DOI:10.16016/j.2097-0927.202405033

CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 cdc42 基因对骨软骨发育的影响

杨云飞,李 仪,孙先定,陈世荣 400016 重庆,重庆医科大学附属第二医院骨科关节外科中心

[**摘要**] **目的** 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 cdc42 基因,探讨其对早期骨软骨发育的影响。**方法** 通过多序列比对分析 cdc42 的种属保守性,设计 cdc42 基因的 gRNA,利用 CRISPR/Cas9 技术构建 cdc42 敲除的斑马鱼突变体。应用整胚原位杂交检测 cdc42 的表达模式,繁殖并利用转基因标记鱼系 Tg(col2a1a:GFP)观察软骨发育表型,并通过茜素红染色观察椎体矿化。**结果** 多序列比对分析显示 cdc42 在人、小鼠和斑马鱼中高度保守,原位杂交结果显示 cdc42 在斑马鱼头颅及身体中广泛表达,包括下颌软骨区域。成功设计 cdc42 的 gRNA 并利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 cdc42 基因敲除的斑马鱼突变体。cdc42 突变体在受精后第 3 天表现出体长短小($P<0.01$)和头颅发育迟缓,头部和眼睛小($P<0.01$),以及下颌发育凹陷。Tg(col2a1a:GFP)斑马鱼显示突变体梅克尔软骨和角舌软骨细胞形态异常,软骨细胞排列紊乱,其角舌软骨夹角增大、长度缩短($P<0.01$)。纯合突变体在受精后 10~13 d 死亡。茜素红染色结果提示突变体椎体矿化数量减少以及软骨内骨化面积减少($P<0.01$)。**结论** 通过 CRISPR/Cas9 技术成功敲除了斑马鱼 cdc42 基因,导致下颌软骨发育迟缓、椎体矿化延迟以及软骨内成骨减少。

[**关键词**] cdc42;复发性多软骨炎;CRISPR/Cas9;骨软骨发育
[**中图法分类号**] R322.71; R394-33; R394.1 [**文献标志码**] A

Effects of cdc42 gene knockout by CRISPR/Cas9 technology on osteochondral development in zebrafish

YANG Yunfei, LI Yi, SUN Xianding, CHEN Shirong Center of Orthopedic and Joint Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To knock out cdc42 gene in zebrafish using CRISPR/Cas9 technology, and investigate the effect of cdc42 on early osteochondral development. **Methods** After the conservation of cdc42 gene sequence of different species was analyzed by multiple sequence alignment analysis, guide RNA of cdc42 gene was designed, and cdc42 knockout zebrafish was constructed by CRISPR/Cas9 technology. The expression pattern of cdc42 was detected by whole-mount *in situ* hybridization, and the chondrogenesis phenotype was observed by transgenic labeled fish line Tg (col2a1a:GFP), and vertebral mineralization was observed by alizarin red staining. **Results** Multiple sequence alignment analysis showed that cdc42 was highly conserved in human, mouse and zebrafish, and *in situ* hybridization results showed that cdc42 was expressed in a variety of tissues in the head and whole body, including mandibular cartilage. With the aid of guide RNA of cdc42, cdc42 knockout zebrafish was successfully constructed by CRISPR/Cas9 technology. The cdc42 mutants exhibited shortened body length ($P<0.01$) and delayed cranial development at 3 d post fertilization, with small heads and eyes ($P<0.01$), as well as delayed mandibular development. The Tg (col2a1a:GFP) zebrafish showed that the mutants presented abnormal morphology of Meckel's cartilage and

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年基金(82002307);国家自然科学基金面上项目(82372397);重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX0121);重庆英才计划"包干制项目"(cstc2022ycjh-bgzxm0052)

[**通信作者**] 孙先定,E-mail:xianding1004@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

ceratohyal cartilage cells, with disordered arrangement of chondrocytes and increased angle and decreased length in ceratohyal cartilage ($P<0.01$). The homozygous mutants died at 10~13 d after fertilization. The results of alizarin red staining suggested delayed vertebral mineralization and reduced endochondral ossification of the mutants. **Conclusion** CRISPR/Cas9 technology successfully knocks out the cdc42 gene in zebrafish, resulting in delayed development of jaw cartilage, delayed mineralization of the vertebrae, and decreased endochondral ossification.

[**Key words**] cdc42; relapsing polychondritis; CRISPR/Cas9; osteochondral development

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82002307), the General Program of National Natural Science Foundation of China (82372397), the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0121), and the Lump Sum Contract Project of Chongqing Talent Program (cstc2022ycjh-bgzxm0052). Corresponding author: SUN Xianding, E-mail: xianding1004@163.com

复发性多软骨炎(relapsing polychondritis, RP)是一种复杂的免疫介导的全身性疾病,对全身的软骨组织有影响[1],但其确切的病因和发病机制仍不清楚,部分原因是该病的罕见性和异质性[2]。目前文献中至少描述了39例细胞分裂周期蛋白42(cell division cycle 42, CDC42)突变的患者,多数致病性CDC42突变显示出蛋白功能被破坏[3-4]。CDC42属于Rho家族的三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)酶,在多种关键细胞功能中起着关键作用,如肌动蛋白细胞骨架的重排、细胞极性、细胞运动、囊泡运输、细胞周期调节、转录激活和迁移[5]。研究发现,CDC42在调节信号转导通路之间具有重要作用,比如CDC42通过Wnt/β-catenin调节早期牙细胞的牙源性分化和增殖[6],在甲状腺癌中通过PTEN/AKT通路影响细胞的增殖及迁移[7]。体外生物学研究发现其在软骨细胞的增殖、肥大和凋亡中起着重要作用[8],但体内生物学研究中敲除Cdc42会导致小鼠胚胎的早期死亡(E7.5)[9]。现有研究表明,Cdc42对软骨内成骨至关重要[10],但目前尚缺乏对cdc42在骨软骨早期发育阶段的研究。斑马鱼因其产卵量大、胚胎透明而在研究中受到青睐,其胎胎在受精后可从1细胞期开始观察表型,且在受精后24 h内胚胎发育至可观察的形态[11]。因此,本研究利用斑马鱼研究cdc42在早期发育过程中对骨软骨发育的影响,为cdc42在早期骨软骨发育的研究提供实验支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 野生型斑马鱼(AB品系)和软骨标记的转基因斑马鱼Tg(col2a1a:GFP)被饲养在上海海圣斑马鱼养殖系统中,保持恒温(27~28 ℃)和14:10的光暗周期。所有斑马鱼鱼系按照标准规程饲养和维护,胚胎在养殖水中孵育,早期发育阶段在28.5 ℃的恒温孵箱中孵化。

1.1.2 主要试剂 PRIMESTR酶、R-*Taq*酶、PSBT购自日本TaKaRa公司,DNA快速提纯试剂盒购自中国TIANGEN公司,RNA快速提纯试剂盒、Cas9蛋白购自美国NEB公司,茜素红粉末、蛋白酶K购自中国上海生工公司,琼脂糖购自中国索莱宝公司,地高辛标记的NTP、抗地高辛抗体、转录试剂盒购自瑞士Roche公司, blocking封闭液、SSCT溶液、MABT溶液、4%PFA溶液、3%H_2O_2/1%KOH溶液、甘油、NBT/BCIP、低熔点琼脂糖粉末购自中国碧云天公司。

1.1.3 主要仪器 显微注射仪器购自美国Thermo Fisher公司,P-97微电极拉针仪购自北京美亚先科技有限公司,PCR仪器、琼脂糖凝胶电泳仪器、凝胶成像仪器购买自美国Bio-Rad公司,荧光体式显微镜购买自德国Leica公司。

1.2 方法

1.2.1 序列比对分析 使用ClustalW软件进行多重序列比对分析。从Ensemble基因库(https://www.ensembl.org/)中下载人类ENST00000656825.1、小鼠ENSMUST00000051477.13和斑马鱼ENSDART00000155746.3的蛋白质氨基酸序列进行比对。相同氨基酸序列用灰度标尺标记。

1.2.2 整胚原位杂交 设计并合成针对斑马鱼基因cdc42表达的mRNA的反义探针进行整胚原位杂交。探针引物序列正义链为:5′-GATGAGGCGATTTTGGCAGC-3′,反义链为:5′-CCGAGCGACGCATTAGAACA-3′。原位杂交方法如前所述:收集胚胎固定后在-20 ℃保存于甲醇中。PBST复水后使用蛋白酶K消化,再次固定后使用地高辛标记的反义探针在68.5 ℃的杂交缓冲液中进行过夜。使用SSCT和MABT溶液进行洗涤,用blocking溶液进行封闭,然后使用抗地高辛抗体在4 ℃孵育过夜。将胚胎浸泡在NBT/BCIP中并置于37 ℃恒温箱中显色0.5 h,使用PBST快速漂洗终止反应。将标本转移到80%甘油/20%PBST中,待其透明后进行拍照。

1.2.3　使用CRISPR/Cas9技术生成cdc42的F0代突变体

1.2.3.1　gRNA的设计及合成　　使用靶点预测网站(CRISPOR.tefor.net),针对每一个编码的外显子序列进行单独预测分析,以GG或GC开头的20个碱基的序列进行评估,最终在斑马鱼的2号、3号和5号外显子上共设计了4个靶点。采用PCR产物体外转录的方法合成gRNA,在设计靶点的前方加上T7启动子序列5′-TAATACGACTCACTATA-3′来识别碱基GG,或加上SP6启动子序列5′-ATTTAGGTGACACTATA-3′识别碱基GA;并在靶点尾部添加骨架序列5′-GTTTT-AGAGCTAGAAATAGC-3′以构成PCR反应的正向引物,设计制备gRNA体外转录模板引物序列(表1)。使用PRIMESTR酶进行PCR扩增。使用DNA快速提纯试剂盒提纯,使用转录试剂盒获得gRNA。

表1　cdc42 gRNA靶位点引物设计序列

靶位点	序列(5′→3′)
T1	GGGGAATTTATTAGTTGTAT
T2	GGTGGTGAGCCGTACACCCT
T3	GAAACCCATCACTCCAGAGA
T4	GAAACCCATCACTCCAGAGA
反向通用引物	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCA AGTTGATAACGGACAGCCTTATTTTAACT TGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

1.2.3.2　gRNA/Cas9酶混合体系的显微注射　　将有效的gRNA和Cas9蛋白混合物显微注射入野生型斑马鱼受精后单细胞期胚胎动物极中,每个gRNA靶点注射200枚斑马鱼单细胞期受精卵,每枚胚胎注射1~2 nL的混合物,即为F0代突变体。

1.2.4　斑马鱼突变体的鉴定　　取F0代受精后48~60 h的存活胚胎10枚,提取胚胎基因组DNA作为PCR的DNA模板,针对靶点区域设计相应的鉴定引物进行PCR扩增反应(表2),利用Sanger测序鉴定敲除情况。鉴定F1幼鱼基因型:取1个月左右的斑马鱼,剪少量尾鳍或拔除部分鱼鳞获取基因组DNA并进行PCR扩增,利用Sanger测序鉴定每条鱼的突变类型;称取1.5 g琼脂糖粉末溶解于100 mL蒸馏水中配置1.5%琼脂糖凝胶,吸取2 μL PCR原液于凝胶孔中,并使用琼脂糖凝胶电泳仪进行20 min电泳,使用凝胶成像仪显影鉴定突变类型。

1.2.5　茜素红染色　　收集受精后第11天的斑马鱼胚胎,用4% PFA溶液固定过夜。随后使用3%H_2O_2/1%KOH溶液漂白去除色素,再用配置的0.1%茜素红/1%KOH溶液进行染色20~30 min。之后用PBST清洗5次,最后保存在甘油中进行拍照观察。

1.2.6　软骨发育表型观察　　繁殖绿色(GFP)荧光标记软骨的突变体鱼系Tg(col2a1a:GFP),以观察软骨发育表型。幼鱼经三卡因麻醉后,使用1%低熔点琼脂糖固定在共聚焦皿中,利用Leica荧光体式显微镜成像观察软骨发育表型的不同时间点。

表2　cdc42 gRNA鉴定引物序列

靶位点	引物序列(5′→3′)
gRNA1	上游:CCTGGAAGAGAAGCGAATACTGTAAC
	下游:TGCAGATCTTGAATGAGAGCAGTG
gRNA2	上游:GTCATGCCATGACCTGTCTCG
	下游:CCCATCAGCATATGAACTCCACC
gRNA3、4	上游:GAGATCACCCACCACTGTCC
	下游:TGATAAATGACCAACTAGAGAGGCAG

1.3　统计学分析　　每个实验至少重复3次,采用GraphPad Prism 8.0软件进行分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用Student's t检验。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　斑马鱼cdc42基因在多个物种间高度保守

为了明确cdc42基因在物种间的保守性,对人(191aa)、小鼠(191aa)和斑马鱼(191aa)的cdc42基因翻译的氨基酸序列进行了多重序列比对,相同的氨基酸残基使用阴影标记,结果显示:斑马鱼cdc42基因的氨基酸序列在小鼠和人类之间的同源性高达98.95%。只有2个位置上的氨基酸不同,分别为185号位和187号位置。人和小鼠的丝氨酸在斑马鱼中变成赖氨酸,而人和小鼠的精氨酸在斑马鱼中也变成了赖氨酸(图1)。因此,斑马鱼cdc42基因在多个物种间高度保守,并且可能具有相同或相似的生物学效应。

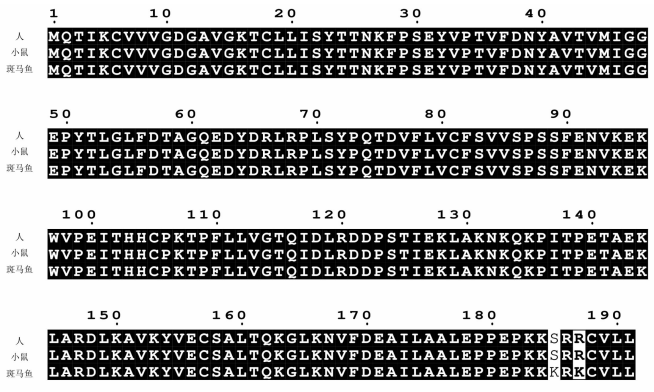


图1　斑马鱼cdc42基因在多个物种间高度保守

2.2 cdc42 的表达模式和 cdc42 突变体测序分析

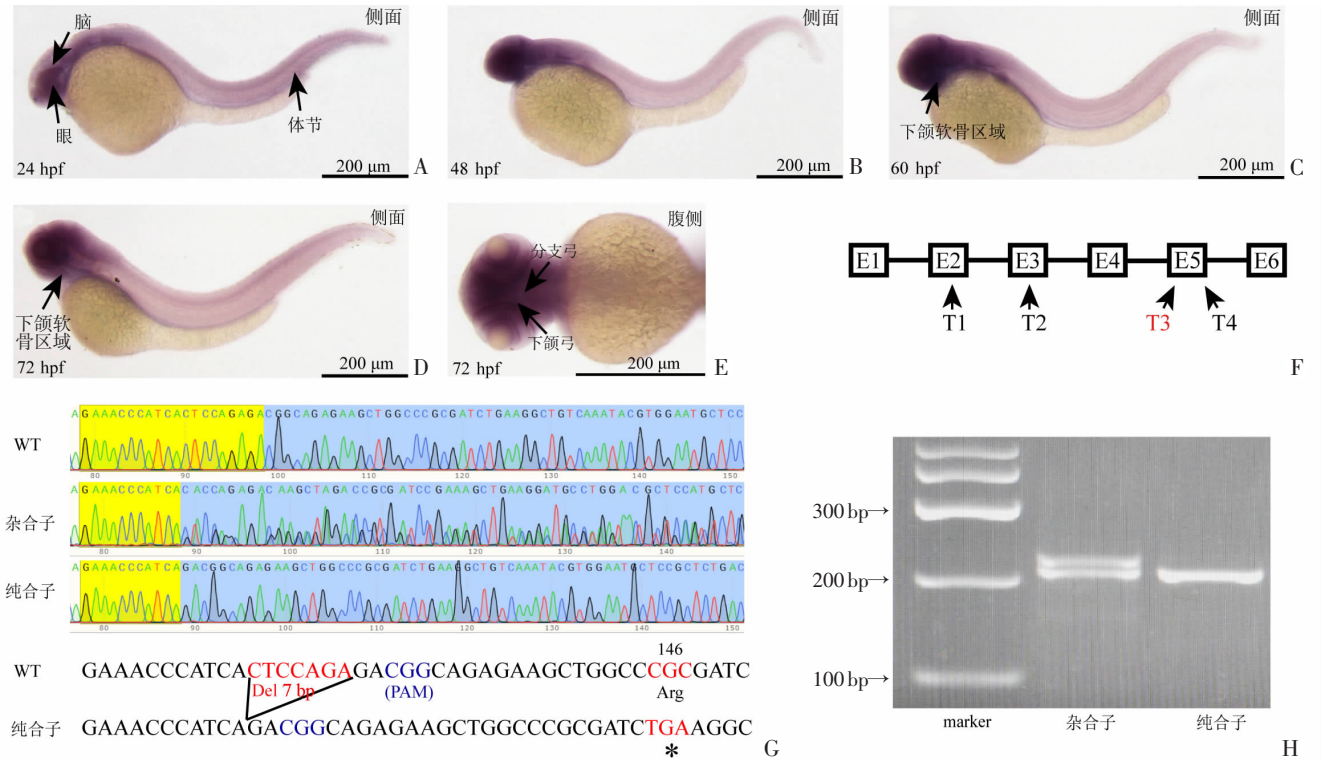
为了探究 cdc42 在体内的功能,使用野生型(wild type,WT)斑马鱼胚胎进行整胚原位杂交。结果显示:cdc42 在受精后第 24 小时广泛分布于眼睛、脑组织和体节(图 2A)。随着时间的推移,其在头颅区域的表达逐渐增加,覆盖下颌软骨区域(图 2B、C)。在胚胎受精后第 72 小时,cdc42 在头颅及身体中的表达下降(图 2D),但在下颌软骨区域的下颌弓和分支弓仍能检测到其表达(图 2E)。在斑马鱼的 3 个外显子(E2、E3、E5)中设计了 4 个 gRNA 靶点(图 2F),并使用 CRISPR/Cas9 技术在斑马鱼体内敲除 cdc42 基因。Sanger 测序结果显示,5 号外显子存在 7 个碱基的缺失突变,导致基因组出现框移突变,并在编码的第 146 个氨基酸精氨酸(Arg)处提前形成终止密码子(图 2G)。设计针对靶点的 PCR 引物序列,通过裂解基因组 DNA 进行 PCR 扩增,并通过琼脂糖凝胶电泳验证突变(图 2H)。

2.3 cdc42 斑马鱼突变体下颌软骨发育迟缓

为了明确 cdc42 斑马鱼突变体早期发育的表型,对比观察纯合突变体 WT 胚胎的形态发育。结果发现,在胚胎受精后第 3 天,斑马鱼突变体发育延迟,相较于同期 WT 发育晚 12~24 h,表现出明显的下颌凹陷发育迟缓(图 3A)。在胚胎受精后第 6 天,突变体无法形成鱼鳔,且下颌软骨依然存在发育凹陷(图 3B)。对受精后第 3 天的斑马鱼胚胎各项数据统计结果显示,突变体相较于 WT,体长短小($P<0.01$,图 3C)、眼睛缩小($P<0.01$,图 3D)、头颅变小($P<0.01$,图 3E)。然而,斑马鱼突变体在存活到受精后第 10~13 天后便发生死亡。

2.4 cdc42 斑马鱼突变体出现软骨发育异常

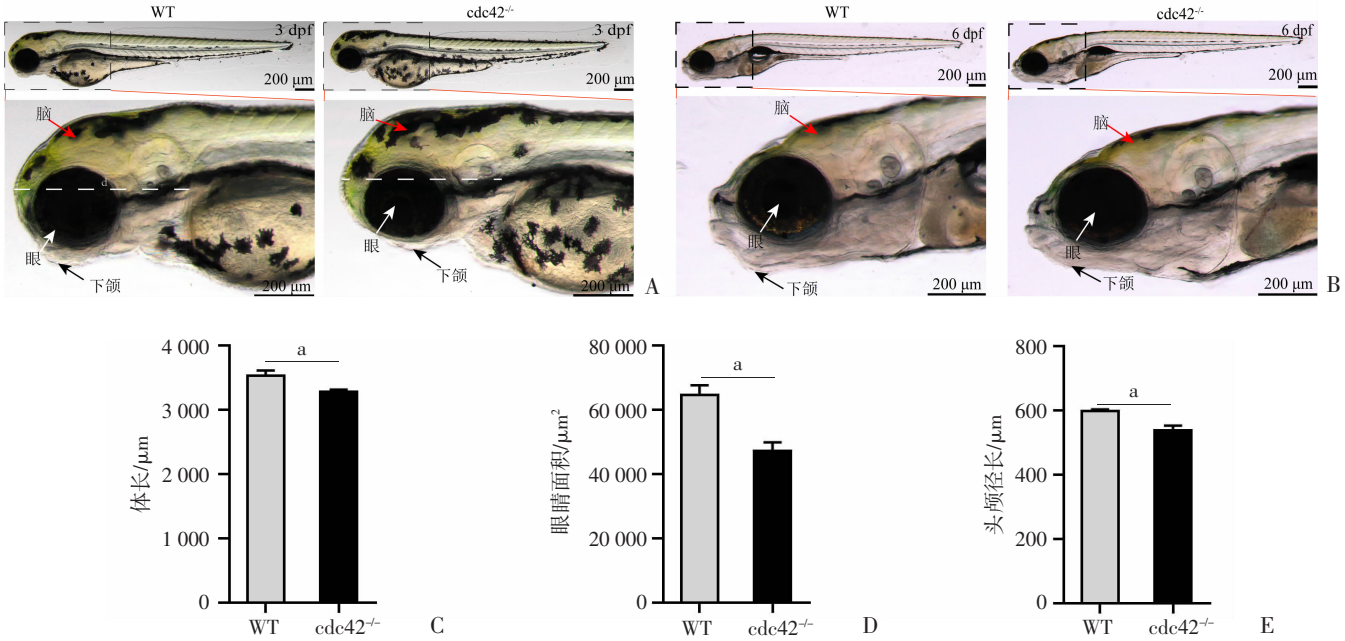
为了探究突变体早期软骨发育情况,通过 Leica 荧光体式显微镜观察荧光标记软骨的 Tg(col2a1a:GFP)斑马鱼突变体。连续对比观察结果显示,在受精后第 3 天和第 5 天,WT 斑马鱼的下颌软骨(梅克尔软骨和角舌软骨)呈现规则的形状发育,软骨细胞大小



A~D:斑马鱼 cdc42 的反义探针在 WT 斑马鱼胚胎受精后第 24、48、60、72 小时的整胚原位杂交检测结果 hpf:受精后小时数;E:D 图头颅区域腹侧视图直接放大视图;F:cdc42 突变靶点的设计位置 T3 靶点为突变位点;G:野生型和 cdc42 等位基因突变的 Sanger 测序结果;H:cdc42 突变后基因组 PCR 跑胶结果鉴定图

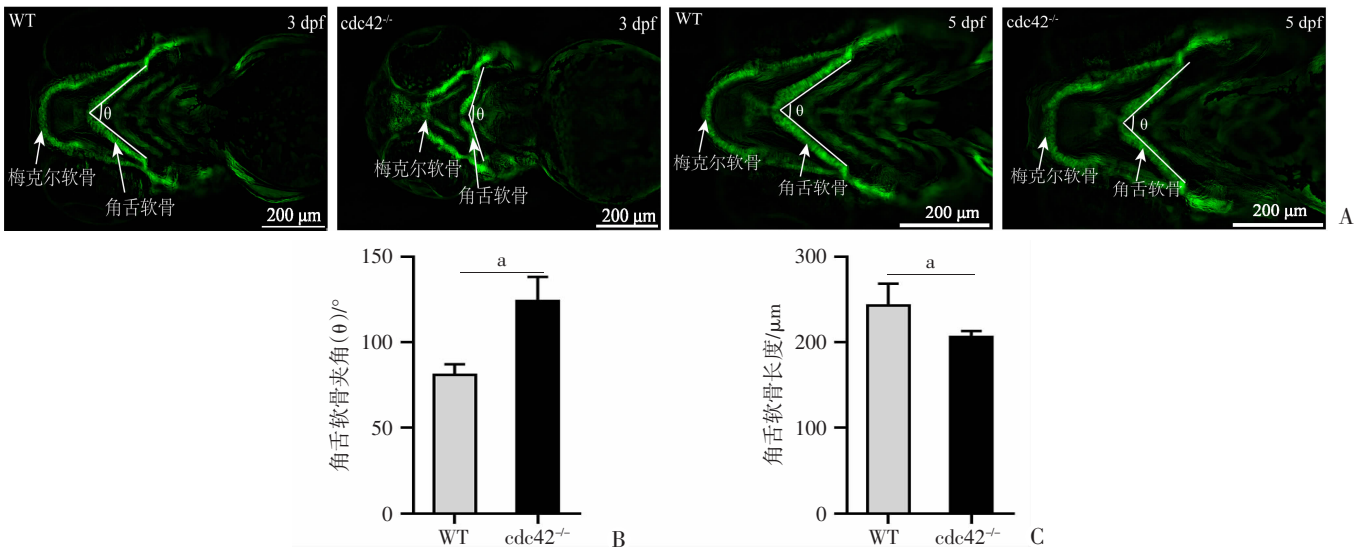
图 2 cdc42 的表达模式和使用 CRISPR/Cas9 技术构建 cdc42 斑马鱼突变体的等位基因鉴定

均匀,角舌软骨排列呈现直线。而在突变体胚胎在受精后第 3 天梅克尔软骨和角舌软骨出现发育异常,角舌软骨形态不规则。继续观察至受精后第 5 天,结果显示其下颌软骨荧光表现异常,梅克尔软骨细胞数量异常,软骨细胞多层排列,大小不一且排列紊乱;角舌软骨细胞形态异常、排列紊乱,角舌软骨向内凹陷(图 4A)。突变体的角舌软骨夹角增大($P<0.01$,图 4B),角舌软骨长度缩短($P<0.01$,图 4C)。



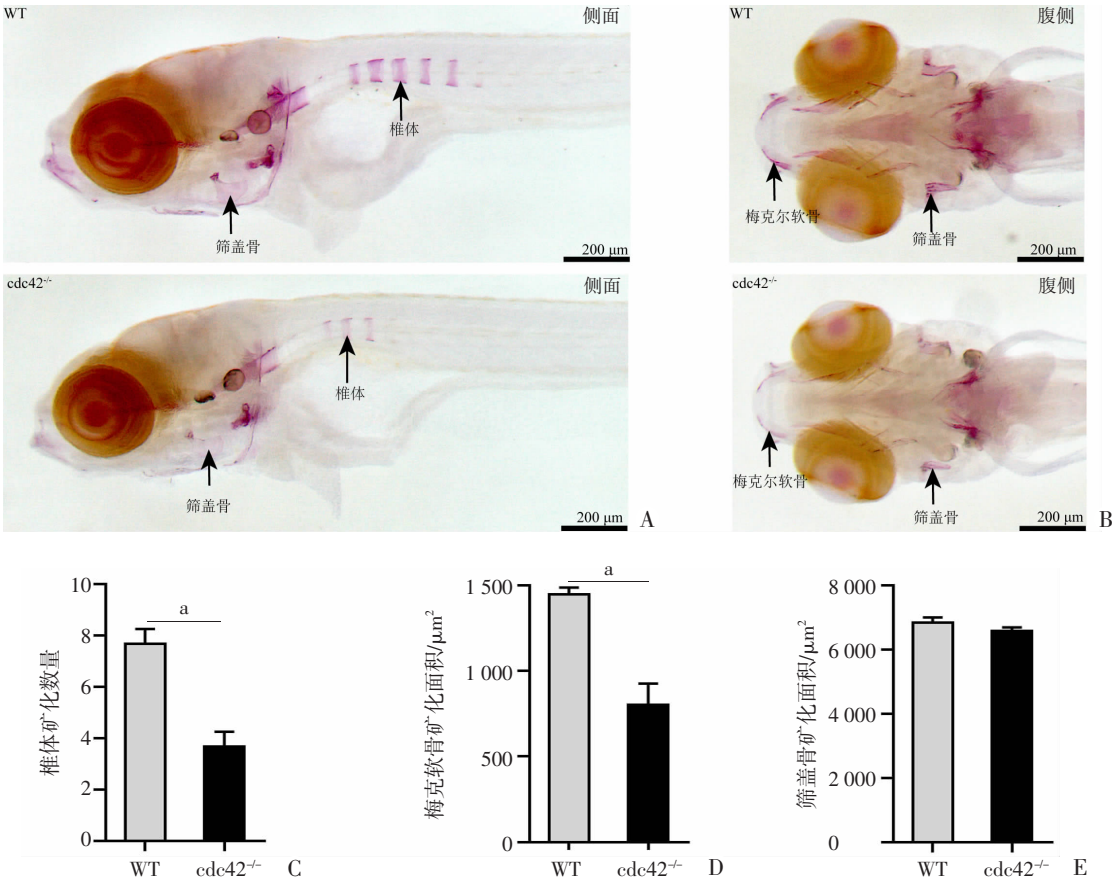
A:斑马鱼 cdc42 突变体和 WT 胚胎在发育到受精后第 3 天的头颅、眼睛、下颌和身体的明场照片　白色虚线:示头颅径长;dpf:受精后天数;$cdc42^{-/-}$:cdc42 纯合突变体;B:cdc42 突变体和 WT 斑马鱼在受精后第 6 天的明场照片;C~E:在胚胎受精后第 3 天的斑马鱼身体长度、眼睛面积、头颅径长统计图($n=3$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$

图 3　cdc42 斑马鱼突变体下颌软骨发育迟缓



A:Tg(col2a1a:GFP)标记的 cdc42 突变体和 WT 斑马鱼在受精后第 3 天和第 5 天的软骨荧光观察　$cdc42^{-/-}$:cdc42 纯合突变体;B、C:斑马鱼胚胎在受精后第 5 天角舌软骨夹角、角舌软骨长度统计($n=3$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$

图 4　cdc42 斑马鱼突变体下颌软骨发育异常



A、B:cdc42 突变体和 WT 胚胎在受精后第 11 天的茜素红染色侧面和腹侧颅面视图 $cdc42^{-/-}$:cdc42 纯合突变体;C:椎体矿化数量的统计分析结果;D:梅克尔软骨矿化面积的统计分析结果;E:筛盖骨矿化面积的统计分析结果

图 5 cdc42 斑马鱼突变体影响椎体矿化和软骨内成骨 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

2.5 cdc42 敲除影响斑马鱼椎体矿化和软骨内成骨

为了研究 cdc42 对成骨发育的影响,通过茜素红染色进行观察。结果显示,在受精后第 11 天,斑马鱼突变体的椎体矿化数量明显比 WT 斑马鱼少($P<0.01$,图 5A、C);胚胎的腹侧颅面视图显示:突变体的梅克尔软骨矿化面积更小($P<0.01$,图 5B、D),但参与膜内成骨的筛盖骨矿化面积在二者间差异无统计学意义(图 5E)。

3 讨论

近年来,由于与人类基因高度同源,斑马鱼被广泛应用于各个研究领域。斑马鱼具有产卵量大且胚胎期透明的生物学优势,已成为表征表型的理想工具。同时,CRISPR/Cas9 基因编辑技术在斑马鱼中的广泛应用,通过敲除斑马鱼基因进行表型分析,为了解人类同源基因在体内的生物学作用奠定了基础[12]。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 cdc42 基因敲除的斑马鱼模型,以研究其对早期骨软骨发育的影响。研究发现,cdc42 斑马鱼突变体在早期阶段出现下颌发育迟缓,相较于同期的 WT 斑马鱼延迟约 12~24 h。通过 Tg(col2a1a:GFP)斑马鱼的荧光观察,发现突变体的梅克尔软骨和角舌软骨中的软骨细胞大小不一、排列紊乱。茜素红染色结果显示,斑马鱼突变体的椎骨矿化减少,并影响软骨内成骨。

据报道,CDC42 突变导致的身材矮小、头面部轻微畸形(圆脸扁平、睑裂轻度上翘、鼻尖宽)以及耳廓炎症被认为是 RP 的诊断特征。然而对 RP 的病理生理机制尚不完全了解。因此,对 RP 的快速诊断和有效治疗依然面临着巨大挑战。病例报告显示,MRI 对儿童 RP 早期诊断具有参考价值,但仅限于骨膜和软骨骨骺的异常高信号表现[13]。此外,随着第 2 代测序技术的应用,与人类疾病相关基因的鉴定率显著提高。特别是外显子组测序已成为揭示孟德尔疾病分子基础的有效策略,尤其适用于罕见临床表现或无法统一临

床诊断的个体[14]。本研究发现,cdc42 斑马鱼突变体表现出体长短小的特征,这与人类 RP 患者的表型一致。此发现进一步支持了 CDC42 在 RP 发病机制中的重要作用。许多患有巨细胞减少症、智力生长迟缓和面部特征畸形的患者也发现了 CDC42 的突变[4]。本研究结果显示,与同时期 WT 斑马鱼相比,cdc42 斑马鱼突变体的脑组织和眼睛发育较小,结合原位杂交结果显示其在脑组织中的表达,表明 cdc42 可能影响神经系统发育,这与 RP 患者智力生长减退的表现具有一定的联系。此外,之前的研究中,敲除小鼠颅神经嵴中的 Cdc42 会影响 Ihh 和 Bmp 信号通路,导致颅骨成骨的发育异常[15]。本实验结果也显示出突变体斑马鱼头颅变小、发育异常。尽管斑马鱼没有四肢和长骨,但其角舌软骨类似哺乳动物,具有相同的骨骺和生长板[16]。为了检测突变体斑马鱼的软骨发育,本研究繁殖并使用荧光标记软骨 Tg(col2a1a:GFP)的斑马鱼突变体进行观察。结果显示,突变体幼鱼早期存活阶段出现软骨发育异常,包括软骨细胞排列紊乱和形态异常,特别是角舌软骨形状不规则、角舌软骨夹角增大、长度缩小。既往的研究表明,过表达 Rac1 和 Cdc42 会增加软骨细胞凋亡和肥大分化的风险[17],另有研究发现,敲除小鼠中的 Cdc42 基因会减少软骨细胞的分化及凋亡[18],因此,本研究推测,cdc42 缺失可能导致软骨细胞程序性死亡和细胞增殖的异常。本研究动态展示了 cdc42 对软骨早期发育过程的持续影响与小鼠中所表现的结果有所不同。此外,Cdc42 不仅影响软骨发育,还对成骨过程有作用。斑马鱼的椎体形成无需经过软骨中间体,而是直接矿化形成[19]。经典的 Wnt/β-catenin 在调成骨方面具有重要作用[20]。本研究发现,突变体的椎体矿化减少,可能是因为 cdc42 敲低下调了 Wnt/β-catenin 信号。同时,本研究还发现,突变体存在软骨内成骨异常,这可能与软骨发育异常或缺陷有关。

综上所述,cdc42 在骨软骨早期的发育中至关重要。CRISPR/Cas9 技术的敲除可以产生稳定的突变表型,为 cdc42 在软骨早期发育阶段提供了可靠的实验支持。

参考文献:

[1] HASLAG-MINOFF J, REGUNATH H. Relapsing polychondritis [J]. N Engl J Med, 2018, 378(18): 1715. DOI: 10.1056/NEJMicm1713302.

[2] MERTZ P, SPARKS J, KOBRIN D, *et al*. Relapsing polychondritis: best practice & clinical rheumatology [J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2023, 37(1): 101867. DOI: 10.1016/j.berh.2023.101867.

[3] VAN WIJCK R T A, SWAGEMAKERS S M A, VAN DER SPEK P J, *et al*. A CDC42 stop-loss mutation in a patient with relapsing polychondritis and autoinflammation[J]. J Clin Immunol, 2023, 43(1): 69-71. DOI: 10.1007/s10875-022-01344-z.

[4] MARTINELLI S, KRUMBACH O H F, PANTALEONI F, *et al*. Functional dysregulation of CDC42 causes diverse developmental phenotypes[J]. Am J Hum Genet, 2018, 102(2): 309-320. DOI: 10.1016/j.ajhg.2017.12.015.

[5] MASRI R E, DELON J. RHO GTPases: from new partners to complex immune syndromes[J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(8): 499-513. DOI: 10.1038/s41577-021-00500-7.

[6] ZHOU T, CHEN G Q, XU Y C, *et al*. CDC42-mediated Wnt signaling facilitates odontogenic differentiation of DPCs during tooth root elongation[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 255. DOI: 10.1186/s13287-023-03486-2.

[7] HUANG D Y, QIU H L, MIAO L, *et al*. Cdc42 promotes thyroid cancer cell proliferation and migration and tumor-associated macrophage polarization through the PTEN/AKT pathway [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(8): e23115. DOI: 10.1002/jbt.23115.

[8] WANG G Y, BEIER F. Rac1/Cdc42 and RhoA GTPases antagonistically regulate chondrocyte proliferation, hypertrophy, and apoptosis[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(6): 1022-1031. DOI: 10.1359/JBMR.050113.

[9] CHEN F, MA L, PARRINI M C, *et al*. Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability[J]. Curr Biol, 2000, 10(13): 758-765. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00571-6.

[10] NAGAHAMA R, YAMADA A, TANAKA J, *et al*. Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 470(4): 813-817. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.111.

[11] KIMMEL C B, BALLARD WW, KIMMEL S R, *et al*. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Dev Dyn, 1995, 203(3): 253-310. DOI: 10.1002/aja.1002030302.

[12] 梁森, 李帅庭, 袁志, 等. CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 lkb1 基因及表型分析[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(15): 1445-1452. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201902114.
LIANG S, LI S T, YUAN Z, *et al*. Knockout and phenotype analysis of lkb1 gene in zebrafish by CRISPR/Cas9 technology[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(15):

1445-1452. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201902114.

[13] ROHENA-QUINQUILLA I R, MULLENS F, CHUNG E M. MR findings in thearthropathy of relapsing polychondritis [J]. Pediatr Radiol, 2013, 43(9): 1221-1226. DOI: 10.1007/s00247-013-2644-y.

[14] BAMSHAD M J, NG S B, BIGHAM A W, *et al*. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(11): 745-755. DOI: 10.1038/nrg3031.

[15] AIZAWA R, YAMADA A, SEKI T, *et al*. Cdc42 regulates cranial suture morphogenesis and ossification[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 512(2): 145-149. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.02.106.

[16] WEIGELE J, FRANZ-ODENDAAL T A. Functional bone histology ofzebrafish reveals two types of endochondral ossification, different types of osteoblast clusters and a new bone type[J]. J Anat, 2016, 229(1): 92-103. DOI: 10.1111/joa.12480.

[17] IKEHATA M, YAMADA A, FUJITA K, *et al*. Cooperation of Rho family proteins Rac1 and Cdc42 in cartilage development and calcified tissue formation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 500(3): 525-529. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.032.

[18] AIZAWA R, YAMADA A, SUZUKI D, *et al*. Cdc42 is required for chondrogenesis and interdigital programmed cell death during limb development[J]. Mech Dev, 2012, 129(1/2/3/4): 38-50. DOI: 10.1016/j.mod.2012.02.002.

[19] BOSWELL C W, CIRUNA B. Understanding idiopathic scoliosis: a newzebrafish school of thought [J]. Trends Genet, 2017, 33(3): 183-196. DOI: 10.1016/j.tig.2017.01.001.

[20] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/β-catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.016.

(**收稿**:2024-05-09;**修回**:2024-06-15)

(编辑 张 维)