DOI:10.16016/j.1000-5404.202101238

基于高通量测序对白癜风黑素细胞的综合生物信息学分析

蒲以欢[1],陈阳美[1],陈雪诺[2],张灵婴[1],陈佳怡[1],高天文[3],陈 瑾[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:皮肤科[1],消化内科[2];710032 西安,空军军医大学西京医院皮肤科[3]

[**摘要**] **目的** 筛选人类白癜风黑素细胞中差异表达的编码和非编码 RNAs,分析它们之间相互作用并对鉴定出的重要 RNAs 进行表达量验证,以探讨其在白癜风发病过程中可能扮演的角色。**方法** 对人类白癜风黑素细胞株和正常黑素细胞株进行高通量测序,用 R 软件进行差异表达(differentially expressed, DE)分析,利用互作基因的检索工具 STRING 构建蛋白相互作用网络(protein-protein interaction, PPI),用生物信息学算法 miRanda 鉴定 miRNA-mRNA 和 miRNA-lncRNA 的相互作用环。并用 Cytoscape 软件构建 CeRNA 网络,运用 DAVID 数据库对筛选获得的 DE mRNAs 进行功能富集和通路分析,最后对鉴定的关键 RNAs 进行 RT-qPCR 验证。**结果** 差异表达分析共筛选出 5 958 个 DE mRNAs,1650 个 DE LncRNAs 和 450 个 DE miRNAs。PPI 网络中 top10 枢纽基因(JUN,HIST2H3PS2,SOX2,EGR1,MMP9,NGF,BMP2,HSPA5,EDN1,SERPINE1)显示与白癜风发病密切相关。本研究还挖掘了与 top20 枢纽基因有相互作用的 LncRNAs,通过取它们的交集鉴定出 7 个关键 LncRNAs,其中分子功能和信号通路富集最丰富的 3 个 LncRNAs(ENST0000623111、NONHSAT245258.1 和 NONHSAT189782.1)被分别构建了竞争性内源性 RNA(CeRNA)子网络,CeRNA 子网络中预测的 hsa-miR-92b-5p 在白癜风黑素细胞中的表达有显著差异。另外,RT-qPCR 结果与我们分析结果基本一致。**结论** 本研究经过层层鉴定及筛选出的枢纽基因以及关键的 ncRNAs 可能在白癜风发病中发挥重要作用,这些发现可能为白癜风的研究提供了新的见解和策略。

[**关键词**] 白癜风黑素细胞;高通量测序;ncRNA;PPI;CeRNA

[**中图法分类号**] R318.04; R394.3; R758.41 [**文献标志码**] A

Comprehensive bioinformatics analysis of vitiligo melanocytes based on high-throughput sequencing

PU Yihuan[1], CHEN Yangmei[1], CHEN Xuenuo[2], ZHANG Lingzhao[1], CHEN Jiayi[1], GAO Tianwen[3], CHEN Jin[1]

[1]Department of Dermatology, [2]Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Dermatology, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China

[**Abstract**] **Objective** To screen the differentially expressed (DE) coding and non-coding RNAs in human vitiligo melanocytes and analyze their interactions and verify the expression of the identified key RNAs in order to explore their possible role in the pathogenesis of vitiligo. **Methods** High throughput sequencing was performed on human vitiligo melanocyte lines and normal human melanocyte lines. DE analysis was performed by R software. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by using the search tool STRING. The interaction loop of miRNA-mRNA and miRNA-lncRNA was identified by bioinformatics algorithm miRanda. The competitive endogenous RNA (CeRNA) network was constructed by Cytoscape

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81773307);重庆市科委前沿与应用基础研究计划一般项目(cstc2018jcyjAX0195)

[**通信作者**] 陈 瑾, E-mail:chenjin771010@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

software, and the functional enrichment and pathway analysis of DE mRNAs were performed by David database. Finally, the identified key RNAs were verified by Q-PCR. **Results** A total of 5 958 DE mRNAs, 1 650 DE lncRNAs and 450 DE miRNAs were screened out by DE analysis. The top10 hub genes (JUN, HIST2H3PS2, SOX2, EGR1, MMP9, NGF, BMP2, HSPA5, EDN1 and SERPINE1) in the PPI network are indicated closely related to the pathogenesis of vitiligo. Furthermore, 7 key lncRNAs that interact with top 20 hub genes are found. Among them, 3 lncRNAs (ENST0000623111, NONHSAT245258.1 and NONHSAT189782.1) with the most abundant molecular functions and signaling pathways were constructed into CeRNA subnetwork, and the expression of hsa-miR-92b-5p predicted in the CeRNA sub-network is significantly different in vitiligo melanocytes. In addition, the results of Q-PCR were basically consistent with our analysis. **Conclusion** The identified hub genes and non-coding RNAs in our study may play important roles in the pathogenesis of vitiligo. Our findings provide novel insights and strategies for researches on vitiligo.

[**Key words**] vitiligo melanocyte; high-throughput sequencing; non-coding RNA; protein-protein interaction; competitive endogenous RNA

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81773307) and the General Project of Frontier and Application Basic Research Plan of Chongqing Science and Technology Commission (cstc2018jcyjAX0195). Correspondence author: CHEN Jin, E-mail: chenjin771010@163.com

白癜风是一种常见的皮肤色素脱失性疾病,严重影响患者的身心健康。黑素细胞的自我破坏和神秘消失是白癜风的发病特征。白癜风黑素细胞的破坏由一系列复杂的因素介导,一方面,多种内源性因素导致黑素细胞内活性氧(reactive oxygen free radicals,ROS)过量产生和积累,ROS 通过黑素细胞功能障碍的相关途径参与黑素细胞的破坏。另一方面,外源性刺激,如紫外线辐射、细胞毒性化学物质、创伤、感染和药物应用等导致黑素细胞过度产生 ROS 并释放黑素体相关抗原,诱导 CD8+T 细胞聚集,进而导致表皮黑素细胞的最终破坏[1]。

一些非编码 RNAs(ncRNAs),包括 microRNA(miRNAs)、长非编码 RNA(LncRNAs)和环状 RNA(circRNAs),可以在转录水平上调控基因转化为功能蛋白。研究显示,miRNAs 在白癜风发病中扮演重要作用。例如,血清 miRNAs 可以作为白癜风的血清生物标志物;氧化应激诱导 miR-25 过度表达促进黑素细胞变性;白癜风患者血清 miRNAs 调控的基因网络与氧化应激、自身免疫和内质网应激有关[2-3]。一项对小鼠不同发育阶段黑素细胞测序的研究中,研究人员通过构建 CeRNA 网络初步揭示了与皮肤和黑素细胞发育相关的 ncRNA 和 mRNAs 之间的复杂相互作用[4]。ncRNA 在白癜风中的作用还未被广泛研究,其机制尚不清楚。在本研究中,我们对人类白癜风黑素细胞株 PIG3V[5]和正常黑素细胞株 PIG1[6]在 Illumina NovaSeq 6000 平台(美国 Illumina)上进行高通量测序,然后进行了全面的生物信息学分析,预测差异表达 RNA 之间的相互作用,旨在为白癜风的发病机制提供新见解。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

将人白癜风黑素细胞株 PIG3V 和人正常黑素细胞株 PIG1[7](均由空军军医大学西京医院李春英博士赠予)在添加 5%胎牛血清和青霉素链霉素的人黑素细胞生长培养基 254 中,于 37 ℃,5%CO_2 培养箱中培养。

1.2 RNA 的分离纯化

使用 RNeasy Mini Kit(Qiagen,德国)或 miRNeasy Mini Kit(50)217004(Qiagen,德国)分离总 RNA,然后使用 Qubit© 2.0 荧光计(Life Technologies,美国)和 NanoDrop One 分光光度计(Thermo Fisher Scientific,Inc.,美国)测量 RNA 浓度和质量。使用安捷伦 2100 生物分析仪(安捷伦科技公司,美国)评估总 RNA 的完整性,并使用 RNA 完整性数(RIN)值大于 7.0 的样品进行测序。一微克 RNA 被用作 RNA 样品制备的输入材料。

1.3 高通量测序

根据制造商的说明,使用 VAHTS 总 RNA-Seq(H/M/R)文库制备试剂盒(Vazyme,中国)构建 RNA-Seq 链特异性文库。miRNA-seq 文库的构建和测序由中国上海鲸舟基因科技有限公司完成,产物经 PCR 纯化和富集得到最终的 cDNA 文库。使用 QIAseq miRNA 文库试剂盒(Qaigen,德国)合成成对文库。纯化的文库

在 Qubit© 2.0 荧光计和安捷伦 2100 生物分析仪上进行定量和验证,以确认插入物大小并计算摩尔浓度。将文库稀释至 10 μm 后,通过 cBot 产生簇,然后在 Illumina NovaSeq 6000 平台(美国 Illumina)和 Illumina Hiseq Xten(美国 Illumina)上测序。

1.4 差异表达分析

使用 R 软件包 edgeR 对 mRNAs/lncRNAs 进行差异表达分析。log2(FC)值>1 和 q<0.05 的 mRNAs/lncRNAs 被认为有显著差异表达。使用 DESeq 软件进行 miRNAs 的差异表达分析。log2(FC)值>1 和 $P<0.05$ 的差异表达的 miRNAs 被认为显著差异表达。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

RT-qPCR 检测 lncRNAs、miRNAs 和 mRNAs 的表达。本研究中使用的引物序列如表 1 所示。根据制造商的说明,使用 PrimeScript RT 试剂盒(Perfect Real Time;TaKaRa,Osaka,Japan)将样本中的总 RNA 反转录得到 cDNA,然后使用 2×SYBR Green qPCR Master Mix(Bimake)试剂盒在 Bio-Rad CFX Manager 实时 PCR 系统上对 cDNA 进行分析。每个 RT-qPCR 分析包括三个技术重复。

1.6 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

利用互作基因的检索工具(STRING,11.0 版)构建差异表达 mRNAs(DE-mRNAs)的 PPI 网络。然后,使用 Cytoscape 软件(版本 3.7.2)可视化 PPI 网络。同时,利用 Cytoscape 的分子复合物检测(MCODE,version 1.5.1)插件筛选 PPI 网络中最重要的功能模块。

1.7 lncRNA-miRNA-mRNA 网络分析

构建 lncRNA-miRNA-mRNA(CeRNA)网络用以确定所选 mRNAs 与其他 lncRNAs 或 miRNAs 之间的相互作用。用生物信息学算法 miRanda 鉴定 miRNA-mRNA 和 miRNA-lncRNA 的相互作用环。使用 Cytoscape 软件(版本 3.7.2)可视化 top500 的 lncRNA-miRNA-mRNA(CeRNA)网络。最后,提取与 top20 枢纽基因有相互作用关系的 lncRNAs,用这些 LncRNAs 取交集并获得 7 个关键 lncRNAs。为进一步探索这些关键 LncRNAs 的相互作用机制,我们以这 7 个关键 LncRNAs 为主体预测了 3 个 CeRNA 子网络,并用 enrich R 包对子网络中的 mRNAs 进行了 GO 和 KEGG 通路分析(http://www.genome.ad.jp/kegg)。

1.8 统计分析

用 Graph-Pad-Prism 8.0.2 软件进行 Student t 检验,计算 RT-qPCR 分析各参数差异的统计学意义。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。$P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 高通量测序结果

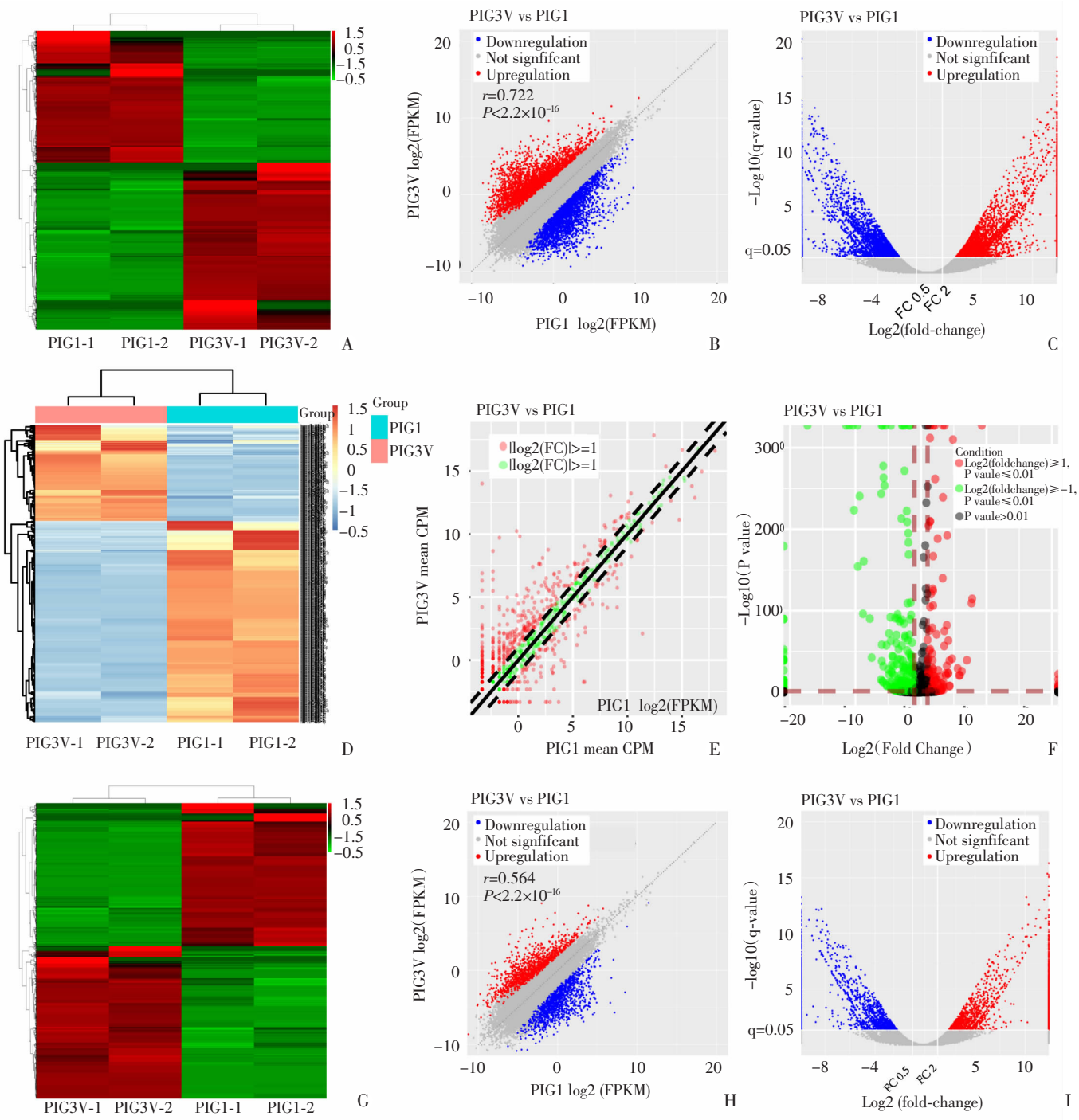
根据微阵列表达谱数据,与对照组相比,白癜风黑素细胞共检测到 3 338 个上调的 mRNAs(56.03%),2 620 个下调的 mRNAs(43.97%)。DE mRNAs 的 F 表达模式的二维层次聚类特征在热图中呈现(图 1A)。散点图和火山图用于评估两组之间的 mRNA 表达差异(图 1B、C)。同样,与对照组相比,白癜风黑素细胞中共鉴定出 1 650 个 DE LncRNAs 和 450 个 DE miRNAs。DE LncRNAs 和 DE miRNAs 的 F 表达模式的二维层次聚类特征在热图中呈现(图 1D、G)。使用散点图和火山图评估两组之间的 LncRNAs 和 miRNAs 表达变化(图 1E、F、H、I)。前 10 位上调和下调的 LncRNAs、mRNAs 和 miRNAs 如表 2 所示。

2.2 PPI 网络构建

根据 STRING 数据库中的信息,DEGs 的 PPI 网络包含 382 个节点和 3 647 个连接。在相应的核心基因列表中,排名前 10 位的高级枢纽节点包括 Jun 原癌基因(JUN),H3.2 组蛋白(HIST2H3PS2),SRY-box 转录因子 2(SOX2),早期生长应答因子 1(EGR1),基质金属肽酶 9(MMP9),神经生长因子(NGF),骨形态发生蛋白 2(BMP2),热休克蛋白(HSP)家族 A(HSP70)成员 5(HSPA5),内皮素 1(EDN1)和丝氨酸蛋白酶抑制剂家族 E 成员 1(SERPINE1)。在这些基因中,JUN 的连接程度最高,为 128。我们调查并可视化了前 50 个高度集线器节点(图 2A)。用 RT-qPCR 验证了前 10 个枢纽基因的表达,结果与测序结果基本一致(图 2B)。为了深入了解 PPI 网络中互作蛋白质参与的主要生物过程,我们用 MCODE 对 PPI 网络进行了功能模块的筛选,并可视化了前三个重要模块(图 2C~E)。

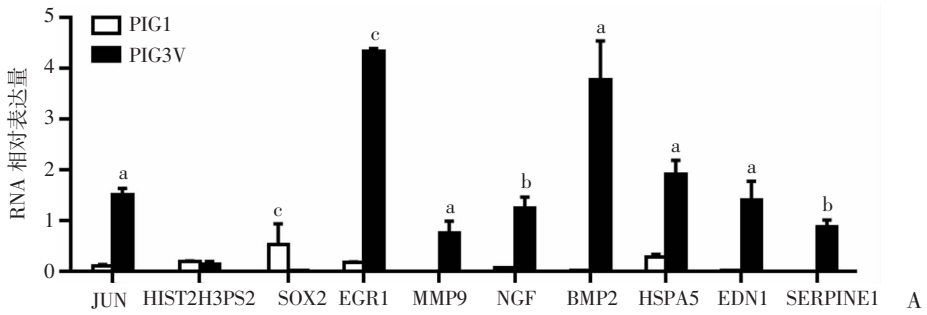
2.3 CeRNA 网络的构建

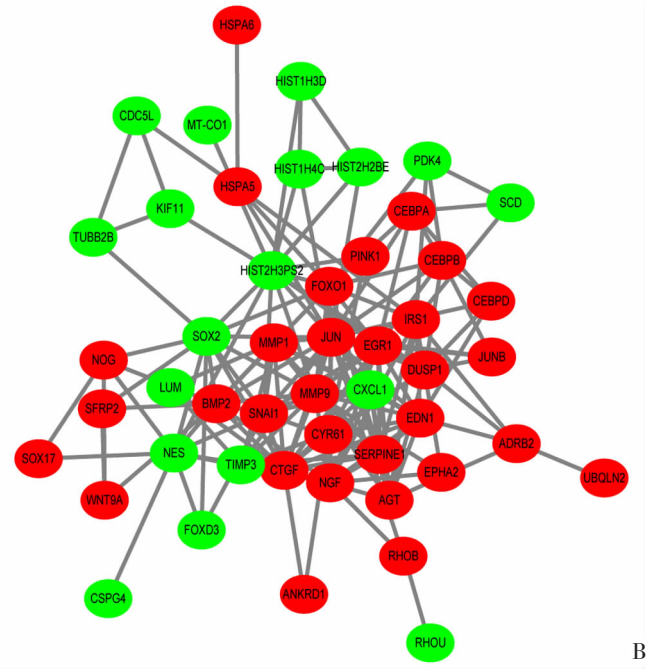
miRNA-mRNA 调控环有 163 个 DE-mRNAs 和 14 个特异性 miRNAs。lncRNA-miRNA 调控环有 94 个 DE-LncRNAs 和 14 个特异性 miRNA。然后,通过整合 DE lncRNA-miRNA 和 DE mRNA-DE miRNA 的关系,我们得到 top500 的 CeRNA 网络(图 3A)。另外,我们筛选的 7 个关键 LncRNAs,分别为 ENST00000623111,NONHSAT 252922.1,NONHSAT245258.1,NONHSAT 017317.2,NONHSAT239778.1,NONHSAT189782.1,and NONHSAT 243639.1 和 1 个关键的 miRNA 即 hsa-miR-92b-5p,并对它们进行了 RT-qPCR 验证,验证结果大致符合预期(图 3B)。

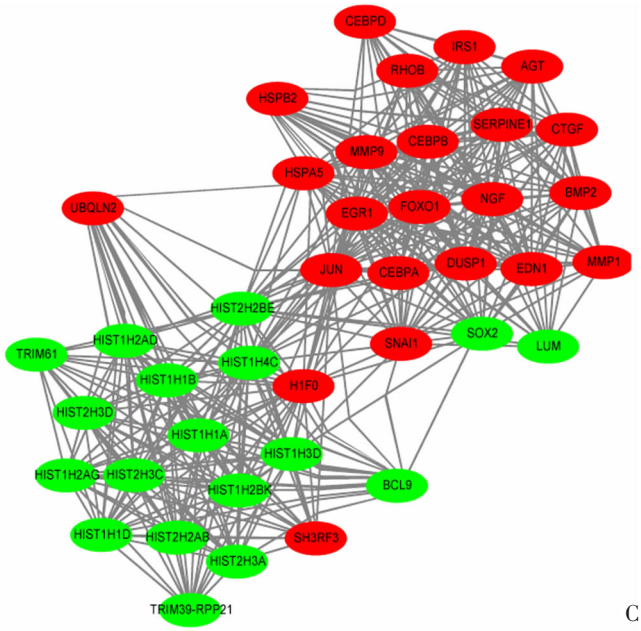


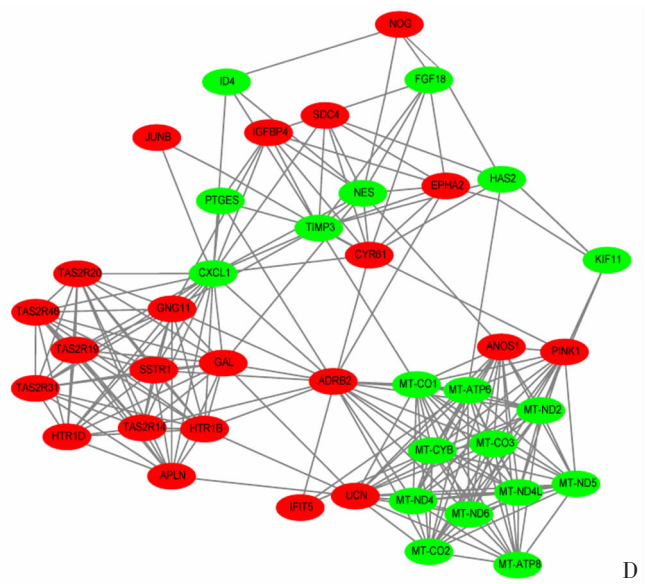
A:鉴定的差异表达 mRNAs 的热图; B: 鉴定的差异表达 mRNAs 的散点图; C:鉴定的差异表达 mRNAs 的火山图; D:鉴定的差异表达 LncRNAs 的热图,E: 鉴定的差异表达 LncRNAs 的散点图;F:鉴定的差异表达 LncRNAs 的火山图;G:鉴定的差异表达 miRNAs 的热图;H: 鉴定的差异表达 miRNAs 的散点图和; I:鉴定的差异表达 miRNAs 的火山图

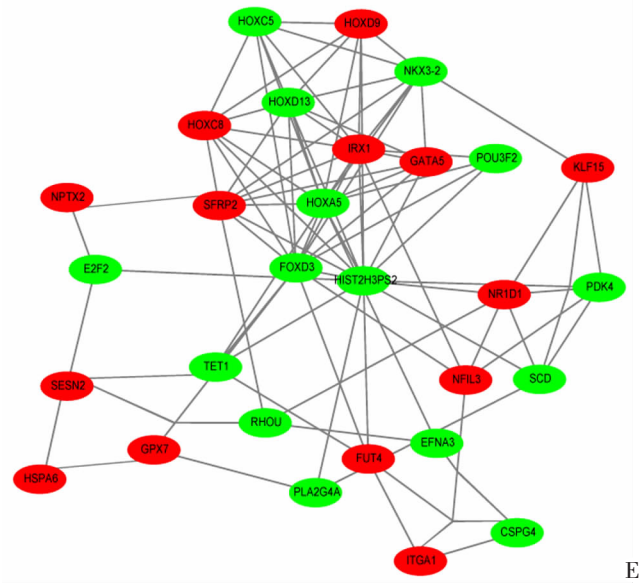
图 1　白癜风黑素细胞的微阵列表达谱分析结果





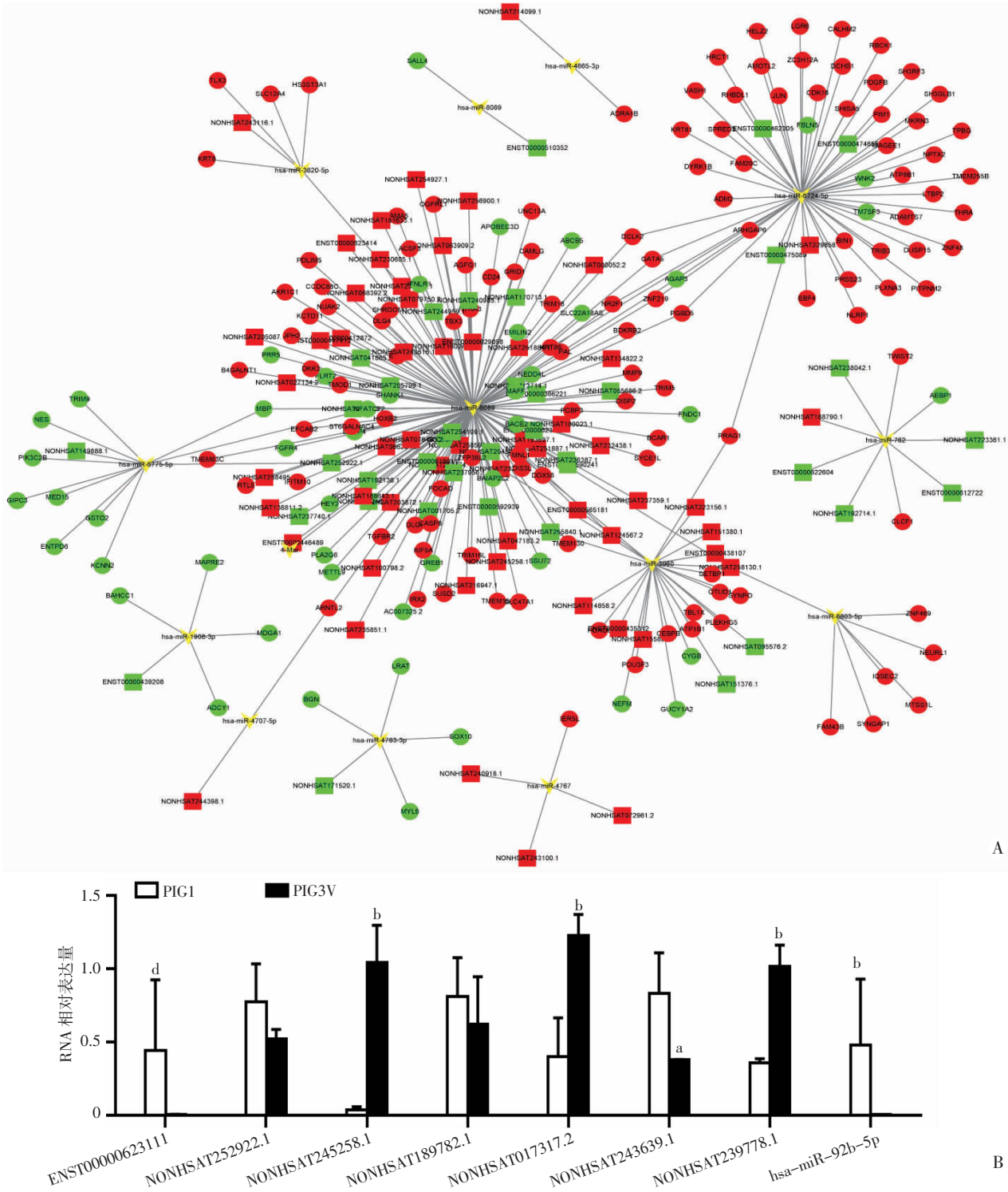






A：Top10 枢纽基因的 qPCR 验证结果($\bar{x}\pm s$)；a：$P<0.01$，b：$P<0.001$，c：$P<0.000\ 1$，与 PIG1 比较；B:Top50 的蛋白-蛋白相互作用网络；C~E 分别为来自蛋白-蛋白相互作用网络的前三个重要功能模组 module1,module2,module3;红色和绿色分别表示上调下调的 DEG

图 2　蛋白-蛋白相互作用网络、枢纽基因的 qPCR 验证结果及重要的功能模组



A:ceRNA 网络构建图,四边形代表 lncRNAs,箭头代表 miRNAs,圆形代表 mRNAs,红色代表上调,绿色代表下调;B:lncRNAs 和 miRNAs 的 qPCR 验证结果($\bar{x}\pm s$);a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,d:$P<0.0001$,与 PIG1 比较

图 3 CeRNA 网络和 lncRNAs、miRNAs 的 qPCR 验证结果

2.4 CeRNA 子网络的预测及富集

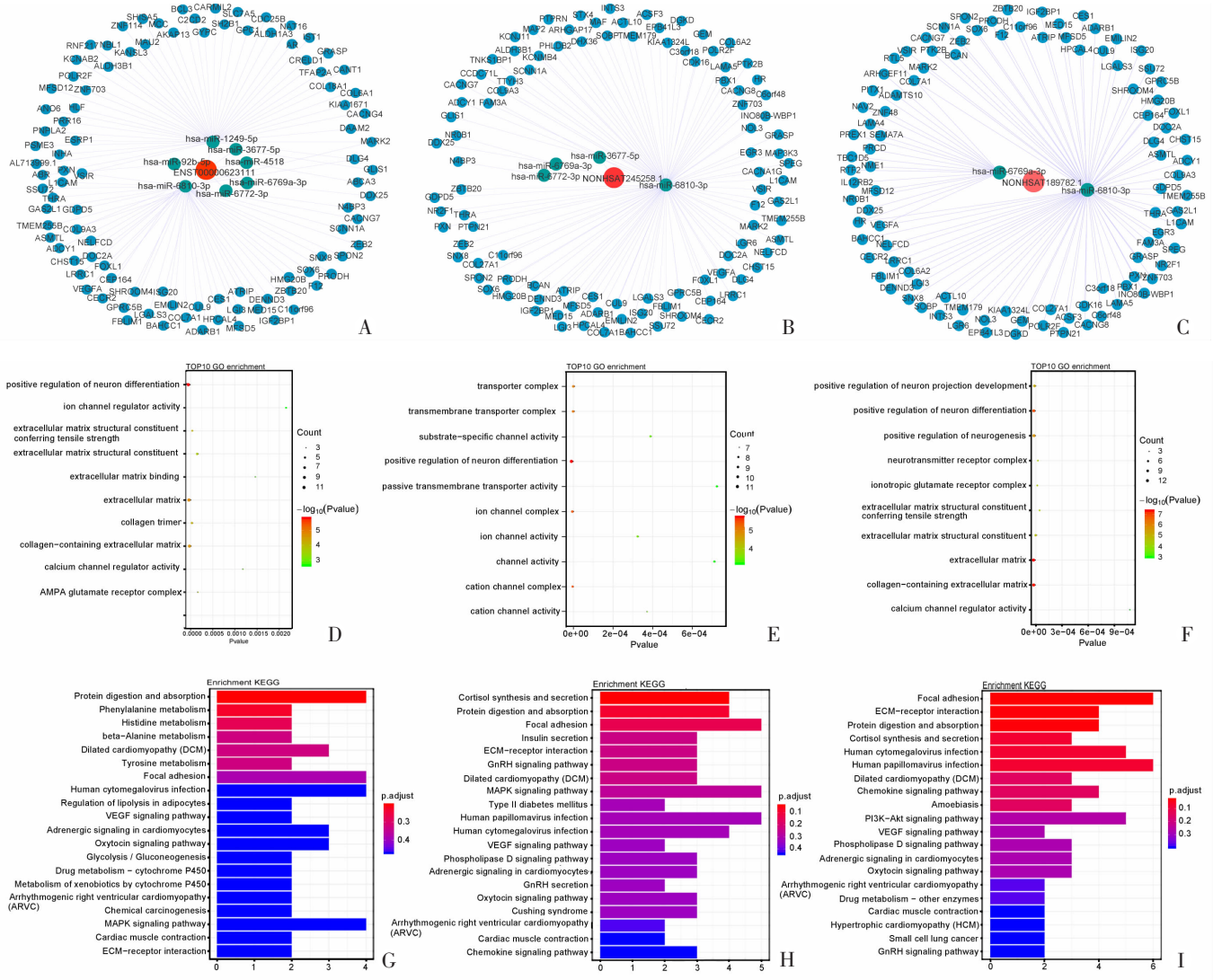
为了更深入挖掘 LncRNA -miRNA-mRNA 之间的“对话”机制,我们对 7 个关键 LncRNAs 均进行了富集,通过对富集的结果分析,最后筛选出分子功能和信号通路富集最丰富的 3 个 LncRNAs(ENST0000623111、NONHSAT245258.1 和 NONHSAT189782.1)并可视化其对应的 CeRNA 子网络(图 4A、B、C)。针对 CeRNA 子网络中的编码基因,我们分别从 GO 和 KEGG 富集来了解它们的功能。从富集的注释结果来看,这些基因对应的分子功能主要参与神经元分化的正调控、离

子通道调节器活性、含胶原的细胞外基质、局灶黏附过程(图 4D~F)。对应的信号通路在 VEGF 信号通路、ECM-受体相互作用、MAPK 信号通路和 P13K-Akt 信号等高度富集(图 4G~I)。

3 讨论

白癜风的发病机制主要包括天然免疫的激活、炎症体的激活、氧化应激和黑素细胞粘附的丧失[8],与白癜风发病相关的信号通路包括 Wnt/β-catenin 信号通路、Nrf2 信号通路、PI3K-Akt 信号通路,JAK-STAT 信号通路[7,9-11]。与白癜风发病相关的分子则更为广泛。

在我们构建的 PPI 网络中,top10 枢纽基因中的 JUN、HIST2H3PS2、SOX2 和 EGR1 编码核蛋白,它们大多在基因的转录水平对其进行调控。其中,JUN 是 AP-1 转录因子,被报道参与白癜风患者氧化应激和黑素生成的调节[12-13]。SOX2 编码的蛋白被报道可能是参与黑素细胞发育过程的转录因子[14]。EGR1-STAT3 轴被证明调节黑素细胞中 α-黑素细胞刺激素诱导的酪氨酸酶基因的转录[15]。另外,其他一些枢纽基因在白癜风相关的研究中也被报道过,其中的 HSPA5 是 HSP70 家族的成员,突变 HSP70 被证明可以逆转白癜风患者自身免疫脱色[16-17]。BMP2 被证明与色素沉着过程有关,它降低了表皮黑素细胞中酪氨酸酶的表达和活性[18]。MMP9 被证明可以调节黑素细胞的迁移[19]。此外,EDN1、SERPINE1 和 NGF 也被提出参与白癜风的发生发展[20-22],但具体机制需要进一步研究。综上所述,这些枢纽基因可能对白癜风黑素细胞的功能有重要影响。



A~C 分别为 3 个 CeRNA 子网络,红色代表 lncRNA,绿色代表 miRNA,蓝色代表 mRNA;D~F:对应于 3 个 CeRNA 子网的 top10 GO 富集结果;G~I:对应于 3 个 CeRNA 子网的 top20 KEGG 富集结果

图 4 3 个 CeRNA 子网络及其相应的 GO 和 KEGG 富集分析

既往报道中,关于 ncRNAs 在白癜风发生发展中的作用研究相对较少。近年来的积累证据表明,lncRNAs 在各种疾病中广泛表达并在基因调控中起关键作用[23]。本研究也观察到一些 LncRNAs 在白癜风黑素细胞中差异表达显著。我们预测了 3 个候选 LncRNAs(ENST0000623111,NONHSAT245258.1,NONHSAT189782.1),在其对应的 CeRNA 子网络中,hsa-miR-92b-5 的表达量显著降低,并且与网络中的多个基因有相互作用。先前有少数研究证实 hsa-miR-92b-5p 在非综合征性单纯腭裂患者中表达下调[24],以及在房颤患者中表达明显改变[25],这些证据表明 hsa-miR-92b-5p 在白癜风黑素细胞中可能是有潜力的调控因子。另外,GO 分析显示,CeRNA 子网络中的编码基因参与了白癜风发病的重要途径,如参与细胞外基质(ECM)的形成过程,白癜风的色素沉着需要依赖于此过程[26];如影响钙离子通道的功能,通过影响线粒体钙的累积在氧化应激诱导的黑素细胞凋亡中起关键作用[27]。KEGG 富集分析还显示,上述基因在 MAPK 信号转导途径、EMC 受体相互作用,VEGF 信号转导途径和粘附等过程中高度富集,其中 MAPK 信号都被研究证明参与调控黑素细胞的生存[28],粘着斑,VEGF 信号转导途径和 EMC 受体信号也都被报道参与了白癜风发病过程[29-31]。这些结果为白癜风研究提供了理论支持,即 lncRNAs、miRNAs 可能在白癜风黑素细胞神秘消失涉及的生物过程和信号转导中扮演重要作用。

综上所述,本研究筛选的 Hub 基因及 ncRNAs 可能为白癜风的发病机制提供新见解。同时,基于本课题研究方法可操作性以及生物信息学技术的科学性,可以为研究者提供新的研究思路和理论支持。除此之外,研究的样本相对较少给本研究带来了一定的局限性,在更深入的功能探索研究中,需要加大样本量以进一步验证 ncRNA 在白癜风中的重要作用。

参考文献:

[1] WANG Y, LI S, LI C. Perspectives of new advances in the pathogenesis of vitiligo: from oxidative stress to autoimmunity[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 1017-1023. DOI: 10.12659/msm.914898.

[2] SHANG Z, LI H. Altered expression of four miRNA (miR-1238-3p, miR-202-3p, miR-630 and miR-766-3p) and their potential targets in peripheral blood from vitiligo patients[J]. J Dermatol, 2017, 44(10): 1138-1144. DOI: 10.1111/1346-8138.13886.

[3] VAISH U, KUMAR A A, VARSHNEY S, *et al*. Micro RNAs upregulated in vitiligo skin play an important role in its aetiopathogenesis by altering TRP1 expression and keratinocyte-melanocytes cross-talk[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10079. DOI: 10.1038/s41598-019-46529-6.

[4] ZHU Z W, MA Y Y, LI Y, *et al*. The comprehensive detection of miRNA, lncRNA, and circRNA in regulation of mouse melanocyte and skin development[J]. Biol Res, 2020, 53(1): 4. DOI: 10.1186/s40659-020-0272-1.

[5] LE POOLE I C, BOISSY R E, SARANGARAJAN R, *et al*. PIG3V, an immortalized human vitiligo melanocyte cell line, expresses dilated endoplasmic reticulum[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 2000, 36(5): 309-319. DOI: 10.1290/1071-2690(2000)0360309: paihvm>2.0.co;2.

[6] 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 E7genes[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 1997, 33(1): 42-49. DOI: 10.1007/s11626-997-0021-6.

[7] MA J, LI S, ZHU L, *et al*. Baicalein protects human vitiligo melanocytes from oxidative stress through activation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 129: 492-503. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.421.

[8] SPEECKAERT R, VAN GEEL N. Vitiligo: an update on pathophysiology and treatment options[J]. Am J Clin Dermatol, 2017, 18(6): 733-744. DOI: 10.1007/s40257-017-0298-5.

[9] KIM N H, LEE A Y. Reduced aquaporin 3 expression and survival of keratinocytes in the depigmented epidermis of vitiligo[J]. J Invest Dermatol, 2010, 130(9): 2231-2239. DOI: 10.1038/jid.2010.99.

[10] MONTILLA A M, GÓMEZ-GARCÍA F, GÓMEZ-ARIAS P J, *et al*. Scoping review on the use of drugs targeting JAK/STAT pathway in atopic dermatitis, vitiligo, and alopecia areata[J]. Dermatol Ther (Heidelb), 2019, 9(4): 655-683. DOI: 10.1007/s13555-019-00329-y.

[11] SASTRY K S, NAEEM H, MOKRAB Y, *et al*. RNA-seq reveals dysregulation of novel melanocyte genes upon oxidative stress: implications in vitiligo pathogenesis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 2841814. DOI: 10.1155/2019/2841814.

[12] KIM Y M, CHO S E, KIM S C, *et al*. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on melanogenesis through p-ERK and p-SAPK/JNK pathways in human melanocytes[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 1-16. DOI: 10.3390/ijms18102120.

[13] LIN M, LU SS, WANG A X, *et al*. Apigenin attenuates dopamine-induced apoptosis in melanocytes via oxidative stress-related p38, c-Jun NH2-terminal kinase and Akt sig-

naling[J]. J Dermatol Sci, 2011, 63(1): 10-16. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.03.007.

[14] LAGA A C, LAI C Y, ZHAN Q, *et al*. Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and merkel cell biology[J]. Am J Pathol, 2010, 176(2): 903-913. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090495.

[15] SHIN S Y, CHOI J H, JUNG E, *et al*. The EGR1-STAT3 transcription factor axis regulates α-melanocyte-stimulating hormone-inducedtyrosinase gene transcription in melanocytes [J]. J Investig Dermatol, 2019, 139(7): 1616-1619. DOI: 10.1016/j.jid.2018.12.020.

[16] JACQUEMIN C, RAMBERT J, GUILLET S, *et al*. Heat shock protein 70 potentiates interferon alpha production by plasmacytoid dendritic cells: relevance for cutaneous lupus and vitiligo pathogenesis[J]. Br J Dermatol, 2017, 177(5): 1367-1375. DOI: 10.1111/bjd.15550.

[17] MOSENSON J A, ZLOZA A, NIELAND J D, *et al*. Mutant HSP70 reverses autoimmune depigmentation in vitiligo[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(174): 174ra28. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005127.

[18] SINGH S K, ABBAS W A, TOBIN D J. Bone morphogenetic proteins differentially regulate pigmentation in human skin cells[J]. J Cell Sci, 2012, 125(pt 18): 4306-4319. DOI: 10.1242/jcs.102038.

[19] SU M Y, MIAO F, JIANG S, *et al*. Role of the p53-TRPM1/miR-211-MMP9 axis in UVB-induced human melanocyte migration and its potential in repigmentation[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(4): 1017-1026. DOI: 10.3892/ijmm.2020.4478.

[20] VIDAL YUCHA S E, TAMAMOTO K A, KAPLAN D L. The importance of the neuro-immuno-cutaneous system on human skin equivalent design[J]. Cell Prolif, 2019, 52(6): e12677. DOI: 10.1111/cpr.12677.

[21] AGIRBASLI M, EREN M, YASAR S, *et al*. Functionally stable plasminogen activator inhibitor-1 in a family with cardiovascular disease and vitiligo[J]. J Thromb Thrombolysis, 2014, 38(1): 50-56. DOI: 10.1007/s11239-013-1021-x.

[22] LAN C C, KO Y C, TU H P, *et al*. Association study between keratinocyte-derived growth factor gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo vulgaris in a Taiwanese population: potential involvement of stem cell factor[J]. Br J Dermatol, 2009, 160(6): 1180-1187. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2009.09064.x.

[23] STATELLO L, GUO C J, CHEN L L, *et al*. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2): 96-118. DOI: 10.1038/s41580-020-00315-9.

[24] SCHOEN C, GLENNON J C, ABGHARI S, *et al*. Differential microRNA expression in cultured palatal fibroblasts from infants with cleft palate and controls[J]. Eur J Orthod, 2018, 40(1): 90-96. DOI: 10.1093/ejo/cjx034.

[25] HOFFMANN S, CLAUSS S, BERGER I M, *et al*. Coding and non-coding variants in the SHOX2 gene in patients with early-onset atrial fibrillation[J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(3): 36. DOI: 10.1007/s00395-016-0557-2.

[26] SRIVASTAVA N, BISHNOI A, MEHTA S, *et al*. Aberrant ETS-1signalling impedes the expression of cell adhesion molecules and matrix metalloproteinases in non-segmental vitiligo[J]. Exp Dermatol, 2020, 29(6): 539-547. DOI: 10.1111/exd.14107.

[27] KANG P, ZHANG W, CHEN X, *et al*. TRPM2 mediates mitochondria-dependent apoptosis of melanocytes under oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 126: 259-268. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.022.

[28] SASTRY K S, IBRAHIM W N, CHOUCHANE A I. Multiple signaling pathways converge on proapoptotic protein BAD to promote survival of melanocytes[J]. Faseb J, 2020, 34(11): 14602-14614. DOI: 10.1096/fj.202001260rr.

[29] WANG P, LI Y, NIE H, *et al*. The changes of gene expression profiling between segmental vitiligo, generalized vitiligo and healthy individual[J]. J Dermatol Sci, 2016, 84(1): 40-49. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.07.006.

[30] ALMASI-NASRABADI M, AMOLI M M, ROBATI R M, *et al*. Is the+405 G/C single nucleotide polymorphism of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene associated with late-onset vitiligo? [J]. Int J Immunogenet, 2019, 46(4): 241-246. DOI: 10.1111/iji.12432.

[31] IVANOVA K, LAMBERS B, VAN DEN WIJNGAARD R, *et al*. Immortalization of human melanocytes does not alter the de novo properties of nitric oxide to induce cell detachment from extra cellular matrix components via cGMP[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 2008, 44(8/9): 385-395. DOI: 10.1007/s11626-008-9113-1.

(收稿:2021-01-27;修回:2021-04-27)

(编辑 邓强庭)