

转录因子 *Runx2* 和 *Osterix* 在半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 早期发育阶段 的时序性表达分析*

马 骞 庄志猛^① 冯文荣 柳淑芳

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 转录因子 *Runx2* 和 *Osterix* 在高等脊椎动物骨骼发育的调控过程中具有重要作用。本研究以 *Runx2* 和 *Osterix* 基因作为研究对象, 利用实时荧光定量 PCR 技术分析了两个转录因子在半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 成鱼的组织表达分布及其在早期发育阶段的表达水平变化。研究结果显示, *Runx2* 和 *Osterix* 在半滑舌鲷成鱼的 13 个组织中具有较广泛的分布, 并在脾组织中表达量最高, 在背鳍、脑等组织中次之, 在肝、肠、胃等组织中仅有微弱的表达。在半滑舌鲷早期发育阶段(卵期、仔鱼、稚鱼和幼鱼), *Runx2* 和 *Osterix* 的时序性表达特征如下: 1) 孵化前, *Runx2* 在卵裂期与原肠期的表达水平最高, 在胚胎期最低, 而 *Osterix* 表达水平呈逐渐升高的趋势并在胚胎期达到最大值, 表明两个基因功能作用的起始可能存在一定的时序性; 2) *Runx2* 和 *Osterix* 在 1-5 日龄仔鱼阶段的表达水平均呈现先升高后降低的趋势, 而在 10-90 日龄稚、幼鱼阶段未呈现特定的变动规律, 表达量在一定范围内呈波动变化; 3) 相关性分析结果显示, 两个基因的表达量在孵化后(1-90 日龄)存在显著的相关性。研究结果表明, *Runx2* 和 *Osterix* 基因可能共同参与半滑舌鲷早期发育阶段生长发育调控, 但其与骨骼发生、发育的相关性有待进一步研究。

关键词 半滑舌鲷; *Runx2* 基因; *Osterix* 基因; mRNA 表达; 早期发育阶段

中图分类号 S932 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0001-07

锌指蛋白(Zinc finger protein)、Runt 结构蛋白(Runt-domain protein)、HLH 蛋白(HLH protein)、亮氨酸拉链蛋白(Leucine zipper protein)等多种转录因子在哺乳动物成骨细胞增殖和分化过程中发挥着决定性作用(Aubin *et al*, 1996; 孙海飏等, 2009)。而不同类型细胞的分化途径也受到各自细胞谱系特异性转录因子的调控(Yamaguchi *et al*, 2000)。Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, *Runx2*) 又称核心结合因子 a1 (Core-binding factor a1, *CBFA1*), 是 Runt 结构域基因家族的转录因子(Nakashima *et al*,

2002; Nishimura *et al*, 2008)。已有研究表明, *Runx2* 在哺乳动物成骨细胞发育、分化及骨形成等过程中发挥着重要作用(Otto *et al*, 1997)。*Runx2* 基因纯合性缺失的小鼠表现出完全的成骨缺失(Komori *et al*, 1997)。此外, *Runx2* 基因缺失的小鼠其膜内骨化和软骨骨化均不能发生(Enomoto *et al*, 2004)。*Osterix* 作为哺乳动物骨形成所必需的成骨细胞特异性转录因子, 其编码产物为特异蛋白 7 (Specific protein 7, Sp7)。高等脊椎动物的 *Osterix* 主要表达于成骨细胞, 并且在成骨细胞分化晚期阶段起着决定性作用(Nakashima

* 国家自然科学基金(31201981)和中国博士后科学基金(2013M531658)共同资助。马 骞, E-mail: maqian@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 庄志猛, 研究员, E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-10-23, 收修改稿日期: 2014-12-10

et al, 2002)。例如, *Osterix* 基因敲除后小鼠完全缺乏骨, 而软骨发育正常, 可见 *Osterix* 作为决定成骨细胞定向的主导因子, 在调控成骨细胞的分化和增殖方面具有重要作用。Oh 等(2012)通过对软骨内骨化过程进行研究, 发现 *Osterix* 同样是软骨细胞分化为成骨细胞过程中的关键调控因子。此外, *Osterix* 对小鼠骨形成过程的调控涵盖了从胚胎期到出生后的不同发育阶段(Nishio et al, 2006)。

Nakashima 等(2002)报道, *Osterix* 缺失的小鼠可表达正常水平的 *Runx2*, 而在敲除 *Runx2* 基因的小鼠中, *Osterix* 的转录产物没有在骨骼元件中检测到, 由此可推测, *Osterix* 在 *Runx2* 的下游来控制成骨细胞分化。Nishio 等(2006)通过进一步研究证实, *Runx2* 通过与 *Osterix* 启动子区域 DNA 片段的特异性结合进而完成对 *Osterix* 的调节。由此可见, 上述两个转录因子在调控高等脊椎动物骨骼发生、发育的过程中密切相关。目前, 鱼类 *Runx2* 和 *Osterix* 的遗传学特征及功能研究鲜见报道, 两个转录因子在鱼类生长发育的调控过程, 尤其在骨骼发生、发育过程中是否发挥作用也有待深入研究。

鱼类早期发育过程中, 鱼体的形态特征、生态和生理变化相当剧烈。本研究所选择的卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期 4 个发育时期, 是鱼类数量最大、死亡最多、数量变化率最高的敏感时期(陈大刚, 1991; Blaxter et al, 1974)。硬骨鱼类作为真骨鱼类的特化群, 其在从胚后仔鱼发育成长为稚鱼期间都会经历一个特殊的变态发育过程。伴随着发育过程中外部形态与游泳方式的改变, 鱼体的骨骼形态和位置亦发生显著变化。而鱼类的骨骼作为鱼体的基本结构之一, 其发生发育过程与个体的发育密不可分。鱼类早期发育阶段中骨骼的发生、发育决定了鱼类的游泳方式、游泳速度及摄食行为等生态习性。因此, 研究鱼类早期生长发育的调控机制, 尤其是骨骼发生、发育的调节机制, 对揭示其早期发育阶段的功能趋向及环境适应具有重要的理论意义和实践价值。

本研究选取半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)这一名贵的海水增养殖对象作为研究鱼类, 分析 *Runx2* 和 *Osterix* 基因在半滑舌鳎成鱼中的组织表达分布特征, 并进一步探讨两个转录因子 mRNA 在早期发育阶段(卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期)的表达水平变化规律及二者的相关性, 以期揭示两个转录因子在半滑舌鳎早期发育阶段的调节作用, 亦可为发掘鱼类骨骼发育的潜在调控因子奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

基因克隆和组织表达检测用半滑舌鳎取自山东莱州明波水产养殖有限公司, 取健康 3 龄鱼 12 尾(雌、雄鱼各 6 尾)。其中, 雌鱼体长、体重分别为(583.0±61.3) mm、(1479.2±280.8) g; 雄鱼为(333.3±14.3) mm、(170.3±16.9) g。解剖并分别取其脑、吻软骨、背鳍、鳃、性腺、心、肠、肾、肝、肌肉、脾、脊髓及胃共计 13 个组织, 立即将样品投入液氮中速冻, 在低温状态下转移至-80℃超低温冰箱中保存待用。此外, 根据陈大刚(1991)和万瑞景等(2004)对半滑舌鳎等鱼类早期发育阶段的划分标准, 选取用于早期发育阶段 *Runx2* 和 *Osterix* 基因表达水平分析用的半滑舌鳎样品(表 1)。上述样品均保存于液氮中用于后续总 RNA 的提取。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

将半滑舌鳎成鱼的组织样品和不同发育阶段的全鱼样品在液氮中研磨后, 利用 TRIzol 法(Invitrogen)提取总 RNA。经检测浓度和纯度, 以提取的总 RNA 为模板, 利用 PrimeScript RTase 试剂盒(TaKaRa)合成第一链 cDNA。

1.3 引物设计

根据本实验室前期克隆的半滑舌鳎 *Runx2* 和 *Osterix* 基因的 cDNA 全序列(GenBank 登录号: KC422342、KC422343), 设计用于实时荧光定量 PCR 检测的引物(*Runx2*-RT-F/R、*Osx*-RT-F/R), 引物序列信息见表 2。

1.4 *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 的组织分布及其在早期发育阶段的表达水平检测

应用实时荧光定量 PCR 的方法, 利用基因特异性引物 *Runx2*-RT-F/R 和 *Osx*-RT-F/R(表 2), 以半滑舌鳎第一链 cDNA 为模板, 检测 *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 在半滑舌鳎成鱼的组织分布以及不同发育阶段的表达变化。如表 2 所示, 分别选取延伸因子(Elongation factor 1-alpha, EF1A)和 18S 核糖体 DNA(18S ribosomal DNA, 18S)基因作为荧光定量 PCR 的内参基因(Ma et al, 2015)。实验流程参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(TaKaRa)操作说明, 在 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上进行。所有引物均经过扩增效率检测($E > 90\%$, $R^2 > 0.990$), 荧光定量 PCR 产物经测序验证, 每个样品设置 3 个重复。

表 1 早期发育阶段半滑舌鲷样品
Tab.1 Samples of *C. semilaevis* during the early developmental stages

取样 Sampling	卵期 Eggs				仔鱼期 Larvae		稚鱼期 Juvenile	幼鱼期 Fingerling
	卵裂期 Cleavage stage	原肠期 Gastrula stage	胚胎期 Embryonic stage	孵化期 Hatching stage	前期仔鱼 Early-stage larvae	后期仔鱼 Late-stage larvae		
时间 Time	3 hpf	13 hpf	22 hpf	32 hpf	1, 2 dph	3, 4, 5, 10 dph	20, 30, 40, 50 dph	90 dph
数量 Number	20 粒	20 粒	20 粒	20 粒	6 尾	6 尾	6 尾	6 尾

注: hpf 为受精后时龄; dph 为孵化后日龄
Note: hpf: Hours post-fertilization; dph: Days post-hatching

表 2 本研究所用的引物序列
Tab.2 Oligonucleotide primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	应用 Amplification target
Runx2-RT-F Runx2-RT-R	GTTTCAGTCCGCCGTCCAATAGC TGAAGGCAGGACCGAACAGAGAA	<i>Runx2</i> 的荧光定量 PCR 检测 Expression of <i>Runx2</i>
Osx-RT-F Osx-RT-R	CCCAGGACCCGTCTCTCTTA AGTTGGTGTGGAGTGGACG	<i>Osterix</i> 的荧光定量 PCR 检测 Expression of <i>Osterix</i>
EF1A-F EF1A-R	GACAAACTGAAGGCHGAGCG CAGCCTGAGAGGTTCCAGTGAT	mRNA 组织表达分布的内参 Expression of <i>EF1A</i>
18S-F 18S-R	CCTGAGAAACGGCTACCACATCC CCAATTACAGGGCCTCGAAAG	早期发育阶段 mRNA 表达水平检测的内参 Expression of 18S

1.5 数据处理

根据荧光实时定量 PCR 测得的 C_t 值,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *Runx2* 和 *Osterix* 基因在半滑舌鲷的组织分布及其在早期发育阶段的 mRNA 表达模式。本研究所有结果均以平均值±标准误差(Mean±SD)表示,并利用 SPSS 16.0 软件中的 One-Way ANOVA 分析 *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 表达量在各发育阶段间差异显著水平;利用皮尔逊相关系数(R)指示两个基因在早期发育阶段 mRNA 表达量变动规律的相关性。

2 结果与分析

2.1 *Runx2* mRNA 的组织表达分布及其在早期发育阶段的表达水平

利用实时荧光定量 PCR 技术检测半滑舌鲷成鱼 *Runx2* mRNA 的组织表达分布。结果显示, *Runx2* mRNA 具有较广泛的组织分布特性,并在脾组织中表达量最高,其次在鳃、背鳍、脑有中等水平的表达,在胃、肠和肝组织中有微弱表达(图 1)。半滑舌鲷脾组织中 *Runx2* 的 mRNA 表达水平可达胃、肠组织的 128 倍。

如图 2 所示, *Runx2* mRNA 在半滑舌鲷胚胎发育阶段的卵裂期和原肠期(3-13 hpf)具有较高的表达量

(1.00-1.17);从胚胎发育的胚胎期(22 hpf)到 5 日龄仔鱼这一发育阶段, *Runx2* 的表达水平总体呈现先升高后降低的趋势;在 10-90 日龄发育时期, *Runx2* 的表达量在中等表达水平上下波动(0.38±0.16)。在本研究的所有取样时间点,半滑舌鲷 *Runx2* 在原肠期(13 hpf)表达量最高,而在胚胎期(22 hpf)的 mRNA 表达水平最低,原肠期的表达量约为胚胎期的 25 倍。差异显

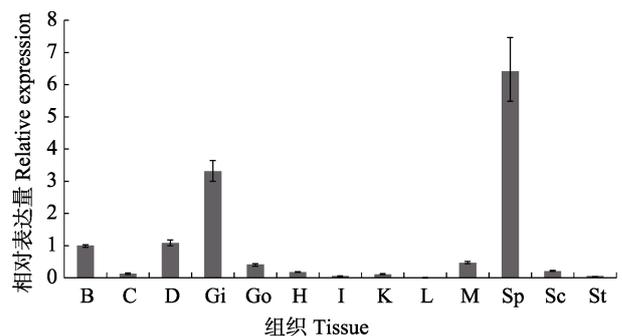


图 1 半滑舌鲷 *Runx2* mRNA 的组织表达分布
Fig.1 The expression of *Runx2* mRNA in various tissues of *C. semilaevis*

B: 脑; C: 吻软骨; D: 背鳍; Gi: 鳃; Go: 性腺; H: 心; I: 肠; K: 肾; L: 肝; M: 肌肉; Sp: 脾; Sc: 脊髓; St: 胃
B: Brain; C: Cartilage; D: Dorsal fin; Gi: Gill; Go: Gonad; H: Heart; I: Intestine; K: Kidney; L: Liver; M: Muscle; Sp: Spleen; Sc: Spinal cord; St: Stomach

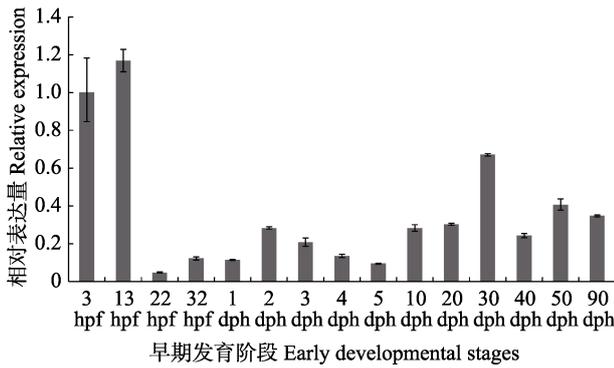


图2 *Runx2* mRNA 在半滑舌鲷早期发育阶段的表达水平
Fig.2 The *Runx2* mRNA expression level during the early developmental stages of *C. semilaevis*

hpf: 受精后时龄; dph: 日龄

hpf: Hours post-fertilization; dph: Days post-hatching

著性分析结果表明, *Runx2* mRNA 在卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期这 4 个早期发育阶段中的表达水平无显著差异。

2.2 *Osterix* mRNA 的组织表达分布及其在早期发育阶段的表达水平

如图 3 所示, 半滑舌鲷 *Osterix* mRNA 在脾组织中具有极高的表达水平, 其次在脊髓、性腺、背鳍、吻软骨、脑和肌肉有较低水平的表达, 在其余 6 个组织中表达量微弱。半滑舌鲷脾组织中 *Osterix* 的 mRNA 表达水平约为脊髓等组织的 17 倍。

在半滑舌鲷早期发育阶段中的卵期, *Osterix* mRNA 在卵裂期(3 hpf)、原肠期(13 hpf)表达量最低, 而在胚胎期(22 hpf)的表达量最高, 胚胎期的表达水

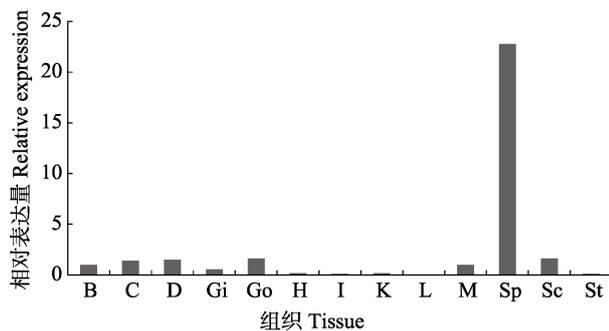


图3 半滑舌鲷 *Osterix* mRNA 的组织表达分布
Fig.3 The expression of *Osterix* mRNA in various tissues of *C. semilaevis*

B: 脑; C: 吻软骨; D: 背鳍; Gi: 鳃; Go: 性腺; H: 心; I: 肠; K: 肾; L: 肝; M: 肌肉; Sp: 脾; Sc: 脊髓; St: 胃
B: Brain; C: Cartilage; D: Dorsal fin; Gi: Gill; Go: Gonad; H: Heart; I: Intestine; K: Kidney; L: Liver; M: Muscle; Sp: Spleen; Sc: Spinal cord; St: Stomach

平约为胚胎发育早期(卵裂期、原肠期)的 16 倍; 从胚胎发育的孵化期(32 hpf)到 5 日龄仔鱼这一发育阶段, *Osterix* 的表达水平总体呈现先升高后降低的趋势; 在 10 日龄之后, *Osterix* mRNA 表达量在不同发育时期波动较大(36.31 ± 13.62)。此外, 30 日龄幼鱼中 *Osterix* 的表达量是各早期发育阶段中的最大值, 其次分别为 10 日龄仔鱼及胚胎期受精卵。差异显著性分析结果表明, *Osterix* mRNA 在卵期、仔鱼期、稚鱼期和幼鱼期这 4 个早期发育阶段中的表达水平无显著差异。

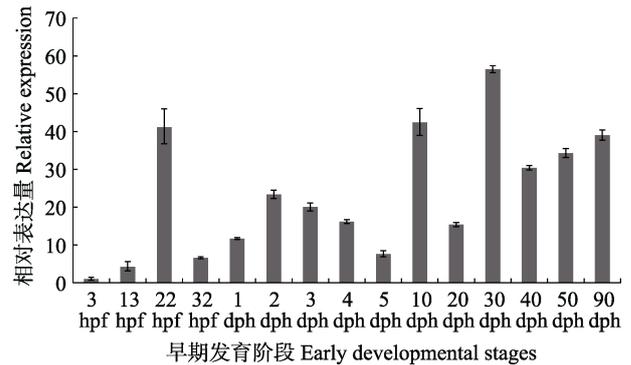


图4 *Osterix* mRNA 在半滑舌鲷早期发育阶段的表达水平
Fig.4 The *Osterix* mRNA expression level during the early developmental stages of *C. semilaevis*

hpf: 受精后时龄; dph: 日龄

hpf: hours post-fertilization; dph: days post-hatching

2.3 早期发育阶段中 *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 表达水平的变动规律

在半滑舌鲷早期发育阶段的不同时期, *Runx2* 和 *Osterix* 两个基因的表达水平存在一定的变动规律。首先, 在卵期的 4 个发育时期, *Runx2* 在卵裂期(3 hpf)与原肠期(13 hpf)的表达水平最高, 在胚胎期(22 hpf)最低; 而 *Osterix* 与之相反, 其在胚胎期表达量最高, 在卵裂期与原肠期最低。在 1-5 日龄仔鱼中, *Runx2* 和 *Osterix* 的表达水平均呈现先升高后降低的趋势, 而在 10 日龄后的稚、幼鱼中, *Runx2* 和 *Osterix* 的 mRNA 表达量未呈现特定的变动规律, 而是在一定范围内波动变化。通过对 *Runx2* 和 *Osterix* 基因在早期发育阶段的表达水平进行相关性分析, 结果表明两个基因的表达量在孵化后(1-90 日龄)存在显著的相关性($R=0.78$, $P=0.001$)。

3 讨论

Runx2 和 *Osterix* 被认为是高等脊椎动物骨发育和细胞成骨分化的两个关键转录因子(Nakashima *et al*,

2002; Nishimura *et al*, 2008)。近年来, 国内外学者针对哺乳动物 *Runx2* 的功能及作用机制开展了大量研究。例如, 敲除 *Runx2* 基因的小鼠出生后, 因没有肋骨导致呼吸困难而死亡(Gersbach *et al*, 2004); 而过表达 *Runx2* 能够促进细胞的成骨分化, 并有效提高新骨生成的速度和数量(Phillips *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2006)。此外, 大鼠骨髓间充质干细胞在成骨分化过程中 *Runx2* 的表达水平上调(胡晓青等, 2014)。由此可见, *Runx2* 的表达水平可影响成骨细胞分化和发育进程。在小鼠的不同发育阶段中, *Runx2* 的表达起始于胚胎发育第 9.5 天的脊索处, 在大约 13.5 d 时表达于软骨膜/骨膜处(Otto *et al*, 1997)。此后, *Runx2* 高水平的表达于所有骨的成骨细胞中, 包括软骨内成骨和膜内成骨方式所形成的骨中(Ducy *et al*, 1997; Inada *et al*, 1999)。

目前, 有关鱼类 *Runx2* 基因的相关研究十分有限。罗在礼(2011)¹⁾采用显微注射的方式将外源 *Runx2* 导入斑马鱼单细胞胚胎并观察融合蛋白的荧光表达, 结果表明, 融合质粒从 8 hpf 开始表达。此外, *Runx2* 基因在胸鳍部位的表达始于孵化后 2 日龄, 并且表达部位位于鳍条分化处(van der Meulen *et al*, 2005)。上述研究结果表明, *Runx2* 可能参与调控鱼类早期生长发育, 尤其是骨骼的发生、发育过程。因此, 本研究克隆了半滑舌鲷 *Runx2* 基因的 cDNA 序列并分析其早期发育阶段的表达水平。研究结果表明, 半滑舌鲷 *Runx2* 在卵裂期、原肠期胚胎(3–13 hpf)中具有最高水平的表达, 随后其表达水平显著降低, 表明 *Runx2* 基因很有可能在半滑舌鲷胚胎发育的早期阶段具有重要作用。此外, *Runx2* 在半滑舌鲷 1–5 日龄仔鱼的表达水平呈先升高后降低的趋势, 这与 Iimura 等(2012)在金鱼(*Carassius auratus*)中的研究相似, 即 *Runx2* 表达量在 1–3 日龄逐渐升高。

脊椎动物的生长发育过程受到不同层次多基因的协同调控。因此, 尽管 *Runx2* 在调控哺乳动物的生长发育过程, 尤其是成骨细胞分化早期, 发挥了十分重要的正向调控作用, 但其成骨细胞的最终成熟过程由 *Osterix* 主导(Liu *et al*, 2001; Zhang, 2012)。即 *Runx2* 与 *Osterix* 在骨发育的不同时期起作用。例如, Li 等(2009)根据骨骼标志基因表达的时序将斑马鱼骨骼发育分成 3 个有重叠的时期(Flores *et al*, 2006; Marks, 1989): 1)早期分化表达, *Runx2* 在斑马鱼软骨和骨骼原始细胞中的表达; 2)中期分化表达, 以 *Osterix* 起始表达为标志; 3)成熟期分化表达, *colla2* 和 *osn* 表达。此外, *Osterix* 在调控过程中存在于 *Runx2* 的下

游, 其功能仍受到 *Runx2* 的控制。在斑马鱼早期发育阶段, *Runx2* 的表达逐渐由头骨区域向其他骨骼部位扩展, 其表达常常也预示着 *Osterix* 和其他骨基质基因的表达(Li *et al*, 2009)。因此, *Osterix* 在鱼类早期发育阶段的表达可能晚于 *Runx2* 基因。

如图 2、图 4 所示, *Osterix* 在半滑舌鲷胚胎发育过程中高表达水平的出现晚于 *Runx2*, 即 *Runx2* 的表达水平在卵裂期(3 hpf)和原肠期(13 hpf)最高, 随后在胚胎期(22 hpf)显著降低; 而 *Osterix* 在胚胎期(22 hpf)之前, 其表达水平呈逐渐升高的趋势, 并在胚胎期达到最大值。由此可推测, 半滑舌鲷 *Runx2* 和 *Osterix* 在调节胚胎发育的过程中, 其功能作用的起始也存在一定的时序性, *Runx2* 的功能行使主要起始于卵裂期、原肠期; 而 *Osterix* 在胚胎发育阶段的表达滞后于 *Runx2*。而相关性分析结果表明, 在半滑舌鲷孵化后的仔、稚、幼鱼阶段, *Runx2* 和 *Osterix* 基因的 mRNA 时序性表达规律趋于一致并且显著相关, 表明上述两个转录因子的相互作用可能在孵化后逐渐趋于稳定, 二者协同参与鱼类早期发育阶段生长发育的调控。

此外, *Runx2* 和 *Osterix* 基因在半滑舌鲷成鱼不同组织的分布模式也极其相似, 二者均具有较广泛的分布而非特异性地表达于骨组织中(图 1、图 3)。尽管大量研究表明, *Runx2* 和 *Osterix* mRNA 特异性地表达于骨组织中, Jeong 等(2008)报道了 *Runx2* 基因在人类非骨组织(脑、精子)中的表达, 表明该转录因子还可能参与生殖调控等其他内分泌调节过程。半滑舌鲷 *Runx2* 和 *Osterix* 基因在脾脏中极高水平的表达, 揭示了两个因子在其他生长内分泌调控中的潜在功能。

已有研究表明, *Runx2* 和 *Osterix* 的表达受到其他基因的调控。例如, 骨形态发生蛋白(BMPs)家族中的 BMP2、BMP4/7 同源二聚体和 BMP7 均可激活 *Runx2* 的表达(Kundu *et al*, 2002)。此外, BMP 2 也能同时诱导骨源性及非骨源性细胞的 *Osterix* 表达上调(Celil *et al*, 2005; Lee *et al*, 2003)。由此可见, 脊椎动物的骨骼发育是个复杂而有序、并受到多个细胞因子精密调控的过程, 参与调控作用的各细胞因子之间也存在一定的相互作用(Soltanoff *et al*, 2009)。因此, 骨骼发育关键调控基因的选取及其结构与功能分析可为揭示鱼类早期骨骼发生、发育的调控机制提供线索。本研究选取的 *Runx2* 和 *Osterix* 基因可能在半滑舌鲷早期发育阶段具有一定的调控作用, 并且二者之

1) 罗在礼. 外源 p204 和 cbfa1 对斑马鱼胚胎发育和骨生成的影响. 山东大学硕士研究生学位论文, 2011
间在表达水平上存在一定的相关性。然而, 上述两个基因在半滑舌鳎成鱼中具有较为广泛的组织表达分布, 并且在软骨组织中的 mRNA 表达水平较低。因此, *Runx2* 和 *Osterix* 是否与半滑舌鳎早期骨骼发生、发育有关, 还有待通过进一步的原位杂交和功能分析进行验证。

参 考 文 献

- 万瑞景, 姜言伟, 庄志猛. 半滑舌鳎早期形态及发育特征. 动物学报, 2004, 50(1): 91-102
- 孙海飏, 刘强, 郭敏锋, 等. 神经递质 P 物质通过调控转录因子 *Osterix* 的表达促进成骨细胞分化. 西安交通大学学报, 2009, 30(6): 716-719
- 陈大刚. 黄渤海渔业生态学. 北京: 海洋出版社, 1991, 35-40
- 胡晓青, 张辛, 代岭辉, 等. 骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 *Runx2* 的表观遗传学修饰. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(2): 150-155
- Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). Principles of Bone Biology. San Diego: Academic Press, 1996, 51-67
- Blaxter JHS, Ehrlich KF. Change in behaviour during starvation of herring and plaice larvae. The Early Life History of Fish, 1974, 575-588
- Celil AB, Hollinger JO, Campbell PG. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. J Cell Biochem, 2005, 95(3): 518-528
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, 1997, 89(5): 747-754
- Enomoto H, Furuichi T, Zanma A, et al. Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro. J Cell Sci, 2004, 117(3): 417-425
- Flores MV, Lam EYN, Crosier P, et al. A hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish. Dev Dynam, 2006, 235(11): 3166-3176
- Gersbach CA, Byers BA, Pavlath GK, et al. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. Exp Cell Res, 2004, 300(2): 406-417
- Iimura K, Tohse H, Ura K, et al. Expression patterns of Runx2, *sparc*, and *bgp* during scale regeneration in the goldfish *Carassius auratus*. J Exp Zool, B: Mol Dev Evol, 2012, 318(3): 190-198
- Inada M, Yasui T, Nomura S, et al. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. Dev Dyn, 1999, 214(4): 279-290
- Jeong JH, Jin JS, Kim HN, et al. Expression of Runx2 transcription factor in non-skeletal tissues, sperm and brain. J Cell Physiol, 2008, 217(2): 511-517
- 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. Cell, 1997, 89(5): 755-764
- Kundu M, Javed A, Jeon JP, et al. *Cbfb* interacts with Runx2 and has a critical role in bone development. Nat Genet, 2002, 32(4): 639-644
- Lee MH, Kwon TG, Park HS, et al. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. Biochem Biophys Res Comm, 2003, 309(3): 689-694
- Li N, Felber K, Elks P, et al. Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation. Dev Dynam, 2009, 238(2): 459-466
- Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, et al. Overexpression of *Cbfa1* in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. J Cell Biol, 2001, 155(1): 157-166
- Ma Q, Zhuang ZM, Feng WR, et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression during early development processes of the tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Acta Oceanologica Sinica, 2015, DOI: 10.1007/s13131-015-0725-5
- Marks SC. Osteoclast biology: lessons from mammalian mutations. Am J Med Gen, 1989, 34(1): 43-54
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell, 2002, 108(1): 17-29
- Nishimura R, Hata K, Ikeda F, et al. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. J Bone Miner Metab, 2008, 26(3): 203-212
- Nishio Y, Dong Y, Paris M, et al. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. Gene, 2006, 372: 62-70
- Oh JH, Park SY, de Crombrughe B, et al. Chondrocyte-specific ablation of Osterix leads to impaired endochondral ossification. Biochem Biophys Res Comm, 2012, 418(4): 634-640
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell, 1997, 89(5): 765-771
- Phillips JE, Guldberg RE, Garcia AJ. Dermal fibroblasts genetically modified to express Runx2/Cbfa1 as a mineralizing cell source for bone tissue engineering. Tissue Eng, 2007, 13(8): 2029-2040
- Soltanoff CS, Chen W, Yang S, et al. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 2009, 19(1): 1-46
- Van der Meulen T, Kranenbarg S, Schipper H, et al. Identifi-

- cation and characterisation of two runx2 homologues in zebrafish with different expression patterns. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2005, 1729(2): 105–117
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*, 2000, 21(4): 393–411
- Zhang X, Yang M, Lin L, *et al.* Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose-derived stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Calcif Tissue Int*, 2006, 79(3): 169–178
- Zhang C. Molecular mechanisms of osteoblast-specific transcription factor Osterix effect on bone formation. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2012, 44(5): 659–665

(编辑 冯小花)

Temporal Expression of Transcription Factors *Runx2* and *Osterix* During Early Development of *Cynoglossus semilaevis*

MA Qian, ZHUANG Zhimeng^①, FENG Wenrong, LIU Shufang

(Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Key Laboratory for Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Transcription factors *Runx2* and *Osterix* play a vital role in the formation and differentiation of the skeleton in mammals. To date, there have been few reports on the regulatory mechanisms of the skeleton development in fish. In this study, we cloned the cDNA sequences of *Runx2* and *Osterix* in *Cynoglossus semilaevis*, and examined their expression patterns in 13 tissues of both female and male adults using qRT-PCR. The results showed that *Runx2* and *Osterix* mRNA were highly expressed in spleen, and moderately expressed in dorsal fin and brain. Next we detected and measured the levels of *Runx2* and *Osterix* mRNA at early developmental stages including the egg, larva, juvenile and fingerling stages. The temporal expression patterns are: 1) the mRNA level of *Osterix* was always significantly higher than *Runx2* during all developmental stages in this study; 2) at stages prior to hatching, the highest level of *Runx2* was observed in the cleavage and gastrula stages and then it dropped to a very low level, and the *Osterix* mRNA level increased and reached the peak in the embryonic stage; 3) at early larvae stages (1–5 days old), the expression of both *Runx2* and *Osterix* first increased followed by a decline; 4) as for the 10–90 day-old fish, there was no variation in the expression pattern of *Runx2* or *Osterix* mRNA. These results suggested that *Runx2* and *Osterix* could participate in the regulation of early development in *C. semilaevis*. However, further studies are needed to explore their roles in the skeleton development.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; *Runx2*; *Osterix*; mRNA expression; Early developmental stages

① Corresponding author: ZHUANG Zhimeng, E-mail: zhuangzm@ysfri.ac.cn