



单细胞转录组和NIB^{-/-}突变体揭示硬骨鱼肌间骨形成的遗传特征

华中农业大学

水产学院

高泽霞教授课题组

1 研究背景

水产食品是人类重要的动物蛋白来源之一。从1961至2018年间，有鳍鱼类的供应量和人均消费量均呈上升趋势（图 1a, b）。世界范围内主要养殖的有鳍鱼类都具有不同类型和数量的肌间骨（图 1b, c），如鲤科和鲑科。肌间骨的存在一定程度上增加了水产食品的加工难度和食用风险，降低了水产食品的经济价值。因此培育无肌间骨养殖鱼类至关重要。

肌间骨是由肌腱通过膜内骨化而来。斑马鱼肌腱组织细胞分化关键基因 *scxa* 的缺失，导致了肌间骨数量减少，同时也证明了肌间骨起源于肌腱祖细胞。随后，我们通过单细胞测序技术，获取了斑马鱼肌间骨组织的单细胞谱系和基因表达特征，并构建了肌间骨相关细胞群的分化轨迹。最后，通过 *crispr/cas9* 技术，比较并分析了鱼类肌间骨分化关键的作用。为培育无肌间骨养殖鱼类供重要依据。

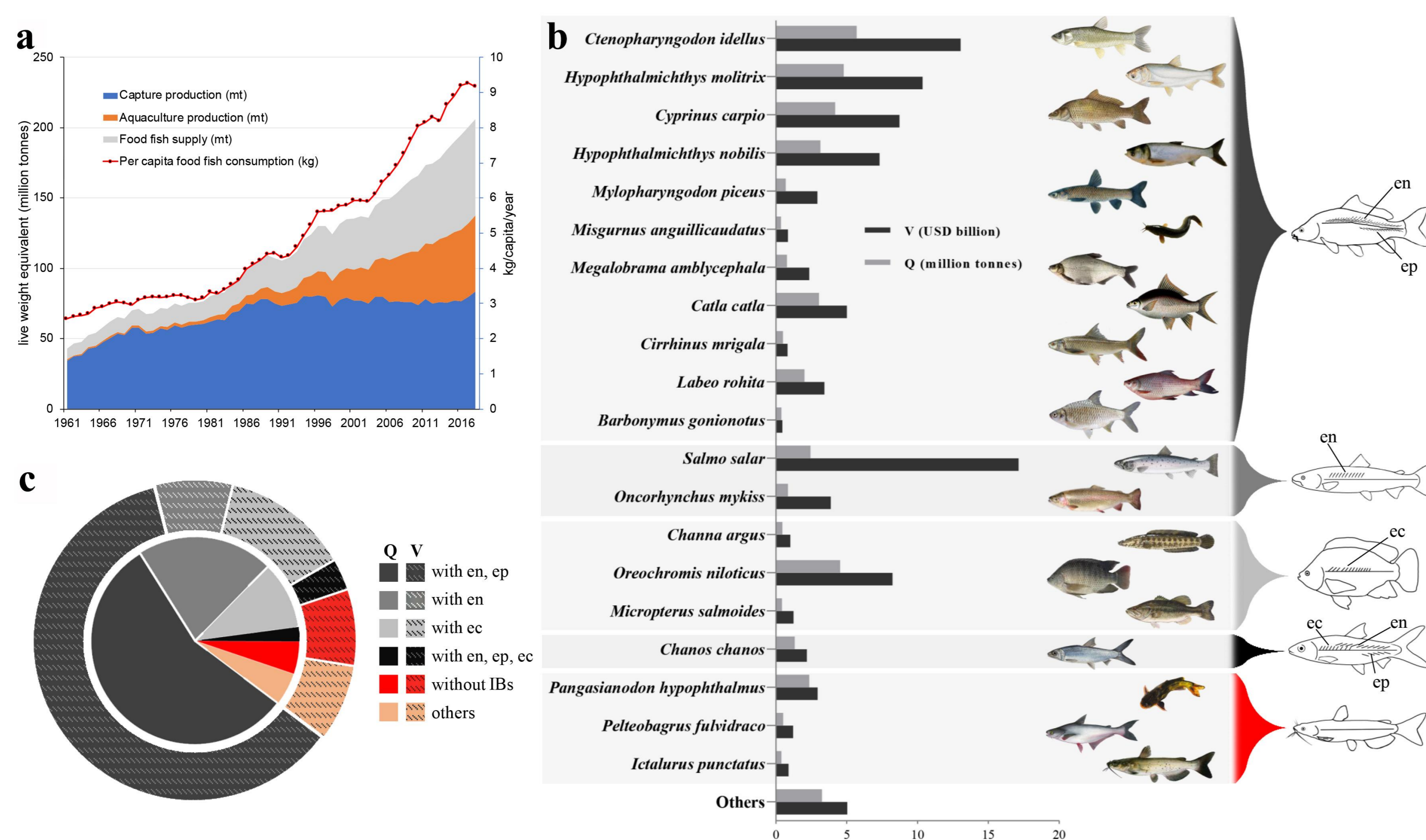


图1 全球鱼类产量和主要水产养殖鱼类肌间骨类型的统计数据。(a) 近年来全球鱼类捕捞、水产养殖和消费的统计数据。(b) 世界水产养殖生产的主要鱼类(2018年)及其肌间骨类型。(c) 不同类型肌间骨的水产养殖鱼类的全球产量和价值(2018年); mt: 百万吨; V: 价值; Q: 数量; en: 髓弓小骨; ep: 脉弓小骨; ec: 椎体小骨。

2 研究结果

I. scRNA-seq揭示肌间骨起源区域的单细胞谱系

为了解肌间骨发育相关细胞群的异致性，我们通过scRNA-seq对来自肌间骨起源组织的细胞进行聚类，并鉴定出18个不同的细胞簇（图2）。其中包括3个肌腱细胞群，和一个肌间骨关联的成骨细胞群。

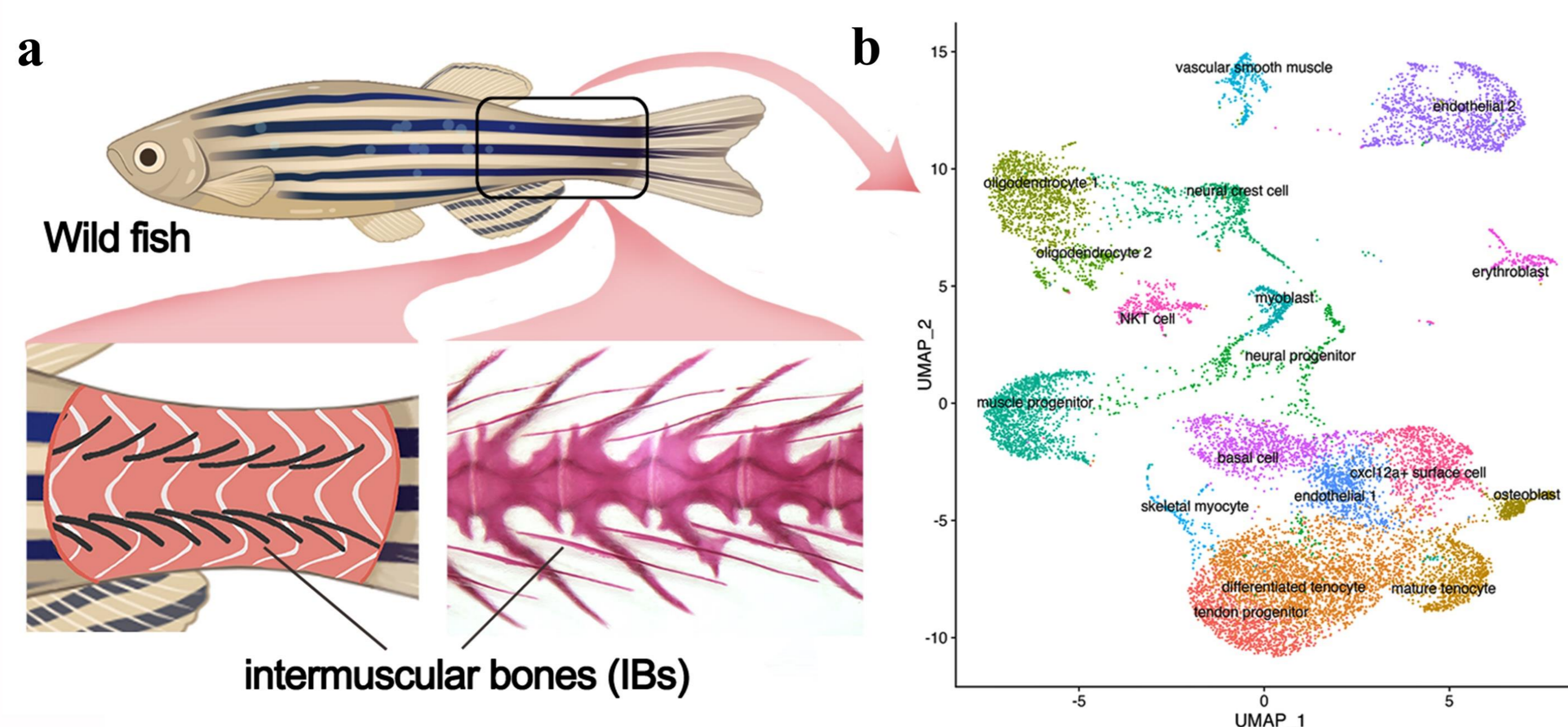


图2 野生型斑马鱼肌间骨 (IBs) 起源组织的单细胞表达谱和细胞类型的鉴定。(a) 用于scRNA-seq的样品的采集。(b) 来源于野生型斑马鱼肌间骨起源组织的13,075个细胞的聚类图，共聚类出18细胞群。

II. 构建成骨细胞分化轨迹并筛选调控肌间骨发育的关键基因

为了了解 IB 相关成骨细胞的起源，我们使用轨迹模型 (monocle2) 构建了肌间骨发育过程中的成骨细胞分化轨迹。伪时序图和扩散图显示了肌腱祖细胞向成熟肌腱细胞或成骨细胞的分化（图3）。最后依据不同基因在分化轨迹中的表达变化，筛选出肌间骨发育的关键基因

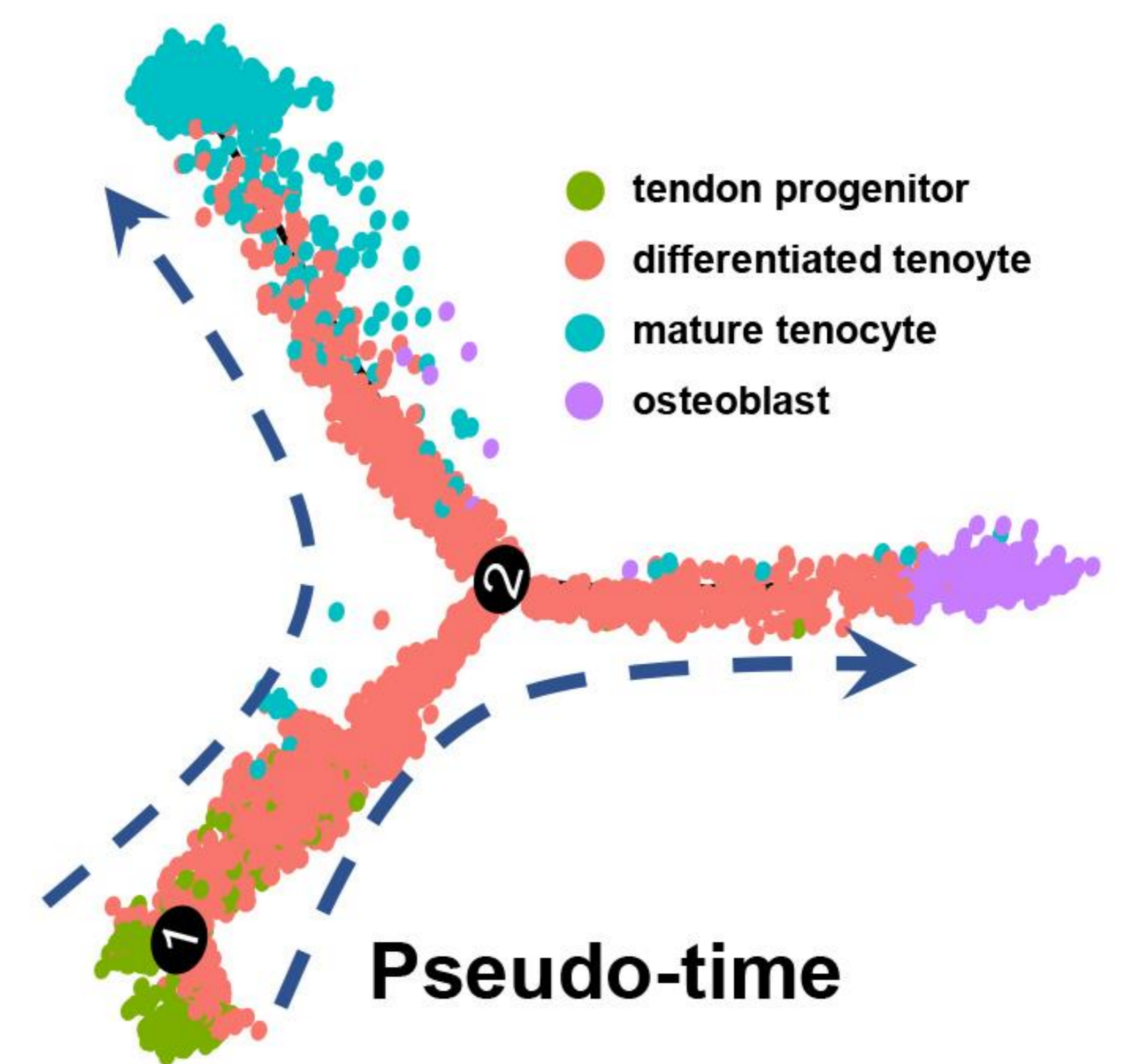


图3 肌间骨和肌腱分化轨迹

III. NIB的缺失完全抑制肌间骨的形成

依据肌间骨和肌腱的分化轨迹和基因在轨迹中的表达模式，我们筛选出了一个肌间骨分化的关键基因 *NIB*，同时使用 *crispr/cas9* 技术构建了斑马鱼 *NIB* 突变系。最后通过 *micro-CT* 和茜素红染色，发现斑马鱼 *NIB* 的缺失会导致肌间骨完全消失，并且无矿化（图4）。

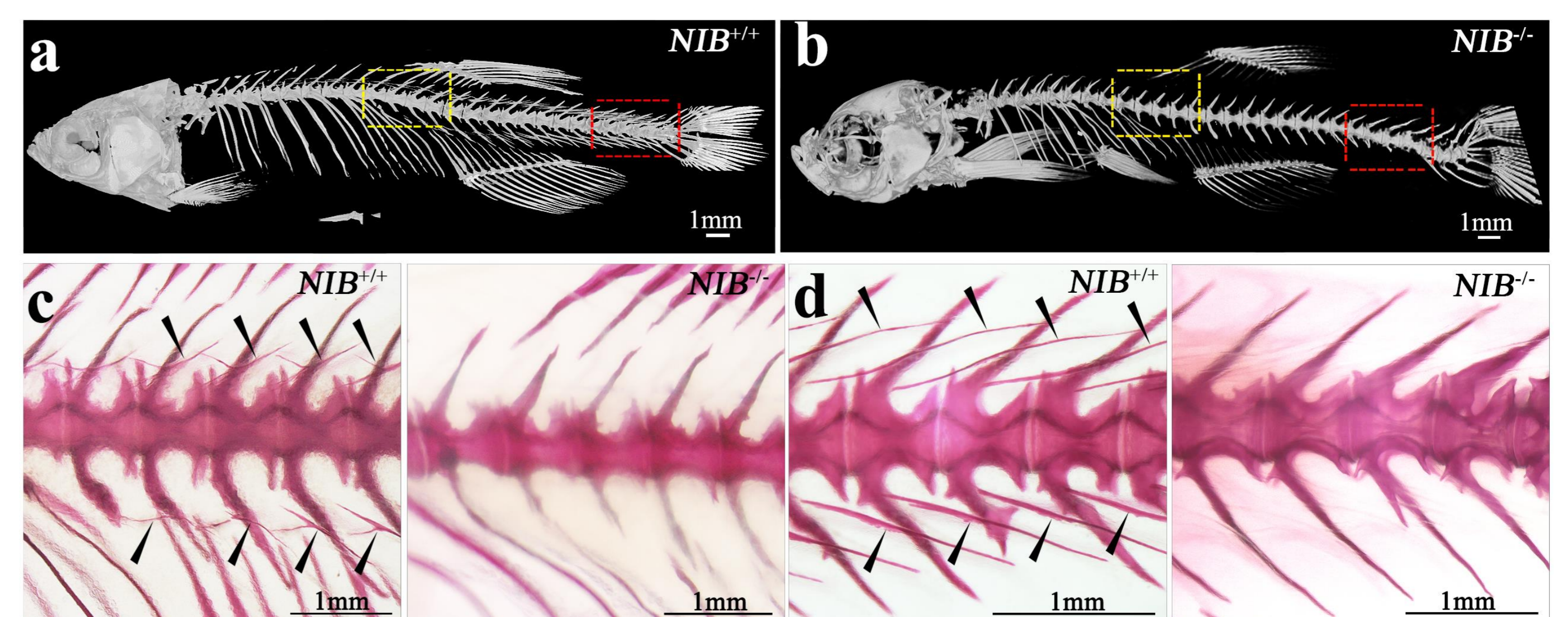


图4 *NIB*^{+/+}和*NIB*^{-/-}斑马鱼的表现特征。(a) 显微 CT 扫描显示*NIB*^{+/+}和*NIB*^{-/-}斑马鱼的整体骨骼结构。*NIB*^{-/-}斑马鱼中的肌间骨丢失(红色和黄色虚线框)。(b, c) *NIB*^{+/+}和*NIB*^{-/-}斑马鱼的茜素红染色。b 表示背部, c 表示尾部。箭头表示肌间骨。

IV. NIB^{-/-}斑马鱼肌间骨的缺失不影响正常的生长和发育

通过 *micro-CT* 发现相比于 *NIB*^{+/+} 斑马鱼, *NIB*^{-/-} 斑马鱼中的肌间骨以外的其他类型骨骼的骨密度 (图5 a, b) 以及总肌肉体积和体重无差异 (图5 c-e), 但体长比 *NIB*^{+/+} 斑马鱼高5% (图 5f)。

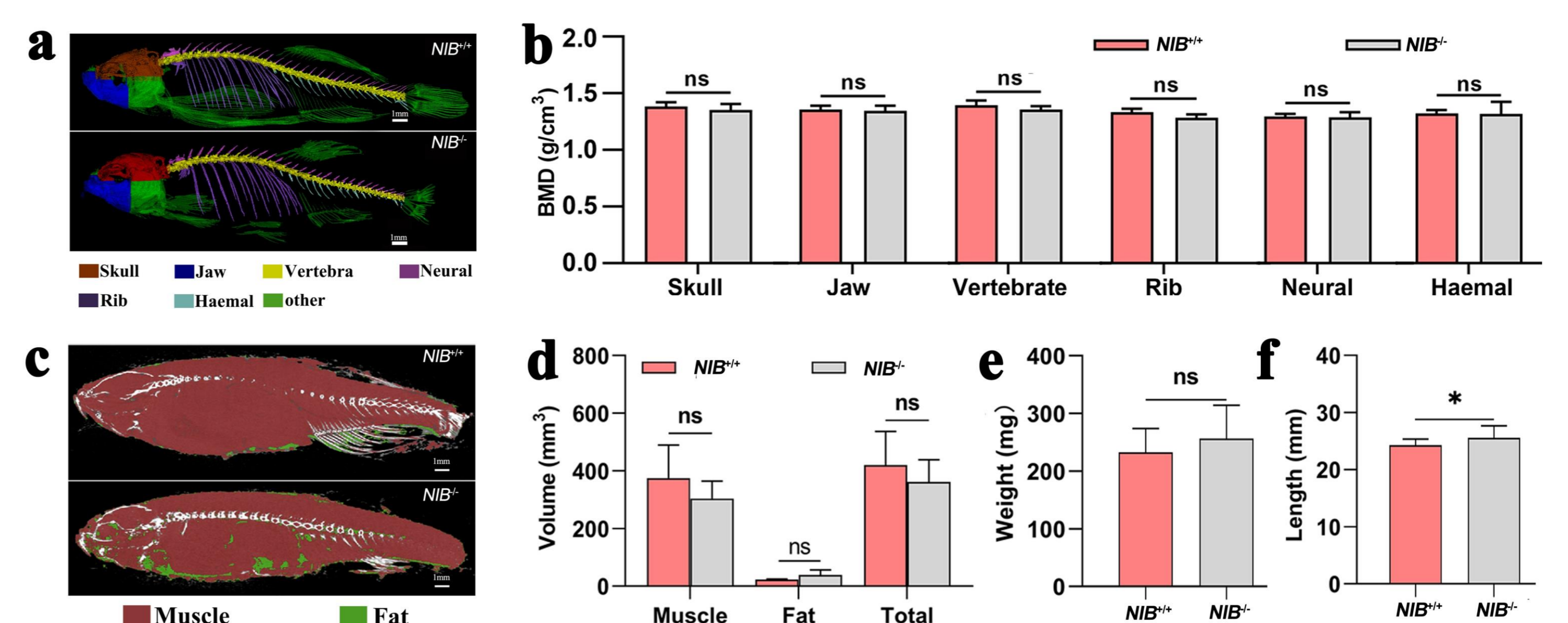


图5 *NIB*^{+/+}和*NIB*^{-/-}斑马鱼之间的游动能力、组织和生长特征的比较。(a, b) 计算并比较了*NIB*^{+/+}和*NIB*^{-/-}斑马鱼中六种骨骼的骨矿物质密度 (BMD) 值。(c, d) 成年 *NIB*^{+/+}和*NIB*^{-/-}斑马鱼肌肉体积的量化; 红色和绿色区域分别表示肌肉和脂肪。(e, f) *NIB*^{+/+}和*NIB*^{-/-}斑马鱼之间的重量和长度比较

3 总结

本研究通过scRNA-seq技术绘制了肌间骨起源组织的单细胞图谱，并构建了肌间骨和肌腱的分化轨迹，我们筛选出肌间骨分化关键基因 *NIB*，为培育无肌间骨鱼类打开了新的视野。