

张海松,刘润来,苏惠贤,等. miR-200a通过靶向 *CDC45* 调节绒山羊皮肤色素沉着[J]. 山西农业科学, 2025, 53(6):64-71.
ZHANG H S, LIU R L, SU H X, et al. miR-200a regulates skin pigmentation in cashmere goats by targeting *CDC45*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2025, 53(6):64-71.

doi:10.26942/j.cnki.issn.1002-2481.2025.06.08

miR-200a通过靶向 *CDC45* 调节绒山羊皮肤色素沉着

张海松^{1,2}, 刘润来^{1,2}, 苏惠贤², 李欣雨², 赵雨鑫², 张巧灵², 李建平¹

(1. 吉林农业科技学院 动物科技学院, 吉林 吉林 132109; 2. 吉林大学 动物医学学院, 吉林 长春 130062)

摘要:为了揭示 miR-200a 是否通过靶向调控 *CDC45* 基因来影响辽宁绒山羊黑色素生成的生物学过程, 选取黑、白色辽宁绒山羊采集背部皮肤组织, 同时利用已保存的 HEK293T 细胞(人胚肾细胞)与 B16 细胞(黑色素瘤细胞)作为体外研究模型。首先通过运用 miR 数据库挖掘, 预测到 *CDC45* 基因的 3'UTR 存在一个高度保守的 miR-200a 特异性结合位点; 为验证二者之间的相互作用, 在 HEK293T 细胞中构建了双荧光素酶报告基因系统进行验证; 然后采用免疫荧光技术, 对各组 B16 细胞内 *CDC45* 基因表达的特定分子(蛋白质、抗原等)进行精确定位与可视化表达分析; 同时通过克隆形成试验, 评估各组 B16 细胞的增殖潜能。最后借助 qRT-PCR 及 Western blot 等技术, 全面评估 *CDC45* 基因在羊皮组织及 B16 细胞中的表达水平。结果表明, miR-200a 的过表达在转录后(mRNA)及翻译后(蛋白质)水平均显著抑制了 *CDC45* 的活性, 而针对该结合位点的突变处理则完全消除了这一抑制效应; 在 B16 细胞模型中, miR-200a 诱导的 *CDC45* 表达下调与黑色素细胞增殖能力的显著减弱呈现出紧密关联。从分子机制层面深入分析, 结果发现, 通过 miR-200a-mimic 转染来降低 *CDC45* 表达的效果, 与 miR-200a 直接过表达所产生的影响高度一致, 表明 miR-200a 与 *CDC45* 之间存在明确的功能性联系。综上, 该研究结果证实了 miR-200a 能够特异性靶向调控 *CDC45* 基因。

关键词: miR-200a; *CDC45*; 黑色素生成; 免疫荧光技术; Western blot; 皮肤色素沉着; B16

中图分类号: S827.9+1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2481(2025)06-0064-08

miR-200a Regulates Skin Pigmentation in Cashmere Goats by Targeting *CDC45*

ZHANG Haisong^{1,2}, LIU Runlai^{1,2}, SU Huixian², LI Xinyu²,

ZHAO Yuxin², ZHANG Qiaoling², LI Jianping¹

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural Science and Technology University,

Jilin 132109, China; 2. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: To investigate whether miR-200a regulates melanin production in Liaoning cashmere goats through targeting the *CDC45* gene, in this study, dorsal skin tissues from black and white goats were collected and preserved HEK293T cells (human embryonic kidney cells) and B16 cells (melanoma cells) were used as in vitro models. Through miR database mining, a highly conserved miR-200a-binding site in the 3'UTR of *CDC45* was predicted. To validate this interaction, a dual-luciferase reporter system in HEK293T cells was constructed for detection. Immunofluorescence analysis was utilized to precisely localize and visualize specific molecules (proteins, antigens) expressed by *CDC45* in B16 cells across the groups. Simultaneously, clonogenic assay was employed to evaluate proliferative potential of B16 cells across the groups. Finally, *CDC45* expression patterns in both skin tissues and B16 cells was comprehensively assessed by qRT-PCR and Western blot analyses. The results revealed that miR-200a overexpression significantly inhibited *CDC45* activity at both post-transcriptional (mRNA) and post-translational (protein) levels, with complete suppression achieved through mutation targeting this binding site. In B16 cell models, miR-200a-induced *CDC45* downregulation was closely associated with markedly reduced melanocyte proliferation capacity. Molecular analysis revealed that miR-200a-mimic transfection-induced reduction of *CDC45* expression was highly

收稿日期: 2025-09-20

基金项目: 吉林省教育厅项目 (JJKH20220399KJ)

作者简介: 张海松, 在读硕士, 研究方向: 动物毛囊发育与毛色遗传, E-mail: 2459593372@qq.com。张海松、刘润来为同等贡献作者

通信作者: 李建平, 副教授, 博士, 主要从事动物毛囊发育与毛色遗传研究, E-mail: lijianping@jlnku.edu.cn

consistent with direct miR-200a overexpression, indicating a clear functional relationship between miR-200a and *CDC45*. Collectively, miR-200a's ability to specifically target and regulate the *CDC45* gene was confirmed in this study.

Keywords: miR-200a; *CDC45*; melanogenesis; immunofluorescence technique; Western blot; skin pigmentation; B16

动物皮肤色素沉着形成源于遗传、表观遗传与环境因素的复杂交互作用^[1-3]。在表观遗传调控因子中,mi核糖核酸(miRNA)已成为基因表达的关键调节器^[4-5],通过精细调控黑色素细胞增殖、分化与黑色素体生成之间的平衡关系。辽宁绒山羊作为我国优质绒肉兼用型品种,其羊绒的经济价值与市场需求持续增长,而天然毛色对提升产品品质及避免染色健康风险至关重要。当前绒山羊毛色单一、分布不均等问题限制了产业升级。毛色表型受多因素调控,其中基因调控网络为核心机制。尽管绒山羊中的miR-200a等miRNA已被证实通过 *WNT5A* 和 *FZD4* 等靶标参与色素沉着调控^[6],但关于miR-200a在皮肤生物学中作用的更广泛调控网络仍不完全明确。

细胞分裂周期蛋白45(*CDC45*)^[7-8]是DNA复制起始机制中保守且不可或缺的核心组分,它通过形成CMG复合物(*CDC45*/MCM2-7/GINS解旋酶复合物)在S期解旋DNA。除了在基因组复制中的经典功能外,*CDC45*还与DNA损伤反应通路及细胞增殖调控相关^[9-10]。然而,该蛋白在非增殖过程(如组织特异性分化或色素沉着)中的潜在作用尚未被深入探索。

本研究提出了一种新型调控轴机制:miR-200a通过靶向*CDC45*,将细胞周期调控与黑色素细胞功能及皮肤色素沉着联系起来。基于生物信息学预测、双荧光素酶报告基因检测以及在HEK293T(人胚肾细胞)细胞和B16(黑色素瘤细胞)细胞中的功能研究^[11],用于证实miR-200a对*CDC45*表达量的影响,从而观察黑色素细胞增殖与黑色素合成情况,旨在揭示细胞周期动态与黑色素生成之间此前未被认知的相互作用关系。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2025年5月在吉林省白山市养殖中心选取黑、白毛色辽宁绒山羊各4只,采集其肩胛骨部皮肤组织,处理后用锡纸包裹后放置于-80℃冰箱中分装保存。同年5—9月在吉林大学动物医学院病理实验室完成相关试验。

1.2 主要试剂和器材

HEK、293T细胞和B16细胞由吉林大学动物医学学院病理实验室保存。*E. coli* DH5 α 感受态细胞(生工生物工程(上海)股份有限公司),RNA提取试剂(北京聚合美生物有限公司),反转录试剂盒、荧光定量试剂盒(湖南一诺唯真科技有限公司),胶回收试剂盒(美国Dwyer Omega集团),LB(肉膏蛋白胨培养基)粉末(德国达姆施塔特默克集团),双荧光素酶报告基因检测试剂盒(普洛麦格(北京)生物技术有限公司),无内毒素质粒提取试剂盒(美国Dwyer Omega集团),*Xho* I限制性内切酶、*Not* I限制性内切酶(宝日医生物技术(北京)有限公司)。

4℃离心机(武汉赛默飞世尔科技公司),Nuclease-Free离心管(中国兰杰柯科技有限公司),超净台(飞龙伟业试验设备有限公司),恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司),微量核酸蛋白检测仪、实时荧光定量PCR系统、核酸检测仪(武汉赛默飞世尔科技公司),PCR扩增仪(美国伯腾仪器有限公司),核酸电泳槽(中国卡尤迪生物科技有限公司),凝胶成像仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 细胞培养与转染 在-80℃冰箱中取出冻存的HEK293T细胞和B16细胞,放置在37℃水浴锅中进行解冻,在超净台中将HEK293T细胞和B16细胞转移至含有胎牛血清(FBS)、青霉素和链霉素的高糖DMEM培养瓶中,并置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。将培养瓶内的2类细胞用胰酶消化后铺至细胞6孔板中继续培养,待细胞贴壁后更换培养基。在倒置荧光显微镜下观察细胞,待细胞生长密度达80%时开始进行转染,将小干扰RNA和一组对照组(NC)转染进细胞,每组设3个重复。按照转染试剂盒操作说明进行转染。

1.3.2 绒山羊羊皮组织细胞与B16细胞内标志基因的实时荧光定量PCR检测 为检测miR-200a在绒山羊皮肤组织及B16细胞中的表达水平,首先将液氮研磨后的羊皮组织粉末与转染后(miR-

200a mimics/inhibitor 处理)的 B16 细胞分别提取总 RNA,并检测其纯度与浓度。随后将 RNA 反转录为 cDNA,针对 miR-200a 设计特异性茎环引物,以 *U6* 为内参基因进行 qRT-PCR(表 1),定量分析各组样本中 miR-200a 的相对表达量。qRT-PCR

反应要严格遵循反应体系(表 2),采用 20 μ L 无核酸酶体系以避免 RNA 降解,所有试剂均使用经 DEPC 处理的水配制。扩增后通过溶解曲线分析验证产物特异性,确保检测结果的准确性。

表 1 本研究中使用的引物
Tab.1 Primers used in the study

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	应用 Application
<i>miR-200a-RT</i>	CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACATCG	RT-PCR
<i>miR-200a-F</i>	ACACTCCAGCTGGGTAACACTGTCTGGTAAC	实时荧光定量 PCR
<i>miR-200a-R</i>	TGGTGTCTGGAGTCG	实时荧光定量 PCR
<i>U6-RT</i>	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	RT-PCR
<i>U6-F</i>	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAAT	实时荧光定量 PCR
<i>U6-R</i>	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT	实时荧光定量 PCR
β -actin-F	CTAAGGAGAAGGGCCAGTCC	实时荧光定量 PCR
β -actin-R	CTCAAGTTGGGGGACAAAAA	实时荧光定量 PCR
<i>CDC45-F(WT)</i>	TCGAGGCCACTATTCAGTTGTAAGATAACATTTGAAATGTGA	双素荧光酶报告基因
<i>CDC45-R(WT)</i>	GGCCTCACATTTCAAATGTTATCTTACAACGAATAGTGGCC	双素荧光酶报告基因
<i>CDC45-F(MT)</i>	TCGAGGCCACTATTCAGTTGTCAGTTAACATTTGAAATGTGA	双素荧光酶报告基因
<i>CDC45-R(MT)</i>	GGCCTCACATTTCAAATGTTAACTGACAACGAATAGTGGCC	双素荧光酶报告基因

注:MT.突变型;WT.野生型。

Note: MT. Mutant type; WT. Wild type.

表 2 实时荧光定量 PCR 体系
Tab.2 Real time fluorescence quantitative PCR system

试剂名称 Reagent name	剂量/ μ L Dose
2xTaq SYBR Green qPCR Premix	10
cDNA	1
上游引物 Forward primer	1
下游引物 Reverse primer	1
Nuclease-Free 水	7

1.3.3 Western blot 检测绒山羊羊皮组织细胞与 B16 相关蛋白表达 检测的目的是在翻译后水平(蛋白水平)验证 miR-200a 对 *CDC45* 表达的调控作用。在体外细胞试验中,通过脂质体转染技术将 miR-200a 模拟物(mi 组)和 miR-200a 抑制剂(ih 组)导入 B16 细胞。设置 mimics 组、NC 组和 inhibitor 组是遵循“功能获得—功能缺失—基线对照”的分子功能研究金标准。将研磨好的羊皮组织样本和转染后的 B16 细胞加入预冷的 RIPA 裂解液(含蛋白酶和磷酸酶抑制剂),冰上超声裂解后,于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度,按等质量上样至 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离。电泳结束后,将凝胶、PVDF 膜及

滤纸置于湿转缓冲液中,使蛋白转移至膜上。随后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(稀释比 1:10 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后,加入 HRP 标记二抗(1:10 000)室温孵育 1 h。最后用 ECL 化学发光试剂显影,并以 β -actin 为内参进行灰度值定量分析。

1.3.4 HEK293T 细胞进行双素荧光素酶报告检测 在活细胞水平验证 miR-200a 与 *CDC45* 基因 3'UTR 预测结合位点的直接靶向作用及特异性。将细胞生长密度达 80% 的 HEK293T 细胞通过脂质体转染技术进行转染,分为 psi 组(空载体对照组)、WT 组(野生型组)、MT 组(突变型组)。其中,WT 组保留原始靶序列,MT 组将核心结合位点突变以破坏碱基互补配对。取出转染后的 HEK293T 细胞,弃去培养基,用 PBS 洗涤细胞,加入细胞裂解液充分裂解。随后加入萤火虫荧光素酶底物检测 Firefly luc 活性,再加入 Stop & Glo 试剂终止反应并同步激活 Renilla luc 检测。通过酶标仪分别读取 2 次发光值,以 Firefly/Renilla 的值作为目标启动子活性的相对指标,每组试验设 3 个复孔,重复 3 次,以确保结果可靠性。

1.3.5 B16细胞免疫荧光测定 在细胞水平直观验证miR-200a对CDC45蛋白表达的调控作用,并观察其亚细胞定位。将转染后的B16细胞从细胞培养箱中取出,置于4%福尔马林溶液中固定15 min,随后使用0.1%(体积分数)TritonX-100溶液提高细胞膜通透性。石蜡切片在37℃条件下用5%牛血清白蛋白孵育30 min。经PBS清洗后,将切片与稀释的CDC45(1:50)抗体于4℃环境中孵育过夜。随后用生物素标记的二抗与载玻片孵育15 min,再加入POD标记的链霉亲和素。经DAB显色及苏木精复染后,通过显微镜观察切片。

1.3.6 对数生长期B16细胞克隆形成试验 为了评估miR-200a通过靶向调控CDC45对B16细胞增殖能力的影响,试验分mi、ih、NC等3组,每组设3个复孔。取出转染后对数生长期的B16细胞,胰酶消化后计数,使用血球计数板对细胞进行计数,按每孔500个细胞接种于6孔板,轻摇使细胞均匀分布,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养10~14 d,期间每3 d更换新鲜培养液。待克隆形成后,弃培养液,PBS轻柔洗涤2次,4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色20 min,流水缓慢冲去染液,晾干后拍照计数。

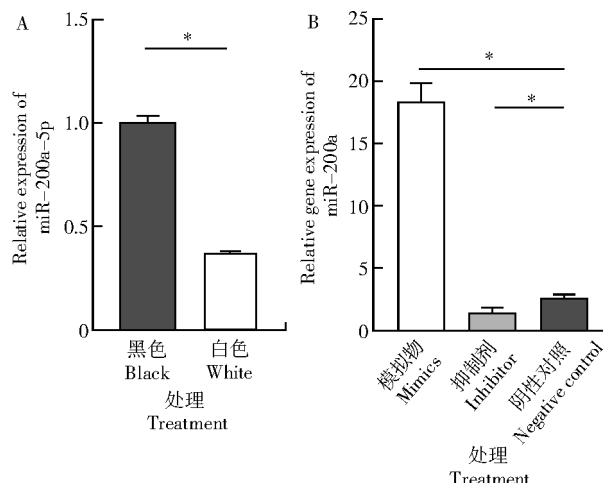
1.4 统计分析

本研究采用GraphPad Prism统计软件对所有试验数据进行分析处理,计量资料以平均值±标准误差(SE)形式呈现。统计推断采用单因素方差分析(one-way ANOVA),并通过*t*检验对任意2组差异进行精确分析。并以*P*<0.05作为差异具有统计学意义的判断标准。

2 结果与分析

2.1 miR-200a在皮肤组织和角质形成细胞中的表达分析

通过系统分析并确定了miR-200a在绒山羊皮肤组织及角质形成细胞中的表达特征。从图1-A可以看出,与白色绒山羊皮肤组织相比,miR-200a在黑色绒山羊皮肤组织中的表达水平呈显著上调趋势,提示该miRNA可能参与调控绒山羊毛色形成的分子机制。B16细胞转染48 h后,qRT-PCR检测证实,转染miR-200a模拟物的B16细胞中其表达量较NC组显著升高(*P*<0.05,图1-B),而转染抑制剂的细胞则表现出miR-200a表达水平的明显抑制。



A. 白色绒山羊和黑色绒山羊皮肤中miRNA-200a的qRT-PCR; B. 将miR-200a模拟物、NC和抑制剂的质粒转染HEK293T细胞,检测miR-200a的相对表达。*表示处理间差异显著(*P*<0.05)。下图同

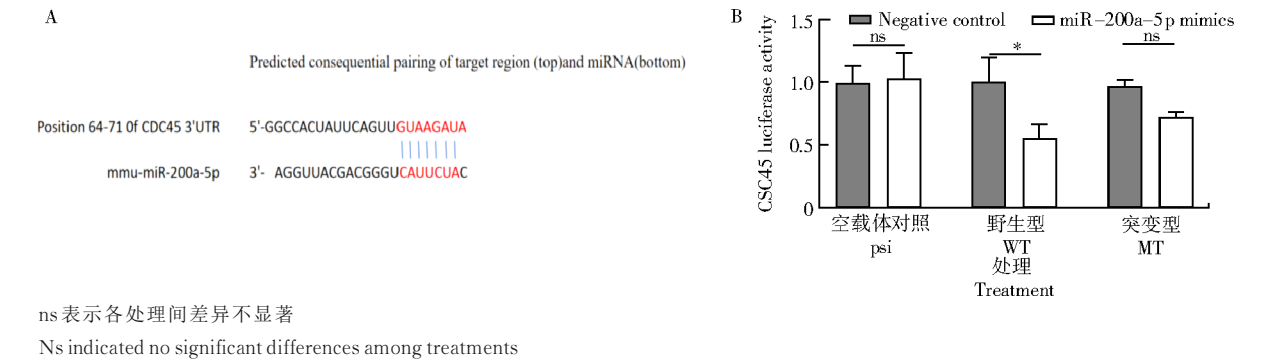
A. Quantitative real-time PCR(qRT-PCR) analysis of miRNA-200a in the skin tissues of white and black cashmere goats. B. Relative expression levels of miR-200a were detected after transfection of HEK293T cells with plasmids of miR-200a mimics, negative controls, and inhibitors. * indicated significant differences among treatments(*P*<0.05). The same as below

图1 不同绒山羊中miR-200a表达

Fig.1 Expression of miR-200a in different cashmere goats

2.2 miR-200a靶向CDC45分析

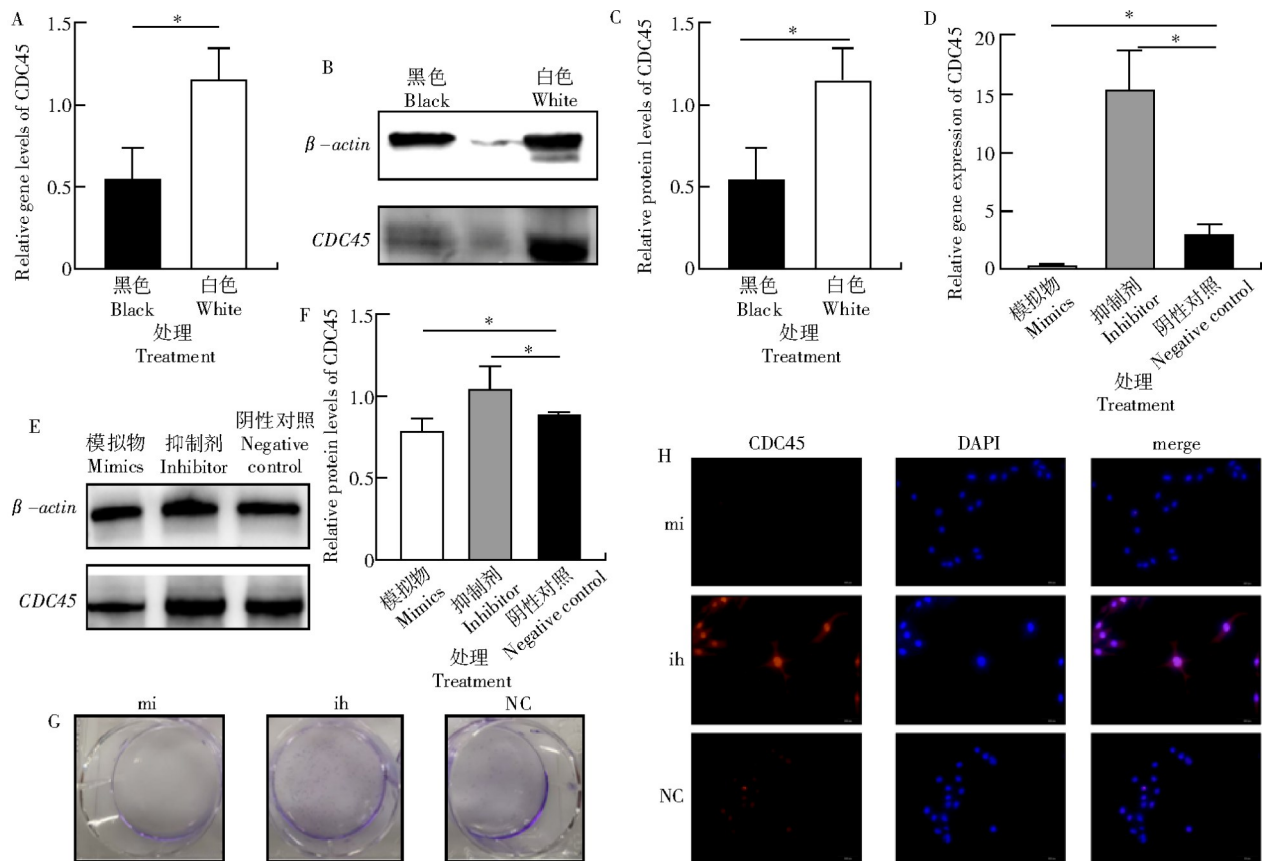
生物信息学软件对mmu-miR-200a-5p与CDC45基因的相互作用进行预测分析,结果显示(图2-A),CDC45基因3'非翻译区(3'UTR)第64—71位核苷酸序列(5'-GUAAGAU-3')与mmu-miR-200a-5p的5'端种子序列(第2—8位核苷酸)存在完全互补配对,提示该区域可能为miR-200a的直接作用靶点^[12]。为验证这一预测,构建了双荧光素酶报告基因系统:psi组仅转染不含靶序列的基础载体,作为背景荧光基线以排除载体本身对报告基因活性的影响;WT组将CDC45基因3'UTR野生型序列(含完整5'-GUAAGAU-3'互补位点)插入载体下游;MT组则通过定点突变技术将5'-GUAAGAU-3'突变为5'-CUUUCUAU-3',破坏miRNA-靶标的碱基配对。结果显示(图2-B),在WT组中,共转染miR-200a mimics的细胞荧光素酶活性较阴性对照(NC组)显著降低(*P*<0.05),表明miR-200a可通过结合该位点抑制报告基因表达;而在MT组中,miR-200a mimics对荧光素酶活性无显著影响,进一步证实了靶序列的特异性及互补配对的必要性。

图2 *CDC45* 是 miR-200a 的靶基因Fig.2 *CDC45* was the target genes of miR-200a

2.3 miR-200a 过表达和敲低对 *CDC45* mRNA 和蛋白水平的影响

从图3可以看出, *CDC45* 在白色绒山羊皮肤

组织中的转录本丰度及蛋白表达量均显著高于黑色绒山羊皮肤组织 ($P < 0.05$), 提示 *CDC45* 与绒山羊毛色表型差异显著相关。



A~C. 采用 qRT-PCR 和 western blot 检测白色绒山羊和黑色绒山羊皮肤中 *CDC45* 的 RNA 和蛋白水平。D~F. 在用 miR-200a 过表达和敲低质粒处理的 B16 细胞中, 分别通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 *CDC45* 的 RNA 和蛋白水平。G. *CDC45* 敲低/过表达的 HEK-293T 细胞克隆形成试验。H. *CDC45* 在 B16 细胞中的表达与定位。

A~C. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot were used to detect *CDC45* RNA and protein levels in skin tissues from white and black cashmere goats. D~F. In B16 cells treated with miR-200a overexpression and knockdown plasmids, qRT-PCR and Western blot were employed to analyze *CDC45* RNA and protein levels. G. Clonal formation of HEK-293T cells with *CDC45* knock-down/overexpression. H. Expression and localization of *CDC45* in B16 cells.

图3 miR-200a 对 *CDC45* mRNA 和蛋白质水平的影响Fig.3 Effects of miR-200a on *CDC45* mRNA and protein levels

qRT-PCR及Western blot检测发现,mi组细胞中*CDC45*的mRNA及蛋白表达水平较阴性对照(NC组)显著下调(图3-D~F),而ih组则呈现相反趋势,即*CDC45*表达量显著上调,表明miR-200a可通过转录后调控抑制*CDC45*的表达。进一步通过单克隆细胞培养试验评估miR-200a对细胞生物学特性的影响,在克隆形成试验中(图3-G),经培养统计,ih组细胞较mi组表现出更强的增殖能力与自我更新活性,细胞形态饱满、活力旺盛,表明*CDC45*参与维持细胞增殖状态。此外,免疫荧光染色结果直观显示(图3-H),在转染miR-200a模拟物的细胞中,*CDC45*蛋白荧光信号显著减弱,而转染抑制剂的细胞中*CDC45*表达增强,且荧光定位与前期报告基因试验结果一致,均集中于细胞核周围。

3 结论与讨论

由相关研究可知,黑色素含量减少,与黑色素合成相关基因(*TYR*、*TYRP1*、*DCT*)的间接调控有关^[13-15]。此外,皮肤色素沉着同时还受到生物体的生理状态和外部环境的影响^[16-17]。黑色素体的形成需经历多阶段生物合成与运输过程,其中蛋白质转运机制及效应蛋白定向募集是调控色素合成的核心环节。在黑色素细胞内,黑色素合成后经囊泡化包装形成黑色素体,通过微管/肌动蛋白骨架依赖的胞内运输系统定向迁移,最终通过胞吐作用或树突延伸将黑色素颗粒转移至邻近角质形成细胞,完成皮肤色素沉积的生理过程^[18-19]。有研究通过Solexa深度测序技术,解析了辽宁山羊皮肤中miRNA的表达与功能^[20]。

既往研究已揭示,miR-200a通过*GNAI1*和*PLCB4*等靶点调控色素沉着,涉及钙信号与GPCR通路^[21-22]。本研究发现,在B16细胞中miR-200a模拟物显著降低了*CDC45*的表达量,然而在抑制物中*CDC45*的表达量显著增多。证明*CDC45*这一非经典色素沉着基因是miR-200a的直接靶点。值得注意的是,*CDC45*在色素沉着中的角色尚未被报道,既往研究将*CDC45*作为细胞周期调控因子^[23],并未进行*CDC45*与皮肤色素沉着关系方向的研究。miR-200a/*CDC45*轴的发现,也与表皮稳态的miRNA调控网络相呼应。例如,miR-200a对细胞增殖的抑制作用与其在肿瘤

中的抑癌功能一致,而其对色素沉着的调控则体现了组织特异性适应^[24]。

此外,在正常情况下,黑色素细胞通过精密的分子机制来平衡细胞增殖与黑色素生成,以应对外界环境的变化。当皮肤暴露于紫外线等有害刺激下时,黑色素细胞需要迅速作出反应,既要防止过度的细胞损伤,又要增强皮肤的防护能力。miR-200a在这一过程中可能发挥着核心的协调作用。本研究表明,miR-200a通过直接靶向DNA复制关键调控因子*CDC45*,结合*CDC45*的3'UTR,抑制其mRNA和蛋白表达,从而调节绒山羊皮肤色素沉着,这一发现也进一步揭示了miR-200a/*CDC45*轴通过整合细胞周期调控与色素沉着,维持黑色素细胞功能稳态的新机制。具体而言,在需要保护皮肤免受紫外线伤害时,miR-200a可能通过抑制细胞周期相关基因的表达,减缓黑色素细胞的增殖速度,从而减少因细胞快速分裂而可能引发的DNA损伤风险。与此同时,miR-200a还可能促进黑色素合成相关基因的活性,加速黑色素的生成和沉积,为皮肤提供额外的保护屏障,抵御紫外线的进一步侵害。此路径的失调可能导致色素沉着异常,如白癜风或黄褐斑中常见的增殖与色素生成失衡^[25]。

不过,从整体来看,该研究仍具有一定的局限性。在体外模型方面,尽管细胞试验明确了机制因果,但缺乏类器官或重建表皮模型等更接近生理环境的数据支持^[26-28]。另一方面是黑色素合成的间接调控,*CDC45*下调后黑色素减少可能源于细胞周期依赖的分化状态改变,需进一步验证直接调控机制。此外,还需要在模型和验证上进行上、下游调控探索,重建表皮评估miR-200a/*CDC45*在分层表皮中的功能,研究miR-200a的转录调控机制(如紫外线诱导的p53或 β -catenin信号)^[29-32],阐明*CDC45*如何影响黑色素合成酶,是否通过转录共调控因子或表观遗传修饰实现。虽然本研究具有完整的体内证据,但仍需要在小鼠相关模型中验证,然后进一步整合基础研究与临床应用,以推动其在色素沉着疾病治疗中的应用。

参考文献:

- [1] CALIN G A, SEVIGNANI C, DUMITRU C D, et al. Human

- microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(9):2999-3004.
- [2] CHEN C Z, LI L, LODISH H F, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science, 2004, 303: 83-86.
- [3] CHENG L C, TAVAZOIE M, DOETSCH F. Stem cells from epigenetic to microRNAs[J]. Neuron, 2005, 46(3):363-367.
- [4] 郭红媛, 贾举庆, 段娜, 等. 燕麦 microRNAs 及其靶基因的生物信息学预测[J]. 山西农业科学, 2014, 42(5):428-431.
- GUO H Y, JIA J Q, DUAN N, et al. Bioinformatics prediction of microRNAs and their target genes in oats[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2014, 42(5):428-431.
- [5] FANG G, YE B L, HU B R, et al. CircRNA_100290 promotes colorectal cancer progression through miR-516b-induced down-regulation of FZD4 expression and Wnt/ β -catenin signaling[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 504(1):184-189.
- [6] LI J Y, BA X, LI J P, et al. MicroRNA-200a regulates skin pigmentation by targeting WNT5A and FZD4 in Cashmere goats[J]. Research in Veterinary Science, 2022, 147:68-73.
- [7] 刘梦君, 李谦妍, 张庆松. CDC45 蛋白在宫颈癌组织中的表达及其与临床特征和预后的关系[J]. 九江学院学报(自然科学版), 2024, 39(4):124-128.
- LIU M J, LI Q Y, ZHANG Q S. CDC45 protein expression in cervical cancer tissues and its association with clinical features and prognosis[J]. Journal of Jiujiang University (Natural Science Edition), 2024, 39(4):124-128.
- [8] 卢鑫. 基于生物信息学筛选和实验验证 CDC45 在三阴性乳腺癌中的临床意义及功能学研究[D]. 济南:山东大学, 2023.
- LU X. Functional and clinical significance of CDC45 in triple-negative breast cancer: bioinformatics screening and experimental validation[D]. Ji'nan: Shandong University, 2023.
- [9] DENKIEWICZ-KRUK M, CHAUDHRY D, KRASILIA A, et al. Effects of CDC45 mutations on DNA replication and genome stability[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2025, 1872(5):119936.
- [10] 姜文瑞. E2F1-CDC45 通路增加宫颈鳞癌放射或顺铂敏感性的研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2024.
- JIANG W R. Enhancing radiation or cisplatin sensitivity in cervical squamous cell carcinoma through the E2F1-CDC45 pathway[D]. Shenyang: China Medical University, 2024.
- [11] CHOWDHURY M R, CHATTERJEE C, GHOSH D, et al. Deciphering miRNA-lncRNA-mRNA interaction through experimental validation of miRNAs, lncRNAs, and miRNA targets on mRNAs in *Cajanus cajan*[J]. Plant Biology, 2024, 26(4):560-567.
- [12] AGARWAL V, BELL G W, NAM J W, et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs[J]. eLife, 2015, 4:e05005.
- [13] 刘娜, 李萍, 王新敬, 等. 5 个眼皮肤白化病家系 TYR 和 TYRP1 基因突变分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2024, 32(6):1223-1228.
- LIU N, LI P, WANG X J, et al. Analysis of TYR and TYRP1 gene mutations in five families with oculocutaneous albinism[J]. Chinese Journal of Birth Health & Heredity, 2024, 32(6):1223-1228.
- [14] 毕欢, 覃海, 袁巍, 等. 敲降 TYRP1 基因对香猪表皮黑色素细胞黑色素生成的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54(10):4143-4153.
- BI H, QIN H, YUAN W, et al. Effect of knocking down TYRP1 gene on melanin production in the Xiang pig epidermal melanocytes[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2023, 54(10):4143-4153.
- [15] 赵若阳, 李超, 图格琴, 等. 越背花毛蒙古马皮肤组织中色素生成相关基因 TYR、TYRP1 及 DCT 的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(6):1042-1050.
- ZHAO R Y, LI C, TU G Q, et al. Expression analysis of melanogenesis related genes TYR, TYRP1 and DCT in tobiano Mongolian horse (*Equus caballus*) skin tissue[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(6):1042-1050.
- [16] SERRE C, BUSUTTI V, BOTTO J M. Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation[J]. International Journal of Cosmetic Science, 2018, 40(4):328-347.
- [17] KANG T H, YOON G, KANG I A, et al. Natural compound licochalcone B induced extrinsic and intrinsic apoptosis in human skin melanoma (A375) and squamous cell carcinoma (A431) cells[J]. Phytotherapy Research, 2017, 31(12):1858-1867.
- [18] 应朝晖, 沈柳园. 揭开恶性黑色素瘤的神秘面纱[J]. 健康博览, 2025(8):14-15.
- YING Z H, SHEN L Y. Unveil the mystery of malignant melanoma[J]. Health Review, 2025(8):14-15.
- [19] 刘智, 程大鹏, 毕新岭. 人皮肤角质形成细胞黑色素内化和分布[J]. 皮肤科学通报, 2025, 42(3):347-352.
- LIU Z, CHENG D P, BI X L. Advances of melanin internalization and distribution by human skin keratinocytes[J]. Dermatology Bulletin, 2025, 42(3):347-352.
- [20] LI J P, QU H E, JIANG H Z, et al. Transcriptome-wide comparative analysis of microRNA profiles in the telogen skins of Liaoning Cashmere goats (*Capra hircus*) and fine-wool sheep (*Ovis aries*) by solexa deep sequencing[J]. DNA and Cell Biology, 2016, 35(11):696-705.
- [21] LI J P, ZHANG B Y, LIU R L, et al. miRNA-200a suppresses GNAI1 and PLCB4 to modulate skin pigmentation in Cashmere goats[J]. Scientific Reports, 2025, 15(1):17456.
- [22] LIU G, FANG Y, LI J M, et al. Anoikis-related PLCB4 is linked to immunotherapy response in osteosarcoma[J]. Discover Oncology, 2025, 16(1):226.
- [23] 张盼, 刘宗文, 袁金金, 等. 下调细胞分裂周期蛋白 45 基因表达对宫颈鳞癌细胞发展的影响[J]. 肿瘤基础与临床, 2023, 36(5):373-378.
- ZHANG P, LIU Z W, YUAN J J, et al. Effect of down-regulating cell division cycle 45 expression on development of cervical squamous cells[J]. Journal of Basic and Clinical Oncology, 2023, 36(5):373-378.

- [24] 赵海龙,郑凤长,李斌,等. LncRNA MIR29B2CHG 调节 miR-200a/PD-L1 轴对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 中国老年学杂志,2024,44(22):5548-5553.
ZHAO H L, ZHENG F C, LI B, et al. Effects of LncRNA MIR29B2CHG regulating miR-200a/PD-L1 axis on proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2024, 44(22): 5548-5553.
- [25] WANG W M, YU X L, WU C, et al. Differential effects of Wnt5a on the proliferation, differentiation and inflammatory response of keratinocytes[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(3):4043-4048.
- [26] 陈子佳,韩宇,刘欣,等. 基于大模型的肺癌表皮生长因子受体突变患者生存预测模型构建与验证[J]. 世界中医药,2025, 20(8):1379-1390.
CHEN Z J, HAN Y, LIU X, et al. Construction and validation of a large model-based survival prediction model for lung cancer patients with EGFR mutations[J]. World Chinese Medicine, 2025, 20(8): 1379-1390.
- [27] 蔡康杰,李海歌,朱建国,等. 三种不同指数模型预测乳腺癌人类表皮生长因子受体 2 阳性状态:一项基于 IVIM 的研究[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志,2025,23(4):105-108.
CAI K J, LI H G, ZHU J G, et al. Prediction of human epidermal growth factor receptor 2 positive status in breast cancer by three different exponential models: a study based on IVIM[J]. Chinese Journal of CT and MRI, 2025, 23(4): 105-108.
- [28] 左绪磊,卢红霞,袁佳玉,等. 利用 hiPSC 分化的皮肤表皮模型研究 STING 通路激活 NLRP3 炎症小体对 UVA 诱导皮肤光老化的作用[C]//中国毒理学会第十一次全国毒理学大会论文集. 苏州:中国毒理学会,2024:170-171.
ZUO X L, LU H X, YUAN J Y, et al. Using hiPSC-differentiated epidermal skin models to study the effect of STING pathway activation of NLRP3 inflammasome on UVA-induced skin photoaging[C]//Proceedings of the 11th National Toxicology Conference of China. Suzhou: China Toxicology Society, 2024: 170-171.
- [29] 李娟. P53/Foxp3/TGF- β 协同网络在紫外线诱导翼状赘肉中的作用研究[D]. 承德:承德医学院,2025.
LI J. Study on the role of P53/Foxp3/TGF- β synergistic network in ultraviolet-induced pterygium[D]. Chengde: Chengde Medical College, 2025.
- [30] 惠海英,吴娜,张美芳,等. 窄谱中波紫外线诱导人永生化表皮细胞凋亡的 Wnt/ β -catenin 信号通路机制研究[J]. 实用皮肤病学杂志,2017,10(5):267-270.
HUI H Y, WU N, ZHANG M F, et al. NB-UVB regulation of HaCaT cells proliferation and apoptosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway: an experimental study[J]. Journal of Practical Dermatology, 2017, 10(5): 267-270.
- [31] 林顺生. β -catenin 在紫外线诱导小鼠皮肤肿瘤模型发病过程中表达的研究[D]. 福州:福建医科大学,2010.
LIN S S. The expression of β -catenin in the ultraviolet rays-induced mouse cutaneous tumors[D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2010.
- [32] 马晓燕,郭翔宇,贾凯琪,等. bta-miR-1343-3p 靶向 *NEDD8* 调控牛卵泡颗粒细胞增殖与凋亡机制初探[J]. 山西农业科学,2023,51(2):198-205.
MA X Y, GUO X Y, JIA K Q, et al. Preliminary study on mechanism of bta-miR-1343-3p targeting *NEDD8* regulating cell proliferation and apoptosis of bovine granulosa cells[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(2): 198-205.

著作权使用说明

本刊已许可中国知网以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。本刊支付的稿酬已包含中国知网著作权使用费,所有署名作者向本刊提交文章发表之行为视为同意上述声明。如有异议,请在投稿时说明,本刊将按作者说明处理。

《山西农业科学》编辑部