

研究论文

SFRP5对黑色素细胞黑素合成的抑制及其机制探究

邹道佩¹ 陈阳美¹ 蒲以欢¹ 高天文² 陈瑾^{1*}(¹重庆医科大学附属第一医院皮肤科, 重庆 400010; ²第四军医大学西京皮肤医院, 西安 710032)

摘要 分泌型卷曲相关蛋白5(secreted frizzled-related protein 5, SFRP5)是分泌卷曲相关蛋白家族的一员,在调节组织器官分化和发育中起着重要作用。但是SFRP5对黑色素细胞生物学功能的影响尚不清楚。该研究利用过表达SFRP5腺病毒(Ad-SFRP5)感染PIG1黑色素细胞,利用多巴氧化法、NaOH裂解法、qRT-PCR以及蛋白质免疫印迹等分析其对黑素合成相关指标的影响;并利用荧光素酶报告基因系统分析Ad-SFRP5对PIG1细胞中各信号通路活性的影响。研究结果表明,SFRP5在不影响PIG1细胞的增殖、凋亡以及细胞周期的情况下抑制PIG1细胞的酪氨酸酶活性和黑色素含量,并通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路下调小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)及其靶蛋白的表达。该研究初步探讨了SFRP5通过调控Wnt信号通路对黑色素细胞黑素合成的抑制作用,为色素性皮肤病的治疗提供了新的治疗靶点。

关键词 SFRP5; 黑色素细胞; 黑素合成; Wnt信号通路

Inhibitory Effect of SFRP5 on Melanogenesis in Melanocytes and Its Mechanism

ZOU Daopei¹, CHEN Yangmei¹, PU Yihuan¹, GAO Tianwen², CHEN Jin^{1*}(¹Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;²Department of Dermatology, Xijing hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Secreted frizzled-related protein 5 is a member of the family of secreted frizzled-related proteins, which plays an important role in regulating tissue differentiation and development. However, its effect on the biological function of melanocytes remains unclear. In this study, SFRP5 adenovirus (Ad-SFRP5) was used to infect PIG1 melanocytes, dopa oxidation, NaOH lysis, qRT-PCR, and Western blot were used to analyze the effects of SFRP5 on melanin synthesis-related indicators. The effect of Ad-SFRP5 on the activity of various signaling pathways in PIG1 cells was analyzed using the luciferase reporter gene system. The results showed that SFRP5 inhibited the tyrosinase activity and melanin synthesis of melanocytes without affecting the proliferation, apoptosis and cell cycle of PIG1 cells. Meanwhile, it downregulated the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and its target protein by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. This study initially explore the in-

收稿日期: 2019-12-15 接受日期: 2020-03-27

国家自然科学基金(批准号: 81773307)和重庆市科委前沿与应用基础研究计划一般项目(批准号: cstc2018jcyjAX0195)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15023188592, E-mail: 1010cj@163.com

Received: December 15, 2019

Accepted: March 27, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81773307) and the General Project of Frontier and Applied Basic Research Program of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.cstc2018jcyjAX0195)

*Corresponding author. Tel: +86-15023188592, E-mail: 1010cj@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5237>

hibitory effect of SFRP5 on melanin synthesis in melanocytes by regulating the Wnt signaling pathway, and provide a new therapeutic target for the treatment of pigmented skin diseases.

Keywords SFRP5; melanocytes; melanogenesis; Wnt pathway

黑色素细胞是人类及脊椎动物皮肤产生及维持色素的主要细胞,来源于神经嵴^[1],逐渐迁移至表皮和毛囊,不仅决定皮肤、头发和眼睛的颜色,还能保护皮肤免受紫外线的过度辐射。其起源、分化以及细胞功能受到多种信号通路的调控,如Wnt、Notch、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)以及胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase, Erk/MAPK)等信号通路,其中Wnt信号通路对黑色素细胞分化、增殖、生长及黑素合成等有十分重要的作用^[2-3]。

黑色素细胞的异常导致一系列难治性色素沉着和色素脱失性疾病的发生,如黄褐斑、白癜风等^[4]。张丽超等^[5]发现,黄褐斑的组织表现为表皮基底层和棘层黑素增加,黑素细胞功能活跃,黑素小体转移至角质形成细胞的数量增多,但无黑素细胞增多。由此也说明,黑色素细胞的功能异常与黄褐斑的发病密切相关。研究表明,遗传和非遗传因素导致的黑色素细胞功能异常是白癜风发病的主要因素^[6-7]。而在临床中白癜风、黄褐斑等色素性疾病的治疗也十分棘手,由于其发病机制不明确,发病率高、治愈率低且复发率高,成为皮肤科领域研究的热点和难点。

分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related proteins, SFRPs)是一类高度保守的分泌蛋白家族^[8],到目前为止,已经发现五种人类SFRPs,根据序列同源性,将其分为以下两个亚科:(1)SFRP1、SFRP2和SFRP5;(2)SFRP3和SFRP4^[9]。SFRPs在调节其他组织器官的分化和发育中起着重要作用。研究发现,SFRP1通过Wnt信号的负反馈作用促进心肌细胞分化^[10]。SFRP3诱导骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞,促进骨再生^[11]。SFRP5通过调节Wnt信号通路促进人多能干细胞形成前肠内胚层^[12]。本课题组前期的研究结果显示,与正常皮肤组织相比,SFRP5在色素痣患者皮损组织中高表达,因此我们猜测,SFRP5可能对黑色素细胞的生物学活性有一定影响。本研究旨在阐明SFRP5对黑色素细胞的调控作用,初步探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 PIG1细胞^[13]由第四军医大学西京皮肤医院李春英教授惠赠;成纤维细胞(fibroblast)由重庆医科大学附属第一医院皮肤科陈爱军教授惠赠;HaCaT细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司;荧光素酶报告基因检测系统所用质粒p-BGluc TCF/LEF、p-BGluc STAT、p-BGluc NF- κ B、p-BGluc Elk1/SRF、Ad-RFP和Ad-SFRP5腺病毒由美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤学实验室何通川教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 普通胎牛血清和DMEM高糖培养基购自Hyclone公司;254培养基、特级澳洲血清及黑色素细胞生长因子购自Gibco公司;SYBR、PCR试剂盒购自TaKaRa公司;CCK-8试剂盒购自Bimake公司;兔抗人 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 单克隆抗体购自Cell Signaling Technology(CST)公司;兔抗人SFRP5单克隆抗体购自Gene Tex公司;兔抗人MITF、TYR、TRP1、TRP2单克隆抗体购自Abcam公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司;LipofectAMINE™ 2000转染试剂购自Thermo Fisher Scientific公司;荧光素酶检测试剂盒购自美国New England Biolabs公司。

1.2 主要方法

1.2.1 细胞培养 HaCaT细胞和成纤维细胞用含10%普通血清、1%青-链霉素的DMEM高糖培养基,PIG1细胞用含5%澳洲血清、1%黑色素细胞生长因子、1%青-链霉素的254培养基,均于37℃、含5%CO₂的细胞孵育箱中培养。HaCaT细胞和成纤维细胞的融合度达90%左右时用配好的胰酶消化、传代。黑色素细胞的融合度达80%左右时用胰蛋白酶消化、传代。

1.2.2 腺病毒扩增及病毒感染滴度的测定 用重组腺病毒Ad-RFP、Ad-SFRP5感染HEK293细胞,36 h后在荧光显微镜(其工作条件为:电源(220 $\pm$ 22) V/50 Hz、气温-5~40℃,相对湿度85%的环境条件)下观察荧光蛋白的表达,2~3天后待荧光表达至90%以上,细

胞呈逐渐漂浮浓缩状态时收集细胞, 1 200 r/min离心5 min, 弃上清。根据细胞数及荧光量度, 用PBS重悬细胞, -80 °C冻存, 37 °C水浴反复冻融3次后, 以12 000 r/min、4 °C离心10 min, 收集病毒液于-80 °C保存。PIG1细胞按50%密度接种于24孔板中, 待细胞贴壁后分别加入不同浓度的Ad-GFP、Ad-SFRP5病毒液, 感染36 h后在荧光显微镜(工作条件同前)下观察感染细胞荧光量, 确定最适感染滴度。

1.2.3 CCK-8法检测Ad-SFRP5处理对细胞活力的影响 当PIG1细胞长至80%~90%融合度时, 用胰蛋白酶消化并重悬至单个细胞, 用血球计数板计数, 以每孔 3×10^3 个细胞(100 μ L)的密度接种于96孔板中, 培养至细胞贴壁后, 分别用一定浓度的Ad-RFP和Ad-SFRP5感染细胞, 每组设置5个复孔。分别于0、24、48、72 h取出孔板并弃上清液, 加入100 μ L 10% PBS, 向每孔加入10 μ L CCK-8溶液, 然后将培养板在培养箱内孵育2 h。应用酶联免疫检测仪, 在450 nm双波长处测得相应吸光度(D)值。

1.2.4 多巴氧化法测定酪氨酸酶活性 参照姚莉等^[14]的实验方法进行测定, 取对数生长期PIG1细胞, 以 1×10^5 个/孔接种于6孔培养板中, 37 °C孵育12 h后将细胞分为空白组(空白对照)、实验组(加入适当浓度的Ad-SFRP5)、控制组(加入适合浓度的Ad-RFP), 继续培养2天, 待实验组和控制组荧光亮度达到60%~70%时, 用0.25%的胰酶消化细胞, 每个样本取 1×10^5 个细胞, 用200 μ L 1% Triton X-100溶液裂解细胞, 并迅速置于-80 °C冰箱内30 min, 再于37 °C溶解细胞, 3 000 r/min离心10 min, 取50 μ L上清到96孔

板中(每组设3个复孔), 每孔加入10 μ L L-Dopa溶液(2 mg/mL), 置于37 °C孵育20 min后用酶联免疫检测仪检测其在475 nm处的吸光度(D_{475})值, 酪氨酸酶的相对活性=(实验组 D_{475} -空白组 D_{475})/(控制组 D_{475} -空白组 D_{475}) $\times100\%$ 。

1.2.5 NaOH裂解法测定黑色素含量 参照熊渺等^[15]的方法进行测定。前期处理与酪氨酸酶活性测定实验相同, 离心收集 1×10^5 个细胞, 加入1 mmol/L NaOH溶液1 mL裂解细胞, 置于37 °C水浴箱中水浴1 h, 选择490 nm波长在酶标仪上测定各处理组的吸光度值。黑色素含量采用相对值, 即黑色素含量=处理组 D_{490} /对照组 $D_{490}\times100\%$ 。

1.2.6 qRT-PCR检测黑色素合成相关指标 *MITF*、*TRP1*、*TRP2*、*TYR*的表达 分别提取3种表皮细胞的总RNA, 按照两步法进行逆转录, 所得cDNA样品保存于-20 °C冰箱。反应体系为: 5 μ L SYBR、0.4 μ L上游引物、0.4 μ L下游引物、1 μ L cDNA模板、3.2 μ L ddH₂O。反应条件为: 94 °C预变性30 s; 94 °C变性10 s, 59 °C退火20 s, 72 °C延伸20 s, 共40个循环进行扩增。分别用Ad-RFP和Ad-SFRP5感染细胞之后, 检测*MITF*、酪氨酸酶(tyrosinase, *TYR*)、酪氨酸相关蛋白1(tyrosinase-related protein 1, *TRP1*)和酪氨酸相关蛋白2(tyrosinase-related protein 2, *TRP2*)基因的表达水平, 引物信息见表1。

1.2.7 蛋白质免疫印迹法(Western blot)分析 取适量蛋白样品上样到10% SDS-PAGE凝胶中, 电泳(90 V 1 h, 120 V 30 min)结束后, 将分离蛋白条带以210 mA恒流湿转到PVDF膜上, 用5%的封闭液

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Primers of qRT-PCR

基因 Genes	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
<i>β-actin</i>	Forward: CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG C Reverse: GTG ATC TCC TTC TGC ATC CTG T
<i>SFRP5</i>	Forward: TGC CCT TGC CCA CAG TTA GA Reverse: GAG GGA ACA GGG ATA GGA GAA CA
<i>MITF</i>	Forward: CAA CAA CCT CGG AAC TGG GAC T Reverse: TCC ATG CTC ATA CTG CTC CTC C
<i>TRP1</i>	Forward: CTG TGC TGA GCC AGG CTA AGT G Reverse: GCC ATC ACC CCA GGA GAC AA
<i>TRP2</i>	Forward: GGA GTG GTC CCT ACA TCC TAC G Reverse: GAA TGG ATG TTC TGC CGA ATC
<i>TYR</i>	Forward: GAC AAA TCC AGA ACC CCA AGG Reverse: GAG GCA TCC GCT ATC CCA GT

37 °C封闭2~3 h, 于4 °C孵育兔抗人 β -actin、SFRP5、 β -catenin、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、MITF、TRP1、TRP2和TYR单克隆抗体(体积稀释比例均为1:1 000) 12~16 h, 用TBST洗膜10 min/次(共3次), 然后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(稀释比例为1:5 000), 于37 °C孵育1 h, 再用TBST洗膜10 min/次(共3次), 用化学发光成像分析系统显影, 再采用Quantity One 4.6.2软件分析各组电泳条带的灰度值, 以此反映蛋白表达水平。

1.2.8 荧光素酶报告基因检测实验 当T25培养瓶中的PIG1细胞达到70%~80%融合度时更换新的254培养基, 然后加入转染体系(包括5 μ L转染试剂LipofectAMINE™ 2000、3 μ g p-BGluc TCF/LEF或p-BGluc STAT、p-BGluc NF- κ B、p-BGluc Elk1/SRF以及200 μ L 254培养基), 4 h后再换成5 mL含5% FBS的细胞培养液。待细胞长满T25培养瓶后, 消化细胞, 并以每孔 5×10^4 个细胞(500 μ L)的密度接种于24孔板中, 待细胞贴壁生长后, 分别用适当浓度的Ad-RFP和Ad-SFRP5处理细胞36 h, 每孔吸取上清液10 μ L, 用于测定荧光素酶活性(具体实验体系及步骤参考说明

书), 以此反映Wnt/ β -catenin、Janus激酶/信号传导和转录激活蛋白(Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)、NF- κ B以及Erk/MAPK信号通路的活性。

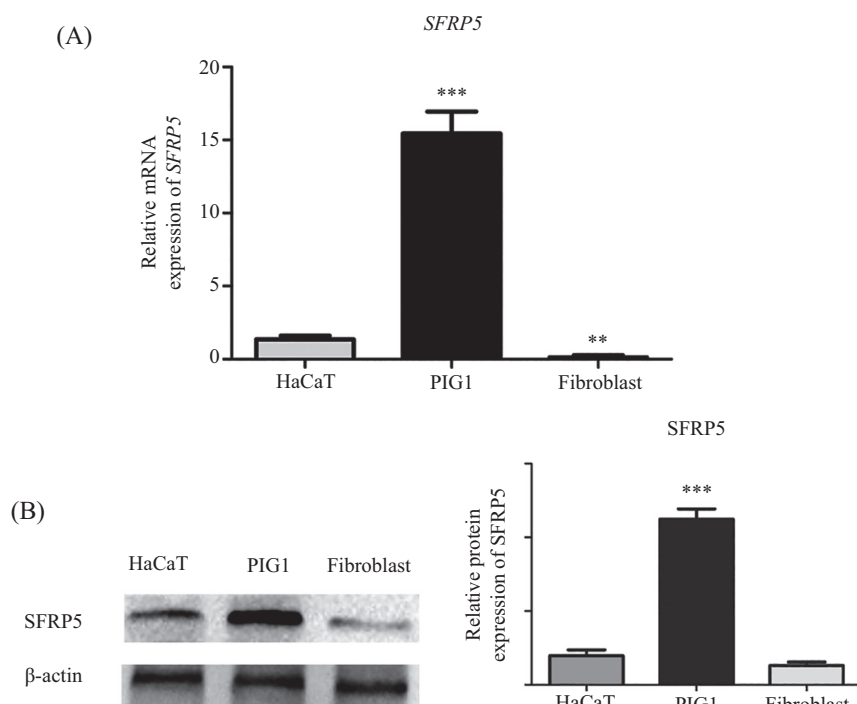
1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较均采用 t 检验, 每组实验均独立重复3次以上, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三种皮肤细胞中SFRP5的表达情况

qRT-PCR结果(图1A)显示, SFRP5在PIG1细胞中的表达量明显高于HaCaT细胞以及成纤维细胞, 差异具有统计学意义($P<0.001$)。接下来, 我们用Western blot来验证这一结果, Western blot的结果与qRT-PCR的结果一致(图1B)。由于黑素生成过程主要在黑色素细胞中进行, 而且SFRP5在PIG1细胞中表达水平相对较高, 故我们选取PIG1细胞为主要的实验对象。



A: SFRP5在三种皮肤细胞中mRNA水平的表达; B: SFRP5在三种皮肤细胞中的蛋白表达水平。 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与HaCaT细胞相比。

A: the relative mRNA expression of SFRP5 in three kinds of epidermal cells; B: the protein expression levels of SFRP5 in three kinds of epidermal cells. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs HaCaT.

图1 SFRP5在三种皮肤细胞中的相对表达量

Fig.1 Relative expression of SFRP5 in three kinds of epidermal cells

2.2 腺病毒的成功扩增和感染

在HEK293细胞内成功扩增得到腺病毒Ad-RFP和Ad-SFRP5, 并确定最适感染滴度。感染PIG1细胞36 h后用荧光显微镜拍照, 各组病毒的感染滴度相似(图2)。

2.3 过表达SFRP5对PIG1细胞的增殖活力、细胞周期以及凋亡的影响

本实验首先通过 Western blot检测感染 Ad-SFRP5和Ad-RFP后PIG1细胞中SFRP5的表达量, 结果显示感染Ad-SFRP5后SFRP5的表达量显著升高(图3A)。进一步, CCK-8结果显示, SFRP5对PIG1细胞的增殖活力无明显影响(图3B)。流式细胞术结果显示, 感染Ad-SFRP5之后, PIG1细胞的凋亡情况(图3C)及细胞周期(图3E)无明显变化。对流式细胞术结果进行定量分析显示, SFRP5对PIG1细胞的凋亡(图3D)以及细胞周期(图3F)无明显影响。

2.4 过表达SFRP5对PIG1细胞中的酪氨酸酶活性和黑色素含量的影响

由于酪氨酸酶活性以及黑色素含量是反映黑色素细胞功能的重要指标, 因此我们对Ad-SFRP5处理之后的PIG1细胞中的酪氨酸酶活性以及黑色素含量进行测定。结果显示, 与阴性对照组相比, SFRP5能明显抑制PIG1细胞的酪氨酸酶活性($P<0.01$)(图4A); 且能明显下调黑色素含量($P<0.01$)(图4B)。

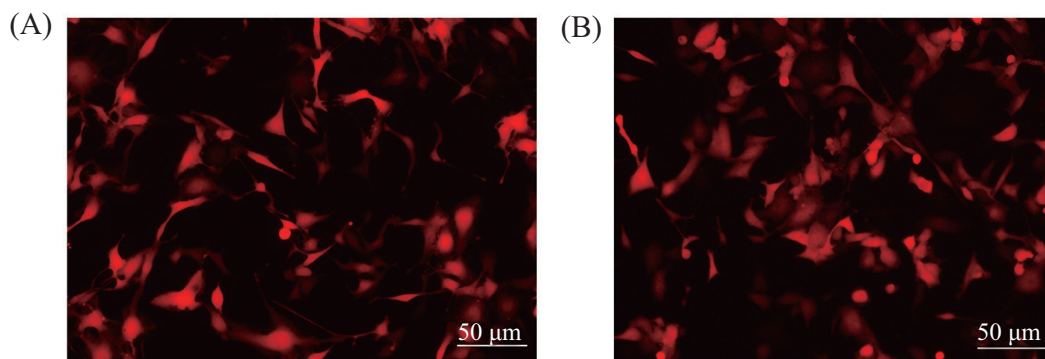
2.5 过表达SFRP5能明显抑制PIG1细胞中MITF、TRP1、TRP2和TYR的表达

qRT-PCR结果显示, Ad-SFRP5感染PIG1细胞之

后, 细胞中MITF的相对表达水平明显下降($P<0.05$), TYR($P<0.01$)、TRP1($P<0.001$)和TRP2($P<0.01$)的表达水平也显著下调(图5A)。用Ad-SFRP5感染PIG1细胞之后提取蛋白, 利用Western blot检测MITF、TRP1、TRP2以及TYR的蛋白表达水平。Western blot的结果与qRT-PCR结果一致, 与阴性对照组相比, MITF、TYR、TRP1以及TRP2的表达水平均有不同程度下调(图5B)。

2.6 过表达SFRP5能够抑制PIG1细胞中Wnt/ β -catenin信号通路的活性

利用荧光素酶报告基因系统检测T细胞因子(T cell factor, TCF)/淋巴增强因子(lymphoid enhancer factor, LEF)、STAT、NF- κ B、EST样转录因子(ETS-like transcription factor, Elk1)/血清反应因子(serum response factor, SRF)的转录活性, 以此来反映Wnt/ β -catenin、JAK/STAT、NF- κ B以及Erk/MAPK信号通路的活性。结果显示, SFRP5对PIG1细胞中Wnt/ β -catenin信号通路的活性抑制明显, 而对JAK/STAT、NF- κ B以及Erk/MAPK信号通路的活性无明显影响(图6A)。为了进一步验证SFRP5是通过Wnt信号通路影响黑色素细胞的黑素合成的, 我们进一步检测了Ad-SFRP5感染PIG1细胞之后, 细胞中 β -catenin、GSK-3 β 及p-GSK-3 β 的表达水平。结果显示, Ad-SFRP5处理之后, β -catenin的表达量明显下调($P<0.01$); p-GSK-3 β 的表达量也显著下降($P<0.01$); 而GSK-3 β 的表达差异不大, 差异不具统计学意义($P>0.05$)(图6C); 但是p-GSK-3 β /GSK-3 β 的比值显著下降($P<0.001$)(图6B)。

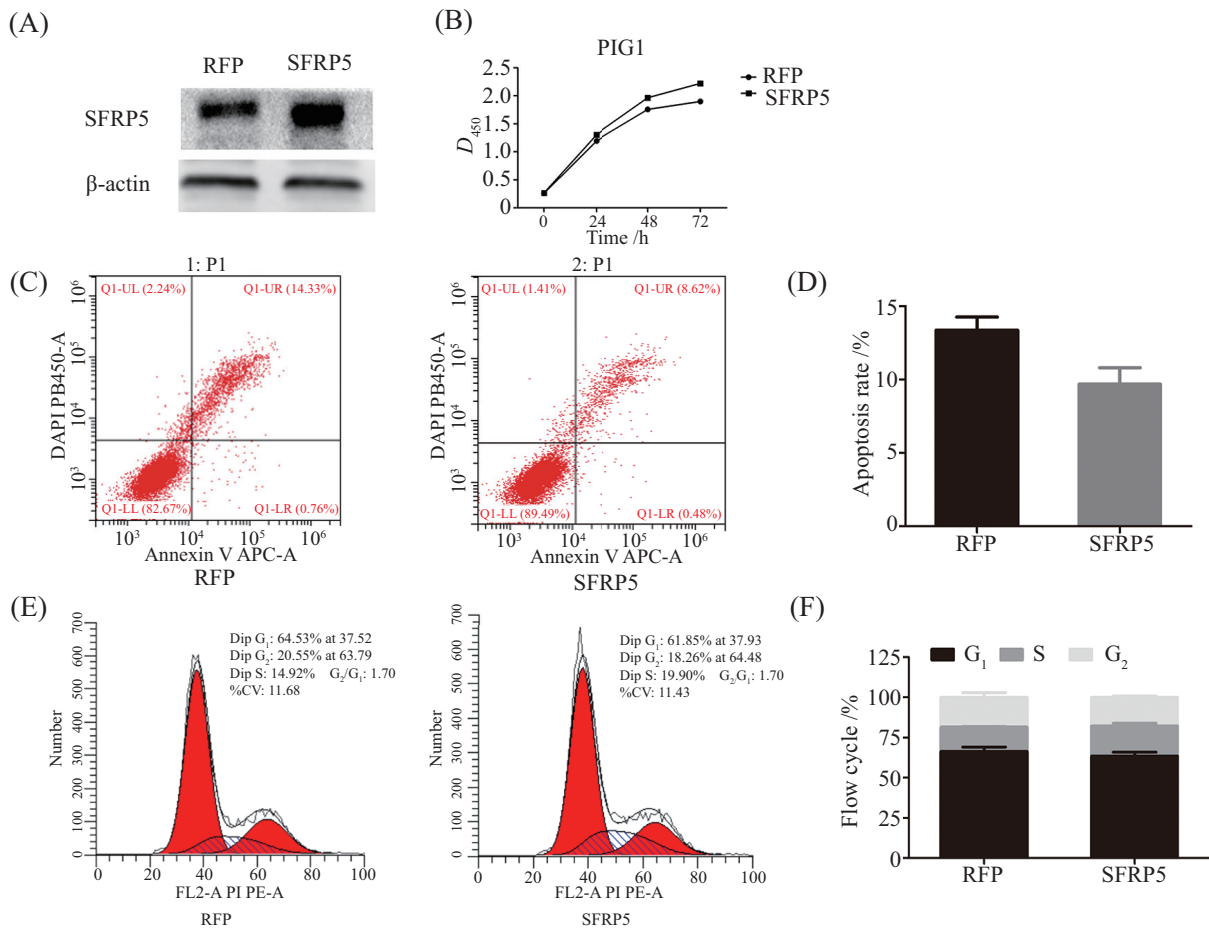


A: Ad-RFP处理组荧光图片; B: Ad-SFRP5处理组荧光图片。

A: fluorescence picture of cells treated with Ad-RFP; B: fluorescence picture of cells treated with Ad-SFRP5.

图2 腺病毒的成功扩增与感染

Fig.2 Successful amplification and infection of adenovirus

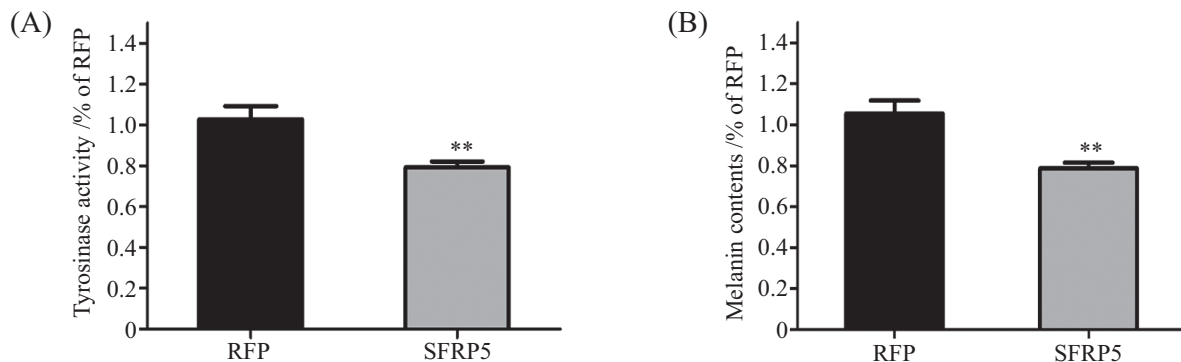


A: Western blot分析PIG1细胞转染Ad-SFRP5后SFRP5的表达量; B: CCK-8检测细胞增殖情况; C: 流式细胞术检测细胞凋亡情况; D: 对凋亡结果进行定量分析; E: 流式细胞术检测细胞周期情况; F: 对细胞周期结果进行定量分析。

A: Western blot analyzes the expression of SFRP5 in PIG1 cells after transfected with Ad-SFRP5; B: CCK-8 is used to detect cell proliferation; C: flow cytometry is used to measure cell apoptosis; D: quantitative analysis of apoptotic results; E: flow cytometry is used to detect cell cycle; F: quantitative analysis of cell cycle results.

图3 过表达SFRP5对黑色素细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响

Fig.3 The effects of SFRP5 overexpression on the proliferation, cell cycle, and apoptosis of melanocytes

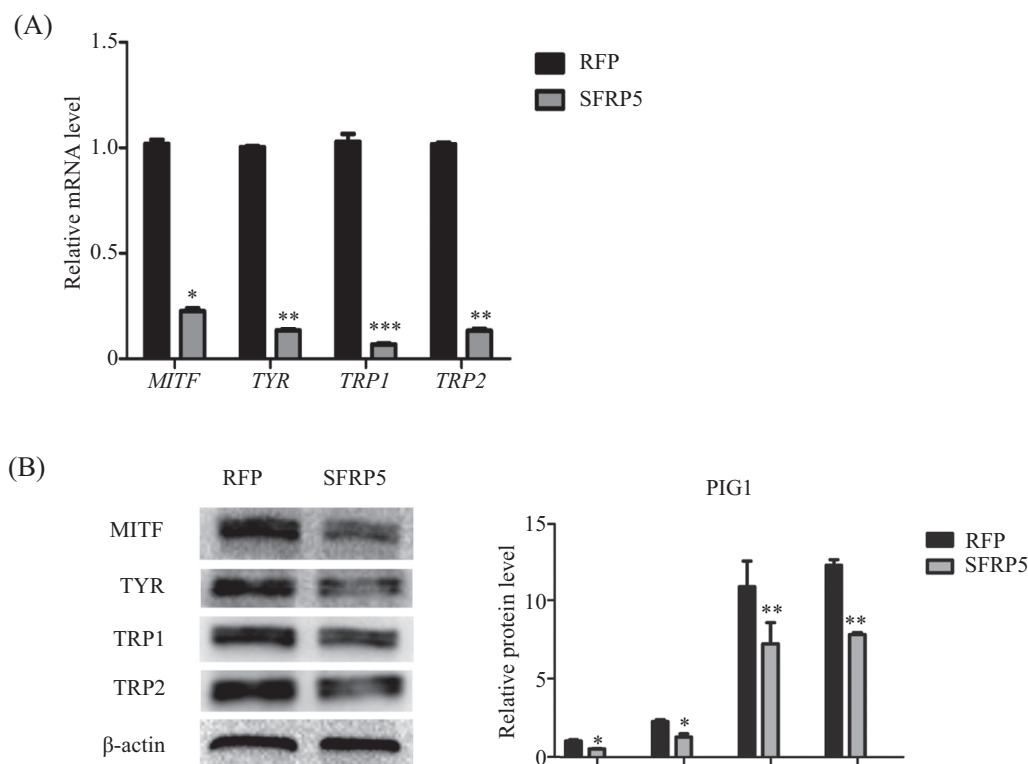


A: 感染Ad-SFRP5对酪氨酸酶活性的影响; B: 感染Ad-SFRP5对黑色素含量的影响。*** $P < 0.01$, 与对照组相比。

A: the effect of Ad-SFRP5 infection on tyrosinase activity; B: the effect of Ad-SFRP5 infection on melanin content. *** $P < 0.01$ vs control group.

图4 酪氨酸酶活性测定结果以及黑色素含量测定结果

Fig.4 The measurement results of tyrosinase activity and melanin content

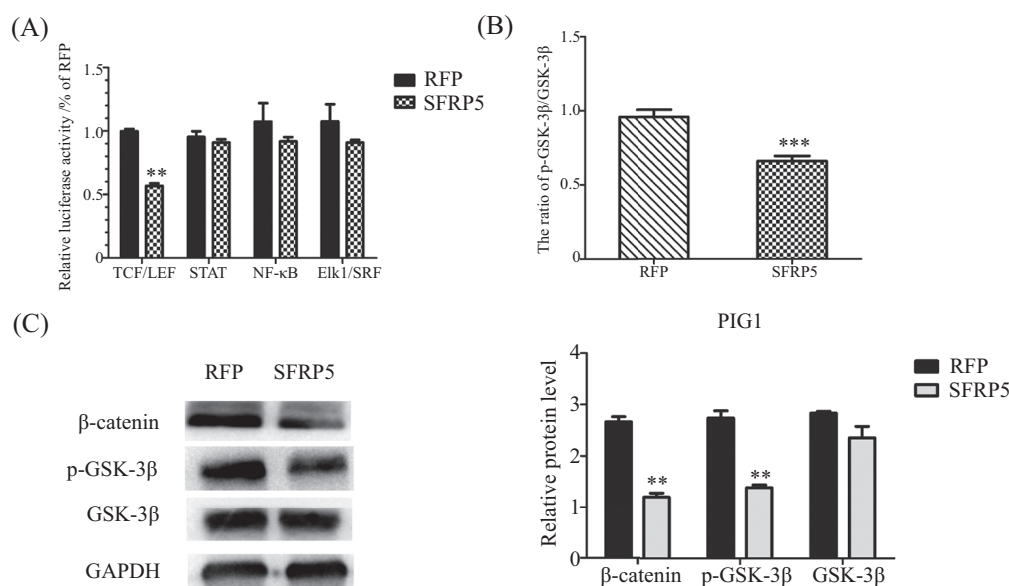


A: SFRP5过表达在PIG1细胞中*MITF*、*TYR*、*TRP1*和*TRP2* mRNA表达水平的影响; B: SFRP5过表达在PIG1细胞中*MITF*、*TYR*、*TRP1*和*TRP2*的蛋白表达水平的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与RFP组相比。

A: the effect of SFRP5 overexpression on *MITF*, *TYR*, *TRP1* and *TRP2* mRNA expression levels in PIG1 cells; B: the effect of SFRP5 overexpression on the protein expression levels of *MITF*, *TYR*, *TRP1* and *TRP2* in PIG1 cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs RFP.

图5 过表达SFRP5对黑色素生成相关蛋白的影响

Fig.5 The effects of SFRP5 overexpression on melanin production-related proteins



A: 荧光素酶报告基因结果; B: 统计学分析p-GSK-3β/GSK-3β的比值; C: Western blot检测感染Ad-SFRP5对PIG1细胞中β-catenin、p-GSK-3β及GSK-3β表达的影响。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与RFP组比较。

A: luciferase reporter gene results; B: statistical analysis of the ratio of p-GSK-3β/GSK-3β; C: Western blot for detecting the effect of Ad-SFRP5 infection on β-catenin, p-GSK-3β and GSK-3β expression in PIG1 cells. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs RFP.

图6 过表达SFRP5对PIG1细胞中信号通路的影响

Fig.6 The effects of SFRP5 overexpression on the signaling pathways in PIG1 cells

3 讨论

黑色素细胞起源于神经嵴, 占表皮细胞的8%^[16], 在胚胎发育过程中, 随着神经管的关闭, 黑素母细胞迁移至生物体的不同部位, 如皮肤、外周神经系统、眼脉络膜、脂肪组织等^[17-18], 但是只有在表皮的基底层和毛囊中, 黑素母细胞才能发育为黑色素细胞并发挥它的基本功能, 即分泌黑色素^[19]。MITF在神经嵴分化为黑色素细胞的过程中发挥着重要作用^[20-21], 同时是黑色素细胞内产生黑色素并调节细胞对细胞内活性氧反应的重要转录因子^[22]。黑色素生成的主要场所在黑色素细胞的黑色素小体中, 黑色素生成以后从黑色素细胞的树突传递至角质形成细胞的过程被称为黑色素合成^[20]。黑色素合成过程极其复杂, 主要涉及酪氨酸基因家族中的三种酶, 即TYR、TRP1和TRP2, 其中TYR是该反应的关键酶^[23]。众多研究均表明, MITF能够调节TYR、TRP1和TRP2的表达, 从而参与黑素合成的调控^[24]。此外, 抑制MITF可能会进一步导致许多有关色素沉着和黑素细胞分化基因的抑制(例如: *TYR*、*TRP1*和*TRP2*)。研究表明, MITF可作为Wnt信号通路下游的靶基因调控黑色素细胞的黑色素合成^[20]。在黑色素细胞中, 稳定的 β -catenin通过Rac1和其他因子转运至细胞核, 并与TCF-LEF转录因子结合, 增强MITF的表达, 从而刺激黑色素生成^[23,25]。由此观之, 作为黑色素细胞的中枢特异性转录因子, MITF在黑色素细胞发育以及维持黑色素细胞功能等各个方面发挥着至关重要的作用。

SFRP5是分泌卷曲相关蛋白家族的一员, 约由300个氨基酸残基组成, 包括一个N末端的半胱氨酸富集区(cysteine rich domain, CRD)和一个C末端。由于其在蛋白质结构上与Wnt信号通路中的Fz受体极为相似, 具有相同的CRD, 故它最初作为Wnt信号通路的抑制剂而被人们所熟知^[26]。在胰岛素抵抗大鼠中SFRP5的下调能够通过激活Wnt5a/JNK1信号通路促进巨噬细胞介导的肺部炎症^[27]。SFRP5在视网膜色素上皮中高表达, 有研究表明, 其可能影响视网膜中感光细胞的极性^[28]。后来也有研究发现, SFRP5具有调节脂质代谢^[29], 改善胰岛素抵抗^[30]的作用, 并且能够调节脂肪细胞分化^[10]、增强胰岛素敏感性^[31], 但是SFRP5对黑色素细胞生物学功能的影响尚无明确报道。

本研究发现, Ad-SFRP5感染PIG1细胞之后, 能

使PIG1细胞的酪氨酸酶活性明显下调, 黑色素含量下降, 而且与黑色素生成相关蛋白MITF、TYR、TRP1及TRP2的表达水平均明显下调。由此证实SFRP5能够抑制黑色素细胞的黑素合成。为了进一步探讨其可能的分子机制, 我们利用荧光素酶报告基因系统检测其可能通过改变哪些信号通路的活性, 影响黑色素细胞的黑素合成, 结果表明, 在PIG1细胞中, Wnt/ β -catenin信号通路的活性明显受到抑制, 而其他三条信号通路的活性未受到很大影响, 故我们初步发现, Wnt/ β -catenin信号通路可能是其靶向信号通路。

Wnts家族属于分泌型糖蛋白, 是重要的细胞外信号分子家族。目前在哺乳动物中发现了19种Wnt蛋白。Wnt信号通路包括经典Wnt信号通路和非经典Wnt信号通路。经典Wnt信号通路涉及关键效应分子 β -catenin的激活, 非经典Wnt信号通路分为Wnt-Ca²⁺通路和Wnt-JNK通路。研究发现, Wnt信号通路对黑色素细胞分化发挥关键作用, Wnt1和Wnt3a促进神经嵴细胞分化为色素细胞^[32-33]。Wnt信号对成熟黑色素细胞生长和黑素合成也具有重要作用。GUO等^[33]认为, Wnt3a对黑色素细胞的功能有促进作用, 使MITF及其下游的基因表达增加, 可显著增加酪氨酸酶活性, 促进黑素合成。ZHANG等^[34]认为, Wnt5a不仅能抑制黑色素细胞的增殖, 还能够通过下调色素形成相关基因的表达从而减少黑素合成。诸多研究均表明, Wnt信号通路在调节黑色素细胞的增殖、分化、生长及黑素合成等过程中起着十分重要的作用^[2,34-35]。这一点也为我们的研究提供了理论依据。

在心血管疾病以及2型糖尿病等相关研究中^[36-37], SFRP5被认为可以抑制Wnt信号通路的活性。在本研究中, 荧光素酶报告基因系统的结果也显示, 用Ad-SFRP5感染PIG1细胞之后, TCF/LEF的转录活性明显降低, 而且Wnt信号通路下游的靶基因MITF的转录活性明显降低, MITF在蛋白水平的表达也受到明显抑制。这表明, Wnt/ β -catenin信号通路的活性受到明显抑制。基于此, 我们检测了感染Ad-SFRP5之后, PIG1细胞中 β -catenin、GSK-3 β 及p-GSK-3 β 的表达水平, 发现 β -catenin及p-GSK-3 β 的表达显著下调。这也进一步佐证了我们的结论。

综上所述, 本研究首次发现了SFRP5在不影响黑色素细胞增殖、细胞周期以及细胞凋亡的情况下抑制黑色素细胞的黑素合成, 并初步探讨了其可能

是通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路的活性而发挥这一抑制作用的。这为探讨SFRP5在色素性疾病中的作用奠定了理论基础,但SFRP5调控Wnt信号通路的具体分子机制还需进一步研究,深入探讨SFRP5在黑色素细胞中的作用及其机制有望为临床中色素性疾病的治疗提供新的靶点。

参考文献 (References)

- [1] VANDAMME N, BERX G. From neural crest cells to melanocytes: cellular plasticity during development and beyond [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(10): 1919-34.
- [2] MEI X, WU Z, HUANG J, et al. Screening and analysis of differentially expressed genes of human melanocytes in skin cells mixed culture [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(5): 2657-67.
- [3] YAMADA T, HASEGAWA S, INOUE Y, et al. Wnt/ β -catenin and kit signaling sequentially regulate melanocyte stem cell differentiation in UVB-induced epidermal pigmentation [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(12): 2753-62.
- [4] HOSAKA C, KUNISADA M. Induced pluripotent stem cell-derived melanocyte precursor cells undergoing differentiation into melanocytes [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2019, 32(5): 623-33.
- [5] 张丽超, 周炳荣, 骆丹. 黄褐斑的治疗进展[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*(ZHANG L C, ZHOU B, LUO D. Progress in the treatment of melasma [J]. *J Dermatol Integr Tradit Wes Med*, 2015, 14(3): 201-4.
- [6] YI X, GUO W, SHI Q, et al. SIRT3-dependent mitoc hondrial dynamics remodeling contributes to oxidative stress-induced melanocyte degeneration in vitiligo [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1614-33.
- [7] KINGO K, AUNIN E, KARELSON M, et al. Expressional changes in the intracellular melanogenesis pathways and their possible role in the pathogenesis of vitiligo [J]. *J Dermatol Sci*, 2008, 52(1): 39-46.
- [8] VACHTENHEIM J, ONDRUSOVA L. Microphthalmia-associated transcription factor expression levels in melanoma cells contribute to cell invasion and proliferation [J]. *Exp Dermatol*, 2015, 24(7): 481-4.
- [9] WEBSTER M R, KUGEL C H, 3RD, WEERARATNA A T. The Wnts of change: How Wnts regulate phenotype switching in melanoma [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1856(2): 244-51.
- [10] GIBB N, LAVERY D L, HOPPLER S. sfrp1 promotes cardiomyocyte differentiation in *Xenopus* via negative-feedback regulation of Wnt signalling [J]. *Development*, 2013, 140(7): 1537-49.
- [11] KATAGIRI W, OSUGI M, KAWAI T, et al. Secreted frizzled-related protein promotes bone regeneration by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 23250-8.
- [12] HOEPFNER J, KLEINSORGE M, PAPP O, et al. Biphasic modulation of Wnt signaling supports efficient foregut endoderm formation from human pluripotent stem cells [J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(5): 534-48.
- [13] LE POOLE I C, VAN DEN BERG F M, VAN DEN WIJNGAARD R M, et al. Generation of a human melanocyte cell line by introduction of HPV16 E6 and E7 genes [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, 33(1): 42-9.
- [14] 姚莉, 尚靖, 徐建国. B16细胞中酪氨酸酶活性测定的方法学研究[J]. *新疆中医药*(YAO L, SHANG J, XU J G. Methodological study on determination of tyrosinase activity in B16 cells [J]. *J Tardit Chin Med*, 2007, 4: 16-8.
- [15] 熊渺, 许兰娇, 瞿明仁, 等. 环磷酸腺苷促进泰和乌骨鸡皮肤黑色素细胞黑素合成[J]. *中国细胞生物学学报*(XIONG M, XU L J, QU M G, et al. Cyclic adenosine promotes melanin synthesis by melanocytes in the skin of Taihe Silky Fowl [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2018, 40(8): 1363-8.
- [16] MARANDUCA M A, BRANISTEANU D, SERBAN D N, et al. Synthesis and physiological implications of melanic pigments [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(5): 4183-7.
- [17] PANZELLA L, EBATO A, NAPOLITANO A. The late stages of melanogenesis: exploring the chemical facets and the application opportunities [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6). pii: E1753.
- [18] BASTIAN B C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9: 239-71.
- [19] CICHOREK M, WACHULSKA M, STASIEWICZ A, et al. Skin melanocytes: biology and development [J]. *Postepy Dermatol Alergol*, 2013, 30(1): 30-41.
- [20] ZHAO M, HU J, NI H, et al. Research progress in melanogenesis signaling pathway [J]. *J Bio Technol*, 2019, 35(9): 1633-42.
- [21] HOSAKA C, KUNISADA M. Induced pluripotent stem cell-derived melanocyte precursor cells undergoing differentiation into melanocytes [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2019, 32(5): 623-33.
- [22] JIANG W, LI S, CHEN X, et al. Berberine protects immortalized line of human melanocytes from H₂O₂-induced oxidative stress via activation of Nrf2 and Mitf signaling pathway [J]. *J Dermatol Sci*, 2019, 94(1): 236-43.
- [23] PILLAIYAR T, MANICKAM M, JUNG S H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis [J]. *Cell Signal*, 2017, 40: 99-115.
- [24] HWANG Y S, KIM Y J, KIM M O, et al. Cannabidiol upregulates melanogenesis through CB1 dependent pathway by activating p38 MAPK and p42/44 MAPK [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 273: 107-14.
- [25] PILLAIYAR T, NAMASIVAYAM V, MANICKAM M, et al. Inhibitors of melanogenesis: an updated review [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(17): 7395-418.
- [26] JAIKANTH C, GURUMURTHY P, INDHUMATHI T, et al. Emergence of SFRP5 as a pleiotropic adipocytokine and its association with Wnt signaling pathways [J]. *Minerva Endocrinol*, 2017, 42(3): 280-9.
- [27] ZHU Z, YIN S, WU K, et al. Downregulation of Sfrp5 in insulin resistant rats promotes macrophage-mediated pulmonary inflammation through activation of Wnt5a/JNK1 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 498-504.
- [28] CHANG J T, ESUMI N, MOORE K, et al. Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(4): 575-83.
- [29] LIU L B, CHEN X D, ZHOU X Y, et al. The Wnt antagonist and

- secreted frizzled-related protein 5: implications on lipid metabolism, inflammation, and type 2 diabetes mellitus [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20180011.
- [30] SUN S, ZHAI H, ZHU M, et al. Insulin resistance is associated with Sfrp5 in obstructive sleep apnea [J]. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2019, 85(6): 739-45.
- [31] LI B, YAO Q, GUO S, et al. Type 2 diabetes with hypertensive patients results in changes to features of adipocytokines: Leptin, Irisin, LGR4, and Sfrp5 [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2019, 41(7): 645-50.
- [32] DORSKY R I, MOON R T, RAIBLE D W. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway [J]. *Nature*, 1998, 396(6709): 370-3.
- [33] DUNN K J, WILLIAMS B O, LI Y, et al. Neural crest-directed gene transfer demonstrates Wnt1 role in melanocyte expansion and differentiation during mouse development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(18): 10050-5.
- [34] ZHANG J, LI Y, WU Y, et al. Wnt5a inhibits the proliferation and melanogenesis of melanocytes [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(6): 699-706.
- [35] YE J, YANG T, GUO H, et al. Wnt10b promotes differentiation of mouse hair follicle melanocytes [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10(6): 691-8.
- [36] WANG D, ZHANG Y, SHEN C. Research update on the association between SFRP5, an anti-inflammatory adipokine, with obesity, type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 2730-5.
- [37] TONG S, JI Q, DU Y, et al. Sfrp5/Wnt pathway: a protective regulatory system in atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2019, 39(8): 472-82.