

# CAPN3靶向的细胞周期调控因子鉴定及其在消化器官发育和功能中的作用研究

王明韞<sup>1#</sup> 丁锋<sup>2#</sup> 苏保纯<sup>2</sup> 彭金荣<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江大学生命科学学院, 杭州 310058; <sup>2</sup>浙江大学动物科学学院, 杭州 310058)

**摘要** CAPN3是钙离子依赖的半胱氨酸蛋白酶calpain家族的成员。在斑马鱼中的研究发现, Capn3b(CAPN3同源蛋白)可被核仁蛋白Def招募至核仁以裂解p53、Chk1和Wee1等调控细胞周期的蛋白质, 进而调控肝脏发育和再生, 提示DEF-CAPN3/Def-Capn3b蛋白裂解途径在细胞周期调控中发挥重要作用。但是, CAPN3是否靶向其他细胞周期调控因子却不得而知。该研究利用体外酶活实验系统检测了人CAPN3(hCAPN3)对29个人细胞周期素和13个细胞周期相关因子的裂解情况, 最终鉴定出CCAR2、CCNL1、RBL1、RBL2 4个蛋白是hCAPN3的新底物。接着, 该研究利用CRISPR-Cas9技术针对这4个蛋白的编码基因分别构建了斑马鱼同源基因的突变体。通过利用肝脏、胰腺和肠道特异性探针进行原位杂交分析发现, *rbl1*基因敲除显著延缓斑马鱼肝脏发育, *rbl2*基因敲除显示出对肠道发育的潜在影响。虽然*rbl1*突变体可活可育, 但RNA-seq数据分析发现, 成鱼肝细胞代谢活性相关基因表达显著上调, 而昼夜节律和免疫应答等相关基因表达显著下调, 说明*rbl1*突变体肝脏功能发生紊乱。该研究成果拓展了对DEF-CAPN3/Def-Capn3b复合物在细胞周期调控中的功能及作用机制的认识。

**关键词** CAPN3; DEF; Rbl1; 细胞周期; 蛋白降解; 肝脏发育

## Identification of Cell Cycle Regulators Targeted by CAPN3 and Their Role in the Development and Function of Digestive Organs

WANG Mingyun<sup>1#</sup>, DING Feng<sup>2#</sup>, SU Baochun<sup>2</sup>, PENG Jinrong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

<sup>2</sup>College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract** CAPN3 is a member of the calcium-dependent cysteine protease family, calpains. Studies in zebrafish have revealed that Capn3b (a homolog of CAPN3) can be recruited by the nucleolar protein Def to the nucleolus, where it cleaves cell cycle regulatory proteins such as p53, Chk1, and Wee1, thereby regulating liver development and regeneration. This suggests that the DEF-CAPN3/Def-Capn3b proteolytic pathway plays a critical role in cell cycle regulation. However, whether CAPN3 targets other cell cycle regulators remains unknown. This study employed an *in vitro* enzymatic activity assay system to examine the cleavage of 29 human cyclins and 13 cell cycle-related factors by hCAPN3 (human CAPN3). This study identified four proteins—CCAR2, CCNL1, RBL1,

收稿日期: 2025-09-19 接受日期: 2025-10-29

国家自然科学基金(批准号: U21A20198)资助的课题

#共同第一作者

\*通信作者。Tel: 0571-88982233, E-mail: pengjr@zju.edu.cn

Received: September 19, 2025 Accepted: October 29, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.U21A20198)

#These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-571-88982233, E-mail: pengjr@zju.edu.cn

and RBL2—as novel substrates of hCAPN3. Subsequently, this study used CRISPR-Cas9 technology to generate zebrafish mutants for the homologous genes encoding these four proteins. *In situ* hybridization analysis with liver-, pancreas-, and intestine-specific probes revealed that knockout of *rbl1* significantly delayed liver development in zebrafish, while knockout of *rbl2* showed a potential impact on intestinal development. Although the *rbl1* mutants were viable and fertile, RNA-seq data analysis indicated significant upregulation of genes related to hepatocyte metabolic activity and significant downregulation of genes associated with circadian rhythm and immune response in adult fish, suggesting disrupted liver function in the *rbl1* mutants. These findings enhance the understanding of the functional roles and mechanisms of the DEF-CAPN3/Def-Capn3b complex in cell cycle regulation.

**Keywords** CAPN3; DEF; Rbl1; cell cycle; proteolysis; liver development

核仁作为细胞核内的核心亚细胞器,传统认知中其核心功能是负责核糖体生物发生<sup>[1-5]</sup>。然而,越来越多的研究发现核仁还直接参与调控细胞周期、DNA损伤修复、应激响应及细胞衰老等生物学过程<sup>[6]</sup>。例如,核仁定位的GTP酶BMS1可通过调控rDNA复制叉进程影响细胞周期<sup>[7]</sup>。在斑马鱼中的研究发现,消化器官扩张因子(digestive-organ expansion factor, Def)除了参与核糖体生成外,还招募半胱氨酸蛋白酶Capn3b进入核仁,在核仁中形成Def-Capn3b蛋白裂解通路来降解肿瘤抑制因子p53以调控肝脏发育<sup>[5]</sup>。目前,在斑马鱼中已知Def-Capn3b复合体的底物包括p53、Mpp10、Chk1和Wee1<sup>[5,8]</sup>。Def-Capn3b通过降解p53可避免细胞周期停滞<sup>[9]</sup>,切割Mpp10可调控核糖体小亚基(ribosomal small subunit, SSU)加工体组装<sup>[10]</sup>,而降解Chk1和Wee1则保障肝切除术后细胞周期再进入的同步性<sup>[8]</sup>。重要的是,进一步研究发现,人源DEF可与人源CAPN3形成DEF-CAPN3复合体,并且该复合体能够裂解人源p53。此外,本实验室通过截短突变实验明确,CAPN3的430—515 aa(86个氨基酸)肽段区域是其与DEF相互作用的关键区域,且其与斑马鱼Capn3b中对应的肽段(417—503 aa, 87个氨基酸)高度保守(68%同源性、84%相似性)<sup>[11]</sup>。这些结果不仅证明DEF-CAPN3复合体构成的核仁蛋白裂解通路在进化上的保守性,也说明其在调控细胞周期中的关键作用<sup>[5,11-12]</sup>。此外,小鼠中的研究发现核仁蛋白mDEF(mouse DEF)的肝脏特异性缺失可引发线粒体铜离子过度累积,并伴随p53与NRF1的异常激活,提示DEF还通过调控金属离子稳态和氧化应激反应参与肝脏代谢稳态维持<sup>[13]</sup>。

细胞周期的精确调控是器官发育与稳态维持的核心基础,其进程依赖细胞周期素(cyclins)、细胞周期素依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)及细胞周期负调控因子(如Rb家族蛋白)的协

同作用<sup>[8,14]</sup>。例如,特定的cyclin通过其保守的“cyclin box”结构与对应的CDK结合并激活其激酶活性,推动细胞从G<sub>1</sub>期向S期、G<sub>2</sub>期向M期过渡;而Rb家族蛋白(如pRb、p107/RBL1、p130/RBL2)则通过与E2F转录因子结合,抑制细胞周期相关基因的转录,从而阻滞G<sub>1</sub>/S期转换<sup>[15-16]</sup>。过往研究表明,细胞周期蛋白的动态平衡主要依赖泛素-蛋白酶体途径(如SCF复合体降解G<sub>1</sub>期细胞周期素、APC复合体降解M期细胞周期素),但DEF-CAPN3/Def-Capn3b通路作为非泛素依赖的蛋白降解途径,是否通过调控更多细胞周期相关因子参与消化器官发育,仍有待系统探究。

我们前期通过蛋白质组学分析发现,斑马鱼*capn3b*敲除突变体(*capn3b*<sup>A19A14</sup>)肝脏细胞核中多个细胞周期调节因子(如Ppm1g、Ddb2)显著上调,提示这些蛋白可能是Capn3b的潜在底物<sup>[8]</sup>,而细胞周期素作为细胞周期推进的关键因子,其是否受CAPN3的“预切割”调控以实现更快速的周转,也尚未有明确结论。为此,本研究首先着眼于前期通过对斑马鱼*capn3b*突变体的研究遴选出的13个细胞周期调控因子,同时从人类基因组中挖掘出29个人类细胞周期素基因,然后通过体外酶活实验筛选并鉴定CAPN3的新底物。之后,确定这些新底物在斑马鱼中的同源蛋白的编码基因,利用CRISPR-Cas9技术,构建这些基因的敲除突变体,通过整胚原位杂交(whole-mount *in situ* hybridization, WISH)分析这些基因对肝脏、胰腺、肠道等消化器官早期发育的影响,并重点探究影响肝脏发育的突变体,揭示其与Def-Capn3b通路的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒构建

通过PCR从人HEK293T细胞cDNA中扩增目的

基因, 并利用无缝克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司, C112)将其连接到带有Flag标签的

CS2

载体中。所有构建成功的质粒均通过测序验证。

### 1.2 细胞培养与转染

人HEK293T细胞使用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养基, 在37 °C、5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱中培养。使用PolyJet转染试剂(SignaGen Laboratories公司)将质粒转染细胞, 转染后24~48 h收取细胞进行后续实验。

### 1.3 体外酶活实验

简要描述实验流程: CAPN3(或者CAPN3<sup>C129S</sup>)与候选底物分别在HEK293T细胞中表达, 将蛋白酶组与底物组的细胞分别裂解, 然后将两组的细胞裂解液混合, 加入Ca<sup>2+</sup>启动反应, 于规定时间迅速加入足量EDTA终止反应。反应产物通过蛋白质免疫印迹(Western blot, WB)进行分析。实验使用hRYBP和p53<sup>R175H</sup>分别作为阳性和阴性对照。

鉴于CAPN3是一种极不稳定的蛋白质, 故为了确保体外酶活实验观察到的结果的可靠性, 本研究设置了如下“酶切判定标准”: (1) Tubulin蛋白在每个泳道中都清晰可见, 表明蛋白抽提成功; (2) 鉴于其自降解能力, 在反应时长为20 min的样品中CAPN3野生型蛋白的浓度相较于其在反应时长为0 min的样品中的浓度会有所降低, 且分子量比CAPN3<sup>C129S</sup>小, 提示CAPN3蛋白在酶活实验过程中处于有活性状态; (3) 作为阴性对照, 无酶活性缺乏自降解能力的CAPN3<sup>C129S</sup>的浓度在反应0 min和20 min之间无明显差别, 或其差别比CAPN3在两个时间点之间的差别小; (4) 每组酶活实验的阳性对照hRYBP在反应20 min时与反应0 min相比其蛋白浓度显著降低, 说明同组的CAPN3蛋白具有降解其候选蛋白的酶活性; (5) 每组酶活实验的阴性对照p53<sup>R175H</sup>蛋白的浓度在反应0 min和20 min之间没有明显差异, 说明同组的CAPN3蛋白对候选蛋白的降解是特异性的; (6) 以Tubulin为对照, 候选蛋白在用CAPN3或者CAPN3<sup>C129S</sup>孵育20 min后, 其蛋白水平的降低程度明显高于Tubulin的降低程度, 说明该候选蛋白可被CAPN3酶切; (7) 当候选蛋白在CAPN3组中反应20 min后, 产生了比全长底物质量小的条带, 即说明CAPN3酶切候选蛋白后形成了稳定的酶切产物。

### 1.4 斑马鱼突变体构建

针对斑马鱼*ccar2*、*ccn11b*、*rbl1*和*rbl2*基因设

计gRNA, 与Cas9蛋白形成核糖核蛋白(ribonucleo-protein, RNP)复合物后, 将其显微注射至野生型AB品系斑马鱼的单细胞期胚胎中。通过测序鉴定F0代鱼, 并通过测交获得F1代, 通过F1代杂交获得纯合突变F2代个体用于表型分析。

### 1.5 整胚原位杂交

利用各个基因的突变体F1代(杂合基因型+/-)的雌雄个体进行自交, 收集其后代F2代4 dpf(days post-fertilization)或5 dpf的斑马鱼幼体, 通过WISH检测其肝脏、胰腺及肠道的发育状态。实验采用以下探针: *fabp10a*(源自肝脏脂肪酸结合蛋白基因*fabp10a*, 标记肝脏)<sup>[17-18]</sup>; *fabp2*(源自肠道脂肪酸结合蛋白基因*fabp2*, 标记肠道)<sup>[18-19]</sup>; *trypsin*(源自胰腺特异性胰蛋白酶原基因*prss1*, 标记外分泌胰腺)<sup>[20]</sup>。

### 1.6 统计分析

所有数据均以平均值±标准误(mean±SEM)表示, 采用GraphPad Prism 10软件进行Student's *t*检验。*\*P*<0.05、*\*\*P*<0.01表示差异具有统计学显著性。

## 2 结果

### 2.1 用于CAPN3酶切筛选的42个细胞周期调控因子的遴选

基于前期对*capn3b*<sup>Δ19Δ14</sup>突变体肝脏术后再生的研究, 我们遴选了13个与细胞周期相关的蛋白质, 并检索出了其在人类中的同源蛋白, 分别是ATM、ATR、CCAR2、CDC42、CHK2、E2F1、MYT1、PLK1、RAD17、RAD1、RB1、RBL1、RBL2(表1)。此外, 我们计划确定CAPN3是否可以靶向某些细胞周期素, 从而使细胞对细胞周期素的调节更为迅捷和准确。为此, 我们将人基因组中所能检索到的29个细胞周期素也纳入了研究范畴。

我们首先利用CAPN3对底物的识别位点序列[LIMV]X(3,4) [LIMV]X(2)[LIMV][DE], 对所有42个蛋白是否含有潜在的CAPN3识别位点进行预测, 发现绝大部分蛋白含1个或以上的潜在的CAPN3识别位点(表1), 只有4个蛋白缺乏CAPN3识别位点。但由于CAPN3对底物的识别位点序列有其弹性和不确定性, 所以后续我们决定克隆对应于所有42个蛋白的人基因。

### 2.2 42个候选蛋白的编码基因的克隆与表达验证

根据表2和表3, 我们设计了对应于42个基因的特异性引物, 并利用从人HEK293T细胞中提取

表1 基于斑马鱼 *capn3b*<sup>A19A14</sup> 突变体研究筛选的13个细胞周期调控因子  
Table 1 Selected 13 cell cycle regulators based on studies of zebrafish *capn3b*<sup>A19A14</sup> mutants

| 蛋白质名称<br>Protein_ID | 总位点数<br>Total_hits | 起始位置—终止位置<br>Start position—end position                                                               |
|---------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ATM                 | 10                 | 510—520, 889—899, 922—932, 1554—1563, 2075—2085, 2146—2156, 2310—2320, 2658—2668, 2914—2924, 3012—3021 |
| ATR                 | 1                  | 44—54, 173—183, 193—203, 275—284, 399—409, 481—491, 549—558, 804—814, 827—836, 1613—1622, 1851—1861    |
| CCAR2               | 4                  | 320—330, 428—437, 694—704, 828—837                                                                     |
| CDC42               | 0                  | —                                                                                                      |
| CHK2                | 1                  | 461—470                                                                                                |
| E2F1                | 1                  | 19—29                                                                                                  |
| MYT1                | 3                  | 372—382, 1027—1036, 1070—1080                                                                          |
| PLK1                | 1                  | 545—554                                                                                                |
| RAD17               | 1                  | 104—114                                                                                                |
| RAD1                | 0                  | —                                                                                                      |
| RB1                 | 5                  | 75—85, 100—109, 199—209, 305—315, 541—551                                                              |
| RBL1                | 1                  | 550—559                                                                                                |
| RBL2                | 1                  | 581—590                                                                                                |

“—”表示总位点数为0, 因此“起始位置—终止位置”为空值。

“—” indicates that the total number of sites is zero; therefore, the “start position—end position” field is null.

的 mRNA 构建了 cDNA 文库, 然后利用 PCR 克隆了目的基因全长 cDNA。接着, 将全长 cDNA 克隆到带有 Flag 标签的表达载体 *pCS2+* 中。在构建候选蛋白表达质粒时, 有以下 11 个基因的表达质粒构建失败: *CCNF*、*CCNI2*、*CCNJL*、*CCNK*、*CCNL2*、*CCNP*、*CCNYL1*、*ATM*、*ATR*、*MYT1*、*RAD17*, 因此无法确认这些基因产物是否为 CAPN3 的底物。余下的构建成功的 31 个基因的表达质粒被用于体外酶切实验。

用表达 31 个候选蛋白的质粒、表达 CAPN3 以及酶活中心突变的 CAPN3<sup>C129S</sup> 的质粒分别转染 HEK293T 细胞, 培养指定时间 (CAPN3 和 CAPN3<sup>C129S</sup> 为 18 h; 31 个候选蛋白大部分为 24 h, 部分表达不佳的候选蛋白延长到 48 h) 后获得过表达蛋白的细胞裂解液后, 将表达候选蛋白的抽提液分别与 CAPN3 和 CAPN3<sup>C129S</sup> 蛋白抽提液孵育进行体外酶切反应。终止反应后利用 WB 检测酶切反应产物。在检测时, 我们发现 7 个候选蛋白未能表达, 分别是 *CCNC*、*CCNE2*、*CCNG1*、*CCNG2*、*CCNI*、*CCNT1*、*CCNT2*。成功表达的候选蛋白用于后续 CAPN3 酶切检测实验。

### 2.3 18 个候选蛋白未明确显示被 CAPN3 裂解

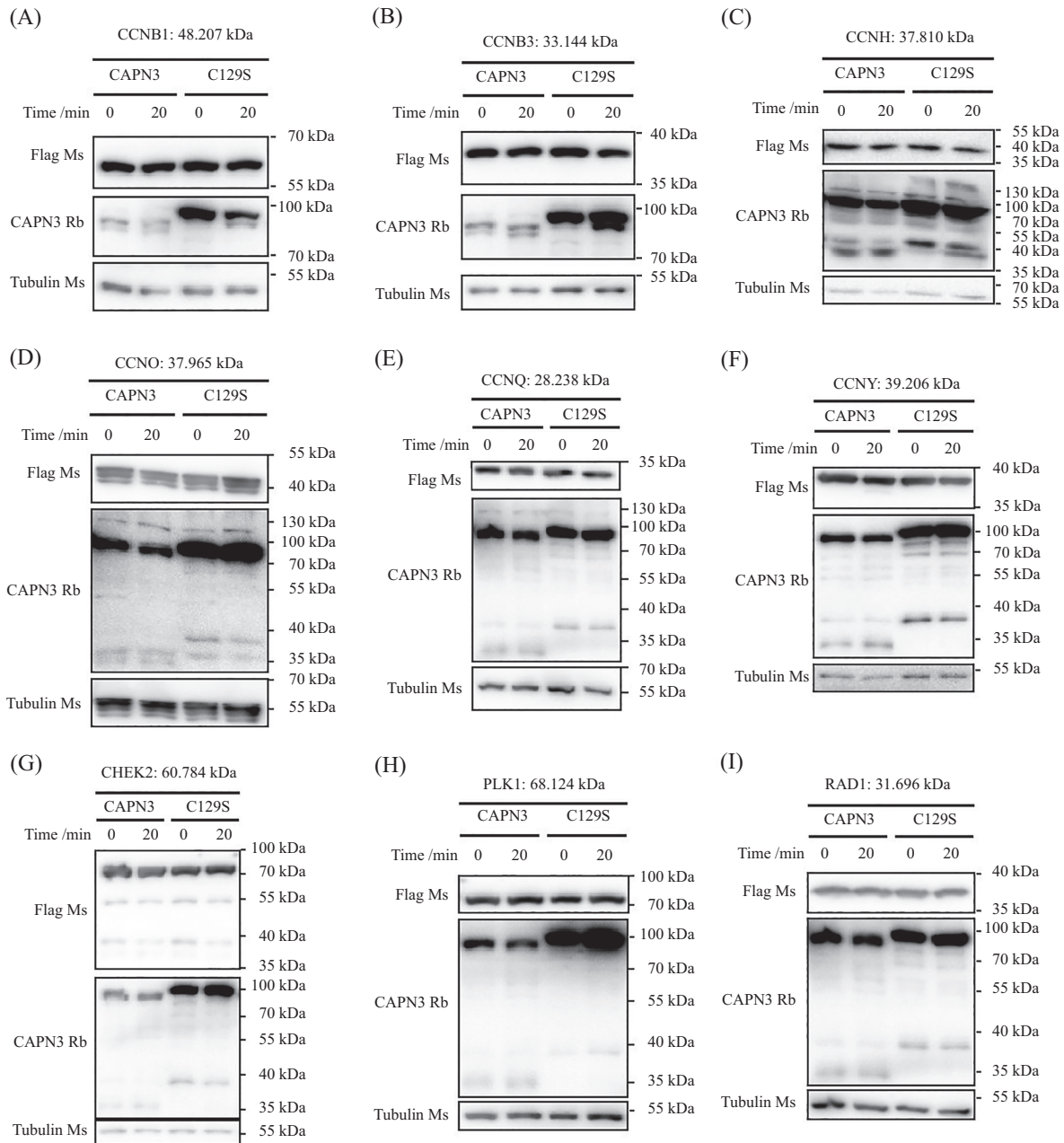
根据“1.3 体外酶活实验”提出的“酶切判定标准”, 我们发现 18 个候选蛋白, 尽管过表达成功, 但

它们无法在体外酶活实验中展现出显著的蛋白量降低, 或无法观测到酶切后的产物条带, 说明其无法或几乎无法被 CAPN3 酶切, 分别为: *CCNA1*、*CCNB1*、*CCNB2*、*CCNB3*、*CCND1*、*CCND2*、*CCND3*、*CCNE1*、*CCNH*、*CCNJ*、*CCNO*、*CCNQ*、*CCNY*、*CDC42*、*CHEK2*、*PLK1*、*RAD1*、*RB1* (图 1 和图 2)。

其中有 9 个候选蛋白, 在反应 20 min 后, Flag 抗体检测到其蛋白水平在 CAPN3 和 CAPN3<sup>C129S</sup> 两组之间无明显差异, 说明这些候选蛋白不与 CAPN3 或 CAPN3<sup>C129S</sup> 反应, 分别为: *CCNB1* (图 1A)、*CCNB3* (图 1B)、*CCNH* (图 1C)、*CCNO* (图 1D)、*CCNQ* (图 1E)、*CCNY* (图 1F)、*CHEK2* (图 1G)、*PLK1* (图 1H)、*RAD1* (图 1I)。

酶活实验结果显示, 有 5 个蛋白, 在反应 20 min 后, Flag 抗体检测到其在 CAPN3 组中的蛋白水平明显低于 CAPN3<sup>C129S</sup> 组, 且与 Tubulin 的减少量相比, 候选蛋白量的变化仍有意义。但与 CAPN3<sup>C129S</sup> 对照组对比, CAPN3 并没有切割更多的候选蛋白, 即该候选蛋白量的减少与 CAPN3 无关。这 5 个蛋白是 *CCNA1* (图 2A)、*CCNB2* (图 2B)、*CCNE1* (图 2C)、*CCNJ* (图 2D)、*CDC42* (图 2E)。

有 3 个蛋白, 也即 *CCND1* (图 2F)、*CCND2* (图 2G) 和 *CCND3* (图 2H), 在反应 20 min 后, Flag 抗体杂交的条带在 CAPN3 实验组中的减少量和 Tubulin 的

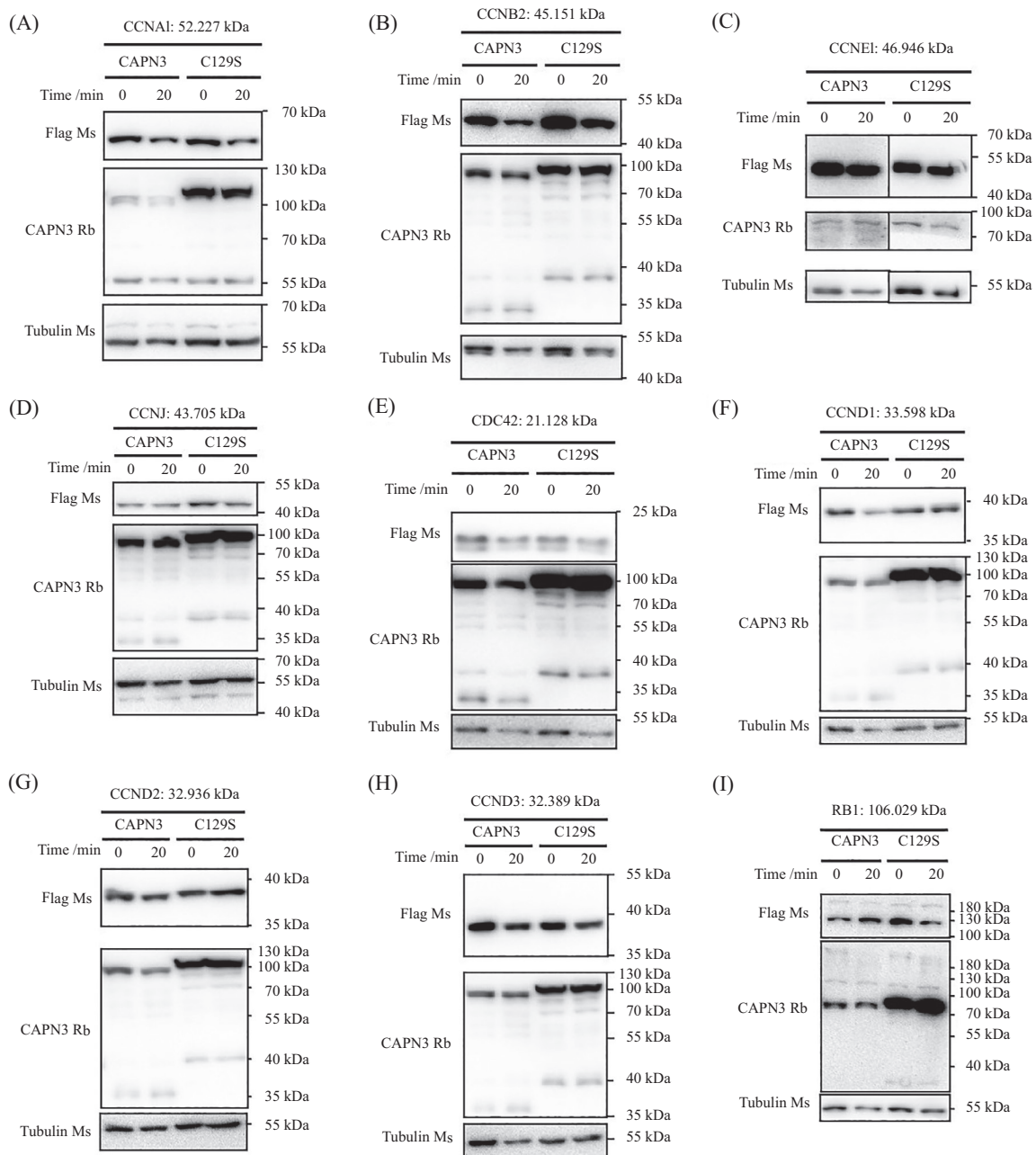


A~I: 分别为候选蛋白CCNB1、CCNB3、CCNH、CCNO、CCNQ、CCNY、CHEK2、PLK1、RAD1的蛋白质免疫印迹结果,各小图顶部标出了各个蛋白本身的预测分子量。图中的CAPN3表示进行酶活实验时,和候选蛋白混合的是具酶活性的野生型CAPN3;C129S表示进行酶活实验时,和候选蛋白混合的是不具酶活性的突变体CAPN3<sup>C129S</sup>。Time(min)表示进行酶活实验时的反应总时长,0表示未进行酶活实验就直接用于后续检测,20表示酶促反应的时间长度为20 min。各小图右侧的数字指示了对应位置的分子量,单位为kDa,左侧的Flag Ms、CAPN3 Rb、Tubulin Ms为抗体,Ms表示该抗体来源于小鼠(mouse),Rb则表示其来源于兔子(rabbit)。Flag Ms用于检测带有Flag标签的候选蛋白;CAPN3 Rb检测CAPN3和CAPN3<sup>C129S</sup>;Tubulin Ms检测Tubulin蛋白,并且Tubulin作为样本内参。

A-I: Western blot results of candidate proteins CCNB1, CCNB3, CCNH, CCNO, CCNQ, CCNY, CHEK2, PLK1, and RAD1, respectively. The predicted molecular weight of each protein is indicated at the top of each subfigure. In the figure, "CAPN3" indicates that the candidate protein was mixed with the enzymatically active wild-type CAPN3 during the enzyme activity assay; "C129S" indicates that the candidate protein was mixed with the enzymatically inactive mutant CAPN3<sup>C129S</sup> during the enzyme activity assay. "Time (min)" represents the total reaction duration of the enzyme activity assay: "0" indicates that the sample was directly used for subsequent detection without undergoing the enzyme activity assay, while "20" indicates that the enzymatic reaction lasted for 20 min. The numbers on the right side of each subfigure indicate the molecular weights at the corresponding positions, with units of kDa. The labels "Flag Ms", "CAPN3 Rb" and "Tubulin Ms" on the left side denote antibodies: "Ms" indicates that the antibody is derived from mouse, and "Rb" indicates that it is derived from rabbit. The Flag Ms antibody is used to detect the Flag-tagged candidate proteins, CAPN3 Rb is used to detect CAPN3 and CAPN3<sup>C129S</sup>, and Tubulin Ms is used to detect Tubulin protein. Tubulin serves as the loading control of the samples.

图1 过表达成功但无法或几乎无法被CAPN3酶切的候选蛋白的蛋白质免疫印迹结果-1

Fig.1 Western blot results of candidate proteins with successful overexpression but no or minimal cleavage by CAPN3 enzyme-1



A-I: 分别为候选蛋白CCNA1、CCNB2、CCNE1、CCNJ、CDC42、CCND1、CCND2、CCND3、RB1的蛋白质免疫印迹结果,各小图顶部标出了各个蛋白本身的预测分子量。图中的CAPN3表示进行酶活实验时,和候选蛋白混合的是具酶活性的野生型CAPN3; C129S表示进行酶活实验时,和候选蛋白混合的是不具酶活性的突变体CAPN3<sup>C129S</sup>。Time(min)表示进行酶活实验时的反应总时长,0表示未进行酶活实验就直接用于后续检测,20表示酶促反应的时间长度为20 min。各小图右缘的数字指示了对应位置的分子量,单位为kDa。图左缘的Flag Ms、CAPN3 Rb、Tubulin Ms为抗体,Ms表示该抗体来源于小鼠(mouse),Rb则表示其来源于兔子(rabbit)。Flag Ms用于检测带有Flag标签的候选蛋白; CAPN3 Rb检测CAPN3和CAPN3<sup>C129S</sup>; Tubulin Ms检测Tubulin蛋白,并且Tubulin作为样本内参。

A-I: Western blot results of candidate proteins CCNA1, CCNB2, CCNE1, CCNJ, CDC42, CCND1, CCND2, CCND3, and RB1, respectively. The predicted molecular weight of each protein is indicated at the top of each subpanel. In the figure, "CAPN3" indicates that the candidate protein was mixed with the enzymatically active wild-type CAPN3 during the enzyme activity assay; "C129S" indicates that the candidate protein was mixed with the enzymatically inactive mutant CAPN3<sup>C129S</sup> during the enzyme activity assay. "Time (min)" represents the total reaction duration of the enzyme activity assay: "0" indicates that the sample was directly used for subsequent detection without undergoing the enzyme activity assay, while "20" indicates that the enzymatic reaction lasted for 20 minutes. The numbers on the right edge of each subpanel indicate the molecular weights at the corresponding positions, with units in kDa. The labels "Flag Ms", "CAPN3 Rb", and "Tubulin Ms" on the left edge denote antibodies: "Ms" indicates that the antibody is derived from mouse, and "Rb" indicates that it is derived from rabbit. The Flag Ms antibody is used to detect the Flag-tagged candidate proteins, CAPN3 Rb is used to detect CAPN3 and CAPN3<sup>C129S</sup>, and Tubulin Ms is used to detect Tubulin protein. Tubulin serves as the loading control of the samples.

图2 过表达成功但无法或几乎无法被CAPN3酶切的候选蛋白的蛋白质免疫印迹结果-2

Fig.2 Western blot results of candidate proteins with successful overexpression but no or minimal cleavage by CAPN3 enzyme-2

减少量几乎相等。这说明该候选蛋白的减少并非由于CAPN3的作用,而大概率源于实验操作中的系统误差。有一个蛋白RBL1(图2I),在与CAPN3<sup>C129S</sup>反应后,蛋白量减少,而与CAPN3反应后,蛋白量反而增加,原因不明。

实验中,经Flag抗体杂交显示的底物蛋白条带,其蛋白分子量基本均会高于预测净分子量。这可能与实验中多个因素相关,例如:Flag标签及其附近序列对分子量的贡献;WB中最终显示的候选底物蛋白分子量大小可能会受到未知翻译后修饰等因素的影响,而该影响的强弱取决于候选底物蛋白的特质,因此不同候选底物蛋白在WB中显示的蛋白分子量与预测分子量的差别各异。

判定某候选底物蛋白无法被CAPN3酶切,需要观察完整数据。因为该体外酶活实验使用的是在细胞蛋白液中过表达的候选底物蛋白与酶蛋白,而在细胞中正常情况下即存在着其他酶,因此为了确定过表达的候选底物蛋白是由CAPN3酶切造成的结果,除了在CAPN3组反应后,候选底物蛋白的条带有减弱外,还要求其减弱程度必须强于该底物在CAPN3<sup>C129S</sup>组反应后的减弱程度。如CCNA1和CCNB2,其条带强度虽然在反应20 min后有所减弱,但减弱程度与该底物蛋白在CAPN3<sup>C129S</sup>组中的减弱程度相当,说明这并非CAPN3特异性酶切的结果。

## 2.4 6个候选蛋白可被CAPN3酶切

图3A和图3B为RBL1的两次代表性实验结果,在CAPN3的20 min泳道都能看到明确的切割后条带。图3G和图3H为E2F1的两次代表性实验结果,虽然在CAPN3的20 min泳道能够看到明确的切割后条带,但是在CAPN3<sup>C129S</sup>的20 min泳道也能看到,原因接下来陈述。CAPN3<sup>C129S</sup>是CAPN3在129位氨基酸位置的突变体。CAPN3是一种高活性的蛋白酶,其酶活的启动与作用机制很复杂。C129S突变并不能完全消除CAPN3的酶活,而只是创造了一个终极减弱版,其残存的微弱活性有时候仍会被检测到,但是这并不会影响对实验结果的解读。另外,该体外酶活实验使用的是细胞总蛋白抽提液,因此其他蛋白酶也可能降解候选底物蛋白。因此,在CAPN3和CAPN3<sup>C129S</sup>组之间,只要CAPN3展示出了对候选底物蛋白更强的酶活切割、降解能力,即可证明CAPN3对候选底物蛋白的特异性酶切作用。

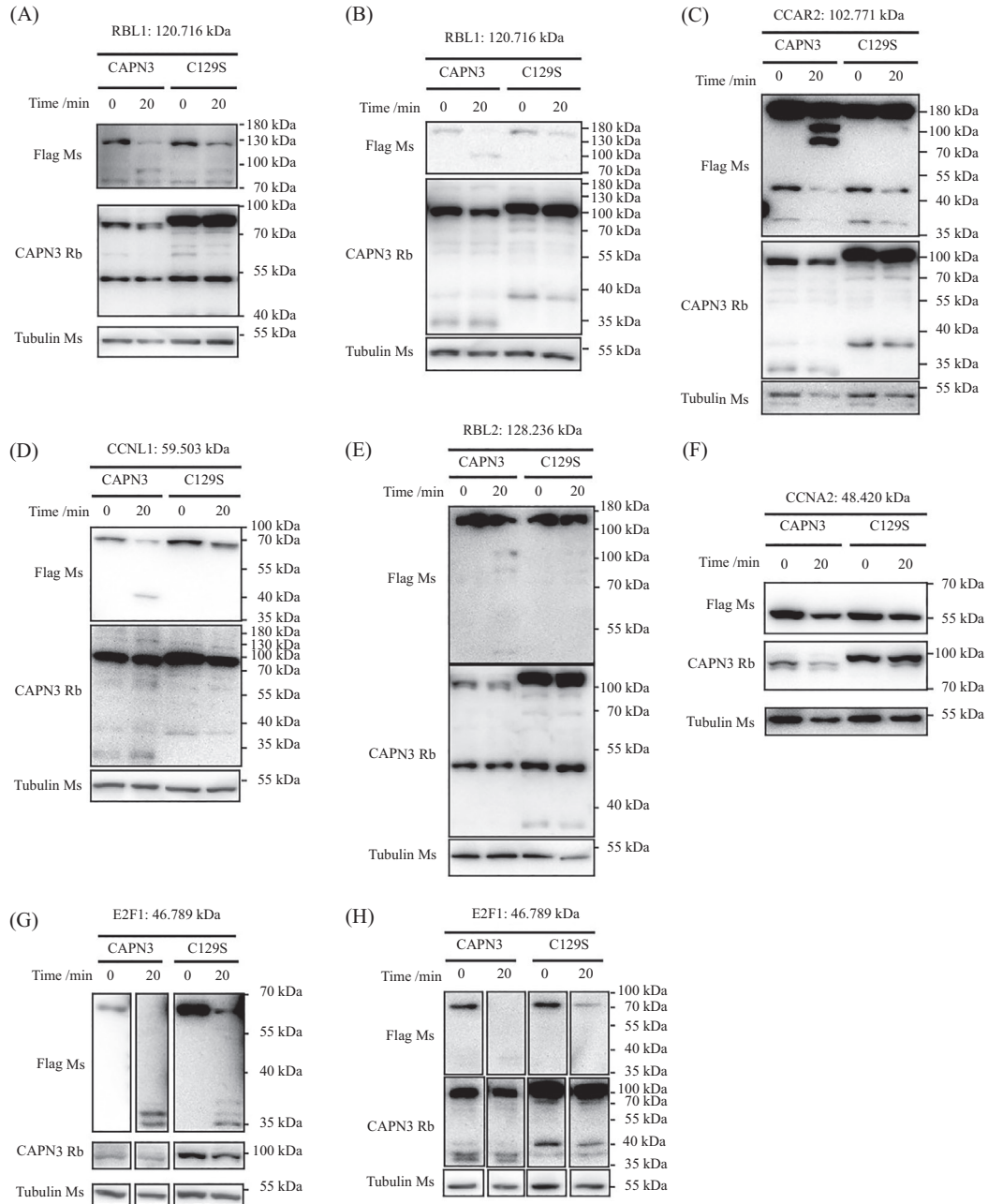
有6个候选蛋白在酶切反应后,或蛋白量显著

减少,或产生了清晰可见的切割产物,包括RBL1、CCAR2、CCNL1、RBL2、E2F1、CCNA2(图3)。根据“酶切判定标准”,这6个候选蛋白被认定为可被CAPN3酶切的底物。仔细分析发现,这6个底物蛋白对CAPN3酶切的敏感性不尽相同(图3)。例如,虽然CCAR2和RBL2在反应20 min后均有大量的未被切割的蛋白,但CCAR2被认为更敏感,是因为其形成了更清晰、稳定的切割产物条带(图3C)。由于大部分RBL1全长蛋白在20 min内被CAPN3切割成片段,这提示CAPN3对RBL1有更强的酶切能力,据此认为RBL1比CCAR2对CAPN3更敏感(图3A~图3C)。以此推测这6个新底物对CAPN3的敏感性从高到低排序为:RBL1>CCAR2>CCNL1>RBL2>CCNA2=E2F1。

## 2.5 构建斑马鱼*ccar2*、*ccnl1*、*rbl1*、*rbl2*基因敲除突变体

在上述鉴定到的6个底物中,CCAR2、CCNL1、RBL1、RBL2被CAPN3酶活切割的结果较为明确,因此本研究继而对这4个蛋白进行更加深入的探索。本实验室过往的研究一直关注DEF-CAPN3/Def-Capn3b对于消化器官发育和再生的调控,发现了p53、Chek1、Wee1作为其底物,能够影响消化器官的发育和再生过程。因此,本研究接下来将利用斑马鱼模型,研究单独敲除这些基因(*ccar2*、*ccnl1a*、*ccnl1b*、*rbl1*、*rbl2*)是否会影响消化器官的早期发育。

人CCAR2、CCNL1、RBL1、RBL2蛋白编码基因CCAR2、CCNL1、RBL1、RBL2在斑马鱼中对应的同源基因分别是*ccar2*、*ccnl1a*、*ccnl1b*、*rbl1*、*rbl2*,其中人CCNL1在斑马鱼中的同源基因有2个(*ccnl1a*和*ccnl1b*)。在构建这5个基因的敲除突变体之前,我们从已有的斑马鱼转录组数据中查看了它们的表达情况,包括3 dpf和5 dpf幼鱼整胚、5 dpf幼鱼肝脏以及成鱼肝脏的RNA-seq数据,以每百万转录本(transcripts per million, TPM)作为计量依据,同时取*def*和肝脏标志基因*fabp10a*为参考对照。如图4所示,这5个基因均在3 dpf和5 dpf幼鱼中表达,且它们的表达量与*def*相当,提示它们可能在早期胚胎发育过程中持续稳定地发挥调控作用。在5 dpf肝脏(5 dpf liver)中,除*rbl2*外,其他4个基因的表达量与*def*相当,但均低于5 dpf幼鱼整胚中的表达量,也与*fabp10a*有巨大差异。在成鱼肝脏中,*rbl1*和*rbl2*的表达量都很低,这可能是因为成鱼肝脏中的大部分细



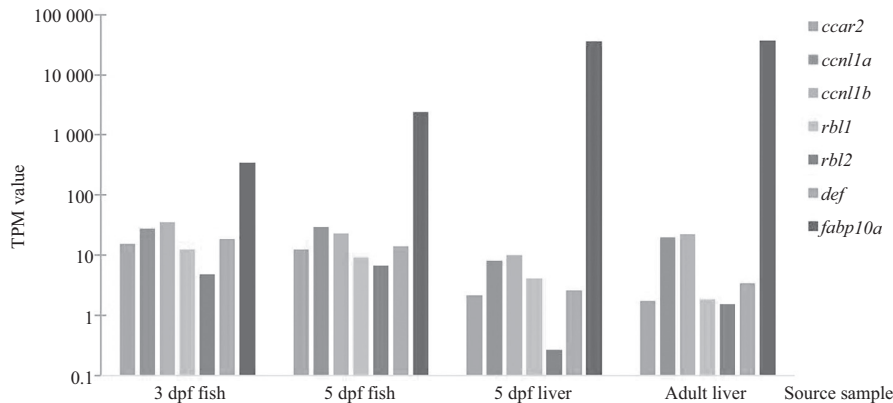
A~H: 分别为候选蛋白RBL1、CCAR2、CCNL1、RBL2、CCNA2、E2F1的蛋白质免疫印迹结果,各小图顶部标出了各个蛋白本身的预测分子量。图中的CAPN3表示进行酶活实验时,和候选蛋白混合的是具酶活性的野生型CAPN3; C129S表示进行酶活实验时,和候选蛋白混合的是不具酶活性的突变体CAPN3<sup>C129S</sup>。Time(min)表示进行酶活实验时的反应总时长,0表示未进行酶活实验就直接用于后续检测,20表示酶促反应的时间长度为20 min。各小图右缘的数字指示了对应位置的分子量,单位为kDa。图左缘的Flag Ms、CAPN3 Rb、Tubulin Ms为抗体,Ms表示该抗体来源于小鼠(mouse),Rb则表示其来源于兔子(rabbit)。Flag Ms用于检测带有Flag标签的候选蛋白; CAPN3 Rb检测CAPN3和CAPN3<sup>C129S</sup>; Tubulin Ms检测Tubulin蛋白,并且Tubulin作为样本内参。

A-H: Western blot results of candidate proteins RBL1, CCAR2, CCNL1, RBL2, CCNA2 and E2F1, respectively. The predicted molecular weight of each protein is indicated at the top of each subpanel. In the figure, "CAPN3" indicates that the candidate protein was mixed with the enzymatically active wild-type CAPN3 during the enzyme activity assay; "C129S" indicates that the candidate protein was mixed with the enzymatically inactive mutant CAPN3<sup>C129S</sup> during the enzyme activity assay. "Time (min)" represents the total reaction duration of the enzyme activity assay: "0" indicates that the sample was directly used for subsequent detection without undergoing the enzyme activity assay, while "20" indicates that the enzymatic reaction lasted for 20 minutes. The numbers on the right edge of each subpanel indicate the molecular weights at the corresponding positions, with units in kDa. The labels "Flag Ms", "CAPN3 Rb", and "Tubulin Ms" on the left edge denote antibodies: "Ms" indicates that the antibody is derived from mouse, and "Rb" indicates that it is derived from rabbit. The Flag Ms antibody is used to detect the Flag-tagged candidate proteins, CAPN3 Rb is used to detect CAPN3 and CAPN3<sup>C129S</sup>, and Tubulin Ms is used to detect Tubulin protein. Tubulin serves the loading control of the samples.

图3 过表达成功且可被CAPN3酶切的候选蛋白的蛋白质免疫印迹结果

Fig.3 Western blot results of candidate proteins with successful overexpression and cleavable by CAPN3 enzyme





横坐标是进行RNA-seq的来源样本, 标出了对应的时间点和组织, 纵坐标是RNA-seq分析所得的TPM数值。

The horizontal axis represents the source samples used for RNA-seq, indicating the corresponding time points and tissues, while the vertical axis shows the TPM values derived from RNA-seq analysis.

图4 目的基因在特定时间点、组织中的TPM数值

Fig.4 TPM values of the target genes in specific time points and tissues

胞处于G<sub>0</sub>期, 对细胞周期相关蛋白的需求不高。这些数据提示, 除了*rbl2*外, 其余4个基因有可能在肝脏早期发育以及成熟肝脏行使代谢功能中发挥作用。

为了研究*ccar2*、*ccnl1a*、*ccnl1b*、*rbl1*、*rbl2*在肝脏发育中的作用, 本研究利用CRISPR-Cas9技术分别对这5个基因进行敲除。经过系列筛选后成功获得了*ccar2*、*ccnl1b*、*rbl1*、*rbl2*的突变体, 但是未能获得*ccnl1a*的突变体。各个突变体的敲除细节即突变类型如图5所示, 其中, *ccar2*、*ccnl1b*、*rbl2*各获得了一种突变类型, 分别是*ccar2*<sup>-13</sup>(图5A)、*ccnl1b*<sup>+25-3</sup>(图5B)及*rbl2*<sup>+28-9</sup>(图5E); *rbl1*获得了两种突变类型, 分别是*rbl1*<sup>-16</sup>(图5C)和*rbl1*<sup>+61-3</sup>(图5D)。

实验结果显示: *ccar2*<sup>-13</sup>突变体相较于野生型, 其胰腺的发育情况并没有显著差异(仅仅使用了*trypsin*一种探针); *ccnl1b*<sup>+25-3</sup>突变体相较于野生型, 其肝脏、胰腺、肠道的发育情况并没有显著性差异。

对于*rbl2*<sup>+28-9</sup>突变体, WISH实验的结果显示, *rbl2*杂合子自交后代4 dpf斑马鱼肝脏的发育情况在不同基因型之间没有显著差异(图6A和图6D)。而对于胰腺的发育, 实验结果(图6B和图6E)显示, 纯合突变体(-/-)拥有显著大于另外两种基因型的胰腺。这表明在胰腺早期发育过程中, *rbl2*或通过充当抑制因子以协调相关进程。从图6C和图6F可知, 野生型(+/+)与纯合突变体(-/-)之间的肠道俯视图面积存在显著差异; 虽然杂合突变体(+/-)与纯合突变体(-/-)之间的差异不具有显著性, 但是从图6C和图6F可以

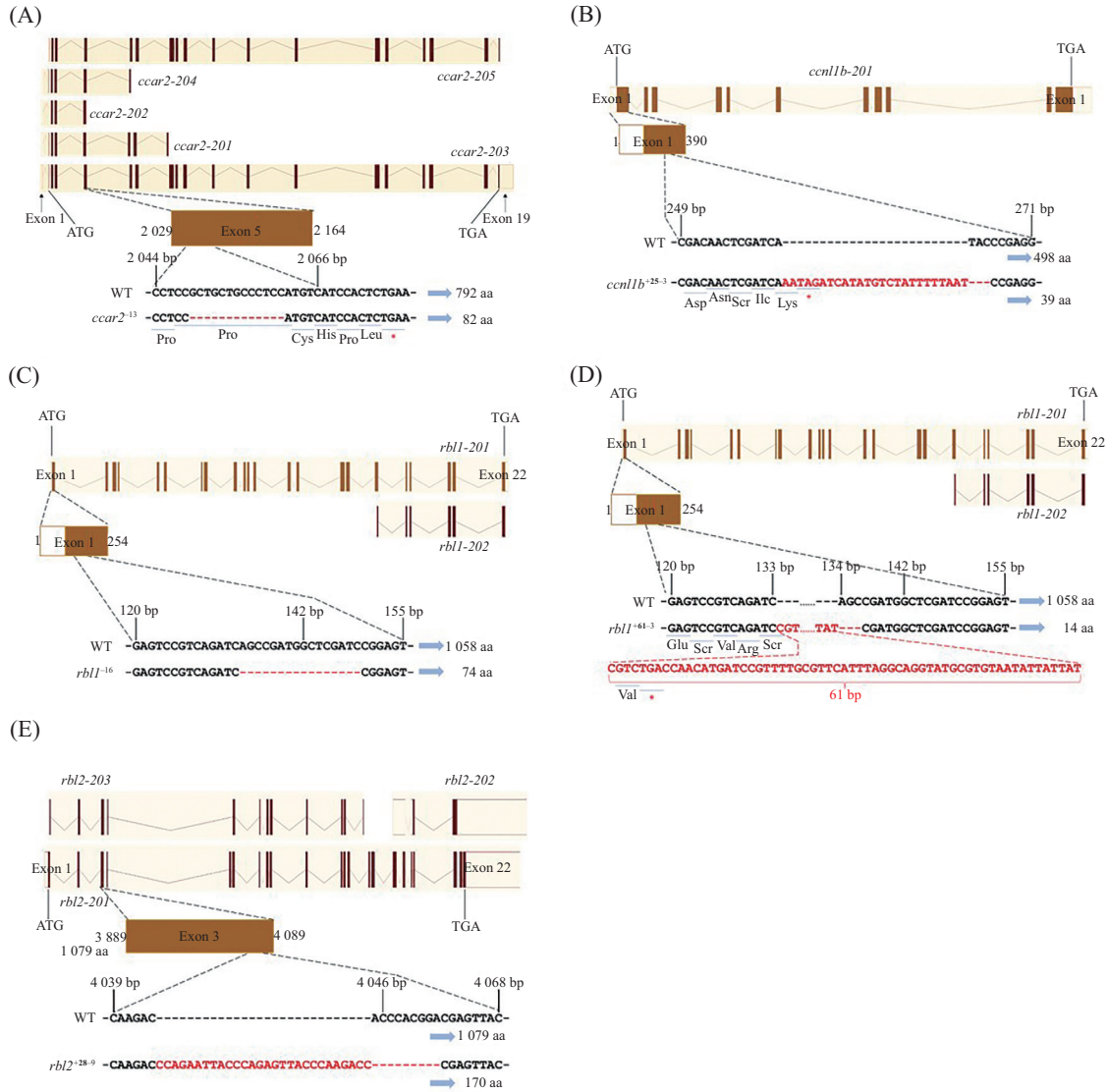
清晰地看到, 杂合突变体(+/-)与野生型(+/+)的俯视图面积存在数个超过10 000的数据点, 而纯合突变体则是零记录。这表明, 纯合突变体(-/-)的肠道发育能力明显不足, 只是由于杂合突变体(+/-)的组内差异过大, 才导致彼此之间的差异被掩盖。

## 2.6 斑马鱼*rbl1*缺失导致斑马鱼肝脏早期发育滞缓

利用*rbl1*<sup>-16</sup>突变体F1代(杂合基因型+/-)的雌雄个体进行自交, 收集其后代F2代4 dpf的斑马鱼幼体, 通过WISH检测其肝脏的发育状态, 实验采用了*fabp10a*探针。WISH实验结果表明, 在*rbl1*基因完全缺失的斑马鱼中, 4 dpf幼体肝脏的像素面积显著小于野生型和杂合子(图7)。利用另一个等位突变体*rbl1*<sup>+61-3</sup>开展实验得到了类似的结果(图8)。不难看出, *rbl1*的缺失导致斑马鱼的肝脏发育滞缓。由此判断, 在斑马鱼中敲除*rbl1*可显著影响肝脏发育。此外, 突变体*rbl1*<sup>+61-3</sup>的胰腺也受到一定影响(图8), 说明*rbl1*可能影响胰腺发育。

## 2.7 斑马鱼*rbl1*缺失导致成鱼肝脏的代谢昼夜节律紊乱

尽管*rbl1*基因缺失影响了斑马鱼肝脏的早期发育, 但其突变体的存活能力并未受到影响, 且具有繁殖能力。为探究*rbl1*基因缺失导致肝脏早期发育缺陷的同时, 是否还会影响成鱼的肝脏功能, 本研究检测了部分肝切除术(partial hepatectomy, PH)对7 mpf(months post-fertilization)斑马鱼*rbl1*<sup>-/-</sup>(*rbl1*<sup>-16</sup>纯合突变体)肝脏再生能力的影响。手术方案参照当前斑马鱼肝再生模型标准流程<sup>[21]</sup>。结果

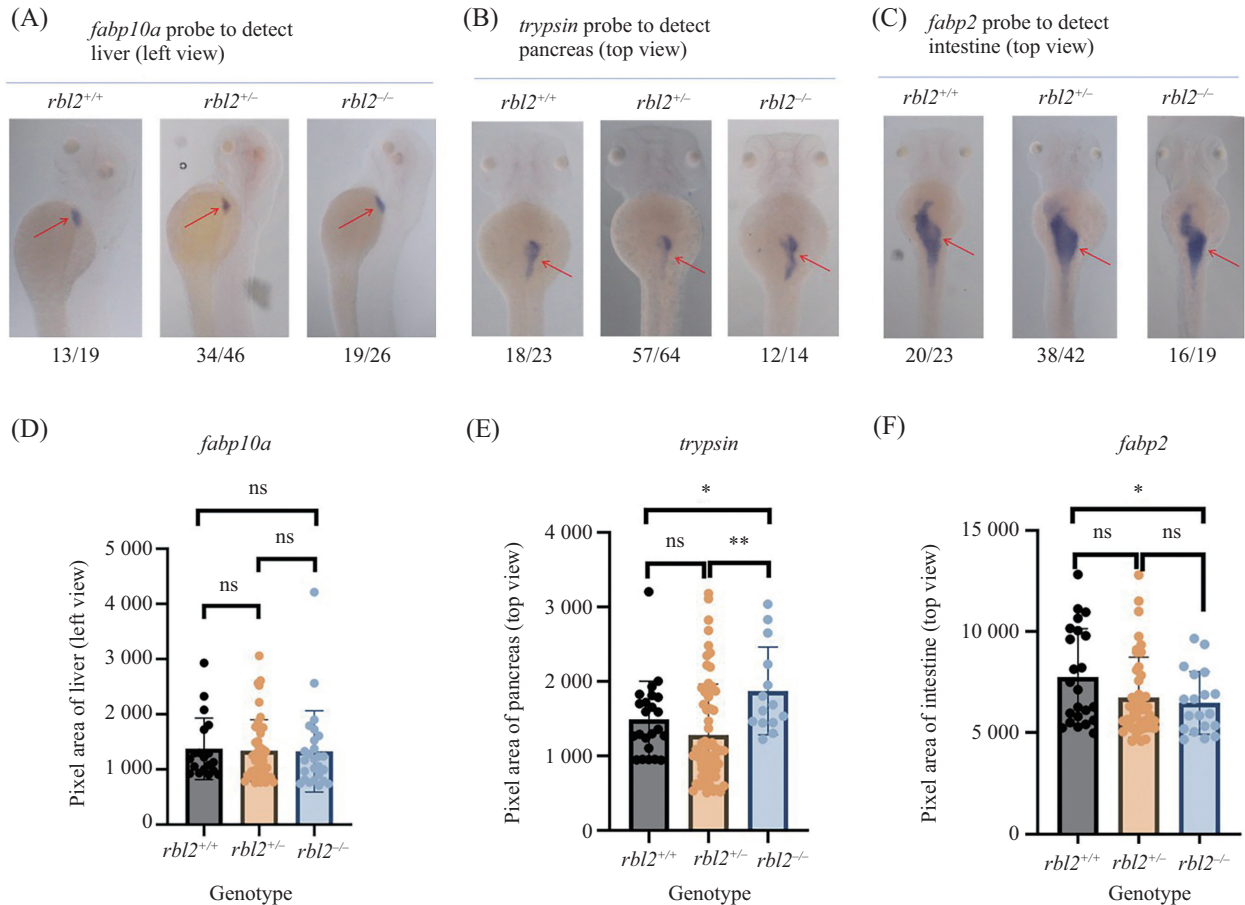


A: 斑马鱼 $ccar2$ 基因有5个转录本,其最长的转录本 $ccar2-203$ 包含19个外显子,所编码的蛋白质长度为792个氨基酸。突变类型缺失了13个碱基,其理论蛋白质的长度为82个氨基酸。图中红色星号(\*)表示提前终止密码子的位置。B: 斑马鱼 $ccn11b$ 基因含11个外显子,所编码的蛋白质长度为498个氨基酸。CRISPR-Cas9所带来的突变是插入25个碱基的同时缺失了3个碱基,净增加碱基数为22个,由此导致了移码突变。突变后,理论蛋白质长度只有39个氨基酸。图中红色星号(\*)表示提前终止密码子的位置。C、D: 斑马鱼 $rbl1$ 基因有2个转录本,其较长的转录本 $rbl1-201$ 包含22个外显子,所编码的蛋白质长度为1 058个氨基酸。突变类型 $rbl1^{-16}$ 缺失了16个碱基,由此导致移码突变。突变后,理论的蛋白质长度只有74个氨基酸。突变类型 $rbl1^{+61-3}$ 插入61个并缺失了3个碱基,由此导致移码突变。突变后,理论的蛋白质长度只有14个氨基酸。图中红色星号(\*)表示提前终止密码子的位置。E: 斑马鱼 $rbl2$ 基因有两个转录本,其较长的转录本 $rbl2-201$ 包含22个外显子,所编码的蛋白质长度为1 079个氨基酸。突变类型插入28个碱基的同时缺失了9个碱基,净增加碱基数为19个,由此导致移码突变。突变后,理论蛋白质的长度为170个氨基酸。

A: the zebrafish  $ccar2$  gene has five transcripts. Its longest transcript,  $ccar2-203$ , contains 19 exons and encodes a protein of 792 amino acids in length. The mutation type involves a 13-base pair deletion, resulting in a theoretical protein length of 82 amino acids. The red asterisk (\*) in the figure indicates the position of the premature termination codon. B: the zebrafish  $ccn11b$  gene contains 11 exons and encodes a protein of 498 amino acids in length. The mutation introduced by CRISPR-Cas9 involves the insertion of 25 base pairs and the deletion of 3 base pairs, resulting in a net increase of 22 base pairs, which causes a frameshift mutation. After the mutation, the theoretical protein length is only 39 amino acids. The red asterisk (\*) in the figure indicates the position of the premature termination codon. C,D: the zebrafish  $rbl1$  gene has two transcripts. Its longer transcript,  $rbl1-201$ , contains 22 exons and encodes a protein of 1 058 amino acids in length. The mutation type  $rbl1^{-16}$  involves a 16-base pair deletion, resulting in a frameshift mutation. After the mutation, the theoretical protein length is only 74 amino acids. The mutation type  $rbl1^{+61-3}$  involves the insertion of 61 base pairs and the deletion of 3 base pairs, resulting in a frameshift mutation. After the mutation, the theoretical protein length is only 14 amino acids. The red asterisk (\*) in the figure indicates the position of the premature termination codon. E: the zebrafish  $rbl2$  gene has two transcripts. Its longer transcript,  $rbl2-201$ , contains 22 exons and encodes a protein of 1 079 amino acids in length. The mutation type involves the insertion of 28 base pairs and the deletion of 9 base pairs, resulting in a net increase of 19 base pairs, which causes a frameshift mutation. After the mutation, the theoretical protein length is 170 amino acids.

图5 基因敲除的具体细节

Fig.5 Specific details of gene knockout



A: 左视图视角下*fabp10a*探针所标记的肝脏,即图中红色箭头所指向的深色部分。该图片由从左到右的三张小组图组成,分别对应野生型(+/-)、杂合突变体(+/-)、纯合突变体(-/-)斑马鱼。每张小图下方附有一个分数,分母部分表示该基因型斑马鱼的总数目,分子部分表示呈现出该小图形态的斑马鱼的数目。B: 俯视图视角下*trypsin*探针所标记的胰腺。C: 俯视图视角下*fabp2*探针所标记的肠道。D: A图中左视图像素面积的统计结果,表征肝脏的尺寸。E: B图中俯视图像素面积的统计结果,表征胰腺的尺寸。F: C图中俯视图像素面积的统计结果,表征肠道的尺寸。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , ns $P>0.05$ 。

A: the liver labeled by the *fabp10a* probe from a left view, specifically the dark area indicated by the red arrow in the image. This panel consists of three sub-images arranged from left to right, corresponding to wild-type (+/+), heterozygous (+/-), and homozygous (-/-) zebrafish, respectively. Below each sub-image is a fraction, where the denominator represents the total number of zebrafish of that genotype, and the numerator represents the number of zebrafish exhibiting the morphology shown in that sub-image. B: the pancreas labeled by the *trypsin* probe from a top view. C: the intestine labeled by the *fabp2* probe from a top view. D: the statistical results of the pixel area from the left lateral images in panel A, representing the size of the liver. E: the statistical results of the pixel area from the dorsal images in panel B, representing the size of the pancreas. F: the statistical results of the pixel area from the dorsal images in panel C, representing the size of the intestine. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , ns $P>0.05$ .

图6 *rbl2*杂合突变体自交后代WISH实验的统计结果

Fig.6 Statistical results of WISH experiments on self-crossed offspring of *rbl2* heterozygous mutants

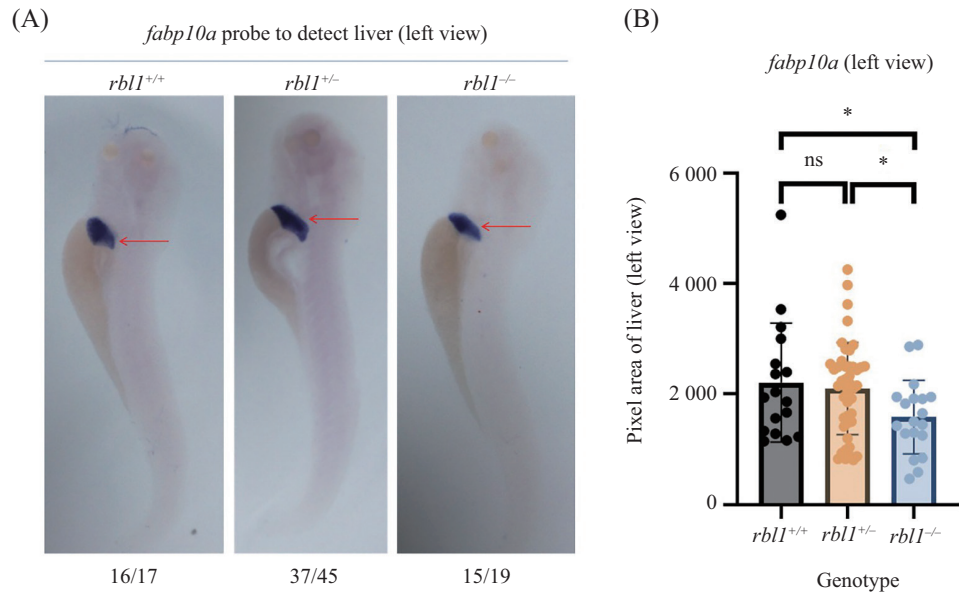
显示,在实施PH后,7尾雄性 *rbl*<sup>-/-</sup>成鱼中有6尾于术后24 h内死亡,而7尾野生型对照组成鱼仅死亡1尾。术后24 h,两组均未再出现死亡个体。

鉴于纯合突变体的超高死亡率,本研究遂决定直接采集成年斑马鱼肝脏组织,利用RNA-seq实验进行转录组分析,以期找到造成超高死亡率的原因。本研究选取雄性成年纯合突变体(Mu组)及野生型斑马鱼(WT组)为实验材料,Mu和WT组各设置3个生物学重复,每个重复包含2~3条成年斑马鱼的全部肝脏

组织。

在获得测序数据后,本研究进行了聚类分析。首先,如图9A所示的主成分分析(principal component analysis, PCA)结果显示,突变体(Mu)彼此之间的距离较近,而野生型(WT)在PC2轴上距离较远,但是总体上两种基因型可以清晰而明确地被分开。

之后,采用DESeq2对野生型及*rbl1*突变体两类样本之间进行基因差异表达分析,选取 $|\log_2\text{fold change}|\geq 1$ 和 $P.\text{adjust}<0.05$ 的基因作为差异表达基因



A: 左视图视角下*fabp10a*探针所标记的肝脏,即图中红色箭头所指向的深色部分。该图片由从左到右的三张小图组成,分别对应野生型(+/+),杂合突变体(+/-)和纯合突变体(-/-)斑马鱼。每张小图下方附有一个分数,分母部分表示在该实验中使用的该基因型斑马鱼的总数量,分子部分表示呈现出该小图形态的斑马鱼的数目。B: A图中左视图像素面积的统计结果,表征肝脏的尺寸。\* $P < 0.05$ , ns  $P > 0.05$ 。

A: the liver labeled by the *fabp10a* probe from a left lateral view, specifically the dark area indicated by the red arrow. This panel consists of three sub-images arranged from left to right, corresponding to wild-type (+/+), heterozygous (+/-), and homozygous (-/-) zebrafish, respectively. Below each sub-image is a fraction, where the denominator represents the total number of the specific genotype zebrafish used in this experiment, and the numerator represents the number of zebrafish exhibiting the morphology shown. B: the statistical results of the pixel area from the left lateral images in panel A, representing the size of the liver. \* $P < 0.05$ , ns  $P > 0.05$ .

图7 *rbl1*杂合突变体(*rbl1*<sup>-16</sup>)自交后代采用*fabp10a*探针的WISH结果

Fig.7 WISH results using the *fabp10a* probe on self-crossed offspring of *rbl1* heterozygous mutants (*rbl1*<sup>-16</sup>)

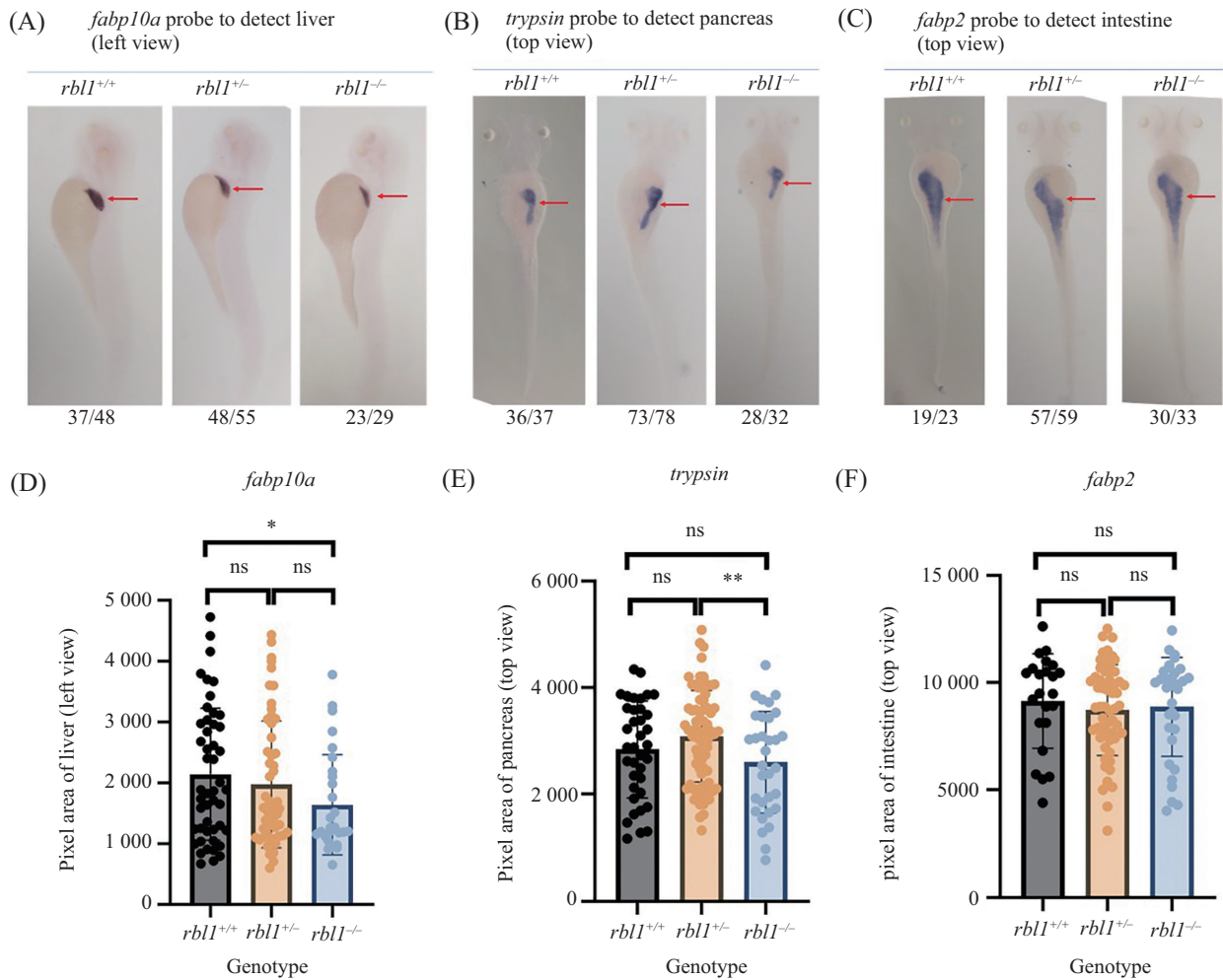
(differentially expressed genes, DEGs)。根据对差异表达基因的定义,利用R语言绘制火山图(图9B),由此直观反映由于*rbl1*基因缺失导致的表达基因的变化情况。统计上述结果,得到上下调基因个数共计184个:其中上调基因69个,下调基因115个(表2)。对69个上调和115个下调基因进行层级聚类分析,结果显示,3个野生型样品和3个突变体样品组内均呈现高度重复性(图9C)。

本课题利用R语言对差异表达的184个基因进行基因本体论(Gene Ontology, GO)分析<sup>[22]</sup>,分为上调和下调2个模块。在分析时,生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)以及细胞组分(cellular component, CC)3个富集模块的参数同时保持开启状态。不过从结果来看,所有差异表达基因全部富集到了BP模块(GO\_BP)。上调基因的GO富集分析的结果如图10A所示;下调基因的GO富集分析的结果如图10B所示。

上调基因的GO\_BP富集分析显示,这些基因主要聚集于代谢相关通路,特别是小分子、有机酸、脂质及核苷酸等物质的合成与降解过程(图10A),显

著富集的条目包括单羧酸代谢过程(monocarboxylic acid metabolic process)、有机酸/羧酸生物合成(organic/carboxylic acid biosynthetic process)、小分子生物合成(small molecule biosynthetic process)和脂质稳态(lipid homeostasis)等。例如,*cyp7a1*<sup>[23]</sup>、*scd*<sup>[24]</sup>和*cyp39a1*<sup>[25-26]</sup>等关键代谢基因参与了胆汁酸合成、饱和脂肪酸合成与类固醇代谢;*gatm*和*gamt*介导瓜基乙酸及肌酸的合成<sup>[27]</sup>,这些过程涉及肝脏能量代谢、脂肪酸合成等关键功能,提示*rbl1*缺失可能促使肝脏代谢活性紊乱,尤其在酸性中间产物及脂类的合成方面表现活跃。

此外,多个条目指向核苷酸及其衍生物的代谢与降解路径,如嘌呤/核苷酸降解过程(purine-containing compound catabolic process、nucleotide catabolic process)、含吡啶化合物代谢过程(pyridine-containing compound metabolic process)及核苷酸磷酸酯降解过程(nucleoside phosphate catabolic process)等。这类条目虽显著性略低( $P_{\text{adjust}}$ 接近0.03~0.04),但相关基因如*pklr*<sup>[28]</sup>、*gck*<sup>[29]</sup>和*nt5e*<sup>[30]</sup>的上调仍可能指向能量代谢物[如ATP、NAD(P)H]周



A: 左视图视角下*fabp10a*探针所标记的肝脏,即图中红色箭头所指向的深色部分。该图片由从左到右的三张小图组成,分别对应野生型(+/+),杂合突变体(+/-)、纯合突变体(-/-)斑马鱼。每张小图下方附有一个分数,分母部分表示该基因型斑马鱼的总数目,分子部分表示呈现出该小图形态的斑马鱼的数目。B: 俯视图视角下*trypsin*探针所标记的胰腺。C: 俯视图视角下*fabp2*探针所标记的肠道。D: A图中左视图像素面积的统计结果,表征肝脏的尺寸。E: B图中俯视图像素面积的统计结果,表征胰腺的尺寸。F: C图中俯视图像素面积的统计结果,表征肠道的尺寸。

A: the liver labeled by the *fabp10a* probe from a left view, specifically the dark area indicated by the red arrow in the image. This panel consists of three sub-images arranged from left to right, corresponding to wild-type (+/+), heterozygous (+/-), and homozygous (-/-) zebrafish, respectively. Below each sub-image is a fraction, where the denominator represents the total number of zebrafish of that genotype, and the numerator represents the number of zebrafish exhibiting the morphology shown in that sub-image. B: the pancreas labeled by the *trypsin* probe from a top view. C: the intestine labeled by the *fabp2* probe from a top view. D: the statistical results of the pixel area from the left lateral images in panel A, representing the size of the liver. E: the statistical results of the pixel area from the dorsal images in panel B, representing the size of the pancreas. F: the statistical results of the pixel area from the dorsal images in panel C, representing the size of the intestine.

图8 *rbl1*杂合突变体(*rbl1*<sup>+/-</sup>)自交后代WISH实验的统计结果

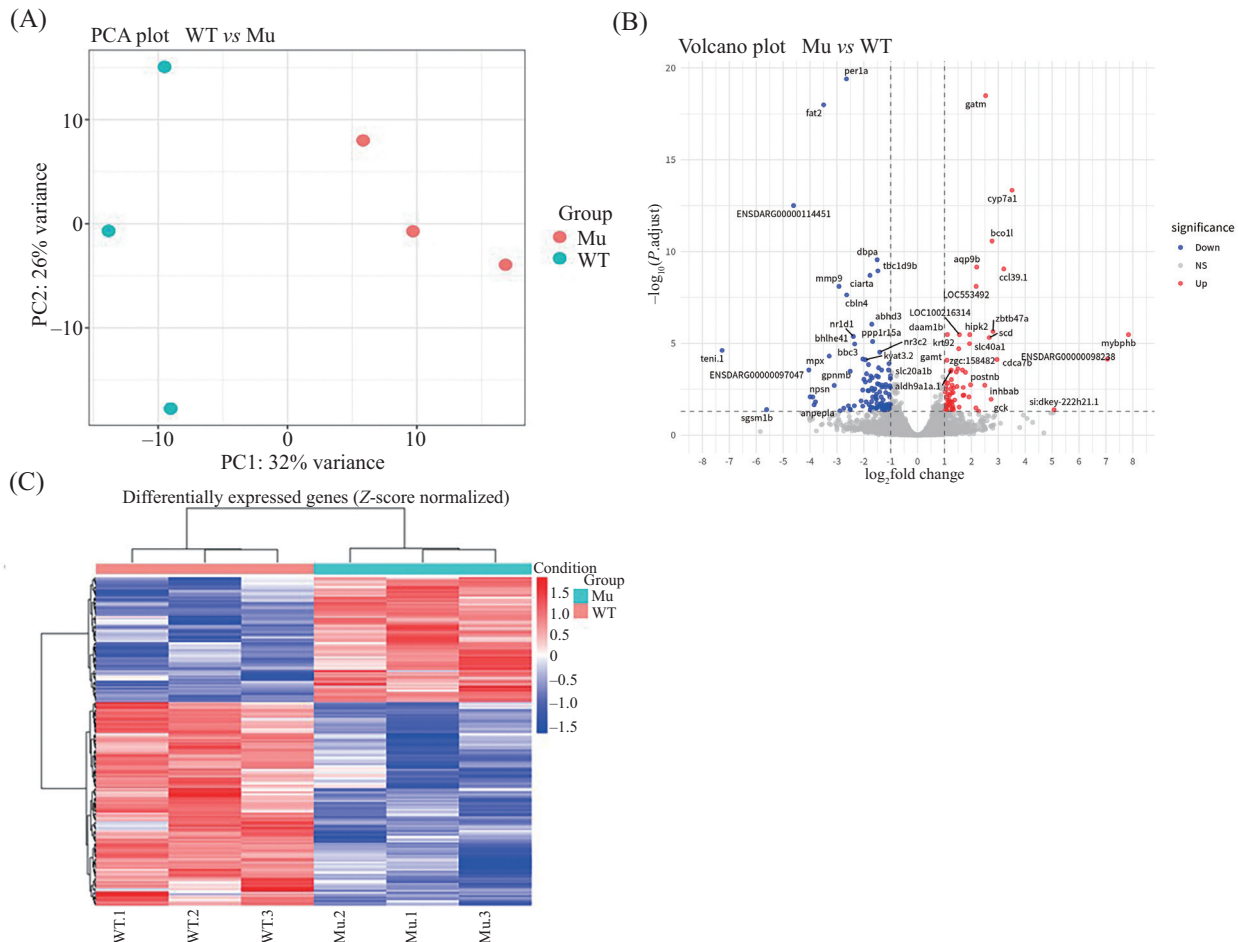
Fig.8 Statistical results of WISH experiments on self-crossed offspring of *rbl1* heterozygous mutants (*rbl1*<sup>+/-</sup>)

转速率的提升或核酸代谢状态的改变<sup>[31]</sup>。

值得注意的是,条目中还富集了化学稳态(chemical homeostasis),反映出*rbl1*缺失后个体可能激活了对体内化学微环境变化的反馈调控机制,涉及基因如*slc40a1*(铁稳态调节)<sup>[32]</sup>与*angptl8*(脂质代谢调控因子)<sup>[33]</sup>等。同时,修饰氨基酸代谢(modified amino acid metabolic process)这一条目的富集(涉及*gatm*、*ald*-

*h9a1a.1*、*gamt*等),进一步提示*rbl1*缺失也影响了肝脏对特定氨基酸的转化能力,可能关联氮代谢及其与代谢途径的交互调节。

综上,GO分析结果表明,*rbl1*缺失主要上调了单羧酸代谢物转换、脂类合成、小分子和核苷酸降解等相关的肝脏代谢通路,同时伴随一定程度的内稳态调节。这些结果共同提示,*rbl1*在维持肝脏代谢



A: 野生型和突变体测序结果的PCA图。图中Mu代表mutant, 即突变体, 用粉红色圆盘表示; WT代表wild type, 即野生型, 用青色圆盘表示。B: 差异表达基因火山图。图中, 横坐标为*rbll*突变体相对于野生型的差异表达基因的 $\log_2$  fold change, 即变化倍数取以2为底的对数所得数值; 纵坐标为表达量变化的统计学显著程度。C: 差异表达基因层级聚类热图。根据差异表达基因在每个样本中的表达量, 取以2为底的对数后, 计算欧氏距离, 再利用层级聚类(hierarchical clustering)算法, 最终得到热图。在图中, 基因的表达量与颜色相对应, 蓝色系表示表达量较低, 红色系表示表达量较高。

A: PCA plot of sequencing results from wild-type and mutant samples. In the figure, “Mu” represents mutant, indicated by pink disks; “WT” represents wild type, indicated by cyan disks. B: volcano plot of differentially expressed genes. The horizontal axis represents the  $\log_2$  fold change of differentially expressed genes in the *rbll* mutant relative to the wild type, i.e., the logarithm base 2 of the fold change; the vertical axis represents the statistical significance of the expression changes. C: hierarchical clustering heatmap of differentially expressed genes. Based on the expression levels of differentially expressed genes in each sample, the logarithm base 2 was taken, and Euclidean distance was calculated. Hierarchical clustering was then applied to generate the heatmap. In the figure, gene expression levels correspond to colors: blue shades indicate lower expression, while red shades indicate higher expression.

图9 聚类分析

Fig.9 Cluster analysis

平衡、能量状态及物质周转中具有重要作用, 且其缺失可能引起肝脏代谢网络的多维度重构。近期报道的*Rb/p107*双敲模型进一步显示, 细胞周期本身缩短即可加剧组织应激并导致动物死亡<sup>[34]</sup>, 这与*rbll*<sup>-/-</sup>肝切除后高死亡率高度吻合, 提示“周期加速-代谢紊乱”可能是跨物种保守的致死机制。

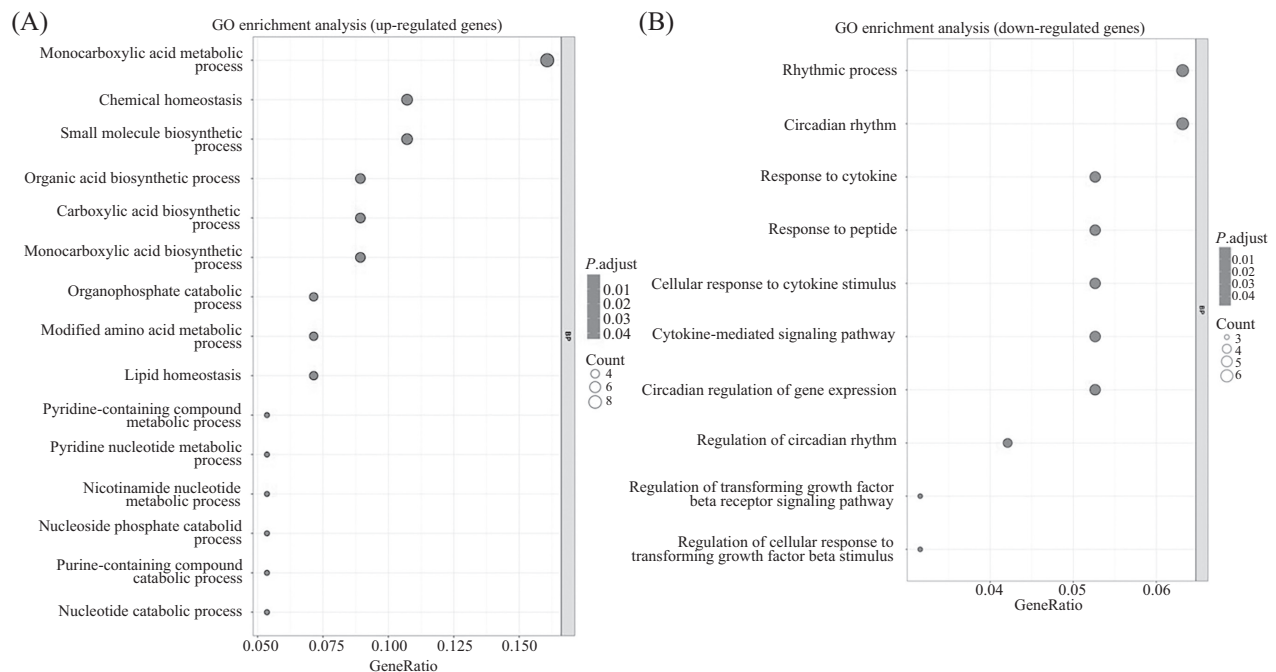
对*rbll*突变斑马鱼肝脏中下调差异基因进行GO富集分析, 结果显示这些基因主要富集于与昼夜节律相关的生物过程, 如节律过程(rhythmic pro-

cess)、昼夜节律(circadian rhythm)、昼夜节律性基因表达调控(circadian regulation of gene expression)以及昼夜节律调节(regulation of circadian rhythm)等条目(图10B)。这些条目富集了*perla*、*perlb*、*nrld1*、*bhlhe41*、*ciarta*和*cipca*等多个关键生物钟基因, 它们共同组成了肝脏自主节律的调控网络<sup>[35]</sup>, 主导了代谢基因表达的时间序列性<sup>[36]</sup>。这些关键生物钟基因表达的显著下调提示*rbll*缺失可能干扰肝脏的时钟功能, 打乱代谢节律的有序协调。已有研究表明,

表2 差异表达基因的变化倍数统计

Table 2 Statistics of fold changes for differentially expressed genes

| 对数2倍变化的绝对值<br> log <sub>2</sub> fold change | 上调基因数目<br>Number of up-regulated genes | 下调基因数目<br>Number of down-regulated genes |
|---------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
| [7, +∞)                                     | 2                                      | 1                                        |
| [4, 7)                                      | 1                                      | 3                                        |
| [3, 4)                                      | 2                                      | 7                                        |
| [2, 3)                                      | 11                                     | 16                                       |
| [1, 2)                                      | 53                                     | 88                                       |
| Total                                       | 69                                     | 115                                      |



A: 差异表达基因中上调基因的GO分析。图中列出了最显著的前15个条目, 依据所富集到的基因数目从上往下依次排列, 图中最右窄条标出了条目所属类别, 此处仅富集到了GO\_BP一类中。B: 差异表达基因中下调基因的GO分析。图中列出了共计10个条目, 依据所富集到的基因数目从上往下依次排列, 图中最右窄条标出了条目所属类别, 此处仅富集到了GO\_BP一类中。

A: GO analysis of upregulated genes among the differentially expressed genes. The figure lists the top 15 most significant terms, arranged from top to bottom according to the number of enriched genes. The narrow bar on the right side of the figure indicates the category to which the terms belong, with enrichment observed only in the GO\_BP category here. B: GO analysis of downregulated genes among the differentially expressed genes. The figure lists a total of 10 terms, arranged from top to bottom according to the number of enriched genes. The narrow bar on the right side of the figure indicates the category to which the terms belong, with enrichment observed only in the GO\_BP category here.

图10 富集分析

Fig.10 Enrichment analysis

肝脏昼夜节律对葡萄糖代谢<sup>[37]</sup>、脂质代谢及解毒功能<sup>[38]</sup>具有重要调控作用, 其紊乱可导致代谢综合征、非酒精性脂肪肝病等<sup>[39]</sup>。

此外, 下调基因还显著富集于与细胞因子信号相关的免疫过程, 如细胞因子应答(response to cytokine)、肽类刺激应答(response to peptide)、细胞对细胞因子刺激的反应(cellular response to cytokine stimulus)及细胞因子介导的信号通路(cytokine-me-

diated signaling pathway)等功能条目。相关基因包括*socs3a*、*cxc4b*、*csf2rb*、*il10ra*和*csflra*, 这些基因在JAK/STAT信号调节、免疫抑制及炎症反馈控制中发挥重要作用<sup>[40]</sup>。其表达下调提示*rb1l*缺失可能改变肝脏细胞对细胞因子刺激的响应能力, 从而影响肝脏的免疫稳态维持。其中, SOCS3(由*socs3a*编码)为STAT信号的关键负调因子, 已有研究指出其功能缺失可导致促炎巨噬细胞(M1)极化增强及炎

症反应激活<sup>[41]</sup>;另有综述明确指出SOCS3是感染与炎症调控过程中的核心调节因子,其表达下调往往与慢性炎症状态密切相关<sup>[42]</sup>。

另外,GO分析还显示下调基因富集于TGF- $\beta$ 信号调节相关条目,如TGF- $\beta$ 受体信号通路调节(regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway)和对TGF- $\beta$ 刺激的细胞反应调节(regulation of cellular response to transforming growth factor beta stimulus),相关基因包括*pmepal*、*mmp9*和*ldlrada4a*,提示*rbll*缺失可能进一步影响细胞转录与分化程序,进而干扰肝组织修复与稳态调控<sup>[43]</sup>。

综上,下调基因GO富集结果强调了*rbll*在调控肝脏昼夜节律、免疫应答及信号通路平衡中的关键作用,表明其缺失不仅影响代谢节律耦合,还可能引发免疫反应紊乱与组织功能障碍。

## 2.8 过表达DEF促进RBL1蛋白水平下降

接下来,本研究检测了RBL1稳定性是否与DEF有关联。本实验室之前证明,过表达DEF能诱导野生型p53蛋白而非p53<sup>R175H</sup>(p53突变体蛋白)的降解<sup>[12]</sup>。鉴于此,我们在HEK293T细胞中检验了过表达的RBL1能否被过表达的DEF诱导降解,并以p53和p53<sup>R175H</sup>为对照。如图11所示,泳道-1的Flag-RBL1和作为阳性对照的泳道-7的Flag-p53都出现了明显的蛋白水平的下降,而作为阴性对照的泳道-9中的p53<sup>R175H</sup>则没有出现类似现象,这表明RBL1如同p53可以被DEF诱导降解。该实验结果有力提示,RBL1不仅是CAPN3体外酶活实验的底物,在细胞内也是DEF-CAPN3复合物的底物。

## 2.9 斑马鱼capn3突变体中Rbl1异常累积

接下来,我们检测了斑马鱼内源Rbl1是否与Capn3b有关联。我们利用斑马鱼*capn3b*<sup>-/-</sup>突变体幼体进行了系列实验。如图12A所示,在2 dpf的斑马鱼中:无论是正常培养温度(28 °C)还是经过了热激(heat shock, HS)(35 °C),*capn3b*突变体(*capn3b*<sup>-/-</sup>)中都累积了更多的Rbl1蛋白;如图12B所示,在5 dpf的斑马鱼中,无论是正常培养温度还是经过了热激,*capn3b*突变体中同样累积了更多的Rbl1蛋白。这表明在斑马鱼中,Capn3b缺失导致了Rbl1异常累积。

## 3 讨论

在本研究一开始,我们遴选了42种与细胞周期相关的蛋白,通过克隆基因并进行体外酶活实验,成功筛选到4个CAPN3的新底物,它们分别是CCNL1、

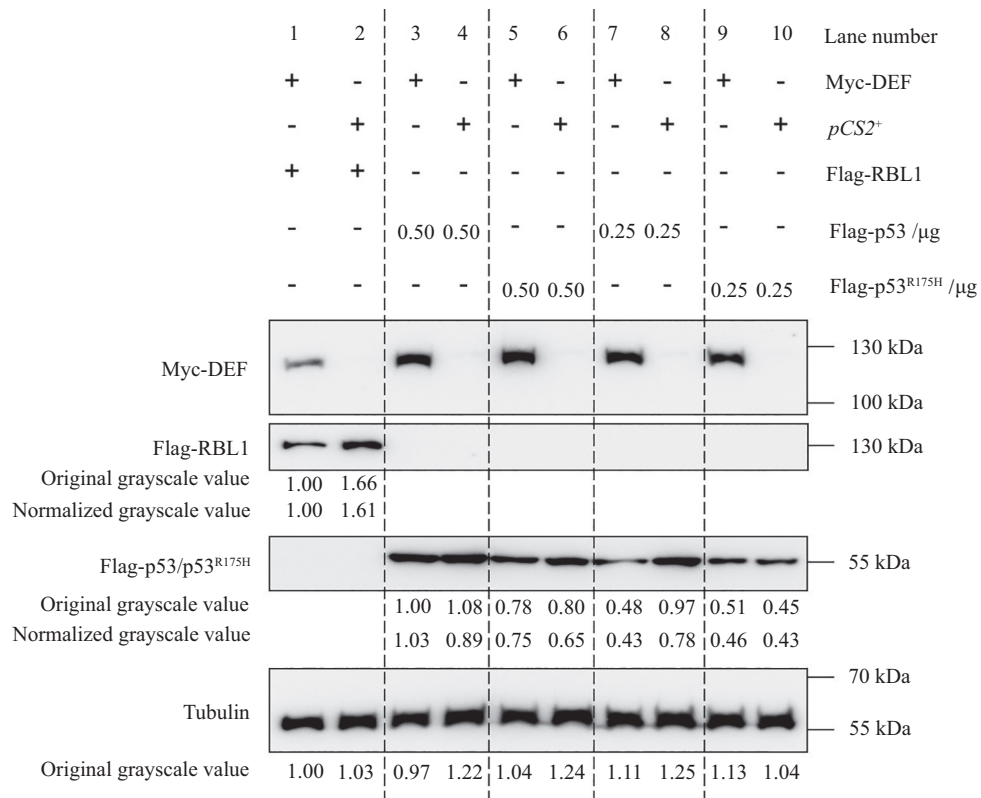
RBL1、RBL2和CCAR2。本研究发现CAPN3可通过蛋白酶切割方式调控RBL1/p107,而近期结构研究表明,p107可通过非典型方式被PP2A:B55识别并去磷酸化<sup>[44]</sup>。这一现象提示,作为细胞周期调控的关键蛋白,p107可能通过“蛋白酶切割(CAPN3介导)”与“磷酸化修饰(PP2A:B55介导)”两种翻译后修饰途径实现协同调控:一方面,CAPN3的切割可能直接影响p107的蛋白稳定性,快速下调其水平;另一方面,PP2A:B55的去磷酸化可能通过调控p107的活性状态,影响其与E2F转录因子家族的相互作用。两种修饰的协同作用或为细胞周期G<sub>1</sub>/S转换提供更精细的调控维度,也为本研究后续探究DEF-CAPN3通路与磷酸化修饰网络的交互作用提供了方向。

细胞周期素的蛋白水平会随着细胞周期的推进呈现周期性变化,过往的研究表明这主要是由泛素化降解通路所介导的。而我们从多达27种细胞周期素中仅仅筛选到一种细胞周期素是CAPN3的底物,说明绝大多数细胞周期素的降解过程确实并不需要CAPN3的参与。而对来源于质谱数据的蛋白进行筛选,则命中率大大提高,充分说明先前实验质谱数据<sup>[8]</sup>的可靠性。进一步地,本研究还证明了RBL1能够被DEF诱导降解,进一步说明了RBL1是DEF-CAPN3复合物的底物,扩展了该蛋白降解通路的既有版图。最新研究进一步发现,p53可直接结合p107-E2F4,组装DREAM复合物,这独立于p21抑制细胞周期基因<sup>[45]</sup>;基于此,我们推测DEF-CAPN3降解p53后,DREAM靶基因的上调可能与此机制相关,从而获得更直接的分子解释。

随即我们利用CRISPR-Cas9技术,构建了斑马鱼中对应基因的突变体。经过系列筛选后成功获得了*ccnl1b*、*rbll*、*rbll2*、*ccar2*的突变体,但是未能获得*ccnl1a*的突变体。

原位杂交实验结果揭示,*rbll*和*rbll2*基因都对消化器官的早期发育存在明显影响,只是对于具体器官的偏好性有所不同。在肝脏中,*rbll*基因的缺失导致肝脏发育滞缓,*rbll2*的缺失则没有造成影响,这与图4所示的5 dpf肝脏中*rbll*拥有显著高于*rbll2*的TPM数值的分析结果相吻合;在胰腺中,*rbll*基因的缺失没有造成明确影响,*rbll2*的缺失反而促进了胰腺的发育;在肠道中,*rbll*基因的缺失没有造成影响,*rbll2*的缺失轻微抑制了发育进程。本论文推测,这两个旁系同源基因的产物很可能属于同工蛋白质(isopro-





本图为HEK293T细胞中的过表达实验结果,过表达在6孔板中进行,收样时间为质粒转染后24 h。所有质粒的载体骨架均为*pCS2*<sup>+</sup>。“+”或者数字表示对应6孔板的孔中转入了该质粒,“-”表示没有转入。Myc-DEF的转染量为2  $\mu$ g,*pCS2*<sup>+</sup>为1  $\mu$ g,Flag-RBL1为1  $\mu$ g,Flag-p53为0.50或0.25  $\mu$ g,Flag-p53<sup>R175H</sup>也为0.50或0.25  $\mu$ g。WB分别使用了Myc兔多抗(杭州华安生物技术有限公司,0912-2)检测Myc-DEF,Flag鼠单抗(杭州华安生物技术有限公司,Ms M1403-2)检测Flag-RBL1、Flag-p53和Flag-p53<sup>R175H</sup>,alpha Tubulin兔多抗(杭州华安生物技术有限公司,ER130905)检测Tubulin。泳道编号便于在引用该图片时描述细节,竖直虚线用于分隔各个比较组。图片左侧部分的数字为蛋白分子质量标准(protein ladder),单位为kDa。原始灰度值可以反映目标条带的真实强度,标准化后灰度值由原始灰度值除以同泳道的Tubulin灰度值得到,可以更加客观地体现目标蛋白量的真实水平。对于Flag-p53和Flag-p53<sup>R175H</sup>,本实验采用了2个梯度,其中0.50  $\mu$ g组并没展现出降解现象,这是因为DEF-CAPN3对底物的降解十分有限,如果基础蛋白量偏多,即便存在降解行为,也难以被检测到。在同样的质粒转染水平下,Flag-p53和Flag-p53<sup>R175H</sup>能表达出远多于Flag-RBL1的蛋白量。因此,在上图中当Flag-p53的质粒转染量为0.25  $\mu$ g时才能够被检测到明显的降解现象。

This figure presents the results of an overexpression experiment in HEK293T cells. The overexpression was performed in six-well plates, and samples were collected 24 hours after plasmid transfection. All plasmids were constructed using the *pCS2*<sup>+</sup> vector backbone. “+” or numbers indicate the transfection of the corresponding plasmid into the respective well of the six-well plate, while “-” indicates no transfection. The transfection amounts were 2  $\mu$ g for Myc-DEF, 1  $\mu$ g for *pCS2*<sup>+</sup>, 1  $\mu$ g for Flag-RBL1, and 0.50 or 0.25  $\mu$ g for Flag-p53 and Flag-p53<sup>R175H</sup>. For WB (Western blot) analysis, the following antibodies were used: Myc rabbit polyclonal antibody (Huaan Biotechnology, 0912-2) for detecting Myc-DEF; Flag mouse monoclonal antibody (Huaan Biotechnology, Ms M1403-2) for detecting Flag-RBL1, Flag-p53, and Flag-p53<sup>R175H</sup>; and alpha Tubulin rabbit polyclonal antibody (Huaan Biotechnology, ER130905) for detecting Tubulin. Lane numbers are provided to facilitate detailed descriptions when referencing this figure, and vertical dashed lines separate different comparison groups. The numbers on the left side of the figure represent the protein molecular weight markers (protein ladder), with units in kDa. The original grayscale values reflect the true intensity of the target bands, while the normalized grayscale values are obtained by dividing the original grayscale values by the Tubulin grayscale values from the same lane, providing a more objective representation of the actual protein levels. For Flag-p53 and Flag-p53<sup>R175H</sup>, two gradients were tested. The 0.50  $\mu$ g group did not show degradation, as the degradation of substrates by DEF-CAPN3 is limited. When the baseline protein amount is high, degradation may be difficult to detect even if it occurs. Under the same transfection conditions, Flag-p53 and Flag-p53<sup>R175H</sup> express significantly more protein than Flag-RBL1. Therefore, in the figure above, significant degradation of Flag-p53 was only detectable when the plasmid transfection amount was reduced to 0.25  $\mu$ g.

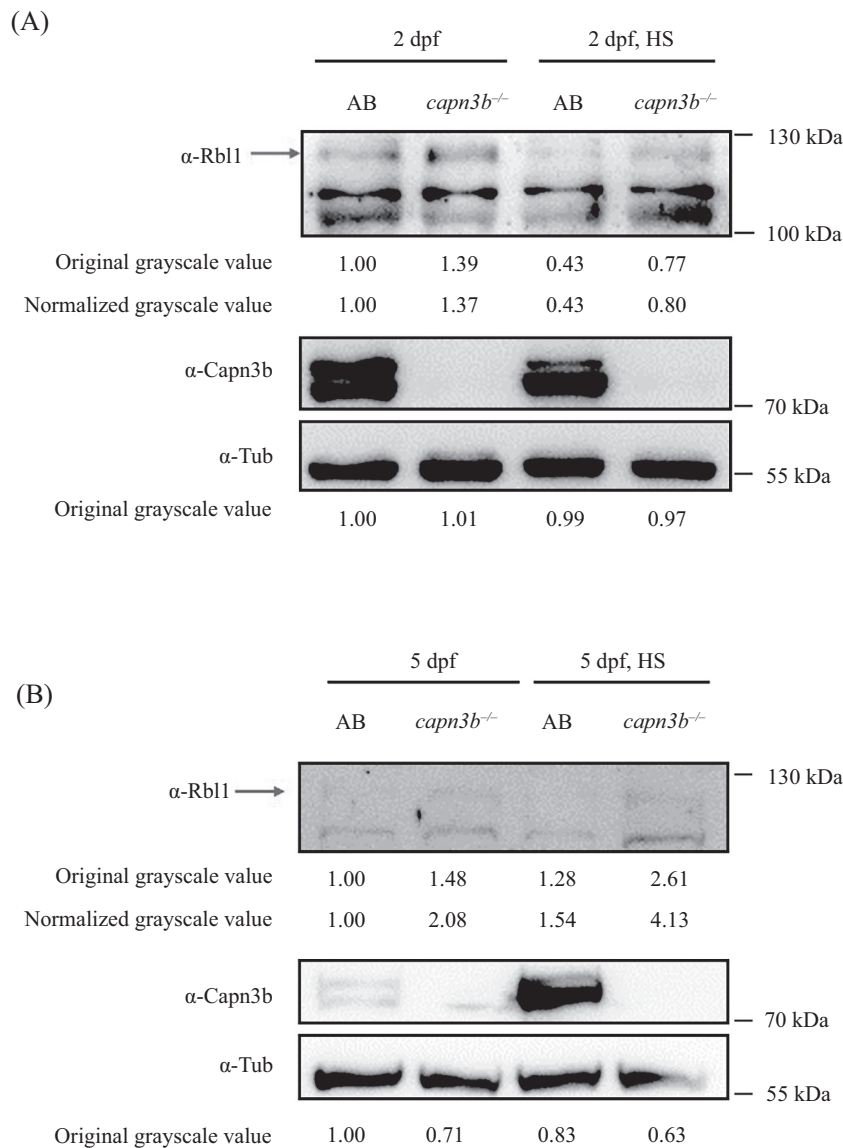
图11 RBL1可以被DEF诱导降解

Fig.11 RBL1 can be induced to degrade by DEF

tein), 分别在不同的消化器官中占据主导地位。

此外,本实验室还构建了*rbl1*和*rbl2*的双突变体,并使用*fabp10a*探针初步检测了肝脏的发育情况,发现了双基因纯合突变体的肝脏尺寸和野生型之间的差

异虽然有显著性,但是显著性水平不够高(\* $P$ <0.05)。这说明,敲除*rbl1*后对肝脏发育的影响程度有限,并不是因为*rbl2*仍然存在所施加的基因冗余效应,也再次与图4中5 dpf肝脏的*rbl1*拥有显著高于*rbl2*的TPM数



A: 利用2 dpf幼年斑马鱼进行的Rb11蛋白量检测实验。B: 利用5 dpf幼年斑马鱼进行的Rb11蛋白量检测实验。A和B中实验材料分别采用了野生型(AB)、*capn3b*突变体(*capn3b*<sup>-/-</sup>)。斑马鱼培养条件分为正常温度(28 °C)和热激(HS, 35 °C)。WB分别使用了p107/RBL1兔多抗(武汉三鹰生物技术有限公司, 13354-1-AP)检测Rb11, zfDef(s1)兔多抗(杭州华安生物技术有限公司)检测Def, *capn3b*鼠单抗(Abmart公司, ZF055576)抗体检测Capn3b, alpha Tubulin兔多抗(杭州华安生物技术有限公司, ER130905)检测Tubulin。图片右侧部分的数字为蛋白分子质量标准(protein ladder), 单位为kDa。原始灰度值可以反映目标条带的真实强度, 标准化后灰度值由原始灰度值除以同泳道的Tubulin灰度值得到, 可以更加客观地体现目标蛋白量的真实水平。热激是本实验室在研究*capn3b*突变体时惯常采用的做法, 能够给斑马鱼施加一个外来的胁迫条件, 使得表型更加明显。此处, 为了防止通常情况下的Rb11不出现累积, 所以刻意额外设置了热激条件。

A: detection of Rb11 protein levels using 2 dpf juvenile zebrafish. B: detection of Rb11 protein levels using 5 dpf juvenile zebrafish. For both A and B, the experimental materials included wild-type (AB) and *capn3b* mutant (*capn3b*<sup>-/-</sup>) zebrafish. The rearing conditions were set to normal temperature (28 °C) and heat shock (HS, 35 °C). WB (Western blot) analysis was performed using the following antibodies: p107/RBL1 rabbit polyclonal antibody (Proteintech, 13354-1-AP) to detect Rb11, zfDef (s1) rabbit polyclonal antibody (prepared in-house) to detect Def, *capn3b* mouse monoclonal antibody (Abmart, ZF055576) to detect Capn3b, and alpha Tubulin rabbit polyclonal antibody (Huaan Biotechnology, ER130905) to detect Tubulin. The numbers on the right side of the figure represent the protein molecular weight markers (protein ladder), with units in kDa. The original grayscale values reflect the true intensity of the target bands, while the normalized grayscale values are obtained by dividing the original grayscale values by the Tubulin grayscale values from the same lane. This provides a more objective representation of the actual target protein levels. Heat shock is a routine practice in our laboratory for studying *capn3b* mutants. It applies an external stress condition to the zebrafish, making phenotypic manifestations more pronounced. Here, to prevent the possible lack of Rb11 accumulation under normal conditions, the heat shock condition was intentionally included.

图12 Rb11在*capn3b*<sup>-/-</sup>中异常累积  
Fig.12 Abnormal accumulation of Rb11 in *capn3b*<sup>-/-</sup>

值相吻合。

在斑马鱼中,关于Rb1和Rb2的研究寥寥无几,但是其同源蛋白在其他物种中的研究却颇为丰富。Rb1的同源蛋白一般被称为p107, Rb2的同源蛋白一般被称为p130。根据在小鼠(*Mus musculus*)、人类(*Homo sapiens*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)中的研究, p107和p130是两个与细胞周期调控、肿瘤抑制以及细胞分化密切相关的蛋白质,它们是视网膜母细胞瘤蛋白家族的一部分。这个家族还包括pRb(视网膜母细胞瘤蛋白),它们在细胞周期的控制中起着关键作用。

p107主要通过E2F转录因子结合抑制其转录活性,从而在G<sub>1</sub>期限制细胞进入S期,它在细胞周期的调控中发挥着关键作用<sup>[15]</sup>。虽然p107与pRb、p130存在一定的功能重叠,但p107的缺失可能导致肝脏中部分细胞周期进程的异常,如G<sub>1</sub>期延长或不完全过渡到S期,可能导致肝脏细胞在早期发育过程中无法正常增殖,从而导致发育早期肝脏的细胞数量不足。若p107缺失导致细胞周期停滞或增殖减缓,肝脏的尺寸可能会因此受到限制。在肝脏的发育过程中,细胞周期的精确控制对于维持正确的组织结构和器官大小至关重要。

肝脏的早期发育依赖于肝脏干细胞(hepatic stem cells)或前体细胞的增殖和分化。p107在细胞周期控制和细胞命运决定中起着重要作用,缺失p107可能导致这些干细胞或前体细胞的增殖减缓或异常,影响肝脏的发育和生长。此外,p107可能在某些情况下调节这些细胞的分化,而其缺失可能会使得一部分干细胞停留在不成熟的状态,从而减少肝脏的成熟细胞数量。

p107在肝脏发育过程中可能通过调控细胞增殖、分化及周期进程等多个途径影响肝脏大小。敲除p107后,肝脏尺寸减小可能与细胞增殖受限、干细胞或前体细胞功能障碍、细胞周期调控异常及其他代偿机制不足有关。未来的研究可以进一步探索这些机制,并结合其他Rb家族成员的功能,揭示p107缺失对肝脏发育的具体影响。甲状腺癌研究亦发现,p107蛋白水平受AURKA(Aurora kinase A)调控,AURKA上调可增加p107表达水平,反之则降低其水平<sup>[46]</sup>,提示不同组织可能通过多种机制快速调节p107丰度,与肝脏中CAPN3蛋白酶切割形成机制互补。

人类细胞中的研究表明,p107和pRb的功能

部分重叠,尤其在肿瘤抑制和细胞周期的调控中。p107对pRb的功能进行补充和增强,尤其是在细胞进入S期时,可防止不必要的增殖<sup>[47]</sup>。前面的实验结果显示,在斑马鱼中将*rb1*敲除对肝脏发育的影响是较为有限的[差异虽然有显著性,但是显著性水平不够高(\* $P < 0.05$ )],而同时敲除*rb2*的双突变也未能增强显著性。这或许暗示,在斑马鱼中,Rb1的地位类似于人类细胞中的p107,pRb才是主导地位,Rb1只是起补充和增强作用。

p130是与pRb和p107密切相关的第三个蛋白,它主要在细胞周期的G<sub>1</sub>期起作用。p130通过与E2F家族成员结合抑制其转录活性,从而抑制细胞周期进程。前面提到,*rb2*的缺失反而促进了胰腺的发育,提示*rb2*在斑马鱼胰腺早期发育中也可能充当抑制因子。

小鼠研究还发现,pRb、p107、p130可能分别在不同组织和细胞类型中发挥作用,这表明它们在细胞周期控制中的相互作用是非常复杂的<sup>[16]</sup>。本文前面的实验结果也发现Rb1和Rb2在不同消化器官(肝脏和肠道)中发挥关键作用,这与前人的研究相呼应。

回顾前述斑马鱼中的结果,*rb1*基因突变明确影响了斑马鱼的早期肝脏发育,而*rb2*基因的影响则不慎明朗。相较于其他基因的结果,*rb1*和*rb2*显然独树一帜。这在一定程度上互相佐证了两者的特殊性,它们是相似的基因,都展现出对早期消化器官发育的影响。本实验室的一个重要标签是“肝脏发育与再生”,一直以来的研究都是围绕肝脏及其他内胚层来源的消化器官展开的。在本研究中,我们并没有观察到其他系统器官在野生型和突变体之间存在差异。这可能是因为*rb1*、*rb2*基因的影响本身就较为有限[差异虽然有显著性,但是显著性水平不够高(\* $P < 0.05$ )],如果没有专用的探针进行检测并进行大规模的统计分析,仅凭肉眼很难注意到差异。Rb1和Rb2作为Rb蛋白家族的成员,Rb的全称是视网膜母细胞瘤(retinoblastoma),光从名称来看,就足以让人怀疑Rb1和Rb2很可能在眼睛的发育中也起作用。只是这并非本实验室关注的重点,所以并没有特地进行检测和统计分析。

在对成年雄性斑马鱼进行部分肝切除术后,相较于野生型,*rb1*纯合突变体展现出极高的死亡率,提示Rb1对肝脏功能有重要影响。最近一项研究指出,细胞周期总时长(Tc)是决定细胞致癌转化能力的关键因素:在特定致癌突变(如*Rb/p107*缺失)背景下,Tc最短的细胞系最具癌变倾向<sup>[34]</sup>。该发现提示,细

细胞周期的加速本身即是驱动肿瘤转化的重要协同因素,并可导致动物死亡风险升高。这与我们在*rb1l*<sup>-/-</sup>肝切除后观察到的高死亡率现象相符,它们共同揭示了细胞周期调控在应激与癌变中的核心作用。我们的想法进一步得到了RNA-seq数据的支持:代谢增强趋势上调,细胞因子响应下调,这种“代谢激活-信号改变”的不对称变化,可能导致*rb1l*突变体肝脏功能紊乱,进而导致肝切手术后的高死亡率。本研究发现*rb1l*缺失导致成年斑马鱼肝脏代谢网络重构与功能紊乱,这与之前报道的肝脏特异性缺失mDEF引发代谢异常的表型<sup>[13]</sup>具有相似性。这共同提示,DEF-CAPN3/Def-Capn3b通路可能通过降解包括p53、Rbl1在内的多个底物,在细胞周期调控与肝脏代谢稳态中发挥核心作用。接下来需要进一步深入研究Rbl1如何在肝细胞中影响这些过程。

本研究利用斑马鱼*capn3b*<sup>-/-</sup>突变体幼鱼发现敲除Capn3b导致Rbl1蛋白异常累积,提示Rbl1是Capn3b的底物,该研究方法在本实验室先前的研究中也使用过<sup>[8]</sup>。结合人类细胞实验中DEF可以诱导RBL1降解的实验结果,我们有理由相信,Rbl1蛋白稳定性和功能与Def-Capn3b途径之间存在联系。此外,*capn3b*<sup>-/-</sup>和*rb1l*<sup>-/-</sup>的表型存在相似和不同之处。首先,*capn3b*<sup>-/-</sup>和*rb1l*<sup>-/-</sup>斑马鱼都可活可育。其次,在3~5 dpf早期发育阶段,*capn3b*<sup>-/-</sup>斑马鱼的表型为:5 dpf时的免疫相关基因相较于野生型显著上调<sup>[48]</sup>;在34.5 °C高温处理下,3 dpf的*capn3b*<sup>-/-</sup>斑马鱼出现身体弯曲、心包水肿等表型,且2 dpf时肝脏和外分泌腺发育滞后,虽3 dpf时恢复正常,但这仍表明其早期发育会受到温度胁迫的短期影响;在低密度(每盘60颗鱼卵)养殖时,3 dpf和5 dpf的*capn3b*<sup>-/-</sup>肝脏显著小于野生型,而在高密度(每盘120颗鱼卵)养殖时,突变体肝脏反而显著大于野生型,说明其肝脏发育对密度变化异常敏感<sup>[8]</sup>。而*rb1l*<sup>-/-</sup>斑马鱼在4 dpf时肝脏发育相较于野生型显著滞后。最后,对于成年斑马鱼而言:*capn3b*<sup>-/-</sup>在PH后肝脏再生相较于野生型斑马鱼会延迟<sup>[8]</sup>;而*rb1l*<sup>-/-</sup>在PH后会出现高死亡率。两者的表型之间存在相似性,但差异则更为显著,这暗示Capn3b和Rbl1之间的关系并不是简单的一条线,而是各自都参与了其他的调控网络。

对*rb1l*和*rb12*的研究,为CAPN3/Capn3b调控细胞周期提供了新证据。结合过往对p53、Chk1、Wee1等因子的研究,这些发现进一步凸显了DEF-CAPN3/Def-Capn3b在细胞周期调控中的重要性。本

研究通过探究DEF-CAPN3/Def-Capn3b复合物在细胞周期调控中的功能及作用机制,为该复合物的功能多样性提供了新视角,同时极大增进了对它的认识。

## 参考文献 (References)

- [1] ZHU Q, TAO B, CHEN H, et al. Rcl1 depletion impairs 18S pre-rRNA processing at the A1-site and up-regulates a cohort of ribosome biogenesis genes in zebrafish [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(10): 5743-59.
- [2] BASSLER J, HURT E. Eukaryotic ribosome assembly [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 281-306.
- [3] DU Y, AN W, ZHU X, et al. Cryo-EM structure of 90S small ribosomal subunit precursors in transition states [J]. *Science*, 2020, 369(6510): 1477.
- [4] SINGH S, BROECK A V, MILLER L, et al. Nucleolar maturation of the human small subunit processome [J]. *Science*, 2021, 373(6560): 59.
- [5] ZHAO S, HUANG D, PENG J. Nucleolus-localized Def-CAPN3 protein degradation pathway and its role in cell cycle control and ribosome biogenesis [J]. *J Genet Genomics*, 2021, 48(11): 955-60.
- [6] GONZALEZ-ARZOLA K. The nucleolus: coordinating stress response and genomic stability [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2024, 1867(2): 195029.
- [7] ZHU Y, WANG Y, TAO B, et al. Nucleolar GTPase Bms1 displaces Ttf1 from RFB-sites to balance progression of rDNA transcription and replication [J]. *J Mol Cell Biol*, 2021, 13(12): 902-17.
- [8] CHEN F, HUANG D, SHI H, et al. Capn3 depletion causes Chk1 and Wee1 accumulation and disrupts synchronization of cell cycle reentry during liver regeneration after partial hepatectomy [J]. *Cell Regen*, 2020, 9(1): 8.
- [9] GUAN Y, HUANG D, CHEN F, et al. Phosphorylation of Def regulates nucleolar p53 turnover and cell cycle progression through Def recruitment of Calpain3 [J]. *PLoS Biol*, 2016, 14: e1002555.
- [10] ZHAO S, CHEN Y, CHEN F, et al. Sas10 controls ribosome biogenesis by stabilizing Mpp10 and delivering the Mpp10-Imp3-Imp4 complex to nucleolus [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(6): 2996-3012.
- [11] DING F, HUANG D, WANG M, et al. An 86 amino acids motif in CAPN3 is essential for formation of the nucleolus-localized Def-CAPN3 complex [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 623: 66-73.
- [12] TAO T, SHI H, GUAN Y, et al. Def defines a conserved nucleolar pathway that leads p53 to proteasome-independent degradation [J]. *Cell Res*, 2013, 23(5): 620-34.
- [13] WEI J, WANG S, ZHU H, et al. Hepatic depletion of nucleolar protein mDEF causes excessive mitochondrial copper accumulation associated with p53 and NRF1 activation [J]. *iScience*, 2023, 26(7): 107220.
- [14] SWAFFER M P, JONES A W, FLYNN H R, et al. CDK substrate phosphorylation and ordering the cell cycle [J]. *Cell*, 2016, 167(7): 1750-61.

- [15] XIAO Z X, GINSBERG D, EWEN M, et al. Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G<sub>1</sub> cyclin-associated kinases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(10): 4633-7.
- [16] COBRINIK D, LEE M H, HANNON G, et al. Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development [J]. Genes Dev, 1996, 10(13): 1633-44.
- [17] HER G M, CHIANG C, CHEN W, et al. *In vivo* studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish (*Danio rerio*) [J]. FEBS Lett, 2003, 538(1/2/3): 125-33.
- [18] COX A G, TSOMIDES A, KIM A J, et al. Selenoprotein H is an essential regulator of redox homeostasis that cooperates with p53 in development and tumorigenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(38): E5562-71.
- [19] VENKATACHALAM A B, SAWLER D L, WRIGHT J M. Tissue-specific transcriptional modulation of fatty acid-binding protein genes, fabp2, fabp3 and fabp6, by fatty acids and the peroxisome proliferator, clofibrate, in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Gene, 2013, 520(1): 14-21.
- [20] BIEMAR F, ARGENTON F, SCHMIDTKE R, et al. Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet [J]. Dev Biol, 2001, 230(2): 189-203.
- [21] MO D, LÜ M, MAO X. Using different zebrafish models to explore liver regeneration [J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1485773.
- [22] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology [J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 25-9.
- [23] GUO K, LIU J, YAO Z, et al. Effect of soluble dietary fiber extracted from *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler on lipid metabolism and liver protection in mice on high-fat diet [J]. Front Nutr, 2025, 12: 1537569.
- [24] BURCHAT N, VIDOLA J, PFREUNDSCHUH S, et al. Intestinal stearyl-CoA desaturase-1 regulates energy balance via alterations in bile acid homeostasis [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2024, 18(6): 101403.
- [25] ZHANG Y, LIU Y, DUAN J, et al. Cholesterol depletion sensitizes gallbladder cancer to cisplatin by impairing DNA damage response [J]. Cell Cycle, 2019, 18(23): 3337-50.
- [26] YANG G, WAN Y Y. Noninvasive biomarkers implicated in urea and TCA cycles for metabolic liver disease [J]. Biomark Res, 2024, 12(1): 145.
- [27] WYSS M, KADDURAH-DAOUK R. Creatine and creatinine metabolism [J]. Physiol Rev, 2000, 80(3): 1107-213.
- [28] ZOU T, GU L, YANG L, et al. Alpha-solanine anti-tumor effects in non-small cell lung cancer through regulating the energy metabolism pathway [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2022, 17(4): 396-409.
- [29] WU X, LI Y, WANG W, et al. DRAM1 enhances the proliferation and metastasis of gastric cancer through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and energy metabolism [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 3542.
- [30] WANG M, JIA J, CUI Y, et al. CD73-positive extracellular vesicles promote glioblastoma immunosuppression by inhibiting T-cell clonal expansion [J]. Cell Death Dis, 2021, 12: 1065.
- [31] ZHAO L, HAO Y, TANG S, et al. Energy metabolic reprogramming regulates programmed cell death of renal tubular epithelial cells and might serve as a new therapeutic target for acute kidney injury [J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1276217.
- [32] DONOVAN A, LIMA C A, PINKUS J L, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis [J]. Cell Metab, 2005, 1(3): 191-200.
- [33] ZHANG R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(4): 786-92.
- [34] CHEN D, LU S, HUANG K, et al. Cell cycle duration determines oncogenic transformation capacity [J]. Nature, 2025, 641(8065): 1309-18.
- [35] GOMEZ-BORONAT M, DE PEDRO N, ALONSO-GOMEZ A L, et al. Nuclear receptors (PPARs, REV-ERBs, RORs) and clock gene rhythms in goldfish (*Carassius auratus*) are differently regulated in hypothalamus and liver [J]. Front Physiol, 2022, 13: 927448.
- [36] YU F M, PERERA E, MATA-SOTRES J A, et al. The circadian transcriptome of marine fish (*Sparus aurata*) larvae reveals highly synchronized biological processes at the whole organism level [J]. Sci Rep, 2017, 7: 12943.
- [37] BASS J, TAKAHASHI J S. Circadian integration of metabolism and energetics [J]. Science, 2010, 330(6009): 1349-54.
- [38] ZHANG E E, KAY S A. Clocks not winding down: unravelling circadian networks [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(11): 764-76.
- [39] MAURY E, RAMSEY K M, BASS J. Circadian rhythms and metabolic syndrome from experimental genetics to human disease [J]. Circ Res, 2010, 106(3): 447-62.
- [40] MORRIS R, KERSHAW N J, BABON J J. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway [J]. Protein Sci, 2018, 27(12): 1984-2009.
- [41] QIN H, HOLDBROOKS A T, LIU Y, et al. SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation [J]. J Immunol, 2012, 189(7): 3439-48.
- [42] CAROW B, ROTTENBERG M E. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation [J]. Front Immunol, 2014, 5: 58.
- [43] GOLESTANEH N, TANG Y, KATURI V, et al. Cell cycle deregulation and loss of stem cell phenotype in the subventricular zone of TGF-beta adaptor *elf*<sup>-/-</sup> mouse brain [J]. Brain Res, 2006, 1108(1): 45-53.
- [44] PADI S K R, GODEK R J, PETI W, et al. Cryo-EM structures of PP2A:B55 with p107 and Eya3 define substrate recruitment [J]. Nat Struct Mol Biol, 2025, 32(8): 1373-82.
- [45] AGRAWAL R, SENGUPTA S. p53 regulates DREAM complex-mediated repression in a p21-independent manner [J]. EMBO J, 2025, 44(8): 2279-97.
- [46] YANG L, GAO Y, LU J, et al. Aurora kinase A promotes epithelial-mesenchymal transition by regulating P130 and P107 molecules in thyroid cancer cells [J]. Exp Ther Med, 2025, 29(5): 214.
- [47] ZHU L, VAN DEN HEUVEL S, HELIN K, et al. Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein [J]. Genes Dev, 1993, 7(7A): 1111-25.
- [48] CHEN Y, HUANG D, XIE A, et al. Capn3b-deficient zebrafish model reveals a key role of autoimmune response in LGMDR1 [J]. J Genet Genomics, 2024, 51(12): 1375-88.