

opn1lw2 基因在红光诱导斑马鱼皮肤色素细胞形成中的作用

廖永冠 李育媚 鲍宝龙*

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

摘要: 为了探究感红光视蛋白 2 基因 *opn1lw2* 在红光诱导斑马鱼 (*Danio rerio*) 皮肤色素细胞形成中的作用, 针对 AB 品系野生型斑马鱼利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除感红光视蛋白 2 基因 *opn1lw2*, 构建 *opn1lw2* 缺失的纯合 *opn1lw2*^{-/-} 品系。使用光强 (800 ± 100) lx 的红光 LED 灯 (每天光照 24 h) 对 15 日龄野生型斑马鱼和 *opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼进行 60 d 水面照射, 发现野生型斑马鱼背部皮肤黑色素细胞数量显著多于 *opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼。实时荧光定量 PCR 分析发现, 黑色素细胞标记基因 *kit* 在野生型斑马鱼背部皮肤表达量显著高于 *opn1lw2*^{-/-} 品系, 黄色素细胞标记基因 *csf1ra* 和虹彩细胞标记基因 *pnp4a* 在 *opn1lw2*^{-/-} 品系及野生型斑马鱼背部皮肤表达无显著差异。表明红光能通过 *opn1lw2* 基因调控斑马鱼背部皮肤黑色素细胞的形成, 但不影响皮肤黄色素细胞和虹彩细胞的形成; 而且, 调控黑色素细胞分化的 α -MSH 促黑激素的前体基因 *pomca* 在红光持续照射 60 d 的 *opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼背部皮肤中的表达显著低于野生型, 表明红光通过 *opn1lw2* 基因调控 *pomca* 基因的表达从而诱导黑色素细胞的形成。实时荧光定量 PCR 检测发现, 野生型斑马鱼皮肤中视黄醛脱氢酶基因 *raldh3* 表达量显著高于 *opn1lw2*^{-/-} 品系, 而视黄醛脱氢酶基因 *raldh2* 的表达, 在两种类型斑马鱼中没有差异, 表明 *opn1lw2* 基因可介导红光诱导视黄醛脱氢酶基因 *raldh3* 表达, 进而调控黑色素细胞的形成。这些结果对于深入理解红光诱导鱼类皮肤色素细胞形成有重要帮助。

关键词: 色素细胞; 红光; *opn1lw2*; 斑马鱼; 视黄酸合成酶

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2021) 04-608-09

The Role of *opn1lw2* in the Formation of Skin Pigment Cells in Zebrafish (*Danio rerio*) under Red Irradiation

LIAO Yong-Guan LI Yu-Mei BAO Bao-Long*

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

Abstract: In order to explore the effect of red light on the formation of skin pigment cells, CRISPR/Cas9 gene editing technology was used to construct a zebrafish line with homozygous deletion of the red light opsin

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31872546);

* 通讯作者, E-mail: blbao@shou.edu.cn;

第一作者介绍 廖永冠, 男, 硕士研究生; 研究方向: 发育生物学; E-mail: 949790185@qq.com。

收稿日期: 2021-01-07, 修回日期: 2021-04-02 DOI: 10.13859/j.cjz.202104013

2 gene *opn1lw2*. A red LED lamp with a light intensity of 800 ± 100 lx was used to irradiate 15-day-old AB strain wild-type zebrafish (*Danio rerio*) and *opn1lw2*^{-/-} strain zebrafish for 60 days, the number of melanocytes in the dorsum skin of wild-type and mutant zebrafish were counted with Photoshop CS5, and the data were analysed using GraphPad Prism6. The results showed that the number of melanocytes in the dorsum skin of wild-type zebrafish was significantly more than that of the mutant (Fig. 2a - c). Real-Time quantitative PCR (RT-PCR) analysis found that the expression of the melanocyte marker gene *kit* in the dorsum skin of wild-type zebrafish was significantly higher than that of the mutant (Fig. 2d). There was no significant difference in the expression of the xanthophore marker gene *csf1ra* and the iridophores marker gene *pnp4a* of the dorsum skin between wild zebrafish and the *opn1lw2*^{-/-} mutant (Fig. 3c, d), indicating that red light can regulate the formation of melanocytes in the dorsum skin of zebrafish through the *opn1lw2*, but does not affect the formation of skin xanthophores and iridophores; moreover, it regulates the differentiation of melanocytes. The expression of the precursor gene *pomca* of α -MSH in the dorsum skin of *opn1lw2*^{-/-} zebrafish was significantly lower than that of the wild type (Fig. 2e), indicating that red light regulates the expression of *pomca* gene through *opn1lw2* to induce the formation of melanocyte; RT-PCR detection found that the expression of retinal dehydrogenase *raldh3* in wild-type zebrafish skin was significantly higher than that of mutant *opn1lw2*^{-/-} (Fig. 4b), while there was no difference in expression of *raldh2* encoding retinal dehydrogenase (Fig. 4a), indicating that *opn1lw2* may selectively mediate the red light-induced synthesis of retinoic acid to regulate the formation of melanocytes. These results are important for understanding the formation of pigment cells in fish skin induced by red light irradiation.

Key words: Pigment cells; Red light; *opn1lw2*; Zebrafish; Retinoic acid synthase

鱼类体色主要是由其体表皮和鳞片所含色素细胞种类及数量决定, 其中, 黑色素细胞、黄色素细胞和虹彩细胞较为常见 (蒋焯等 2019)。关于红光影响鱼类体色的研究已有报道。马本贺 (2016) 及马本贺等 (2017) 发现, 红光能促进白条双锯鱼 (*Amphiprion frenatus*) 皮肤胡萝卜素的生成, 进而使其体色更加鲜明。对豹纹鳃棘鲈 (*Plectropomus leopardus*) 研究表明, 红光能显著促进其皮肤的黑色素生成 (周邦维 2014), 而其分子机理没有进一步探究。Shin 等 (2014) 研究表明, 红光能通过影响金鱼 (*Carassius auratus*) 垂体内分泌激素的合成, 改变自身体色。以上研究都表明红光能影响鱼类体色, 然而, 有关红光对鱼类色素细胞形成的具体分子机理, 少见有研究报道。海洋底层鱼类牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 皮肤的成体型黑色素细胞是通过皮肤中感蓝光视锥视蛋白 *sws2* 感受水面下的蓝光, 诱导皮肤视黄醛脱氢

酶 3 基因 (*raldh3*) 的表达, 合成 9-顺-视黄酸, 从而调控黑色素细胞的形成 (Shao et al. 2017), 而红光对鱼类色素细胞是否存在相似的调控机理, 尚未清楚。

本研究拟通过构建感红光视锥视蛋白 2 基因 *opn1lw2* 缺失的纯合 *opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼 (*Danio rerio*), 探究 *opn1lw2* 基因在红光照射中对斑马鱼背部皮肤黑色素细胞、黄色素细胞及虹彩细胞形成的作用, 并检测调控黑色素细胞形成的阿黑皮素原基因 (pro-opiomelanocortin-a gene, *pomca*) 和视黄酸合成相关基因视黄醛脱氢酶基因 (retinal dehydrogenases gene, *raldhs*) 的表达水平变化, 从分子层面理解光线调控鱼类色素细胞形成的机制。

1 材料与方法

1.1 突变体构建及实时荧光定量 PCR 引物

所用 AB 系野生型斑马鱼饲养于上海海洋

大学水产与生命学院生物发育系实验室，饲养光周期为 14 h 明/10 h 暗，水温为 26 ~ 28 °C。在 (<https://genome.ucsc.edu/>) 网站上设计斑马鱼 *opn1lw2* 基因的敲除靶点，查询 *opn1lw2* 基因 DNA 序列（基因编号 436716）内含子、外显子结构及其转录本信息，敲除靶点设计在第一外显子编码序列上，以确保敲除有效。靶点序列、分型检测引物及实时荧光定量 PCR 引物序列见表 1。

合成 *opn1lw2* 基因向导 RNA (sgRNA)。PCR 体系：2 × *Taq* PCR Master Mix 10 μl、*opn1lw2*-Target (靶点序列) 1.5 μl、Oligo2 (通用序列) 1.5 μl、ddH₂O 7 μl。靶点序列 *opn1lw2*-Target 与通用序列 Oligo2 可结合形成双链 DNA，具有转录功能。PCR 程序：98 °C 2 min，50 °C 10 min，72 °C 10 min。使用 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒 (NEB 公司) 对上步 PCR 产物进行体外转录，步骤参考

说明书，用 RNA Clean & Concentrator Kit 试剂盒 (Zymo Research 公司) 纯化转录产物，获得 sgRNA，步骤参考说明书。

合成 Cas9 mRNA。实验采用 T3 质粒 pT3TS-nCas9n，*Xba* I 酶 (NEB 公司) 37 °C 水浴 2 h 酶切。用 PCR Purification Kit 试剂盒 (QIAGEN 公司) 对酶切产物进行纯化，步骤参考试剂盒说明书。使用 HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒 (NEB 公司) 对纯化产物进行体外转录，步骤参考试剂盒说明书。用 RNA Clean & Concentrator Kit 试剂盒 (Zymo Research 公司) 纯化转录产物，获得 Cas9 mRNA，步骤参考试剂盒说明书。

将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 按照 25 ~ 50 pg sgRNA 和 150 ~ 300 pg Cas9 mRNA 的比例混合，通过显微注射方法将其注射到野生型斑马鱼 1 细胞期的胚胎中，胚胎于 1%浓度的亚甲基蓝溶液中置于 28 °C 恒温培养箱孵化。

表 1 *opn1lw2* 敲除靶点、引物及实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Target knockout and primer sequence of *opn1lw2* and primer of RT-PCR

基因 Gene	序列 Sequence (5'-3')	退火温度 (°C) Annealing Temperature
<i>opn1lw2</i> -Target	TAATACGACTCACTATAGGCGAGGGGACGAAACAACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC	60
Oligo2	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAA CTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC	57
<i>opn1lw2</i> -F	TGTAACGACGCGCCAGTTAAGGGGCAAAGGACAGACC	60
<i>opn1lw2</i> -R	GTGTCTTTCGAGGGGCAATGTGGTAAT	60
β-actin-F	GGAAATCGTGCGTGACATTAAG	60
β-actin-R	CCTCTGGACAACGGAACCTCT	60
<i>pomca</i> -F	GCCCCTGAACAGATAGAGCC	60
<i>pomca</i> -R	CTTGATGGGTCTGCGTTTGC	60
<i>raldh2</i> -F	CGTGAACCTCGGAGAGATCGG	60
<i>raldh2</i> -R	CCCACCAAAGGATAACGGCT	60
<i>raldh3</i> -F	TCAAGCCGCGAAGGTTATT	60
<i>raldh3</i> -R	CATCGACCGGCATGGTTTTC	60
<i>csflra</i> -F	ACGTCACATGGACACACTCC	60
<i>csflra</i> -R	GCTTCGTTCTGACCCGTACA	60
<i>pnp4a</i> -F	GGACATCCCTGGCTTTCCTC	60
<i>pnp4a</i> -R	AACTGTCCGCTAATGACCCC	60
<i>kit</i> -F	AGTGCCTCTCAAGGTGTCAG	60
<i>kit</i> -R	GCACTTGTCCATCAATCGGC	60

使用碱裂解法提取斑马鱼 DNA, 剪取饲养至 3 月龄大斑马鱼的少许尾鳍, 置于 PCR 管内, 加入 10 μ l 50 μ mol/L NaOH 溶液, 在 95 $^{\circ}$ C 条件下裂解 15 min, 加入 10 μ l 50 μ mol/L Tris-HCl 进行中和。以裂解得到的 DNA 为模板, 用特异性引物 *opn1lw2*-F 和 *opn1lw2*-R 进行 PCR 扩增。PCR 体系: 2 \times Taq PCR Master Mix 10 μ l、DNA 3 μ l、*opn1lw2*-F 0.5 μ l、*opn1lw2*-R 0.5 μ l、ddH₂O 6 μ l。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 12 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司经毛细管电泳检测。

经毛细管电泳检测筛选 *opn1lw2* 基因突变碱基为非 3 倍数的个体进行分子克隆, 与野生 *opn1lw2* 基因序列对比, 选取敲除有效的个体进行交配获得 F1 代, 饲养至 3 月龄成鱼, 剪尾进行 PCR 扩增(体系、程序同上), 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行毛细管电泳检测。

1.2 光照实验

将孵化后 15 d 的野生型斑马鱼和 *opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼置于遮光实验架上(铁架用遮光布遮光, 避免外界光源干扰), 在顶部安置红光 LED 灯。设置 3 个对照组及 3 个实验组, 每组的鱼缸内放置 20 尾鱼, 早晚各投喂 1 次, 定时换水。调节鱼缸和灯管的位置, 使灯管距离水面 20 cm, 保持水面光照的强度为 (800 \pm 100) lx, 全天保持红光照射, 持续光照 60 d。

1.3 黑色素细胞统计方法

照射 60 d 野生型、*opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼分别取 20 尾, 在尼康体视显微镜 4 倍视野下进行拍照, 统计斑马鱼背部各 6 处, 即分左背右背, 分别为从头到尾的 1/4、1/2 和 3/4 处, 共 6 处的皮肤 0.01 cm² 面积中黑色素细胞的数量。具体方法为, 使用 Photoshop CS5 软件, 按图片相应比例尺使用 0.1 cm \times 0.1 cm 画框选定, 选定区域经放大后可直接统计黑色素细胞数量。GraphPad Prism6.0 软件对数据进行单尾 *t* 检验

分析, GraphPad Prism6.0 软件默认 *P* 值为 4 档, *P* < 0.05、*P* < 0.01、*P* < 0.001 和 *P* < 0.0001。

1.4 实时荧光定量 PCR

Trizol 法提取 *opn1lw2*^{-/-} 品系、野生型斑马鱼背部皮肤 RNA, 使用 M-MLV 反转录试剂盒 (Promega 公司) 将 RNA 反转成 cDNA, 具体步骤参考试剂盒说明。以 β -actin 为内参基因, 设置 3 个重复组, 实时荧光定量 PCR 引物见表 1。PCR 体系: 实时荧光定量 PCR 混合物 qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme 公司) 10 μ l、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ l、cDNA 1 μ l、DEPC H₂O 8 μ l。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s。相对表达量采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算, 统计分析使用 GraphPad Prism6.0 软件, 采用单尾 *t* 检验分析比较各基因的表达差异。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼 *opn1lw2*^{-/-} 品系构建

野生型、*opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼 PCR 产物毛细管电泳检测结果见图 1, 野生型斑马鱼 *opn1lw2* 基因 PCR 扩增片段大小为 406 bp (图 1a), *opn1lw2*^{-/-} 品系的 *opn1lw2* 基因 PCR 扩增片段大小为 410 bp (图 1b)。野生型与 *opn1lw2*^{-/-} 品系 *opn1lw2* 基因靶点序列对比, 表明 *opn1lw2*^{-/-} 品系 *opn1lw2* 基因靶点插入 4 bp (图 1c)。

2.2 野生型、突变体斑马鱼背部皮肤黑色素细胞数量、标记基因表达量比较

依据野生型斑马鱼外观(图 2a 左图)及从头至尾部 1/2 处背部皮肤(图 2a 右图)和 *opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼外观(图 2b 左图)及从头至尾部 1/2 处背部皮肤(图 2b 右图)统计黑色素细胞数量, 野生型斑马鱼背部黑色素细胞数量显著多于 *opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼(图 2c, *P* < 0.0001)。RT-PCR 定量检测斑马鱼背部皮肤中黑色素标记基因 *kit* 表达量, 野生型极显著量高于 *opn1lw2*^{-/-} 品系突变体(图 2d, *P* < 0.001), 而促黑激素前体基因 *pomca* 的表达量, 野生型亦显著高于 *opn1lw2*^{-/-} 品系(图 2e, *P* < 0.01)。

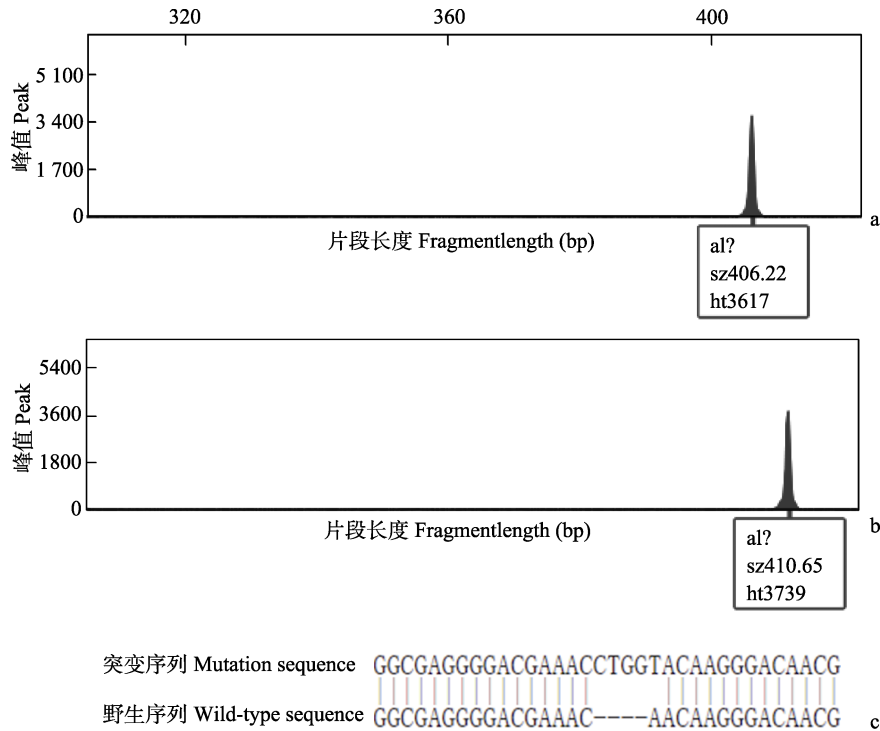


图 1 *opn1lw2* 基因敲除检测结果

Fig. 1 The result of *opn1lw2* gene knockout

a. 野生型 *opn1lw2* 基因毛细管电泳检测结果; b. *opn1lw2^{-/-}* 品系 *opn1lw2* 基因毛细管电泳检测结果; c. 野生型与 *opn1lw2^{-/-}* 品系靶点序列对比。

a. Wild-type *opn1lw2* gene capillary electrophoresis detection results; b. Capillary electrophoresis detection results of *opn1lw2^{-/-}* strain *opn1lw2* gene; c. Wild-type and *opn1lw2^{-/-}* strain sequence comparison.

图中 sz 指标为 PCR 扩增产物的片段长度 (bp), 为仪器检测峰值, al 为峰面积。

The sz (size) indicator in the figure is the fragment length (bp) of the PCR amplified product, ht (height) is the height of the peak (Peak) detected by the instrument, al is the peak area.

2.3 野生型、突变体斑马鱼背部皮肤黄色素细胞、虹彩细胞差异比较

比较野生型 (图 3a) 与 *opn1lw2^{-/-}* 品系 (图 3b) 斑马鱼从头至尾部 1/2 处背部皮肤外观图, 并以实时荧光定量 PCR 检测, 二者背部皮肤黄色素细胞标记基因 *csf1ra* 和虹彩细胞标记基因 *pnp4a* 的表达量均无显著差异 (图 3c, d)。

2.4 野生型、突变体斑马鱼背部皮肤视黄酸合成酶基因 *raldhs* 表达量比较

为了调查红光是否通过诱导视黄酸合成通路诱导黑色素细胞形成, 对野生型斑马鱼和 *opn1lw2^{-/-}* 品系斑马鱼背部皮肤的 *raldhs* 基因进行实时荧光定量 PCR 检测, 野生型斑马鱼与

opn1lw2^{-/-} 品系背部皮肤 *raldh2* 表达量无显著差异 (图 4a), 而野生型斑马鱼背部皮肤 *raldh3* 的表达量显著高于 *opn1lw2^{-/-}* 品系 ($P < 0.05$, 图 4b)。

3 讨论

3.1 *opn1lw2* 介导红光影响斑马鱼黑色素细胞形成

敲除斑马鱼感红光视蛋白 2 基因 *opn1lw2* 后, 影响斑马鱼皮肤黑色素细胞的形成。黑色素细胞标记基因 *kit* 实时荧光定量 PCR 结果表明, *opn1lw2* 介导红光诱导黑色素细胞形成。

实时荧光定量 PCR 结果表明, *opn1lw2^{-/-}*

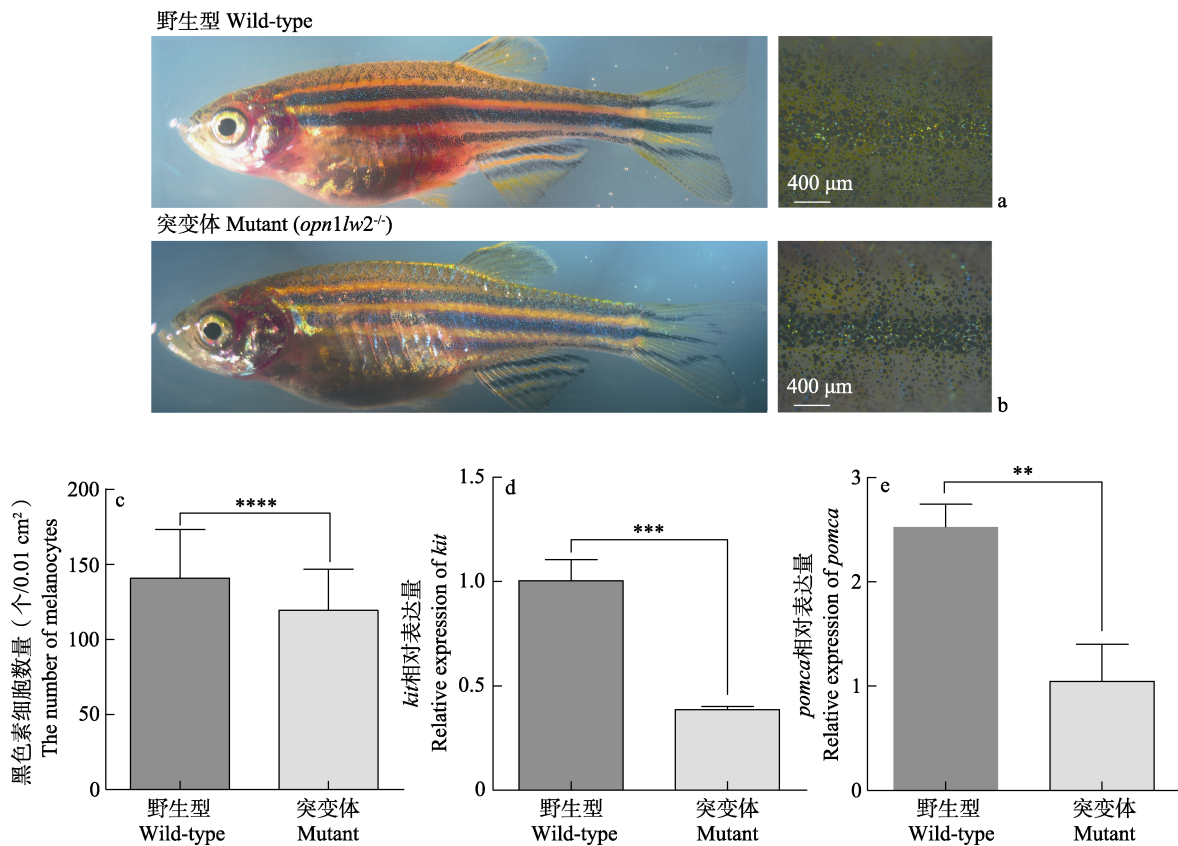


图 2 红光照射 60 d 斑马鱼背部皮肤黑色素细胞数量

Fig. 2 The number of melanocytes in the dorsum skin of zebrafish after 60 days of red light irradiation

a. 野生型斑马鱼整体图(左图)及从头至尾部 1/2 处背部皮肤(右图); b. *opn1lw2*^{-/-}品系斑马鱼整体图(左图)及从头至尾部 1/2 处背部皮肤(右图); c. 黑色素细胞数量; d. 背部皮肤 *kit* 基因相对表达量; e. 背部皮肤 *pomca* 基因的相对表达量。

a. The overall picture of wild-type zebrafish (left picture) and the dorsum skin from head to 1/2 tail place (right picture); b. *opn1lw2*^{-/-} strain-zebrafish overall picture (left picture) and the dorsum of from head to 1/2 tail place (right picture); c. Number of melanocytes; d. Relative expression of *kit* gene in dorsum skin; e. Relative expression of *pomca* gene in dorsum skin.

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

品系斑马鱼与野生型斑马鱼二者间黄色素细胞及虹彩细胞的标记基因表达量均没有差异,表明 *opn1lw2* 可能不介导红光诱导黄色素细胞和虹彩细胞的形成。为何 *opn1lw2* 基因的缺失只影响斑马鱼皮肤黑色素细胞形成,而不影响黄色素细胞和虹彩细胞的形成? 感红光视蛋白基因在斑马鱼基因组中有两个亚型 *opn1lw1* 和 *opn1lw2* (Takechi et al. 2005)。本研究中只敲除感红光视蛋白基因 *opn1lw* 的亚型 *opn1lw2*, 是否 *opn1lw1* 在红光影响斑马鱼色素细胞形成中也起作用呢, 还需进一步研究。其次, 色素

细胞由神经嵴细胞分化而来, 在斑马鱼条纹形成过程中各种色素细胞发育模式也各有差异。集落刺激因子 1 受体基因 *csflr* 促进黄色素细胞发育与分化, 而最近发现 *csflr* 是由虹彩细胞表达, 促进黑色素细胞和黄色素细胞分化与增殖 (Frohnhofer et al. 2013)。当黄色素细胞的密度增加到一定程度后, 会抑制虹彩细胞的发育与形成, 终止斑马鱼条纹的发育与形成 (Patterson et al. 2014)。同时还发现, 甲状腺激素能够减少黑色素细胞的产生, 却能促进黄色素细胞的发育 (McMenamin et al. 2014)。色素细

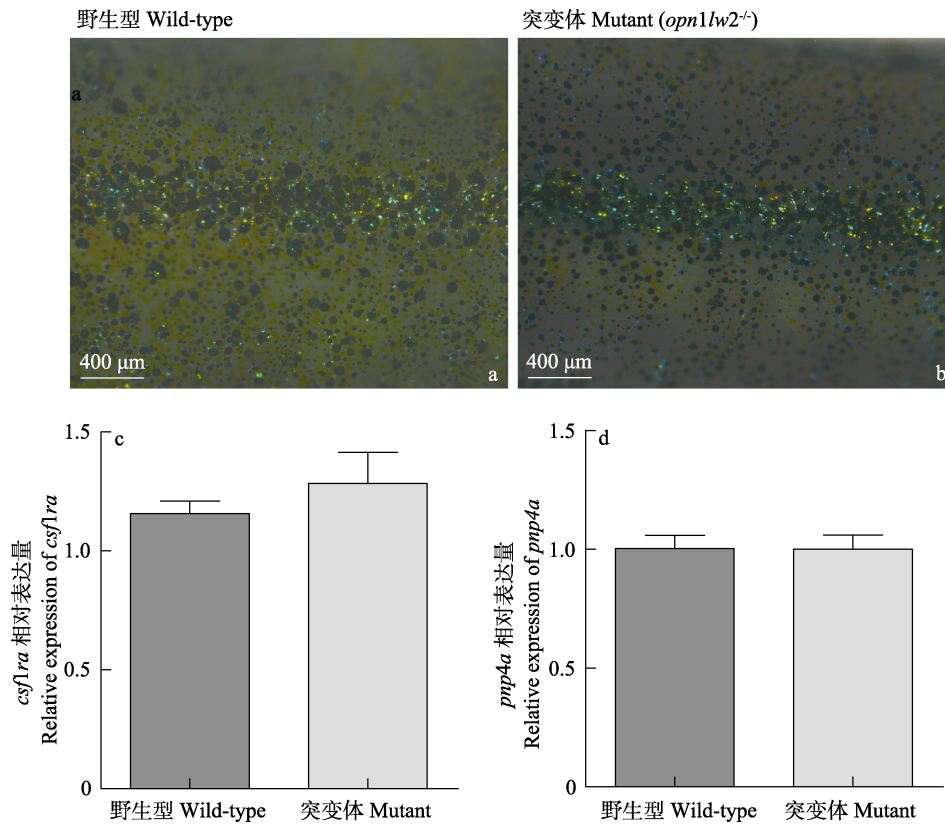


图 3 红光对斑马鱼背部皮肤 *csf1ra* 和 *pnp4a* 表达的影响

Fig. 3 Expression of *csf1ra* and *pnp4a* in dorsum of zebrafish

a. 野生型斑马鱼从头至尾部 1/2 处背部皮肤; b. *opn1lw2^{-/-}* 品系斑马鱼从头至尾部 1/2 处背部皮肤; c. 背部皮肤 *csf1ra* 基因相对表达量; d. 背部皮肤 *pnp4a* 基因相对表达量。
 a. Wild-type zebrafish from head to 1/2 tail of the dorsum skin appearance; b. *opn1lw2^{-/-}* strain zebrafish from head to 1/2 tail of the dorsum skin appearance; c. Relative expression of *csf1ra* gene in dorsum skin; d. Relative expression of *pnp4a* gene in dorsum skin.

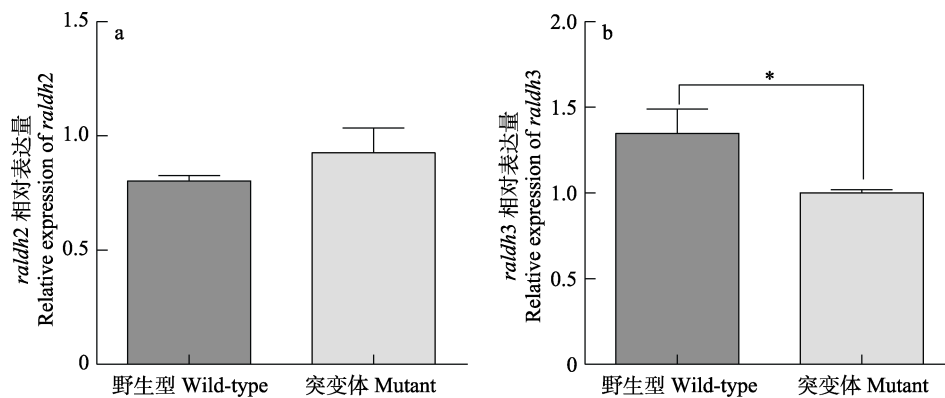


图 4 红光对斑马鱼背部皮肤 *raldh2* (a) 和 *raldh3* (b) 表达的影响

Fig. 4 Expression of *raldh2* (a) and *raldh3* (b) in dorsum of two kinds of zebrafish

* $P < 0.05$

胞间的互作模式以及其他激素的调控影响说明黄色素细胞、虹彩细胞形成的调控机制并非单一,还涉及多种调控因子及调控通路。

3.2 *opn1lw2* 基因的缺失影响 *raldh3* 基因的表达而不是 *raldh2*

海洋底层鱼类牙鲆皮肤的成体型黑色素细胞形成是通过皮肤的感蓝光视锥视蛋白基因 *sws2*, 感受水面下的蓝光, 诱导皮肤视黄醛脱氢酶 3 基因 (*raldh3*) 的表达, 合成 9-顺-视黄酸, 从而调控黑色素细胞的形成 (Shao et al. 2017)。斑马鱼中存在 *raldh2* 和 *raldh3* 两种视黄醛脱氢酶基因 (Pittlik et al. 2008), 为了调查红光是否通过诱导视黄酸合成调控黑色素细胞形成, 实时荧光定量 PCR 对斑马鱼中视黄醛脱氢酶基因进行检测, 发现 *raldh2* 在野生型和 *opn1lw2*^{-/-} 品系斑马鱼背部皮肤表达量无显著差异, 而 *raldh3* 的表达量前者显著高于后者。结果说明, 红光能通过感红光视蛋白基因 *opn1lw2* 介导调控视黄酸的合成, 进而影响黑色素细胞的形成, 这与蓝光影响牙鲆皮肤黑色素细胞形成 (Shao et al. 2017) 的机制类似。同样, 姚晓华 (2019) 研究发现, 蓝光也能促进斑马鱼皮肤 *raldh3* 基因的表达, 影响视黄酸合成, 进而诱导黑色素细胞的形成。然而, *opn1lw2* 基因的缺失为何只影响红光对 *raldh3* 基因的表达而不影响 *raldh2* 基因的表达, 目前尚不清楚。

3.3 红光能诱导斑马鱼皮肤 *pomca* 基因的表达

阿黑皮素原 (POMC) 所衍生的多种激素, 如促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、促黑色素细胞激素 (melanocyte-stimulating hormone, MSH) 等, 其中, 促肾上腺皮质激素 (ACTH) 可生成促黑色素细胞激素 (MSH) 以及促肾上腺皮质素垂体中叶肽 (corticotropin like intermediate lobe peptide, CLIP 片段, 魏平 2001), 而促黑色素细胞激素 (MSH) 是诱发养殖鱼类体色黑化的重要多肽之一。阿黑皮素原 (POMC) 介导高密度和黑暗环境诱发养殖牙鲆无眼侧黑化发生的过程, 同时, 阿黑皮素原 (POMC) 及其衍

生多肽促黑色素细胞激素 (MSH) 都参与鲆鲽鱼类无眼侧黑化的过程 (Kang et al. 2012, 史学营等 2015)。斑马鱼的 POMC 编码基因主要为 *pomca*, 实时荧光定量 PCR 检测发现野生型斑马鱼背部皮肤 *pomca* 表达量显著高于 *opn1lw2*^{-/-} 品系。Shin 等 (2014) 研究发现, 红光 LED 灯照射金鱼 6 个月后, 能促进其垂体 *pomc* 的表达, 表明红光能诱导鱼类 *pomc* 的表达。已知由 POMC 所衍生的促黑色素细胞激素 MSH 直接调控黑色素细胞形成, 而本研究表明红光能诱导斑马鱼背部皮肤 *pomca* 表达, 为红光诱导斑马鱼皮肤黑色素细胞形成提供了充分证据。

本研究敲除斑马鱼 *opn1lw2* 基因, 发现 *opn1lw2* 介导红光影响视黄酸合成和黑色素细胞刺激激素前体基因 *pomca* 表达, 从而调控斑马鱼皮肤黑色素细胞的形成。其中涉及到的上、下游通路虽然还不清楚, 但却为我们提供重要启示, 其他不同颜色的光是否也通过相应的感光视蛋白基因介导调控色素细胞的形成。是光线介导所产生的视黄酸与甲状腺激素互作而共同调控色素细胞的形成, 还是视黄酸直接参与调控阿黑皮素原 *pomca* 的表达进而诱导色素细胞的形成? 有待进一步的探究验证。

参 考 文 献

- Frohnhofer H G, Krauss J, Maischein H M, et al. 2013. Iridophores and their interactions with other chromatophores are required for stripe formation in zebrafish. *Development*, 140(14): 2997–3007.
- Kang D Y, Kim H C. 2012. Relevance of environmental factors and physiological pigment hormones to blind-side hypermelanosis in the cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(21): 356–357.
- Patterson L B, Bain E J, Parichy D M. 2014. Pigment cell interactions and differential xanthophore recruitment underlying zebrafish stripe reiteration and *Danio* pattern evolution. *Nature Communications*, 5: 5299.
- Pittlik S, Domingues S, Meyer A, et al. 2008. Expression of zebrafish

- aldh1a3 (raldh3)* and absence of *aldh1a1* in teleosts. *Gene Expression Patterns*, 8(3): 141–147.
- McMenamin S K, Bain E J, McCann A E, et al. 2014. Thyroid hormone-dependent adult pigment cell lineage and pattern in zebrafish. *Science*, 345(6202): 1358–1361.
- Shao C, Bao B, Xie Z, et al. 2017. The genome and transcriptome of Japanese flounder provide insights into flatfish asymmetry. *Nature Genetics*, 49(1): 119–124.
- Shin H S, Choi C Y. 2014. The stimulatory effect of LED light spectra on genes related to photoreceptors and skin pigmentation in goldfish (*Carassius auratus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(4): 1229–1238.
- Takechi M, Kawamura S. 2005. Temporal and spatial changes in the expression pattern of multiple red and green subtype opsin genes during zebrafish development. *Journal of Experimental Biology*, 208(7): 1337–1345.
- 蒋焯, 黄权. 2019. 鱼类体色成因及影响因素研究进展. *水产科技情报*, 46(2): 110–113.
- 马本贺. 2016. 环境光色对白条双锯鱼 (*Amphiprion frenatus*) 幼鱼的影响及相关基因克隆研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 马本贺, 孙志宾, 马爱军, 等. 2017. 环境光色对白条双锯鱼 (*Amphiprion frenatus*) 幼鱼生长和体色的影响. *海洋与湖沼*, 48(1): 148–154.
- 史学营, 徐永江, 武宁宁, 等. 2015. 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 体表色素细胞观察及 POMC 表达特性分析. *渔业科学进展*, 36(2): 45–54.
- 魏平. 2001. 垂体内外 POMC 基因表达调控研究进展. *国外医学: 内分泌学分册*, 21(1): 39–41.
- 姚晓华. 2019. 蓝光影响鱼类隐蔽伪装色形成的信号通路. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 周邦维. 2014. 主要营养源及光色对工业养殖豹纹鳃棘鲈生长、肤色及生理指标的效应研究. 青岛: 中国科学院研究生院/海洋研究所硕士学位论文.