

小眼畸形相关转录因子转录调控与 白癜风临床类型的相关性研究

倪亚杰 王 平 洪为松 章 莉 郑俊惠

摘 要 **目的** 研究小眼畸形相关转录因子(MITF)及其转录调控的酪氨酸酶相关蛋白(TRPs)与白癜风临床类型的相关性。**方法** 选择非节段型白癜风(NSV)17例和节段型白癜风(SV)13例,对所有病例均取白斑区、远离白斑正常肤色区的表皮片,首先应用免疫组织化学方法原位检测黑素细胞的 MITF 及其主要转录调控分子酪氨酸酶(TYR)、酪氨酸酶相关蛋白1(TYRP1)和酪氨酸酶相关蛋白2(TYRP2)的表达情况,并对所有30例远离白斑正常肤色区的表皮黑素细胞进行培养,应用免疫印迹方法检测培养的黑素细胞 MITF 及 TYR、TYRP1 和 TYRP2 的表达情况。**结果** (1)原位表达结果:白斑区:所有病例 MITF 及 TYR、TYRP1 和 TYRP2 的表达均为阴性;正常肤色区:SV 的 MITF 表达显著抑制,与 NSV 及正常人对比如具有统计学差异($P < 0.05$),NSV 的 MITF、NSV 与 SV 的 TYR、TYRP1 和 TYRP2 表达与正常人对比如没有统计学差异($P > 0.05$)。(2)培养黑素细胞的蛋白表达结果:NSV 的 TYRP2 表达下调,与正常人对比如具有统计学差异($P < 0.05$),而 MITF、TYR 和 TYRP1 表达正常;SV 的 MITF 与 NSV 及正常人对比如具有统计学差异($P < 0.05$),而 TYR、TYRP1 和 TYRP2 正常表达。**结论** NSV 和 SV 可能存在不同的 MITF 转录调控机制。

关键词 小眼畸形相关转录因子 酪氨酸酶相关蛋白 白癜风

Correlation Between Microphthalmia – associated Transcription Factor and Clinical Pattern in Vitiligo Patients. Ni Yajie, Wang Ping, Hong Weisong, Zhang Li, Zheng Junhui. Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310053, China

Abstract Objective To analyze the expression of microphthalmia – associated transcription factor (MITF), tyrosinase – related proteins (TRPs) and the correlation with clinical pattern in patients with vitiligo. **Methods** Suction epidermal sheets were taken from lesional and non – lesional skin from patients of 17 non – segmental vitiligo (NSV) and 13 segmental vitiligo (SV) respectively. MITF and its transcriptional molecules tyrosinase (TYR), tyrosinase – related protein – 1 (TYRP1), and tyrosinase – related protein – 2 (TYRP2) of melanocytes from lesional and non – lesional skin were detected by immunohistochemistry. MITF, TYR, TYRP1 and TYRP2 of cultured melanocytes from non – lesional vitiligo skin were detected by Western Blotting. **Results** The expression of MITF, TYR, TYRP1 and TYRP2 in situ; the expression of MITF, TYR, TYRP1 and TYRP2 from depigmented lesions was all negative. In normal area of vitiligo patients, the expression of TYR, TYRP1 and TYRP2 was normal both in NSV and SV; but the expression of MITF in SV patients decreased dramatically compared with NSV and healthy people ($P < 0.05$). MITF in NSV patients was no statistically difference from healthy people ($P > 0.05$). Proteins expression of MITF, TYR, TYRP1 and TYRP2 in cultured melanocytes: in NSV patients, the expression of MITF, TYR and TYRP1 had all no statistically difference from SV and healthy people ($P > 0.05$). But TYRP2 had statistically difference from healthy people ($P < 0.05$). Comparatively, in SV patients, the expression of MITF protein showed statistically difference from NSV and healthy people ($P < 0.05$), but the expression of TYR, TYRP1 and TYRP2 were almost normal. **Conclusion** There may exist different pathogenesis about the transcriptional role of MITF between NSV and SV.

Key words Microphthalmia – associated transcription factor; Tyrosinase – related protein; Vitiligo

白癜风是表皮黑素细胞缺陷和(或)功能障碍性疾病,病因与发病机制不明且顽固难治。根据白斑分

布的特点,白癜风分为非节段型白癜风(non – segmental vitiligo, NSV)和节段型白癜风(segmental vitiligo, SV)。目前认为,NSV 的发病可能与免疫或氧化应激造成表皮黑素细胞损伤有关,SV 的发病可能与遗传缺陷有关。NSV 和 SV 不同的黑素细胞缺陷机制,对于选择相应的治疗方法具有重要指导意义^[1,2]。人类皮肤黑素生成过程中,酪氨酸酶

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2080112);杭州市医学重点专科专病项目(20100733Q08)

作者单位:310009 杭州,浙江中医药大学(倪亚杰);杭州市第三人民医院皮肤科(王平、洪卫松、章莉、郑俊惠)

通讯作者:王平,电子信箱:dermwang@yahoo.com.cn

(TYR)、酪氨酸酶相关蛋白 1 (TYRP1) 和酪氨酸酶相关蛋白 2 (TYRP2) 等酪氨酸酶相关蛋白 (TRPs) 发挥着核心作用,并作为黑素细胞标志的小眼畸形相关转录因子 (MITF) 的转录调控。本研究对不同临床类型白癜风白斑区和远离白斑正常表皮组织,首先应用免疫组织化学方法原位检测黑素细胞的 MITF 及其主要转录调控分子 TYR、TYRP1 和 TYRP2 的表达情况,并对远离白斑正常肤色区表皮黑素细胞进行培养,应用免疫印迹方法检测培养的黑素细胞 MITF 及 TYR、TYRP1 和 TYRP2 的表达情况,分析 MITF 转录调控网络与白癜风临床类型的相关性。

资料与方法

1. 病例:(1)病例与标本:选择笔者医院白癜风专病门诊确诊病例 30 例,男性 14 例,女性 16 例,其中 NSV17 例,SV13 例。所有病例均在白斑区、远离白斑的臀部正常肤色区进行负压吸疱各 6 枚,吸疱压力约为 40kPa,吸疱时间 40~100min,均为完全起疱,所有皮片均行常规组织学检查,并对远离白斑的臀部正常肤色区表皮片进行黑素细胞培养。另取笔者医院门诊手术室包皮环切术切取的 10 例健康儿童包皮皮片作为对照。本研究获得笔者医院伦理委员会批准,同时所有患者均知情同意。(2)试剂:1)细胞培养试剂:F12 基础培养基、胎牛血清、谷氨酰氨、庆大霉素、0.25% 胰酶、0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA)、0.05% 胰酶-EDTA、D-Hank's 液、基因素均购自美国 GIBCO 公司,霍乱毒素 (CT)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、二甲基亚砷 (DMSO) 均购自美国 Sigma 公司,人重组碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 购自美国 Pepro-Tech 公司。2) 抗体:MITF (Ab12039)、TYR (Ab52493)、TYRP1 (Ab3312) 和 TYRP2 (Ab74073) 均为英国 Abcom 公司产品,3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)、层粘连蛋白和 IV 型胶原抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品。

2. 方法:(1)表皮完整性的确定:所有皮片均经 10% 甲醛溶液固定常规 HE 染色、对冷冻切片进行层粘连蛋白和 IV 型胶原的免疫荧光检查,确定表皮的完整性(图 1A)。(2)免疫组化:对白癜风白斑区和远离白斑正常肤色区表皮组织进行的 MITF、TYR、TYRP1 和 TYRP2 的原位表达检测,按常规免疫组化 SP 法操作。MITF、TYR、TYRP1 和 TYRP2 的工作浓度按试剂要求。阳性对照由 SP 试剂盒提供,以 PBS 代替一抗作为

阴性对照,DAB 显色后立即普通光学显微镜下观察、拍照、分析。(3)表皮片黑素细胞培养:取表皮片 4 枚浸入无菌 D-Hank's 液中并漂洗 2 次,以 0.25% 胰蛋白酶于 37℃ 孵育 10min,弃胰酶,以 0.02% EDTA 于 37℃ 孵育 10min。在立体显微镜下剥下角质层,将角质层下的上皮层及真皮上的上皮层刮下。用 D-Hank's 液冲洗,将细胞悬液吸出,加入 10% 含血清的 F12 培养基吹打 5 次,1000r/min 离心 5min,用黑素细胞 Hu16 选择性培养基 (F12 基础培养基,含 bFGF、CT、IBMX 和胎牛血清)吹打成细胞悬液,最优化调整细胞浓度为 5×10^5 /ml 接种于培养瓶中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,第 3 天加入基因素以去除角质形成细胞和成纤维细胞的污染,每隔 1 天换液 1 次,经 2~5 次传代后,当黑素细胞融合达 80% 时,以 0.05% 胰酶-EDTA 消化黑素细胞,离心收集于 F12 培养基中备用。(4)免疫印迹:按照分子克隆操作手册,常规进行细胞总蛋白提取并定量、SDS-PAGE、免疫印迹(湿转)、免疫显色。各抗体工作浓度为:MITF、TYR、TYRP1 均为 1:500, TYRP2 为 1:200,GAPDH 和二抗均为 1:5000。

3. 统计学方法:SPSS 17.0 软件处理,采用计数资料 χ^2 检验的 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MITF 及其转录调控分子 TYR、TYRP1、TYRP2 的原位表达:连续观察 10 个高倍视野 ($\times 400$),计数表皮基底层阳性细胞总数,根据正常人表皮黑素细胞分布与数量,将阳性结果分为:- (≤ 5 个)为不表达;+ (6~25 个)为表达减少;++ (26~50 个)为正常表达,+++ (> 50 个)为表达增加,以不表达和表达减少之和作为表达抑制。

免疫组化显示:①白斑区:所有病例的 MITF 及 TYR、TYRP1 和 TYRP2 的表达均为阴性(表 1);②正常肤色区:NSV 与 SV 的 TYR、TYRP1 和 TYRP2 表达与正常人对比如没有统计学差异 ($P > 0.05$,表 1);SV 的 MITF 的表达抑制率 (69.23%) 与正常人 (20.00%) 对比具有统计学差异 ($P < 0.05$,表 1),与 NSV (23.53%) 对比具有统计学差异 ($P < 0.05$,表 1),但 NSV 的 MITF 表达抑制率与正常人对比如无统计学差异 ($P > 0.05$,表 1)。

表 1 白斑区和正常肤色区 MITF、TYR、TYRP1、TYRP2 表达抑制情况 [n(%)]

诊断	n	白斑区				正常肤色区			
		MITF	TYR	TYRP1	TYRP2	MITF	TYR	TYRP1	TYRP2
NSV	17	17(100)	17(100)	17(100)	17(100)	4(23.53)	0(0)	0(0)	0(0)
SV	13	13(100)	13(100)	13(100)	13(100)	9(69.23)*	0(0)	0(0)	0(0)
正常人	10	-	-	-	-	2(20.00)	0(0)	0(0)	0(0)

与 NSV 及正常人对比如, * $P < 0.05$

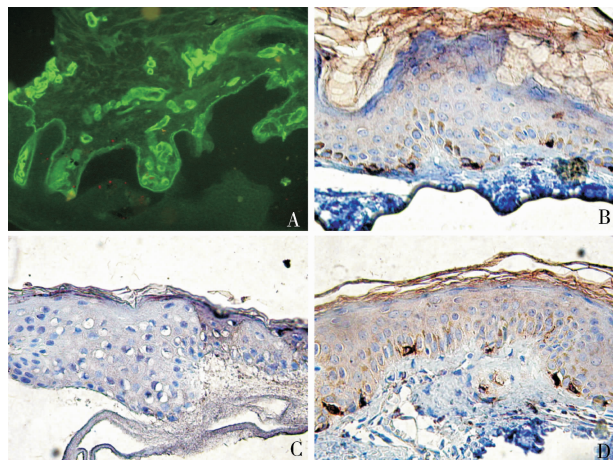


图1 MITF原位表达情况

A. 针对层粘连蛋白的冷冻切片免疫荧光检查, 确定了表皮完整性($\times 200$); B. NSV, 表示 MITF 表达减少($\times 400$); C. SV, 表示 MITF 不表达($\times 400$); D. 正常人皮肤, 表示 MITF 正常表达($\times 400$)

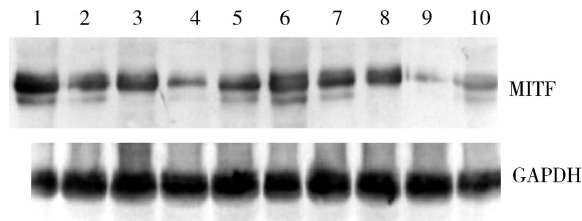


图2 Western blot 检测黑素细胞 MITF 表达情况

1~5. 非节段型白癜风黑素细胞; 6~10. 节段型白癜风黑素细胞; GAPDH. 内参照第4例存在 MITF 的表达下调, 第9、10例均存在 MITF 的表达下调

疾病, 病因与发病机制不明, 目前从不同角度提出的假说主要涉及遗传、自身免疫、神经介质、氧化应激、细胞毒作用、微环境紊乱等^[3]。目前认为, NSV 的发病可能与免疫或氧化应激造成表皮黑素细胞损伤有关, SV 的发病则可能与遗传缺陷有关。

2. 培养的黑素细胞 MITF 及其转录调控分子 TYR、TYRP1、TYRP2 的蛋白表达: 应用 Band Scanner 生物学软件, 记录并分析 MITF、TYR、TYRP1、TYRP2 与内参照 GAPDH 的灰度值比, 应用 SPSS 比较 MITF、TYR、TYRP1、TYRP2 的蛋白表达差异, 以不表达和表达显著减少之和作为表达抑制。结果显示: 来源于 17 例 NSV 所培养的黑素细胞, MITF、TYR、TYRP1 的表达例数分别为 14、14、14 例, 与 SV 及正常人对比如没有统计学差异($P > 0.05$, 表 2), TYRP2 表达例数为 9 例(52.94%), 存在表达下调现象, 与正常人(100%)对比具有统计学差异($P < 0.05$, 表 2); 而来源于 13 例 SV 所培养的黑素细胞, 仅有 5 例(38.46%)存在 MITF 表达, 与 NSV(82.35%)及正常人(100%)对比均具有统计学差异($P < 0.05$, 表 2), 而 TYR、TYRP1 和 TYRP2 几乎均正常表达, 表达例数分别为 13、12、11 例(表 2)。

表2 培养的白癜风黑素细胞 MITF、TYR、TYRP1、TYRP2 的表达情况[n(%)]

诊断	n	表达			
		MITF	TYR	TYRP1	TYRP2
NSV	17	14(82.35)	14(82.35)	14(82.35)	9(52.94) ^a
SV	13	5(38.46) ^b	13(100.00)	12(92.31)	11(84.62)
正常人	10	10(100.00)	10(100.00)	10(100.00)	10(100.00)

与正常人对比如, ^a $P < 0.05$; 与 NSV 及正常人对比如, ^b $P < 0.05$

讨 论

白癜风是表皮黑素细胞缺陷和(或)功能障碍性

人类皮肤黑素生成由超过 90 余个位点、150 余个等位基因、200 多种分子共同组成了有序的、立体的调控网络, 其中, TYR 为黑素生成的核心调节酶, TYRP1 和 TYRP2 的氨基酸残基与 TYR 约有 40% 的同源性, 而且在结构上与 TYR 相关, 主要参与优黑素生成, 为优黑素生成的速度调节器^[4]。作为黑素细胞的标志, MITF 作为分子开关, 在皮肤黑素生成过程中, 转录调控与黑素生成密切相关的 TYR、TYRP1 和 TYRP2 等重要分子, 在黑素细胞发育、分化和功能等方面发挥着重要的作用^[5]。MITF 基因突变与色素病关系密切: 在动物研究中, MITF 基因突变可引起小鼠白癜风^[6]。对于人类而言, MITF 基因突变可引起 Waardenburg 综合征, 表现为皮肤色素减退和耳聋^[7]。有学者通过连锁分析证实了白癜风的发病与 MITF 基因突变无关^[8]。但是, 既往有学者应用免疫组化和 RT-PCR 方法研究了白癜风表皮 MITF 及其上游分子 SCF/KIT 的交互表达情况, 证实了白癜风黑素细胞消失和黑素合成功能减退与 SCF/KIT 和 MITF 功能减退有关。最近, Manga 等^[9]为探究白癜风的发病机制, 应用 4-叔丁基苯酚(4-TBP)诱导黑素细胞的氧化应激反应, 可引起 MITF 及其下游分子 TYRP1 的表达下降, 推测白癜风的发病机制可能与 MITF 转录调控阻滞有关。

我们的研究发现, 在 SV 和 NSV 患者正常皮肤黑素细胞中, MITF 及其下游转录调控分子的表达水平各不相同: ① SV 存在 MITF 表达的显著抑制, 而 TYR、TYRP1 和 TYRP2 正常表达; 提示 SV 黑素生成存在不依赖于 MITF 的转录调控, 而 NSV 的大部分

MITF 表达与黑素生成密切相关的 TYR、TYRP1、TYRP2 的表达一致,提示 NSV 黑素生成与 MITF 的转录调控密切相关;②NSV 存在显著的 TYRP2 表达下调现象:尽管由于表皮黑素细胞含量较少使得我们的原位检测 TYRP2 的表达相对定量正常,但在定量更为准确的对培养黑素细胞进行的免疫印迹检测中,我们发现了 NSV 患者的正常肤色区黑素细胞存在 TYRP2 的显著抑制现象。在我们另外一项对正常人黑素细胞的研究中也发现,MITF 基因敲除后 TYRP2 表达反而显著上调,这些现象均表明,TYRP2 可能在不依赖于 MITF 的转录调控机制。有关 TYRP2 研究文献报道较少,有学者认为 TYRP2 的功能可能远远不止于参与 TYR 相关的黑素生成功能,而且,在恶性黑色素瘤中也发现了针对 TYRP2 的 T 淋巴细胞^[10]。

研究 MITF 转录调控网络对于进一步阐明白癜风的发病机制,具有重要意义。本研究结果表明了 NSV 和 SV 存在不同的 MITF 转录调控,我们还需要对 MITF 转录调控网络特别是 TYRP2 的功能作进一步研究与探讨。

参考文献

- Gauthier Y, Cario Andre M, Taïeb A. A critical appraisal of vitiligo etiologic theories. Is melanocyte loss a melanocytorrhagy[J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16(4):322-332
- Dell'anna ML, Picardo M. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo[J]. *Pigment Cell*

- Res, 2006, 19(5):406-411
- Schallreuter KU, Bahadoran P, Picardo M, *et al.* Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else[J]. *Exp Dermatol*, 2008, 17(2):139-140; discussion 141-160
- Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, *et al.* Regulation of melanogenesis - controversies and new concepts[J]. *Exp Dermatol*, 2008, 17(5):395-404
- Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network[J]. *Annu Rev Genet*, 2004, 38:365-411
- Kurita K, Nishito M, Shimogaki H, *et al.* Suppression of progressive loss of coat color in microphthalmia - vitiligo mutant mice[J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 125(3):538-544
- Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene[J]. *Nat Genet*, 1994, 8(3):251-255
- Tripathi RK, Flanders DJ, Young TL, *et al.* Microphthalmia - associated transcription factor (MITF) locus lacks linkage to human vitiligo or osteopetrosis: an evaluation[J]. *Pigment Cell Res*, 1999, 12(3):187-192
- Manga P, Sheyn D, Yang F, *et al.* A role for tyrosinase - related protein 1 in 4 - tert - butylphenol - induced toxicity in melanocytes: implications for vitiligo[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169:1652-1662
- Bam M, Bagchi T. Absence of tyrosinase - related protein - 2/dopachrome tautomerase transcripts in PBMCs from vitiligo patients[J]. *Scand J Immunol*, 2009, 69(4):366-373

(收稿日期:2012-07-03)

(修回日期:2012-09-29)

血浆和肽素浓度与脑外伤预后的相关分析

杨志辉 张祖勇 俞文华 陈宜德 吴晓玉 董晓巧

摘要 **目的** 检测脑外伤患者血浆和肽素浓度,揭示其与脑外伤预后的相关性。**方法** 选取重型脑外伤患者和健康体检者各 116 例,采用 ELISA 法测定血浆和肽素浓度,统计分析血浆和肽素浓度与脑外伤后 6 个月内神经功能预后不良(格拉斯哥预后评分 1~3 分)和死亡的相关性。**结果** Mann-Whitney U 检验显示,脑外伤患者血浆和肽素浓度($425.6 \pm 163.9 \text{ pg/ml}$)较健康体检者($54.6 \pm 18.1 \text{ pg/ml}$)明显增高($P < 0.01$)。多因素分析显示,血浆和肽素浓度与入院时格拉斯哥评分呈显著负相关($P < 0.01$),是脑外伤后 6 个月内神经功能预后不良(OR = 1.172, 95% CI:1.097~1.891, $P < 0.01$)和死亡(OR = 1.205, 95% CI:1.103~2.216, $P < 0.01$)的独立危险因素。受试者工作特征曲线分析显示,血浆和肽素浓度预测脑外伤后 6 个月神经功能预后不良(曲线下面积 = 0.894, 95% CI:0.838~0.942, $P < 0.01$)和死亡(曲线下面积 = 0.903, 95% CI:0.842~0.961, $P < 0.01$)有显著预测价值。**结论** 脑外伤后血浆和肽素浓度显著升高,该指标测定可显著预测脑外伤患者预后。

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2012KYB148)

作者单位:318020 浙江省台州市第一人民医院 EICU(杨志辉、陈宜德、吴晓玉);310006 杭州市第一人民医院神经外科(张祖勇、俞文华、董晓巧)

通讯作者:董晓巧,电子信箱:dxqhyy@163.com