

甲状腺素抑制斑马鱼早期胚胎黑色素细胞的稳态维持

钱露薇 许璟瑾 韩骐泽 康云思*

(中国海洋大学海洋生物多样性与进化研究所, 青岛 266003)

摘要 甲状腺激素对维持机体的发育至关重要。在成年斑马鱼中, 过量甲状腺激素可抑制黑色素细胞的增殖, 并促进黄色素细胞的发育, 但是过量甲状腺激素对斑马鱼早期胚胎色素细胞发育的作用研究的相对较少。该研究分析了甲状腺素在斑马鱼胚胎早期发育时期对黑色素细胞发育的影响, 发现甲状腺素处理导致斑马鱼胚胎黑色素沉着异常。通过对不同发育时期胚胎的处理, 该研究发现甲状腺素影响了黑色素细胞的稳态维持, 但对其早期命运的分化并未有显著影响, 这与成鱼有显著区别。实时录像以及组织学实验结果表明甲状腺素处理导致黑色素小体形态异常, 并最终导致黑色素细胞的凋亡。与表皮黑色素细胞不同, 甲状腺素处理并未影响视网膜色素上皮细胞中黑色素小体的成熟与稳态发育, 表明甲状腺素对黑色素细胞稳态维持的抑制具有组织特异性。上述结果将有助于进一步了解甲状腺激素在早期胚胎发育过程中的生理功能, 同时为了解斑马鱼独特的体色决定机制提供参考。

关键词 斑马鱼; 甲状腺素; 黑色素细胞; 黑色素小体

L-thyroxine Inhibits Homeostasis Maintenance of Melanocytes in Zebrafish Embryos

QIAN Luwei, XU Jingjin, HAN Qize, KANG Yunsi*

(Institute of Evolution & Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract TH (thyroid hormone) is essential for maintaining the proper development of the body. Although excessive thyroid hormone has been found to inhibit the proliferation of melanocytes and promote the development of xanthophores in adult zebrafish, it remains unclear whether thyroid hormone is involved in the development of pigment cells during early embryonic stages in zebrafish. This study aimed to investigate this matter and revealed that L-thyroxine treatment causes abnormal melanin pigmentation in zebrafish embryos. By treating zebrafish embryos at different stages, this work demonstrated that L-thyroxine played a crucial role in the homeostasis, but not the differentiation, of melanocytes—which differed from the role it plays in adult zebrafish. Live imaging and histological analysis showed that L-thyroxine treatments affected melanosome formation and eventually led to melanocyte apoptosis. Notably, the inhibition of melanosome formation was specific to melanocytes, as L-thyroxine treatment did not affect the development of melanosomes in retinal pigment epithelium cells. Overall, this work sheds light on the physiological function of thyroid hormone during early embryonic stages and provides further insights into skin pigment determination in zebrafish.

Keywords zebrafish; L-thyroxine; melanocyte; melanosome

收稿日期: 2023-05-05 接受日期: 2023-07-18

国家自然科学基金(批准号: 32200415)资助的课题

*通讯作者. Tel: 0532-82032173, E-mail: kangyunsi@ouc.edu.cn

Received: May 5, 2023 Accepted: July 18, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32200415)

*Corresponding author. Tel: +86-532-82032173, E-mail: kangyunsi@ouc.edu.cn

紫外线对人类皮肤产生各种影响, 包括DNA光损伤、红斑、光老化、晒黑等, 人类通过皮肤角质细胞中的黑色素抵御紫外线的损害^[1-2]。黑色素是由黑色素细胞中的黑色素小体合成、分泌和转运的, 黑色素是不规则的吸光聚合物, 含有吡啶和酪氨酸氧化的多种中间产物^[3]。不同种族皮肤中黑色素细胞的数量相差甚微, 但是黑色素含量的比例相差很大^[4-5]。在人体中, 黑色素合成、代谢及黑色素细胞功能异常, 会导致如白化病、黑色素瘤等多种疾病。

哺乳动物皮肤中的黑色素前体细胞来源于神经嵴细胞, 神经嵴细胞通过表达转录因子SOX10 (sry-related HMG-box gene 10)形成黑色素细胞/神经胶质细胞双能祖细胞^[6]。具有黑色素细胞分化命运的黑色素前体细胞随后表达小眼球相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)、酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白1(tyrosinase-related protein 1, TYRP1)、酪氨酸酶相关蛋白2(tyrosinase-related protein 2, TYRP2;也被称为dopachrome tautomerase, DCT)和干细胞因子受体酪氨酸激酶(kit protooncogene, receptor tyrosine kinase, KIT)等^[6-7]。TYR、TYRP1和DCT在黑色素合成中发挥重要功能。黑色素细胞中的L-酪氨酸被TYR羟化为L-二羟基苯丙氨酸(L-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA), L-DOPA被TYR进一步氧化为多巴醌(dopaquinone, DQ), 这是黑色素生物合成的关键步骤, 氧化产物DQ是黑色素的前体, 最终能够形成黑色素^[8]。

MITF是黑色素形成过程中最重要的转录因子, 是多种信号转导途径的共同靶点, MITF基因转录激活了包括TYR和DCT在内的关键酶促反应^[9]。多种旁分泌细胞因子如 α -黑素细胞刺激素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)、Wnt、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、内皮素-1(endothelin-1, ET-1), 通过激活多种信号通路促进MITF的表达进而调控黑色素的合成^[10]。以太阳光辐射为例, 光照促进角质细胞分泌 α -MSH, 它是由13个氨基酸组成的内源性神经免疫调节肽, α -MSH与黑色素前体细胞上的黑素皮质受体, 又称促黑素细胞激素受体(melanocortin 1 receptor, MC1R)结合, 将导致胞内cAMP的上调, 促进MITF的表达^[11-13]。

斑马鱼(*Danio rerio*)是研究脊椎动物早期胚胎色素发育的经典模式生物^[14-15]。与哺乳动物相似,

斑马鱼胚胎的真皮和表皮色素细胞来源于神经嵴细胞, 而视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE)来源于视泡背侧外层的细胞^[16-17]。斑马鱼具有三种不同的色素细胞: 黑色素细胞、黄色素细胞和银色素细胞, 三种色素共同形成标志性斑马条纹^[18]。大约在受精后24 h(24 hour post-fertilization, 24 hpf), 斑马鱼胚胎的耳朵两侧首先出现黑色素, 随后黑色素向躯干迁移, 不久后出现黄色素, 黄色素由头部背侧向尾部生长, 银色素是最后出现的色素类型^[14]。在胚胎发育到约第4天(4 days post fertilization, 4 dpf), 形成胚胎/早期幼鱼色素模式^[19]。

在脊椎动物中, 甲状腺激素(thyroid hormone, TH)是胚胎发育的关键调节因子^[20-21]。甲状腺激素包括甲状腺素(thyroxine, T₄)和三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T₃), T₄与T₃在体内可以互相转化^[22]。T₄分为D型、L型和DL型, 其中L-甲状腺素(L-thyroxine)的活性最强, 临床上治疗甲状腺功能减退症以L-甲状腺素为主^[23]。鱼类胚胎中存在大量由母体提供的T₄和T₃, 在发育过程中其浓度逐渐降低, 直到内源性甲状腺激素开始产生^[24-25]。甲状腺激素在斑马鱼色素细胞发育、色素模式以及更加广泛的胚胎发育后起着重要作用。已有研究表明, 甲状腺激素会限制斑马鱼成鱼黑色素细胞的扩张, 同时促进黄色素细胞的发育^[26]。通过分析成年斑马鱼神经嵴的单细胞转录组数据, 研究人员发现甲状腺激素促进黑色素细胞和黄色素细胞的成熟, 但是作用方式不同: 甲状腺激素驱动黑色素细胞的终末分化, 使其停止增殖, 最终抑制黑色素细胞数量; 甲状腺激素促进黄色素细胞中类胡萝卜素的积累, 使其发生肉眼可见的色素沉着^[27]。

斑马鱼早期胚胎色素细胞和成鱼色素细胞发育具有不同的调控机制, 因此甲状腺激素对于胚胎色素细胞和成鱼色素细胞的影响应该也不同。然而目前关于甲状腺激素对早期胚胎黑色素细胞发育的相关研究还未见报导。在本研究中, 我们在斑马鱼胚胎培养液中加入甲状腺素进行处理, 首先研究了甲状腺素对斑马鱼胚胎黑色素细胞形成的影响; 其次, 探究外源甲状腺素过量作用下, 斑马鱼胚胎黑色素细胞的反应, 进一步研究甲状腺素对黑色素合成基因的调控作用。本研究结果有助于我们了解甲状腺素在斑马鱼早期胚胎黑色素合成中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 斑马鱼饲养

本实验使用的斑马鱼品系为Tübingen(TU), 斑马鱼饲养在28 °C的恒温养殖系统中, 每日按时投喂新鲜卤虫两次。实验动物的相关操作经中国海洋大学动物保护委员会批准(批准号: OUC2012316)。

1.2 药物处理

甲状腺素[L-thyroxine, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 货号A602869]溶于0.1 mol/L NaOH中, 制成 4×10^5 $\mu\text{g/L}$ 的母液。处理胚胎时, 用新鲜E3溶液(称取0.290 g NaCl、0.0134 g KCl、0.044 g无水CaCl₂、0.166 g 7H₂O·MgSO₄, 补纯水至1 L溶解即可)稀释甲状腺素母液至300 $\mu\text{g/L}$, 将发育至90%外包期(9 hpf左右)或72 hpf的胚胎转移到24孔板中, 用含有药物的新鲜E3溶液培养, 对照组的E3溶液中含等量NaOH溶液, 每隔24 h更换一次E3溶液, 持续处理至48 hpf、72 hpf和120 hpf。处理成鱼时, 用新鲜的养殖系统水稀释甲状腺素母液至300 $\mu\text{g/L}$ 和30 $\mu\text{g/L}$, 对照组的养殖系统水中含等量NaOH溶液, 每隔24 h更换一次系统水, 持续处理14天。

1.3 黑色素细胞数目统计

肾上腺素(购自Sigma公司, 货号E4642)溶于灭菌水中配制溶液浓度为10 mg/mL, 胚胎进行药物处理至对应时期, 用肾上腺素处理胚胎, 处理时间约1 min, 然后置于正置显微镜下拍摄胚胎头部区域。ImageJ软件统计黑色素细胞数量, 本实验统计斑马鱼胚胎视顶盖至小脑末端区域内的表皮黑色素细胞数量。

1.4 原位杂交

反义探针 $sox10$ 、 $mitfa$ 和 dct 基因由野生型斑马鱼72 hpf胚胎的cDNA文库中扩增, 探针引物序列见表1。

原位杂交步骤参考标准方案^[28]进行, 胚胎经4%

PFA(购自Sigma, 货号158127) 4 °C固定过夜, 甲醇脱水后与探针在65 °C孵育过夜。次日回收探针, 再依次用50%甲酰胺(甲酰胺:2× SSCT=1:1)、2× SSCT、0.2× SSCT和MABT(100 mmol/L马来酸、150 mmol/L氯化钠、0.1%吐温-20, pH7.5)依次漂洗。用封闭液(10%羊血清和2%封闭液溶于MABT缓冲液)处理胚胎, 封闭后的胚胎与Anti-Digoxigenin-AP(购自Roche公司, 货号11093274910)置于4 °C孵育过夜。次日使用MABT洗脱, 用染色缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、50 mmol/L MgCl₂、0.1%吐温-20、1 mmol/L左旋咪唑)漂洗, 最后用BM Purple(购自Roche公司, 货号为11442074001)显色。

1.5 胚胎的活体图像采集

将对应时期的处理组和对照组的斑马鱼胚胎, 用0.016% Tricaine(购自Sigma公司, 货号P7629)麻醉, 之后用1%低熔点琼脂糖(购自Sigma公司, 货号A9414)进行包埋, 胚胎背部向下紧贴在3.5 cm细胞培养皿的血底, 培养皿中注满E3溶液, 再倒扣在10 cm的培养皿中, 此时胚胎背部朝上, 便于观察黑色素小体的变化。使用Thunder Imager Tissue正置显微成像系统(购自Leica公司)进行图像采集。

1.6 黑色素小体舒张实验

咖啡因(购自Sigma公司, 货号C0750)溶于灭菌水中配制溶液浓度为10 mg/mL, 胚胎进行药物处理至72 hpf, 用咖啡因处理胚胎, 处理时间约1 min, 正置显微镜下拍摄黑色素细胞黑色素小体的舒张状态。

1.7 细胞凋亡检测

将对应时期的处理组和对照组斑马鱼胚胎用4% PFA 4 °C固定过夜。次日用PBS漂洗30 min, 再用0.1%柠檬酸钠溶液(加入0.1% Triton X-100)通透2 min, 之后用50 mmol/L Tris-HCl漂洗三次。阳性对照用DNase I处理10 min, 使胚胎的DNA充分断裂, Tris-HCl漂洗三次。使用罗氏TMR红色荧光法

表1 探针引物序列

Table 1 Primer sequence for probe

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
$sox10$	Forward: TGG AGA CTG CTG AAC GAG AC Reverse: CGC TGG AGA TGC CGT ATG T
$mitfa$	Forward: ATT ATC CGT TAC TCC ATC TCC Reverse: CGT TGT TGA GGT CCA GAG TG
dct	Forward: GCA GCA TTA CTA CTC CGT CAG Reverse: GAA GCG TCT CAT CCA TTC ATC A

表2 RT-qPCR引物序列
Table 2 Primer sequence for RT-qPCR

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>casp3b</i>	Forward: AGC ATC TCA GGA AGA TCA CAG T Reverse: CAG GAG CCA TTA GCG ACA TTC
<i>β-actin</i>	Forward: CCG TGA CAT CAA GGA GAA GC Reverse: TAC CGC AAG ATT CCA TAC CC

原位细胞死亡检测试剂盒(购自 Roche公司, 货号 12156792910)检测细胞凋亡, 检测样品在 37 °C 避光条件下孵育过夜。次日, 洗去 TUNEL 染液, 染上 DAPI, 置于共聚焦显微镜下拍摄。

1.8 RNA提取和RT-qPCR

斑马鱼胚胎处理至所需时期, 处理组和对照组分别收取 15 枚胚胎, 用 RNAiso Plus(购自 TaKaRa 公司, 货号 9109)提取胚胎总 RNA, 具体操作方法参考制造商提供的说明书。随后用逆转录试剂盒(购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 货号 R323-01)将总 RNA 反转录为 cDNA, 具体方法参考制造商提供的说明书。本研究中实时荧光定量 PCR 扩增用到的引物序列见表 2。

实时荧光定量 PCR 在 ThermoFisher Scientific 的 StepOne Real-Time PCR systems 中进行, 使用的酶为 2× ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 货号 Q311-02), 总体积为 20 μL 进行扩增。靶基因 mRNA 的表达量归一化为 *β-actin* mRNA 的表达, 所有实验结果均进行了三次以上的重复。

1.9 冷冻切片

处理至 72 hpf 和 120 hpf 的幼鱼用 4% PFA 4 °C 固定过夜, 次日用 30% 蔗糖溶液(蔗糖溶于 PBST)进行脱水。脱水后的胚胎用冷冻切片包埋剂(购自 Leica 公司, 货号 14020108926)包埋, 胚胎头部朝下, 进行水平切片, 切片厚度为 10 μm, 将切片铺展到涂有多聚赖氨酸的黏附性载玻片上, 37 °C 下烘干使组织切片黏附得更牢。烘干之后用 PBST 进行复水, 置于共聚焦显微镜下拍摄。

1.10 统计分析

实验数据的分析运用 Microsoft Excel 和 Graph-Pad Prism 8 来进行, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。两组之间的差异用 Student's *t*-test 来进行比较。其中 ns 代表数据差异不显著; 若 $P < 0.05$, 则认为数据之间有差异,

$P < 0.0001$, 则认为数据有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 甲状腺素处理抑制斑马鱼早期胚胎黑色素沉着

为研究甲状腺素对斑马鱼色素细胞发育的影响, 我们从斑马鱼胚胎受精后 9 h(9 hour post-fertilization, 9 hpf)开始, 用 300 μg/L 的甲状腺素对胚胎进行处理。结果显示: 胚胎发育至 48 hpf, 处理组与对照组的黑色素无明显差异(图 1A 和图 1D)。持续处理至 72 hpf, 处理组躯干的黑色素细胞内的黑色素小体出现聚集的现象(图 1B 和图 1D)。继续处理至 120 hpf 时, 多数黑色素小体消失, 仅存少量细小的黑色素小体(图 1C 和图 1D)。为统计甲状腺素处理组和对照组黑色素细胞的数量, 我们进一步利用肾上腺素处理胚胎。肾上腺素可迅速通过黑色素细胞上的 α -肾上腺素受体诱导黑色素小体聚集^[29], 进而便于统计黑色素细胞的数量。统计结果显示: 甲状腺素处理至 48 hpf, 并未影响黑色素细胞的数目, 继续处理至 72 hpf, 黑色素细胞的数量也未发生显著改变, 但与早期相比, 处理至 120 hpf, 表达黑色素的细胞数目显著减少(图 1D)。

2.2 甲状腺素处理导致黑色素细胞维持缺陷

甲状腺素处理结果显示, 处理斑马鱼胚胎至 48 hpf 并未对黑色素细胞发育产生显著影响。为进一步探究甲状腺素影响黑色素细胞的关键时期, 我们将斑马鱼胚胎从 48 hpf 起进行甲状腺素处理, 发现仅处理 24 h 即能够引起胚胎的黑色素小体分布出现明显异常(图 2A)。类似地, 从 72 hpf 开始处理, 在 120 hpf 时出现黑色素细胞发育缺陷(图 2B 和图 2C)。分别用 30 μg/L 和 300 μg/L 的甲状腺素处理成年斑马鱼, 在持续处理 14 天后, 可见斑马鱼躯干出现剂量依赖性的黑色素的沉着缺陷, 同时, 处理组成鱼体色偏黄, 暗示黄色素沉着加强(图 2D), 这与已有的报道一致^[26]。此外, 我们发现停止甲状腺素处理 20 天后, 躯干的黑色素细

胞可以恢复(图2E), 暗示黑色素前体细胞命运并未受影响。上述结果表明, 甲状腺素处理导致斑马鱼黑色素细胞数量减少。

2.3 甲状腺素处理并未对黑色素细胞特征基因的表达产生明显影响

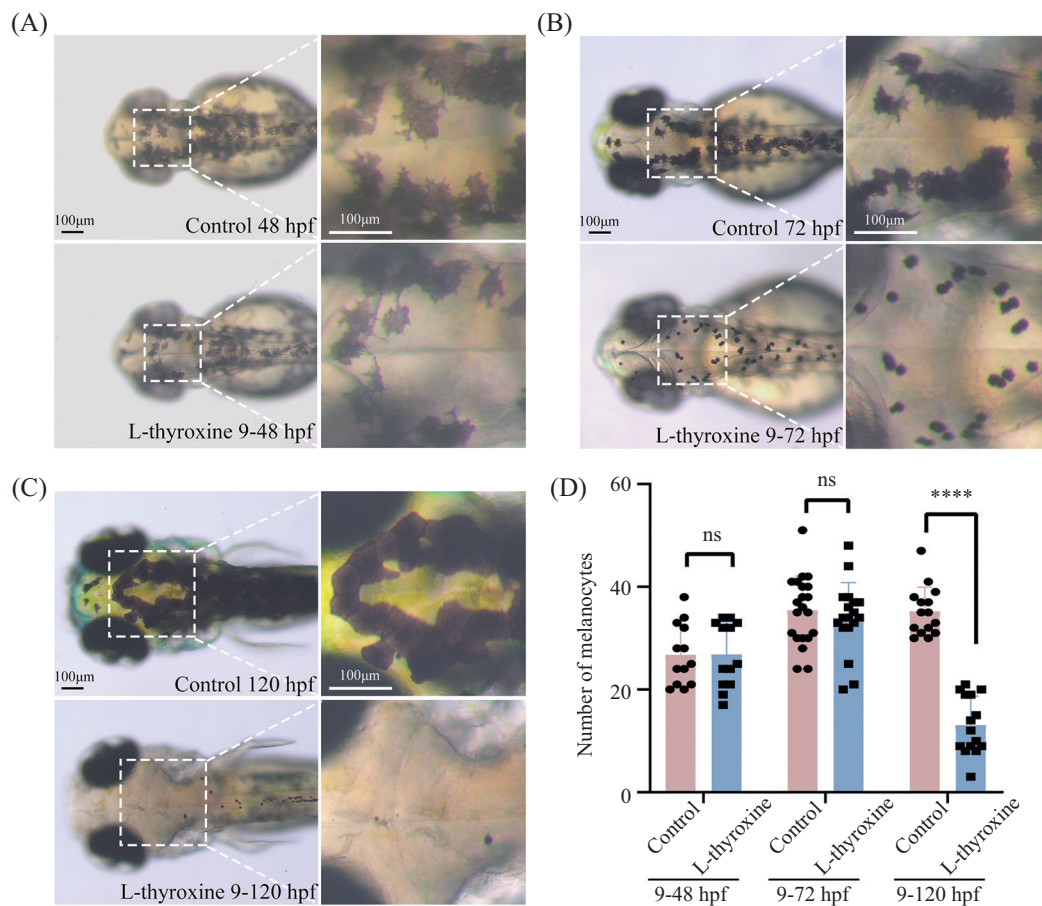
为了进一步探究甲状腺素是否对斑马鱼胚胎黑色素细胞的分化产生影响, 我们采用原位杂交方法检测了甲状腺素处理后胚胎神经嵴标记基因 *sox10*、*mitfa* 以及黑色素细胞标记基因 *dct* 的表达水平。结果显示: 从 9 hpf 处理至 24 hpf, 与对照组相比, 处理组基因的表达量并未发生明显变化(图 3A)。即使甲状腺素处理持续至 48 hpf, *dct* 的表达也未受显著影响(图 3B)。以上结果说明甲状腺素处理并未对黑色素细胞的早期分化产生显著影响。

2.4 甲状腺素促进黑色素细胞的凋亡

为了动态探究甲状腺素处理对黑色素细胞发

育的影响, 我们从 9 hpf 开始, 对斑马鱼胚胎进行处理, 待胚胎发育至 48 hpf 时开始进行连续摄像。录像结果显示在处理过程中黑色素小体逐渐聚集, 录像至约第 15 h(甲状腺素处理胚胎至 63 hpf), 黑色素小体完全聚集, 录像至约第 17 h(甲状腺素处理胚胎至 65 hpf), 可以看到部分黑色素小体碎裂出多个小的黑色素小体的现象(图 4, 黄色箭头)。

在体视镜下采集处理至 72 hpf 的斑马鱼胚胎图像, 同样可以观察到微小的黑色素小体存在(图 5A)。为进一步分析黑色素小体是否具有生理功能, 我们对其进行了咖啡因处理。咖啡因可激活黑色素细胞内的 cAMP 水平^[30], 进而促使黑色素小体舒张^[31]。斑马鱼提前用肾上腺素处理使黑色素小体聚集, 咖啡因处理后对照组黑色素小体发生明显扩张, 处理组中较大的黑色素小体仍可发生部分舒张, 但程度明显减弱, 而小的黑色素小体并无增大趋势(图 5A), 暗

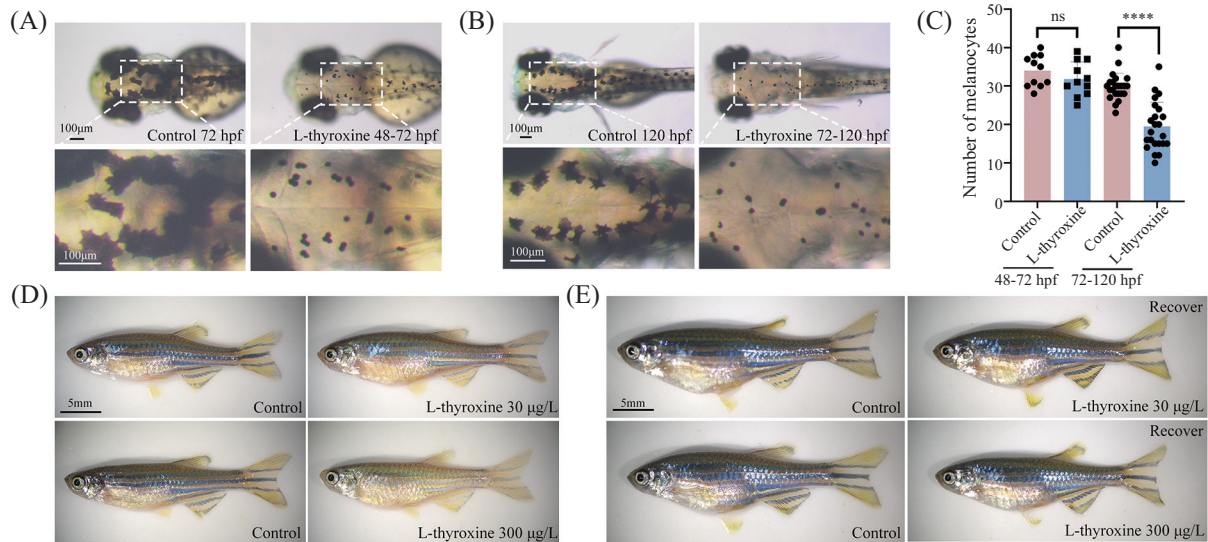


A~C: 从 9 hpf 开始利用甲状腺素处理胚胎至 48 hpf、72 hpf 和 120 hpf 后的表型及其对照图。D: 不同处理组黑色素细胞的统计数据。ns: 差异不显著, **** $P < 0.0001$ 。

A~C: the phenotypes of zebrafish larvae treated with L-thyroxine at 9-48 hpf, 9-72 hpf, and 9-120 hpf. D: bar graph with dots showing the relative number of melanocytes in control and L-thyroxine-treated groups. ns: no significance, **** $P < 0.0001$.

图1 L-甲状腺素处理导致斑马鱼早期胚胎黑色素细胞发育异常

Fig.1 L-thyroxine treatments induces abnormal melanogenesis in zebrafish larvae

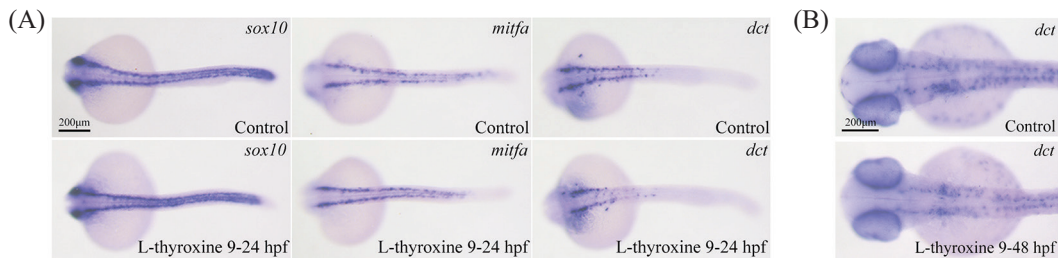


A、B: 利用甲状腺素在不同时期处理斑马鱼胚胎后黑色素表型图。C: 黑色素细胞数目统计。D: 不同浓度甲状腺素处理斑马鱼成鱼的表型图。E: 停止甲状腺素处理20天后, 斑马鱼成鱼表型图。ns: 差异不显著, **** $P < 0.0001$ 。

A,B: the phenotypes of melanosomes in zebrafish larvae treated with L-thyroxine at different stages. C: bar graph with dots showing relative number of melanocytes in control and L-thyroxine-treated groups. D: inhibition of melanogenesis in adult zebrafish at different concentrations of L-thyroxine. E: the recovery of melanocytes at 20 days after L-thyroxine treatment. ns: no significance, **** $P < 0.0001$ 。

图2 L-甲状腺素处理影响黑色素细胞的正常维持

Fig.2 L-thyroxine treatments inhibit the maintenance of melanocytes



A: 甲状腺素处理胚胎由受精后9 h至24 h, 胚胎原位杂交结果显示 $sox10$ 、 $mitfa$ 和 dct 的表达没有明显变化。B: 甲状腺素处理胚胎由受精后9 h至48 h, 原位杂交结果显示 dct 的表达无显著变化。

A: the expression of $sox10$, $mitfa$, and dct was grossly normal in 24 hpf larvae treated with L-thyroxine at 9-24 hpf. B: *in situ* hybridization results showing that the expression of dct was not changed in larvae treated with L-thyroxine at 9-48 hpf.

图3 L-甲状腺素处理对黑色素细胞早期特征基因的表达无显著影响

Fig.3 The expression of melanocyte genes is grossly normal after L-thyroxine treatments at early stages

示黑色素细胞可能出现凋亡迹象。随后, 我们利用TUNEL染色实验进行检测, 发现处理至72 hpf的胚胎, 黑色素细胞发生明显凋亡(图5B)。此外, qPCR结果也显示细胞凋亡基因 $casp3b$ 的表达量显著上调(图5C), 这些结果表明甲状腺素处理导致了黑色素细胞后期的凋亡。

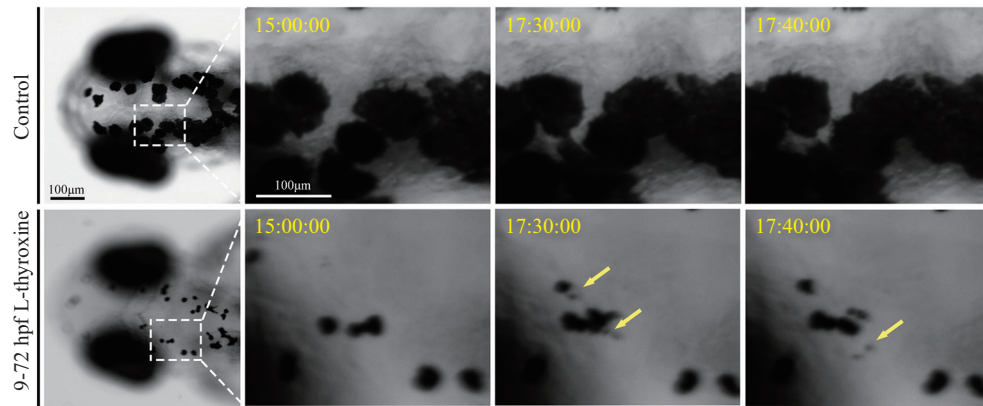
2.5 甲状腺素处理对视网膜色素上皮细胞无明显影响

视网膜色素上皮细胞同样富含黑色素小体, 进一步我们检测了甲状腺素处理是否会抑制RPE的黑色素沉着。我们将斑马鱼胚胎从9 hpf持续用甲状腺

素处理至120 hpf, 然后进行组织切片观察。结果显示: 与对照组相比, 甲状腺素处理组的RPE黑色素层并没有明显异常(图6A和图6B), 且二者的RPE黑色素层厚度也无明显差别(图6C)。

3 讨论

甲状腺素参与调控细胞的多种生理功能, 是调节组织器官发育和稳态维持的关键内分泌控制器^[32]。斑马鱼成体具有条纹状图案, 主要由黑色素、黄色素和银色素细胞组成。之前的报导显示, 甲状腺素对调控成鱼色素细胞的发育至关重要, 具有促进黄

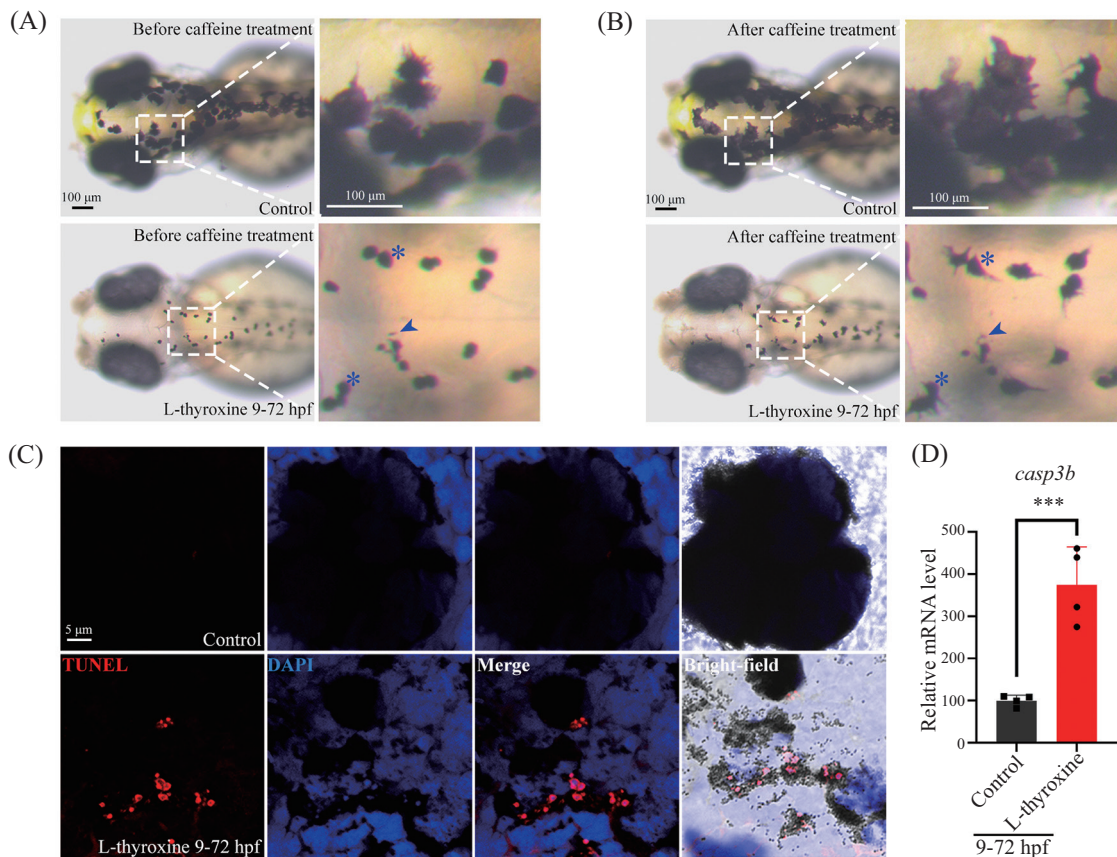


甲状腺素处理胚胎后对黑色素细胞的实时录像截图。斑马鱼胚胎从受精后9 h开始处理, 并从48 h开始录像, 显示图片为48 h开始录像后不同时间点的结果。箭头显示破碎的黑色素小体。

Time-lapse imaging showing the phenotypes of melanocytes after L-thyroxine treatments starting from 9 hpf. The video was captured from 48 hpf and different time points were shown. Arrow indicate the small particles broken from the melanosome.

图4 L-甲状腺素处理导致黑色素细胞色素小体降解

Fig.4 L-thyroxine treatments result in melanosome degeneration in melanocytes

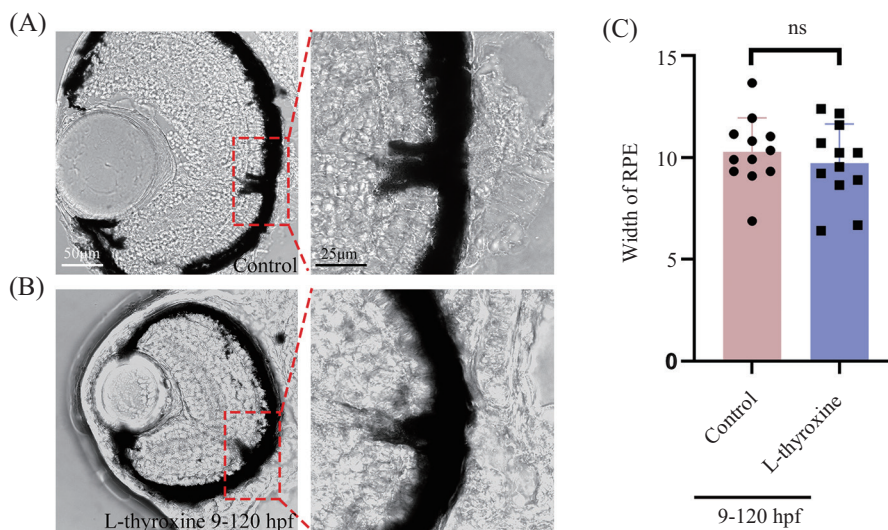


A、B: 对照组胚胎, 用咖啡因处理, 黑色素小体可正常舒张, 甲状腺素处理胚胎9~72 hpf后, 小黑色素小体碎片无法正常舒张(蓝色箭头), 面积较大的黑色素小体可以舒张(蓝色星号)。

A,B: the melanosomes dispersed normally in control zebrafish larvae after caffeine treatment. In L-thyroxine-treated groups, small melanin particles failed to disperse (blue arrow) and larger ones still underwent dispersion (blue asterisk) when treated with caffeine. C: confocal images showing TUNEL-positive melanocytes after L-thyroxine treatment. D: q-PCR analysis showing the expression of apoptosis-related gene *casp3b* in control and L-thyroxine-treatment groups. $***P<0.001$.

图5 L-甲状腺素诱导黑色素细胞凋亡

Fig.5 L-thyroxine induces the apoptosis of melanocytes



A、B: 对照组(A)及处理组(B)斑马鱼胚胎的视网膜切片图, 甲状腺素处理时间为受精后9 h至120 h。C: 甲状腺素处理胚胎与对照组胚胎的RPE黑色素层厚度统计图。ns: 差异不显著。

A,B: cross section of the retina in 120 hpf control (A) or treated zebrafish larvae (B). The larvae were treated with L-thyroxine at 9-120 hpf. C: bar graph with dots showing the thickness of RPE layer in control and L-thyroxine-treatment groups. ns: no significance.

图6 L-甲状腺素处理不影响视网膜色素上皮细胞发育

Fig.6 Retinal pigment epithelium are grossly normal after L-thyroxine treatments

色素细胞增殖, 同时抑制黑色素细胞数量的功能^[27]。但是, 在胚胎发育早期阶段, 黄色素及银色素细胞发育相对较晚, 这一时期甲状腺素对黑色素细胞命运的决定尚无相关报道。

通过在斑马鱼胚胎发育不同时期进行甲状腺素处理, 本研究分析了早期胚胎发育过程中, 甲状腺素对黑色素细胞的分化及维持的影响。从受精后9 h开始处理斑马鱼胚胎, 直至受精后48 h, 并未发现黑色素细胞的明显异常。这一时期是黑色素细胞由神经嵴细胞分化形成的关键时期, 说明甲状腺素对早期黑色素细胞命运的分化过程并无显著影响。而持续处理斑马鱼胚胎至72 h, 可见色素细胞的黑色素小体发生明显改变(图1A)。同时, 受精后48 h开始处理, 同样会引起黑色素细胞的异常, 说明甲状腺素对黑色素细胞的影响发生在这一关键时期, 即黑色素细胞成熟后的功能维持期。进一步, 我们通过实时录像、细胞凋亡检测及qPCR等手段, 发现甲状腺素处理导致了黑色素细胞的凋亡。这些结果表明: 在胚胎发育时期, 黑色素细胞的分化不受甲状腺素的影响, 但其功能的稳态维持受到甲状腺素的抑制。这一结果与甲状腺素在成鱼黑色素细胞中的调控机制略有不同: 在成体阶段, 甲状腺素直接影响黑色素细胞的成熟过程, 并促进黄色素细胞的增殖。

值得注意的是, 甲状腺素处理并未影响视网膜色

素上皮细胞中黑色素小体的发育。为防止这是由于处理时间短所致, 我们延长处理时间至受精后120 h, RPE中的黑色素小体形态亦基本正常。类似地, 甲状腺素通路激活的斑马鱼突变体成鱼虽然具有体色的异常(黑色素细胞减少, 黄色素细胞增加), 但其眼部的RPE细胞黑色素小体也未报道有明显异常^[26]。这些实验结果表明甲状腺素对色素细胞的影响具有组织特异性, 其处理导致的黑色素小体的破碎是由于色素细胞本身的功能异常所导致, 而不是影响了黑色素小体的成熟过程。

综上, 在斑马鱼胚胎的早期发育中, 甲状腺素处理不影响黑色素细胞的分化及成熟, 但是显著抑制黑色素细胞的稳态维持。甲状腺素处理会导致黑色素小体的破碎、黑色素细胞的凋亡, 致使斑马鱼最终呈现出体表黑色素缺失表型。本研究结果将有助于更全面了解斑马鱼色素细胞的发育及体色的决定机制。

参考文献 (References)

- [1] LIN J Y, FISHER D E. Melanocyte biology and skin pigmentation [J]. *Nature*, 2007, 445(7130): 843-50.
- [2] SLOMINSKI A, TOBIN D J, SHIBAHARA S, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(4): 1155-228.
- [3] CORDERO R J B, CASADEVALL A. Melanin [J]. *Curr Biol*,

- 2020, 30(4): R142-R3.
- [4] BRENNER M, HEARING V J. The protective role of melanin against UV damage in human skin [J]. *Photochem Photobiol*, 2008, 84(3): 539-49.
- [5] PAVAN W J, STURM R A. The genetics of human skin and hair pigmentation [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2019, 20: 41-72.
- [6] MORT R L, JACKSON I J, PATTON E E. The melanocyte lineage in development and disease [J]. *Development*, 2015, 142(4): 620-32.
- [7] KAWAKAMI A, FISHER D E. Key discoveries in melanocyte development [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(E1): E2-4.
- [8] ZHOU S, ZENG H, HUANG J, et al. Epigenetic regulation of melanogenesis [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 69: 101349.
- [9] TSUKAMOTO K, JACKSON I J, URABE K, et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPachrome tautomerase [J]. *EMBO J*, 1992, 11(2): 519-26.
- [10] LIU C, NUERAIHEMAITI M, ZANG D, et al. Quercetin 3-O-(6''-O-E-caffeoyl)-beta-D-glucopyranoside, a flavonoid compound, promotes melanogenesis through the upregulation of MAPKs and Akt/GSK3beta/beta-catenin signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4780.
- [11] ICHIYAMA T, SATO S, OKADA K, et al. The neuroimmunomodulatory peptide alpha-MSH [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 917: 221-6.
- [12] CHEN H, WENG Q Y, FISHER D E. UV signaling pathways within the skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(8): 2080-5.
- [13] HOU L, PAVAN W J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf [J]? *Cell Res*, 2008, 18(12): 1163-76.
- [14] PATTERSON L B, PARICHY D M. Zebrafish pigment pattern formation: insights into the development and evolution of adult form [J]. *Annu Rev Genet*, 2019, 53: 505-30.
- [15] IYENGAR S, KASHETA M, CEOL C J. Poised regeneration of zebrafish melanocytes involves direct differentiation and concurrent replenishment of tissue-resident progenitor cells [J]. *Dev Cell*, 2015, 33(6): 631-43.
- [16] MORENO-MARMOL T, LEDESMA-TERRON M, TABANERAN, et al. Stretching of the retinal pigment epithelium contributes to zebrafish optic cup morphogenesis [J]. *eLife*, 2021, doi: 10.7554/eLife.63396.
- [17] KWAN K M, OTSUNA H, KIDOKORO H, et al. A complex choreography of cell movements shapes the vertebrate eye [J]. *Development*, 2012, 139(2): 359-72.
- [18] KELSH R N, BRAND M, JIANG Y J, et al. Zebrafish pigmentation mutations and the processes of neural crest development [J]. *Development*, 1996, 123: 369-89.
- [19] KIMMEL C B, BALLARD W W, KIMMEL S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 1995, 203(3): 253-310.
- [20] LAUDET V. The origins and evolution of vertebrate metamorphosis [J]. *Curr Biol*, 2011, 21(18): R726-37.
- [21] TATA J R. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone [J]. *Cell Res*, 1998, 8(4): 259-72.
- [22] WALPITA C N, VAN DER GEYTEN S, RURANGWA E, et al. The effect of 3,5,3'-triiodothyronine supplementation on zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development and expression of iodothyronine deiodinases and thyroid hormone receptors [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 152(2/3): 206-14.
- [23] POWER D M, LEWELLYN L, FAUSTINO M, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 130(4): 447-59.
- [24] WENDL T, LUN K, MIONE M, et al. Pax2.1 is required for the development of thyroid follicles in zebrafish [J]. *Development*, 2002, 129(15): 3751-60.
- [25] MCMENAMIN S K, BAIN E J, MCCANN A E, et al. Thyroid hormone-dependent adult pigment cell lineage and pattern in zebrafish [J]. *Science*, 2014, 345(6202): 1358-61.
- [26] SAUNDERS L M, MISHRA A K, AMAN A J, et al. Thyroid hormone regulates distinct paths to maturation in pigment cell lineages [J]. *eLife*, 2019, doi: 10.7554/eLife.45181.
- [27] SCHULTE-MERKER S, HO R K, HERRMANN B G, et al. The protein product of the zebrafish homologue of the mouse T gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo [J]. *Development*, 1992, 116(4): 1021-32.
- [28] XU J, XIE F K. alpha- and beta-adrenoceptors of zebrafish in melanosome movement: a comparative study between embryo and adult melanophores [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(2): 250-5.
- [29] ZHANG S J, LI Y F, WANG G E, et al. Caffeine ameliorates high energy diet-induced hepatic steatosis: sirtuin 3 acts as a bridge in the lipid metabolism pathway [J]. *Food Funct*, 2015, 6(8): 2578-87.
- [30] LOGAN D W, BURN S F, JACKSON I J. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores [J]. *Pigment Cell Res*, 2006, 19(3): 206-13.
- [31] MANCINO G, MIRO C, DI CICCO E, et al. Thyroid hormone action in epidermal development and homeostasis and its implications in the pathophysiology of the skin [J]. *J Endocrinol Invest*, 2021, 44(8): 1571-9.