

文章编号: 1674-5566(2024)02-0317-10

DOI: 10.12024/jsou.20231204372

## *aldh3a2a* 敲除对斑马鱼体色的影响

卢培钰<sup>1,2</sup>, 冯毅栋<sup>1,2</sup>, 鲍宝龙<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 本研究探究了 *aldh3a2a* 在斑马鱼色素细胞发育中的意义及其对醛代谢和肝脏健康的影响。利用 CRISPR/Cas9 技术, 成功构建 *aldh3a2a* 敲除纯合突变家系, 导致黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞数量减少, *csf1ra*、*pnp4a*、*itk* 下调, 黑色素合成通路关键基因 *mitfa*、*tyrp1b* 和 *kita* 下调。转录组分析揭示了基因表达谱系的变化, 差异基因 *scd*、*lpla* 和 *aox5* 在类固醇生物合成途径中下调, 指示 *aldh3a2a* 对类固醇生物合成的关键作用。对视黄醇代谢通路的转录组分析和 qPCR 联合研究结果表明, *aldh3a2a* 可以调控 *raldh2*、*rxrab* 以及 *aox5*, 表明其对视黄酸受体的信号传导有一定影响, 同时 *aldh3a2a* 可以调控钾离子通道蛋白 *kcnk3b*, 指示其对色素细胞的影响与钾离子信号传导有关。GO 和 KEGG 富集分析发现突变体的细胞周期、同源重组、RNA 降解、RNA 转运、p53 信号通路、真核生物核糖体生物发生、DNA 复制、碱基切除修复、氨基酰基-tRNA 生物合成、细胞质 DNA 传感通路、类固醇生物合成、错配修复、类固醇激素生物合成和醛酸盐代谢等通路也有着广泛影响。此外, *aldh3a2a* 基因敲除会导致体内醛积累明显, 产生细胞毒性进而引发肝脏体积异常增大、肝脏内出现空泡, 体质量增加的表征, 类似于 Sjögren-Larsson 综合征的症状, 揭示了 *aldh3a2a* 在斑马鱼体内的作用及其与人类遗传疾病的相关性, 将有助于更深入地了解其在斑马鱼和人类中的功能和潜在的治疗靶点。

**关键词:** *aldh3a2a* 基因敲除; 色素细胞; 视黄醇代谢通路; 视黄酸代谢

**中图分类号:** S 917 **文献标志码:** A

鱼类体色多种多样, 其影响因素主要包含遗传、内分泌、环境和食物等<sup>[1]</sup>。不同鱼类在体色形成上的差异与其生活在不同深度时光照强度相关, 这是其在环境中长时间适应和演化的结果。已有研究表明, 在牙鲆中蓝光能通过感蓝光视蛋白基因 *sus2* 介导影响视黄酸合成继而调控黑色素细胞形成<sup>[2]</sup>, 感光视锥视蛋白 *opn1lw2* 基因的缺失会影响视黄醛脱氢酶基因 *raldh3* 的表达<sup>[3]</sup>, 且敲除斑马鱼感短波视锥视蛋白 *sus1* 基因后, 斑马鱼皮肤中另一个视黄醛脱氢酶 *raldh2* 的表达量显著降低<sup>[4]</sup>, 综上可知皮肤中的视蛋白通过影响斑马鱼体内视黄酸的代谢, 进而影响斑马鱼的体色。

*Aldh* 家族在斑马鱼色素细胞发育中起着关键作用, *Aldh1* 利用视黄醛作为底物, 其代谢产物

视黄酸具有激活下游基因转录的能力<sup>[5]</sup>, 通过视黄酸与由视黄酸受体 RXR 和 RAR 组成的转录因子复合物结合而发生<sup>[6-7]</sup>, 最终诱导比目鱼和斑马鱼的黑色素细胞发育。但是, 在硬骨鱼中不存在 *aldh1a1*, 只有 *aldh1a2* 和 *aldh1a3* 作为该亚群的代表, 另一方面, *aldh2* 和 *aldh5* 利用甲醛和乙醛作为各自的底物进行线粒体代谢, 从而为斑马鱼黑色素细胞的成熟提供必要的原料<sup>[8]</sup>。在斑马鱼基因组中, *aldh3* 基因表现出显著的多样性, 包括 5 个不同的亚型: *aldh3a1*、*aldh3a2a*、*aldh3a2b*、*aldh3b1* 和 *aldh3b2*, *aldh3* 的主要底物包括长链脂肪醛<sup>[9]</sup>, 另外, 文献表明其将视黄醛转化为视黄酸并非是其主要功能。在本研究中, 我们阐明了 *aldh3a2a* 对斑马鱼色素细胞的影响, 特别是 *aldh3a2a* 在这一生物学过程中所起的

收稿日期: 2023-12-15 修回日期: 2023-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(31872546)

作者简介: 卢培钰(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为发育生物学。E-mail: catherine20201010@163.com

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

作用。

醛是癌细胞中氧化磷酸化和核苷酸合成增强的副产物,这些醛是由脂质过氧化物产生的,这是一种 caspase 非依赖性的细胞凋亡形式。醛的积累可引起 DNA 损伤、脂肪变性和肝坏死<sup>[10]</sup>,而 *aldh3a2* 被认为具有氧化长链脂肪醛的能力,从而减轻对细胞的氧化损伤<sup>[9]</sup>。小鼠中 *aldh3a2* 的缺失导致细胞氧化还原状态的改变并影响脂质代谢。在人类中,同源基因 *aldh3a2a* 的突变导致 Sjögren-Larsson 综合征(SLS)。SLS 患者具有典型的临床特征,包括鱼鳞病、痉挛性双瘫、智力残疾、癫痫发作和明显的视网膜病变<sup>[10-11]</sup>。*aldh3a2* 中 SLS 相关突变超过 70 个,包括氨基酸替换、缺失、插入和剪接错误。在本研究中,我们以斑马鱼为模型系统进行 CRISPR/cas9 介导的 *aldh3a2a* 基因敲除,与转录组测序方法相结合,使我们能够研究由 *aldh3a2a* 介导的肝脏毒理学表型,并探索斑马鱼体色形成的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 斑马鱼养护

实验所用到的 AB 系野生型斑马鱼,饲养于上海海洋大学本实验室。斑马鱼的饲养光周期是 14 h 光照:10 h 黑暗,水温为 26~28 °C,显微注射前的野生型斑马鱼亲鱼,按照雌雄比例 1:1 在前一天晚上进行暗处理配组,当天光刺激后产卵,用于后续的注射。

### 1.2 斑马鱼 *aldh3a2a* 基因敲除靶点设计

本实验在 UCSC [The University of California Santa Cruz Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>)] 网站上设计 *aldh3a2a* 基因敲除靶点。先在 NCBI 上查询到 *aldh3a2a* 基因的 DNA 序列(登录号:323653),明确该基因的内含子、外显子具体结构及其转录本的详细信息,在外显子编码(CDS)序列区域设计特异性的靶点,以保证敲除靶点对破坏该基因产生的蛋白质有效果,靶点序列、基因型检测引物序列见表 1。

合成的 sgRNA 靶点包含 T7 启动子的特定序列和部分基因组序列,以及下游通用引物 Oligo2,如表 1 所示。转录模板采用 PCR 法合成,产物采用 T7 高产 RNA 合成试剂盒(NEB 公司)

进行体外转录反应纯化和转录,然后使用 RNA Clean & Concentrator TM-25 (zymo RESEARCH) 试剂盒纯化转录本,获得最终的 sgRNA。cas9 蛋白购自 Kingsley (Z03385)。按照 500 ng sgRNA 和 1  $\mu$ L cas9 蛋白的比例,将 5  $\mu$ L 体系混合后微量注射到斑马鱼受精卵中。这些 F<sub>0</sub> 亲鱼被饲养到成年,并与野生型鱼杂交获得后代。PCR 扩增目标位点周围 250 bp 区域,筛选 7 bp 缺失系,自交获得纯系。

### 1.3 黑色素细胞统计分析

随机选取 90 日龄的野生型和纯合突变体斑马鱼雌雄各 3 尾进行分析。将斑马鱼放大 3 倍后,在尼康立体显微镜下拍摄。随后,分别在第 2 色素带皮肤的 1/4、1/2 和 3/4 处,在第 3 色素带皮肤的 1/4、1/2 和 3/4 处划取 1 mm<sup>2</sup> 区域对黑色素细胞进行计数。方法是根据图像上相应的比例尺,使用 Adobe Photoshop 2022 软件选择帧长为 1 mm $\times$ 1 mm 的计数区域,将选择的区域放大,用 Image J 软件对其中的黑色素细胞进行计数,使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件对数据进行 T-Test (unpaired) 分析。

### 1.4 皮肤转录组测序与 RNA 的提取

转录组测序实验所用的斑马鱼均为 90 日龄的成鱼,分别取 6 尾纯合子突变体和 6 尾野生型斑马鱼,雌雄数量相等,从背部和腹部皮肤匀浆中提取 RNA,质检后进行转录组测序。提取前,用 MS-222 麻醉,拍照并记录。

### 1.5 RNA 逆转录与实时荧光定量 PCR

采用 HiScript III QRT Super Mix for QPCR (Vazyme) 逆转录试剂盒制备实时荧光定量 PCR 模板,具体操作步骤参考试剂盒说明书。测定 cDNA 浓度后,将 cDNA 样品 -20 °C 保存。

实时荧光定量 PCR 以斑马鱼  $\beta$ -肌动蛋白基因为内参。实验组对每个基因使用的引物见表 1,共 3 次重复。制备了 20  $\mu$ L 的 PCR 反应,其中 2 $\times$ qPCR SYBR Green Master Mix 为 10  $\mu$ L,模板 DNA 为 1  $\mu$ L,上游引物 0.4  $\mu$ L,下游引物 0.4  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 为 8.2  $\mu$ L。实验采用的具体 PCR 程序:95 °C 初始变性 30 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火延伸 30 s,40 个循环。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法计算相应基因的相对表达量,采用 GraphPad Prism 9.0.0 进行统计分析。

表 1 靶点及 PCR 所用引物序列  
Tab. 1 Primer sequences used in the present study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
<i>aldh3a2a</i> -target	TAATACGACTCACTATAGGCACCAACAAGG GGTTGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	Gene editing
<i>oligo2</i>	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCA AGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTT GCTATTTCTAGCTCTAAAAC	Gene editing
<i>aldh3a2a</i> -F	TGTA AACGACGGCCAGTAGTGTACTGGA ACGTTTGGAT	Gene editing
<i>aldh3a2a</i> -R	GTGCTTATCATTTGGGGCTGGA ACTA	Gene editing
<i>kita</i> -F	AGTGCCTCTCAAGGTGTCAG	qRT-PCR
<i>kita</i> -R	GCACTTGTCATCAATCGGC	qRT-PCR
<i>csf1ra</i> -F	AGACTACATTTGCTGCGCTA	qRT-PCR
<i>csf1ra</i> -R	TTCGATCAAAAACCCCGAGA	qRT-PCR
<i>pnp4a</i> -F	TCAAGTCCAGGACTCGTTC	qRT-PCR
<i>pnp4a</i> -R	CTTACAGATGTCCAGCGCCA	qRT-PCR
<i>raldh2</i> -F	GAGAGGTGAAGAACGACCCC	qRT-PCR
<i>raldh2</i> -R	GGTTGTACGTGGGGAAGACC	qRT-PCR
<i>raldh3</i> -F	TTATTAACAGACTCGCCGAT	qRT-PCR
<i>raldh3</i> -R	AATAATAGCTCCGCACACA	qRT-PCR
<i>rxrab</i> -F	CCTCACTTTTCGGACCTCCC	qRT-PCR
<i>rxrab</i> -R	AAGCTCTGTCCAGCACTCTGTC	qRT-PCR
<i>mitfa</i> -F	AGGGAATTATCCGTTACTCCA	qRT-PCR
<i>mitfa</i> -R	CAAGTTCCTGAATACGGAGCA	qRT-PCR
<i>tyrp1a</i> -F	GCAGTCGACTTCAGTCA CGA	qRT-PCR
<i>tyrp1a</i> -R	TAGTCCTCCACTCTCGCA	qRT-PCR
<i>itk</i> -F	ATGGAGCCAAACCTCTTCCG	qRT-PCR
<i>itk</i> -R	TACGAACCATGAAACCCCGG	qRT-PCR
<i>aox5</i> -F	GGAAGAATATCGCAAAGCTC	qRT-PCR
<i>aox5</i> -R	GTAATTTCCCTTGGCGCACT	qRT-PCR
<i>kcns3b</i> -F	ATCAAAGAAGCTCCCGGGAA	qRT-PCR
<i>kcns3b</i> -R	GCATTGTCCAAGTCCGGCATC	qRT-PCR
<i>lpla</i> -F	TGGACCACTGCAGCAAATCA	qRT-PCR
<i>lpla</i> -R	ACGCCATAGCAATTCACCCA	qRT-PCR
<i>scd</i> -F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	qRT-PCR
<i>scd</i> -R	TCAAGTAGTCCGGGATGTCC	qRT-PCR
$\beta$ -actin-F	AGGTCATCACCATTGGCAAT	qRT-PCR
$\beta$ -actin-R	GATGTCGACGTCACACTTCAT	qRT-PCR

## 1.6 GO富集和KEGG富集分析

每个GO项目中不同基因的富集显著性可以使用超几何分布算法计算,然后通过Fisher精确检验计算每个条目的BP、CC和MF值。

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 是一个国际通用的基因组分析路径数据库。本研究利用KEGG对通路差异进行全面分析,并通过数据识别富含差异表达基因

的通路。

## 1.7 组织切片及H. E染色

根据文献进行组织切片和H.E染色。整尾斑马鱼用10%甲醛固定,然后包埋切片。

## 1.8 分子进化树

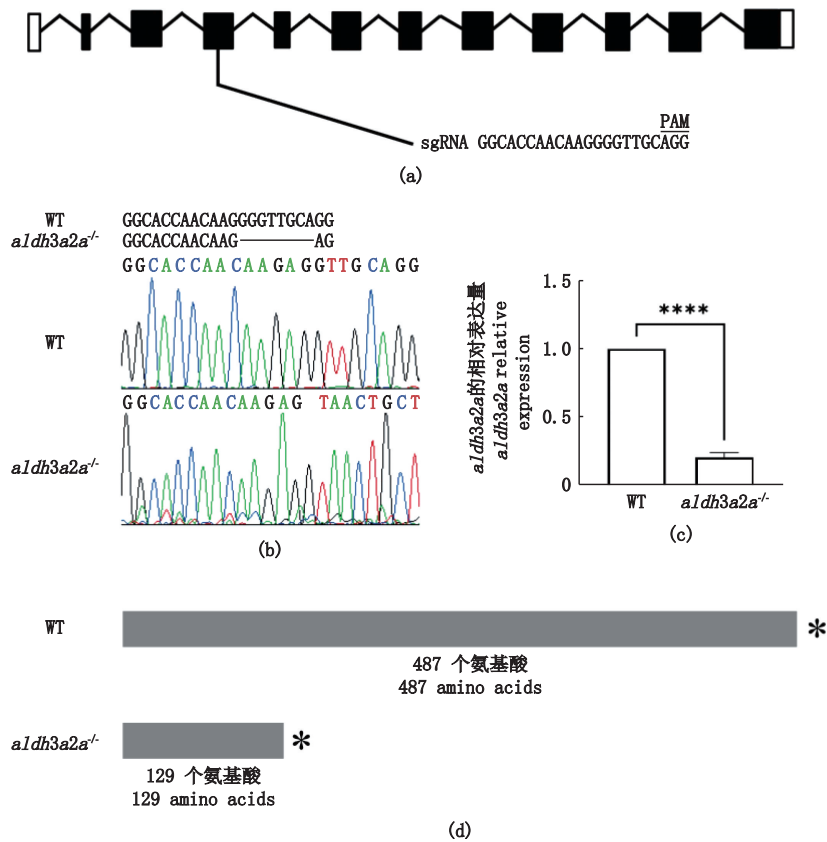
在NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找并下载*aldh*家族相关基因序列,使用MEGA软件进行序列比对和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 利用 CRISPR/Cas9 构建斑马鱼 *aldh3a2a* 纯合敲除家系

为了解 *aldh3a2a* 在斑马鱼色素细胞发育和醛代谢中的作用,利用 CRISPR/cas9 技术设计了 *aldh3a2a* 的 sgRNA 结合靶点,该靶点位于第 4 外显子,序列为 GGCACCAACAAGAGGTTGC (图 1a)。根据 DNA 测序结果,在靶点附近发现了 1 个

缺失 7 bp、突变 1 bp 的家系(图 1b),并将家系命名为 *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>。通过在缺失的 7 bp 序列上设计引物(表 1),并以皮肤组织 cDNA 为模板进行 qPCR,结果显示突变体中检测到的 *aldh3a2a* 表达量远低于野生型,且差异显著(图 1c)。证明 *aldh3a2a* 基因在转录水平上被成功敲除,核酸序列突变导致相应氨基酸密码提前终止,由于移码突变,野生型终止于第 487 号氨基酸,突变体终止于第 129 号氨基酸(图 1d),突变体缺失 358 个氨基酸。



(a) *aldh3a2a* 基因敲除靶点设计位置; (b) 野生型斑马鱼和纯合子突变体基因序列对比; (c) 纯合子突变体中 *aldh3a2a* 基因表达量; (d) 野生型斑马鱼和纯合子突变体氨基酸数目对比; WT. 野生型斑马鱼; *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>. *aldh3a2a* 纯合突变体; \*\*\*\*.  $P < 0.0001$ 。

(a) Design location of *aldh3a2a* gene knockout target; (b) Comparison of gene sequences between wild type zebrafish and homozygous mutant; (c) Expression of *aldh3a2a* gene in homozygous mutant; (d) Comparison of amino acid numbers between wild type zebrafish and homozygous mutant; WT. Wild-type zebrafish; *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>. A homozygous mutant strain of zebrafish; \*\*\*\*.  $P < 0.0001$ .

图 1 *aldh3a2a* 基因敲除纯合家系的构建

Fig. 1 Construction of homozygous families with *aldh3a2a* gene knockout

### 2.2 *aldh3a2a* 突变体的色素细胞和体脂特征

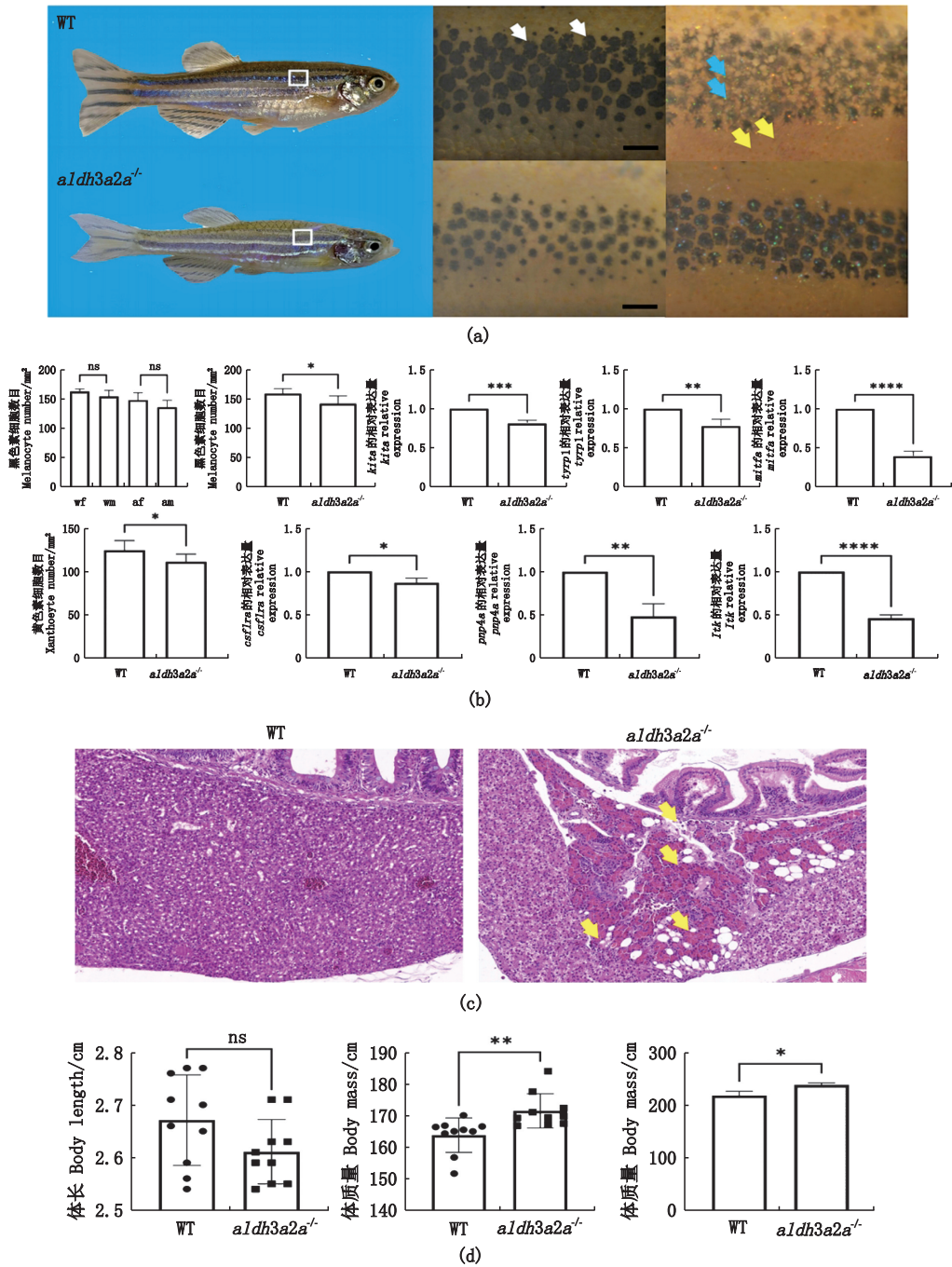
3 种色素细胞在野生型和突变体斑马鱼的皮肤中分布如图所示(图 2a),通过计数色素带上黑色素细胞和黄色素细胞的数量(图 2b),结果显示突变体的黑色素细胞和黄色素细胞明显少于野生型。根据斑马鱼色素细胞遗传谱系的建立,人们普遍认为 *mitfa*、*kit* 和 *tyrp1a* 是黑色素细胞的标记基因<sup>[12]</sup>, *csf1ra* 是黄色素细胞的标记

基因<sup>[13]</sup>, *pnp4a* 和 *itk* 是虹彩细胞的标记基因<sup>[14]</sup>, 它们参与色素细胞的发育或色素颗粒的合成<sup>[15]</sup>。

利用 qPCR 对 3 种色素细胞的标记基因进行验证,结果显示色素标记基因表达水平下调(图 2b),差异显著。结果表明,3 种色素细胞数量减少,色素合成能力下降。我们检测了野生型和突变体斑马鱼的体长和体质量(图 2d),结果显示两

者的体长没有差异,但体质量有差异。突变体的质量显著高于野生型。肝组织切片结果显示,突

变体肝组织体积增大,出现圆形液泡和蜂窝状细胞(图 2c),为脂肪变性的表现。



(a) 野生型斑马鱼和 *aldh3a2a* 纯合突变体的整体观和皮肤色素分布; (b) 斑马鱼皮肤中黑色素细胞和黄色素细胞计数及色素细胞标记基因相对表达量; (c) 野生型和突变体斑马鱼的肝组织切片; (d) 野生型和突变体斑马鱼的体长、体质量和肝脏长度; WT. 野生型斑马鱼; *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>. *aldh3a2a* 纯合突变体; wf. 野生型雌性斑马鱼; wm. 野生型雄性斑马鱼; af. *aldh3a2a* 纯合突变体雌性斑马鱼; am. *aldh3a2a* 纯合突变体雄性斑马鱼; ns. 无显著差异; \*, *P*<0.05; \*\*, *P*<0.01; \*\*\*, *P*<0.001; \*\*\*\*, *P*<0.0001。

(a) Global view and skin pigment distribution of wild-type zebrafish and *aldh3a2a* homozygous mutant; (b) Count of melanocytes and xanthophyll cells and relative expression of pigment cell marker genes in zebrafish skin; (c) Liver tissue slices of wild type and mutant zebrafish; (d) Body length, weight and liver length of wild type and mutant zebrafish; WT. Wild-type zebrafish; *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>. A homozygous mutant strain of zebrafish; wf. Wild-type female zebrafish; wm. Wild-type male zebrafish; af. A homozygous mutant strain of female zebrafish; am. A homozygous mutant strain of male zebrafish; ns. No significant difference; \*, *P*<0.05; \*\*, *P*<0.01; \*\*\*, *P*<0.001; \*\*\*\*, *P*<0.0001.

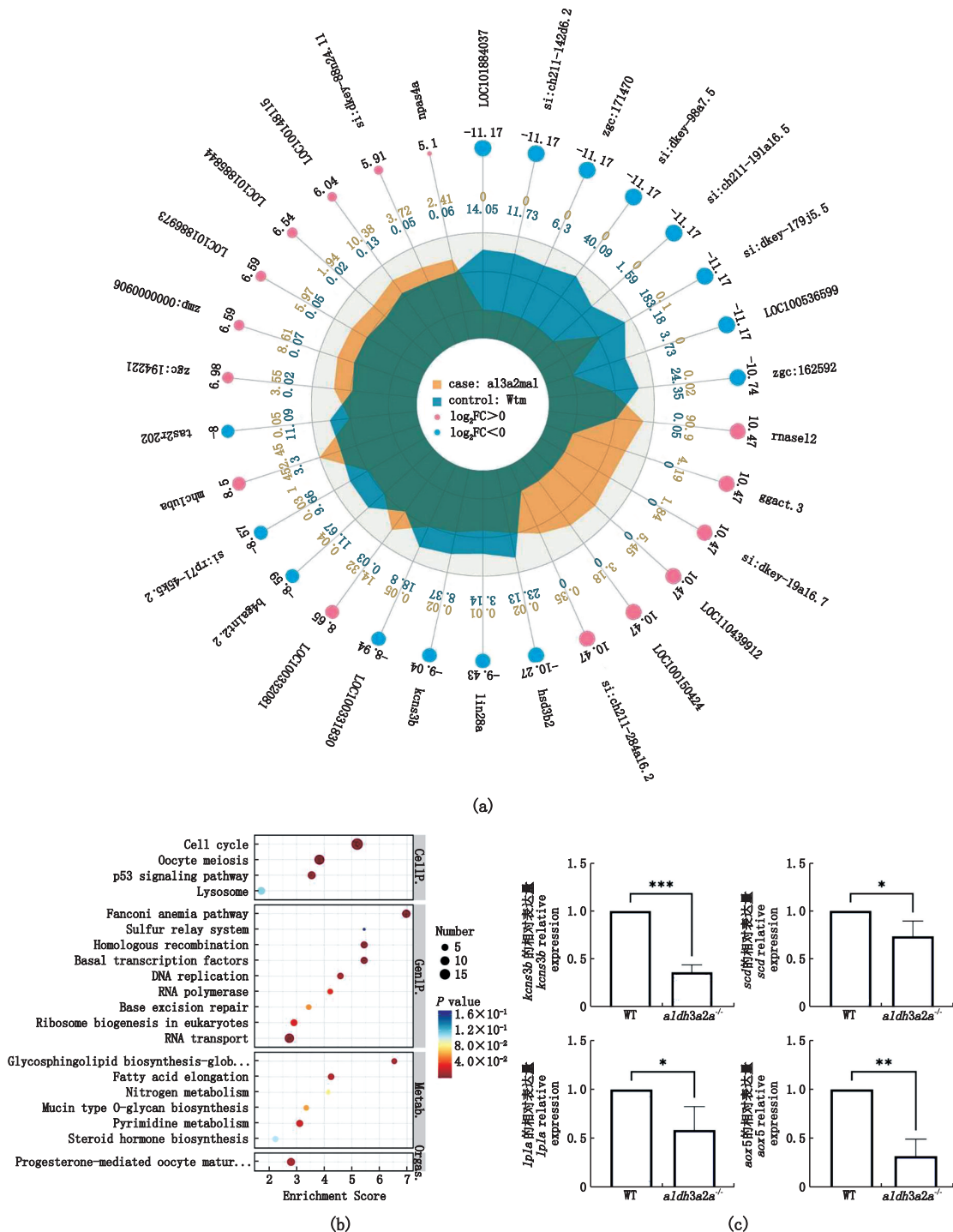
图2 *aldh3a2a* 突变体的色素细胞和体脂特征

Fig. 2 Chromatocyte and body fat characterization of *aldh3a2a* mutant

### 2.3 *aldh3a2a* 转录组测序和 qPCR 结果分析

通过转录组测序共检测到 24 054 个基因,在野生型和突变型皮肤组织中均有表达。选择  $P < 0.05$   $|\log_2 \text{fold change}| > 1$  筛选差异表达基因。结果

表明, *aldh3a2a* 突变体和野生型斑马鱼皮肤转录组中富集了 204 个显著上调基因和 1 294 个显著下调基因(图 3)。



(a) 显著差异基因; (b) KEGG 富集差异显著通路; (c) 差异显著基因 qPCR 结果; WT. 野生斑马鱼; *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>. *aldh3a2a* 纯合突变斑马鱼; ns. 无显著差异; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

(a) Significant different gene; (b) KEGG enrichment pathway with significant difference; (c) qPCR results of significantly different genes; WT. Wild-type Zebrafish; *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>. A homozygous mutant strain of zebrafish; ns. No significant difference; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

图 3 *aldh3a2a* 转录组测序和 qPCR 结果分析

Fig. 3 Cross-linking analysis of *aldh3a2a* transcriptome sequencing and qPCR results

在差异最显著的 30 个基因中, *npas4a*、*mhc1uba*、*ggact3*、*rnasel2* 显著上调, *tas2r202*、*b4galnt2*、*kcns3b*、*lin28a*、*hsd3b2* 显著下调(图 3b)。钾通道基因在黑色素细胞中是细胞自主性所必需的基因, 实时荧光定量 PCR 结果也证实了 *kcns3b* 在突变体皮肤中的表达量显著下调(图 3c), 表明 *aldh3a2a* 通过干扰钾通道来减少色素细胞的形成。

KEGG 信号通路富集差异最大的 20 条通路分别是细胞周期、范可尼贫血通路、同源重组、卵母细胞减数分裂、RNA 聚合酶、糖鞘脂生物合成-球蛋白和异球蛋白系列、孕激素介导、卵母细胞成熟、RNA 降解、RNA 转运、p53 信号通路、真核生物核糖体生物发生、DNA 复制、碱基切除修复、氨基酰基-tRNA 生物合成、细胞质 DNA 传感通路、类固醇生物合成、错配修复、类固醇激素生物合成、鞘糖脂生物合成-乳酸和新乳酸系列和抗坏血酸和醛酸盐代谢。

差异基因 *scd*、*lpla* 和 *aox5* 在类固醇生物合成途径中下调, 定量 PCR 结果也证实了 *scd*、*lpla* 和 *aox5* 的下调, 表明 *aldh3a2a* 代谢物促进了类固醇激素的合成(图 3c)。

#### 2.4 分子进化中 *aldh3a2a* 与 *aldh1a2* 聚类, 不与其他 *aldh* 家族基因聚类

分子进化树的结果表明, *aldh3a2a* 与 *aldh1a2* 的亲缘关系比 *aldh1a3* 的亲缘关系更近(图 4)<sup>[16]</sup>。

转录组数据显示, *aldh3a2a* 缺失对 *aldh3a1*、*aldh3b1* 和 *aldh18a1* 的影响最大, 影响其下调幅度超过 2 倍(图 4b), 尽管所有 *aldh* 家族基因在转录水平上没有显著差异。我们通过实时荧光定量 PCR 检测了 *aldh1*、*aldh2* 和 *aldh5* 的表达水平(部分数据未列出), 结果显示突变体中 *aldh1a2* 的表达明显下调(图 4d), 说明 *aldh3a2a* 的功能可能是通过调节 *aldh1a2* 实现的。

*aldh1a2* 的基因功能是通过其代谢物视黄酸来完成的。敲除 *aldh3a2a* 诱导的 *aldh1a2* 下调作用于视黄酸受体, 转录组学数据显示, *rarab* 下调, *rargb* 上调。通过实时荧光定量 PCR 检测 6 种视黄酸 RXR 受体和 4 种视黄酸 RAR 受体在斑马鱼中的表达水平(数据未列出), 结果显示只有

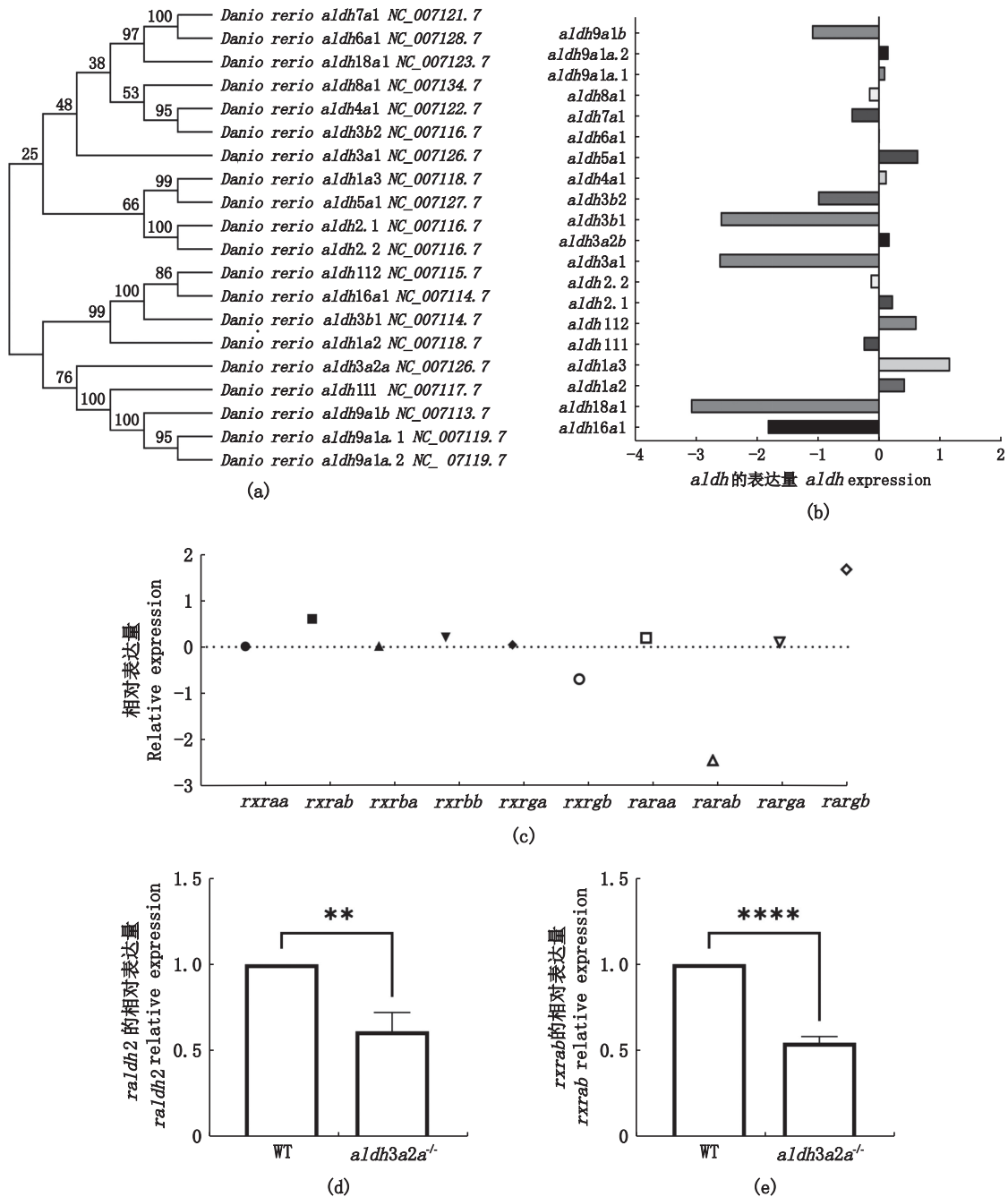
*RXRab* 显著下调(图 4e)。

### 3 讨论

本文研究了 *aldh3a2a* 在斑马鱼色素细胞中的作用及其对醛代谢和肝脏健康的潜在影响, 研究结果揭示了 *aldh3a2a* 在色素细胞发育中的重要性及其与各种生理过程的关联。

*aldh3a2a* 在斑马鱼色素细胞的发育中起着关键作用。与野生型斑马鱼相比, 敲除 *aldh3a2a* 导致突变体斑马鱼的黑色素细胞和黄色素细胞数量显著减少。此外, *mitfa*、*kit*、*tyrp1a*、*csf1ra* 等关键色素细胞标记基因的表达水平在突变体中下调, 表明色素细胞发育和色素合成受损<sup>[17]</sup>。这些发现表明 *aldh3a2a* 对斑马鱼色素细胞的正常形成和功能行使至关重要。转录组分析显示, 与野生型鱼相比, *aldh3a2a* 突变体斑马鱼皮肤组织中的基因表达谱发生了显著变化。值得注意的是, 与钾通道和类固醇生物合成途径相关的基因下调表明 *aldh3a2a* 可以通过这些途径调节染色质形成和类固醇激素合成。我们的结果表明 *aldh3a2a* 和 *aldh1a2* 之间存在关系, *aldh1a2* 在突变体中显著下调。 *aldh1a2* 参与视黄酸代谢, 数据表明 *aldh1a2* 表达降低可能影响视黄酸受体 (RAR 和 RXR) 信号通路<sup>[16]</sup>, 具体来说, *RXRab* 的下调表明 *aldh3a2a* 可能通过调节视黄酸信号来调节色素细胞的发育, 最终影响色素沉着<sup>[18]</sup>。GO 和 KEGG 富集分析显示, *aldh3a2a* 敲除后, 各种生物过程和途径发生了显著变化。值得注意的是, 与细胞周期、DNA 修复和类固醇生物合成相关的途径受到了显著影响。这些发现提供了对 *aldh3a2a* 在色素细胞发育以外的细胞过程中更广泛的影响的见解。

已知 *aldh3a2a* 参与长链脂肪醛的代谢<sup>[10]</sup>, 这是各种细胞进程的副产物。研究证实, 敲除 *aldh3a2a* 会导致该基因在转录水平下调。这种下调导致醛的积累, 这可能对细胞产生不利影响, 包括 DNA 损伤和脂质变性。在斑马鱼中观察到的肝脏异常, 如肝脏肿大和圆形空泡的存在, 进一步证明了 *aldh3a2a* 在防止醛诱导的细胞损伤中的重要性。



(a) *aldh* 基因家族进化发育树; (b) *aldh3a2a* 缺失对 *aldh* 家族基因的影响; (c) *aldh3a2a* 缺失对视黄酸受体 (RXR 和 RAR) 基因的影响; (d) 视黄醛脱氢酶基因 *raldh2* 的表达; (e) 视黄酸受体基因 *rxrab* 的表达; WT. 野生型斑马鱼; *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>. *aldh3a2a* 纯合突变体; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

(a) *aldh* gene family evolution and development tree; (b) Effects of *aldh3a2a* deletion on *aldh* family genes; (c) Effects of *aldh3a2a* deletion on retinoic acid receptor (RXR and RAR) genes; (d) Expression of retinal dehydrogenase gene *raldh2*; (e) Expression of retinoic acid receptor gene *rxrab*; WT. Wild-type zebrafish; *aldh3a2a*<sup>-/-</sup>. A homozygous mutant strain of zebrafish; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

图4 分子进化中 *aldh* 家族基因分析

Fig. 4 Gene analysis of *aldh* family in molecular evolution

斑马鱼中 *aldh3a2a* 基因的研究对于理解其在人类中的同源基因及其相关疾病具有更广泛的意义。在人类中, *aldh3a2* 突变与 Sjögren-Larsson 综合征 (SLS) 有关, 这是一种罕见的遗传疾病, 以鱼鳞病、痉挛性截瘫、智力残疾、癫痫发

作和视网膜病变为特征<sup>[11]</sup>。本研究使用的斑马鱼模型具有 *aldh3a2a* 基因敲除, 并表现出令人联想到 SLS 的表型特征, 如皮肤异常<sup>[10]</sup>和脂质代谢改变<sup>[19]</sup>。这表明我们的斑马鱼模型可以为进一步研究 SLS 的分子机制和潜在的治疗干预提供



有价值的工具。总之,研究证明了 *aldh3a2a* 在斑马鱼色素细胞发育中的关键作用及其对醛代谢、肝脏健康和人类遗传疾病的潜在影响。进一步研究 *aldh3a2a* 影响色素细胞发育和细胞过程的机制,将有助于更深入地了解其在斑马鱼和人类中的功能和潜在的治疗靶点。

#### 参考文献:

- [1] 李欢, 桑卫国, 段青源, 等. 鱼类体色成因及调控研究进展[J]. 海洋科学, 2014, 38(8): 109-115.  
LI H, SANG W G, DUAN Q Y, et al. Advance of fish color mechanism and its regulation [J]. Marine Sciences, 2014, 38(8): 109-115.
- [2] SHAO C W, BAO B L, XIE Z Y, et al. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry [J]. Nature Genetics, 2017, 49(1): 119-124.
- [3] 廖永冠, 李育媚, 鲍宝龙. *opn1lw2* 基因在红光诱导斑马鱼皮肤色素细胞形成中的作用[J]. 动物学杂志, 2021, 56(4): 608-616.  
LIAO Y G, LI Y M, BAO B L. The role of *opn1lw2* in the Formation of skin pigment cells in Zebrafish (*Danio rerio*) under Red Irradiation [J]. Chinese Journal of Zoology, 2021, 56(4): 608-616.
- [4] 邱超达, 鲍宝龙. 紫光对斑马鱼皮肤黑色素细胞数量及相关基因表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(1): 1-10.  
QIU C D, BAO B L. Effects of UV illumination on number of melanocytes and expression of related genes in *sus1* mutant zebrafish [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31(1): 1-10.
- [5] LE MAIRE A, TEYSSIER C, BALAGUER P, et al. Regulation of RXR-RAR heterodimers by RXR- and RAR-specific ligands and their combinations[J]. Cells, 2019, 8(11): 1392.
- [6] GHYSELINCK N B, DUESTER G. Retinoic acid signaling pathways[J]. Development, 2019, 146(13): dev167502.
- [7] WIDJAJA-ADHI M A K, GOLCZAK M. The molecular aspects of absorption and metabolism of carotenoids and retinoids in vertebrates [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2020, 1865(11): 158571.
- [8] BRUNSDON H, BROMBIN A, PETERSON S, et al. Aldh2 is a lineage-specific metabolic gatekeeper in melanocyte stem cells[J]. Development, 2022, 149(10): dev200277.
- [9] YUSUF R Z, SAEZ B, SHARD A, et al. Aldehyde dehydrogenase 3a2 protects AML cells from oxidative death and the synthetic lethality of ferroptosis inducers[J]. Blood, 2020, 136(11): 1303-1316.
- [10] RIZZO W B, S'AULIS D, DORWART E, et al. Sjögren-Larsson syndrome: a biochemical rationale for using aldehyde-reactive therapeutic agents [J]. Molecular Genetics and Metabolism Reports, 2022, 30: 100839.
- [11] NOJIRI K, FUDETANI S, ARAI A, et al. Impaired skin barrier function due to reduced  $\omega$ -O-Acylceramide levels in a mouse model of Sjögren-Larsson syndrome [J]. Molecular and Cellular Biology, 2021, 41(10): e00352-21.
- [12] MCMENAMIN S K, BAIN E J, MCCANN A E, et al. Thyroid hormone-dependent adult pigment cell lineage and pattern in zebrafish [J]. Science, 2014, 345(6202): 1358-1361.
- [13] PATTERSON L B, BAIN E J, PARICHY D M. Pigment cell interactions and differential xanthophore recruitment underlying zebrafish stripe reiteration and *Danio* pattern evolution[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5299.
- [14] FROHNHÖFER H G, KRAUSS J, MAISCHEIN H M, et al. Iridophores and their interactions with other chromatophores are required for stripe formation in zebrafish [J]. Development, 2013, 140(14): 2997-3007.
- [15] COOPER C D, ERICKSON S D, YIN S, et al. Protein kinase a signaling inhibits iridophore differentiation in zebrafish [J]. Journal of Developmental Biology, 2018, 6(4): 23.
- [16] PITTLIK S, BEGEMANN G. New sources of retinoic acid synthesis revealed by live imaging of an Aldh1a2-GFP reporter fusion protein throughout zebrafish development [J]. Developmental Dynamics, 2012, 241(7): 1205-1216.
- [17] PARICHY D M. Evolution of danio pigment pattern development[J]. Heredity, 2006, 97(3): 200-210.
- [18] NILSSON SKÖLD H, ASPENGREN S, WALLIN M. Rapid color change in fish and amphibians - function, regulation, and emerging applications[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2013, 26(1): 29-38.
- [19] WARRACK S, LOVE T, RIZZO W B. A neurodegenerative phenotype associated with Sjögren-Larsson syndrome [J]. Journal of Child Neurology, 2021, 36(11): 1011-1016.

## Role of *aldh3a2a* on the body color formation in zebrafish

LU Peiyu<sup>1,2</sup>, FENG Yidong<sup>1,2</sup>, BAO Baolong<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** This study investigated the significance of *aldh3a2a* in zebrafish pigment cell development and its impact on aldehyde metabolism and liver health. Using CRISPR/Cas9 technology, we successfully generated *aldh3a2a* knockout homozygous mutant lineages, resulting in reduced numbers of melanocytes, xanthophores and iridophores, *csf1ra*, *pnp4a* and *itk* were downregulated, and key genes in the melanin synthesis pathway, including *mitfa*, *tyrp1b* and *kita*, were also downregulated. Transcriptome analysis revealed changes in gene expression profiles, with downregulation of differential genes *scd*, *lpla* and *aox5* in the steroid biosynthesis pathway, indicating the critical role of *aldh3a2a* in steroid biosynthesis. Transcriptomic analysis and qPCR combined study on the retinol metabolism pathway revealed that *aldh3a2a* can regulate *raldh2*, *rxrab* and *aox5*, indicating its certain influence on the signaling transduction of retinoic acid receptors. Additionally, *aldh3a2a* can regulate potassium channel protein *kcns3b*, suggesting its association with melanocyte function and potassium ion signaling. GO and KEGG enrichment analysis found widespread effects on pathways such as the cell cycle, homologous recombination, RNA degradation, RNA transport, p53 signaling pathway, eukaryotic ribosome biogenesis, DNA replication, base excision repair, aminoacyl-tRNA biosynthesis, cytoplasmic DNA sensing pathway, steroid biosynthesis, mismatch repair, steroid hormone biosynthesis, and aldarate metabolism in the mutant. Moreover, knockout of the *aldh3a2a* gene leads to significant accumulation of aldehydes in the body, causing cytotoxicity and resulting in abnormal enlargement of the liver, appearance of vacuoles within the liver, and characteristic weight gain, resembling symptoms of Sjögren-Larsson syndrome. This reveals the role of *aldh3a2a* in zebrafish and its relevance to human genetic diseases, which will contribute to a deeper understanding of its function and potential therapeutic targets in both zebrafish and humans.

**Key words:** *aldh3a2a* gene knockout; pigment cell; retinol metabolic pathway; retinoic acid metabolism