

内皮素 3 对不同毛色绵羊黑色素细胞的影响

李亚楠, 赵兵令, 王海东, 陈天直, 刘颖, 常露程, 董常生

(山西农业大学, 山西太谷 030801)

摘要: 【目的】探索内皮素 3 (EDN3) 对来源于不同毛色体外培养的黑色素细胞产生黑色素作用机制及差异的影响。【方法】体外培养不同毛色皮肤来源的黑色素细胞, 通过 MTT 法检测不同细胞在 EDN3 影响下的增殖率, 分别提取两种细胞的总 RNA 和总蛋白, 总 RNA 经反转录合成 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 方法检测 EDN3 对两种细胞内 EDNRB、NRas 及 TYR 在 mRNA 水平相对表达量的影响, 总蛋白通过 Western blot 方法检测 EDN3 对两种细胞内 EDNRB、NRas 及 TYR 在蛋白水平的表达量是否发生变化, 结果均使用 SPSS19.0 软件进行差异显著性分析。

【结果】MTT 法测得 EDN3 对黑白两种来源的黑色素细胞的增殖均产生促进作用, 实时荧光定量 PCR 结果显示添加 EDN3 的白色来源细胞内 EDNRB mRNA 的相对表达量是正常细胞组的 1.7992 倍, NRas 是正常细胞组的 1.8536 倍差异极显著 ($P < 0.01$), 但 TYR mRNA 的相对表达量未发生明显变化; 添加 EDN3 的黑色来源细胞内 EDNRB mRNA 的相对表达量是正常细胞组的 2.2512 倍, NRas 是正常细胞组的 1.3859 倍, TYR 是正常细胞组的 15.5710 倍差异极显著 ($P < 0.01$); Western blot 结果显示添加 EDN3 的白色来源细胞内 EDNRB 蛋白表达量是正常细胞组的 3.0827 倍差异极显著 ($P < 0.01$), NRas 是正常细胞组的 1.2936 倍差异显著 ($P < 0.05$), TYR 蛋白表达量未发生明显变化; 添加 EDN3 的黑色来源细胞内 EDNRB 蛋白表达量是正常细胞组的 3.9800 倍差异极显著 ($P < 0.01$), NRas 是正常细胞组的 1.3658 倍差异显著 ($P < 0.05$), TYR 是正常细胞组的 1.8498 倍差异显著 ($P < 0.05$)。【结论】EDN3 促进白色来源的黑色素细胞增殖但对色素合成的限速酶 TYR 未产生促进作用; EDN3 促进黑色来源的黑色素细胞增殖并可能促进黑色素生成。

关键词: 内皮素 3 (EDN3); 绵羊; 毛色; 黑色素细胞

Effect of EDN3 on of Sheep Skin Melanocytes with Different Coat Colors *in Vitro*

LI YaNan, ZHAO BingLing, WANG HaiDong, CHEN TianZhi, LIU Ying,
CHANG LuCheng, DONG ChangSheng

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Taigu 030801, Shanxi)

Abstract: 【Objective】 The objective of this study is to explore the effects of EDN3 *in vitro* on sheep melanocytes with different coat colors and to find the mechanisms of production of melanin and their differences. 【Method】 Melanocytes from black and white coat colors were cultured *in vitro*, and MTT assay was used to detect different cell proliferation rates by affected EDN3. After extraction of total RNA and total protein of both cells, the total RNA was reversely transcribed to cDNA, and then the effect of EDN3 on mRNA relative expression of EDNRB, NRas and TYR was analyzed by RT-PCR, and Western blot was performed to ensure whether EDN3 had influence on the protein expression of EDNRB, NRas and TYR. Significant difference was analyzed by using statistical method with software SPSS19.0. 【Result】 MTT assay showed that EDN3 promoted cells proliferation from both black and white coat colors. RT-PCR revealed that compared with the control group, the relative expressions of EDNRB and NRas

收稿日期: 2016-03-01; 接受日期: 2017-01-22

基金项目: 国家自然科学基金 (31302049), 国家高技术研究发展计划 (“863”计划, 2013AA102506)

联系方式: 李亚楠, Tel: 18404966095; E-mail: 18404966095@163.com. 赵兵令, Tel: 18404981230; E-mail: 921695051@qq.com; 李亚楠与赵兵令为同等贡献作者。通信作者董常生, Tel: 0354-6288980; E-mail: csdong18@163.com

mRMA in EDN3 group from white coat color were significantly increased by 1.7992 folds and 1.8536 folds respectively ($P<0.01$), while TRY mRNA had no significant difference. In cells from black coat color, the expressions of EDNRB, NRas and TYR were all induced significantly with multiples of 2.2512, 1.3859 and 15.5710 respectively ($P<0.01$). The result of Western blot in EDN3 group was consistent with RT-PCR, the EDNRB protein expression from white coat color was 3.0827 times of control group ($P<0.01$), and the NRas protein expression was 1.2936 fold of control group ($P<0.05$), while TYR had no change. The protein expressions in cells from black coat color of EDNRB, NRas and TYR were observably added up to 3.9800 time ($P<0.01$), 1.3658 and 1.8498 times ($P<0.05$), respectively. 【Conclusion】 EDN3 promoted melanocytes proliferation from both black and white coat colors, while had no effect on TYR which is a rate-limiting enzyme of pigment synthesis in cells from white coat colors, and might play a role in producing melanin in cells isolated from black coat color.

Key words: EDN3; sheep; coat color; melanocytes

0 引言

【研究意义】内皮素 (endothelin, EDN) 是一类由内皮细胞合成分泌的活性肽包括 EDN1、EDN2、EDN3, 各亚型的功能因分布部位不同而有一定的差异, 主要作用为参与血管扩张剂的释放及促进细胞有丝分裂^[1-3]。EDN3 对心血管系统的稳定及血压的调节有一定的作用^[4]。在毛色形成的主要部位, EDN3 由角化细胞及内皮细胞合成分泌, 并通过 EDNRB 与黑色素细胞结合通过一系列的分子调控, 最后作用于 MITF (小眼畸形转录因子) 从而影响黑色素的合成及转运^[5]。【前人研究进展】已有研究表明, 在不同物种不同部位的色素沉着均显示 EDN3 有明显的调控作用^[6]。其中在细胞水平的研究显示, EDN3 与 KIT 信号途径对黑色素细胞发育存在必不可少的协同作用^[7], EDN3 对黑色素细胞前体的迁移及增殖有较大的影响, 并与生长因子一起成为形成成熟的黑色素细胞必要的因子^[8]。EDN3 对已成熟的羊驼黑色素细胞有促进增殖分化的作用, 明显促进黑色素细胞数量的变化^[9]。另有研究称 EDN3 对黑色素细胞分泌的黑色素小体的转运有一定的影响^[10]。体外培养的黑色素细胞在 EDN3 的刺激下, 细胞数量显著增加黑色素的合成也相应的增多。EDN3 及其受体所组成的信号通路参与黑色素的合成并发挥重要的调节作用^[11]。EDN3 在黑色素瘤以及人类的皮肤色素过度沉着等疾病中均发挥作用, 主要表现在对黑色素细胞前体细胞的分化及已成熟细胞的增殖均有影响^[12-13]。关于内皮素家族及其受体的研究进展显示其对体外培养的黑色素细胞的促增殖作用较明显, 对于色素合成的相关基因有一定的促表达作用。但在不同毛色绵羊皮肤中的组织定位及表达的分析显示 EDN3 在黑色及白色皮肤中表达有异^[14]。【本研究切入点】在体外培养的不同毛色绵

羊皮肤来源的黑色素细胞中 EDN3 的作用是否有所不同, 仍未见报道。【拟解决的关键问题】本研究通过对不同毛色的绵羊皮肤来源的黑色素细胞进行试验, 分析 EDN3 对黑色素细胞的作用, 进一步补充 EDN3 的作用机制。

1 材料与方法

本试验于 2014 年 11 月至 2015 年 2 月在山西农业大学羊驼生物工程实验室进行。

1.1 试剂

MELM(2201)(SCIENCECELL), 胰酶 (1 : 250) (solarbio), 胎牛血清 (杭州四季青公司), RNA 提取试剂盒, 反转录试剂盒 (Takara 公司产品), QuantiFast SYBR Green PCR Kit (QIAGEN 公司产品), EDN3, EDNRB 抗体 (生工生物公司产品), NRas 抗体 (生工生物公司产品), TYR 抗体 (生工生物公司产品)。

1.2 材料

绵羊黑色素细胞 (山西农业大学羊驼生物工程实验室提供), 分别为白色绵羊皮肤来源与黑色绵羊皮肤来源 (皮肤取自 1 岁左右小尾寒羊介体羊场提供)。

1.3 方法

1.3.1 黑色素细胞的复苏与传代 从液氮罐中取出细胞冻存管并快速置于提前加热至 37℃ 的水浴锅中, 轻轻摇动使其迅速融化。待细胞完全融化并酒精消毒后置于超净台, 加入培养基轻轻吹打使细胞悬浮, 将该细胞悬液转移至 15mL 离心管, 4℃, 1 000 r/min 离心 10 min。弃去上清液, 加入黑色素培养基轻轻吹打悬浮细胞后接种于 6 孔细胞培养板, 静置于 5% CO₂ 培养箱, 37℃ 培养, 24 h 后观察细胞贴壁情况并更换新鲜培养基。

1.3.2 黑色素细胞活力的测定 采用四甲基偶氮噻

唑蓝比色法 (MTT 法)^[15]。取对数生长期细胞, 0.25% 胰酶+EDTA 消化, 分别计数并调节细胞浓度为 1×10^4 个/mL 接种于 96 孔板静置培养 24 h, 更换为添加有不同浓度 EDN3 的黑色素培养基, 置于 5% CO₂ 培养箱中培养 72 h。每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 200 μL , 放置培养箱孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加二甲基亚砜 (DMSO) 150 μL 。在酶标仪上以 490nm 波长测各孔吸光度值计算添加不同浓度 EDN3 后细胞的增值率。增值率 = (添加 EDN3 A_{490} 值 - 无 EDN3 A_{490} 值) / (无 EDN3 A_{490} 值 - 培养基 A_{490} 值) $\times 100\%$ ^[14]。

1.3.3 Real-time PCR 检测 使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 测定浓度后按照 Takara 公司反转录试剂盒合成 cDNA。根据 GenBank 上的绵羊 EDNRB、NRas 和 TYR 序列, 利用 Premier 5.0 软件设计引物并通过 NCBI 初步检测引物的特异性。引物由北京华大基因公司合成。引物序列见表 1。按照 Applied Biosystems 公司荧光定量试剂盒进行扩增, 反应结束通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因在不同毛色绵羊皮肤中的相对表达水平。 $\Delta\text{CT}_{\text{目的基因}} = \text{CT}_{\text{目的基因}} - \text{CT}_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{白色绵羊组}} - \Delta\text{CT}_{\text{黑色绵羊组}}$, 各个目的基因 mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示。

表 1 目的基因引物序列及 PCR 扩增条件

Table 1 Sequence of primers and conditions for PCR amplification

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	PCR 产物 Product size (bp)	温度 Temperature (°C)
ETRB	F: CCTAGAGGGGGA AGGATGGT	156	58
	R: GATTCTCAGCAGC GTGAGAT		
NRas	F: CTTTCCCGGTTG TGGTCGTA	118	60
	R: TTTTCCCAACAC CACCTGCT		
TYR	F: CCTCGGCTGATG TGGAGTTT	336	58
	R: TGTAGGATTCCC GGTGTGTC		
18S	F: GAAGGCACCA CCAGGAGT	158	60
	R: CAGACAAATCA CTCACCAA		

1.3.4 蛋白免疫印迹试验 用碧云天蛋白裂解液提取细胞总蛋白, 检测总蛋白浓度, 上样调整一致后进行 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳。浓缩胶与分离胶电泳条件分别为恒压 80V 与 120V, 电泳结束后转至 NC 膜。转膜结束后, 用 5% 封闭蛋白干粉室温封闭 1h, 加入 EDNRB (1 : 1 000)、NRas (1 : 500)、TYR (1 : 1 000) 和 β -actin (1 : 1 000) 一抗 4°C 过夜孵育。

水平摇床上用 TBST 清洗 NC 膜, 10min \times 3 次。根据一抗来源选择 HRP 标记的二抗 (1 : 10 000) 37°C 摇床孵育 1 h。二抗孵育结束后, 用 TBST 漂洗 NC 膜 5min \times 6 次。使用康为高灵敏度 ECL 显色后暗室曝光, 得到有条带的胶片扫描并分析。用 Image-ProPlus 6.0 软件对绵羊色素细胞免疫印迹结果进行分析。蛋白含量 = 条带面积 \times 平均灰度, 目的蛋白相对定量值 = 目的蛋白含量 / β -actin 蛋白含量。数据均用 Means \pm SE 表示, 用 SPSS 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.01$ 差异极显著。

2 结果

2.1 黑色素细胞的形态学观察

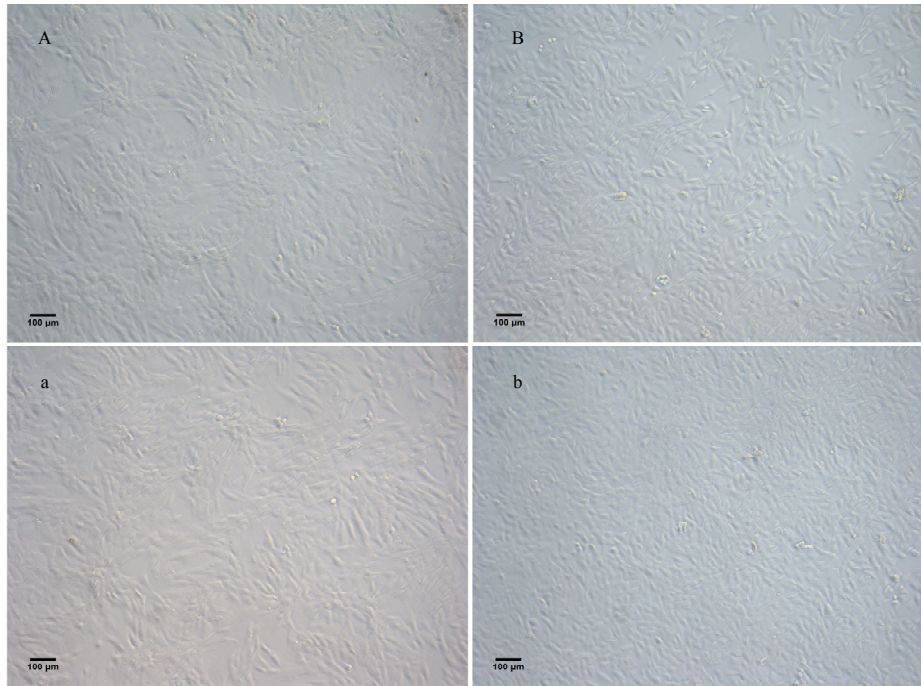
两种来源的黑色素细胞复苏及传代后, 均呈双树突或三树突状且正常贴壁生长、状况良好, 添加 EDN3 后, 细胞无明显的形态学变化 (图 1)。

2.2 EDN3 对细胞增值率的影响

利用 MTT 法测得细胞增值率的结果显示两种来源的黑色素细胞在 EDN3 的刺激下增值率均有所提高, 但以 EDN3 在 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时细胞的增值率变化最为明显, 且浓度过高时 (1×10^{-7} , 1×10^{-6}) 反而会有一定的抑制作用。比较两种细胞的增值率显示白色皮肤来源的黑色素细胞在 EDN3 为 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的增值率明显高于黑色皮肤来源的黑色素细胞 (图 2)。

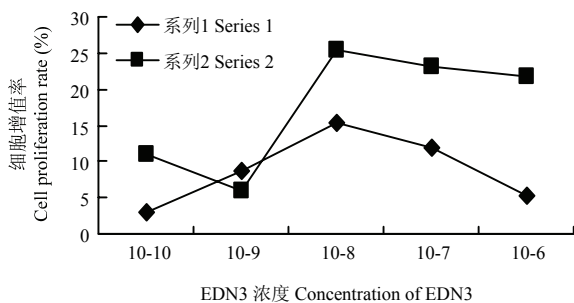
2.3 EDNRB、NRas 及 TYR mRNA 的变化

通过 qRT-PCR 方法检测了 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 EDN3 对 EDNRB、NRas 及 TYR mRNA 相对表达量的影响。统计结果分析显示: 添加 EDN3 的白色来源细胞内 EDNRB mRNA 的相对表达量为 1.8007 ± 0.1434 是正常细胞组的 1.7992 倍, NRas mRNA 的相对表达量为 1.8552 ± 0.0999 是正常细胞组的 1.8536 倍差异极显著 ($P < 0.01$), 但 TYR mRNA 的相对表达量为 1.0005 ± 0.0358 相较正常组细胞未发生明显变化。添加 EDN3 的黑色来源细胞内 EDNRB mRNA 的相对表达量为 2.2542 ± 0.1598 是正常细胞组的 2.2512 倍, NRas mRNA 的相对表达量为 1.3950 ± 0.0329 是正常细胞组的 1.3859 倍, TYR mRNA 的相对表达量为 15.6190 ± 0.3239 是正常细胞组的 15.5710 倍差异极显著 ($P < 0.01$)。与正常培养的细胞相比, 添加 EDN3 的细胞色素相关基因的表达量均发生了变化。EDN3 的受体 EDNRB 和下游基因 NRas mRNA 的表达量有显著的增加 (图 3-A、B), 但 TYR mRNA



(A) 白色皮肤来源的正常黑色素细胞 (a) 白色皮肤来源添加 EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的黑色素细胞 (B) 黑色皮肤来源的正常黑色素细胞 (b) 黑色皮肤来源添加 EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的黑色素细胞
 (A) Control white sheep skin melanocytes (a) White sheep skin melanocytes cultured by the addition of EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (B) Control black sheep skin melanocytes (b) Black sheep skin melanocytes cultured by the addition of EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 1 绵羊黑色素细胞的形态
 Fig. 1 The morphology of sheep melanocytes



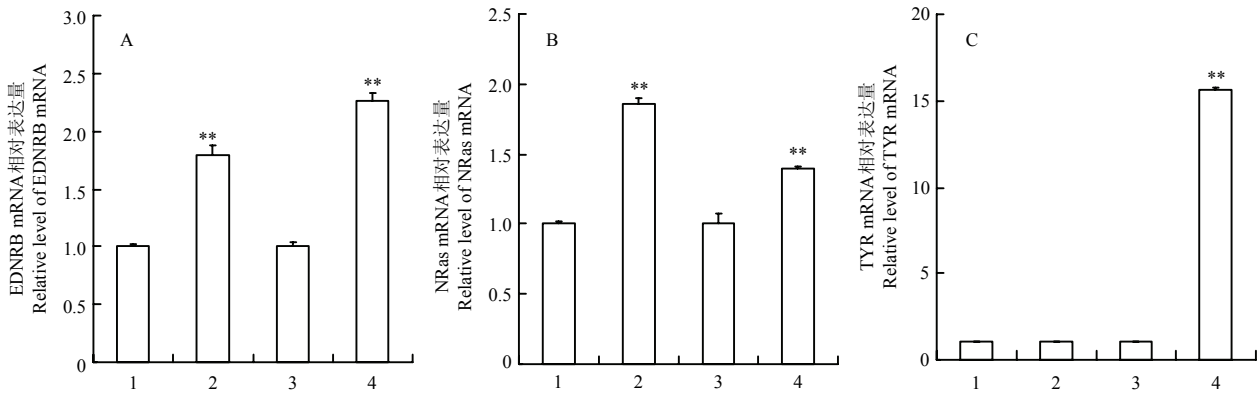
系列 1: 黑色皮肤来黑色素细胞源系列; 2: 白色皮肤来源黑色素细胞
 series 1: Black sheep skin melanocytes series; 2: White sheep skin melanocytes

图 2 不同浓度 EDN3 对细胞增值率的影响
 Fig. 2 Proliferation of sheep melanocytes induced by different concentrations of EDN3

的表达量仅有黑色皮肤来源的黑色素细胞有极显著的增加, 白色皮肤来源的黑色素细胞未发生明显的变化 (图 3-C)。

2.4 Western blot 实验结果

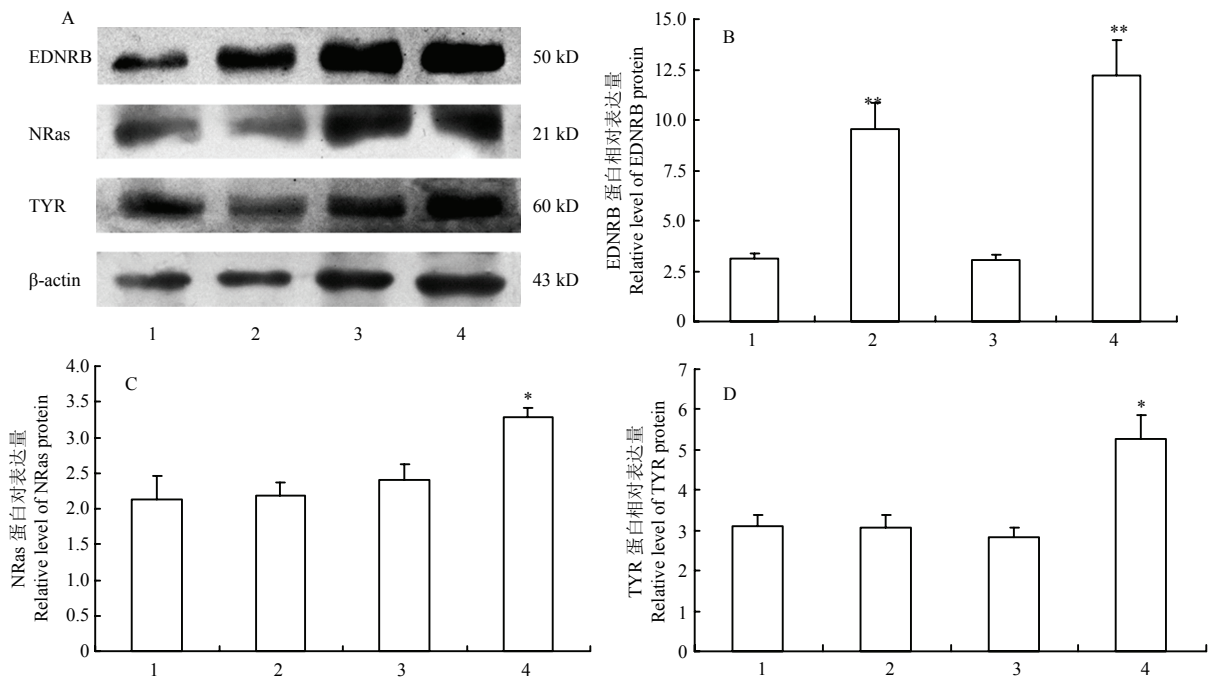
通过 Western blot 方法检测了 $1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 EDN3 对 EDNRB、NRas 及 TYR 蛋白表达量的影响 (图 4-A)。结果分析显示: 添加 EDN3 的白色来源细胞内 EDNRB 蛋白表达量为 9.5724 ± 2.1927 是正常细胞组的 3.0827 倍差异极显著 ($P < 0.01$), NRas 蛋白表达量为 2.1856 ± 0.3264 是正常细胞组的 1.2936 倍差异显著 ($P < 0.05$), TYR 蛋白表达量为 3.0818 ± 0.5227 是正常细胞组的 1.0024 倍, 未发生明显变化。添加 EDN3 的黑色来源细胞内 EDNRB 蛋白表达量为 12.2360 ± 2.9357 是正常细胞组的 3.9800 倍差异极显著 ($P < 0.01$), NRas 蛋白表达量为 3.2779 ± 0.2466 是正常细胞组的 1.3658 倍差异显著 ($P < 0.05$), TYR 蛋白表达量为 5.2662 ± 1.0464 是正常细胞组的 1.8498 倍差异显著 ($P < 0.05$)。EDN3 的受体 EDNRB 和下游基因 NRas 的蛋白表达量有显著的增加 (图 4-B、C), 但 TYR 的蛋白表达量仅有黑色皮肤来源的黑色素细胞有显著的增加, 白色皮肤来源的黑色素细胞未发生明显的变化 (图 4-D)。



(A) EDNRB mRNA 相对表达量; (B) NRas mRNA 相对表达量; (C) TYR mRNA 相对表达量
 (A) Relative level of EDNRB mRNA;(B) Relative level of NRas mRNA;(C) Relative level of TYR mRNA
 (1) 白色皮肤来源的正常黑色素细胞; (2) 白色皮肤来源添加 EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的黑色素细胞; (3) 黑色皮肤来源的正常黑色素细胞; (4) 黑色皮肤来源添加 EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的黑色素细胞
 (1) Control white sheep skin melanocytes; (2) White sheep skin melanocytes cultured by the addition of EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); (3) Control black sheep skin melanocytes; (4) Black sheep skin melanocytes cultured by the addition of EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

图 3 EDN3 对 EDNRB、NRas、TYR mRNA 表达量的影响

Fig. 3 The relative mRNA expression of the EDNRB, NRas and TYR genes in melanocytes treated by EDN3



EDNRB、NRas、TYR 和 β -actin 多克隆抗体免疫印迹; (B) EDNRB 蛋白表达量; (C) NRas 蛋白表达量; (D) TYR 蛋白表达量
 (A) Western blot detected EDNRB,NRas,TYR and β -actin polyclonal antibody (B) Relative level of EDNRB protein;(C) Relative level of NRas protein;(D) Relative level of TYR protein
 (1) 白色皮肤来源的正常黑色素细胞; (2) 白色皮肤来源添加 EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol/L}$)的黑色素细胞; (3) 黑色皮肤来源的正常黑色素细胞; (4) 黑色皮肤来源添加 EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol/L}$)的黑色素细胞
 (1) Control white sheep skin melanocytes; (2) White sheep skin melanocytes cultured by the addition of EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol/L}$); (3) Control black sheep skin melanocytes; (4) Black sheep skin melanocytes cultured by the addition of EDN3($1 \times 10^{-8} \text{mol/L}$)

图 4 EDNRB、NRas 及 TYR 蛋白表达印迹分析

Fig. 4 Western blot analysis of the expression of EDNRB,NRas and TYR protein

3 讨论

本试验通过添加不同浓度的 EDN3, 对比黑白来源的黑色素细胞有不同的增值率, 显示白色来源的黑色素细胞在 EDN3 的刺激下有较高的增值率。同时通过 qRT-PCR 以及 Western Bolt 方法对黑色素细胞合成黑色素的相关基因分析表明 EDN3 促进黑色来源的黑色素细胞相关基因和蛋白的表达量显著增加, 对白色来源的黑色素细胞也有一定的促进作用, 但与色素合成密切相关的酪氨酸酶并未产生促进效果。结果提示, EDN3 对两者细胞均有促进细胞增殖和基因表达的作用, 但对白色来源的细胞以促进增殖为主对色素合成并无较大的影响。对黑色来源的色素细胞有明显促进色素合成的作用。已有的研究表明内皮素家族中的 EDN2、EDN3 对羊、羊驼体外培养的黑色素细胞均有促进增殖及黑色素合成作用^[9,16]。动物体内转基因过表达 EDN3 同样显示在 EDN3 的刺激下, 黑色素细胞前体细胞和已分化成熟的黑色素细胞在数量上均有一定的增多, 随后色素的持续沉着需要 EDN3 的维持^[17]。猫科动物的研究显示 EDN3 对后期表型花纹的形成有促进作用, EDN3 从胚胎时期至毛色的形成对黑色素细胞有维持的作用^[18]。

转基因小鼠体内的 EDN3 信号用以维持皮肤黑色素细胞的存在, 在毛囊中的黑色素细胞受 EDN3 受体信号的支持不仅增加细胞数量还促进酪氨酸酶的表达从而促进其增加色素合成的能力^[19]。EDNRA 对于 EDN1 和 EDN2 有非常高的亲和力, 但对 EDN3 的亲和力较小; 与此相反, EDNRB 对三者都具有相似的高亲和力^[20-21]。研究发现紫外线的持续照射会引起皮肤色素沉着加深, 其机制包括紫外线引起角化细胞持续分泌 EDN1、EDN3 与 EDNRB 结合后加速色素合成^[12, 22]。EDNRB 在绵羊皮肤中是主要参与介导黑色素细胞增殖的受体, 并且参与黑色素的生成^[23]。EDN1 的作用机制是在黑色素合成过程中磷酸化 MITF 并增加 TYR 等酶的表达量, 在黑色素的转运机制中诱导黑色素细胞向角化细胞转运的黑素小体的增加, 这种诱导机制可通过抑制内皮素受体的功能禁止^[13,24-25]。同时中等浓度的 EDN3 会产生与 EDN1 相似的功能及影响。本试验添加 EDN3 体外培养的细胞显示黑色素细胞合成色素相关的基因在 EDN3 的刺激下表达

均有所提高, 但白色皮肤来源的黑色素细胞中 TYR 的表达未发生变化。这一结果提示 EDN3 发挥类似 EDN1 的作用, 促进正常色素的合成及转运, 但是白色毛发的形成未有色素颗粒的正常生成, 猜测白色皮肤来源的黑色素细胞合成黑色素的过程受到其他基因调控, 致使色素生成的限速酶合成受到限制。据此可以推测白色绵羊最终毛色表型的形成在色素合成的过程中受到调控, 但是内皮素家族对色素细胞的作用仅为色素基因的一部分, 在不同年龄不同动物形成白色毛发的机制可能会存在差异, 尚未明确仍需进一步研究。

另有研究显示体外培养的神经营细胞在干细胞生长因子和 EDN3 的共同刺激或仅有 EDN3 刺激下均可分化发育为黑色素细胞, 单独由干细胞生长因子刺激分化发育为未成熟细胞^[26-28]。这一结果提示 EDN3 对早期黑色素细胞的形成有至关重要的作用, 本试验结果提示 EDN3 对已成熟的黑色素细胞有促进细胞增殖和色素生成的作用, 但对白色来源的黑色素细胞以促进细胞增殖为主。EDN3 在不同时期发挥不同的功能, 对不同来源的细胞也会产生不同的作用。不能正常合成黑色素的细胞在 EDN3 的作用下相关基因的表达量有所增加, 但影响色素合成的主要基因未发生变化, 具体机制仍有待研究。

4 结论

内皮素 3 可促进白色来源的黑色素细胞增殖但对色素合成的限速酶 TYR 未产生促进作用; 内皮素 3 可促进黑色来源的黑色素细胞增殖并可能促进黑色素生成。

References

- [1] INOUE A, YANAGISAWA M, KIMURA S, KIMURA S, KASUYA Y, GOTO Y, MASAKI T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86 (8):2863-2867.
- [2] SALDANA-CABOVERDE A, KOS L. Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2010, 23(2):160-170.
- [3] IMOKAWA G, YADA Y, MIYAGISHI M. Endothelins secreted

- from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(34): 24675-24680.
- [4] KEDZIERSKI R M, YANAGISAWA M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 2001, 41(1): 851-876.
- [5] LIN J Y, FISHER D E. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 2007, 445(7130): 843-850.
- [6] KINOSHITA K, AKIYAMA T, MIZUTANI M, SHINOMIYA A, ISHIKAWA A, YOUNIS H H, TSUDZUKI M, NAMIKAWA T, MATSUDA Y. Endothelin receptor B2 (EDNRB2) is responsible for the tyrosinase-independent recessive white (mo(w)) and mottled (mo) plumage phenotypes in the chicken. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86361-e86361.
- [7] AOKI H, MOTOHASHI T N, YAMAZAKI H, et al. Cooperative and indispensable roles of endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte development. *Developmental Dynamics*, 2005, 233(2):407-417.
- [8] FANG D, LEISHEAR K, NGUYEN T K, FINKO R, CAI K, FUKUNAGA M, LI L, BRAFFORD P A, KUIP A N, XU X, SMALLEYS K S, HERLYN M. Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24(7): 1668-1677.
- [9] 耿建军, 白俊明, 范瑞文, 杨姗姗, 庞亚妙, 董常生. 内皮素-3 对羊驼黑色素细胞特征及细胞内毛色基因表达的影响. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(7): 1070-1077.
- GENG J J, BAI J M, FAN R W, YANG S S, PANG Y M, DONG C S. The effect of endothelin-3 on the melanocyte characteristic and expression of hair color genes in melanocytes from alpaca (*Lama Pacos*) *in vitro*. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(7): 1070-1077.(in Chinese)
- [10] HIROBE T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated?. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2011, 24(3): 462-478.
- [11] REGAZZETTI C, DE DONATIS G M, GHORBEL H H, CARDOT-LECCIA N, AMBROSETTI D, BAHADORAN P, CHIQUON-SICARD B, LACOUR JP, BALLOTTI R, MAHNS A, PASSERON T. Endothelial cells promote pigmentation through endothelin receptor B activation. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015, 135(12): 3096-3104.
- [12] VON KOSCHEMBAHR A M, SWOPE V B, STARNER R J, ABDEL-MALEK Z A. Endothelin-1 protects human melanocytes from UV-induced DNA damage by activating JNK and p38 signalling pathways. *Experimental Dermatology*, 2015, 24(4): 269-274.
- [13] SKOVSTED GF, KILIC S, EDVINSSON L. Endothelin-1 and endothelin-3 regulate endothelin receptor expression in rat coronary arteries. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2015, 117(5): 297-305.
- [14] 李亚楠, 赵兵令, 马淑慧, 赫晓燕, 范瑞文, 王海东, 耿建军, 董常生. 内皮素 3 在不同毛色绵羊皮肤的表达与定位. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(12):2322-2328.
- LI Y N, ZHAO B L, MA S H, HE X Y, FAN R W, WANG H D, GENG J J, DONG C S. EDN3 expression and localization in sheep skin with different coat color. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(12): 2322-2328. (in Chinese)
- [15] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65(s 1-2):55-63.
- [16] 秦以龙, 董常生, 庞亚妙, 崔玉琮, 赵园园, 耿建军. 内皮素-2 (ET-2) 促进体外培养的绵羊皮肤黑色素细胞增殖及黑色素生成. *中国生物化学与分子生物学报*, 2015, 31(11): 1199-1205.
- QIN Y L, DONG C S, PANG Y M, CUI Y C, ZHAO Y Y, GENG J J. Endothelin-2 (ET-2) promotes cultured ovine skin melanocytes proliferation and melanin synthesis *in vitro*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 31(11): 1199-1205.(in Chinese)
- [17] REID K, TURNLEY AM, MAXWELL GD, KURIHARA H, BARTLETT PF, MURPHY M. Multiple roles for endothelin in melanocyte development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development*, 1996, 122: 3911-3919.
- [18] KAELIN C B, XU X, HONG LZ, DAVID V A, MCGOWAN K A, SCHMIDT-KUNTZEL A, ROELKE M E, PINO J, PONTIUS J, COOPER G M, MANUEL H, SWANSON W F, MARKER L, HARPER CK, VAN DYK A, YUE B, MULLIKIN JC, WARREN WC, EIZIRIK E, O'BRIEN SJ, BARSH GS, MENOTTI-RAYMOND M. Specifying and sustaining pigmentation patterns in domestic and wild cats. *Science*, 2012, 337(6101): 1536-1541.
- [19] BARNES K J, SPENCER N J. Can colonic migrating motor complexes occur in mice lacking the endothelin-3 gene?. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*, 2015, 42(5): 485-495.
- [20] ARAI H, HORI S, ARAMORI I, OHKUBO H, NAKANISHI S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 1990, 348(6303):730-732.
- [21] SAKURAI T, YANAGISAWA M, TAKUWA Y, MIYAZAKI H,

- KIMURA S, GOTO K, MASAKI T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, 1990, 348(6303):732-735.
- [22] BENADUCE A P, BATISTA D, GRILO G, JORGE K, CARDERO D, MILIKOWSKI C, KOS L. Novel UV-induced melanoma mouse model dependent on Endothelin3 signaling. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014, 27(5):839-842.
- [23] 耿建军, 孙乐天, 穆晓丽, 张杰, 姜俊兵, 张映, 李宏全, 董常生. 内皮素受体在不同毛色绵羊皮肤中的表达和定位分析. *中国农业科学*, 2010, 43(24): 5147-5154.
- GENG J J, SUN L T, MU X L, ZHANG J, JIANG J B, ZHANG Y, LI H Q, DONG C S. Immunolocalization and expression analysis of endothelin receptor in sheep skin of different hair color. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(24): 5147-5154.(in Chinese)
- [24] GARCIA RJ, ITTAH A, MIRABAL S, FIQUEROA J, LOPEZ L, GLICK AB, KOS L. Endothelin 3 induces skin pigmentation in a keratin-driven inducible mouse model. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008, 128(1): 131-142.
- [25] SATO-JIN K, NISHIMURA E K, AKASAKA E, HUBER W, NAKANO H, MILLER A, DU J, WU M, HANADA K, SAWAMURA D, FISHER D E, IMOKAWA G. Epistatic connections between microphthalmia-associated transcription factor and endothelin signaling in Waardenburg syndrome and other pigmentary disorders. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2008, 22(4):1155-1168.
- [26] KAWA Y, ITO M, ONO H, ASANO M, TAKANO N, OOKA S, WATABE H, HOSAKA E, BABA T, KUBOTA Y, MIZOGUCHI M. Stem cell factor and/or endothelin-3 dependent immortal melanoblast and melanocyte populations derived from mouse neural crest cells. *Pigment Cell Research*, 2000, 13 (Supplement s8): 73-80.
- [27] THOMAS A J, ERICKSON C A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2008, 21(6): 598-610.
- [28] ABDLE-MALEK Z, SWOPE VB, SUZULI I, AKCALI C, HARRIGER M D, BOYCE S T, URABE K, HEARING V J. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(5): 1789-1793.

(责任编辑 林鉴非)