microRNA-183-5p 通过调控 *MITF* 基因影响长牡蛎黑色素形成

刘　万[1], 张晓臣[1], 赵春暖[2], 张浩瑜[1], 杨李俊淞[1], 韩怡静[1], 高　雁[2], 王晓通[1]

(1. 鲁东大学 水产学院, 山东 烟台 264025; 2. 烟台市海洋经济研究院, 山东 烟台 264003)

摘要: 黑色素的合成是一个极为复杂的过程, 多种基因及 microRNAs(miRNAs)都参与其中。近年来, 越来越多的研究证实miRNAs在哺乳动物毛色生成过程中发挥着重要作用, 但miRNA对于贝类参与黑色素合成的调控机制研究较少。其中, 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)外套膜与黑色素沉着密切相关, 是壳色形成及黑色素产生的关键部位。本研究采用 RNAhybrid 预测 miR-183-5p 的靶基因; 通过实时荧光定量 PCR(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)、双荧光素酶报告基因检测、和马松丰塔纳黑色素染色技术等验证 miR-183-5p 对黑色素合成的影响。软件预测和双荧光素酶报告基因检测证实小眼畸形相关转录因子(Microphthalmia-associated transcription factor, *MITF*)是 miR-183-5p 的靶基因, qRT-PCR 表明 miR-183-5p 在长牡蛎黑色和白色外套膜中均有表达且在白色中显著表达, 其 miR-183-5p 过表达后使黑色素形成相关基因表达量显著下调, 染色结果也显示模拟物组棕色颗粒较对照组明显减少。综上, miR-183-5p 可能通过调控 *MITF* 的表达影响长牡蛎黑色素的形成。

关键词: 长牡蛎(*Crassostrea gigas*); 黑色素; miR-183-5p; *MITF*

中图分类号: S917.4　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2025)7-0063-10

DOI: 10.11759/hykx20250225001

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又名太平洋牡蛎, 俗名生蚝、海蛎子, 属于软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、牡蛎目(Ostreoida)、牡蛎科(Ostreidae), 并具体归类于巨牡蛎属(*Crassostrea*)[1]。长牡蛎作为一种全球性分布的双壳贝类, 是中国重要的贝类养殖品种, 具有较高的经济价值[2]。长牡蛎凭借其丰富的优质特性构成了贝类种质资源中不可或缺的一个部分[3-4]。软体动物的外壳主要由外套膜的外褶皱产生, 各种类型的色素从边缘外套膜分泌出来, 然后融入外壳的外表面层[5-6]。其中, 长牡蛎具有各类优质性状, 是贝类种质资源中至关重要的组成部分[3]。贝壳的颜色主要是由于生物色素的存在, 其中黑色素是形成壳色的关键成分[7]。黑色素是一种天然色素, 广泛存在于动植物中[8], 并且具有色素沉着、自由基清除和辐射防护等作用[9]。在贝类研究中, 如 HAN 等[10]发现在长牡蛎外壳及外套膜组织中富含大量的黑色素。LI 等[11]发现黑色素由外套膜产生并影响贝壳颜色。郝世鑫等[12]在紫贻贝(*Mytilus edulis*)贝壳中成功提取黑色素。王晓娜等[13]在栉江珧(*Atrina pectinata*)和旗江珧(*Atrina vexillum*)贝壳中成功提取黑色素。这一发现为后续深入研究长牡蛎黑色素的合成机制、功能特性以及其在长牡蛎生长、防御等生理过程中的作用, 奠定了坚实的物质基础。与此同时, 牡蛎作为贝类研究的模式生物, 研究其所含的色素具有广泛的生物学意义。

microRNA(miRNA)是一类长度约为 19~25 nt 的非编码调控单链小分子 RNA, 在生命活动中扮演着至关重要的角色, 通过调控基因表达来发挥作用。作为后生动物中基因表达的关键调控因子, miRNAs 通

收稿日期: 2025-02-25; 修回日期: 2025-04-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42076088); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2023QC107, ZR2022QC233); 山东省重点研发计划资助项目(2022LZGC015); 山东省泰山学者专项资金项目(tstp20240518); 山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-14-01); 烟台市省级以上领军人才专项支持资金项目(202203); 烟台市水产种业提升项目(2023HD)

[Foundation: The National Natural Science Foundation of China, No. 42076088; The Natural Science Foundation of Shandong Province, Nos. ZR2023QC107, ZR2022QC233; The Key Research and Development Program of Shandong Province, No. 2022LZGC015; The Special Funds for Taishan Scholars of Shandong Province, No. tstp20240518; The Modern Agricultural Industry Technology System of Shandong Province, No. SDAIT-14-01; The Special Supporting Funds for Leading Talents above Provincial Level in Yantai City, No. 202203; The Aquaculture Seed Industry Promotion Project of Yantai City, No. 2023HD]

作者简介: 刘万(1999—), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事海洋贝类学研究, E-mail: liuwan0628@163.com; 韩怡静(1990—), 通信作者, 女, 山东烟台人, 博士, 副教授, 主要从事贝类分子免疫学研究, E-mail: yijing_han@126.com; 高雁(1987—), 通信作者, 女, 山东烟台人, 本科, 高级工程师, 主要从事海洋生物学研究, E-mail: 455386466@qq.com

过 2 种主要机制来调节目标基因的表达: 一是促进 mRNA 的降解, 二是抑制 mRNA 的翻译过程[14-15]。研究报道了miRNA在多种生物过程中发挥着关键作用, 涉及生长发育[16]、细胞增殖[17]、细胞凋亡及免疫调节[18-19]等。miRNA 对黑色素合成的调控已成为生物体色素沉着领域的研究热点。目前, 已在多种生物体中开展 miRNA 对黑色素调节作用的研究, 主要集中在生物体的体表和毛发颜色。例如, miR-221-3p 可能通过调控靶基因并抑制其表达, 进而减少黑色素细胞中的黑色素含量, 从而影响湘猪肤色的形成[20]。miR-8 直接作用于发育中的表皮, 可能通过调控新的靶基因来调节色素沉着的空间模式, 其缺失会导致雌性果蝇腹部背面色素沉着减少[21]。miR-206 沉默导致*MC1R*表达上调以及黑色素细胞增殖和迁移能力增强, 从而对锦鲤皮肤颜色的分化和色素沉着起到调控作用[22]。还有研究表明, miR-138-5p 和 miR-722 可能在调控色素沉着过程中起重要作用, 从而对红罗非鱼皮肤颜色分化产生影响[23]。因此, miRNA 在色素沉积中的作用不容忽视。miR-183-5p 是 miRNA-183/96/182 簇中的一员, 该簇具有高度保守性, 位于人类染色体 7q 的基因间区域[24]。miR-183-5p 是一种重要的调控因子, 主要在黑色素细胞中发挥核心作用, 能够通过抑制黑色素合成相关基因的表达, 进而影响黑色素的形成过程[25-26]。尽管对双壳贝类 miR-183-5p 的研究很少, 但由于其具有高度保守的特性, 通过参考其他物种的相关研究, 能够为贝类 miR-183-5p 研究的顺利开展提供基础。

小眼畸形相关转录因子(Microphthalmia-associated transcription factor, *MITF*)是黑色素细胞发育和黑色素合成的关键调控因子[27-28]。*MITF* 通过转录调控 3 个主要的色素合成酶: 酪氨酸酶(Tyrosinase, Tyr)、酪氨酸酶相关蛋白 1(Tyrosinase related protein1, Tyrp1)和酪氨酸酶相关蛋白 2(Tyrosinase related protein 2, Tyrp2), 从而对色素沉着过程起到关键作用[29]。*MITF* 于 1942 年首次在辐射诱导的小鼠(*Mus musculus*)中被发现[30]。目前, 越来越多的研究表明, *MITF* 在动物体色和毛发中的黑色素合成过程中发挥着调节作用, 并且与贝类壳色的形成有着密切的联系。在脊椎动物中, 羊驼(*Vicugna pacos*)白色被毛皮肤组织中 *MITF* 基因表达量显著低于棕色被毛皮肤组织[31]。白绒乌鸡(*Gallus gallus domesticus*)中 *MITF* 基因高表达可能有助于体内黑色素的形成[32]。在双壳贝类中, 紫色贻贝(*Mytilus edulis*)中 *MITF* 的表达高于白色贻贝, 表明 *MITF* 在黑色素合成和贝壳着色中起重要作用[33]。*MITF* 可能还参与长牡蛎贝壳形成早期黑色素的产生过程, 并且有可能调控酪氨酸酶 *Tyr2* 基因, 进而参与外套膜和贝壳中黑色素的形成[34]。此外, 随着测序技术和验证实验的发展, 关于 miRNA 与靶基因相互作用的研究方法已较为成熟。多种 miRNA 被证明通过与靶基因 3′端非编码区(3′UTR)结合, 从而调控黑色素的合成。miR-137 通过调控 *TYR* 基因的表达, 从而影响菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)贝壳颜色的形成[35]。miR-15b 通过调控 *TYR* 的表达, 从而影响三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)珍珠层颜色的形成[36]。与此同时, miRNA 是调控生物性状的重要分子, 以往研究多集中于其靶基因的筛选、验证和功能等方面, 而具体的分子调控机制却不清楚。因此, 本研究从分子功能解析的角度初步探究 miRNA 调控长牡蛎黑色素形成的分子机制。基于此, 本研究假设miR-183-5p可能通过靶向*MITF*基因来调节长牡蛎黑色素的形成, 为贝类黑色素的形成机制解析提供新的研究方向, 亦可为软体动物特色性状解析研究提供理论参考。此外, 本研究虽证实 *MITF* 是 miR-183-5p 的靶基因, 但鉴于黑色素合成的复杂调控网络, miR-183-5p 是否通过其他靶基因参与该过程仍有待深入探索。

1 材料与方法

1.1 样品采集与制备

实验中使用的长牡蛎购自山东烟台一个当地养殖场。选取黑白条纹相间的个体。在实验开始之前, 将长牡蛎放在循环海水(温度 20 ℃左右、盐度 25 ± 0.5、溶解氧大于 5.0 mg/L)中暂养 1 周。挑选 5 只活性较好的个体, 在无菌条件下, 分别取黑色外套膜和白色外套膜组织样品, 迅速放入液氮冷冻, 并在 –80 ℃保存备用。

1.2 总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

使用 RNAiso plus 试剂从太平洋牡蛎的各个组织中提取总 RNA。通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 并使用 Nanodrop ND 2000 分光光度计检测其 RNA 浓度。然后使用 Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒(Accurate Biotechnology, China)进行第一链 cDNA 合成。上述所有步骤均严格依据说明书的指导进行操作。

1.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

按照 SYBR®Green Premix Pro Taq HS qPCR 试剂盒进行操作。使用上述合成的 cDNA 作为模板。根据 XU 等[37]的研究证明 miR-183-5p 序列。miR-183-5p

和色素相关基因分别以 *U6* 和 *β-actin* 作为内参基因。本研究使用 Primer 5 软件进行引物设计，利用软件功能规避引物二聚体形成、排除非特异性结合位点，保证引物特异性。随后对样本进行扩增，并通过琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。若电泳结果呈现单一目标条带，则可初步证明扩增产物特异性达标。最后，运用 qRT-PCR 技术观察扩增曲线是否呈单一峰形，进一步验证扩增产物特异性。qRT-PCR 引物序列(表 1)。条件设定：预变性 95 ℃ 30 s，后 95 ℃ 5 s、55 ℃ 30 s 进行 40 个循环，然后进行溶解曲线分析 95 ℃ 15 s、60 ℃ 1 min、95 ℃ 30 s、60 ℃ 15 s。每个样本设定 3 个重复，利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法来计算数值。

表 1　本研究使用的引物
Tab. 1　Primers used in this study

引物名称	引物序列	应用
miR-183-5p-R	AATGGCACTGGTAGAATTCACGG	qRT-PCR
miR-183-5p-F	GTGCGTGTCGTGGAGTC	qRT-PCR
Tyr6-F	TTAAGCAGGAGAAGACTCGC	qRT-PCR
Tyr6-R	GAAGATGGGATCAAACCAAG	qRT-PCR
Tyr8-F	TGGCGTCCATAACTACATCG	qRT-PCR
Tyr8-R	CTGAAAGCAACCCACAGAAG	qRT-PCR
Typ-F	AGATGGCGTTTGTGATGTC	qRT-PCR
Typ-R	CAGGTATGAACTGGTCCCG	qRT-PCR
Typ1-F	AAACAGACCTATGGACCTTTACGA	qRT-PCR
Typ1-R	GTTGGTAGCACAGGAAGGCATA	qRT-PCR
Typ2-F	GACTACTGACAGCGAGATGATGG	qRT-PCR
Typ2-R	GAATCTTCCAAAGGGTCCAGTC	qRT-PCR
Typ3-F	GTAAGGACAGGTTTCTGTGGCAA	qRT-PCR
Typ3-R	GGCATCTCGTCTGGGTAATCG	qRT-PCR
U6-F	ATTGGAACGATACAGAGAAGATT	qRT-PCR
U6-R	ATTTGCGTGTCATCCTTGC	qRT-PCR
β-actin-F	GTGCTACGTTGCCCTGGACTT	qRT-PCR
β-actin-R	TCGCTCGTTGCCAATGGTGAT	qRT-PCR

1.4　靶基因预测

通过 RNAhybrid 网站(https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/)预测 miR-183-5p 的靶基因。根据预测结果，筛选出 miR-183-5p 的潜在靶点：$\Delta G \leqslant -15$ kcal/mol 作为 miR-183-5p 的靶基因。

1.5　miR-183-5p 体内过表达和抑制实验

miR-183-5p 模拟物、miR-183-5p 抑制剂和阴性对照由吉玛公司(上海，中国)合成。所有长牡蛎在实验开始前在循环海水中暂养 7 d。实验分为 miR-183-5p 模拟物组、miR-183-5p 抑制剂组以及阴性对照组，且每组有 6 只。使用 5%硫酸镁进行麻醉后注射 10 μg 到闭壳肌中。每 4 d 注射 1 次，共注射 8 d。注射完成后，对外套膜组织取样并提取总 RNA，用于后续实验。

1.6　细胞培养及转染

目前，由于没有已知的软体动物细胞系可用于质粒转染，因此，使用人的 HEK-293T 细胞[38]。HEK-293T 细胞在温度为 37 ℃且含有 5% CO_2 的培养箱中进行培养[39]。构建了 pmirGLO-MITF-WT 质粒和 pmirGLO-MITF-MUT 质粒[40]。当细胞数量约占培养皿的 80% ～ 90%时既可进行细胞传代或质粒转染。使用 Lipofectamine 2000 试剂(美仑生物，中国)根据制造商的说明书将质粒转染。

1.7　双荧光素酶报告基因测定

将 HEK-293T 细胞接种到 24 孔培养板中，细胞密度约为 80%~90%时即可进行转染。然后，将 pmirGLO-MITF-WT+miR-183-5p 模拟物/阴性对照和 pmirGLO-

MITF-MUT+miR-183-5p 模拟物/阴性对照分别转染到 HKE-293T 细胞中。转染 48 h 后，使用 Dual-Glo®荧光素酶检测系统试剂盒(Promega, USA)检测荧光素酶活性。

1.8　马松丰塔纳黑色素染色

取处理后的外套膜组织块置于 4%多聚甲醛中固定，常规脱水，浸蜡，包埋，切片。根据制造商的说明书，使用马松丰塔纳染色试剂盒(索莱宝，中国)进行黑色素染色。将样品切片(6 mm 厚)入 Fontana 氨银溶液，于 56 ℃温箱避光染色 40 min，经蒸馏水多次浸洗后，再放入海波溶液染色 3 min，最后用中性红染液复染 2 min。最后，在显微镜(Nikon Corporation, CI-L, Japan)下观察组织样品。

1.9　统计分析

使用 SPSS 软件(IBM, Chicago, IL, USA)对文中所有数据进行 t 检验，分析其显著性差异。计量资料以“均值±标准差($\bar{x}\pm s$)”来表示。P<0.05 的差异具有统计学意义。

2　实验结果

2.1　miR-183-5p 在黑色和白色外套膜的表达情况

对黑白纹壳牡蛎的观察发现，壳上黑色和白色部位的分布与外套膜上的分布具有高度的相关性。贝壳上放射性分布的黑色和白色部位与外套膜的放射状分布呈一一对应关系[图 1(a)]。分别提取长牡蛎外套膜组织的黑色部位和白色部位的总 RNA，并将其反转录得到的 cDNA 作为模板。将 *U6* 作为内参基因，通过 qRT-PCR 实验分析 miR-183-5p 在黑色和白色外套膜中表达的差异性。结果如图 1(b)所示，miR-183-5p 在黑色和白色外套膜中均有表达，但白色外套膜的表达水平显著高于黑色外套膜的表达水平，且白色外套膜中 miR-183-5p 的相对表达量是黑色外套膜中的 4.4 倍。

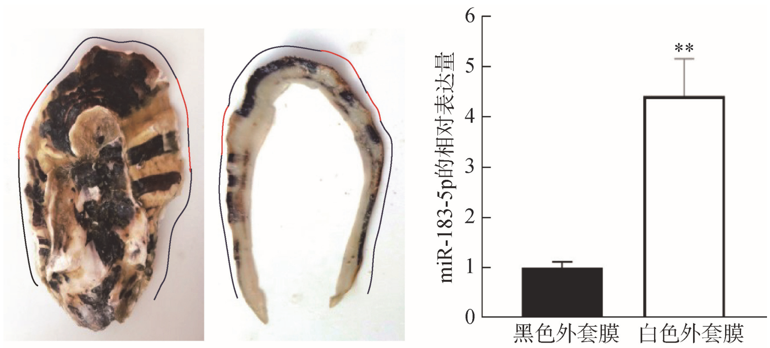

图 1　miR-183-5p 表达量检测

Fig. 1　miR-183-5p expression assay

注：**表示 $P < 0.01$

2.2　目的基因预测

为探讨 miR-183-5p 对 *MITF* 基因的潜在调控作用，通过 RNAhybrid 网站预测二者之间的结合位点。结果表明，长牡蛎体内的 miR-183-5p 均与 *MITF* 基因 3′UTR 区域存在部分结合位点(图 2)。经预测，miRNA 序列与 *MITF* 基因 3′UTR 区域结合的自由能为–21.4 kcal/mol(图 2)，小于–15 kcal/mol，表明 miR-183-5p 与 *MITF* 之间具有潜在的相互作用。

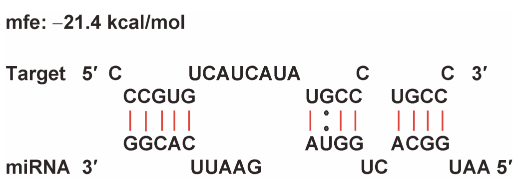

图 2　miR-183-5p 与 *MITF* 基因 3′UTR 的结合位点预测

Fig. 2　Predicted binding sites of miR-183-5p to the 3′UTR of *MITF*

2.3　miR-183-5p 对长牡蛎黑色素合成的调控作用

为了验证 miR-183-5p 对黑色素合成的影响，将 miR-183-5p 模拟物、miR-183-5p 抑制剂及阴性对照试剂注射到闭壳肌中。通过 qRT-PCR 检测 3 组外套膜中黑色素形成的差异表达。*U6* 作为内参基因。如图 3 所示，与对照组相比，miR-183-5p 模拟物组表达量显著升高，且较对照组升高了 1.295 倍($P < 0.05$)。而 miR-183-5p 抑制剂组表达量则比对照组降低了

0.531 倍($P < 0.01$)。这一结果证明了 miR-183-5p 对长牡蛎黑色素合成具有正向调控作用。

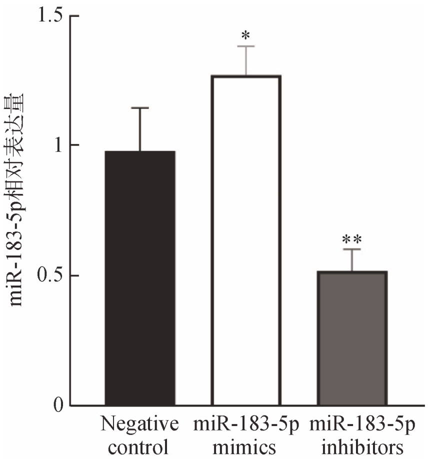

图 3　qRT-PCR 检测注射 miR-183-5p 模拟物和抑制剂后外套膜中 miR-183-5p 的表达情况

Fig. 3　qRT-PCR-based detection of the relative expression levels of miR-183-5p in the mantle after the injection of miR-183-5p mimics and inhibitors

注：Negative control: 阴性对照组；miR-183-5p mimics: miR-183-5p 模拟物组; miR-183-5p inhibitors: miR-183-5p 抑制剂组, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$

2.4　双荧光素酶报告基因检测 miR-183-5p 对 *MITF* 的调控作用

为了证明 miR-183-5p 对 *MITF* 有负调控作用，作者使用含有 *MITF* 3′UTR 的荧光素酶报告载体进行双荧光素酶报告基因实验。首先，我们在 pmirGLO 双荧光素酶报告载体中构建了 *MITF* 3′UTR 野生型或突变型质粒，并将其 miR-183-5p 模拟物和阴性对照转染到 HEK-293T 细胞，48 h 后检测荧光素酶活性。结果如图 4 所示，miR-183-5p 模拟物可明显降低 pmirGLO-MITF-WT 的荧光素酶活性，但 pmirGLO-MITF-MUT 的荧光素酶活性无显著性变化。综上表明，miR-183-5p 与 *MITF* 具有靶向负调控关系。

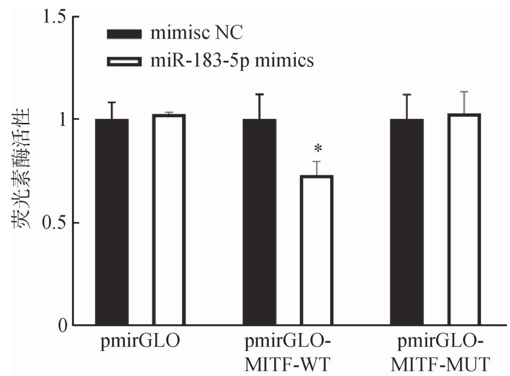

图 4　双荧光素酶报告基因检测实验

Fig. 4　Dual luciferase reporter gene detection assay

注: *$P<0.05$

2.5　miR-183-5p 调控外套膜黑色素产生

马松丰塔纳黑色素染色结果清晰地呈现出了不同的状态。当与阴性对照组进行比较时，可以明显地观察到，miR-183-5p 模拟物组中棕色颗粒的数量相对较少。在显微镜下，该组的样本中，棕色颗粒稀疏分布，与阴性对照组形成了较为鲜明的对比。而与之相反的是，miR-183-5p 抑制剂组的样本中棕色颗粒则较多(图 5，红色箭头所示)。

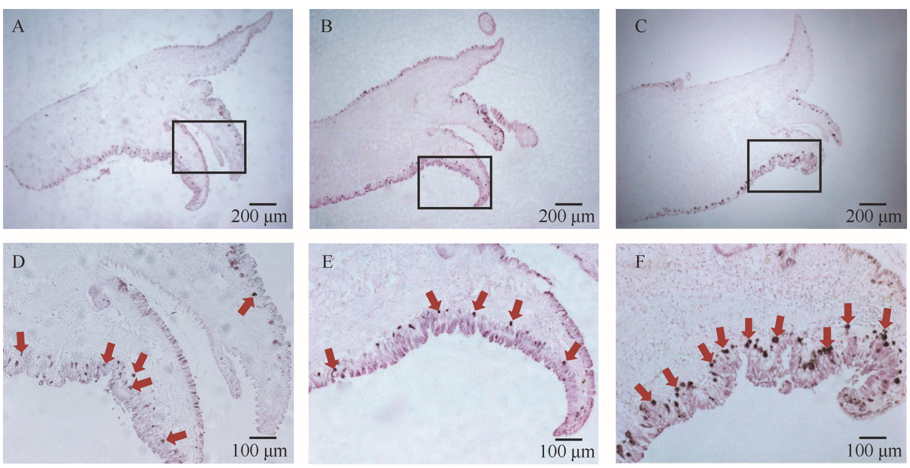

图 5　长牡蛎外套膜组织的马松丰塔纳黑色素染色

Fig. 5　Masson–Fontana melanin staining of the mantle tissue of *C. gigas*

注: A: 阴性对照组; B: miR-183-5p 模拟物组; C: miR-183-5p 抑制剂组; D–F: 分别是 A、B 和 C 中黑框区域的放大视图，红色箭头指示黑色素颗粒

2.6 miR-183-5p 调控黑色素相关基因的表达

为了进一步验证 miR-183-5p 对黑色素形成的影响，进行 miR-183-5p 过表达和抑制实验。我们选取了与黑色素产生相关基因 *Tyr6*、*Tyr8* 和酪氨酶酸样蛋白(Typ)。同时，还选取了参与酪氨酸通路与黑色素有关的基因酪氨酸酶样蛋白 1(Typ1)、酪氨酸酶样蛋白 2(Typ2)和酪氨酸酶样蛋白 3(Typ3)。通过 qRT-PCR 检测各个基因在外套膜组织中的表达。结果如图 6 所示，miR-183-5p 模拟物组 *Tyr6*、*Tyr8*、*Typ*、*Typ1*、*Typ2* 及 *Typ3* 基因表达较阴性对照均显著降低($P < 0.05$)，其表达量分别下降了 0.366 倍、0.213 倍、0.590 倍、0.505 倍、0.241 倍和 0.265 倍。而 miR-183-5p 抑制剂组 *Tyr6*、*Tyr8*、*Typ*、*Typ1*、*Typ2* 及 *Typ3* 基因表达则显著升高($P < 0.01$)，其表达量分别上升了 2.245 倍、1.403 倍、1.350 倍、1.715 倍、1.609 倍和 1.915 倍。

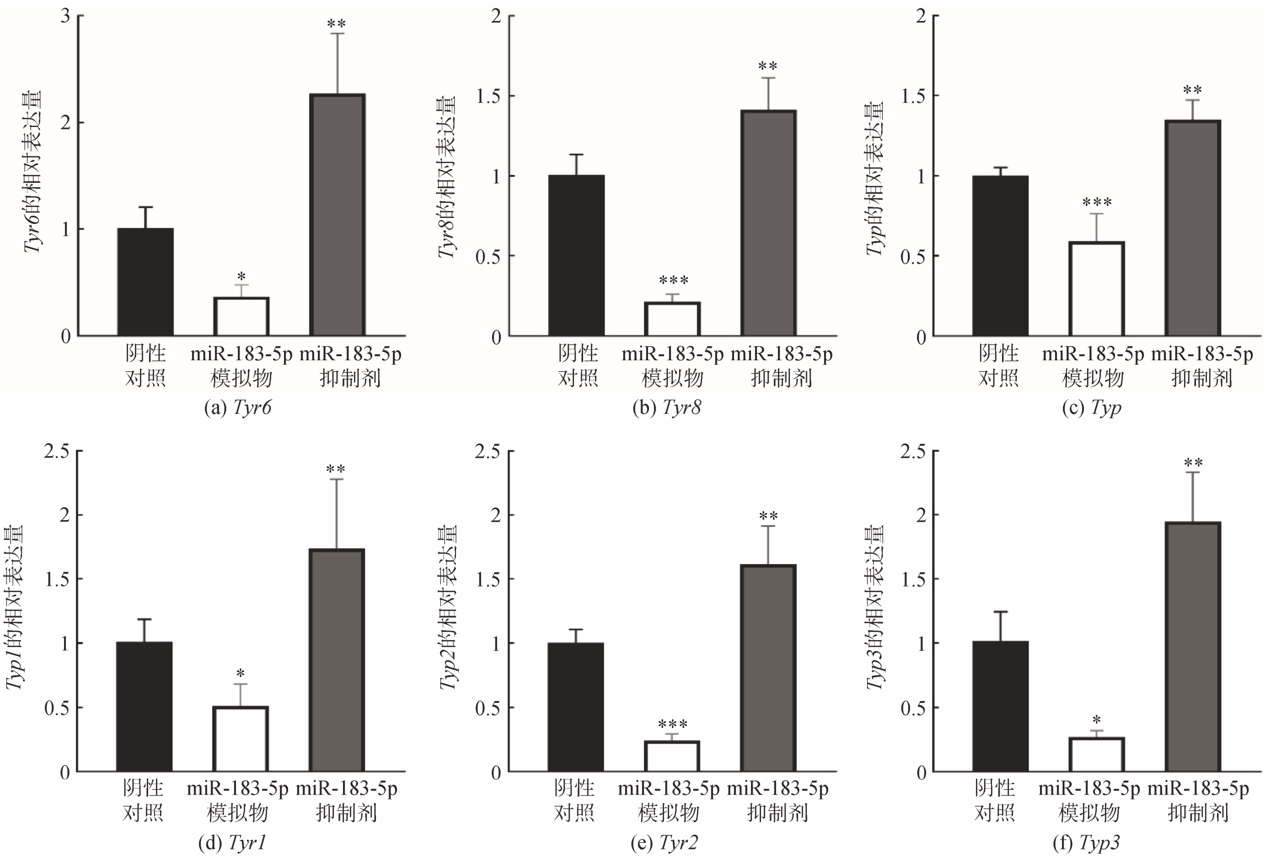

图 6 注射 miR-183-5p 模拟物和抑制剂后外套膜中与黑色素相关基因的表达情况

Fig. 6 Expression of melanin formation–related genes in the mantle after the injection of miR-183-5p mimics and inhibitors

注: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

3 讨论

miRNA 广泛存在于各类生物体内，其主要以降解靶基因 mRNA 或者抑制靶基因蛋白质翻译的形式，来实现转录后抑制调控[41]。miRNA 在黑色素合成、基因表达、生长发育、细胞增殖和调亡等方面起着至关重要的作用[16]。其中，miRNA 对黑色素合成的调控主要集中在生物体的体表和毛发颜色[42]。有研究表明，miR-137 的表达可导致小鼠皮肤颜色从黑色到棕色的变化[43]。miR-9-5p 参与调节菲律宾蛤仔贝壳颜色的形成[44]。此外，miR-183 被认为在小鼠中对与黑色素合成具有重要调节作用。这项研究结果表明，miR-183 过表达被证明能够调控黑色素生成，从而影响其皮肤颜色变化[45]。本研究通过向长牡蛎体内注射 miR-183-5p 模拟物和抑制剂，检测到 miR-183-5p 模拟物组表达量显著高于阴性对照组，而 miR-183-5p 抑制剂组表达量显著低于阴性对照组。此外，对长牡蛎黑色和白色外套膜组织的检测结果表明，miR-183-5p 在白色外套膜中的表达量显著高于黑色外套膜中的表达。因此，我们发现 miR-183-5p 表达量的变化与黑色素合成量呈现反向关

联，揭示了 miR-183-5p 在长牡蛎黑色素合成过程中发挥负调控作用。这一发现为理解贝类色素形成机制提供了新的理论依据。

为了深入地探究 miR-183-5p 的调控机制，对其靶基因进行了预测。结果发现，miR-183-5p 可能靶向调控 *MITF* 基因。由于 *MITF* 作为黑色素生成过程的关键调节因子起着重要作用，且一些研究已经对可能影响 *MITF* 表达以及进而调节黑色素生成酶的 mRNA 水平的 miRNA 进行了研究[46]。CHEN 等[47]研究发现，miR-4504 通过靶向调控 *MITF* 参与三角帆蚌珍珠层颜色的形成。XU 等[48]研究发现，miR-2a 和 miR-133 可能通过负调控 *MITF* 参与菲律宾蛤仔黑色素形成。DU 等[45]研究同样证明，miR-183 调节 *MITF* 的表达，对小鼠黑色素瘤细胞有影响，说明 miR-183 确实可以通过调控 *MITF* 表达来影响黑色素生成。另外，miRNA 与其他靶基因也存在靶向调控作用。例如，miR-380-3p 通过靶向 *Sox6* 调控羊驼黑色素细胞的黑色素生成[49]。miR-21a-5p 通过靶向 *Sox5* 增强 *MITF* 的表达，从而调控小鼠黑色素细胞黑色素合成[50]。miR-206 通过靶向 *MC1R* 参与锦鲤皮肤色素的形成[22]。故本研究通过双荧光素酶报告基因检测及黑色素染色等进一步探究 miR-183-5p 对长牡蛎色素合成的具体调控机制。研究结果发现，miR-183-5p 能够靶向作用于 *MITF* 基因并抑制其表达。这一成果进一步表明 miRNA 参与黑色素生成和皮肤色素沉着。

miRNA 是高度保守性的非编码 RNA。它不仅能够与靶基因结合，而且可以通过调控 *MITF* 及其下游基因的表达，从而影响色素沉着表型。ZHANG 等[51]发现，miR-508-3p 通过靶向 *MITF*，下调其 mRNA 和蛋白水平，进而降低 *TYR*、*TYRP1* 等黑色素生成相关基因的表达，减少黑色素生成。在其他贝类中也有研究证明，miR-2d 通过与 *MITF* 的 3′UTR 区域结合，抑制 *MITF* 的表达。*MITF* 表达量的变化会影响其下游基因(如 *TYR*)的表达，进而影响黑色素的合成[52]。miR-4504 通过调控 *MITF* 及其下游基因 *TYR* 的表达从而影响珍珠层颜色的形成[47]。故本研究通过检测黑色素相关基因 *Tyr6*、*Tyr8*、*Typ*、*Typ1*、*Typ2* 及 *Typ3* 基因表达进一步验证 miR-183-5p 对黑色素合成的影响。结果显示，miR-183-5p 过表达抑制了 *Tyr6*、*Tyr8*、*Typ*、*Typ1*、*Typ2* 及 *Typ3* 基因的表达，从而抑制黑色素的产生。综上表明，miR-183-5p 与其他研究一样都发挥负调控作用。这一研究初步阐明 miRNA 在贝类黑色素合成中的调控作用，并且有助于深入了解贝类黑色素形成的分子机制，为揭示贝类色素沉着提供了理论依据。

综上所述，miR-183-5p 通过负调控 *MITF* 参与了长牡蛎黑色素的形成，从而进一步揭示了 miR-183-5p 的作用机制。基于本研究结果假设：miR-183-5p 可能在贝类适应环境颜色变化的进化过程中，通过调控黑色素合成发挥关键作用。在长期进化过程中，miR-183-5p 表达变化可能驱动了贝类外壳颜色的多样化，以适应不同的生态环境。对 miR-183-5p 功能的深入研究，不仅有助于阐明 miRNA 在贝类黑色素合成调控中的作用具有重要的参考价值，也为深入研究贝类色素沉着的分子机制提供了可能。

4 结论

本研究通过系统性的功能验证实验，证实 miR-183-5p 能够通过调控靶基因 *MITF* 的表达，在长牡蛎黑色素的形成过程中发挥负调控作用。这一研究不仅加深了对软体动物色素沉着分子机制的理解，也为长牡蛎的选择性育种提供了理论依据和实践指导，有助于推动牡蛎养殖业的发展，提高养殖效益。未来可进一步深入探究这些 miRNA 的调控机制，以及它们与其他基因和环境因素的相互作用，更好地实现对软体动物性状的精准调控和优化育种。

参考文献：

[1] LI Z Z, XU C X, YU H, et al. Effects of dietary cystine and tyrosine supplementation on melanin synthesis in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Marine Biotechnology, 2023, 25(4): 537-547.

[2] WAN S, LI Q, YU H, et al. Estimating heritability for meat composition traits in the golden shell strain of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[J]. Aquaculture, 2020, 516: 734532.

[3] YU H, ZHAO X L, LI Q. Genome-wide identification and characterization of long intergenic noncoding RNAs and their potential association with larval development in the Pacific oyster[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 20796.

[4] ZHANG G F, FANG X D, GUO X M, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. Nature, 2012, 490(7418): 49-54.

[5] WILLIAMS S T. Molluscan shell colour[J]. Biological Reviews, 2017, 92: 1039-1058.

[6] BUDD A, MCDOUGALL C, GREEN K, et al. Control of shell pigmentation by secretory tubules in the abalone mantle[J]. Frontiers in Zoology, 2014, 11: 62.

[7] JIANG K Y, YU H, KONG L F, et al. cAMP-mediated CREM-MITF-TYR axis regulates melanin synthesis in Pacific oysters[J]. Marine Biotechnology, 2024, 26(3): 460-474.

[8] 赵博文，李琪，王九龙，等. 长牡蛎酪氨酸酶基因(*CgTyr1*)SNP多态性与壳色性状的关联[J]. 水产学报, 2020, 44(2): 195-205.
ZHAO Bowen, LI Qi, WANG Jiulong, et al. Association between SNP polymorphism in the tyrosinase gene (*CgTyr1*) of *Crassostrea gigas* and shell color traits[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(2): 195-205.

[9] CAO W, ZHOU X H, MCCALLUM N C, et al. Unraveling the structure and function of melanin through synthesis[J]. Journal of the American Chemicao Society, 2021, 143(7): 2622-2637.

[10] HAN Z Q, LI Q. Relationship between shell color and growth and survival traits in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Journal of Ocean University of China, 2021, 20(4): 985-991.

[11] LI M, TANG J Y, YUAN M Q, et al. Outer fold is sole effective tissue among three mantle folds with regard to oyster shell colour[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 241: 124655.

[12] 郝世鑫, 侯鑫, 孙东方, 等. 紫贻贝贝壳和脉红螺厣中色素的提取与鉴定[J]. 海洋科学, 2015, 39(11): 49-53.
HAO Shixin, HOU Xin, SUN Dongfang, et al. Extraction and identification of pigments from the shell of *Mytilus edulis* and the operculum of *Rapana venosa*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(11): 49-53.

[13] 王晓娜. 栉江珧与旗江珧贝壳中黑色素的提取研究[D]. 烟台：烟台大学, 2017.
WANG Xiaona. Study on the extraction of melanin from the shells of *Atrina pectinata* and *Atrina vexillum*[D]. Yantai: Yantai University, 2017.

[14] ANDREASSEN R, HØYHEIM B. miRNAs associated with immune response in teleost fish[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2017, 75: 77-85.

[15] WOLDEMARIAM N T, AGAFONOV O, HØYHEIM B, et al. Expanding the miRNA repertoire in Atlantic salmon; discovery of isomiRs and miRNAs highly expressed in different tissues and developmental stages[J]. Cells, 2019, 8(1): 42.

[16] HU G K, DRESCHER K M, CHEN X M. Exosomal miRNAs: biological properties and therapeutic potential[J]. Frontiers in Genetics, 2012, 3: 56.

[17] NIU Z J, ZhANG Y, WANG Y S, et al. MTFR2 promotes endometrial carcinoma cell proliferation and growth via the miR-132-3p/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Frontiers in Medicine, 2025, 11: 1505071.

[18] TAO Y, CHU C N, SUN D J, et al. MicroRNA-486-3p targets chymotrypsin C to regulate pancreatic cancer progression and immunosuppressive factor expression[J]. Iranian Journal of Allergy Asthma & Immunology, 2024, 23(6): 727-737.

[19] IOANNIDIS J, SÁNCHEZ-MOLANO E, PSIFIDI A, et al. Association of plasma microRNA expression with age, genetic background and functional traits in dairy cattle[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 12955.

[20] YUAN W, QIN H, BI H, et al. Ssc-mir-221-3p regulates melanin production in xiang pigs melanocytes by targeting the TYRP1 gene[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 369.

[21] KENNELL J A, CADIGAN K M, SHAKHMANTSIR I, et al. The microRNA miR-8 is a positive regulator of pigmentation and eclosion in Drosophila[J]. Developmental Dynamics, 2012, 241(1): 161-168.

[22] DONG Z J, LUO M K, WANG L M, et al. MicroRNA-206 regulation of skin pigmentation in koi carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Frontiers Genetics, 2020, 11: 47.

[23] WANG L M, ZHU W B, DONG Z J, et al. Comparative microRNA-seq analysis depicts candidate miRNAs involved in skin color differentiation in red tilapia[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 1209.

[24] SACHELI R, NGUYEN L, BORGS L, et al. Expression patterns of miRNA-96, miRNA-182 and miRNA-183 in the developing inner ear[J]. Gene Expression Patterns, 2009, 9(5): 364-370.

[25] AL ROBAEE A A, ALZOLIBANI A A, RASHEED Z. MicroRNA-183-5p regulates MITF expression in vitiligo skin depigmentation[J]. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2022, 41(8): 703-723.

[26] YU X, CUI Y L, ZHU X Q, et al. MicroRNAs: emerging players in the pathogenesis of vitiligo[J]. Frontiers Cell and Development Biology, 2022, 10: 964982.

[27] LIN Y P, HSU F L, CHEN C S, et al. Constituents from the formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes[J]. Phytochemistry, 2007, 68(8): 1189-1199.

[28] SCHALLREUTER K U, KOTHARI S, CHAVAN B, et al. Regulation of melanogenesis–controversies and new concepts[J]. Experimental Dermatology, 2008, 17(5): 395-404.

[29] YU F F, LU Y S, ZHONG Z M, et al. Mitf involved in innate immunity by activating tyrosinase-mediated melanin synthesis in pteria penguin[J]. Frontiers Immunology, 2021, 12: 626493.

[30] KAWAKAMI A, FISHER D E. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology[J]. Laboratory Investigation, 2017, 97(6): 649-656.

[31] ZHU Z, HE J, JIA X, et al. MicroRNA-25 functions in regulation of pigmentation by targeting the transcrip-

tion factor MITF in alpaca (*Lama pacos*) skin melanocytes[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2010, 38(3): 200-209.

[32] 郑嫩珠, 辛清武, 朱志明, 等. 白绒乌鸡 *MITF* 基因的 cDNA 克隆、表达及其对黑色素沉积的影响. 中国农业科学, 2015, 48(18): 3711-3718.
ZHENG Nenzhu, XIN Qingwu, ZHU Zhiming, et al. cDNA cloning and expression of *MITF* gene and its effect on melanin deposition in silky fowl[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(18): 3711-3718.

[33] CHEN X J, LIU X J, BAI Z Y, et al. *HcTyr* and *HcTyp-1* of *Hyriopsis cumingii*, novel tyrosinase and tyrosinase-related protein genes involved in nacre color formation[J]. Comparative Biochemisty and Physiology B-Biochemisty & Molecular Biology, 2017, 204: 1-8.

[34] 杨佳敏, 王勇, 王晓通, 等. 长牡蛎 *MITF* 基因表达及与壳色的关联[J]. 水产学报, 2020, 44(6): 915-923.
YANG Jiamin, WANG Yong, WANG Xiaotong, et al. Expression of the *MITF* gene in Crassostrea gigas and its association with shell color[J]. Journal of Fisheries, 2020, 44(6): 915-923.

[35] DING J F, WEN Q, HUO Z M, et al. Identification of shell-color-related microRNAs in the manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing of small RNA transcriptomes[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 8044.

[36] CHEN X J, BAI Z Y, LI J L. The mantle exosome and microRNAs of *Hyriopsis cumingii* involved in nacre color formation[J]. Marine Biotechnology, 2019, 21(5): 634-642.

[37] XU F, WANG X T, FENG Y, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by deep sequencing[J]. PLoS One. 2014, 9(8): e104371.

[38] LI L L, LIU W J, FAN N N, et al. Scallop IKK1 responds to bacterial and virus-related pathogen stimulation and interacts with myD88 adaptor of Toll-like receptor pathway signaling[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 869845.

[39] LIU W J, LI F S, MA J L, et al. Scallop interferon regulatory factor 1 interacts with myeloid differentiation primary response protein 88 and is crucial for antiviral innate immunity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 222(Pt. A): 1250-1263.

[40] LU W, ZHANG H H, NIU Y Q, et al. Long non-coding RNA linc00673 regulated non-small cell lung cancer proliferation, migration, invasion and epithelial mesenchymal transition by sponging miR-150-5p[J]. Molecular Cancer, 2017, 16(1): 118.

[41] 许冬梅, 唐中伟, 朱芷葳, 等. MiR-186-5p 对绵羊黑色素细胞黑色素生成的调控[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(8): 961-969.
XU Dongmei, TANG Zhongwei, ZHU Zhiwei, et al. Regulation of melanogenesis in sheep melanocytes by miR-186-5p[J]. Chinese Journal of Biochemisty Molecular Biology, 2020, 36(8): 961-969.

[42] ZHANG W G, WU J H, LI J Q, et al. A subset of skin-expressed microRNAs with possible roles in goat and sheep hair growth based on expression profiling of mammalian microRNAs[J]. OMICS, 2007, 11(4): 385-396.

[43] DONG C S, WANG H D, XUE L L, et al. Coat color determination by miR-137 mediated down-regulation of microphthalmia-associated transcription factor in a mouse model[J]. RNA, 2012, 18(9): 1679-1686.

[44] CHEN S T, NIE H T, HUO Z M, et al. Comprehensive analysis of differentially expressed mRNA, lncRNA and miRNA, and their ceRNA networks in the regulation of shell color in the manila clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 256(Pt 2): 128404.

[45] DU B, LIU X X, KHAN A, et al. miRNA-183 ~ 96 ~ 182 regulates melanogenesis, cell proliferation and migration in B16 cells[J]. Acta Histochemica, 2020, 122(3): 151508.

[46] NGUYEN N T, FISHER D E. MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2019, 32(2): 224-236.

[47] CHEN X J, ZHANG M Y, ZHANG J P, et al. miR-4504 is involved in nacre color formation in *Hyriopsis cumingii*[J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 2019, 517(2): 210-215.

[48] XU Q Y, NIE H T, YIN Z H, et al. MiRNA-mRNA integration analysis reveals the regulatory roles of miRNAs in shell pigmentation of the manila clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. Marine Biotechnology, 2021, 23(6): 976-993.

[49] LIU X X, DU B, ZHANG P Q, et al. miR-380-3p regulates melanogenesis by targeting SOX6 in melanocytes from alpacas (*Vicugna pacos*)[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 962.

[50] WANG P C, ZHAO Y Y, FAN R W, et al. MicroRNA-21a-5p functions on the regulation of melanogenesis by targeting Sox5 in mouse skin melanocytes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(7): 959.

[51] ZHANG J, LIU Y, ZHU Z, et al. Role of microRNA508-3p in melanogenesis by targeting microphthalmia transcription factor in melanocytes of alpaca[J]. Animal, 2017, 11(2): 236-243.

[52] XU Q Y, NIE H T, MA Q Y, et al. The lgi-miR-2d is potentially involved in shell melanin synthesis by targeting mitf in manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Marine Biotechnology, 2024, 26(3): 432-446.

Regulation of melanin formation in *Crassostrea gigas* by microRNA-183-5p via *MITF* gene

LIU Wan[1], ZHANG Xiaochen[1], ZHAO Chunnuan[2], ZHANG Haoyu[1], YANG Lijunsong[1], HAN Yijing[1], GAO Yan[2], WANG Xiaotong[1]

(1. School of Fisheries, Ludong University, Yantai 264025, China; 2. Yaitai Marine Economic Research Institute, Yantai 264003, China)

Received: Feb. 25, 2025
Key words: *Crassostrea gigas*; melanin; miR-183-5p; *MITF*

Abstract: Melanin synthesis is an extremely complex process involving multiple genes and microRNAs (miRNAs). In recent years, numerous studies have confirmed that miRNAs play important roles in mammalian coat color formation. However, only a few studies have examined the mechanisms by which miRNAs regulate melanin synthesis in shellfish. In *Crassostrea gigas* (*C. gigas*), the mantle is closely related to melaninosis, a key component of shell color formation and melanin production. In this study, RNAhybrid was used to predict the target genes of miR-183-5p. The effects of miR-183-5p on melanin synthesis were verified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), dual-luciferase reporter gene assays, and Masson–Fontana melanin staining. *In silico* predictions and dual-luciferase reporter gene assays confirmed that *microphthalmia-associated transcription factor* (*MITF*) is a target of miR-183-5p. qRT-PCR analysis revealed that miR-183-5p is expressed at higher levels in white than in black mantles of *C. gigas*. The overexpression of miR-183-5p significantly downregulated genes related to melanin formation. Melanin staining showed that the brown particles in the mimic group were markedly reduced compared to those in the negative control group. In conclusion, miR-183-5p may regulate melanin formation in *C. gigas* by targeting *MITF*.

(本文编辑：赵卫红)