水产学报
JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA
DOI: 10.11964/jfc.20241214817
Science Press

王文秀, 陈宇龙, 肖正雨, 等. *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因在斑马鱼骨骼发育中的功能分化 [J]. 水产学报, 2026, 50(1): 019102.
Wang W X, Chen Y L, Xiao Z Y, *et al*. Functional differentiation of *pcolcea* and *pcolceb* genes in bone development in *Danio rerio* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(1): 019102 (in Chinese).

pcolcea 和 *pcolceb* 基因在斑马鱼骨骼发育中的功能分化

王文秀[1]，陈宇龙[1]，肖正雨[1]，高泽霞[1,2,3]，聂春红[1,2*]
(1. 华中农业大学水产学院，农业农村部淡水生物繁育重点实验室，
长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心，湖北 武汉　430070；
2. 湖北洪山实验室，湖北 武汉　430070；
3. 湖北省名优鱼育种与健康养殖工程技术研究中心，湖北 武汉　430070)

摘要：【目的】探究硬骨鱼类前胶原蛋白酶增强因子（PCOLCE）的 2 种亚型（*pcolcea* 和 *pcolceb*）在斑马鱼骨骼发育中的作用。【方法】采用生物信息学分析、原位杂交、荧光定量 PCR、CRISPR/Cas9 基因编辑及显微型计算机断层扫描等分析技术和实验手段以明确斑马鱼 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因的序列特征、蛋白结构、组织表达以及功能缺失对骨骼发育的影响。【结果】*pcolcea* 和 *pcolceb* 基因主要在脊椎、头部和胸鳍表达。与野生型斑马鱼相比，*pcolcea*$^{-/-}$斑马鱼和 *pcolcea*$^{-/-}$;*pcolceb*$^{-/-}$双突变斑马鱼脊椎骨的密度显著降低，而 *pcolceb*$^{-/-}$斑马鱼与野生型相比无显著性差异。在 *pcolcea*$^{-/-}$突变体的尾部椎骨中，*bmp1b*、*col1a1a*、*col1a2*、*runx2b*、*alpl*、*sp7* 基因的表达显著下调，在 *pcolcea*$^{-/-}$;*pcolceb*$^{-/-}$双突变体的尾部椎骨中，*bmp1b*、*col1a1a*、*col1a1b*、*col1a2*、*runx2b*、*entpd5a*、*bglap*、*sp7* 基因的表达均显著低于野生型斑马鱼。【结论】*pcolcea* 基因功能的丧失会影响斑马鱼骨骼组织的正常矿化，且 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因的同时缺失会显著加重该表型。本研究揭示了 *pcolcea* 和 *pcolceb* 在斑马鱼骨骼发育中的作用，为进一步研究鱼类骨骼发育的分子调控机制提供了科学依据。

关键词：斑马鱼；*pcolcea*；*pcolceb*；骨骼发育；CRISPR/Cas9；基因表达
中图分类号：S 917.4　　**文献标志码：**A

骨骼的矿化在骨发育过程中十分重要，骨骼的形成需要胶原蛋白的参与[1]。早期研究发现，前胶原 C 端蛋白酶增强蛋白 (procollagen C-proteinase enhancer protein，PCOLCE) 是一种分泌型蛋白，能通过增强前胶原蛋白酶的活性来参与细胞外基质的重建[2]，包含 3 个主要的蛋白结构域：2 个 CUB (module found in complement subcomponents C1r/C1s, Uegf and BMP-1) 结构域和 1 个 C 端 NTR (netrin-like) 结构域[3]。前胶原 C 端蛋白酶 (procollagen C proteinase，pCP) 切割 I、II、III 型

收稿日期：2024-12-21　　**修回日期：**2025-04-28
资助项目：国家自然科学基金青年科学基金 (32202917)；国家自然科学基金重点项目 (32330108)；中央高校基本科研业务费专项 (2662023SCQD002)；湖北省自然科学基金 (2022CFB819)
第一作者：王文秀，从事鱼类遗传育种与繁育研究，E-mail：wangkaka@webmail.hzau.edu.cn
通信作者：聂春红，从事鱼类遗传育种研究，E-mail：chunhongnie@mail.hzau.edu.cn

前胶原 C 前肽，是合成脊椎动物细胞外基质主要纤维成分的必要步骤[4]。前胶原 C 前肽由骨形态发生蛋白 1 (bone morphogenetic protein 1，BMP1) 和相关金属蛋白酶所提供的 pCPs 活性切割[5-6]。PCOLCE 是通过其 CUB 结构域与前胶原 III 的 C-前体肽以及通过其 NTR 结构域与肝素硫酸酯结合，来增强 BMP-1 的活性，促进胶原前体的成熟，从而加快胶原蛋白的形成[7-8]。

PCOLCE 在富含 I 型胶原蛋白的结缔组织和纤维化组织中含量丰富，是胶原蛋白沉积的正调节因子[3]，其表达失调与多种疾病的发生发展相关。Xiang 等[9] 发现 PCOLCE 在胃癌肿瘤组织中表达上调，被视为一种新的免疫浸润的预后生物标志物。Massoudi 等[10] 表示 PCOLCE 的缺乏可能会导致角膜修复缺陷。Wang 等[2] 发现 TWIST1 能够促进 PCOLCE 的表达，加快骨肉瘤细胞的侵袭和转移，从而减小骨肉瘤患者的生存概率。此外，研究表明 *pcolce* 基因在发育中的骨骼中表达水平较高[3]，*pcolce* 基因的表达对骨骼的发育具有重要的作用。在小鼠 (*Mus musculus*) 中，*pcolce* 基因表达下调会导致成熟的 I 型胶原蛋白含量下降，*pcolce* $^{-/-}$ 雄性小鼠股骨骨质降低[4]。由于真骨鱼类基因组复制事件，斑马鱼 (*Danio rerio*) 包含 *pcolce* 基因的 2 个亚型，*pcolcea* 和 *pcolceb*。在斑马鱼中，通过 MO (morpholine) 注射引起的斑马鱼 *pcolceb* 基因的表达降低，会导致斑马鱼胚胎背部化发育异常[11]。尽管有研究显示 *pcolce* 基因在脊椎动物骨骼发育中发挥一定作用，但 *pcolce* 基因在斑马鱼中调控骨骼发育的分子机制尚不清楚。

前期实验室已发表的 60 dpf (受精后 60 d) 斑马鱼尾部肌肉 (含肌间刺) 单细胞转录组数据发现，*pcolcea* 基因在肌腱细胞、成骨细胞中均有表达，而 *pcolceb* 基因在成骨细胞中特异表达[12]，以上结果表明 *pcolcea* 与 *pcolceb* 基因可能在骨骼发育中存在功能分化。因此，本研究在利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因敲除斑马鱼品系的基础上，通过突变体表型观察和功能基因表达分析，探讨 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因对鱼类骨骼发育的调控作用。

1　材料与方法

1.1　实验材料

实验中所使用的野生型 AB 品系斑马鱼亲本均由中国科学院水生生物研究所提供，后代在华中农业大学水产学院繁殖饲养，水温保持在 28℃，光暗交替周期为 14 h 光照和 10 h 黑暗。斑马鱼胚胎在 28℃ 下培养，5~14 dpf 饲喂草履虫，14 dpf 后饲喂丰年虫。实验采集了以下组织样品：20 尾 20 dpf 野生型斑马鱼的尾部肌肉，30、45、60 及 90 dpf 野生型鱼 (各 9 尾) 的尾部肌肉，以及 10 尾 5 月龄野生型和 3 种 5 月龄突变体鱼 (各 10尾) 的尾部椎骨。所有样品采集后立即液氮速冻，并保存于−80℃ 备用。本研究获得华中农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准 (批准文号：HZAUFI-2023-0013)，实验过程中操作人员严格遵守华中农业大学实验动物相关伦理规范，并按照华中农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2　PCOLCE 基因的生物信息学分析

从 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) 或 Ensemble (http://asia.ensembl.org) 获取了 7 种鱼类：半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*)、斑马鱼、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)、小鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) 的 *pcolce* 基因序列。使用 DNAMAN 对物种的同源序列进行比对，并通过 PhyloSuitev1.2.3 的 MAFFT 算法进行相似性比对后构建进化树，在 itol 网站 (https://itol.embl.de/) 进行可视化。同时，利用在线网站 (http://gsds.gao-lab.org/index.php) 揭示物种之间基因结构相似性，并使用 AlphaFold3 (https://alphafoldserver.com/) 预测斑马鱼 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因的蛋白质三级结构。

1.3　原位杂交

全胚胎原位杂交以 24、48、72 hpf (受精后 72 h) 的野生型斑马鱼胚胎为研究对象，观察 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因在斑马鱼胚胎发育时期的表达位置。*pcolcea* 的原位杂交探针引物 F: 5′-CATCTCCACGTCCAACACCA-3′和 R: 5′-TAATACGACTCACTATAGGGCTGTTCCGGTGCCTCTGC-3′。*pcolceb* 的原位杂交探针为 F: 5′-GGGGCATCTGGGACACATAA-3′和 R: 5′-TAATACGACTCACTATAGGG CCACAGAAGCGACCCAGTTT-3′。全胚胎原位杂交根据 Thisse C 和 Thisse B

所描述的方法进行[13]。使用 Sigma-Aldrich 的抗 DIG-AP，Fab 片段 (Roche, SKU: 11093274910) 作为抗体。采用 SZX-16 型奥康体视显微镜 (奥康 SZX-16，日本) 采集图片。

切片荧光原位杂交以 60 dpf 野生型斑马鱼为研究对象，取其尾部组织。处理后使用 Leica UV1900 冷冻切片机 (Leica，德国) 沿肌肉横断面切片，切片厚度 10 μm。切片荧光原位杂交交采用 Wang 等[14] 的方法进行，探针序列从 Beliveau 等[15] 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 488 荧光探针标记 *pcolcea* 基因，cy3 荧光探针标记 *poclceb* 基因，DAPI 染料 (Thermo Fisher，美国) 标记细胞核。采用 ZEISS LSM 800 激光共聚焦显微镜 (ZEISS，德国) 采集图片。

1.4　斑马鱼突变品系构建

在 Ensembl 数据库 (https://asia.ensembl.org/*Danio_rerio*/Info/Index) 下载斑马鱼 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因的 DNA 序列，在 crisprscan 网站 (https://www.crisprscan.org) 上筛选合适的基因敲除靶点，通过 oligoevaluator 网站 (http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet) 检测敲除位点的特异性及脱靶效率。使用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术靶向斑马鱼的 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因。gRNAs 和 PCR 的测序引物列在表 2 中。通过对 2 种单基因敲除纯合突变体进行杂交，并对其后代进行基因型分析，获得了 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因的双基因

表 1　*pcolcea* 和 *pcolceb* 基因荧光原位杂交探针合成引物序列

Tab. 1　Primer sequence synthesis of fluorescent in situ hybridization probes for *pcolcea* and *pcolceb* genes

引物名称 primer name	序列 (5′—3′) primer sequence (5′—3′)
pcolcea-probe1	ACATTA GAGACCACGCGGGATGCTGG A ACCATGCTGGATCTAG AAGATA CCACCTGCAGACGGAGAAT TAATGTTATCTT
pcolcea-probe2	ACATTA GGAGATGAGAGCCCCAGGCC A ACCATGCTGGATCTAG AAGATA ACCATCATGGTGTTGGACG TAATGTTATCTT
pcolcea-probe3	ACATTA CACCACATTGCCCTCTGGGA G ACCATGCTGGATCTAG AAGATA AAAATCCTGAAGGACAGCA TAATGTTATCTT
pcolcea-probe4	ACATTA TCATGAGTTTGACAGACATGGT A ACCATGCTGGATCTAG AAGATA AATGGGCATTTCTTGCAGGG TAATGTTATCTT
pcolceb-probe1	ACATTA CTGATGCCTGCTGGGTAATC T TACTAGCTCGATTCAA AAGATA CTGATATGTGCCAGGAGCA TAATGTTATCTT
pcolceb-probe2	ACATTA TGTGAGTGTGGCAGATGTGC A TACTAGCTCGATTCAA AAGATA GGACATTTACTGCATGTGG TAATGTTATCTT
pcolceb-probe3	ACATTA GTCGGTCACCAGATGTCCAC G TACTAGCTCGATTCAA AAGATA TCACTGGCCACAAATCCTG TAATGTTATCTT
pcolceb-probe4	ACATTA AGGGGTTCAAAATGCCAAGA G TACTAGCTCGATTCAA AAGATA ATGCTGTAGGGCGAAGCTG TAATGTTATCTT

表 2　斑马鱼 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因的 gRNAs 靶序列及基因突变检测引物序列

Tab. 2　gRNAs target sequences of *pcolcea* and *pcolceb* genes and primer sequences of genotype in *D. rerio*

引物名称 primer	序列 (5′—3′) primer sequence (5′—3′)	目的 purpose
pcolcea-target	taatacgactcactataGGGGATCTGGTTGGAGACTCgttttagagctagaa	基因敲除
pcolceb-target	taatacgactcactataGGAGGTGGAGATCAGGGCTCgttttagagctagaa	
pcolcea-check	F: TCTCAAGCCACCATAAATGCAATG R: ACGATGGGAATCCTTCACTTCC	靶点检测
pcolceb-check	F: TGGACACTCATACACAGTGCAG R: AGCGTGAAGTCAGCTTACCA	靶点检测
pcolceb-seq	F: CTCTCCTGCTCTCTAGGCCC R: TGGATTGATATTAAAGGCAAAGCGT	测序

敲除纯合突变体，命名为 *pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$。

1.5　总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

选择野生型斑马鱼骨骼形成的三个关键时期 (20 dpf 和 30 dpf 是骨骼快速发育的时期，45 dpf 和 60 pdf 是骨骼单元逐渐完全显现的时期，90 dpf 是斑马鱼性成熟且骨骼形态稳定的时期) 的尾部肌肉 (含肌间刺) 样品以分析 *pcolcea* 和 *pcolceb* 的表达情况。选择 5 月龄野生型及突变体斑马鱼尾部椎骨样品，对 2 个 *pcolce* 下游调控基因 (*bmp1a*、*bmp1b*)，3 个胶原蛋白发育基因 (*col1a1a*、*col1a1b*、*col1a2*) 和 5 个骨骼发育基因 (*runx2b*、*entpd5a*、*alpl*、*bglap*、*sp7*) 进行表达分析。

按照 NAiso Plus Reagent (TaKaRa，大连) 说明书提取总 RNA。通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和完整性，使用 K5600 超微量分光光度计 (KRiRo，北京) 检测 RNA 浓度和 OD 值。使用 HiScript II Q RT Super Mix for qPCR (+ gDNA wiper) 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA，稀释 5 倍后于 −20℃ 保存。

1.6　显微型计算机断层扫描分析 (Micro-CT)

将 5 月龄斑马鱼保存在 4% 的多聚甲醛中 48 h，随后在平生医疗科技 (昆山) 有限公司的 Nemo Micro-CT (NMC-200) 设备上进行 Micro-CT 扫描分析，以 12 μm 的体素大小 (使用 90 kV 的 X 射线管电位，65 μA 的 X 射线强度) 扫描斑马鱼样本。野生型和 3 种突变体斑马鱼各 3 尾，共 12 尾。使用小鼠胫骨的标准骨密度模型 (QRM-MircoCT-HA，德国) 校准后，对斑马鱼的脊椎和肋骨进行组织矿物质密度测量。

1.7　实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

使用 NCBI 网站 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) 设计定量引物，由擎科生物科技股份有限公司合成 (表 3)。使用 Prime Script RT Reagent Kit with g DNA Eraser (No. RR047A，TaKaRa) 合成 cDNA。根据试剂盒 Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (Low Rox Plus，翌圣) 说明配制 PCR 体系，*β-actin* 作为内参，在 QuantStudio 6 Flex 实时 PCR 系统 (Applied Biosystems，ABI，美国) 上进行 RT-qPCR 分析。所有实验均设置 3 个重复，使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的 mRNA 相对表达量，并通过 IBM SPSS Statistics (version 22.0) 软件的 Turkey 氏多重比较法和 *t* 检

表 3　实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab. 3　Sequences of the primers used for RT-qPCR

引物名称 primer	序列 (5′—3′) primer sequence (5′—3′)	退火温度/℃ annealing temperature	产物片段/ bp product size
pcolcea	F: CCTATAAGACTGGCAGACTC R:TGGCTGGTTGTTGATGTT	60	221
pcolceb	F: GCCATTAGACCTCAACCAA R: CCATCGTGCCTATTCTCTT	60	172
bmp1a	F: TCGATCTGGACGCGATTGAG R: TTCCTCATCCAGCGCAATGT	60	122
bmp1b	F: CGTGACGGATACGGGAGAAG R: GTCTCACTTCGCCTCCACAA	60	175
col1a1a	F: TCATGAGAGAAGCACACCTTAG R: CAAGTCCATTGGGCAGTCAG	60	178
col1a1b	F: AGGGAGTTTCTGCTAGGGTCT R: TCTCACTGCAAGGACCACTG	60	179
col1a2	F: TGTCAAAACATGAAATGGGTTTTCT R: AGCATCCCAAGTTGCAGTGA	60	190
runx2b	F: CACTTACCACAGAGCCATT R: TGAGACGGTCAGAGAACA	60	110
entpd5a	F: GGCAGAGGCAACATATTAC R: CATTGTCAAGCACTGGAAG	60	245
alpl	F: ACGCAGGCTGATAGATAAC R: GGCAATGTTCTTGTTGAGTT	60	184
bglap	F: ATGAAGGTGTGTTTGTGAAG R: TAGGCGGTGATGATTCCA	60	172
sp7	F: TCCGTATCCATCCGTAGG R: GCAATCGCAAGAAGACCT	60	193
β-actin	F: GGCATCACACCTTCTACAA R: GAGTCCATCACAATACCAGTA	60	208

验进行差异显著性分析。

2　结果

2.1　脊椎动物 PCOLCE 基因的系统发育分析

系统发育分析结果显示，脊椎动物中的 *pcolce* 基因形成 4 个主要分支。其中，斑马鱼、斑点叉尾鮰、草鱼和团头鲂的 *pcolceb* 基因与半滑舌鳎和青鳉聚为一支；斑马鱼、斑点叉尾鮰、草鱼和团头鲂的 *pcolcea* 基因则与青鳉、牙鲆和半滑舌鳎聚为另一支；此外，人类和小鼠的 *pcolce* 基因聚为一支；热带爪蟾单独聚为一支 (图 1-a)。*pcolce* 基因的序列结构分析表明，斑马鱼 *pcolcea* 基因包含 8 个外显子，*pcolceb* 基因包含 9 个外显子，且 *pcolceb* 基因长度显著大于斑马鱼 *pcolcea* 基因 (图 1-b)。不同物种间的氨基酸序列分析表明，斑马鱼 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因与其他物种有两个共同的蛋白结构域，称为 CUB 结构域，这两种蛋白结构域的编码序列在这些物种间高度保守 (图 1-c)。氨基酸序列对比结果显示，斑马鱼 *pcolcea* 基因与人、小鼠和热带爪蟾的 *pcolce* 基因间的氨基酸序列相似性分别为 43.52%、43.31% 和 46.2%；*pcolceb* 基因的相似性则分别为 39.67%、41.02% 和 42.8%。

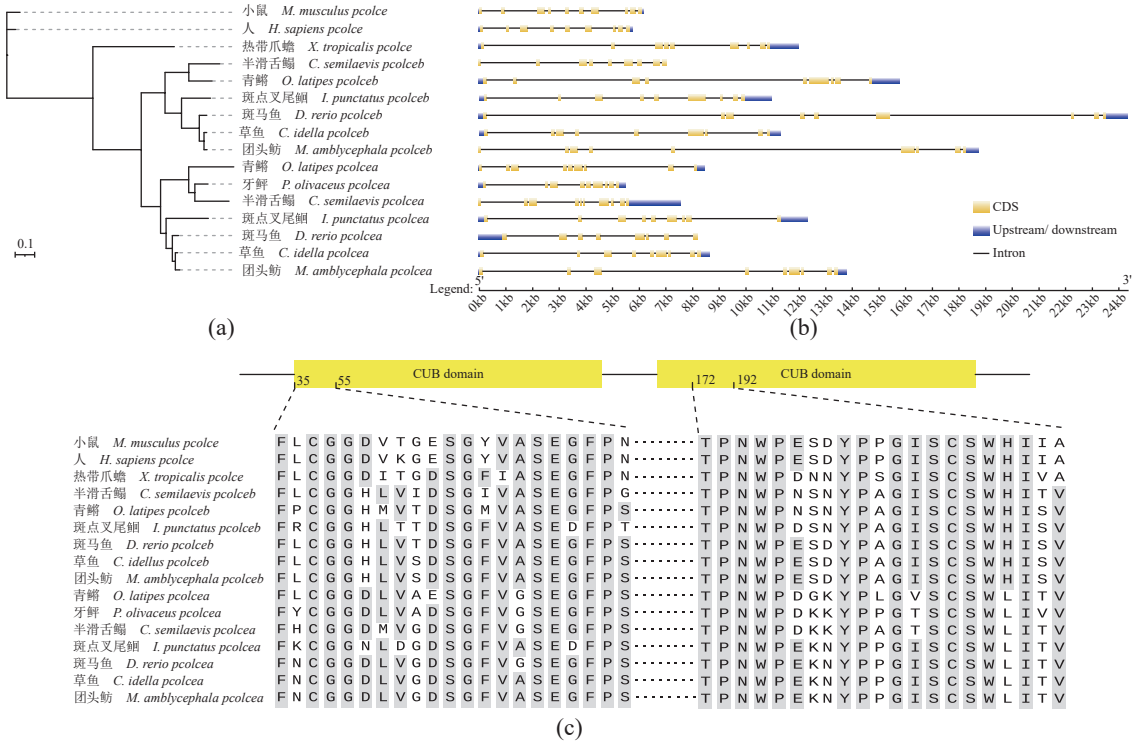


图 1　不同物种内 *pcolce* 基因的系统发育和结构特征

(a) 不同物种 *pcolce* 基因的系统发育分析，红色字体. 斑马鱼 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因；(b) 不同物种 *pcolce* 基因的结构特征。黑色线段. 内含子，蓝色矩形框. 非翻译区 (UTR) 序列，黄色矩形框. 编码区序列 (CDS)；(c) 不同物种 *pcolce* 基因的 2 个 CUB 结构域的两个片段 (35~55 和 172~192 氨基酸序列)，灰色矩形框. 高度保守区域。

Fig. 1　Phylogenetic and structural characterization of *pcolce* genes

(a) phylogenetic analysis of *pcolce* genes in different species, red font. *pcolcea* and *pcolceb* genes of *D.rerio*; (b) structural characteristics of *pcolce* genes in different species, black line. introns, blue rectangular boxes. UTR sequences, yellow rectangular boxes. CDS sequences; (c) two segments (35-55 and 172-192 amino acid sequences) of the two CUB domains of the *pcolce* genes in different species, gray rectangular boxes. highly conserved regions.

2.2　*Pcolcea* 和 *pcolceb* 基因的表达模式

全胚胎原位杂交和荧光原位杂交结果显示，在 24 hpf 时，*pcolcea* 基因在脊索和卵黄囊有较强的表达，而 *pcolceb* 基因尚未检测到表达；48 hpf 时，*pcolcea* 基因在头部和脊椎中高表达，*pcolceb* 基因在脊椎和胸鳍中高表达；72 hpf 时，*pcolcea* 和 *pcolceb* 基因均在头部、眼周、胸鳍和脊椎中表达，但 *pcolcea* 基因的表达范围更广，且表达量更高 (图版 Ⅰ)。在 60 dpf 时，*pcolcea* 和 *pcolceb* 基因在脊椎、肌间刺和肌膈中均有表达

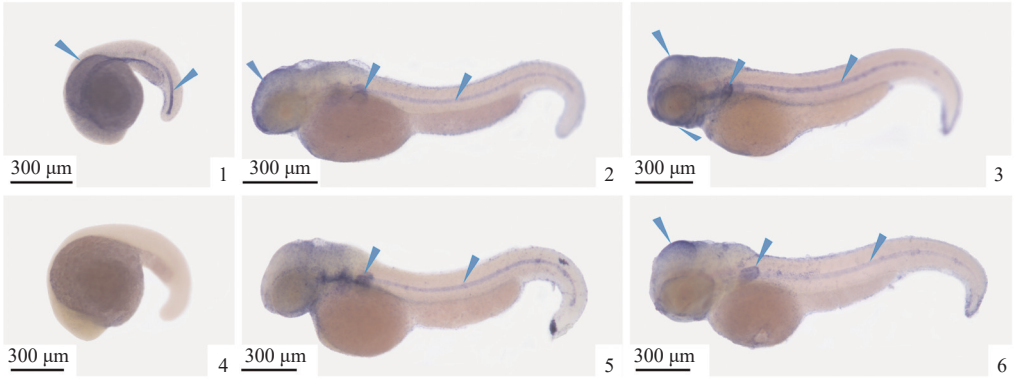
(图版 Ⅱ)。

定量结果显示，*pcolcea* 基因在 20 dpf 相对表达量最低，60 dpf 时相对表达量最高 (图 2-a)；*pcolceb* 基因在 20 dpf 相对表达量最低，之后逐渐升高，并在 45 dpf 后表达保持稳定 (图 2-b)。

2.3　*pcolcea*$^{-/-}$和 *pcolceb*$^{-/-}$斑马鱼突变品系构建和表型分析

与野生型斑马鱼相比，*pcolcea*$^{-/-}$斑马鱼在第一外显子上产生 229 bp 的碱基缺失，造成移码突变，导致起始密码子后移 (图 3-a)。*pcolceb*$^{-/-}$斑马鱼在第三外显子上产生 7 bp 的碱基缺失，造成移码突变，第 116 位氨基酸位置提前出现终止密码子，导致蛋白质翻译提前终止 (图 3-b)。蛋白结构预测显示，移码突变和蛋白质提前终止翻译使得 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因所编码的蛋白质结构不完整，进而造成结构域被破坏。*pcolcea*$^{-/-}$斑马鱼的蛋白链长度变短，α-螺旋和 β-折叠明显减少 (图 3-c)，*pcolceb*$^{-/-}$斑马鱼只编码 115 个氨基酸，其蛋白三级结构仅剩 4 个 β-折叠 (图 3-d)。

Micro-CT 扫描后，对脊椎和肋骨骨密度进行分析 (图版 Ⅲ)，结果表明，*pcolcea*$^{-/-}$斑马鱼脊椎

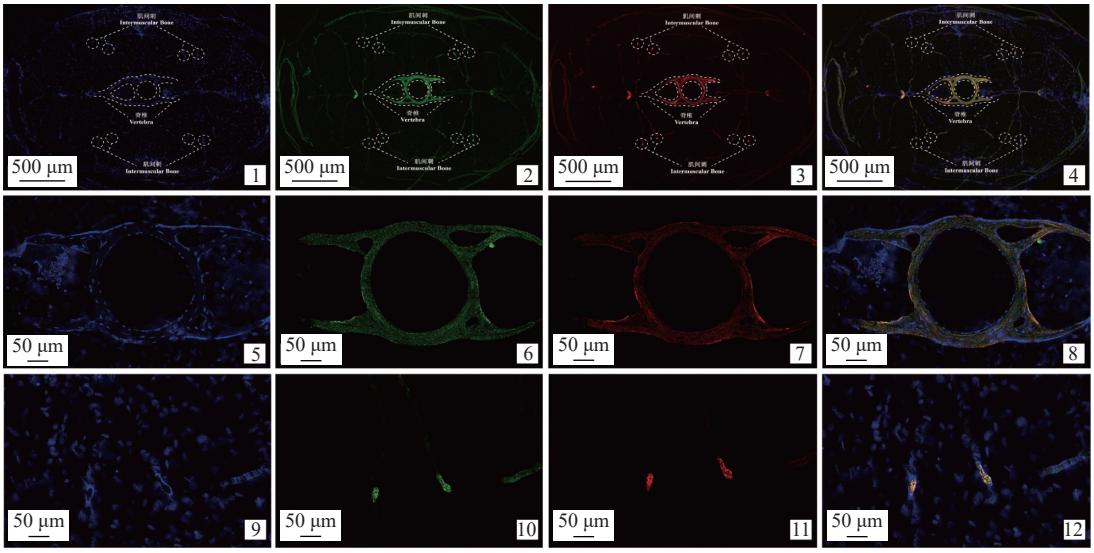


图版 Ⅰ　***pcolcea* 和 *pcolceb* 基因在野生型斑马鱼胚胎发育时期的原位杂交**

1~3. *pcolcea* 基因的表达情况，4~6. *pcolceb* 基因的表达情况；1、4. 24 dpf，2、5. 48 dpf，3、6. 72 dpf；蓝色三角形. 杂交信号位置。

Plate Ⅰ　Whole-mount *in situ* hybridization of the *pcolcea* and *pcolceb* at *D. rerio* wild-type embryos

1-3. expression of the *pcolcea* gene, 4-6. expression of the *pcolceb* gene; 1, 4. 24 dpf; 2, 5. 48 dpf; 3, 6. 72 dpf. Blue triangles. hybridization signal.



图版 Ⅱ　***pcolcea* 和 *pcolceb* 基因在 60 dpf 野生型斑马鱼尾部组织中的荧光原位杂交**

1~4. 尾部组织整体横截面，5~8. 椎骨，9~12. 肌间刺；1、5、9. DAPI，2、6、10. *pcolcea*，3、7、11. *pcolceb*，4、8、12. 合并后的表达情况。

Plate Ⅱ　Fluorescent *in situ* hybridization of the *pcolcea* and *pcolceb* in 60 dpf wild-type *D. rerio* tail tissue

1-4. overall cross section of the tail tissue, 5-8. vertebra, 9-12. intermuscular bone; 1, 5, 9. DAPI, 2, 6, 10. *pcolcea*, 3, 7, 11. *pcolceb*, 4, 8, 12. expression of merge.

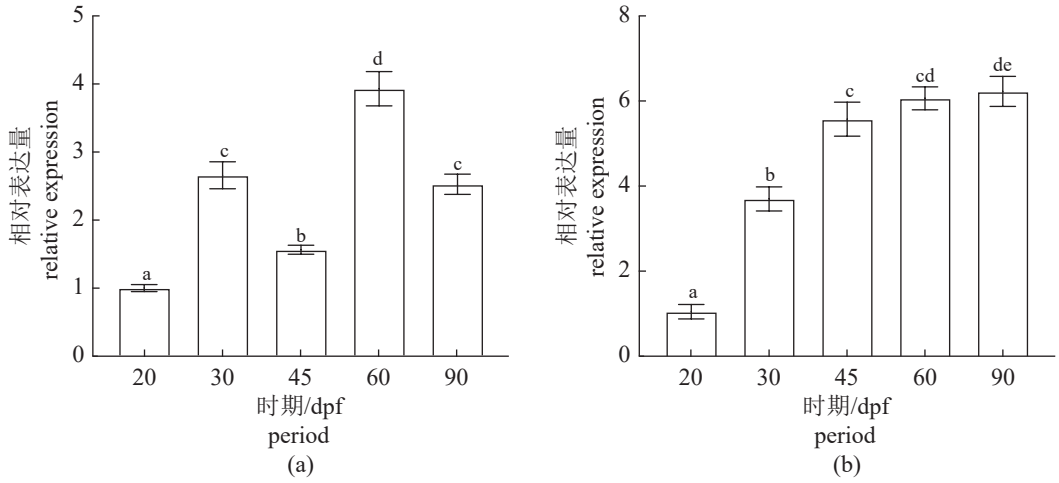


图 2　*pcolcea* (a) 和 *pcolceb* (b) 基因在不同发育时期野生型斑马鱼中的定量表达分析

不同字母表示差异显著，$P<0.05$。

Fig. 2　Quantitative expression analysis of *pcolcea* (a) and *pcolceb* (b) genes in wild-type *D. rerio* at different developmental stages

Different letters indicate significantly different groups, $P<0.05$.

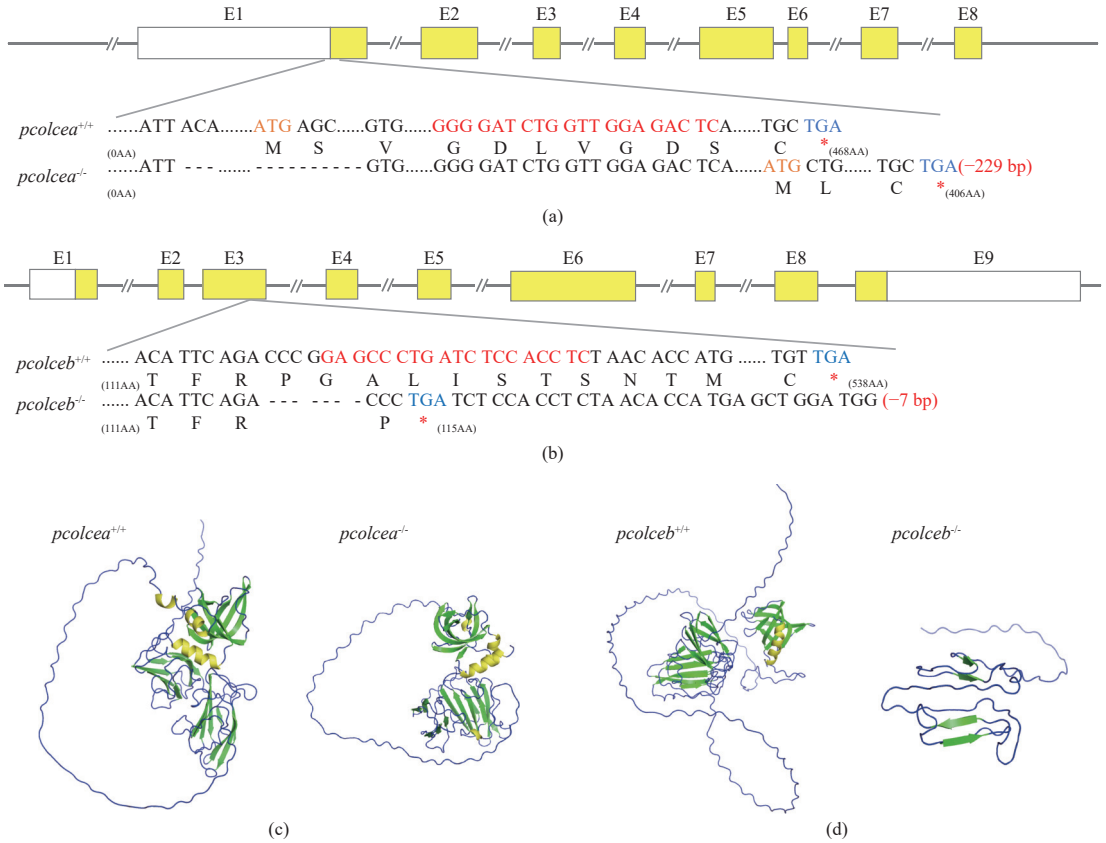


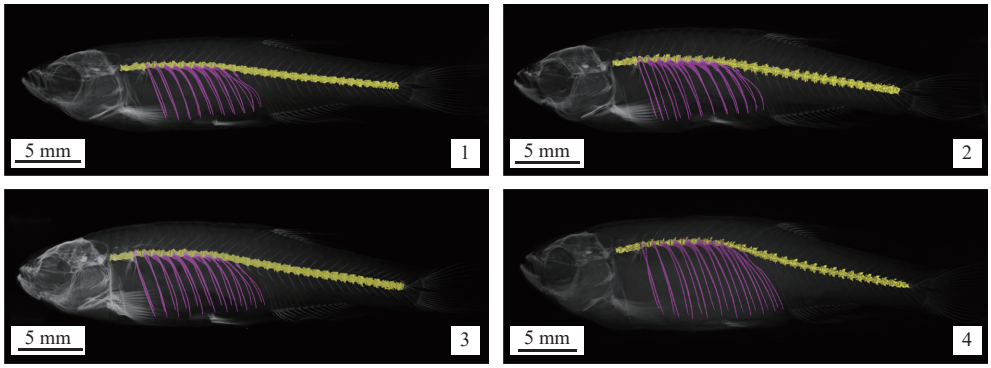
图 3　野生型和突变体斑马鱼的序列特征 (a、b) 和蛋白质结构预测 (c、d)

白色矩形框. 非翻译区序列，黄色矩形框. 编码区序列；红色字体. CRISPR- Cas9 靶序列，橙色. 起始密码子，“-”. 缺失的核苷酸，红色“*”. 终止密码子；黄色区域. α-螺旋，绿色区域. β-折叠。

Fig. 3　Sequence characterization (a, b) and protein structure prediction (c, d) of wild-type and mutant *D. rerio*

White rectangular boxes. untranslated region sequences, yellow rectangular boxes. coding region sequence; red font. CRISPR-Cas9 target sequence, orange font. start codon, “-”. missing nucleotides, red “*”. stop codon, yellow area. α-helix, green area. β-sheet.

骨密度显著下降 (图 4-a)，*pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$双突变斑马鱼的脊椎和肋骨骨密度均显著降低 (图 4-a, c)，而 *pcolceb*$^{-/-}$斑马鱼的脊椎和肋骨骨密度与野生型相比无显著性差异 (图 4-b)。



图版 Ⅲ　野生型和突变体斑马鱼的 Micro-CT 扫描

1. 野生型斑马鱼，2. *pcolcea*$^{-/-}$斑马鱼，3. *pcolceb*$^{-/-}$斑马鱼，4. *pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$双突变斑马鱼，黄色区域. 椎骨，紫色区域. 肋骨。

Plate Ⅲ　Micro-CT of wild-type and mutant *D. rerio*

1. wild-type, 2. *pcolcea*$^{-/-}$, 3. *pcolceb*$^{-/-}$, 4. *pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$, yellow area. vertebra, purple area. rib.

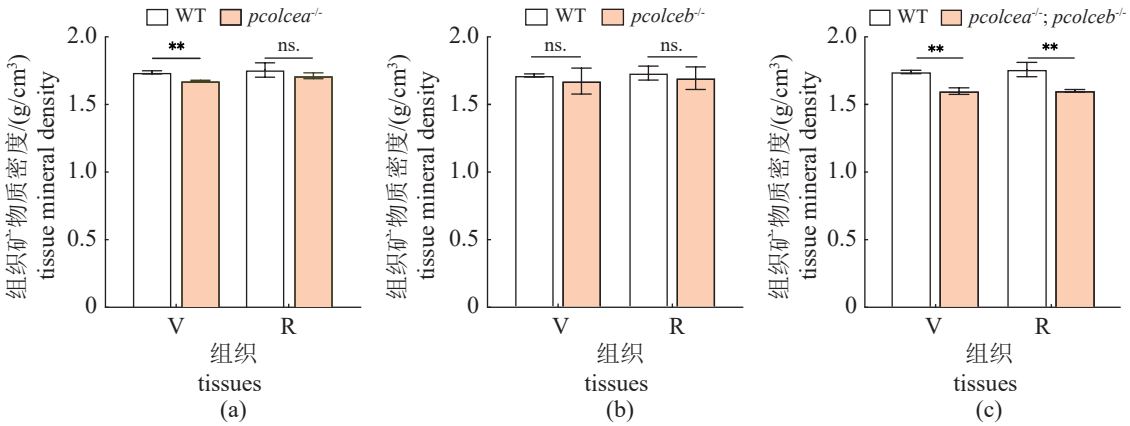


图 4　野生型和突变体斑马鱼骨组织矿物质密度分析

V. 椎骨，R. 肋骨；ns.. *P*>0.05，“*”. *P*<0.05，“**”. *P*<0.01，“***”. *P*<0.001；下同。

Fig. 4　Analysis of bone tissue mineral density in wild-type and mutant *D. rerio*

V. vertebra, R. rib; ns.. *P*>0.05, “*” *P*<0.05, “**”. *P*<0.01, “***”. *P*<0.001; the same below.

2.4　骨骼发育相关基因差异表达分析

为进一步探讨 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因对斑马鱼脊椎骨骼矿化的影响，本研究利用荧光定量方法检测了胶原蛋白发育相关基因，骨骼发育相关基因及 *pcolce* 下游调控基因在 5 月龄 *pcolcea*$^{-/-}$、*pcolceb*$^{-/-}$与 *pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$双突变体及野生型斑马鱼的尾部椎骨组织中的表达变化。结果显示，*pcolcea* 和 *pcolceb* 基因在尾部椎骨中存在补偿效应，*pcolcea*$^{-/-}$突变体中 *pcolceb* 基因表达显著上调，而在 *pcolceb*$^{-/-}$突变体中 *pcolcea* 基因的表达呈现上调趋势 (图 5-a, c)。在 *pcolcea*$^{-/-}$突变体的尾部椎骨中，下游调控基因 *bmp1b*，胶原蛋白发育相关基因 *col1a1a*、*col1a2* 以及骨骼发育相关基因 *runx2b*、*alpl*、*sp7* 基因的表达显著降低 (图 5-ab)；*pcolceb*$^{-/-}$突变体，下游调控基因 *bmp1a* 及骨骼发育相关基因 *bglap* 的表达显著上调，胶原蛋白发育相关基因 *col1a1a* 和 *col1a2* 的表达显著下调 (图 5-c, d)；*pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$双突变体中下游调控基因 *bmp1b*，胶原蛋白发育相关基因 *col1a1a*、*col1a1b*、*col1a2* 以及骨骼发育相关基因 *runx2b*、*entpd5a*、*bglap*、*sp7* 的表达均显著下降 (图 5-e, f)。

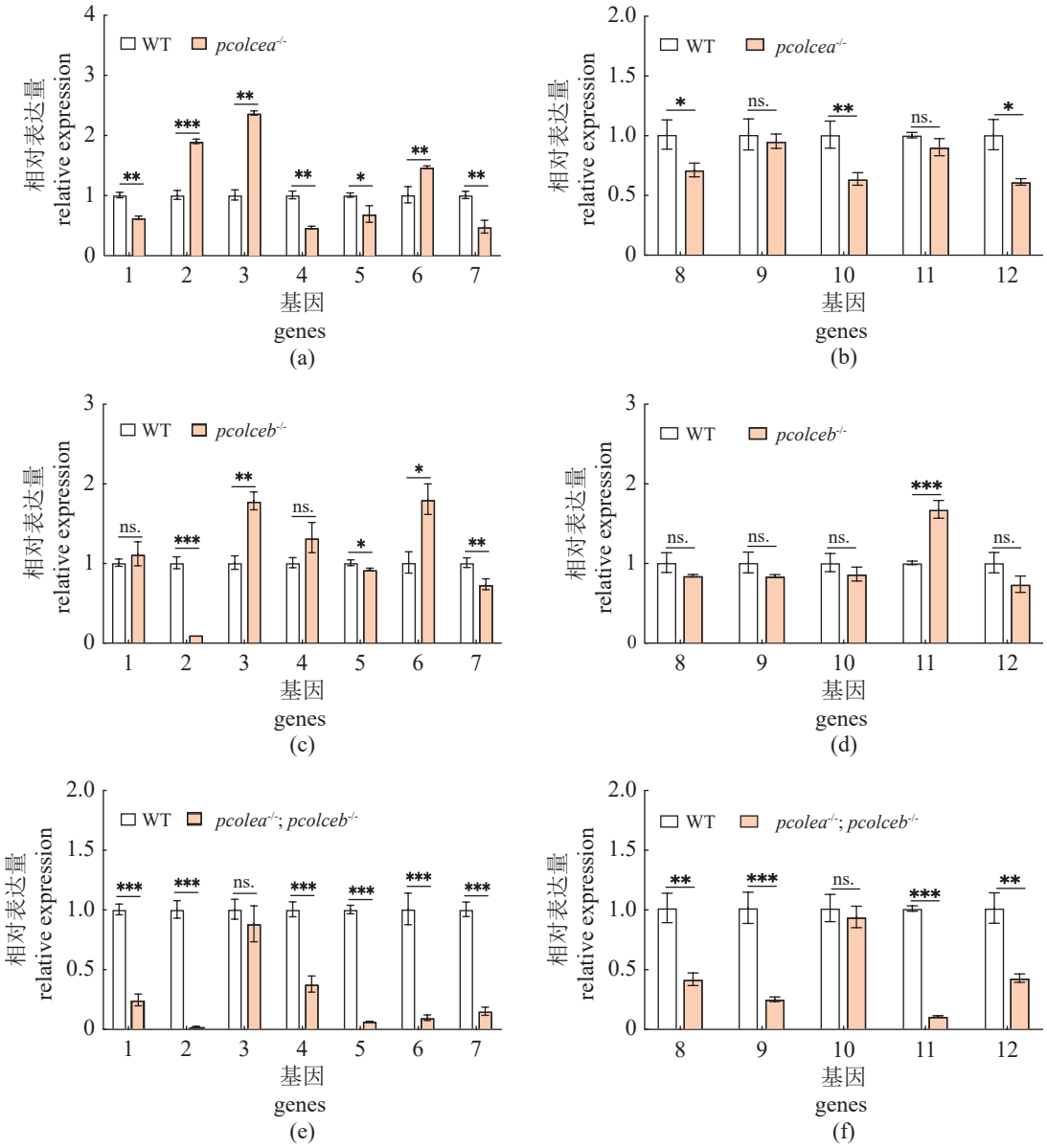


图 5　野生型和突变体斑马鱼骨骼发育相关基因定量表达分析

(a) (b) 野生型和 *pcolcea*$^{-/-}$斑马鱼尾部椎骨发育相关基因定量表达分析；(c) (d) 野生型和 *pcolceb*$^{-/-}$斑马鱼尾部椎骨发育相关基因定量表达分析；(e) (f) 野生型和 *pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$双突变斑马鱼尾部椎骨发育相关基因定量表达分析；1. *pcolcea*，2. *pcolceb*，3. *bmp*1*a*，4. *bmp*1*b*，5. *col*1*a*1*a*，6. *col*1*a*1*b*，7. *col*1*a*2，8. *runx*2*b*，9. *entpd*5*a*，10. *alpl*，11. *bglap*，12. *sp*7。

Fig. 5　Quantitative expression analysis of genes related to bone development in wild type and mutant *D. rerio*

(a) (b) quantitative expression analysis of genes related to development of tail vertebrae of wild type and *pcolcea*$^{-/-}$ *D. rerio*; (c) (d) quantitative expression analysis of genes related to development of tail vertebrae of wild type and *pcolceb*$^{-/-}$ *D. rerio*; (e) (f) quantitative expression analysis of genes related to development of tail vertebrae of wild type and *pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$ double mutant *D. rerio*. 1. *pcolcea*, 2. *pcolceb*, 3. *bmp*1*a*, 4. *bmp*1*b*, 5. *col*1*a*1*a*, 6. *col*1*a*1*b*, 7. *col*1*a*2, 8. *runx*2*b*, 9. *entpd*5*a*, 10. *alpl*, 11. *bglap*, 12. *sp*7.

3　讨论

基因组的重复对于物种的进化具有积极的推动作用，可为物种分化、基因功能变异等提供所需的遗传物质[16]。鱼类特有的基因组复制事件使鱼类拥有比高等脊椎动物更多的基因[17]。研究表明，基因组的复制可能导致鱼类基因的不同命运，如功能丧失、基因沉默、亚功能化，甚至产生新的功能[18-19]。例如，在斑马鱼中，*bmp*7*a* 和 *bmp*7*b* 两种基因亚型的编码的蛋白和结构域高度保守，但它们的生物学功能显著不同。*bmp*7*a* 基因参与背腹模式的发育，而 *bmp*7*b* 基因参与眼睛的黑色

素形成以及骨骼的发育，缺失 *bmp7a* 基因会导致斑马鱼胚胎致死，缺失 *bmp7b* 基因抑制斑马鱼的生长和诱导皮肤黑色素的形成[20]。类似的，斑马鱼和大多数硬骨鱼类具有 *pcolcea* 和 *pcolceb* 两种基因亚型，而哺乳动物仅具有 *pcolce* 一种基因型。在本研究中，全胚胎原位杂交结果显示 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因在胚胎中的表达存在时空差异。*pcolcea* 基因在 24 hpf 胚胎的卵黄囊和脊椎中高表达，但在同时期胚胎中并未检测到 *pcolceb* 基因的表达。*pcolcea* 和 *poclceb* 基因在骨骼发育不同时期的定量表达结果也有显著差异 (图 2)。这些结果进一步证实了 *pcelcea* 和 *pcolceb* 基因在进化过程中功能发生了分化。

现有关于 *pcolce* 基因的生物学功能研究主要在哺乳动物中进行。先前的研究表明，*pcolce* 基因功能的缺失可以改善小鼠肝脏纤维化，提高治疗脂肪性肝炎的可能性[21]。*pcolce* 基因还具有抗血管生成功能，可在角膜或其他组织损伤修复中发挥作用[10]。在斑马鱼中，*pcolce* 基因的表达下调会导致斑马鱼胚胎背部化发育异常[11]。有研究表明，*pcolce* 基因可促进Ⅰ型胶原蛋白的成熟，Ⅰ型胶原蛋白是鱼类组织中含量最丰富的一种胶原蛋白，也是骨骼中参与骨形成、生长、重塑以及矿化形成骨组织的主要胶原蛋白[22-23]。胶原蛋白的合成受阻会导致多种骨骼疾病，如成骨发育不全、软骨发育不良等[24]。本研究基于 CRISPR-Cas9 基因组编辑后的表型观察来进一步探究 *pcelcea* 和 *pcolceb* 基因的生物学功能。研究结果表明，*pcolcea* 基因在斑马鱼骨骼发育中发挥重要作用。单敲除 *pcolcea* 基因，斑马鱼脊椎骨密度降低 (图 4-a)，而单敲除 *pcolceb* 基因则无显著表型 (图 4-b)，且 *pcolceb* 基因在 *pcolceb* 基因缺失时显著上调 (图 5-a)，这提示二者在骨骼代谢调控中存在功能冗余。双敲除二者后，斑马鱼骨密度降低表型更严重 (图 4-c)，表明 *pcolceb* 基因补偿作用对维持骨骼稳态至关重要。*pcolcea* 和 *pcolceb* 基因可能通过影响胶原蛋白的合成间接影响骨骼的发育，单敲除 *pcolcea* 基因时，*pcolceb* 的表达上调可能部分补偿其功能，而两基因双敲除后，导致这种间接影响加重，使骨骼的发育显著受到抑制。

生物表型的形成通常受多个功能基因及复杂通路所调节[25]。例如，*entpd5* 和 *enpp1* 基因共同调节斑马鱼机体内磷酸盐稳态而影响骨骼矿化[26]。*Runx2* 基因通过与 hedgehog、Fgf、Wnt、Pthlh 信号分子和转录因子 *dlx5*、*sp7* 等相互调控，调控成骨祖细胞的增殖和向成骨细胞的分化；在未成熟的成骨细胞中，*runx2* 基因还调节骨基质蛋白基因的表达，包括 *col1a1*、*col1a2*、*spp1*、*ibsp* 和骨 γ 羧基谷氨酸蛋白 (Bglap/Bglap2)，并诱导成骨细胞成熟[27]。*Alpl* 基因的突变会引起低磷脂病，其特点是血清和骨碱性磷酸酶活性不足以及骨骼和牙齿矿化缺陷[28]。本研究分析了骨骼发育相关调节因子的表达模式。结果显示，*pcolcea* 和 *pcolceb* 基因失去功能后，*pcolce* 下游调控基因、胶原蛋白发育相关基因及骨骼发育相关基因的表达均发生显著变化。在 *pcolcea* $^{-/-}$突变体的尾部椎骨中，*bmp1b*、*col1a1a*、*col1a2*、*runx2b*、*alpl*、*sp7* 基因的表达水平显著低于野生型，在 *pcolcea* $^{-/-}$; *pcolceb* $^{-/-}$双突变体中，*bmp1b*、*col1a1a*、*col1a1b*、*col1a2*、*runx2b*、*entpd5a*、*bglap*、*sp7* 基因的表达均显著低于野生型斑马鱼 (图 5)。先前的研究表明，*runx2b* 基因的缺失会导致斑马鱼肌间刺的完全缺失[12]，*col1a1a*、*col1a1b*、*col1a2*、*entpd5a*、*alpl*、*bglap*、*sp7* 基因也会不同程度地直接或间接影响骨骼的矿化和发育。这解释了 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因缺失及这些调节因子表达响应性变化可能是导致斑马鱼骨骼密度降低的原因。

综上所述，本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在斑马鱼中构建了 *pcolcea* 和 *pcolceb* 单基因和双基因敲除纯合突变体，揭示了 *pcolcea* 和 *pcolceb* 基因的功能分化；同时还阐明了 *pcolcea* 基因的功能丧失对斑马鱼骨骼发育的影响。这些结果丰富了动物 *pcolce* 基因功能研究的数据，为深入探究鱼类 *pcolce* 基因在骨骼发育中的调控机制提供了基础。

（作者声明本文无利益冲突）

参考文献 (References):

[1] Arnold W V and Fertala A. Skeletal diseases caused by mutations that affect collagen structure and function[J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2013, 45(8): 1556-1567.

[2] Wang S, Zhong L, Li Y, *et al*. Up-regulation of PCOLCE by TWIST1 promotes metastasis in osteosarcoma[J]. Theranostics, 2019, 9(15): 4342-4353.

[3] Takahara K, Kessler E, L Biniaminov L, *et al*. Type I procolla-

gen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE)[J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(42): 26280-26285.

[4] Steiglitz B M, Kreider J M, Frankenburg E P, *et al*. Procollagen C proteinase enhancer 1 genes are important determinants of the mechanical properties and geometry of bone and the ultrastructure of connective tissues[J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(1): 238-249.

[5] Greenspan DS. Biosynthetic Processing of Collagen Molecules[J]. Topics in Current Chemistry, 2005, 247: 149-183.

[6] Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, *et al*. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase[J]. Science, 1996, 271(5247): 360-362.

[7] Weiss T, Ricard-Blum S, Moschcovich L, *et al*. Binding of procollagen C-proteinase enhancer-1(PCPE-1)to heparin/heparan sulfate: properties and role in PCPE-1 interaction with cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(44): 33867-33874.

[8] Bourhis J M, Vadon-Le Goff S, Afrache H, *et al*. Procollagen C-proteinase enhancer grasps the stalk of the C-propeptide trimer to boost collagen precursor maturation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(16): 6394-6399.

[9] Xiang A Z, Lin X, Xu L, *et al*. PCOLCE is potent prognostic biomarker and associates with immune infiltration in gastric cancer[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2020, 7: 544895.

[10] Massoudi D, Germer C J, Glisch J M, *et al*. Procollagen C-proteinase enhancer 1(PCPE-1)functions as an anti-angiogenic factor and enhances epithelial recovery in injured cornea[J]. Cell and Tissue Research, 2017, 370(3): 461-476.

[11] Zhu Q, Guo W, Zhang S J, *et al*. Synergistic effect of PCPE1 and sFRP2 on the processing of procollagens via BMP1[J]. Febs Letters, 2019, 593(1): 119-127.

[12] Nie C H, Wan S M, Chen Y L, *et al*. Single-cell transcriptomes and *runx2b*-/- mutants reveal the genetic signatures of intermuscular bone formation in zebrafish[J]. National Science Review, 2022, 9(11): nwac152.

[13] Thisse C and Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos[J]. Nature Protocols, 2008, 3(1): 59-69.

[14] Wang X, Allen W E, Wright M A, *et al*. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states[J]. Science, 2018, 361(6400): eaat5691.

[15] Beliveau B J, Kishi J Y, Nir G, *et al*. OligoMiner 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.

[16] Sidow A. Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1996, 6(6): 715-722.

[17] Wittbrodt J, Meyer A, Schartl M. More genes in fish?[J]. BioEssays, 1998, 20(6): 511-515.

[18] Michael L and Allan F. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization[J]. Genetics, 2000, 154(1): 459-473.

[19] Zhou L, Wang Y, Gui J F, *et al*. Fish-specific genome duplication[J]. Zoological Research, 2006, 27(5): 525-532.

[20] Dong X R, Wan S M, Zhou J J, *et al*. Functional differentiation of BMP7 genes in zebrafish: *bmp7a* for dorsal-ventral pattern and *bmp7b* for melanin synthesis and eye development[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022, 10: 838721.

[21] Hsiao T Y, Yoshida Y, Okuda S, *et al*. PCPE-1, a brown adipose tissue-derived cytokine, promotes obesity-induced liver fibrosis[J]. EMBO Journal, 2024, 43(21): 4846-4869.

[22] Kobayashi K, Luo M, Zhang Y, *et al*. Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction[J]. Nature Cell Biology, 2009, 11(1): 46-55.

[23] Carter E M and Raggio C L. Genetic and orthopedic aspects of collagen disorders[J]. Current Opinion in Pediatrics, 2009, 21(1): 46-54.

[24] Myllyharju J and Kivirikko K I. Collagens and collagen-related diseases[J]. Annals of Medicine, 2001, 33(1): 7-21.

[25] Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, *et al*. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(43): 29119-29125.

[26] Huitema L F A, Apschner A, Logister I, *et al*. Entpd5 is essential for skeletal mineralization and regulates phosphate homeostasis in zebrafish[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(52): 21372-21377.

[27] Komori T. Whole aspect of Runx2 functions in skeletal development[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10): 5776.

[28] Mornet E. Hypophosphatasia[J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2007, 2(1): 40.

Functional differentiation of *pcolcea* and *pcolceb* genes in bone development in *Danio rerio*

WANG Wenxiu [1], CHEN Yulong [1], XIAO Zhengyu [1], GAO Zexia [1,2,3], NIE Chunhong [1,2*]

(1. *Key Lab of Freshwater Animal Breeding*, *Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, *Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt*, *Ministry of Education*, *College of Fisheries*, *Huazhong Agricultural University*, *Wuhan* 430070, *China*;
2. *Hubei Hongshan Laboratory*, *Wuhan* 430070, *China*;
3. *Hubei Province Famous Fish Breeding and Healthy Aquaculture Engineering Technology Research Center*, *Wuhan* 430070, *China*)

Abstract: Procollagen C-proteinase enhancer protein (PCOLCE) is a secreted protein that enhances the activity of procollagen C-proteinase, thereby facilitating the maturation of collagen and influencing the process of bone formation. Down-regulation of *pcolce* expression compromises the maturation of collagen, ultimately leading to a reduction in bone mass. In teleost fish, the occurrence of genomic duplication events has led to the emergence of two paralogs of *pcolce*, designated *pcolcea* and *pcolceb*, whose functional roles in skeletal development remain incompletely characterized. To delineate the functional divergence of *pcolcea* and *pcolceb* in zebrafish (*Danio rerio*) osteogenesis, this study employed a multi-faceted approach integrating computational analysis of sequence features, spatiotemporal expression profiling, and phenotypic characterization of targeted mutants. The results indicated that *pcolcea* and *pcolceb* comprise 8 and 9 exons, respectively, with *pcolceb* being significantly longer; both genes were predominantly expressed in the vertebrae, head, and pectoral fins. Through targeted gene knockout, we generated *pcolcea*$^{-/-}$ and *pcolceb*$^{-/-}$ homozygous mutants. The *pcolcea*$^{-/-}$ mutant carried a 229-bp deletion in exon 1, while the *pcolceb*$^{-/-}$ mutant carried a 7-bp deletion in exon 3. Compared to wild-type *D. rerio*, *pcolcea*$^{-/-}$ and *pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$ double mutant *D. rerio* exhibited a marked reduction in vertebral tissue mineral density, whereas *pcolceb*$^{-/-}$ *D. rerio* showed no significant difference. Subsequently, the expression of genes related to bone development (*runx2b*, *entpd5a*, *alpl*, *bglap*, *sp7*), collagen development (*col1a1a*, *col1a1b*, *col1a2*), and downstream effector genes (*bmp1a*, *bmp1b*) was quantified by RT-qPCR in the caudal vertebrae of the mutants. RT-qPCR results showed that expression of *bmp1b*, *col1a1a*, *col1a2*, *runx2b*, *alpl*, and *sp7* was significantly downregulated in *pcolcea*$^{-/-}$ mutants. In *pcolcea*$^{-/-}$; *pcolceb*$^{-/-}$ double mutants, the expression of *bmp1b*, *col1a1a*, *col1a1b*, *col1a2*, *runx2b*, *entpd5a*, *bglap*, *and sp7* was significantly lower than in wild-type *D. rerio*. Collectively, these results demonstrated that loss of *pcolcea* impaired skeletal tissue mineralization in *D. rerio*, and this phenotype was significantly exacerbated by the concurrent deletion of *pcolceb*. This study elucidates the distinct roles of *pcolcea* and *pcolceb* in *D. rerio* bone development and provides a foundation for understanding the molecular mechanisms governing skeletal formation in fish.

Key words: *Danio rerio*; *pcolcea*; *pcolceb*; bone development; CRISPR/Cas9; gene expression

Corresponding author: NIE Chunhong. E-mail: chunhongnie@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (32202917); Key Program of the National Natural Science Foundation of China (32330108); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662023SCQD002); Hubei Provincial Natural Science Foundation of China (2022CFB819)