

• 动物及兽医生物技术 •

## 鸡 *zpl* 基因对成骨细胞矿化的影响

岳巧娴<sup>#</sup>, 黄晨轩<sup>#</sup>, 张寅梁, 陈辉, 周荣艳<sup>\*</sup>

河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001

岳巧娴, 黄晨轩, 张寅梁, 陈辉, 周荣艳. 鸡 *zpl* 基因对成骨细胞矿化的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2684-2694.

YUE Qiaoxian, HUANG Chenxuan, ZHANG Yinliang, CHEN Hui, ZHOU Rongyan. Effect of the chicken *zpl* gene on osteoblast mineralization[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2684-2694.

**摘 要:** 本研究旨在克隆编码鸡透明带 1 (zona pellucida 1, Zp1) 蛋白的 *zpl* 基因, 并研究其组织表达谱及在成骨细胞矿化中的作用。利用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测蛋鸡不同组织和性成熟启动前后胫骨中的 *zpl* 表达水平; 将 Zp1 过表达载体转染至诱导分化 8 d 的鸡颅骨成骨细胞内, 检测细胞外矿化基质和矿化相关基因表达。结果表明, 鸡 *zpl* 基因全长 3 045 bp, 编码 958 个氨基酸残基, 具有 2 个 N-糖基化位点。*zpl* 基因在产蛋期鸡肝脏中高水平表达, 其次为胫骨和卵黄膜, 在蛋壳腺和心脏中不表达。鸡性成熟启动后血浆雌激素(estrogen, E2)、胫骨糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)含量和 *zpl* 表达量均极显著高于性成熟启动前。在过表达 Zp1 的鸡成骨细胞中添加雌激素后, 细胞外矿化基质和矿化相关基因表达水平均显著升高。因此, *zpl* 基因表达具有组织特异性, 在雌激素作用下正向调控鸡成骨细胞矿化, 为阐明 Zp1 在鸡产蛋期骨骼中的功能特性奠定了理论基础。

**关键词:** *zpl*; 鸡; 成骨细胞; 雌激素; 细胞矿化

## Effect of the chicken *zpl* gene on osteoblast mineralization

YUE Qiaoxian<sup>#</sup>, HUANG Chenxuan<sup>#</sup>, ZHANG Yinliang, CHEN Hui, ZHOU Rongyan<sup>\*</sup>

College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei, China

**Abstract:** The aim of this study was to clone the chicken *zpl* gene encoding zona pellucida 1

资助项目: 河北省研究生创新资助项目(CXZZBS2022051, 2022–2023); 国家自然科学基金(32272922); 河北省重点研发计划项目现代种业科技创新专项(22326319D); 河北省鸡现代种业科技创新团队(21326303D)

This work was supported by the Hebei Province Graduate Innovation Funding Project (CXZZBS2022051, 2022–2023), the National Natural Science Foundation of China (32272922), the Hebei Provincial Key Research and Development Program Modern Seed Industry Science and Technology Innovation Special Project (22326319D), and the Hebei Provincial Chicken Modern Breeding Science and Technology Innovation Team (21326303D).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: rongyanzhou@126.com

Received: 2022-10-07; Accepted: 2023-03-02

(Zp1) and investigate its tissues expression profile and its effect on osteoblast mineralization. The expression level of *zpl* was quantified in various tissues of laying hens and in the tibia of the pre- and post-sexual maturity by RT-qPCR. Zp1 overexpressed vector was transfected into chicken calvarial osteoblasts which were induced differentiation for 8 days, and the extracellular mineral and the expression of mineralization-related genes were detected. The full-length chicken *zpl* gene is 3 045 bp, encoding 958 amino acids residuals, and has two *N*-glycosylation sites. The highest expression level of the *zpl* gene was found in the liver, followed by the tibia and yolk membrane, while no expression was detected in the heart and eggshell gland. Compared with the pre-sexual maturity hens, the concentration of estrogen (E2) in plasma, the content of glycosaminoglycan (GAG) and the expression level of the *zpl* gene in the tibia with post-sexual maturity were higher. The extracellular matrix and the level of osteoblast mineralization-related genes showed a significantly upregulated expression in chicken calvarial osteoblasts with Zp1 overexpressed and addition of estrogen. The expression of the *zpl* gene is tissue-specific and positively regulated osteoblast mineralization under the action of estrogen, laying the foundation for elucidating the functional properties of Zp1 in chicken bones during the egg production period.

**Keywords:** *zpl*; laying hens; osteoblast; estrogen; cell mineralization

家禽育种中对高产蛋率的严格选择,加之家禽业生产体系的强化,使蛋鸡在产蛋过程中容易出现龙骨弯曲、骨质流失等问题。骨稳态是成骨细胞的骨形成和破骨细胞的骨吸收之间的平衡状态,骨质量的好坏依赖于骨稳态的平衡与否。骨质疏松症和龙骨损伤是商业蛋鸡中众所周知的福利问题 and 经济问题,通常导致蛋鸡生产性能降低、蛋品质和骨矿物质密度下降等问题,严重的甚至导致蛋鸡死亡<sup>[1-4]</sup>。随着产蛋周龄增加,产蛋期矿化结构骨量减少引起蛋鸡健康状况和蛋品质下降<sup>[5]</sup>,目前骨骼健康是影响超长产蛋期蛋鸡生产性能的主要因素之一。

骨骼细胞外基质中的非胶原蛋白通过与多种基质成分相互作用并作为交联剂参与细胞外基质的结构组织并参与生物矿化过程<sup>[6]</sup>。如蛋白聚糖(proteoglycans, PGs)是由一个或多个糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)通过丝氨酸或苏氨酸残基以共价连接到核心蛋白上的大分子糖蛋白。骨涎蛋白(integrin bone sialoprotein,

IBSP)被鉴定为鸡髓质骨主要成分之一的硫酸角质素蛋白聚糖(keratan sulfate proteoglycan, KSPG)的核心蛋白<sup>[7]</sup>,促进羟基磷灰石的沉积<sup>[8]</sup>。蛋白聚糖还可调节长骨生长<sup>[9]</sup>,促进成骨分化和矿化<sup>[10-11]</sup>以及间充质干细胞增殖和成骨<sup>[12]</sup>。GAG含量与相关合成酶表达水平和骨内蛋白聚糖含量以及成骨功能等相关<sup>[13]</sup>。

透明带(zona pellucid, Zp)蛋白是一类糖蛋白,含有一个高度保守的氨基酸序列,称为 Zp 结构域,由大约 260 个氨基酸残基组成,其中有 8 或 10 个保守的 Cys 残基<sup>[14]</sup>,该结构域含有 2 个独特的免疫球蛋白样折叠,称为 Zp-N 和 Zp-C 结构域<sup>[15-16]</sup>,也称为 Zp 结构域蛋白。Zp 蛋白最初鉴定为卵黄膜的基质组成成分<sup>[17]</sup>,后陆续在许多体细胞中被发现<sup>[18-20]</sup>,主要通过锚定在膜上或释放到细胞外基质中发挥作用<sup>[21]</sup>。Zp1 是 Zp 家族蛋白之一,与 Zp2 和 Zp3 形成的二聚体交联形成网状结构<sup>[22]</sup>,Zp1 蛋白 *N*-寡糖基位点的突变不影响其分泌,但影响其交联功能<sup>[23]</sup>; Zp

结构域的突变则导致 Zp1 蛋白的组装和功能受损<sup>[24]</sup>。给予幼龄雄性鹌鹑雌激素类化合物处理后,在其肝脏检测到 *zpl* 的表达,性成熟后雌性鹌鹑和鸡的肝脏中 *zpl* 的高表达均表明其表达受雌激素调控,且为性别特异基因<sup>[25-26]</sup>。

蛋鸡随性成熟开始,体内雌激素水平迅速升高并开始形成髓质骨(成骨细胞分化和矿化)且髓质骨随产蛋周期的进行发生周期性吸收与重建,并为蛋壳形成提供可利用的钙源。性成熟期积累的髓质骨数量与产蛋后期骨质量密切相关<sup>[27]</sup>,因此研究性成熟期髓质骨形成的调控为改善产蛋后期骨骼质量下降提供基础。本研究在性成熟启动后的蛋鸡胫骨中检测到 *zpl* 基因的高水平表达,结合生物信息学结果推测,Zp1 糖蛋白可能通过其糖链与 GAG 结合调控成骨细胞外基质的矿化。因此,克隆鸡胫骨的 *zpl* 基因全长 cDNA 序列,研究其在不同时期和组织中的表达模式及其在成骨细胞矿化中的作用,对阐明 Zp1 糖蛋白的功能特性及其在细胞外基质矿化中的作用具有重要意义,对改善蛋鸡骨骼质量和提高生产性能提供重要理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物和样品采集

选取 5 只体型基本一致、健康的 72 周龄大午金凤蛋鸡,采集心脏、肝脏、蛋壳腺、卵黄膜、胫骨组织样品,用于总 RNA 提取;选取健康的 15 周龄和 19 周龄蛋鸡各 8 只,采集胫骨用于总 RNA 提取和 GAG 测定,采集的肝素钠抗凝血液以 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血浆用于雌激素(estrogen, E2)含量测定。本研究所用实验动物经河北农业大学实验动物伦理委员会(2019/03)审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则。

### 1.2 主要试剂

Trizol up 购自 Invitrogen; 2×ES Master Taq Mix 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 50 bp DNA Ladder (Dye Plus)购自大连宝生物工程有限公司; PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; Forget-Me-Not EvaGreen qPCR Master Mix 试剂盒购自 Biotium 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega Bio-Tek; 鸡雌激素 ELISA 试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司; DMEM 高糖、FBS、双抗购自赛默飞世尔科技有限公司; 雌激素购自 Sigma。

### 1.3 鸡 *zpl* 基因克隆

利用已发表引物<sup>[28]</sup>克隆 *zpl* 基因,利用 Primer3.0 (<https://primer3.ut.ee/>)在线引物设计软件设计内参基因和目的基因 PCR 引物(表 1)。引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成。以胫骨组织 cDNA 为模板,PCR 反应总体系为 20 μL: 2×Es Master Mix 10 μL, cDNA 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL。PCR 反应程序: 96 °C 5 min; 96 °C 15 s, 68 °C 15 s, 72 °C 1 min, 共 20 个循环,每个循环降 0.5 °C; 96 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 1 min, 共 20 个循环; 72 °C 完全延伸 7 min; 4 °C 保存。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>zpl</i> -F	GGGACAACCTACAGGACGCAG	150
<i>zpl</i> -R	ACAGGATGTACACCTCTCCCT	
<i>ibsp</i> -F	GGGCGATGAGGACAGTGAT	124
<i>ibsp</i> -R	ATGGGGTGTGTGTGCTGTG	
<i>bglap</i> -F	CGCAGTGCTAAAGCCTTCATCT	136
<i>bglap</i> -R	GCTCACACACCTCTCGTTGG	
<i>on</i> -F	CGGGCCTTGCAAATTCATCC	116
<i>on</i> -R	TGTCCTCATCGCGCTCATAC	
<i>lbr</i> -F	GGTGTGGGTTCATTGTCTACA	80
<i>lbr</i> -R	CTGCAACCGGCCAAGAAA	

#### 1.4 鸡 *Zp1* 过表达载体构建

利用重组臂技术克隆鸡 *zp1* 基因编码序列(coding sequence, CDS)区片段, 利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切 pcDNA3.1(+)/myc-hisA 质粒, 胶回收纯化后利用 T4 DNA 连接酶于 25 °C 连接 2 h, 连接产物转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 利用 *Sal* I 酶切和测序筛选阳性克隆。

#### 1.5 鸡成骨细胞分离培养

取 15 胚龄的颅骨组织, 剪碎后利用组织块法分离成骨细胞, 差速贴壁法纯化并进行原代培养。用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 当纯化细胞长至 80% 融合度时进行传代培养。

#### 1.6 细胞转染

将 F3 代鸡成骨细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 待融合度达 80% 时将普通培养基更换为成骨诱导培养基(完全培养基中添加 50  $\mu$ g/mL 抗坏血酸、10 mol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠和 100 nmol/L 地塞米松), 诱导分化 8 d 进行细胞转染(2  $\mu$ g DNA, 4  $\mu$ L P3000, 4  $\mu$ L Lipofectamine 3000)。鸡 *Zp1* 过表达设置 pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1 组、pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1+E2 组和 pcDNA3.1(+)/myc-hisA 阴性对照组并设置空白对照组(CON)和 E2 对照组(E2) (200 pg/mL), 48 h 后收集细胞提取总 RNA。

#### 1.7 甲苯胺蓝染色

用于染色的 F3 代细胞接种于 12 孔板, 处理方式同“1.6”。12 孔板弃培养基, 加 4% 多聚甲醛固定 10 min 后加 0.5% Triton X-100 通透 3 min, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 3 次, 每孔加 1 mL 0.5% 甲苯胺蓝染液在 37 °C 条件下染色 30 min, 荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.8 总 RNA 提取及 cDNA 合成

利用 Trizol up 试剂, 提取蛋鸡各组织及细

胞总 RNA, 利用 NanoDrop2000 测定 RNA 浓度, 参照反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 于 -20 °C 保存备用。

#### 1.9 胫骨 GAG 和血液雌激素的含量测定

胫骨在液氮中研磨成粉, 转移至裂解缓冲液 I (4 mol/L 盐酸胍, 0.05 mol/L Tris 和 0.1 mol/L 6-氨基己酸, pH 7.4) 中, 于 4 °C 在振荡器上处理 72 h, 在剩余沉淀中加入裂解缓冲液 II (4 mol/L 盐酸胍、0.5 mol/L 乙二醇四乙酸四钠盐、0.05 mol/L Tris 和 0.1 mol/L 6-氨基己酸, pH 7.4), 于 4 °C 振荡处理 72 h。裂解上清液加二甲基亚甲基蓝显色液后室温放置 15 min, 测定波长为 525 nm 的吸光值。以 100  $\mu$ g/mL 硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)为标准品, 制作标准曲线, 计算样品中 GAG 含量。根据鸡雌激素酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒说明书测定血浆雌激素浓度。

#### 1.10 RT-qPCR 检测基因相对表达量

组织表达谱分析以胫骨、心脏、肝脏、卵黄膜、蛋壳腺的 cDNA 为模板, 成骨矿化标志基因骨涎蛋白(integrin bone sialoprotein, *ibsp*)、骨钙素(osteocalcin, *ocn* or *bglap*)、骨黏蛋白(osteonectin, *on*, *bm-40* or *sparc*)表达以成骨细胞 cDNA 为模板。实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)的反应条件及程序按照说明书, 反应体系 20  $\mu$ L: 2 $\times$ Eva Green Mix 10  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ROX (100 $\times$ ) 3  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 4.2  $\mu$ L。用 ABI Q6 实时荧光定量 PCR 系统进行定量分析, 两步法程序为: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。每个组设置 3 个重复, 利用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  方法计算基因相对表达量。

#### 1.11 鸡 *Zp1* 生物学特性分析

利用 NCBI 的 BLAST 程序(<https://blast.ncbi.>

nlm.nih.gov/)进行同源比对; BioEdit 软件进行氨基酸序列的多重比对; MEGA 软件绘制 Zp1 氨基酸序列系统进化树; 利用在线软件 NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)预测 Zp1 O-糖基化位点, NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测 N-糖基化位点。

### 1.12 统计分析

利用独立样本 *t* 检验分析 15 周龄和 19 周龄及 CON 和 E2 两组基因表达差异, 3 组间基因表达差异采用单因素方差分析和 Duncan's 多重比较。以  $P < 0.05$  为差异显著, 用 \* 表示;  $P < 0.01$  为差异极显著, 用 \*\* 表示; 以  $P > 0.05$  为差异不显著, 用 ns 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸡 *zp1* 基因克隆和鉴定

以胫骨 cDNA 为模板, 扩增得到的鸡 *zp1* 基

因片段均符合预期目的片段大小(图 1A), 拼接基因长度为 3 045 bp, 其中 5'非编码区为 5 bp, 3'非编码区为 166 bp, 开放阅读框为 2 874 bp, 共编码 958 个氨基酸。利用 *Sal* I 内切酶对重组 pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1 质粒进行酶切, 酶切产物电泳结果表明, 酶切片段符合目的片段长度(图 1B), 经测序验证与预期相符。

### 2.2 Zp1 蛋白二级结构糖基化和进化分析

利用 NetNGlyc 1.0 在线工具预测到 Zp1 蛋白潜在的 N-糖基化位点有 2 个; 用 NetOGlyc 4.0 软件预测到 63 个潜在的 O-糖基化位点。

使用 BioEdit 软件对鸡(*Gallus gallus*) Zp1 的氨基酸序列与火鸡(*Meleagris gallopavo*)、环颈雉(*Phasianus colchicus*)、普通鹌鹑(*Coturnix coturnix*)、日本鹌(*Coturnix japonica*)、绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)、盔珠鸡(*Numida meleagris*)、云斑林鹑(*Odontophorus gujanensis*)、黑天鹅(*Cygnus atratus*)、棕硬尾鸭(*Oxyura jamaicensis*)、

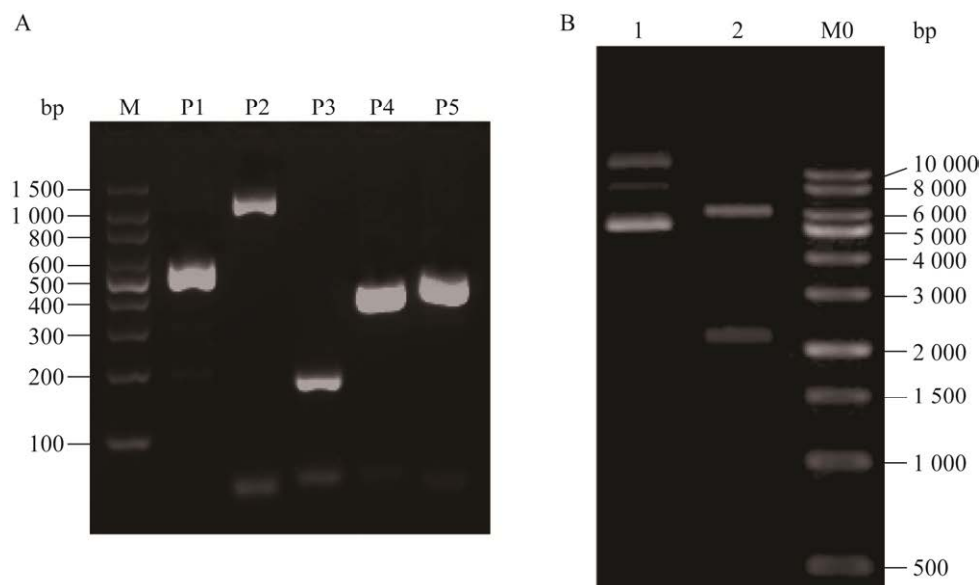


图 1 *zp1* 基因克隆与鉴定

Figure 1 Cloning and identification of *zp1* gene in hens. A: Electrophoresis of PCR amplification products of *zp1* gene fragments. M: 100 bp DNA Marker; P1–P5: The amplification result of *zp1* gene fragments. B: pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1 by single endonuclease digestion. M0: 1 kb DNA ladder; Lane 1: Undigested pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1 plasmid; Lane 2: Single endonuclease digestion products of pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1.

凤头潜鸭(*Aythya fuligula*)、白翅栖鸭(*Asarcornis scutulata*)、人(*Homo sapiens*)、马(*Equus caballus*)、小鼠(*Mus musculus*)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)进行比对,结果显示鸡与火鸡的序列相似性最高,为 88.2%,与其他禽类的相似性在 72%–88% 之间,与哺乳动物的相似性最低(24%–27%) (图 2)。在上述禽类的 *Zp1* 蛋白中的 *Zp* 结构域氨基酸序列相似性很高,说明 *Zp1* 蛋白在禽类中的保守性很强。

2.3 鸡 *zp1* 基因的组织表达分析

以蛋鸡各组织 cDNA 为模板,以 *zp1* 和 *lbr* 为引物进行扩增,PCR 结果显示,肝脏、胫骨和卵黄膜组织在 150 bp 和 80 bp 处均有条带,而心脏和蛋壳腺组织仅有 80 bp 左右的内参条带,目的基因 *zp1* 未见表达(图 3A),本研究首次检测到 *zp1* 基因在胫骨组织表达。利用 RT-qPCR 检测产蛋鸡不同组织中 *zp1* 基因的表达量,结果表明, *zp1* 基因在肝脏和骨骼中表达水平较高,在卵黄膜中有较低表达,而在心脏和蛋壳腺中处于表达量很低甚至不表达的水平

(*C<sub>t</sub>* 值分别为 33.4 和 34.3) (图 3B)。其结果与普通 PCR 扩增结果一致。

2.4 不同时期蛋鸡血浆雌激素和胫骨 GAG 含量及 *zp1* 表达量

对 15 和 19 周龄蛋鸡测定指标进行比较,发现 19 周龄蛋鸡血浆 E2 浓度(图 4A)、胫骨 GAG 含量(图 4B)和胫骨 *zp1* 基因相对表达量均极显著高于 15 周龄(*P*<0.01) (图 4C)。

2.5 *Zp1* 过表达效率检测

在添加/不添加 200 pg/mL E2 条件下,在颅骨成骨细胞转染 pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1,转染 48 h 后收集细胞,利用 RT-qPCR 检测 *zp1* 过表达效率。结果显示, pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1 组与 pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1+E2 组 *zp1* 基因表达水平比 pcDNA3.1(+)/myc-hisA 组分别上升 38.59 和 44.65 倍(*P*<0.01), pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1 组与 pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1+E2 组相比, *zp1* 基因表达水平没有差异(*P*>0.05); CON 和 E2 组 *zp1* 基因均不表达(*C<sub>t</sub>* 值均为 34.0) (图 5A)。

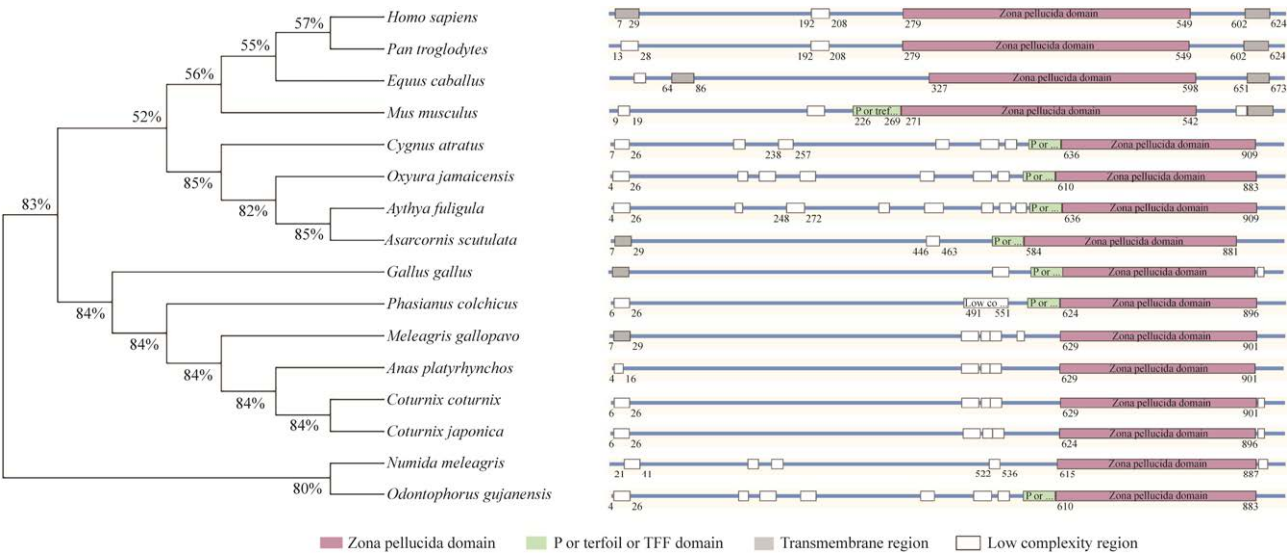


图 2 不同物种 *Zp1* 氨基酸序列构建的系统进化树及保守基序  
Figure 2 Phylogenetic tree and conserved motifs based on the amino acid sequences of *Zp1* from different species.

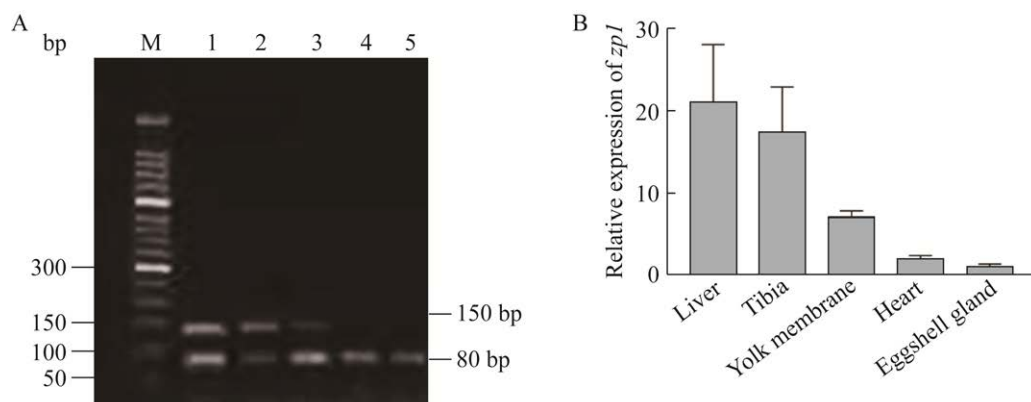


图3 *zp1* 基因在蛋鸡不同组织中的表达水平

Figure 3 The expression level of the *zp1* gene in different tissues of laying hens. A: PCR amplification of the *zp1* gene in different tissues of laying hens. B: Relative expression levels of the *zp1* gene in different tissues of laying hens. M: 50 bp DNA ladder; Lane 1: Liver; Lane 2: Tibia; Lane 3: Eggshell; Lane 4: Heart; Lane 5: Eggshell gland.

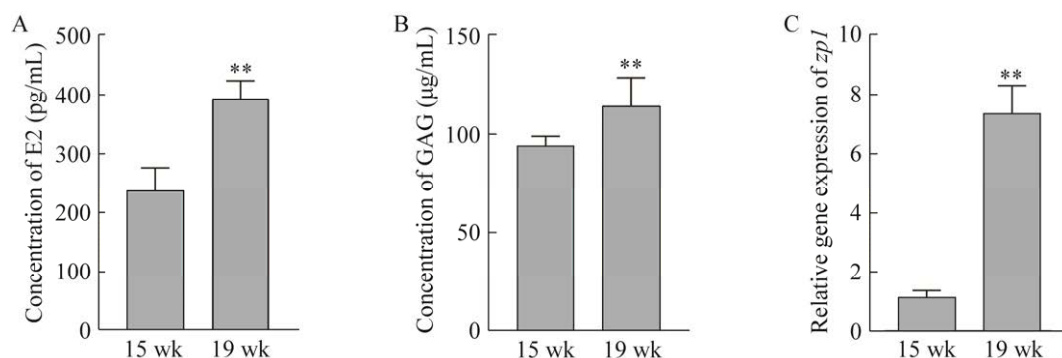


图4 不同时期血浆 E2 浓度、胫骨 GAG 含量及 *zp1* 表达量

Figure 4 The concentration of E2 in plasma, the GAG content and *zp1* gene expression in the tibia at different ages. A: The concentration of E2 in plasma. B: The content of GAG in the tibia. C: The *zp1* gene expression level in the tibia. 15 wk: 15 weeks of age; 19 wk: 19 weeks of age. \*\*:  $P < 0.01$ .

## 2.6 过表达 Zp1 促进鸡颅骨成骨细胞矿化

利用甲苯胺蓝染色观察过表达 Zp1 后细胞外矿化基质形成情况(图 5B), 发现过表达 Zp1 有增加细胞外矿化基质的趋势, 过表达 Zp1 同时添加 E2 极显著促进细胞外矿化基质生成 ( $P < 0.01$ ), 空白对照组和 E2 对照组细胞外矿化基质形成变化不明显。

在诱导分化 8 d 的鸡颅骨成骨细胞中添加 E2 48 h 后, 通过 RT-qPCR 检测发现矿化基因 *ibsp*、*bglap*、*on* 等与空白对照组相比均显著降低 ( $P < 0.05$ ); pcDNA3.1(+)/myc-hisA-ZP1 组的矿化基因与 pcDNA3.1(+)/myc-hisA 组相比均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但联合添加 E2 后, *ibsp*、*bglap* 和 *on* 基因的相对表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。



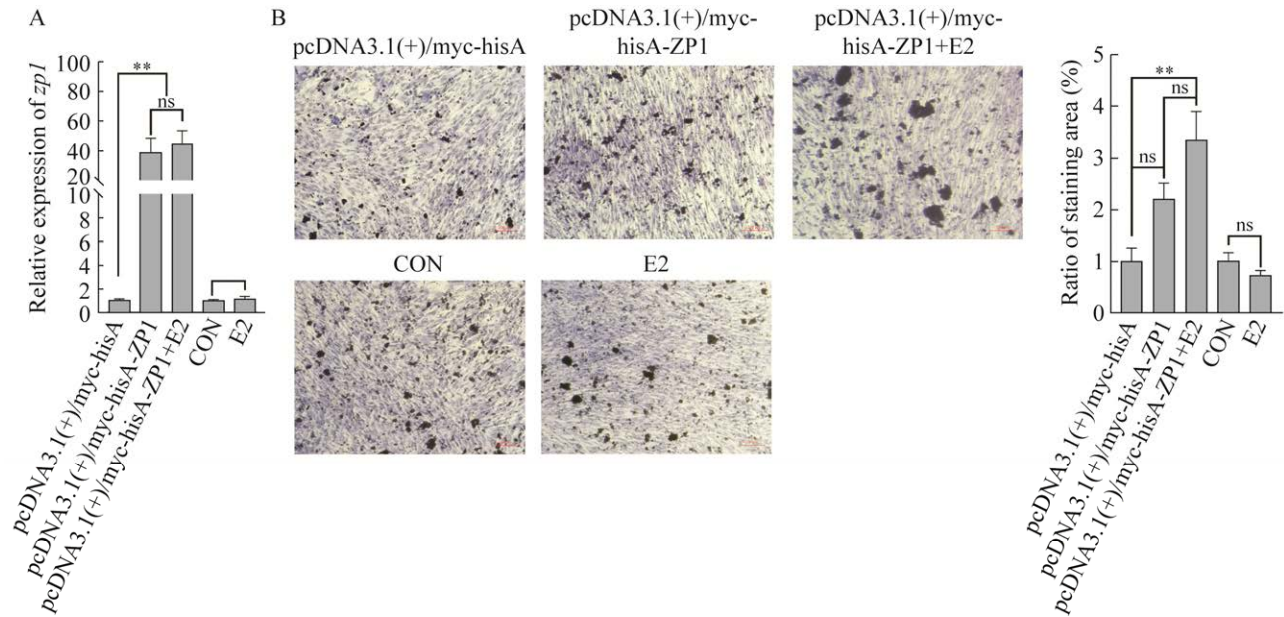


图5 *zp1* 基因过表达效率及 *Zp1* 过表达对鸡成骨细胞矿化的影响

Figure 5 The *zp1* gene overexpression efficiency and the effects of *Zp1* overexpressed on mineralization in chicken calvarial osteoblast. A: The *zp1* gene overexpression efficiency. B: The effect of *Zp1* overexpressed on toluidine blue staining and quantitative results. \*\*:  $P < 0.01$ ; ns:  $P > 0.05$ .

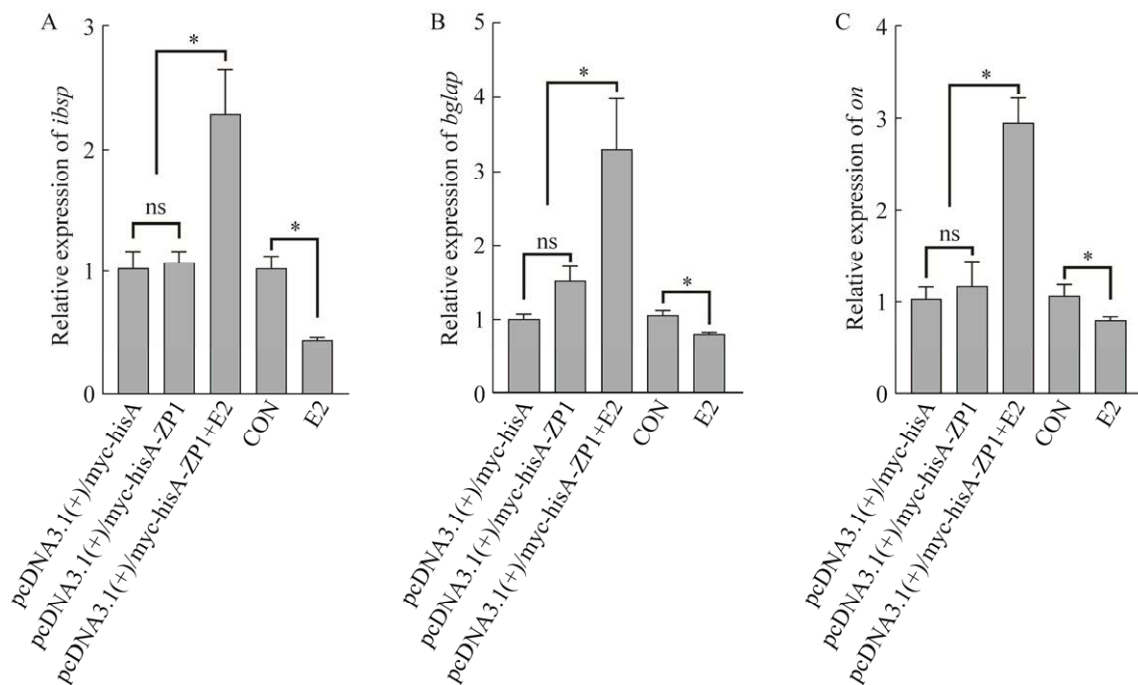


图6 *Zp1* 过表达对鸡颅骨成骨细胞矿化基因的影响

Figure 6 Effect of overexpressed *Zp1* on mineralization-related genes in chicken calvarial osteoblast. A–C: The relative gene expression levels of *ibsp*, *bglap* and *on*, respectively. \*:  $P < 0.05$ ; ns:  $P > 0.05$ .



### 3 讨论

本研究克隆得到鸡 *zp1* 基因序列 3 045 bp, 共编码 958 个氨基酸, 其在鸡与其他禽类的同源性高达 72%–88.2%, 表明该基因高度保守。鸡 *Zp1* 蛋白质预测具有 2 个 *N*-糖基化位点和 63 个 *O*-糖基化位点, 推测 *Zp1* 糖蛋白可能作为核心蛋白通过 *O*-连接或  $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖连接 GAG 促进骨细胞外基质矿化。

组织表达谱显示, 鸡 *zp1* 基因具有组织特异性, 在肝脏和卵黄膜中表达, 本研究首次检测到在骨骼中表达、在心脏和蛋壳腺中不表达。在鸡卵黄膜中, *Zp1*、*Zp3* 和 *Zpd* 是参与基质形成的主要成分, 其中 *Zp1* 来自肝脏, 通过血液运输到卵泡, *Zp3* 和 *Zpd* 均来自卵泡颗粒细胞<sup>[29-30]</sup>。研究表明, *zp1* mRNA 在性成熟的雌性鹌鹑肝脏中表达最强, 且受雌激素调控<sup>[25]</sup>。性成熟启动后雌激素水平和 *zp1* 表达量的升高也提示了 *zp1* 基因受雌激素调控。蛋鸡 10 周龄和 38 周龄的肝脏转录组的结果显示, *zp1* 在产蛋高峰肝脏中的表达是性成熟前肝脏中的 15 倍, 提示 *zp1* 表达受雌激素调控<sup>[31]</sup>。近期关于蛋鸡内脏脂肪的比较转录组中也鉴定到 *zp1* 基因的表达, 且在幼龄肉鸡脂肪中比性成熟肉鸡中低约 800 倍<sup>[32]</sup>。*zp1* 基因在内脏脂肪、产蛋鸡肝脏、胫骨中均有表达, 表明其在调控脂肪代谢和骨代谢过程中具有重要作用。

E2 对成骨细胞增殖和分化的调节取决于分化阶段(包括基质合成、早期/晚期矿化阶段)、物种差异和细胞系统等<sup>[33]</sup>。本研究以分化至 8 d 的鸡颅骨成骨细胞(早期矿化阶段)为研究对象, 发现添加 E2 的细胞中矿化标志基因表达下调, 表明 E2 在成骨细胞早期矿化阶段可能发挥抑制作用。为了明确 *Zp1* 是否在雌激素调控下促进骨矿化作用, 在过表达该基因的鸡颅骨成骨

细胞中同时添加 E2 可以增加细胞外矿化基质, 且 *ibsp*、*bglap*、*on* 等基因表达显著升高。*Ibsp* 是骨中高度糖基化的非胶原磷蛋白, 也是鸡髓质骨 KSPG 的核心蛋白<sup>[7]</sup>, 可促进成骨细胞分化和早期矿化以及羟基磷灰石沉积<sup>[8,34]</sup>。*Bglap* 是最丰富的非胶原骨基质蛋白, 由 *bglap* 和 *bglap2* 编码<sup>[35]</sup>, 引导磷灰石晶体排列但不参与骨量的调节<sup>[36]</sup>。*On* 是一种重要的非胶原蛋白, 与 I 型胶原蛋白和羟基磷灰石具有高亲和力<sup>[37]</sup>, 并通过 p38 信号通路调节成骨细胞的细胞外基质矿化<sup>[38]</sup>。据此推测, *zp1* 在性成熟后的产蛋鸡骨矿化发挥重要作用, 但其是否作为髓质骨的组成成分需要进行深入研究。

### 4 结论

本研究克隆得到 *zp1* 基因序列, 共编码 958 个氨基酸残基, 同源比对发现, 在禽类中 *zp1* 基因具有较高的保守性; *zp1* 基因表达具有组织特异性, 且在性成熟启动后表达量显著高于性成熟启动前期; 在雌激素作用下过表达 *Zp1* 正向调控鸡成骨细胞矿化。

### REFERENCES

- [1] HABIG C, HENNING M, BAULAIN U, JANSEN S, SCHOLZ AM, WEIGEND S. Keel bone damage in laying hens—its relation to bone mineral density, body growth rate and laying performance[J]. *Animals*, 2021, 11(6): 1546.
- [2] CANDELOTTO L, STRATMANN A, GEBHARDT-HENRICH SG, RUFENER C, van de BRAAK T, TOSCANO MJ. Susceptibility to keel bone fractures in laying hens and the role of genetic variation[J]. *Poultry Science*, 2017, 96(10): 3517-3528.
- [3] WEBSTER AB. Welfare implications of avian osteoporosis[J]. *Poultry Science*, 2004, 83(2): 184-192.
- [4] HARLANDER-MATAUSCHEK A, RODENBURG TB, SANDILANDS V, TOBALSKE BW, TOSCANO MJ. Causes of keel bone damage and their solutions in laying hens[J]. *World's Poultry Science Journal*, 2015,

- 71(3): 461-472.
- [5] ALFONSO-CARRILLO C, BENAVIDES-REYES C, de LOS MOZOS J, DOMINGUEZ-GASCA N, SANCHEZ-RODRÍGUEZ E, GARCIA-RUIZ AI, RODRIGUEZ-NAVARRO AB. Relationship between bone quality, egg production and eggshell quality in laying hens at the end of an extended production cycle (105 weeks)[J]. *Animals*, 2021, 11(3): 623.
  - [6] HAO JX, SHEN MJ, WANG CY, WEI JH, WAN QQ, ZHU YF, YE T, LUO ML, QIN WP, LI YT, JIAO K, ZHAO B, NIU LN. Regulation of biomineralization by proteoglycans: from mechanisms to application[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 294: 119773.
  - [7] HADLEY JA, HORVAT-GORDON M, KIM WK, PRAUL CA, BURNS D, LEACH RM Jr. Bone sialoprotein keratan sulfate proteoglycan (BSP-KSPG) and FGF-23 are important physiological components of medullary bone[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2016, 194: 1-7.
  - [8] BOULEFTOUR W, JUIGNET L, BOUET G, GRANITO RN, VANDEN-BOSSCHE A, LAROCHE N, AUBIN JE, LAFAGE-PROUST MH, VICO L, MALAVAL L. The role of the SIBLING, bone sialoprotein in skeletal biology—contribution of mouse experimental genetics[J]. *Matrix Biology*, 2016, 52/53/54: 60-77.
  - [9] DOMOWICZ MS, CORTES M, HENRY JG, SCHWARTZ NB. Aggrecan modulation of growth plate morphogenesis[J]. *Developmental Biology*, 2009, 329(2): 242-257.
  - [10] LIN WZ, ZHU XH, GAO L, MAO MY, GAO DM, HUANG ZW. Osteomodulin positively regulates osteogenesis through interaction with BMP2[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(2): 147.
  - [11] FRARA N, ABDELMAGID SM, SONDAG GR, MOUSSA FM, YINGLING VR, OWEN TA, POPOFF SN, BARBE MF, SAFADI FF. Transgenic expression of osteoactivin/gpnmh enhances bone formation *in vivo* and osteoprogenitor differentiation *ex vivo*[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2016, 231(1): 72-83.
  - [12] HUANG B, SU YW, SHEN EP, SONG M, LIU DP, QI H. Extracellular vesicles from GPNMB-modified bone marrow mesenchymal stem cells attenuate bone loss in an ovariectomized rat model[J]. *Life Sciences*, 2021, 272: 119208.
  - [13] 牛萍萍, 李俊辉, 薛徽, 周济, 张帅, 孙瑶. 骨质疏松小鼠骨内糖胺聚糖的变化[J]. *口腔生物医学*, 2021, 12(2): 91-94.
  - [14] NIU PP, LI JH, XUE H, ZHOU J, ZHANG S, SUN Y. Changes of glycosaminoglycans in bone of osteoporosis mice[J]. *Oral Biomedicine*, 2021, 12(2): 91-94 (in Chinese).
  - [15] BORK P, SANDER C. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF- $\beta$  type III receptor[J]. *FEBS Letters*, 1992, 300(3): 237-240.
  - [16] JOVINE L, QI HY, WILLIAMS Z, LITSCHER ES, WASSARMAN PM. A duplicated motif controls assembly of zona pellucida domain proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(16): 5922-5927.
  - [17] HAN L, MONNÉ M, OKUMURA H, SCHWEND T, CHERRY AL, FLOT D, MATSUDA T, JOVINE L. Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3[J]. *Cell*, 2010, 143(3): 404-415.
  - [18] BAKST MR, HOWARTH B Jr. The fine structure of the hen's ovum at ovulation[J]. *Biology of Reproduction*, 1977, 17(3): 361-369.
  - [19] LEGAN PK, RAU A, KEEN JN, RICHARDSON GP. The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(13): 8791-8801.
  - [20] YAN B, ZHANG ZZ, HUANG LY, SHEN HL, HAN ZG. OIT3 deficiency impairs uric acid reabsorption in renal tubule[J]. *FEBS Letters*, 2012, 586(6): 760-765.
  - [21] OP de BEÉCK K, VERMEIRE S, RUTGEERTS P, BOSSUYT X. Antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in inflammatory bowel diseases[J]. *Gut*, 2012, 61(1): 162-164.
  - [22] PLAZA S, CHANUT-DELALANDE H, FERNANDES I, WASSARMAN PM, PAYRE F. From A to Z: apical structures and zona pellucida-domain proteins[J]. *Trends in Cell Biology*, 2010, 20(9): 524-532.
  - [23] LITSCHER ES, WASSARMAN PM. Zona pellucida genes and proteins and human fertility[J]. *Trends in Developmental Biology*, 2020, 13: 21-33.
  - [24] NISHIMURA K, DIOGUARDI E, NISHIO S, VILLA A, HAN L, MATSUDA T, JOVINE L. Molecular basis of egg coat cross-linking sheds light on ZP1-associated female infertility[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 3086.
  - [25] WASSARMAN PM, LITSCHER ES. Zona pellucida genes and proteins: essential players in mammalian

- oogenesis and fertility[J]. *Genes*, 2021, 12(8): 1266.
- [25] SASANAMI T, PAN J, MORI M. Expression of perivitelline membrane glycoprotein ZP1 in the liver of Japanese quail (*Coturnix japonica*) after *in vivo* treatment with diethylstilbestrol[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 84(1): 109-116.
- [26] HANAFY AM, SASANAMI T, MORI M. Sensitivity of expression of perivitelline membrane glycoprotein ZP1 mRNA in the liver of Japanese quail (*Coturnix japonica*) to estrogenic compounds[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, 144(4): 356-362.
- [27] DUNN IC, de KONING DJ, McCORMACK HA, FLEMING RH, WILSON PW, ANDERSSON B, SCHMUTZ M, BENAVIDES C, DOMINGUEZ-GASCA N, SANCHEZ-RODRIGUEZ E, RODRIGUEZ-NAVARRO AB. No evidence that selection for egg production persistency causes loss of bone quality in laying hens[J]. *Genetics Selection Evolution*, 2021, 53(1): 1-13.
- [28] OKUMURA H, SATO T, SAKUMA R, FUKUSHIMA H, MATSUDA T, UJITA M. Identification of distinctive interdomain interactions among ZP-N, ZP-C and other domains of zona pellucida glycoproteins underlying association of chicken egg-coat matrix[J]. *FEBS Open Bio*, 2015, 5(1): 454-465.
- [29] BAUSEK N, WACLAWEK M, SCHNEIDER WJ, WOHLRAB F. The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(37): 28866-28872.
- [30] NISHIO S, OKUMURA H, MATSUDA T. Egg-coat and zona pellucida proteins of chicken as a typical species of aves[M]//*Current Topics in Developmental Biology*. Amsterdam: Elsevier, 2018: 307-329.
- [31] GLOUX A, DUCLOS MJ, BRIONNE A, BOURIN M, NYS Y, RÉHAULT-GODBERT S. Integrative analysis of transcriptomic data related to the liver of laying hens: from physiological basics to newly identified functions[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 1-16.
- [32] BORNELÖV S, SEROUSSI E, YOSEFI S, BENJAMINI S, MIYARA S, RUZAL M, GRABHERR M, RAFATI N, MOLIN AM, PENDAVIS K, BURGESS SC, ANDERSSON L, FRIEDMAN-EINAT M. Comparative omics and feeding manipulations in chicken indicate a shift of the endocrine role of visceral fat towards reproduction[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 295.
- [33] SYED F, KHOSLA S. Mechanisms of sex steroid effects on bone[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 328(3): 688-696.
- [34] XU L, ZHANG ZQ, SUN X, WANG JJ, XU W, SHI L, LU JJ, TANG J, LIU JJ, SU X. Glycosylation status of bone sialoprotein and its role in mineralization[J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 360(2): 413-420.
- [35] KOMORI T. Functions of osteocalcin in bone, pancreas, testis, and muscle[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(20): 7513.
- [36] KOMORI T. What is the function of osteocalcin?[J]. *Journal of Oral Biosciences*, 2020, 62(3): 223-227.
- [37] TERMINE JD, KLEINMAN HK, WHITSON SW, CONN KM, McGARVEY ML, MARTIN GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen[J]. *Cell*, 1981, 26(1): 99-105.
- [38] ZHU YS, GU Y, JIANG C, CHEN L. Osteonectin regulates the extracellular matrix mineralization of osteoblasts through P38 signaling pathway[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(3): 2220-2231.

(本文责编 郝丽芳)