论著

文章编号:1000-5404(2014)03-0228-04

sFRP5 抑制 Wnt3a 对黑素细胞黑素形成作用的初步研究

汤寅虹[1],杨 珂[2],杨 恬[2],叶吉星[3],刘 鹏[4],连小华[2],郭海英[2],彭惠民[1] (400016 重庆,重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室[2];400044 重庆,重庆大学生物工程学院[3];400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院放射科[4])

[摘要] **目的** 研究 sFRP5 抑制 Wnt3a 对黑素细胞黑素形成的作用。**方法** 以永生化的黑素细胞为模型,利用腺病毒表达载体,设置 Control 组、Wnt3a 处理组、Wnt3a + sFRP5 处理组进行以下实验:L-DOPA 测定酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)活性;Masson-Fontanas 银染色法观察黑素形成情况;RT-PCR 检测酪氨酸酶相关蛋白 1(tyrosinase-related protein 1, TRP-1)、TYR 基因的表达;Western blot 检测 TRP-1、TYR 蛋白的表达水平。**结果** L-DOPA 测定酪氨酸酶活性结果显示 Wnt3a + sFRP5 处理组 TYR 活性低于 Wnt3a 处理组,差异有统计学意义($P < 0.05$);Masson-Fontanas 银染色法显示 Wnt3a + sFRP5 处理组形成的黑素明显低于 Wnt3a 处理组;RT-PCR 检测结果显示 Wnt3a + sFRP5 处理组能下调 TRP-1、TYR 基因的表达($P < 0.05$);Western blot 检测结果显示 Wnt3a + sFRP5 处理组能下调 TRP-1、TYR 蛋白的表达水平($P < 0.05$)。**结论** sFRP5 能抑制 Wnt3a 对黑素细胞黑素生成的作用。

[关键词] sFRP5;Wnt3a;黑素细胞

[中图法分类号] R322.991; R329.26; R394.3 [文献标志码] A

SFRP5 suppresses melanin formation of melanocytes through Wnt3a inhibition

Tang Yinhong[1], Yang Ke[2], Yang Tian[2], Ye Jixing[3], Liu Peng[4], Lian Xiaohua[2], Guo Haiying[2], Peng Huiming[1] ([1]Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044; [4]Department of Radiology, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of secreted Frizzled-related protein 5 (sFRP5) inhibiting Wnt3a on the melanin formation of melanocytes. **Methods** With immortalized melanocytes as model and adenoviral vectors, we set up 3 experimental groups, melanocytes transfected with Ad-GFP (Ad-GFP group), melanocytes transfected with Ad-Wnt3a (Ad-Wnt3a group) and melanocytes transfected with Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 (Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 group) to do the following experiments, including L-dopa tyrosinase activity assay, Masson-Fontanas silver staining for melanin formation detection, RT-PCR for testing expression of tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) and tyrosinase (TYR), and Western blotting for detecting the protein levels of TRP-1 and TYR in iMC23 cells. **Results** L-Dopa tyrosinase activity assay showed an obvious decrease in tyrosinase activity in the Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 group as compared to Ad-Wnt3a group ($P < 0.05$). Masson-Fontanas silver staining found that melanin in the Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 group was significantly lower than that in the Ad-Wnt3a group. RT-PCR results showed that the mRNA expression levels of TRP-1 and TYR were down-regulated in the Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 group ($P < 0.05$). Moreover, the protein levels of TRP-1 and TYR showed similar changes as proven by Western blotting ($P < 0.05$). **Conclusion** SFRP5 can suppress the melanin formation of melanocytes through Wnt3a inhibition.

[**Key words**] secreted Frizzled-related protein 5; Wnt3a; melanocytes

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81271770) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA0335).
Corresponding author: Peng Huimin, Tel: 86-23-65712090, E-mail: phm614@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81271770);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA0335)
[通信作者] 彭惠民,电话:(023)65712090,E-mail: phm614@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131022.1410.009.html(2013-10-22)

皮肤中黑素细胞的主要功能是合成黑素,通过树突将黑素颗粒输送给其相关联的角质形成细胞,使皮肤维持正常肤色,免受紫外线及光致癌因子的损害。目前研究发现毛囊 bulge 区存在黑素干细胞是维持毛发和皮肤黑素形成的根源。研究黑素干细胞分化调节的机制,有助于了解衰老性白发的发生机制,对临床上色素脱失性疾病如白癜风的治疗也有很好的提示作用。

黑素细胞起源于神经嵴,发育过程中逐渐迁移到表皮,形成毛囊中的黑素干细胞[1]。目前的研究发现黑素干细胞的分化受众多信号通路的共同调控,其中 Wnt 信号通路发挥关键的作用[2]。我们前期的工作发现,Wnt3a 能通过激活经典 Wnt/β-catenin 信号通路,调节黑素干细胞的分化[3]。分泌型卷曲相关蛋白(secreted Frizzled-related proteins, sFRPs)是一种分泌型糖蛋白家族,结构上与 frizzled 受体极为相似,发挥调节 Wnt 信号通路的作用[4]。目前在哺乳动物发现 5 个成员 sFRP-1、sFRP-2、sFRP-3、sFRP-4、sFRP-5,sFRPs 家族不同成员可表达于不同的靶器官,我们发现 sFRP5 在皮肤中规律性表达。本研究主要通过体外实验,探讨 sFRP5 调节 Wnt3a 对黑素细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

黑素细胞 iMC23[5];腺病毒 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-sFRP5(美国芝加哥大学肿瘤研究中心何通川教授赠送保存);DMEM 细胞培养基和胎牛血清(HyClone);Trizol Kit(美国 Invitrogen 公司);First Strand cDNA Synthesis Kit (日本 TOYOBO);PCR 引物(上海生物工程有限公司合成);L-DOPA(Sigma 公司);PCR Mix 试剂盒(天根);RIPA 强裂解液(碧云天);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天);兔抗酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)抗体(美国 Bioworld 公司);羊抗酪氨酸酶相关蛋白 1(tyrosinase-related protein 1, TRP-1)抗体(美国 Santa Cruz 公司);GAPDH 抗体(上海康成);硝酸银(MYM 生物科技公司);凝胶成像系统(Bio-Rad);PCR 仪(Bio-Rad);琼脂糖凝胶电泳仪(Bio-Rad);蛋白定量仪(Bio-Rad);PAGE 垂直电泳仪(Bio-Rad);湿转仪(Bio-Rad);扫描仪(GS-800);荧光显微镜(Nikon)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 iMC23 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基,置于 37 ℃、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2.2 腺病毒扩增及病毒感染滴度的测定 重组腺病毒 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-sFRP5 感染 HEK293 细胞,24 h 后在荧光显微镜下观察荧光蛋白的表达,3 ~ 5 d 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于离心管中 1 200 r/min 离心 5 min,弃上清。根据细胞数及荧光量用 PBS 重悬细胞,-80 ℃ 冻存,37 ℃ 水浴反复冻融 4 次后 12 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,收集病毒液 -80 ℃ 保存。iMC23 细胞按 50% 密度接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 病毒液,感染 24 h 后在荧光显微镜下观察感染细胞荧光量,确定最适感染滴度。

1.2.3 L-DOPA 测定 TYR 活性 取对数生长期 iMC23 细胞,以 1×10^5 细胞/孔接种于 6 孔培养板中,孵育 12 h 后添加 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5;继续培养 3 d,0.25% 胰酶消化,每个样本取 1×10^5 细胞,加入 1% Triton X-100 溶液 200 mL,迅速置 -80 ℃ 冰箱内 30 min,室温下融化使细胞完全破裂,1 000 × g 离心 10 min,取 50 μL 上清到 96 孔板中,每孔加 2 mg/mL L-Dopa 溶液 10 μL,37 ℃ 反应 2 h 后在酶联免疫检测仪 490 nm 波长测定各孔光密度值[D(490)]。

1.2.4 Masson-Fontanas 银染法 iMC23 细胞接种于 24 孔板中,添加 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5,继续培养 4 d。PBS 洗 2 次,冰丙酮固定 10 min,蒸馏水洗 2 次,银氨液浸 60 ℃ 1 h,22 mg/mL 氯化金水溶液增色 5 ~ 10 min,350 mg/mL 硫代硫酸钠水溶液固定 2 min,蒸馏水洗后镜检照相。

1.2.5 RT-PCR 检测 iMC23 细胞 mRNA 的表达 分别提取 3 组细胞的总 RNA,每个样本均取 1 μg RNA 按照 TOYOBO 公司试剂盒说明书逆转录,然后根据天根 PCR Master Mix 试剂盒,取 cDNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL (10 μmol/L),PCR Mix 12.5 μL,ddH_2O 9.5 μL 共 25 μL,采用 Touchdown 的方法进行 PCR 反应,取 5 μL 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳(120 V,20 min),凝胶成像仪成像。引物信息见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)	扩增片段(bp)
TYR	上游引物:GGGCCCAAATTGTACAGAGA	174
	下游引物:ATGGGTGTTGACCCATTGTT	
TRP1	上游引物:AAGTTCAATGGCCAGGTCAG	157
	下游引物:TCAGTGAGGAGAGGCTGGTT	
GAPDH	上游引物:ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
	下游引物:TCCACCACCCTGTTGCTGTA	

1.2.6 Western blot 检测 iMC23 细胞蛋白的表达 以最适滴度 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 感染 iMC23 细胞,48 h 后提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取 50 μg 蛋白样品 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜,一抗 4 ℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 10 min × 3 次,二抗室温孵育 1 h,TBST 漂洗 10 min × 3 次,化学发光试剂盒显色,在暗室里进行胶片曝光,最后扫描仪成像。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,进行重复测量设计的单因素方差分析。

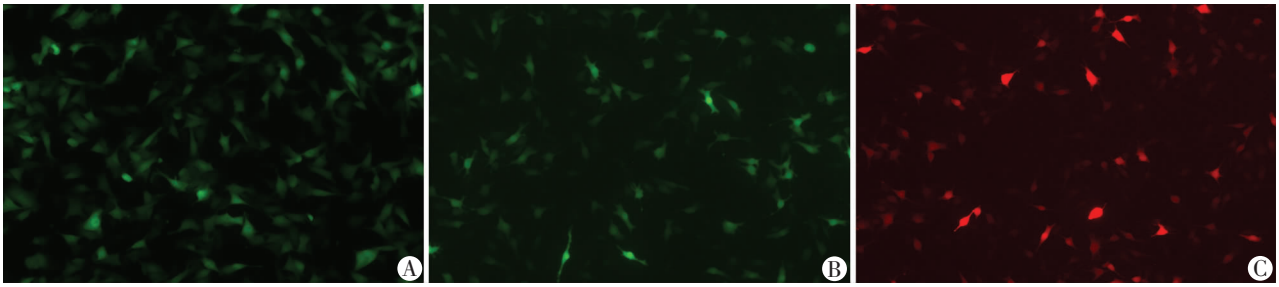
2 结果

2.1 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-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-sFRP5,并确定了最适感染滴度。感染 iMC23 细胞 24 h 后荧光显微镜照相,各组病毒的感染滴度相似(图 1)。

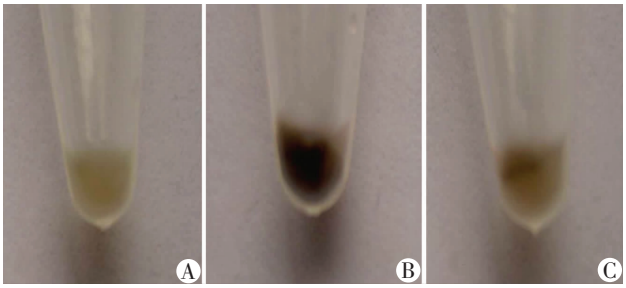
2.2 TYR 活性检测及分析

用最适滴度 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 感染 iMC23 细胞,72 h 后收集培养的细胞,离心后直接观察细胞沉淀。可观察到 Wnt3a 处理组的沉淀为黑色;Wnt3a + sFRP5 联合处理组的沉淀为灰色,Ad-GFP 对照组(Control)的沉淀为白色。DOPA 氧化法测定 TYR 活性结果显示,Control 组细胞 D(490) 光密度值为(2.600 ± 0.195),Wnt3a 处理组为(6.154 ± 0.701),Wnt3a + sFRP5 处理组为(2.964 ± 0.118),差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。



A:Control 组;B:Wnt3a 处理组;C:Wnt3a + sFRP5 处理组

图1 荧光显微镜观察腺病毒感染 iMC23 细胞感染效率 (×100)

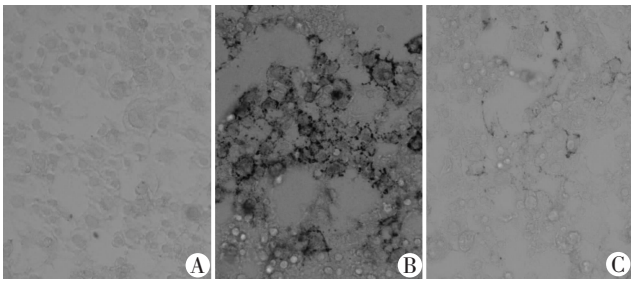


A:Control 组;B:Wnt3a 处理组;C:Wnt3a + sFRP5 处理组

图2 各组细胞沉淀观察

2.3 Masson-Fontanas 银染实验

腺病毒 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 感染 iMC23 细胞,4~5 d 后通过 Masson-Fontanas 银染法观察黑素颗粒的形成情况。结果显示 Wnt3a + sFRP5 处理组镜下所见黑素颗粒明显少于 Wnt3a 处理组,Control 组未见到黑素颗粒(图3)。

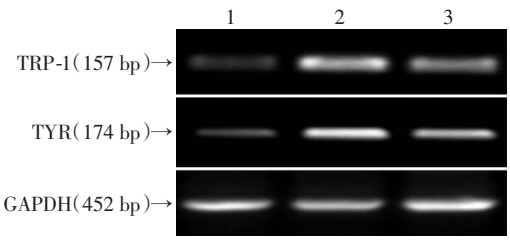


A:Control 组;B:Wnt3a 处理组;C:Wnt3a + sFRP5 处理组

图3 Masson-Fontanas 银染实验检测各组黑素形成能力

2.4 RT-PCR 检测黑素分化指标的表达

腺病毒 Ad-GFP、Ad-Wnt3a、Ad-Wnt3a + Ad-sFRP5 感染 iMC23 细胞,提取 36 h 细胞 RNA。RT-PCR 检测结果显示,Wnt3a + sFRP5 处理组黑素细胞的黑素合成关键靶基因 TRP-1 和 TYR 的 RNA 水平下调,差异有统计学意义($P<0.05$,图4)。

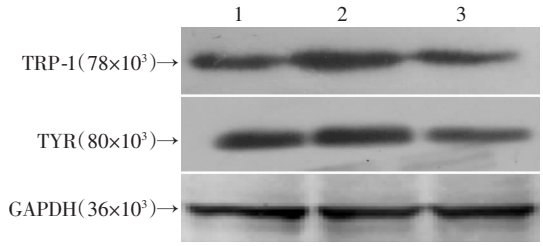


1:Control 组;2:Wnt3a 处理组;3:Wnt3a + sFRP5 处理组

图4 RT-PCR 检测黑素细胞的 TRP-1 和 TYR 基因的表达

2.5 Western blot 检测黑素分化指标的表达

为进一步分析 sFRP5 是否抑制 Wnt3a 对黑素细胞黑素形成的作用,我们检测了 TRP-1 和 TYR 蛋白的表达水平。Western blot 检测结果显示,Wnt3a + sFRP5 处理组 TRP-1 和 TYR 的蛋白表达水平明显低于 Wnt3a 处理组($P<0.05$,图5)。



1:Control 组;2:Wnt3a 处理组;3:Wnt3a + sFRP5 处理组

图5 Western blot 检测黑素细胞 TRP-1 和 TYR 蛋白的表达

3 讨论

Wnt 信号转导通路参与了多种生物学过程的调控,包括胚胎的生长和形态发育、组织的稳定、能量代谢的平衡以及干细胞的维持和分化调控,分为"Wnt 经典通路"和"Wnt 非经典通路"。在黑素细胞的发育过程中,Wnt 经典通路发挥重要的作用 β-catenin 的缺失导致神经脊向黑素细胞发育的失败,而 Wnt 经典信号的启动能促进神经脊细胞向黑素细胞的分化[6]。小鼠出生后毛囊中黑素干细胞的激活与分化同样受 Wnt 经典信号通路的调节,当毛囊从静止期晚期转入生长期早期时,黑素干细胞的活化依赖于 β-catenin 的入核发挥作用。我们前期的研究结果发现,经典通路中的 Wnt 信号分子 Wnt3a 和 Wnt10b 能促进黑素干细胞的分化[3,7]。然而,Wnt 信号的适度作用能保持黑素干细胞的正确分化、迁移等生物学行为,过度激活将导致分化异常、干细胞的耗竭或黑素瘤的产生[8-9]。通过原位表达的检测,我们也发现在体中存在经典通路的 Wnt 蛋白高表达,但 Wnt/β-catenin 通路并未激活的状态提示毛囊中存在 Wnt 经典通路的抑制机制,来保证黑素干细胞在正确的时空中进行激活和分化[3]。

为检测黑素细胞的分化,本实验以 iMC23 为细胞模型[5]。iMC23 是本实验室建立的类黑素干细胞,为

体外模型,分化程度低,分化标志物的表达偏低,正常培养下不产生黑素。运用这个细胞模型,能良好地检测 Wnt 信号通路对黑素细胞分化的作用。本实验中也检测到 Wnt3a 刺激后能明显增加黑素的形成,TYR 活性明显增加,各个分化指标也明显上调。

Wnt 信号的胞外调节主要依靠一些分泌性的配体蛋白,目前已知的这些分泌型蛋白主要包括两大家族:Dickkopf(DKKs)家族和 sFRPs 家族。在许多组织器官中,这两个家族的分子通过调节 Wnt 信号通路的作用来完成正确的发育、细胞转运及细胞凋亡等生命过程。Yamaguchi 等[10]发现 DKK1 能通过抑制 Wnt/β-catenin 经典通路,从而抑制正常人黑素细胞的生长和黑素形成的功能。有报道黑素干细胞自身高表达一些 Wnt 信号通路的抑制因子,如 Wif1、sFRP1、Dab2、Dkk4 等[11],然而具体的作用方式少见报道。本实验在前期工作检测到 sFRP5 在皮肤中的表达的基础上,为进一步检测其对黑素细胞的作用,以 Wnt3a 处理作为阳性对照,发现 sFRP5 可显著下调 Wnt3a 诱导的 TYR 活性,银染实验进一步发现 sFRP5 可明显抑制 Wnt3a 促进 iMC23 黑素干细胞产生黑素的作用,提示 sFRP5 能有效抑制黑素干细胞中的 Wnt3a 信号途径。

黑素合成过程是一个多步骤的酶促生化反应。在这个过程中,TYR 是唯一催化黑素合成的酶,黑素生成量与 TYR 活性相关,控制其活力即可控制黑素生成量。TRP-1 和 TRP-2 是两种 TYR 相关蛋白,TRP-1 是把 TYR 运输给黑素小体的关键酶,合成速率与黑素合成呈正相关。TRP-2 即多巴色素互变异构酶(dopachrome tautomerase,DCT),是黑素合成过程中的一个关键酶。在黑素干细胞的分化过程中,TYR 和 TRP-1 的表达从无到有,并逐渐升高,最终导致黑素细胞的分化成熟和产生黑素的能力[11-12]。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示 sFRP5 能够拮抗 Wnt3a 诱导的这些酶表达的升高,从而抑制黑素的生成,进一步揭示 sFRP5 能拮抗 Wnt3a 对黑素细胞的促进细胞分化的作用。

近来研究发现 sFRP5 表达下调可减弱对 Wnt 信号的抑制作用[13]。Mori 等[14]报道 sFRP5 通过抑制 Wnt 信号通路的活动而减低了脂肪细胞线粒体的新陈代谢。sFRPs 的分子结构和 Wnt 受体极为相似,均具有相同的半胱氨酸富集结构域,它们可通过竞争性结合受体而抑制 Wnt 信号通路,而目前的研究发现 sFRPs 的功能可能更复杂[15]。Bovolenta 等[16]认为 sFRPs 家族对 Wnt 信号通路并不是简单的抑制作用,它们可能通过 4 条途径来调节 Wnt 信号:①sFRPs 通过 CRD 和 Wnt 结合抑制 Wnt 信号;②sFRPs 与 Frizzled 受体结合,形成无功能的复合体而抑制 Wnt 信号;③sFRPs 之间相互作用形成二聚体,促进 Wnt 信号;④某些 sFRPs 还可以通过转运 Wnt 蛋白至 Frizzled 或直接结合 Frizzled,从而促进 Wnt 信号的转导。

本研究表明,sFRP5 抑制了 Wnt3a 在黑素细胞中促进黑素形成的作用,但是 sFRP5 在体内如何调节 Wnt 经典通路对黑素细胞的作用,需进一步研究。

参考文献:

[1] Osawa M. Melanocyte stem cells[M]//StemBook. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute, 2009: 1-23.
[2] Rabbani P, Takeo M, Chou W, *et al*. Coordinated activation of Wnt in epithelial and melanocyte stem cells initiates pigmented hair regeneration[J]. Cell, 2011, 145(6): 941-955.
[3] Guo H, Yang K, Deng F, *et al*. Wnt3a promotes melanin synthesis of mouse hair follicle melanocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 420(4): 799-804.
[4] Cruciat C M, Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(3): a015081.
[5] Yang K, Chen J, Jiang W, *et al*. Conditional immortalization establishes a repertoire of mouse melanocyte progenitors with distinct melanogenic differentiation potential[J]. J Invest Dermatol, 2012, 132(10): 2479-2483.
[6] 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 U S A, 2000, 97(18): 10050-10055.
[7] Ye J, Yang T, Guo H, *et al*. Wnt10b promotes differentiation of mouse hair follicle melanocytes[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(6): 691-698.
[8] Nishimura E K, Granter S R, Fisher D E. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche[J]. Science, 2005, 307(5710): 720-724.
[9] Sinnberg T, Menzel M, Ewerth D, *et al*. β-Catenin signal increase during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23429.
[10] Yamaguchi Y, Morita A, Maeda A, *et al*. Regulation of skin pigmentation and thickness by Dickkopf 1 (DKK1)[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 2009, 14(1): 73-75.
[11] Nishikawa S, Osawa M. Generating quiescent stem cells[J]. Pigment Cell Res, 2007, 20(4): 263-270.
[12] Dorsky R I, Raible D W, Moon R T. Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway[J]. Genes Dev, 2000, 14(2): 158-162.
[13] Osawa M, Egawa G, Mak S S, *et al*. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche[J]. Development, 2005, 132(24): 5589-5599.
[14] Mori H, Prestwich T C, Reid M A, *et al*. Secreted frizzled-related protein 5 suppresses adipocyte mitochondrial metabolism through WNT inhibition[J]. J Clin Invest, 2012, 122(7): 2405-2416.
[15] Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, *et al*. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity[J]. Science, 2010, 329(5990): 454-457.
[16] Bovolenta P, Esteve P, Ruiz J M, *et al*. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 6): 737-746.

(**收稿**:2013-08-18;**修回**:2013-09-12)
(编辑 张 维)