

· 基础研究 ·

## 斑马鱼3号染色体血红蛋白基因敲除对心血管发育的影响

黄梓熙<sup>1</sup>, 孟琳<sup>1</sup>, 陈良标<sup>1\*</sup>, 陈忠<sup>2\*</sup><sup>1</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; <sup>2</sup>上海交通大学医学院附属第六人民医院心内科, 上海 201306

**[摘要]** 目的: 研究斑马鱼3号染色体血红蛋白基因敲除后心血管发育的差异及可能的机制。方法: 利用CRISPR/Cas9敲除斑马鱼3号染色体血红蛋白基因 *hbba2* 到 *hbae3* 片段, 获得杂合突变体斑马鱼 ( $Hb^{+/-}$ )。检测  $Hb^{+/-}$  与野生型斑马鱼 (WT) 受精卵的血红蛋白含量及分布, 观察血管的发育, 统计两者5月龄红细胞数量, 并采用成年斑马鱼心脏转录组测序分析, qRT-PCR进行验证。结果:  $Hb^{+/-}$  胚胎血红蛋白含量明显减少, 且在受精后50 h的胚胎中异位分布。 $Hb^{+/-}$  腹部主血管与共同基静脉相对WT发育迟缓, 肠下静脉发育更快, 尾部节间血管增生; 而  $Hb^{+/-}$  和WT成鱼红细胞数量的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。对成年斑马鱼心脏转录组分析发现, 血红蛋白水平降低导致 *nos2b*、*cybb* 上调, *hif3a* 下调, 并激活了线粒体的代偿保护机制。结论: 血红蛋白基因敲除影响了胚胎时期斑马鱼的血红蛋白水平和血管发育, 通过调控基因表达和线粒体的补偿机制可维持成鱼的正常生理活动。

**[关键词]** 血红蛋白; 心血管发育; CRISPR/Cas9; *hbba2*; *hif3a***[中图分类号]** Q344**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)07-900-09**doi:** 10.7655/NYDXBNS20230702

## Effect of zebrafish hemoglobin gene knockout in chromosome 3 on cardiovascular development

HUANG Zixi<sup>1</sup>, MENG Lin<sup>1</sup>, CHEN Liangbiao<sup>1\*</sup>, CHEN Zhong<sup>2\*</sup><sup>1</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; <sup>2</sup>Department of Cardiology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201306, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the differences of cardiovascular development in zebrafish after knockout of the hemoglobin gene on chromosome 3 and the underlying mechanism. **Methods:** We used CRISPR/Cas9 technology to knock out the fragment from *hbba2* to *hbae3* of the zebrafish hemoglobin gene on chromosome 3 to obtain heterozygous zebrafish ( $Hb^{+/-}$ ). The hemoglobin content and distribution of  $Hb^{+/-}$  and wild-type zebrafish (WT) fertilized eggs were detected, the development of blood vessels was observed, and the number of 5-month-old erythrocytes of both were counted. The transcriptome of the heart of adult zebrafishes were analyzed by sequencing and validated by qRT-PCR. **Results:** A significantly reduced hemoglobin content in  $Hb^{+/-}$  embryos and ectopic in 50 hpf embryos was detected. Compared with WT,  $Hb^{+/-}$  had a retarded development of abdominal major vessels and common cardinal veins in the abdomen, a more rapid development of the subintestinal veins, and hyperplasia of the caudal intersegmental vessels. There was no significant difference in erythrocytes between  $Hb^{+/-}$  and adult WT ( $P > 0.05$ ). Transcriptome analysis of the heart of adult zebrafish revealed that the decreased hemoglobin levels led to the up-regulation of *nos2b* and *cybb*, down-regulation of *hif3a*, and activation of compensatory protective mechanisms in mitochondria. **Conclusion:** Hemoglobin gene knockout affects hemoglobin levels and vascular development in embryonic zebrafish, and the normal physiological activity of adult fish can be maintained by regulating gene expression and mitochondrial compensation mechanism.

**[Key words]** hemoglobin; cardiovascular development; CRISPR/Cas9; *hbba2*; *hif3a*

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(07):900-908]

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(32130109); 上海市第六人民医院特色学科项目

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhongchen7498@hotmail.com; lbchen@shou.edu.cn

心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的患病率近年来逐步提升,已经成为我国重大公共卫生问题,每年有2/5的死亡可归因于CVD<sup>[1]</sup>。除此之外,CVD的治疗费用也十分高昂,并且仍在不断增长<sup>[2-3]</sup>。因此,CVD的影响因素和治疗方法都需要深入研究。红细胞是运输氧气的载体,血红蛋白在机体内发挥着重要的作用,虽然血红蛋白水平和CVD之间的关系仍不明确,但是它与携氧量、血流量及某些炎症过程相关,而有研究显示,血红蛋白水平和CVD之间的关系并不是线性关系<sup>[4]</sup>,而是呈U型相关<sup>[5]</sup>,因此血红蛋白水平增高或降低都可能与CVD有密切的关系<sup>[6]</sup>,目前对于血红蛋白水平调控心血管发育的机制研究较少。

斑马鱼基因与人类具有高度的同源性,本研究充分利用斑马鱼易于繁殖、便于在体观察的特点以及现有成熟的基因操纵技术,首次在斑马鱼中使用CRISPR/Cas9技术对3号染色体上血红蛋白基因从*hbba2*到*hbae3*的片段进行敲除,对基因敲除后斑马鱼的血红蛋白水平及不同时期心血管发育进行研究,以阐明血红蛋白水平变化影响心血管发育的分子机制,为CVD的防治提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

邻联茴香胺(o-Dianisidine)粉末(Sigma公司,美国);rTaq酶、PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒、TB Green® Premix Ex Taq™(TaKaRa公司,日本);PBS缓冲液、甲基纤维素(北京索莱宝);Tween-20、醋酸钠、无水乙醇、甘油(上海生工);30%过氧化氢(上海国药试剂);4% PFA(上海 Lab Top);TRIzol(Ambion公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 斑马鱼饲养

AB品系野生型斑马鱼(购于中科院遗传与发育生物学研究所)及*kdr1:EGFP*转基因斑马鱼(购于国家斑马鱼资源中心)在上海海圣斑马鱼养殖循环系统中按照标准方法饲养。养殖水循环水温控制在28℃,pH值为7.4±0.2,自动进行暗光循环(10 h/14 h)。通过自然配对交配获得斑马鱼胚胎,并将其保存在装有养殖水的培养皿中,置于28℃恒温培养箱。斑马鱼胚胎的年龄以受精后小时数或天数(hpf或dpf)表示。所有实验操作均经上海海洋大学动物伦理委员会批准。

#### 1.2.2 CRISPR/Cas9 敲除

利用CRISPR/Cas9技术<sup>[7]</sup>对斑马鱼3号染色体上编码血红蛋白的基因片段*hbba2*到*hbae3*进行双靶点敲除(图1)。基因敲除后利用基因组DNA提取试剂盒提取DNA,进行基因组扩增。参照NCBI上斑马鱼基因序列设计引物,并在上海生工公司进行合成。分别使用3对引物进行PCR扩增,鉴定斑马鱼的基因型。鉴别结果可分为以下3种情况,①使用第1对引物进行扩增:上游引物H6-1-F(5'-GT-GAAAGGGTCTGCTGGTTGTT-3');下游引物H5-12-R(5'-TTAGCTTGCAGAGACGGA-3')。扩增后无条带则为野生型(WT)斑马鱼;若扩增出220 bp的条带,则说明此斑马鱼为杂合子(Hb<sup>+/-</sup>)或纯合子(Hb<sup>-/-</sup>),接着再分别使用HB-2-F1(5'-CAAAGCTTA-AATGTTTCGTGC-3')、HB-2-R1(5'-CGATGACAAT-GCTCAGGCAGTC-3')和H5-2-F(5'-GCGTTCAAA-ACAATGCTCTTC-3')、H5-2-R(5'-GGGTAAACGAA-CAAAGTCCTGTAAA-3')两对引物扩增;②若扩增出472 bp和393 bp的目的条带,则此斑马鱼为杂合子(Hb<sup>+/-</sup>);③若扩增不出472 bp和393 bp的目的条带,则此斑马鱼为纯合子(Hb<sup>-/-</sup>)。PCR扩增的反应条件为:95℃下预变性5 min;95℃下变性30 s,62℃(58℃/55℃)下退火30 s,72℃下延伸30 s,共进行35个循环;最后在72℃下再延伸5 min。PCR产物使用1.5%的琼脂糖凝胶电泳成像。

#### 1.2.3 固蓝染色

血红蛋白催化过氧化氢释放出氧后会使得o-Dianisidine呈现出铁锈的颜色,根据这一特性,使用o-Dianisidine检测受精卵中血红蛋白的含量及分布情况。

配制固蓝染液<sup>[7]</sup>:取0.36 mg o-Dianisidine粉末、13 μL 30%过氧化氢、2 μL 3 mol/L醋酸钠(pH4.5)、240 μL无水乙醇,使用ddH<sub>2</sub>O定容到600 μL。

将敲除得到的杂合突变体斑马鱼(Hb<sup>+/-</sup>)以及野生型斑马鱼(WT)雌雄各一对分别进行自交,所产受精卵收集于不同的培养皿中,同时记录产卵时间,随后置于28℃恒温培养箱中培养。分别取24、28、30、33、36、48、52 hpf Hb<sup>+/-</sup>和WT斑马鱼胚胎(n=30),早期胚胎未出膜时,需先将卵膜剥离再进行染色。使用o-Dianisidine染液室温染色15 min,全程避光,随后用PBST漂洗3次,每次漂洗3 min,漂洗完成后将受精卵置于4% PFA中固定超过6 h, PBST再漂洗3次,每次3 min,放置在100%的甘油中,显微镜观察染色情况并拍照。

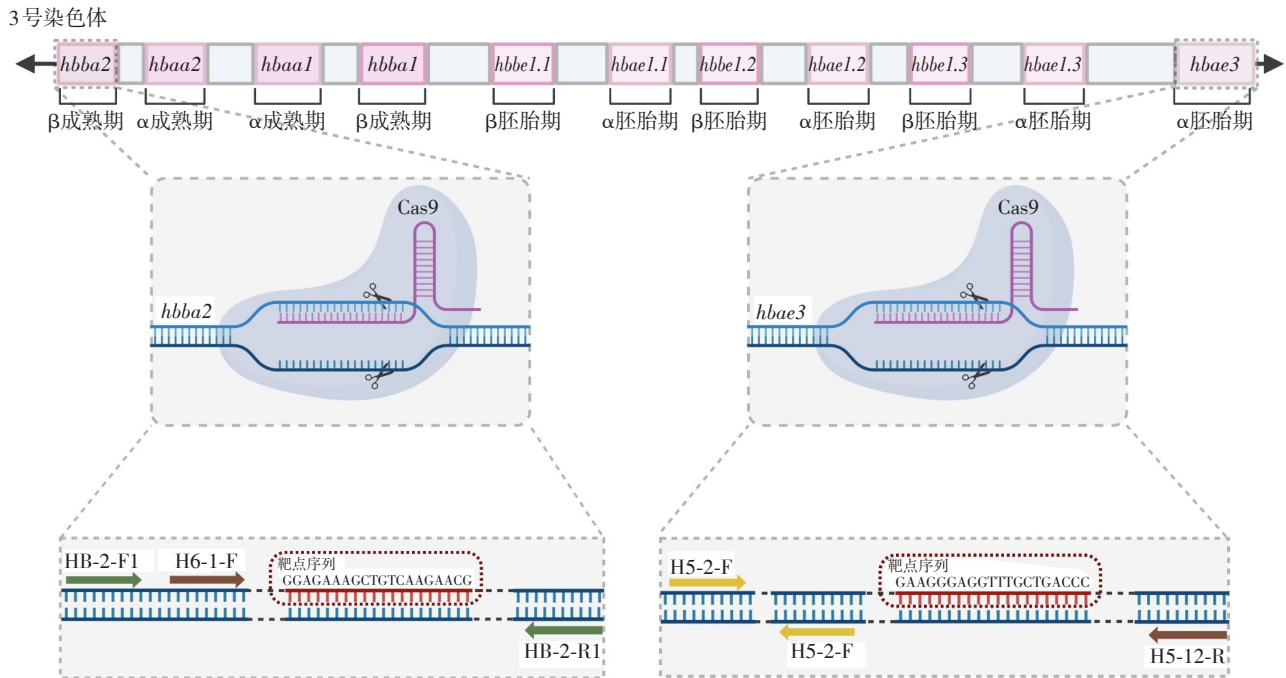


图1 基因敲除及基因型鉴定引物设计示意图

Figure 1 Schematic diagram of gene knockout and primer design for genotype identification

#### 1.2.4 红细胞计数

分别将5月龄Hb<sup>+/+</sup>和WT成年斑马鱼(n=10)放在冰上麻醉后,酒精棉球擦拭尾柄取血,吸取2 μL血液在1 mL PBS溶液中混匀后,取1 μL置于血细胞计数板上在显微镜下计数红细胞。

#### 1.2.5 血管发育观察

分别收集Hb<sup>+/+</sup>与血管标记转基因斑马鱼(*kdr1:EGFP*)杂交及*kdr1:EGFP*转基因斑马鱼自交的受精卵,记录产卵时间,置于28 °C恒温培养箱中培养,在28、30、32、36、48、72、96、120、144、168 hpf这10个时间点用荧光体式显微镜(Stemi 2000, ZEISS)下拍照记录斑马鱼胚胎(n=30)血管发育情况。

#### 1.2.6 总RNA提取、转录组测序及分析

用TRIzol法分别提取Hb<sup>+/+</sup>和WT成年斑马鱼心脏总RNA(n=8×3),使用NanoDrop 2000 Spectrophotometer检测总RNA的浓度和纯度,而后使用质量浓度为1.5%的琼脂糖凝胶电泳检验RNA的提取质量。将提取后的总RNA提交至北京安诺优达公司进行mRNA纯化、文库制备和转录组测序。使用DESeq2进行差异基因分析,设置差异倍数(fold change)>2且校正后P<0.05检测差异表达的基因。使用GOseq对差异表达基因进行GO(gene ontology)富集分析,校正基因长度偏差。校正后P<0.05的GO术语被认为在差异表达基因中显著富

集。我们还使用KOBAS软件进行了京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路中差异表达基因的富集统计。

#### 1.2.7 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)验证基因表达

使用PrimeScript™ RT Master Mix试剂盒反转录心脏总RNA为cDNA。TB Green® Premix Ex Taq™用于qRT-PCR。基因扩增和检测使用CFX Opus 96 Real-Time PCR系统进行。使用2<sup>-ΔΔCT</sup>方法计算相对于对照组mRNA表达的基因表达水平。用于qRT-PCR的引物:*hbba2*, 5'-ATTGCCAGTGTCTGGAG-3'和5'-CCGTGTTCTGAAACTTTGG-3'; *hif3a* (*hif1al*), 5'-GCTGGATGGCTTGTCTGATGG-3'和5'-CCCTCATGAGAGCTGCTGTG-3'; *nos2b*, 5'-AAGCCCCGACTCTACTCCAT-3'和5'-TGGACCTTTTCCCTCCTGTG-3'; *cybb*, 5'-CTTTCGTTATGAAGCGGTGATG-3'和5'-GGTTCTCCTGGACGTGTTTAT-3'; *tnnt2c*, 5'-GACCGAACGTGAGAAGAAGA-3'和5'-AGGACTTCCTGGTGGTTTTTC-3'; *β-actin*, 5'-TACAATGAGCTCCGTGTTGC-3'和5'-ACATACAATGGCAGGGGTGTT-3'。*β-actin*作为mRNA的内参基因。

#### 1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism9对所得实验数据进行统计分析并绘图。所得数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )

表示。通过 *t* 检验比较两组间差异。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CRISPR/Cas9 构建 $Hb^{+/}$ 突变体

将 CRISPR/Cas9 靶点分别设计在 *hbba2* 基因第 2 外显子和 *hbae3* 基因第 2 外显子的反义链上。将 Cas9 蛋白和 gRNA 混合注入一细胞期的斑马鱼胚

胎,取发育至 96 hpf 的 F0 胚胎基因组 PCR 纯化产物进行测序,并采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,突变型在 220 bp 处出现 1 个条带,野生型无条带。F0 斑马鱼性成熟后与野生型斑马鱼杂交产生 F1 代,3 个月后对其剪尾鉴定,将 PCR 纯化产物进行测序,经序列比对及琼脂糖凝胶电泳分析(图 2),表明成功筛选出从 *hbba2* 到 *hbae3* 缺失的杂合突变体。

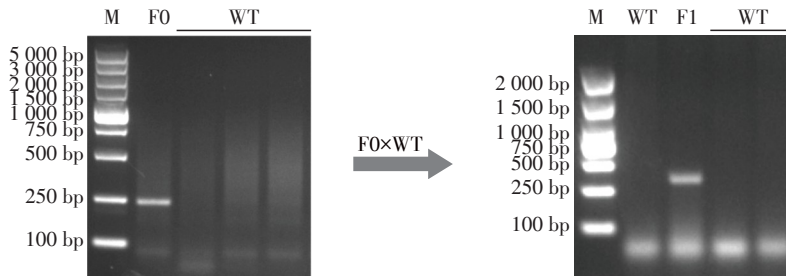


图2 可遗传的F0代及F1代突变体筛选

Figure 2 Screening of heritable F0 and F1 generation mutants

### 2.2 对斑马鱼胚胎血红蛋白水平的影响

选取多个时间点对斑马鱼胚胎进行固蓝染色。24 hpf WT 斑马鱼显示少数 o-Dianisidine 阳性细胞,而  $Hb^{+/}$  未有阳性显示;28、30、33、36 hpf 时与 WT 斑马鱼相比,  $Hb^{+/}$  血红蛋白明显减少(图 3A~D),36 hpf 时 WT 斑马鱼胚胎在心脏位置显示强烈的染色阳性,相反,  $Hb^{+/}$  只有个别胚胎在该位置显示阳性;当斑马鱼胚胎发育至 48 hpf 以后,血红蛋白的表达量趋近一致,从染色结果来看,WT 斑马鱼胚胎的血红蛋白在腹部的分布比  $Hb^{+/}$  更分散,50 hpf 可以明显观察到血红蛋白的异位表达,WT 的血红蛋白主要分布在斑马鱼上腹部横向斑纹的上方,而在  $Hb^{+/}$  中主要分布于其下方(图 3E)。

### 2.3 对成年斑马鱼红细胞发育的影响

对 5 月龄  $Hb^{+/}$  和 WT 成年斑马鱼红细胞计数,结果表明两者之间的红细胞数量没有显著差异 ( $P > 0.05$ ),但是将雌、雄斑马鱼的红细胞数量分开统计对比发现,  $Hb^{+/}$  雌鱼红细胞数量增多、雄鱼红细胞数量减少 ( $P$  均  $< 0.05$ , 图 4)。

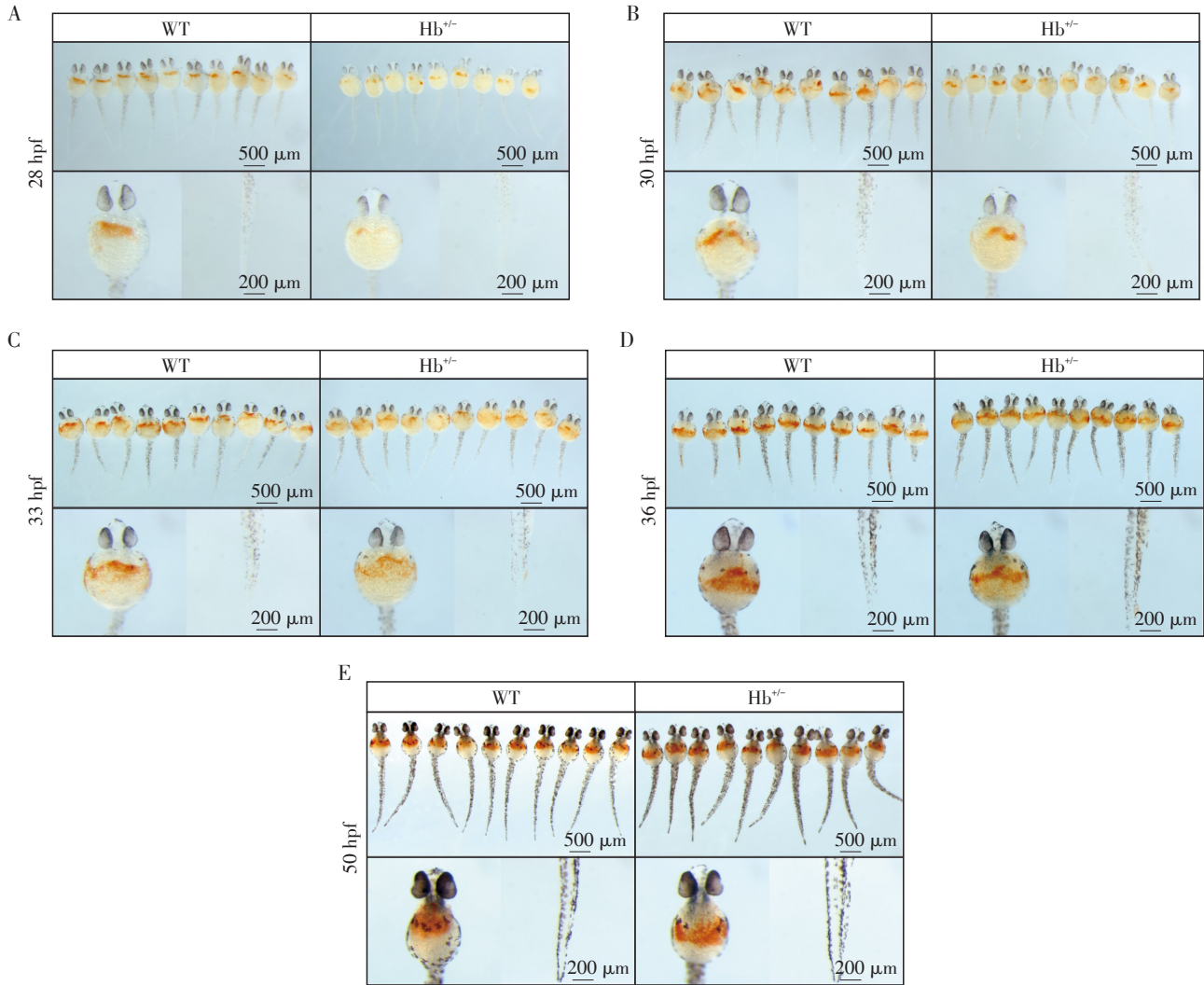
### 2.4 对斑马鱼胚胎血管发育的影响

将血管标记转基因斑马鱼 (*kdrl:EGFP*) 与  $Hb^{+/}$  杂交后收集受精卵,28 °C 恒温培养至 24 hpf,挑选带有绿色荧光的血管标记的胚胎继续培养。结果显示,28、30、32 hpf  $Hb^{+/}$  斑马鱼胚胎腹部与心脏相接的主血管及共同基静脉 (common cardinal vein, CCV) 较

WT 均发育迟缓(图 5A~C),腹部大血管发育迟缓的情况一直持续到 36 hpf(图 5D),但 48 hpf 后,  $Hb^{+/}$  与 WT 斑马鱼的血管发育趋近一致,且未能观察到明显的差异。与 WT 的血管发育相比,48 hpf 时  $Hb^{+/}$  的节间血管 (intersegmental vessel, ISV) 横向分支发育缓慢(图 5E),3 dpf 时  $Hb^{+/}$  的肠下静脉 (subintestinal vein, SIV) 发育更快(图 5F);4~7 dpf  $Hb^{+/}$  的 ISV 发育异常,且观察到尾部出现了血管增生,  $Hb^{+/}$  比 WT 多 1 对 ISV(图 5G);背长轴血管 (dorsal longitudinal anastomotic vessel, DLAV) 在整个发育过程中并未受到影响。另外,  $Hb^{+/}$  和 WT 的腹部和背部的拍照结果并未显示差异。

### 2.5 成鱼心脏转录组分析结果及 qRT-PCR 验证

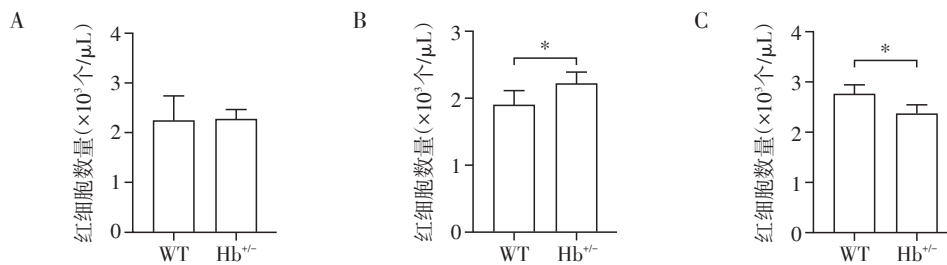
为了阐明血红蛋白基因大片段敲除影响心血管发育的机制,我们使用 RNA 测序对  $Hb^{+/}$  心脏和 WT 心脏进行了转录组分析。在  $Hb^{+/}$  斑马鱼心脏中共鉴定出 1 675 个差异表达基因,包括 794 个上调基因和 881 个下调基因(图 6A)。 *hbba2* 是下调幅度最大的基因之一。用上调和下调的基因生成了热图以说明  $Hb^{+/}$  斑马鱼心脏的转录谱(图 6B)。KEGG 注释的分子通路分析显示,血红蛋白敲除影响氧化磷酸化、心肌收缩、HIF1 信号通路和坏死性凋亡等通路(图 6C)。血红蛋白水平降低,导致心脏供氧不足,缺氧诱导因子 HIF1 信号通路中诱导型一氧化氮合酶 (NOS2/iNOS) 编码基因 *nos2b* 显著上调以及缺



A~E: 28 hpf(A)、30 hpf(B)、33 hpf(C)、36 hpf(D)、50 hpf(E)野生型斑马鱼(WT)与杂合突变体(Hb<sup>+/-</sup>)血红蛋白含量及分布差异(n=10)。

图3 斑马鱼胚胎不同发育时期固蓝染色

Figure 3 o-Dianisidine staining of zebrafish embryos at different developmental stages



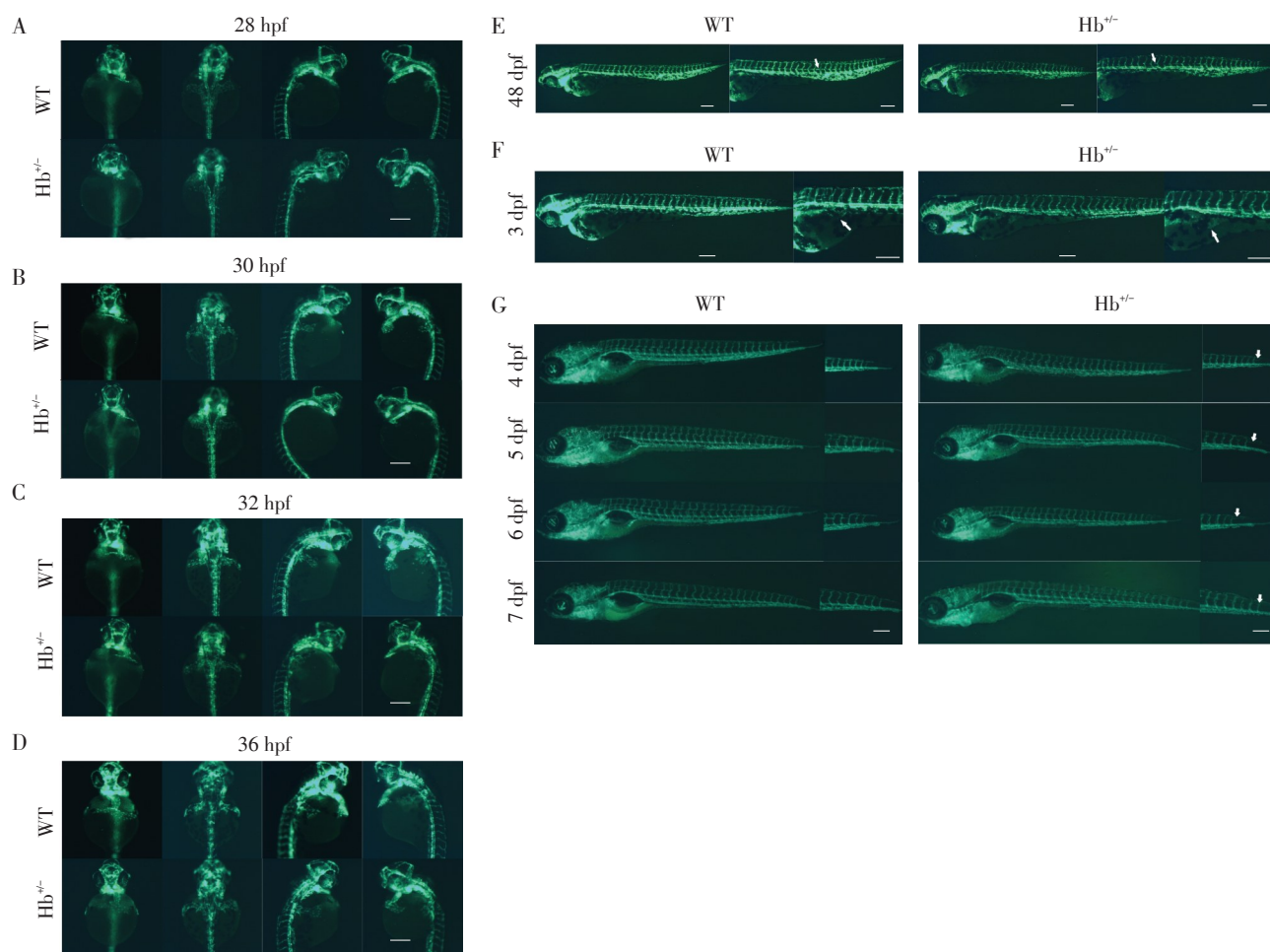
A: WT与Hb<sup>+/-</sup>5月龄红细胞数量无显著差异,  $P > 0.05$  (n=10); B, C: 分别比较WT与Hb<sup>+/-</sup>雌鱼(B)与雄鱼(C)的红细胞数量, Hb<sup>+/-</sup>雌鱼红细胞数量显著增多(n=6)、雄鱼红细胞数量显著减少(n=4), 两组比较,  $P < 0.05$ 。

图4 5月龄斑马鱼红细胞统计分析

Figure 4 Statistical analysis of erythrocytes in 5-month-old zebrafish

氧诱导因子 HIF3 $\alpha$  编码基因 *hif1a* (*hif3a*) 的显著下调。此外, 缺氧还导致 NADPH 氧化酶 2 (NOX2) 编码基因 *cybb* 和肌钙蛋白 T2 (TNNT2) 编码基因 *tnnt2c*

显著上调(图 6D)。qRT-PCR 分析结果也证实了 Hb<sup>+/-</sup> 中 *hbba2* 和 *hif1a* 显著下调, *nos2b*、*cybb* 及 *tnnt2c* 显著上调 ( $P < 0.001$ , 图 6E)。氧化磷酸化通路中其



A~D: 28 hpf(A)、30 hpf(B)、32 hpf(C)、36 hpf(D)野生型斑马鱼(WT)与杂合突变体(Hb<sup>+/-</sup>)的腹部主血管与CCV发育差异;E: 48 dpf野生型斑马鱼(WT)与杂合突变体(Hb<sup>+/-</sup>)ISV的横向分支血管发育差异;F: 3 dpf野生型斑马鱼(WT)与杂合突变体(Hb<sup>+/-</sup>)SIV发育差异;G: 4~7 dpf野生型斑马鱼(WT)与杂合突变体(Hb<sup>+/-</sup>)ISV发育差异;标尺: 200 μm。

图5 斑马鱼胚胎及幼鱼血管发育

Figure 5 Vascular development of zebrafish embryos and larvae

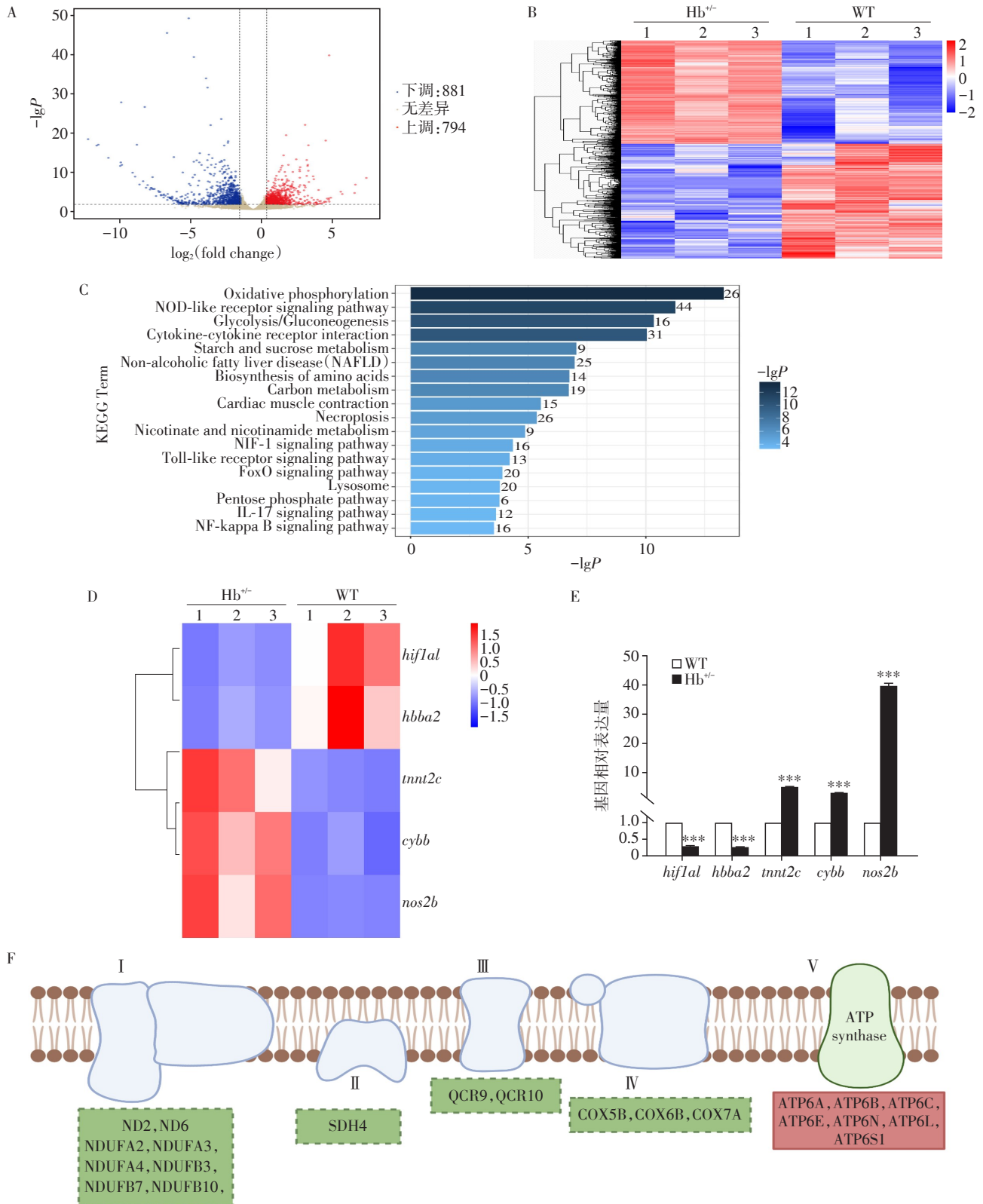
复合物 I~IV (电子传递链的组成成员) 相关基因显著下调, 复合物 V (ATP 合酶) 相关基因显著上调(图 6F), 提供 ATP 的合成质子动力减弱, ATP 合酶表达量增多。

### 3 讨论

血红蛋白在机体中承担着运输氧的功能, 其将氧气输送到组织, 再将二氧化碳输送到肺部进行气体交换, 血红蛋白的浓度与 CVD 有着密切联系。研究表明, 高浓度血红蛋白可引起血管收缩、血压升高<sup>[8]</sup>; 低色素性贫血则是因为球蛋白的合成减少或铁吸收减少<sup>[9]</sup>。红细胞生成刺激剂(erythropoiesis stimulating agents, ESA) 是临床上治疗贫血的常用药物, ESA 治疗会增加高血压和血栓的风险, 并且可能会导致纯红细胞再生障碍性贫血(pure red

cell aplasia, PRCA)<sup>[10]</sup>, 因此血红蛋白基因调控机制对临床上治疗贫血及 CVD 有指导意义。而体内完全不含血红蛋白的南极冰鱼的相关研究, 则为实验室血红蛋白杂合突变体斑马鱼的构建提供了可能性<sup>[11-12]</sup>。

斑马鱼是一种与哺乳动物类似, 适合于研究人类 CVD 的模式生物, 现已成功建立多种 CVD 斑马鱼模型, 如动脉粥样硬化、扩张性心肌病和先天性心脏缺陷等疾病模型<sup>[13-14]</sup>。目前对 CVD 的机制研究多集中于与线粒体能量代谢以及微小 RNA 调控的关系<sup>[15-16]</sup>, 而对血红蛋白基因影响心血管发育的机制鲜有研究。斑马鱼的红细胞与人类一样含有血红蛋白, 且斑马鱼的 α-珠蛋白和 β-珠蛋白位于同一染色体上, 并且按照胚胎期到成熟期的表达顺序排列<sup>[17]</sup>。本研究首次使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术



A: 火山图显示 Hb<sup>+/-</sup> (实验组) 和 WT (对照组) 之间基因上调 (红色)、下调 (蓝色) 和无差异 (灰色); B: 差异表达基因表达模式的聚类热图, 红色表示基因表达上调, 蓝色表示基因表达下调; C: Hb<sup>+/-</sup> 中显著富集的和心血管发育相关的 KEGG 通路; D: *hif1a1*, *hbba2*, *tnnt2c*, *cybb*, *nos2b* 基因在 Hb<sup>+/-</sup> 和 WT 中表达差异热图, 红色表示上调, 蓝色表示下调; E: 差异基因定量 PCR 验证, 与 WT 比较, \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ); F: 氧化磷酸化途径, 红色方框内基因表达上调, 绿色方框内基因表达表示下调。

图6 成年斑马鱼心脏转录组分析及差异基因 qRT-PCR 的验证

Figure 6 Transcriptome analysis and qRT-PCR verification of adult zebrafish hearts

对斑马鱼3号染色体血红蛋白基因 *hbba2* 到 *hbae3* 进行了大片的敲除,利用斑马鱼与人类基因的高度同源性<sup>[18]</sup>对该基因片段的缺失进行功能学研究。

固蓝染色结果表明,  $Hb^{+/+}$  斑马鱼胚胎与 WT 胚胎相比,血红蛋白水平更低,分布较分散,同时还观察到血红蛋白的异位分布,这与已有研究结果相一致<sup>[7,11]</sup>,敲除 *hbae3* 基因或 *hbae1.1* 基因都对血红蛋白的生成有着明显影响。对于血红蛋白分布的差异,推测是由于血管发育的差别导致的,在固蓝染色结果的基础上利用 *kdrl:EGFP* 转基因型斑马鱼与  $Hb^{+/+}$  进行杂交后观察血管的发育,结果证实,  $Hb^{+/+}$  的血管发育延迟明显,且能观察到  $Hb^{+/+}$  血管管径有增大的趋势以及节间血管的增生。血管和血细胞拥有类似的发育机制,且只有同步发育才能满足机体的需要<sup>[19]</sup>,这个结论与本研究结果相符,当血红蛋白的数量显著减少时会明显影响到同期血管的发育。ISV 的增生则可能是为了补偿红细胞和血管发育异常产生的不利影响,保证机体的正常发育和运行,血管发育发生了代偿。红细胞内的  $\alpha$ -珠蛋白和  $\beta$ -珠蛋白合成的平衡对血红蛋白的功能至关重要<sup>[20]</sup>,两者对血红蛋白疾病的分子遗传学机制有极其重要的意义,红细胞计数结果显示,WT 和  $Hb^{+/+}$  成鱼的红细胞数量没有显著差异,但是统计结果显示明显的雌、雄红细胞数量两极分化,于是将雌鱼与雄鱼分开比较,发现  $Hb^{+/+}$  雌鱼的红细胞显著增多,而雄鱼的红细胞显著减少,导致该现象的原因及机制仍不清楚。

为了探究血红蛋白基因影响心血管发育的机制,本研究取成年斑马鱼的心脏进行了转录组测序,并对测序结果进行了 KEGG 富集分析,发现了 50 个显著富集的信号通路。基于 *hbba2* 到 *hbae3* 血红蛋白基因敲除后导致血红蛋白含量降低、红细胞数量不变及血管发育异常的现象,我们整理了  $Hb^{+/+}$  中 18 个可能与心血管发育有关的信号通路,并对与能量代谢密切相关的氧化磷酸化途径、缺氧诱导因子 HIF1 信号通路、心肌收缩及坏死性凋亡通路和关键基因展开分析。血红蛋白水平降低会导致机体缺氧,而缺氧会引起心脏氧化应激和炎症及心肌细胞死亡<sup>[21]</sup>。HIF1 信号通路是缺氧诱导的主要通路,除了 HIF1 $\alpha$  和 HIF2 $\alpha$  之外, HIF3 $\alpha$  也是 HIF $\alpha$  家族的确定成员, *hif3a* (*hif1al*) 的缺失会减弱斑马鱼的缺氧耐受性并破坏红细胞的生成,研究发现 *hif3a* 敲除后的斑马鱼耗氧率降低<sup>[22]</sup>。并且 HIF $\alpha$  可以增加一氧化氮合酶的表达<sup>[22]</sup>,过表达 *nos2a* 可减轻 *cbs* 和 *cth* 突

变体中的脑血管发育缺陷<sup>[23]</sup>, *nos2b* mRNA 的过度表达可恢复 *tnnt2a* 或 *klf2a* 突变体中的血管缺陷<sup>[24]</sup>,提示 HIF3 $\alpha$  表达量下调可以减少机体的耗氧量,并且通过 HIF1 信号通路诱导 NOS2 显著上调,促进血管发育,以提高机体的缺氧耐受性。ALAS1 是血红素合成的限速酶<sup>[25]</sup>,推测可能是通过 *alas1* 的上调补偿了 *hbba2* 及 *hif1al* 下调对红细胞生成造成的影响。NOX 家族的线粒体呼吸链和 NADPH 氧化酶是心肌细胞中 ROS 的主要来源,NOX 亚型 NOX1、NOX2、NOX4 和 NOX5 在心血管系统中表达,其中,NOX1、NOX2 和 NOX4 在心肌细胞中表达,产生的 ROS 进一步导致心肌细胞的氧化损伤<sup>[26]</sup>,而肌钙蛋白是心肌损伤的标志物, TNNT2 的升高提示心肌损伤或坏死<sup>[27-28]</sup>,这与本研究分析的结果一致。在缺氧条件下为了维持 ATP 的产生以保护组织功能,线粒体可通过 *g0s2* 的表达等效质子动力,表达 *g0s2* 的心肌细胞群体在常氧和缺氧条件下 ATP 的合成增加<sup>[29]</sup>,复合物 I ~IV 的显著下调而复合物 V 的显著上调,可能是线粒体的代偿保护机制,具体途径需要进一步研究。

另外,本研究中虽然敲除了 *hbba2* 到 *hbae3* 的血红蛋白基因,但是尚未获得纯合突变体,根据  $Hb^{+/+}$  胚胎基因型的鉴定情况,WT、 $Hb^{+/+}$ 、 $Hb^{+/+}$  比例严重失衡,推测是卵子产生携带敲除片段与不携带敲除片段配子的比例失衡,导致产生的后代中极少有纯合子,而产生的个别纯合子也因发育不全而在早期死亡,具体机制有待后续进一步研究和探索。

本研究对斑马鱼3号染色体血红蛋白基因进行了全序列敲除,其中既含有胚胎时期表达的血红蛋白基因(*hbbe1*、*hbae1* 和 *hbae3*)又包含了成年时期的血红蛋白基因(*hbba2*、*hbaa2*、*hbaa1*、*hbba1*),同时包含  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的成员,分别对胚胎和成年斑马鱼进行观察和分析,发现血红蛋白水平降低会影响斑马鱼心血管的发育,但是斑马鱼机体的补偿机制使其能维持正常生理活动,了解其中的分子机制可以为临床治疗 CVD 提供新方向。

#### [参考文献]

- [1] MA L Y, CHEN W W, GAO R L, et al. China cardiovascular diseases report 2018: an updated summary [J]. J Geriatr Cardiol, 2020, 17(1): 1-8
- [2] KRAVITZ R L. Ethnic differences in use of cardiovascular procedures: new insights and new challenges [J]. Ann Intern Med, 1999, 130(3): 231-233
- [3] CHIEN K R, FRISÉN J, FRITSCHÉ-DANIELSON R, et



- al. Regenerating the field of cardiovascular cell therapy [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(3): 232-237
- [4] ABEBE T B, ALEMAYEHU GEBREYOHANNES E, BHAGAVATHULA A S, et al. Anemia in severe heart failure patients: does it predict prognosis? [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2017, 17(1): 248
- [5] CHAPARRO C M, SUCHDEV P S. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2019, 1450(1): 15-31
- [6] RYMER J A, RAO S V. Anemia and coronary artery disease: pathophysiology, prognosis, and treatment [J]. *Coron Artery Dis*, 2018, 29(2): 161-167
- [7] 孟琳, 陈良标. CRISPR/Cas9技术敲除hbae1.1基因对斑马鱼血红蛋白生成的影响 [J]. *生物学杂志*, 2021, 38(5): 12-16
- [8] 李嘉颖, 韩清华. 血红蛋白量与心血管疾病的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(24): 3633-3635
- [9] GORE A V, PILLAY L M, VENERO GALANTERNIK M, et al. The zebrafish: a fantastic model for hematopoietic development and disease [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2018, 7(3): e312
- [10] KIDANEWOLD A, WOLDU B, ENAWGAW B. Role of erythropoiesis stimulating agents in the treatment of anemia: a literature review [J]. *Clin Lab*, 2021, 67(4): 10.7754
- [11] 蔡畅, 王丛丛, 吴智超, 等. Cas9-CRISPR敲除hae3基因对斑马鱼血红蛋白生成的影响 [J]. *大连海洋大学学报*, 2015, 30(6): 573-579
- [12] 许强华, 陈良标. 南极鱼类适应低温的分子进化研究进展 [J]. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(2): 177-186
- [13] 余翠, 武琳, 陈忠, 等. 双酚S对高脂饮食斑马鱼脂代谢的影响及机制 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(7): 981-985
- [14] BOWLEY G, KUGLER E, WILKINSON R, et al. Zebrafish as a tractable model of human cardiovascular disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(5): 900-917
- [15] 黄梦圆, 李德利, 张加良, 等. 过表达miR-155对斑马鱼胚胎发育的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(8): 1028-1033
- [16] CHISTIakov D A, SHKURAT T P, MELNICHENKO A A, et al. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review [J]. *Ann Med*, 2018, 50(2): 121-127
- [17] WILBER A, NIENHUIS A W, PERSONS D A. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities [J]. *Blood*, 2011, 117(15): 3945-3953
- [18] CHOI T Y, CHOI T I, LEE Y R, et al. Zebrafish as an animal model for biomedical research [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53(3): 310-317
- [19] 贾静, 章康威, 王敏娟, 等. 斑马鱼模型在心血管疾病中的应用研究 [J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2023, 37(1): 70-73
- [20] 明邦发, 王欢, 陈柳蓉, 等. 斑马鱼血液疾病模型 [J]. *发育医学电子杂志*, 2022, 10(1): 7-11
- [21] PARENTE V, BALASSO S, POMPILIO G, et al. Hypoxia/reoxygenation cardiac injury and regeneration in zebrafish adult heart [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53748
- [22] CAI X, ZHOU Z, ZHU J, et al. Zebrafish Hif3 $\alpha$  modulates erythropoiesis via regulation of gata1 to facilitate hypoxia tolerance [J]. *Development*, 2020, 147(22): dev185116
- [23] ZHANG Z, YAO L, YANG J, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4): 3547-3554
- [24] XIE X, ZHOU T, WANG Y, et al. Blood flow regulates zebrafish caudal vein plexus angiogenesis by ERK5-klf2a-nos2b signaling [J]. *Curr Mol Med*, 2018, 18(1): 3-14
- [25] 牛志杰. *alas1*基因的缺失通过影响钙离子信号通路导致斑马鱼心脏功能障碍 [D]. 苏州大学, 2016
- [26] CADENAS S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76-89
- [27] FERRANTE M I, KIFF R M, GOULDING D A, et al. Troponin T is essential for sarcomere assembly in zebrafish skeletal muscle [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(4): 565-577
- [28] 张一帅. 核肌球蛋白在Nox2介导的心肌缺血性损伤中的作用及机制 [D]. 中南大学, 2013
- [29] KIOKA H, KATO H, FUJITA T, et al. *In vivo* real-time ATP imaging in zebrafish hearts reveals g0s2 induces ischemic tolerance [J]. *FASEB J*, 2020, 34(2): 2041-2054

[收稿日期] 2023-02-20

(责任编辑: 蒋莉)