] 唐国盘. 镜鲤肌间骨 QTL 定位及相关基因的功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- TANG G P. QTL mapping and functional studies of genes associated with intermuscular bones in mirror carp (*Cyprinus carpio*) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.
- [17] LORENZO P, BAYLISS M T, HEINEGÅRD D. A novel cartilage protein (CILP) present in the mid-zone of human articular cartilage increases with age [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(36): 23463-23468.
- [18] LORENZO P, NEAME P, SOMMARIN Y, et al. Cloning and deduced amino acid sequence of a novel cartilage protein (CILP) identifies a proform including a nucleotide pyrophosphohydrolase [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(36): 23469-23475.
- [19] LORENZO P, AMAN P, SOMMARIN Y, et al. The human *CILP* gene: exon/intron organization and chromosomal mapping [J]. *Matrix Biology*, 1999, 18(5): 445-454.
- [20] NAKAMURA I, OKAWA A, IKEGAWA S, et al. Genomic organization, mapping, and polymorphisms of the gene encoding human cartilage intermediate layer protein (CILP) [J]. *Journal of Human Genetics*, 1999, 44(3): 203-205.
- [21] HARSHITHA S M, SIBIN M K, CHETAN G K, et al. Association of *CILP*, *COL9A2* and *MMP3* gene polymorphisms with lumbar disc degeneration in an indian population [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2018, 66(3): 378-382.
- [22] TAIPALE M, SOLOVIEVA S, LEINO-ARJAS P, et al. Functional polymorphisms in asporin and *CILP* together with joint loading predispose to hand osteoarthritis [J]. *BMC*

- Genetics, 2017, 18(1): 108.
- [23] WANG Z L, KIM J H, HIGASHINO K, et al. Cartilage intermediate layer protein (CILP) regulation in intervertebral discs. The effect of age, degeneration, and bone morphogenetic protein-2[J]. Spine, 2012, 37(4): E203-E208.
- [24] SEKI S, TSUMAKI N, MOTOMURA H, et al. Cartilage intermediate layer protein promotes lumbar disc degeneration [ J ]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 446(4): 876-881.
- [25] KISHI J Y, LAPAN S W, BELIVEAU B J, et al. SABER amplifies FISH: enhanced multiplexed imaging of RNA and DNA in cells and tissues [ J ]. Nature Methods, 2019, 16(6): 533-544.
- [26] KISHI J Y, SCHAUS T E, GOPALKRISHNAN N, et al. Programmable autonomous synthesis of single-stranded DNA [ J ]. Nature Chemistry, 2018, 10(2): 155-164.
- [27] BELIVEAU B J, KISHI J Y, NIR G, et al. Oligomimer provides a rapid, flexible environment for the design of genome-scale oligonucleotide in situ hybridization probes [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(10): E2183-E2192.
- [28] 曹顶臣, 佟广香, 吕伟华, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 *ifit30* 基因 [ J ]. 水产学杂志, 2016, 29(6): 26-30.
- CAO D C, TONG G X, LYU W H, et al. Knock out of interferon-gamma-inducible gene 30 in zebrafish by CRISPR/Cas9 [ J ]. Chinese Journal of Fisheries, 2016, 29(6): 26-30.
- [29] 唐国盘, 黄安群, 孙志鹏, 等. 三种 CRISPR/Cas9 基因敲除变异检测方法的比较分析 [ J ]. 淡水渔业, 2019, 49(2): 20-26.
- TANG G P, HUANG A Q, SUN Z P, et al. Comparative analysis of three methods for detecting gene mutation using CRISPR/Cas9 knockdown system [ J ]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(2): 20-26.
- [30] 杨建, 佟广香, 郑先虎, 等. 肌间刺缺失对斑马鱼骨骼发育的影响 [ J ]. 水生生物学报, 2020, 44(3): 546-553.
- YANG J, TONG G X, ZHENG X H, et al. Comparative analysis of skeletal development between wildtype zebrafish and intermuscular bone-deficient mutants [ J ]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(3): 546-553.
- [31] KIMMEL C B, BALLARD W W, KIMMEL S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [ J ]. Developmental Dynamics, 1995, 203(3): 253-310.
- [32] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [ J ]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [33] BERNARDO B C, BELLUOCIO D, ROWLEY L, et al. Cartilage intermediate layer protein 2 (CILP-2) is expressed in articular and meniscal cartilage and down-regulated in experimental osteoarthritis [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(43): 37758-37767.
- [34] MCLELLAN M A, SKELLY D A, DONA M S I, et al. High-resolution transcriptomic profiling of the heart during chronic stress reveals cellular drivers of cardiac fibrosis and hypertrophy [ J ]. Circulation Research, 2020, 142(15): 1448-1463.
- [35] SEKI S, KAWAGUCHI Y, CHIBA K, et al. A functional SNP in *CILP*, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease [ J ]. Nature Genetics, 2005, 37(6): 607-612.
- [36] YAO Z, NAKAMURA H, MASUKO-HONGO K, et al. Characterisation of cartilage intermediate layer protein (CILP)-induced arthropathy in mice [ J ]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2004, 63(3): 252-258.
- [37] GROß S, THUM T. TGF- $\beta$  inhibitor CILP as a novel biomarker for cardiac fibrosis [ J ]. JACC: Basic to Translational Science, 2020, 5(5): 444-446.
- [38] 安新玲, 韩金祥, 王世立. 骨形态发生蛋白的研究进展 [ J ]. 食品与药品, 2009, 11(11): 69-73.
- AN X L, HAN J X, WANG S L. Progress on bone morphogenetic protein [ J ]. Food and Drug, 2009, 11(11): 69-73.
- [39] 车家驹, 金旭红, 戴涛. BMP 在 BMSC 成骨、软骨分化中作用及机制的研究进展 [ J ]. 山东医药, 2020, 60(16): 99-101.
- CHE J J, JIN X H, DAI T. Reserch progress on the role and mechanism of BMP in BMSC osteogenesis and bone marrow differentiation [ J ]. Shandong Medical Journal, 2020, 60(16): 99-101.
- [40] JEON E J, LEE K Y, CHOI N S, et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(24): 16502-16511.
- [41] LIU T J, GAO Y H, SAKAMOTO K, et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines [ J ]. Journal of Cellular Physiology, 2007, 211(3): 728-735.
- [42] GUZMAN A, ZELMAN-FEMIAK M, BOERGERMANN J H, et al. SMAD versus non-SMAD signaling is determined by lateral mobility of bone morphogenetic protein (BMP) receptors [ J ]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(47): 39492-39504.
- [43] NISHIMURA R, HATA K, IKEDA F, et al. The role of smads in BMP signaling [ J ]. Frontiers in Bioscience-Landmark, 2003, 8(6): 275-284.
- [44] CHEN Z J, SONG Z Y, YANG J J, et al. *Sp7/Osterix* positively regulates *dlx2b* and *bglap* to affect tooth development and bone mineralization in zebrafish larvae [ J ]. Journal of Biosciences, 2019, 44(6): 127.
- [45] KOMORI T. Runx2, An inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation [ J ]. Histochemistry and Cell Biology, 2018, 149(4): 313-323.

## Effect of *cilp* on the development of the intermuscular bones and vertebra in zebrafish

YANG Xiaoxing<sup>1,2,3,4</sup>, TONG Guangxiang<sup>2,3,4</sup>, YAN Ting<sup>2,3,4</sup>, DONG Le<sup>1,2,3,4</sup>, SUN Zhipeng<sup>2,3,4</sup>, XU Huan<sup>2,3,4</sup>, TANG Guopan<sup>5</sup>, KUANG Youyi<sup>2,3,4</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 3. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 4. National and Local Joint Engineering Laboratory for Freshwater Fish Breeding, Harbin 150070, Heilongjiang, China; 5. Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, Henan, China)

**Abstract:** To investigate the molecular mechanism of *cilp* in the development of vertebrae and intermuscular bones in zebrafish, we established a zebrafish *cilp*<sup>-/-</sup> homozygous mutant strain by CRISPR/Cas9. The bones staining of wild type zebrafish and *cilp*<sup>-/-</sup> strain showed that the loss function of *cilp* caused abnormal fusion of vertebrae and deficiency of neural spine in mutants, and the number of intermuscular bones in *cilp*<sup>-/-</sup> strain was significantly reduced by 10.27%, while the length of intermuscular bones did not change significantly. Furthermore, we analyzed the expression levels of 14 bone development-related genes in five embryonic development stages and 90 dph (days post hatching) adult fish skeletal tissue. The results showed that the *coll1a1a*, *sp7*, *smad4a*, and *smad5* genes were significantly differentially expression throughout the embryonic development stages compared to the wild type, the expression levels of *bmp2a*, *bmp2b*, *smad5*, *sp7*, *runx2a*, *runx2b*, and *bglap* in the skeleton of the 90 dph mutant adult fish were significantly lower than those of the wild type zebrafish, which indicated that the *cilp* gene knockout down-regulated the expression levels of genes in BMPs and SMADs families which consequentially repressed the expression of genes related to osteoblast development. In summary, dysfunctions of the *cilp* gene might affect the development of intermuscular bones and skeleton in zebrafish by suppressing the BMPs signaling pathway to affect the development of osteoblasts and bones formation.

**Key words:** *cilp*; zebrafish; skeletal development; intermuscular bone; RNA-FISH