

团头鲂肌腱发育相关基因 *tnmd/xirp2a* 的克隆和表达

陈宇龙^{1,2} 张丽红¹ 周佳佳¹ 孟佑廉¹ 高泽霞^{1,2,3}

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/
农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;
2. 池塘健康养殖湖北省工程实验室, 武汉 430070;
3. 华中农业大学水产养殖国家级实验教学示范中心, 武汉 430070

摘要 为分析肌腱发育相关基因 *tnmd/xirp2a* 与团头鲂肌间骨发育之间的相关性, 通过克隆获得团头鲂 *tnmd/xirp2a* 的 cDNA 序列, 其中 *tnmd* 的 cDNA 全长为 1 420 bp, 开放阅读框为 906 bp, 共编码 301 个氨基酸; *xirp2a* 的 cDNA 全长为 11 715 bp, 包括开放阅读框 9 522 bp, 编码 3 174 个氨基酸。系统进化研究表明, *tnmd/xirp2a* 基因在不同脊椎动物中保守性很低, 且相比哺乳类和家禽类, 鱼类 *tnmd* 基因存在一段氨基酸的缺失。采用荧光定量方法比较分析 *tnmd/xirp2a* 在团头鲂成鱼不同组织及肌间骨发生发育 4 个关键时期的表达情况, 结果显示, *tnmd/xirp2a* 在肌肉和肌间骨中的表达量均显著高于其他组织, 且肌肉中 *tnmd* 基因表达高于肌间骨 ($P < 0.05$), 而 *xirp2a* 在肌间骨中的表达高于肌肉组织 ($P < 0.05$)。在肌间骨发育 4 个关键时期 (I: 尾部尚未出现肌间骨; II: 尾部出现少量肌间骨; III: 尾部肌间骨大量出现且长度增加; IV: 肌间骨从尾部到背部全部出现且形态成熟) 中, *tnmd* 在第 III 时期的表达水平显著高于另外 3 个时期; 在第 II、III、IV 时期之间, *xirp2a* 的表达水平没有显著性差异。此结果表明, *tnmd* 基因在肌间骨的发育过程中存在潜在作用, 而 *xirp2a* 基因与肌间骨的发育之间的相关性还需进一步研究。

关键词 团头鲂; 肌间骨; *tnmd*; *xirp2a*; 克隆; 定量表达

中图分类号 S 917: Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)02-0001-08

肌间骨 (intermuscular bone), 指椎骨两侧肌间隔中的硬骨小刺, 由肌膈中的肌腱分化而来^[1], 仅存在于真骨鱼类中, 且普遍存在于低等真骨鱼类 (非棘鳍鱼类) 中^[2-3]。肌间骨根据其自身的附着或连接位置可分为 3 种: 髓弓小骨、椎体小骨和脉弓小骨^[3]。我国淡水养殖的鱼类如草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙 (*Aristichthys nobilis*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲫 (*Carassius auratus*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 等以其产量高、价格低、营养高的特点受到了人们的青睐。然而, 它们大部分具有数量多且复杂的肌间骨, 极大地影响了其经济价值。

在鱼类骨骼系统的研究中, 已有很多关于椎骨研究的报道, 但对肌间骨的研究并不多, 大多数只停留在肌间骨的表型研究, 且对肌间骨发生发育的分

子机制尚不清楚。国外主要是 Patterson 等^[3] 和 Johnson 等^[4] 对真骨鱼类的 125 属进行了详细的观察和分析, 但针对中国主要淡水养殖的鲤科鱼类, 仅描述了鳊属一种。国内也仅对鲤形目鱼类的鲢、鲤、斑马鱼 (*Danio rerio*)、团头鲂、唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 以及合鳃鱼目的黄鳝 (*Monopterus albus*) 和鳗鲡目的日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的肌间骨的发育和骨化时间进行了研究^[5-9]。Moav 等^[10] 的早期研究表明, 由于基因型—环境相互作用, 肌间骨的存在可能受到 1 个或 2 个基因的控制。目前, 关于肌间骨分子调节的研究主要集中在间充质干细胞向成骨细胞分化以及后续的成骨细胞骨化、矿化相关因子上面, 如硬化蛋白 (sclerostin, *SOST*) 基因在淇河鲫肌间骨骨化过程及不同分布位置中的表达调控作用^[11-12]、肌肉片段同源基因 C (muscle seg-

收稿日期: 2018-10-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31872559); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目 (CARS-46-08); 中央高校基本科研业务费专项 (2662018PY035); 武汉市生态渔业产业技术体系品种改良岗位

陈宇龙, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: cyl76@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 高泽霞, 博士, 教授, 研究方向: 鱼类遗传育种, E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

ment homeobox C, *MsxC*) 在唇鳍肌间骨发育过程中的表达调控作用^[13]、*bmp* 家族基因在团头鲂肌间骨发生发育过程中以及鲤肌间骨不同分布位置的表达调控作用等^[14]。随着高通量测序技术的发展, Wan 等^[15]开展了团头鲂肌间骨发生发育关键时期的 RNA 转录组和小 RNA 组比较研究以及肌间骨和肌间骨外周结缔组织研究, Liu 等^[16]比较了 3 种关键组织(肌间骨、肌间骨外周结缔组织、背部白肌)的 RNA 转录组分子特征, 这些基因资源的开发为进一步探讨鱼类肌间骨形成机制奠定了基础。

鱼类肌间骨经历了肌隔结缔组织骨化^[6], 以及后续的矿化、生长和形态演化^[17]。Danos 等^[1]通过研究不同发育系统的鱼类肌间骨形态和数量与肌腱的关系, 提出肌间骨可能由肌腱骨化而来。笔者克隆获得了团头鲂肌腱发育相关基因 *tnmd* 和 *xirp2a*, 并分析其在团头鲂不同组织和肌间骨 4 个关键发育时期的表达情况, 以期为鱼类肌间骨发生发育分子机制的探讨提供一定的基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用团头鲂均来自湖北百容水产良种有限公司(湖北省黄冈市团风县团风镇白鹤林村)。按照万世明等^[9]的方法采集团头鲂肌间骨发育 4 个关键时期样品(S1: 尾部尚未出现肌间骨, 约孵出后 17 d; S2: 少量肌间骨出现在尾部, 约孵出后 24 d; S3: 尾部肌间骨数目增多, 长度增加, 约孵出后 29 d; S4: 肌间骨全部出现且形态成熟, 约孵出后 42 d)。分别取 2 尾 2 龄团头鲂肋骨、肌间骨、鳍条、脑、肝脏、肌肉、心脏、脾脏 8 种组织样品。将上述样品置于液氮中速冻后, 迅速转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存、备用。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存的团头鲂肌间骨发育 4 个时期及 8 种组织样品, Trizol 法(TAKARA, 大连)提取总 RNA 并电泳检测完整性, NanoDrop ND-2000 核酸蛋白仪(Thermo, 美国)测定 RNA 浓度及 OD 值。按照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 大连)的说明书合成各样品的 cDNA, 将合成的 cDNA 稀释 5 倍后, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3 团头鲂 *tnmd* 和 *xirp2a* 基因克隆

NCBI 上查找斑马鱼 *tnmd* 和 *xirp2a* 基因的 cDNA 序列, 与课题组之前已获得的团头鲂尾部肌肉转录组序列进行 blast, 获得多个目的基因 cDNA 片段。利用 Primer Premier 5.0 软件设计简并引物, 由武汉擎科公司合成(表 1), 以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 用 1% 琼脂糖检测产物单一性, 将条带单一的 PCR 产物送往武汉天一辉远有限公司测序。将测序获得的目的基因片段通过 Mega 6.0 软件进行拼接, 并通过与斑马鱼基因序列比对判断所拼接序列的编码区是否完整。

表 1 基因克隆相关引物信息

Table 1 Primer information for gene clone

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>tnmd</i> 引物 1 <i>tnmd</i> primer 1	F: AAATAGTCTGAGCTGGAG R: CACGAATGCTGGGACGAA
<i>tnmd</i> 引物 2 <i>tnmd</i> primer 2	F: GCACGAATGCTGGGACGAA R: GGTTCCATTCCATGTGGTTT
<i>xirp2a</i> 引物 1 <i>xirp2a</i> primer 1	F: ACACCACCATAACCCAGAA R: TTAGCCAGGGCAAGGTTT
<i>xirp2a</i> 引物 2 <i>xirp2a</i> primer 2	F: TTCACATCAGCACCAGAC R: GGCTTTGCCTGTATCACT

1.4 团头鲂 *tnmd/xirp2a* 基因生物学信息分析

基因开放阅读框利用 NCBI 的 ORF finder 程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析; 使用 ProtParam(<http://web.expasy.org/prot-param/>)分析 *Tnmd/Xirp2a* 的理化性质。使用 DNAMAN 软件对不同脊椎动物 *tnmd/xirp2a* 基因进行同源性分析, 并使用 MAGE7.0 软件构建基因系统进化树。

1.5 qRT-PCR 扩增

参照基因克隆获得的 *tnmd* 和 *xirp2a* 序列信息, 以 β -actin 为内参, 利用 Primer Premier 5.0 设计其定量引物, 由武汉擎科公司合成(表 2)。荧光定量 PCR 使用 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH Plus) 试剂盒(TaKaRa, 大连), 以团头鲂肌间骨不同发育时期样品和 2 龄团头鲂不同组织样品 cDNA 为模板, 参照试剂盒反应体系进行 qRT-PCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法进行目的基因的 mRNA 相对表达水平计算。使用 SPSS 软件中的 Duncan's Multiple Range Test 来比较基因在肌间骨不同发育时期及不同组织中的相对表达水平差异性。

表 2 基因荧光定量 PCR 引物信息

Table 2 Primer information for real time PCR of genes

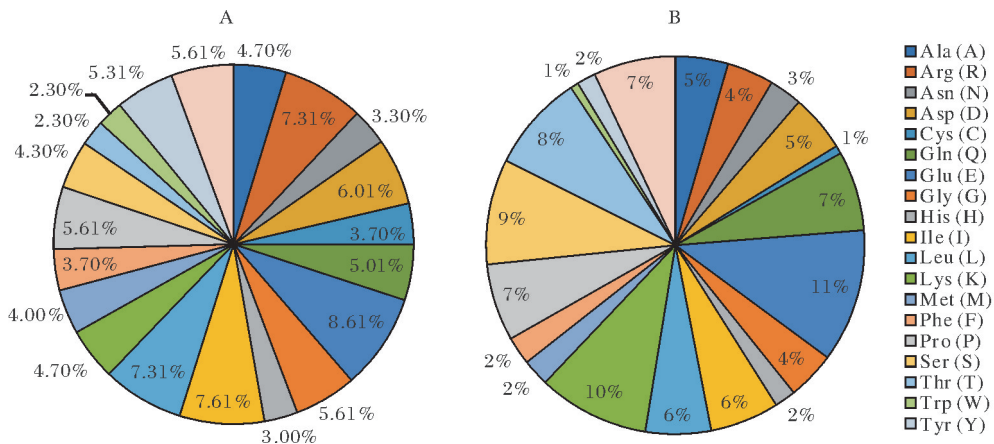
基因名称 Gene ID	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>tnmd</i>	F:TCAGGGCTCAAACCAAG
	R:CTCCTCCACGTCCTCTAC
<i>xirp2a</i>	F:TGGGCAAGTCTCTAACA
	R:TGGAAGGGTCTCGCTCAT
β -actin	F:CGTGCTGTTTTCCCTTCCATT
	R:CAATACCGTGCTCAAAGGATACTT

2 结果与分析

2.1 团头鲂 *Tnmd* 和 *Xirp2a* 理化性质分析

利用同源克隆拼接核心序列,获得了团头鲂 *tnmd* 和 *xirp2a* 的 cDNA 核心序列,其中 *tnmd* 为 1 420 bp,包括开放阅读框 903 bp;*xirp2a* 为 11 715 bp,开放阅读框为 9 525 bp。ProtParam 软件预测结果显示,团头鲂 *Tnmd* 由 301 个氨基酸残基构成,分子式为 $C_{1583}H_{2427}N_{431}O_{451}S_{23}$,分子质量为 35.45

ku,理论等电点(pI)为 5.66,为酸性蛋白。氨基酸残基中 Arg (7.3%)、Glu (8.6%)、Ile (7.6%)、Leu(7.3%)的频率较高,极性氨基酸占 53.6%,其中包括 24.2%的中性氨基酸、14.8%的碱性氨基酸、14.6%的酸性氨基酸;非极性氨基酸占 46.10% (图 1A)。消光系数 ($M^{-1}cm^{-1}\gamma = 280\text{ nm}$) 为 62 965,其不稳定系数为 34.58,属稳定类蛋白;疏水指数为 79.34,平均亲水性为 -0.45,属可溶性蛋白。*Xirp2a* 由 3 174 个氨基酸残基构成,分子式为 $C_{15563}H_{25134}N_{4302}O_{5120}S_{95}$,分子质量为 357.48 ku,理论等电点(pI)为 5.39,为酸性蛋白。氨基酸残基中 Glu(11.4%)、Lys(9.5%)和 Ser(9%)的频率较高,极性氨基酸占 63.9%,其中包括 34.2%中性氨基酸、15.3%的碱性氨基酸、14.4%的酸性氨基酸;非极性氨基酸占 34.1% (图 1B)。消光系数 ($M^{-1}cm^{-1}\gamma = 280\text{ nm}$) 为 203 865,其不稳定系数为 59.01,属不稳定类蛋白;疏水指数为 69.7,平均亲水性为 -0.815,属可溶性蛋白。

图 1 基因 *tnmd*(A)和 *xirp2a*(B)氨基酸频率分布图Fig.1 Amino acid frequency distribution of *tnmd* (A) and *xirp2a* (B)

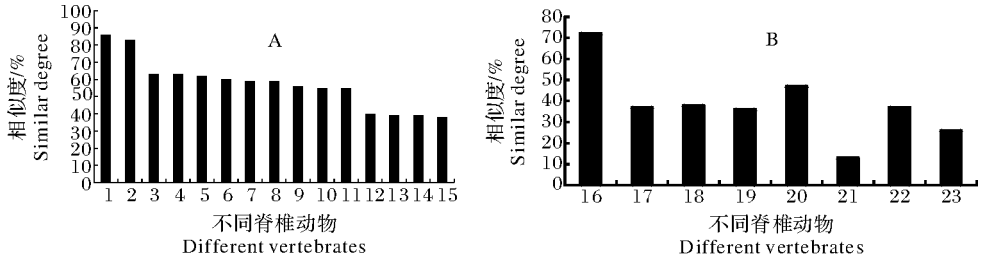
2.2 团头鲂 *tnmd* 和 *xirp2a* 同源性分析

使用 DNAMAN 软件对人 (*Homo sapiens*)、鼠 (*Mus musculus*)、鸡 (*Gallus gallus*)、团头鲂及其他鱼类 *tnmd/xirp2a* 氨基酸序列进行同源性比较,并使用 MAGE 软件构建进化树。结果表明:团头鲂 *tnmd* 的氨基酸序列与鲤 (85.98%)、斑马鱼 (82.62%) 具有高度同源性 (图 2A),在进化树中距离最近 (图 3A);与其他鱼类具有中度同源性 (63%~55%);与人 (39.63%)、牛 (39.02%)、小鼠 (38.72%)、家鸡 (38.11%) 具有低度同源性;在进化树中鱼类与哺乳类和家禽类的遗传距离比较远,形

成两个大分支。团头鲂 *xirp2a* 与斑马鱼的同源性较高 (72%) (图 2B),在进化树中距离最近 (图 3B),与其他物种的同源性较低。通过比对不同脊椎动物 *tnmd* 氨基酸序列,发现在鱼类中存在一段氨基酸序列的缺失 (图 4)。

2.3 *tnmd* 和 *xirp2a* 基因在团头鲂不同组织中的表达

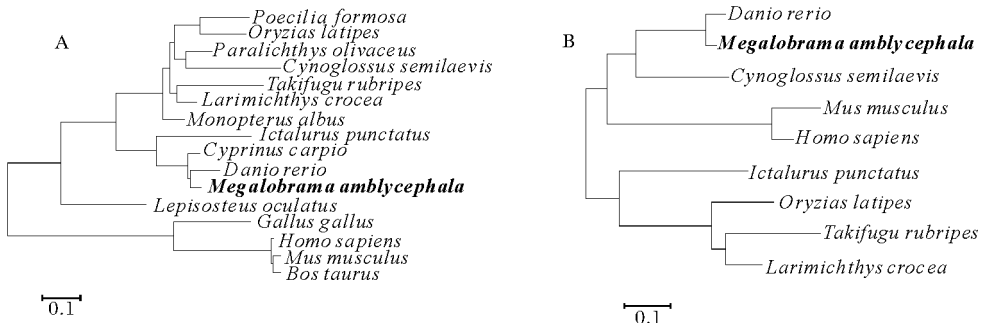
不同组织的定量表达结果显示,*tnmd* 和 *xirp2a* 基因在肌间骨和肌肉里面有很高的表达量,与其他组织中的表达水平存在显著差异 ($P < 0.05$)。*tnmd* 基因在肌肉中的表达量显著高



1: 鲤 *Cyprinus carpio*; 2: 斑马鱼 *Danio rerio*; 3: 斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*; 4: 黄鳝 *Monopterus albus*; 5: 大黄鱼 *Larimichthys crocea*; 6: 牙鲆 *Paralichthys olivaceus*; 7: 青鳉 *Oryzias latipes*; 8: 亚马逊花鲈 *Poecilia Formosa*; 9: 斑点雀鲷 *Lepisosteus oculatus*; 10: 半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis*; 11: 红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*; 12: 人 *Homo sapiens*; 13: 牛 *Bos taurus*; 14: 鼠 *Mus musculus*; 15: 鸡 *Gallus gallus*; 16: 斑马鱼 *Danio rerio*; 17: 斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*; 18: 大黄鱼 *Larimichthys crocea*; 19: 青鳉 *Oryzias latipes*; 20: 半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis*; 21: 红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*; 22: 人 *Homo sapiens*; 23: 鼠 *Mus musculus*.

图 2 团头鲂 *tmd*(A) 和 *xirp2a*(B) 与其他脊椎物种的同源性比较

Fig.2 Comparison of homology between *tmd* and *xirp2a* in *M. amblycephala* and other vertebrates



A: *Megalobrama amblycephala*: MK_033246, *Cyprinus carpio*: XP_018971269, *Danio rerio*: NP_001107885, *Poecilia Formosa*: XP_016517049, *Oryzias latipes*: XP_004073119, *Paralichthys olivaceus*: XP_019948014, *Cynoglossus semilaevis*: XP_024919030, *Takifugu rubripes*: XP_003970659, *Larimichthy scrocea*: XP_010730297, *Monopterus albus*: XP_020451660, *Ictalurus punctatus*: XP_017328923, *Lepisosteus oculatus*: XP_015207016, *Gallus gallus*: NP_996868, *Bos taurus*: NP_001093418, *Mus musculus*: NP_071717, *Homo sapiens*: NP_071427; B: *Megalobrama amblycephala*: MK_033245, *Danio rerio*: XP_005165842, *Cynoglossus semilaevis*: XP_008323051, *Ictalurus punctatus*: XP_011609184, *Larimichthy scrocea*: XP_019110793, *Mus musculus*: NP_001019789, *Homo sapiens*: NP_001186073.

图 3 *tmd*(A) 和 *xirp2a*(B) 基因的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *tmd* and *xirp2a*

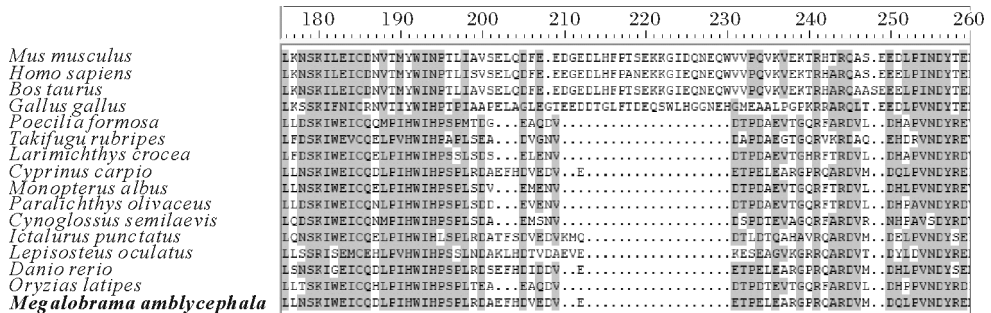
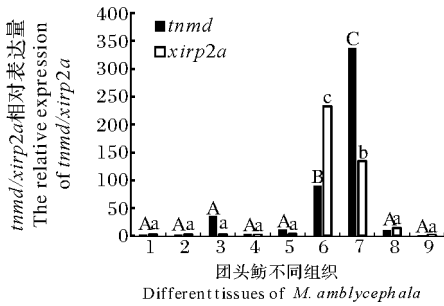


图 4 不同脊椎动物 *tmd* 部分序列比对分析

Fig.4 Partial alignment sequence of *tmd* in different vertebrates



1: 鳍 Fin; 2: 性腺 Gonad; 3: 心 Heart; 4: 肾 Kidney; 5: 脑 Brain; 6: 肌间骨 Intermuscle bone; 7: 肌肉 Muscle; 8: 肝 Liver; 9: 脾 Spleen. 不同的大写字母和小写字母分别表示 *tnmd* 和 *xirp2a* 在不同组织中的差异显著性 ($P < 0.05$)。Uppercase and lowercase letters indicates the significant difference for *tnmd* and *xirp2a* in the different tissues, respectively ($P < 0.05$).

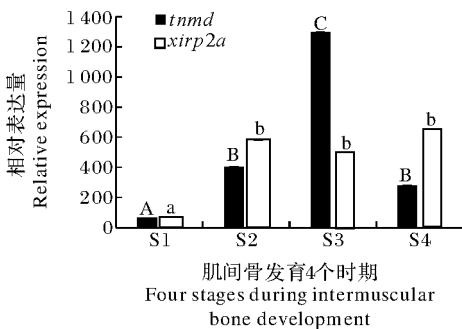
图5 *tnmd* 和 *xirp2a* 在团头鲂不同组织中的相对表达量

Fig.5 Relative expression levels of *tnmd* and *xirp2a* in different tissues of *M. amblycephala*

于在肌间骨中的表达量 ($P < 0.05$), 但肌肉中 *xirp2a* 的表达水平要显著低于肌间骨 ($P < 0.05$), 另外 *tnmd* 基因在心脏中也存在一定的表达量 (图5)。

2.4 *tnmd* 和 *xirp2a* 基因在团头鲂肌间骨不同发育时期的表达分析

不同时期表达量结果显示, *tnmd* 在第 I 时期的表达量最低, 在第 III 时期的表达量最高, 整体呈现先上升后下降的趋势。 *xirp2a* 在第 I 时期的表达水平也是最低的, 在其他 3 个时期的表达水平较高, 但没有显著差异 ($P > 0.05$) (图6)。



不同的大写字母和小写字母分别表示 *tnmd* 和 *xirp2a* 在不同时期中的差异显著性 ($P < 0.05$)。Uppercase and lowercase letters indicates the significant difference for *tnmd* and *xirp2a* in the different tissues, respectively ($P < 0.05$).

图6 *Tnmd/xirp2a* 在团头鲂肌间骨发育不同时期的相对表达量

Fig.6 Relative expression of *tnmd/xirp2a* in different development stages of intermuscular bones

3 讨论

本研究通过 PCR、基因克隆和高通量测序等技术获得团头鲂 *tnmd/xirp2a* 基因的 CDs 核酸序列, 并通过 ProtParam 分析了 Tnmd 蛋白和 Xirp2a 蛋白的理化性质, 可为研究团头鲂 *tnmd/xirp2a* 基因在肌间骨发育过程中的分子特性提供理论依据。通过对团头鲂 *tnmd/xirp2a* 基因序列分析发现, 其长度和编码的氨基酸数量与其他物种相似。同源性在某种程度上可以反映物种的亲缘关系, 团头鲂 *tnmd* 和 *xirp2a* 基因在鲤科鱼类中同源性较高, 但在不同物种中的同源性变异性较大 (*tnmd*: 38% ~ 86%; *xirp2a*: 13% ~ 72%), 说明二者在进化发育系统中保守性低, 但在同一科中存在高度保守性。通过比对不同脊椎动物 *tnmd* 基因的氨基酸序列, 发现鱼类中存在一段氨基酸序列的缺失。Tnmd 蛋白是一种主要在肌腱中表达的 II 型跨膜糖蛋白^[18], 其基因启动子由 *scx* 激活^[19]。已有研究表明, *tnmd* 基因的遗传变异与 II 型糖尿病 (T2DM)、中心性肥胖和葡萄糖代谢受损相关^[20-21], Tolppanen 等^[22] 提出 *tnmd* 的遗传变异与低度炎症有关。鱼类具有潜在糖尿病体质, 糖代谢能力低, 在自然环境中几乎不摄食高淀粉饵料^[23]。因此, 我们推测 *tnmd* 基因在进化过程中增加的氨基酸片段, 有可能改变了物种的糖代谢能力。

在团头鲂不同组织表达谱中, *tnmd* 和 *xirp2a* 基因在肌间骨和肌肉中均显示高 mRNA 水平; 并且肌间骨发育 4 个关键时期中, *tnmd* 基因的表达量变化与肌间骨发育存在同步性。 *tnmd* 和 *xirp2a* 作为肌腱、韧带以及隔膜发育的关键因子, 说明肌腱和肌间骨之间可能存在潜在的分子联系。肌腱是一种连接骨骼肌与骨骼的结缔组织, 在医学上, 当人肌腱受到某些外界因素影响后, 会出现一种典型的获得性异位骨化, 即肌腱钙化^[24], McClure^[25] 利用老鼠建立肌腱切断模型, 观察发现全部模型在 10 周后均发生了肌腱钙化。Asai 等^[26] 在肌腱受损的小鼠模型上发现了一种损伤源性肌腱祖细胞, 这类细胞比普通肌腱祖细胞具有更强的成软骨能力, 推测这类细胞可能成为肌腱钙化的细胞源。除此之外, Chen 等^[27] 以斑马鱼为模型, 利用原位杂交和免疫组化等方法, 发现在斑马鱼的颅面以及肌隔处存在肌腱标

志物的表达,如 *Tnmd* (tenomodulin), *Scleraxis* (*Scx*), type I collagen。基于斑马鱼与哺乳动物肌腱的基因表达、形态学、胶原超微结构排列和发育调节的相似性,斑马鱼模型可为研究脊椎动物遗传系统中的肌腱生物学提供新途径。由此说明,鱼与人的肌腱存在着同源性,并且可能出现类似肌腱钙化的现象,也为肌间骨由肌腱分化而来这一理论提供了一定支持。

肌间骨的形成涉及到膜内骨化的多类细胞群。体内的间充质干细胞形成细胞团,然后部分干细胞分化成骨原细胞并形成骨质中心,与此同时血管开始增生为骨原细胞的增值分化提供营养,随后骨质开始矿化成骨,并由成骨细胞形成的骨膜所包围^[28]。Zhang 等^[29]提出肌腱干细胞的分化是不可逆的,而肌间骨的形成最终来源于体内的干细胞, Gemball 等^[30]认为肌间骨是一种骨化肌腱,推测肌间骨的形成可能由附着于肌腱组织周围的肌腱干细胞分化而来。肌腱干细胞是一种类似间充质干细胞,具有高增殖潜能及分化潜能的细胞^[31],为肌腱骨化是由肌腱干/祖细胞分化而来提供了理论支持^[32]。在医学上,Rui 等^[33]就异位骨化提出肌腱骨化是肌腱干细胞错误分化。在肌腱修复方面,肌腱干/祖细胞成为了一种新型细胞源。大量的研究已报道肌腱干/祖细胞与成骨分化的相关性,一些与肌腱发育相关的分子标记如 *Tnmd*、*Scleraxis*、type I collagen 等,在肌腱干/祖细胞中的表达量要明显高于骨髓间充质干细胞^[34-36]。通过成骨、脂肪分化的两个关键因子(*Runx2* 和 *PPAP γ*),可以诱导肌腱干/祖细胞定向分化为成骨/脂肪^[37-38],而且在肌腱干/祖细胞中可以通过 *Wnt/t*/肌腱干细胞信号通道来调节肌腱发育相关基因 *scx*、*mkx* 和 *tnmd* 的表达^[38]。

Xirp2a 对肌隔的发育发挥重要作用, Otten 等^[39]发现 *xirp2a* 基因的表达定位于骨骼肌,并且局限于肌腱连接处(myotendinous junction, MTJ),在斑马鱼孵化 24 h 时,*xirp2a* 在体肌节处存在高度的表达,在孵化 48 h 后,*xirp2a* 的表达衍生到其他类型的骨骼如胸鳍。在幼鱼期,肌间骨的发育是与体长有关的^[9]。随着体长的增长,鱼的肌肉逐渐加强,肌隔组织也不断发育,但大侧肌的肌隔纤维膜不足以支持运动,需要骨来支持肌肉的运动^[6]。随

着肌间骨的成熟,骨原细胞定向分化开始减弱,*runx2a* 基因表达量下降,随后出现骨组织的增大成熟^[17]。但在鱼生长过程中,肌肉的发育始终伴随着肌隔的发育,因此,在肌间骨发育的 II、III、VI 时期中,*xirp2a* 始终表现高表达量。

本研究通过肌腱发育相关基因 *tnmd* 和 *xirp2a* 的克隆及同源性分析,推测 *tnmd* 在不同脊椎动物的氨基酸差异性可能存在糖代谢调节能力不同的作用。通过团头鲂不同组织和肌间骨发育 4 个关键时期的定量表达分析,为肌间骨是由肌腱发育而来提供一定的理论支持。

参 考 文 献

- [1] DANOS N, WARD A B. The homology and origins of intermuscular bones in fishes: phylogenetic or biomechanical determinants[J]. *Biological journal of the linnean society*, 2012, 106(3): 607-622.
- [2] 孟庆闻, 苏锦祥, 李婉端. 鱼类比较解剖学[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 102-103.
- [3] PATTERSON C, JOHNSON G D. The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes[J]. *Smlthsonian contribution to zoology*, 1995(559): 1-83.
- [4] JOHNSON G D, PATTERSON C. The intermuscular system of acanthomorph fishes: a commentary[J]. *American museum novitates*, 2001(3312): 1-25.
- [5] 吕耀平, 鲍宝龙, 蒋燕, 等. 低等真骨鱼类肌间骨的比较分析[J]. *水产学报*, 2007, 31(5): 661-668.
- [6] 秉志. 幼鲤大侧肌隔骨针的观察[J]. *动物学报*, 1962(2): 32-36.
- [7] BIRD N C, MABEE P M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae)[J]. *Developmental dynamics*, 2003, 228(3): 337-357.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] MOAV R, FINKEL A, WOHLFARTH G. Variability of intermuscular bones, vertebrae, ribs, dorsal fin rays and skeletal disorders in the common carp[J]. *Theoretical and applied genetics*, 1975, 46(1): 33-43.
- [11] 田雪, 王良炎, 陈琳, 等. *OST* 基因在淇河鲫肌间骨骨化过程中的表达研究[J]. *水产学报*, 2016, 40(5): 673-680.
- [12] 王良炎, 田雪, 庞小磊, 等. 硬化蛋白基因在淇河鲫成鱼不同肌间骨相邻肌组织的表达差异分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(12): 1354-1359.

- [13] JAVED A, BAE J S, AFZAL F, et al. Structural coupling of smad and runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal [J]. *Journal of biological chemistry*, 2008, 283 (13): 8412-8422.
- [14] ZHANG W Z, LAN T, NIE C H, et al. Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream [J]. *Gene*, 2018, 642: 116-124.
- [15] WAN S M, YI S K, ZHONG J, et al. Dynamic mRNA and miRNA expression analysis in response to intermuscular bone development of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Scientific reports*, 2016, 6. DOI:10.1038/srep31050.
- [16] LIU H, CHEN C H, GAO Z X, et al. The draft genome of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) reveals the development of intermuscular bone and adaptation to herbivorous diet [J]. *Giga science*, 2017, 6(7): 1-13.
- [17] KARSENTY G, WAGNER E F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development [J]. *Developmental cell*, 2002, 2(4): 389-406.
- [18] BRANDAU O, MEINDL A, FÄSSLER R, et al. A novel gene, tendin, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-1 [J]. *Developmental dynamics*, 2010, 221(1): 72-80.
- [19] SHUKUNAMI C, TAKIMOTO A, NISHIZAKI Y, et al. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes [J]. *Scientific reports*, 2018, 8: 3155. DOI:10.1038/S41598-018-21194-3.
- [20] TOLPPANEN A M, PULKKINEN L, KOLEHMAINEN M, et al. Tenomodulin is associated with obesity and diabetes risk; the Finnish diabetes prevention study [J]. *Obesity*, 2012, 15(5): 1082-1088.
- [21] TOLPPANEN A M, LAPPALAINEN T J, KOLEHMAINEN M, et al. Tenomodulin mRNA levels are correlated with serum and mRNA levels of inflammatory markers; the genobin study [J]. *Diabetes and vascular disease research*, 2007, 4(suppl 1): 19-20.
- [22] TOLPPANEN A M, PULKKINEN L, HERDER C, et al. The genetic variation of the tenomodulin gene (TNMD) is associated with serum levels of systemic immune mediators—the Finnish diabetes prevention study [J]. *Genetics in medicine*, 2008, 10(7): 536-544.
- [23] 米康夫, 董耀龄. 鱼会患糖尿病吗? ——用高碳水化合物饵料, 鱼生长缓慢, 鲫鱼等越是肉食性强的鱼种耐糖能力越低 [J]. *国外水产*, 1984, 22(8): 489-491.
- [24] KARSENTY G, WAGNER E F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development [J]. *Developmental cell*, 2002, 2(4): 389-406.
- [25] MCCLURE J. The effect of diphosphonates on heterotopic ossification in regenerating achilles tendon of the mouse [J]. *Journal of pathology*, 2010, 139(4): 419-430.
- [26] ASAI S, OTSURU S, CANDELA M E, et al. Tendon progenitor cells in injured tendons have strong chondrogenic potential; The CD105-negative subpopulation induces chondrogenic degeneration [J]. *Stem cells*, 2015, 32(12): 3266-3277.
- [27] CHEN J W, GALLOWAY J L. The development of zebrafish tendon and ligament progenitors [J]. *Development*, 2014, 141(10): 2035-2045.
- [28] BRADLEY E W, MCGEE-LAWRENCE M E, WESTENDORF J J. Hdac-mediated control of endochondral and intramembraneous ossification [J]. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 2011, 21(2): 101-113.
- [29] ZHANG J, WANG J H. Mechanobiological response of tendon stem cells: implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy [J]. *Journal of orthopaedic research*, 2010, 28(5): 639-643.
- [30] GEMBALL A S, BRITZ R. Homology of intermuscular bones in acanthomorph fishes [J]. *American museum novitates*, 1998 (3241): 1-25.
- [31] ZHANG J, WANG H C. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes [J]. *BMC musculoskeletal disorders*, 2010, 11(1): 10.
- [32] BI Y, EHIRCHIOU D, KILTS T M, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche [J]. *Nature medicine*, 2007, 13(10): 1219-1227.
- [33] RUI Y F, LUI P P, CHAN L S, et al. Does erroneous differentiation of tendon-derived stem cells contribute to the pathogenesis of calcifying tendinopathy? [J]. *Chinese medical journal*, 2011, 124(4): 606-610.
- [34] DUCY P, ZHANG R, GEOFFROY V, et al. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 747-754.
- [35] NI M, LUI P P Y, RUI Y F, et al. Tendon-derived stem cells (TDSCs) promote tendon repair in a rat patellar tendon window defect model [J]. *Journal of orthopaedic research*, 2012, 30(4): 613-619.
- [36] TAN Q, LUI P P Y, RUI Y F, et al. Comparison of potentials of stem cells isolated from tendon and bone marrow for musculoskeletal tissue engineering [J]. *Tissue engineering Part A*, 2012, 18(7/8): 840-851.
- [37] KISHIMOTO Y, OHKAWARA B, SAKAI T, et al. Wnt/ β -catenin signaling suppresses expressions of *Scx*, *Mkx*, and *Tnmd* in tendon-derived cells [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0182051.
- [38] KOMORI T, YAGI H, NOMURA S, et al. Targeted disruption of *cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 755-

764.

markinjured skeletal muscle in zebrafish[J]. PLoS One, 2012,

[39] OTTEN C, VEN P F V D, LEWRENZ I, et al. Xirp proteins

7(2):e31041.

Cloning and expression analysis of *tnmd/xirp2a* genes relating to tendon development in *Megalobrama amblycephala*

CHEN Yulong^{1,2} ZHANG Lihong¹ ZHOU Jiajia¹ MENG Youlian¹ GAO Zexia^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction, Ministry of Education/Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to investigate the relationship between the tendon development related genes (*tnmd/xirp2a*) and the intermuscular bone in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*), we firstly obtained the cDNA sequence of *tnmd/xirp2a* by cloning. The full-length cDNA of *tnmd* is 1 420 bp, including an open reading frame (ORF) of 906 bp encoding 301 amino acids. The cDNA sequences of *xirp2a* is 11 715 bp in length, including an ORF of 9 522 bp encoding 3 174 amino acids. Phylogenetic analysis showed that the *tnmd* gene was lowly conserved among different vertebrates. The *tnmd* protein had a sequence deletion compared to mammals and poultry. The *tnmd/xirp2a* expression in the muscle and intermuscular bone was significantly higher than that in other tissues ($P < 0.05$). The *tnmd* expression in the muscle was significantly higher than that in the intermuscular bone ($P < 0.05$), while the result of *xirp2a* was the exact opposite. During intermuscular bone development, the *tnmd* mRNA was significantly higher at stage III than that at the other three stages. However, there was no significant differences of the *xirp2a* expression among stages II, III and IV ($P > 0.05$). Our results indicate that the *tnmd* gene may play possible regulation roles during the intermuscular bone development, while the relationship between the *xirp2a* gene and the intermuscular bone development needs to be further studied. The results of this study provide theoretical support for the derivation of intermuscular bone from the tendon.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; intermuscular bone; *tnmd*; *xirp2a*; cloning; qRT-PCR

(责任编辑:边书京)