



唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因克隆及其在肌间刺骨化过程中的表达

陈洁¹, 吕耀平^{1*}, 戴庆敏¹, 张乐², 杨露莹¹

(1. 丽水学院生态学院, 浙江 丽水 323000;

2. 丽水学院医学与健康学院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 在脊椎动物中存在着 2 种 *twist* 基因, 即 *twist1* 和 *twist2*, 二者对骨骼的发育具有调控作用。为探究唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 与肌间刺骨化的相关性, 实验克隆得到了唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因 cDNA 序列。氨基酸序列比对结果显示, 唇鲮 TWIST1 和 TWIST2 与其他鱼类保守性较高, 都具有螺旋-环-螺旋 (HLH) 结构域和色氨酸-精氨酸 (WR) 结构域。系统进化树分析表明, 唇鲮 TWIST1 和 TWIST2 与斑马鱼亲缘关系最为接近。通过荧光定量 PCR 检测发现唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因在所有被检测的组织中均有表达, *twist1* 在脑中的表达量最高, 心脏中次之, 在脾脏中表达量最低。*twist2* 在皮肤和鳃中的表达量较高, 在脾脏中的表达量最低。此外, *twist1* 和 *twist2* 基因的表达量在肌间刺骨化的 4 个关键阶段发生显著变化。研究表明, *twist* 基因与肌间刺骨化有一定的相关性。本研究首次在经济鱼类中克隆得到了 *twist* 基因, 并揭示了 *twist* 基因与肌间刺骨化的相关性。研究结果将为进一步调查鱼类 *twist* 基因功能以及肌间刺形成的分子机制提供基础数据。

关键词: 唇鲮; *twist*; 基因表达; 肌间刺; 骨化

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

唇鲮 (*Hemibarbus labeo*) 属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鮡亚科 (Gobioninae) 鲮属 (*Hemibarbus*), 淡水底栖鱼类, 生活在溪流中, 以水生昆虫为食, 主要分布于中国东部、日本以及韩国。和其他鲤科鱼类一样, 唇鲮也具有很多肌间刺^[1-2]。肌间刺是位于椎骨两侧肌肉中的膜性硬骨, 由肌隔结缔组织不经软骨直接骨化而成^[3-4]。肌间刺的发生起始于间叶细胞, 由间叶细胞转变成为成骨细胞^[5]。肌间刺的存在影响了鱼类的食用和深加工。研究肌间刺的形态发生及其潜在的分子机制将有助于找到消除肌间刺的方法。

目前为止, 唇鲮^[2]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[3]、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)^[6]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[7]、淇河鲫 (*Carassius auratus*)^[8]、黄河鲤 (*Cyprinus carpio haematopterus*)^[9] 和合方鲫 (*C. auratus cuvieri* × *C. auratus* var. *red*)^[10] 等个体发育过程中的肌间刺形态发生被相继报道, 发现鲤形目鱼类肌间刺骨化模式是从尾部向躯体前部依次骨化, 各种形态的肌间刺都是从最简单的 I 形发展而来的^[2-3,6-10]。同时, 上述鱼类肌间刺的骨化都是在主轴骨骼及附肢骨骼完成之后开始的。

国内外关于鱼类肌间刺发生的分子机制方

收稿日期: 2019-09-22 修回日期: 2020-05-23

资助项目: 浙江省自然科学基金 (Y3110477); 丽水市高层次人才培养资助项目 (2018RC01)

第一作者: 陈洁 (照片), 从事水产分子生物学研究, E-mail: jchen@lsu.edu.cn

通信作者: 吕耀平, E-mail: yplv@lsu.edu.cn



面的研究报道十分有限。2015年本研究团队首次报道了一个肌间刺发生相关基因 (*muscle segment homeobox-C*, *msx-C*)^[11]。也有学者报道肌间刺的骨化与硬化蛋白基因 (*sclerostin*、*sost*) 相关^[8]；另有学者报道骨形态发生蛋白家族基因 (*bone morphogenetic protein*, *bmp*) 可能与肌间刺的形成、分布和维持相关^[12-13]。肌间刺作为一种膜性硬骨，在进化上，其发生应该与高等脊椎动物的膜性硬骨的发生是同源的，因此可以参考高等脊椎动物膜性硬骨发生的机理，来进行鱼类肌间刺发生机理的研究。高等脊椎动物硬骨发育的分子信号调控途径，在斑马鱼上也证明比较保守，已知 *msx-C*、*bmp2* 和 *twist* 等基因参与硬骨骨化的各个过程^[14]。

新近，本研究团队在唇鲮肌肉转录组中发现了 *twist1* 和 *twist2* 基因 cDNA 序列。TWIST 蛋白是高度保守的碱性螺旋-环-螺旋 (*helix-loop-helix*, HLH) 家族中的转录因子^[15-16]。在脊椎动物中存在着两种 *twist* 基因，即 *twist1* 和 *twist2* 基因^[17-18]。*twist1* 和 *twist2* 基因对骨骼的发育具有调控作用^[19]。*twist1* 基因可以抑制间叶细胞向成骨细胞转变，例如用二甲双胍抑制 *twist1* 的表达，可以促进间叶细胞向成骨细胞的分化^[20]。*twist1* 基因也可以通过引导颅神经脊细胞的迁移分化调控颅骨发育^[21]。*twist2* 基因在成骨细胞中表达，可反向调控成骨细胞的分化^[22]。此外，*twist2* 基因与间叶细胞分化成结缔组织具有一定的相关性^[23]。综上，推测 *twist* 基因的表达与肌间刺的发生可能存在负相关性。为明确 *twist* 基因与肌间刺发生的相关性，本研究将克隆唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因，确定二者在不同组织中的表达情况及其与肌间刺骨化之间的关联，为唇鲮及其他鲤科鱼类肌肉品质改良、肌间刺形成分子机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

唇鲮仔、稚鱼样本取自浙江丽水学院实训基地的鱼类良种场。从受精后 29 d 开始，每隔 3 d 取样 1 次，一直取到 62 d。用 4% 多聚甲醛固定，室温存放，用于茜素红染色。取仔、稚鱼尾部肌肉固定于 RNA 样本保存液，存放于 -20 °C，用于检测 *twist* 基因与肌间刺骨化的相关性。此

外，取唇鲮成鱼健康组织 (肝脏、肾脏、脾脏、鳃、心脏、脑、肌肉、皮肤、肠) 固定于 RNA 样本保存液，存放于 -20 °C，用于检测 *twist* 基因组织差异表达。

1.2 唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因 cDNA 克隆及序列分析

唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因 cDNA 序列来自唇鲮肌肉转录组，通过 RT-PCR 结合测序验证 cDNA 序列的真实性。首先使用 RNAiso 提取唇鲮肌肉组织总 RNA，利用 AMV 反转录酶反转录获得 cDNA 第一链，随后进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳检测，切胶回收后将 PCR 产物连接于线性化 pGEM-T 载体，转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞，经蓝白斑筛选后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。使用 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线软件查找开放阅读框；使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测编码蛋白的理化性质；使用 ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) 在线软件进行多序列比对；利用 MEGA 7.0 软件采用邻接法构建系统进化树，1 000 次 Bootstraps，其他参数均使用默认值。

1.3 茜素红染色

为了验证唇鲮肌间刺骨化的 4 个关键时期，根据柯中和等^[6]的方法进行茜素红染色。用超纯水漂洗 4% PFA 固定的标本 3 次，每次 30 min；样本浸泡在 1% KOH 中，滴加少许 H₂O₂，强光下照射去除色素；样本浸泡于胰蛋白酶消化液 [100 mL 体系：65 mL ddH₂O、35 mL 饱和硼酸钠盐 (Na₂B₄O₇·10 H₂O) 上清液、1 g 胰蛋白酶] 中消化，直至头部肌肉组织透明；用 1% KOH 漂洗几次后浸泡在该溶液中，滴加几滴茜素红溶液 (1 g 茜素红溶于 100 mL 0.5% KOH) 直至变成深红色，染色过夜。依次经过 1% KOH : 甘油 (比例：3 : 1、1 : 1、1 : 3，各浸泡 24 h)，最后保存于加有少许麝香草酚的甘油中。

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

利用 RT-qPCR 检测唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因的表达量，用 RNAiso 抽提样本总 RNA，DNase I 处理总 RNA，利用 AMV 反转录酶反转录获得 cDNA 第一链。使用 BioRad CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 系统进行 RT-qPCR，反应体系：SYBR

Premix Ex Taq(2×) 缓冲液 12.5 μL, cDNA 模板 0.5 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 以 ddH₂O 补足至 25 μL。反应程序: 94 °C 预变性 300 s; 95 °C 30 s,

60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。RT-qPCR 检测结果使用 2^{-ΔΔC_t} 方法分析^[24]。以唇鲮 18S *rRNA* 作为内参基因, 所用引物见表 1。每个样品重复 4 次。

表 1 引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide primers used in this study

名称 primers	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 application
<i>twist1</i> -t(+)	CAGGAAGAACGGAGAGGACT	目的基因荧光定量引物
<i>twist1</i> -t(-)	CTGAGCTGTGCCGAGGGTAA	目的基因荧光定量引物
<i>twist2</i> -t(+)	TTTGCGCAAAATCATCCCCA	目的基因荧光定量引物
<i>twist2</i> -t(-)	TCCATCCTCCACCCGAAAA	目的基因荧光定量引物
18S <i>rRNA</i> -t(+)	AGAAACGGCTACCACATCCA	内参基因荧光定量引物
18S <i>rRNA</i> -t(-)	CCGAGATCCAACCTACGAGCT	内参基因荧光定量引物

注: +, 上游引物, - 下游引物

Notes: +, forward primer, -, reverse primer

1.5 数据分析

所有数据均以平均值±标准误表示。使用 IBM 公司 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因序列分析

唇鲮 *twist1* 基因 cDNA 序列 (GenBank 登录号: MN478415) 由 744 个核苷酸组成, 包含一个由 522 个核苷酸组成的开放阅读框, 可编码 173 个氨基酸。预测唇鲮 TWIST1 蛋白大小为 19.7 ku, 理论等电点为 7.67。唇鲮 *twist2* 基因 cDNA 序列 (GenBank 登录号: MN478416) 由 1 095 个核苷酸组成, 开放阅读框包含 495 个核苷酸, 可编码 164 个氨基酸。TWIST2 蛋白大小为 18.7 ku, 理论等电点为 9.48。多序列比对显示鱼类 TWIST1 和 TWIST2 保守性较高, 且二者都具有螺旋-环-螺旋结构域和色氨酸-精氨酸 (tryptophan-arginine, WR) 结构域 (图 1)。系统发育树分析显示唇鲮 TWIST1 和 TWIST2 与同为鲤科鱼类的斑马鱼的 TWIST1 和 TWIST2 最为接近 (图 2)。

2.2 唇鲮肌间刺在 4 个主要发育阶段的形态特征

为了验证唇鲮肌间刺骨化的 4 个关键阶段, 用茜素红对唇鲮进行整体骨骼染色 (图 3)。染色结果表明, 唇鲮尾部肌间刺骨化经历了 4 个阶段。

第 I 阶段: 孵化后 29 d (体长 17 mm), 除肌间刺外, 唇鲮所有主轴骨骼和附肢骨骼均已骨化完全 (图 3-a); 第 II 阶段: 孵化后 35 d (体长 21 mm), 尾部第 36~41 肌节出现 12 枚较短的肌间刺, 第 36 肌节处肌间刺长度约为 0.57 mm (图 3-b); 阶段 III: 孵化后 41 d (体长 24 mm), 尾部第 36~41 肌节肌间刺不再增多, 但是肌间刺仍继续向前部骨化, 第 36 肌节处肌间刺长度约为 0.81 mm (图 3-c); 第 IV 阶段: 孵化后 56 d (体长 30 mm), 尾部肌间刺数量不再发生变化, 此时肌间刺已具备成熟的形态, 第 36 肌节处肌间刺长度约为 1.26 mm (图 3-d)。与此同时, 肌间刺也从尾部到头部出现在整个鱼体内。

2.3 唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因组织差异表达

利用荧光定量 PCR 检测 *twist1* 和 *twist2* 基因在唇鲮成鱼不同组织中的表达情况, 结果显示, *twist1* 在脑中的表达量最高, 心脏中次之, 在脾脏中表达量最低。*twist1* 在脑中的表达量是在脾脏中的 4.5 倍。相对于 *twist1*, *twist2* 在不同组织间的表达量差异较大, *twist2* 在皮肤和鳃中的表达量较高, 在脾脏中的表达量最低, 在皮肤中的表达量是在脾脏中的 140.6 倍 (图 4)。

2.4 肌间刺骨化过程中 *twist1* 和 *twist2* 基因的表达

在肌间刺骨化的 4 个关键阶段, 检测了 *twist1* 和 *twist2* 基因的表达情况, 结果显示, *twist1*

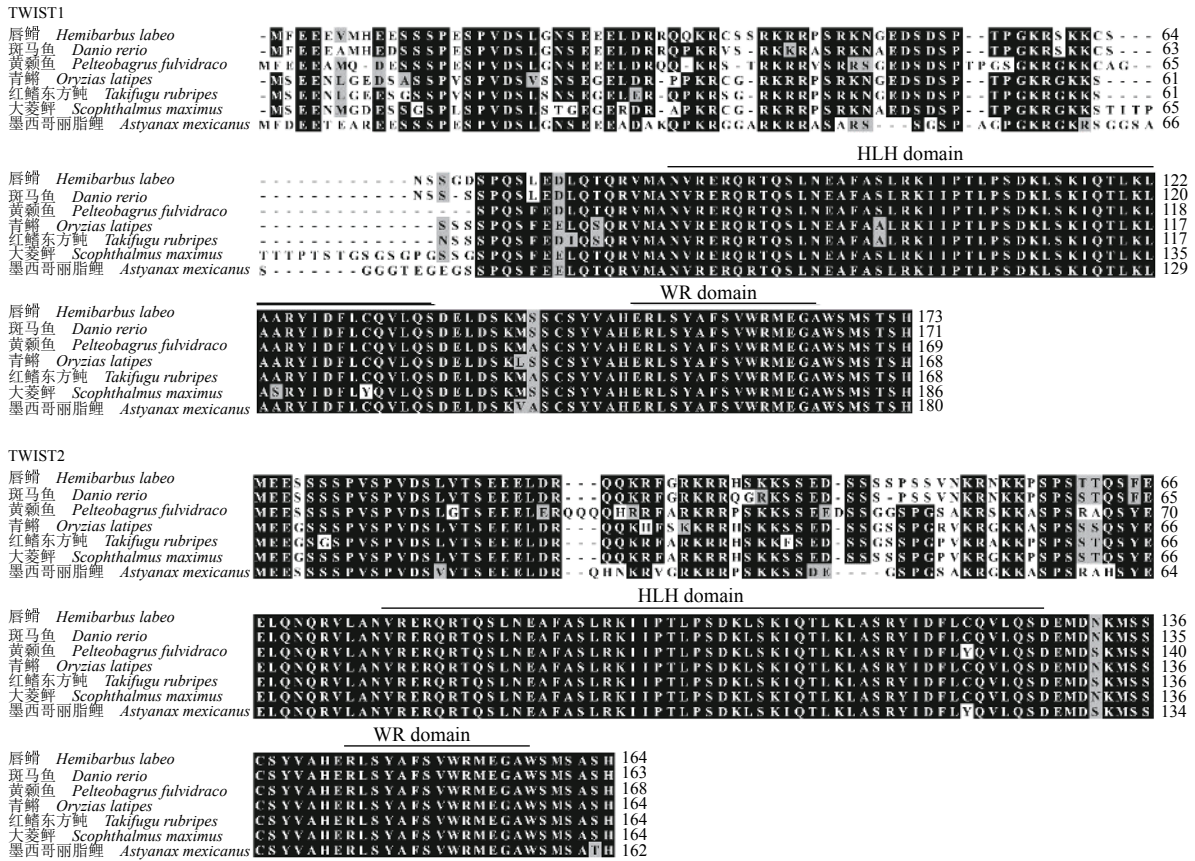


图 1 TWIST1 和 TWIST2 氨基酸序列比对

灰色表示相似氨基酸残基(阈值为 60%), 黑色表示相同氨基酸残基, 结构域标注于序列上方

Fig. 1 Multiple alignment of TWIST1 and TWIST2 sequences

The threshold for shading was 60%, similar residues are marked with a grey shadow, identical residues with a black shadow. The predicted domains are indicated above the alignment

基因随着肌间刺的发育, 表达量逐渐降低, 与阶段 I 比较, *twist1* 基因在阶段 III 和 IV 中的表达量显著降低, 此时肌间刺正在快速骨化。*twist2* 基因从阶段 I 到阶段 III 的表达量并未发生显著变化, 到了阶段 IV 其表达量才显著降低(图 5)。

3 讨论

为探究唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因与肌间刺发生的相关性, 本研究克隆得到了唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因 cDNA 序列。氨基酸序列分析结果显示, 唇鲮 TWIST1 和 TWIST2 都具有 HLH 和 WR 结构域。HLH 结构域功能通常涉及生长调控、骨骼、肌肉和神经发生^[25-26]。WR 结构域可与 RUNX2 蛋白互作^[27], RUNX2 蛋白是成骨细胞分化所必须的, 在骨骼发育早期, *twist1* 和 *twist2* 在 *runx2* 阳性的细胞内表达, TWIST 蛋白可迟滞

成骨细胞的分化, TWIST 蛋白不影响 *runx2* 的基因表达, 而是通过抑制 RUNX2 蛋白活性, 从而实现对成骨分化的调节^[28]。氨基酸序列比对结果显示鱼类 TWIST1 和 TWIST2 蛋白都含有高度保守的 HLH 和 WR 结构域。上述结果提示, TWIST1 和 TWIST2 蛋白可能在鱼类骨骼发育过程中扮演着重要角色。

通过荧光定量 PCR 检测发现唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因在所有被检测的组织中都有表达, *twist1* 在所检测组织中广泛分布, 其中在脑中的表达量最高, 心脏中次之, 在脾脏中表达量最低。相对于 *twist1*, *twist2* 基因主要在皮肤、鳃和肌肉中表达, 在其他组织中的表达量较低, 在皮肤中的表达量较高, 而在脾脏中的表达量最低。在斑马鱼胚胎中, 发现 *twist* 基因在头部神经嵴、生骨节和侧板中胚层均有表达^[29]。生骨节

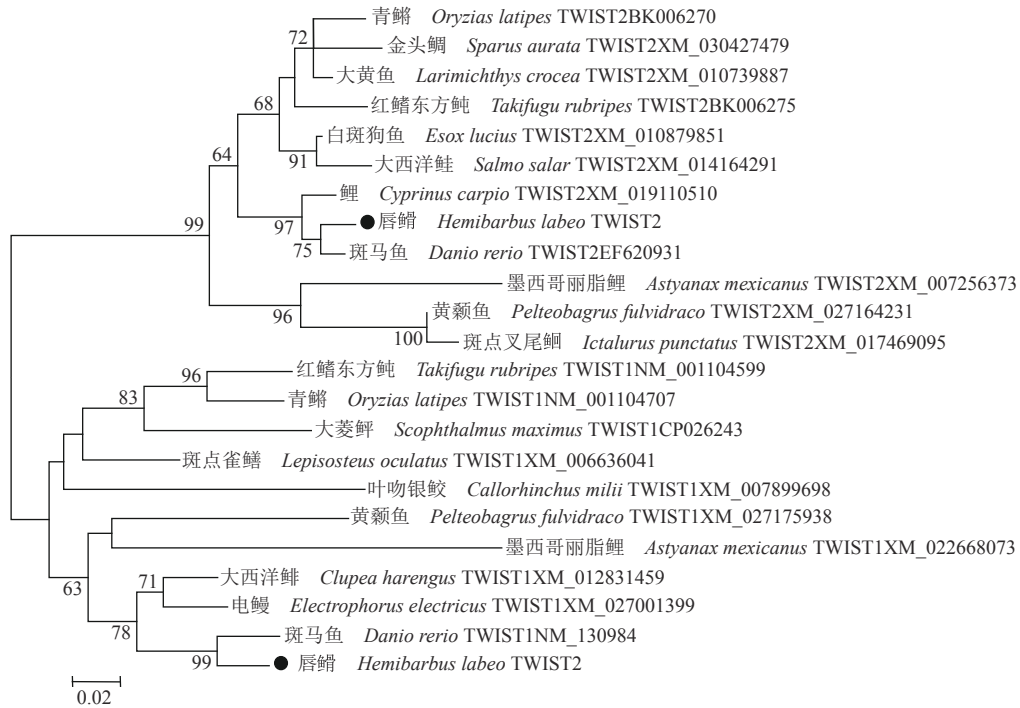


图 2 基于 TWIST1 和 TWIST2 蛋白氨基酸序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the complete amino acid sequences of the TWIST1 and TWIST2 proteins

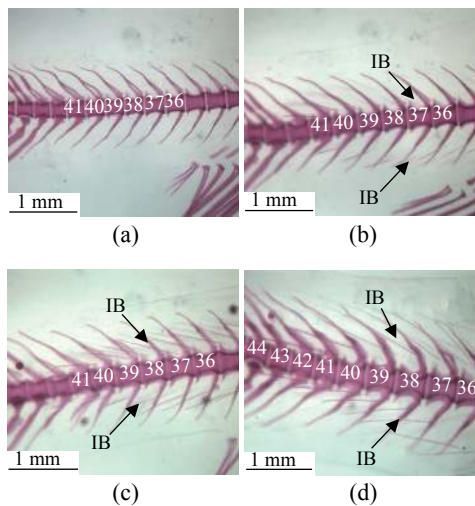


图 3 唇鲮肌间刺骨化的 4 个关键时期

(a) 阶段 I, 尾部肌间刺未出现; (b) 阶段 II, 尾部出现较短的肌间刺; (c) 阶段 III, 尾部肌间刺变长且增多; (d) 阶段 IV, 尾部的肌间刺骨化成最终形态; IB. 肌间刺

Fig. 3 Development characteristics of intermuscular bones in the four key development stages of *H. labeo*

(a) Stage I. the intermuscular bones haven't emerged; (b) Stage II. a few intermuscular bones of small length have emerged in the tail; (c) Stage III. more intermuscular bones of greater length gradually emerged in the tail; (d) Stage IV. all of the intermuscular bones in the tail have a mature morphology and length; IB. intermuscular bone

位于胚胎体节的腹侧正中, 生骨节围绕神经管和脊索形成脊椎骨。*twist* 基因在生骨节被检测到, 表明其在体节发生和成骨细胞形成过程中扮演着重要角色^[30]。此外, 在青鲮中敲除 *twist1* 基因, 生骨节细胞的迁移没有受到抑制, 而是抑制了生骨节细胞分化为成脊椎骨^[31]。上述结果共同证实了 *twist* 基因对于脊椎发生的必要性。本研究虽未检测 *twist* 基因在骨骼中的表达, 但是 *twist* 基因在肌肉中的表达也暗示着鱼类 *twist* 基因与骨骼发生的相关性。

在哺乳动物中, *twist* 基因对骨骼的发育调控作用已明确^[19]。*twist1* 可以调控间叶细胞向成骨细胞转变^[20]。*twist2* 与间叶细胞分化成结缔组织相关^[23]。这些功能与肌间刺骨化均有关联。因此, 实验检测了唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因在肌间刺骨化的 4 个关键时期的表达。结果显示, 随着肌间刺的骨化, 唇鲮 *twist1* 基因的表达量逐渐降低, 与阶段 I 比较, 在阶段 III 和 IV 的表达量显著降低, 此时肌间刺正处于快速骨化阶段。*twist2* 基因从阶段 I 到阶段 III 的表达量并没有发生显著变化, 到了阶段 IV 其表达量才显著降低, 表明 *twist2* 的调控晚于 *twist1*。此外, *twist* 基因对于肌间刺的形成都是负调控的, 在阶段 IV, *twist1* 和 *twist2* 均显著下调, 提示着二者在肌间刺发生

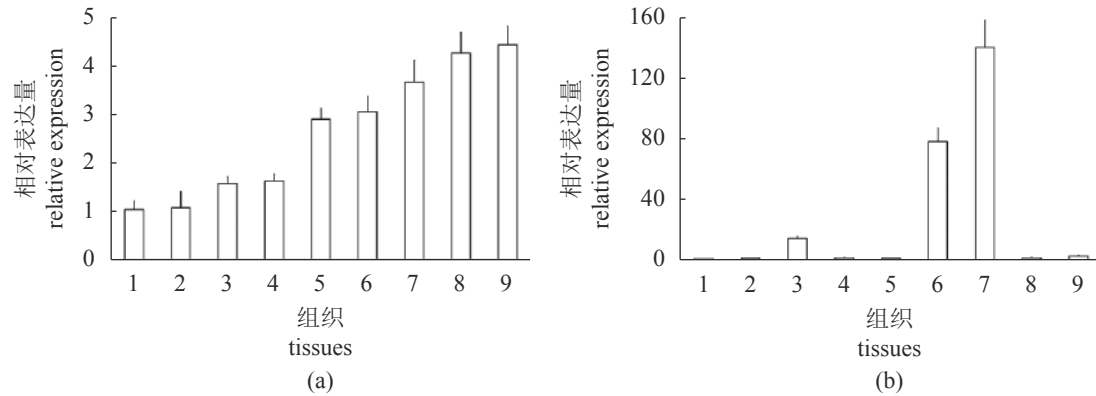


图 4 唇鲮 *twist1* (a) 和 *twist2* (b) 的组织差异表达分析

1. 脾脏, 2. 肾脏, 3. 肌肉, 4. 肠, 5. 肝脏, 6. 鳃, 7. 皮肤, 8. 心脏, 9. 脑

Fig. 4 Constitutive expression of *twist1* (a) and *twist2* (b) in different tissues of *H. laevis*

1. spleen, 2. kidney, 3. muscle, 4. intestine, 5. liver, 6. gill, 7. skin, 8. heart, 9. brain

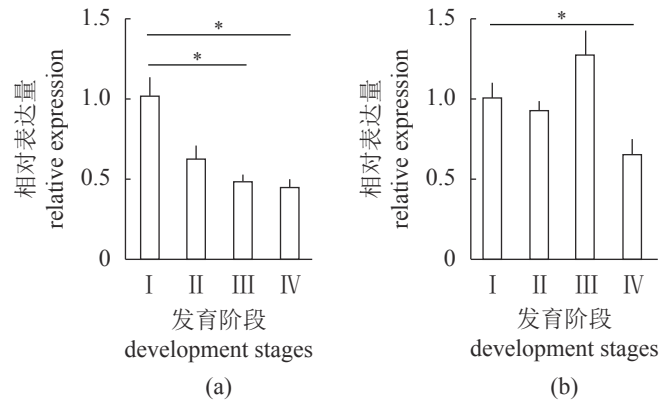


图 5 唇鲮 *twist1* (a) 和 *twist2* (b) 在肌间刺骨化不同阶段的表达

*. 两组间差异显著

Fig. 5 Temporal expression patterns of *twist1* (a) and *twist2* (b) during intermuscular bone development

*. significant difference between the two groups

过程中可能具有重叠的作用,也可能存在相互作用。二者功能重叠也体现在二者具有相似的结构域,即都具有 HLH 和 WR 结构域。另有研究发现,外源 *twist1* 可激活内源 *twist2* 的表达,外源 *twist2* 反过来可激活内源 *twist1* 的表达,表明二者相互作用^[28]。综上,提示 *twist* 基因与肌间刺骨化有一定的相关性。

综上,本研究克隆得到了唇鲮 *twist1* 和 *twist2* 基因 cDNA 序列,分析了其编码蛋白的氨基酸序列特征。基因表达分析显示 *twist1* 和 *twist2* 基因在肌肉等组织中表达,同时 *twist1* 和 *twist2* 基因的表达与肌间刺骨化存在一定的相关性。研究结果将为进一步调查鱼类 *twist* 基因功能以及肌间刺形成的分子机制提供基础数据。

<https://www.china-fishery.cn>

参考文献 (References):

- [1] Yang K F, Jiang W S, Wang X A, *et al.* Evolution of the intermuscular bones in the Cyprinidae (Pisces) from a phylogenetic perspective[J]. *Ecology and Evolution*, 2019, 9(15): 8555-8566.
- [2] 吕耀平, 陈洁, 鲍宝龙, 等. 唇鲮肌间小骨的骨化过程[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 549-553.
Lü Y P, Chen J, Bao B L, *et al.* The ossificational process of the intermuscular bones in *Hemibarbus laevis*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(4): 549-553(in Chinese).
- [3] Bird N C, Mabee P M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae)[J]. *Developmental Dynamics*, 2003, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 228(3): 337-357.
- [4] Danos N, Ward A B. The homology and origins of intermuscular bones in fishes: phylogenetic or biomechanical determinants?[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2012, 106(3): 607-622.
- [5] Brighton C T, Hunt R M. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 1991, 73(6): 832-847.
- [6] 柯中和, 张炜, 蒋燕, 等. 鲢肌间小骨发育的形态学观察[J]. *动物学杂志*, 2008, 43(6): 88-96.
Ke Z H, Zhang W, Jiang Y, *et al.* Developmental morphology of the intermuscular bone in *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, 43(6): 88-96(in Chinese).
- [7] 万世明, 易少奎, 仲嘉, 等. 团头鲂肌间骨发育的形态学观察[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(6): 1143-1151.
Wan S M, Yi S K, Zhong J, *et al.* Developmental and morphological observation of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1143-1151(in Chinese).
- [8] 田雪, 王良炎, 陈琳, 等. *SOST*基因在淇河鲫肌间骨骨化过程中的表达研究[J]. *水产学报*, 2016, 40(5): 673-680.
Tian X, Wang L Y, Chen L, *et al.* The mRNA and protein expression of gene *SOST* during ossification process of intermuscular bone in crucian carp (*Carassius auratus*) in Qihe River[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(5): 673-680(in Chinese).
- [9] 陈琳, 田雪, 米佳丽, 等. 黄河鲤肌间骨发育的形态学观察[J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(4): 481-489.
Chen L, Tian X, Mi J L, *et al.* Developmental and morphological study of intermuscular bones in *Cyprinus carpio haematopterus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(4): 481-489(in Chinese).
- [10] 王静, 张俏, 赵琼, 等. 合方鲫肌间骨骨化过程及形态学观察[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2017, 40(2): 39-43.
Wang J, Zhang Q, Zhao Q, *et al.* Ossification process and morphology of intermuscular bones in hybrids crucian carp[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2017, 40(2): 39-43(in Chinese).
- [11] Lv Y P, Yao W J, Chen J, *et al.* Newly identified gene *muscle segment homeobox C* may play a role in intermuscular bone development of *Hemibarbus labeo*[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(3): 11324-11334.
- [12] Zhang W Z, Lan T, Nie C H, *et al.* Characterization and spatiotemporal expression analysis of nine bone morphogenetic protein family genes during intermuscular bone development in blunt snout bream[J]. *Gene*, 2018, 642: 116-124.
- [13] Su S Y, Dong Z J. Comparative expression analyses of *bone morphogenetic protein 4 (BMP4)* expressions in muscles of tilapia and common carp indicate that *BMP4* plays a role in the intermuscular bone distribution in a dose-dependent manner[J]. *Gene Expression Patterns*, 2017, 27: 106-113.
- [14] Li N, Felber K, Elks P, *et al.* Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation[J]. *Developmental Dynamics*, 2009, 238(2): 459-466.
- [15] Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(6): 415-428.
- [16] Rosivatz E, Becker I, Specht K, *et al.* Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer[J]. *The American Journal of Pathology*, 2002, 161(5): 1881-1891.
- [17] Wolf C, Thisse C, Stoetzel C, *et al.* The *M-twist* gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus X-twi* and the *Drosophila twist* genes[J]. *Developmental Biology*, 1991, 143(2): 363-373.
- [18] Li L, Cserjesi P, Olson E N. Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis[J]. *Developmental Biology*, 1995, 172(1): 280-292.
- [19] Huang Y Y, Meng T, Wang S Z, *et al.* Twist1- and Twist2- haploinsufficiency results in reduced bone formation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99331.
- [20] Marofi F, Vahedi G, Solali S, *et al.* Gene expression of TWIST1 and ZBTB16 is regulated by methylation modifications during the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(5): 6230-6243.
- [21] Lenton K A, Nacamuli R P, Wan D C, *et al.* Cranial suture biology[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2005, 66: 287-328.
- [22] Tamura M, Noda M. Identification of DERMO-1 as a member of helix-loop-helix type transcription factors

- expressed in osteoblastic cells[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1999, 72(2): 167-176.
- [23] Lai W T, Krishnappa V, Phinney D G. Fibroblast growth factor 2 (Fgf2) inhibits differentiation of mesenchymal stem cells by inducing *Twist2* and *Spry4*, blocking extracellular regulated kinase activation, and altering Fgf receptor expression levels[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(7): 1102-1111.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Zeng Q, Wan Y, Zhu P, *et al.* The bHLH Protein Nulp1 is essential for femur development via acting as a cofactor in wnt signaling in *Drosophila*[J]. *Current Molecular Medicine*, 2017, 17(7): 509-517.
- [26] Jan Y N, Jan L Y. HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 827-830.
- [27] Bialek P, Kern B, Yang X L, *et al.* A twist code determines the onset of osteoblast differentiation[J]. *Developmental Cell*, 2004, 6(3): 423-435.
- [28] Zhang Y, Hassan M Q, Li Z Y, *et al.* Intricate gene regulatory networks of Helix-Loop-Helix (HLH) proteins support regulation of bone-tissue related genes during osteoblast differentiation[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 105(2): 487-496.
- [29] Germanguz I, Lev D, Waisman T, *et al.* Four *twist* genes in zebrafish, four expression patterns[J]. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(9): 2615-2626.
- [30] Renn J, Schaedel M, Volf J N, *et al.* Dynamic expression of *sparc* precedes formation of skeletal elements in the medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Gene*, 2006, 372: 208-218.
- [31] Yasutake J, Inohaya K, Kudo A. Twist functions in vertebral column formation in medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121(7-8): 883-894.

Molecular characterization of two *twist* genes in barbel steed (*Hemibarbus labeo*) and their relationship with intermuscular bone development

CHEN Jie¹, LÜ Yaoping^{1*}, DAI Qingmin¹, ZHANG Le², YANG Luying¹

(1. College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, China;

2. College of Medicine and Health, Lishui University, Lishui 323000, China)

Abstract: There are two *twist* genes in vertebrates, namely *twist1* and *twist2*, which have a regulatory effect on bone development. To explore the relationship between *twist1*, 2 and intermuscular bone development in barbel steed (*Hemibarbus labeo*), cDNAs of the *twist1* and *twist2* genes of *H. labeo* were cloned and sequenced. Sequence analysis revealed that *H. labeo* TWIST1 and TWIST2 were conserved in most of the teleosts, and they all had a helix-loop-helix (HLH) domain and a tryptophan-arginine (WR) domain. Phylogenetic tree analysis indicated that *H. labeo twist1* and *twist2* were closely related to that of zebrafish (*Danio rerio*). Expression of *twist1* and *twist2* transcripts were detected in all the tested tissues. *twist1* was the highest expressed in the brain, followed by the heart, and the lowest in the spleen. *twist2* had higher expression levels in skin and gill, and the lowest expression in spleen. The transcript levels of the *twist1* and *twist2* gene significantly changed during the four developmental stages of intermuscular bone development, suggesting that there is a certain correlation between *twist* genes and intermuscular bone development. This study, for the first time, cloned the *twist* genes in economic fish and revealed the correlation between *twist* genes and intermuscular bone development. The results will provide basic data for further investigation of *twist* gene function and its regulation role in intermuscular bone development.

Key words: *Hemibarbus labeo*; *twist*; gene expression; intermuscular bone; ossification

Corresponding author: LÜ Yaoping. E-mail: yplv@lsu.edu.cn

Funding projects: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Y3110477); Research Project of Lishui Science and Technology Bureau (2018RC01)