

基于 *tyrp1a* 转基因斑马鱼构建色素障碍性疾病药物筛选模型刘力<sup>1</sup>,裴思然<sup>1</sup>,吴华丽<sup>1</sup>,赵庆顺<sup>3</sup>,彭继先<sup>2\*</sup>,尚靖<sup>1\*\*</sup>(<sup>1</sup>中国药科大学江苏省中药评价与转化重点实验室,南京 211198;<sup>2</sup>南京睿鹰润泽生物医药科技有限公司,南京 211111;<sup>3</sup>南京大学模式动物研究所,南京 210061)

**摘要** 为了能够有效地筛选治疗色素障碍性疾病药物,建立一种转基因斑马鱼药物筛选模型。采用斑马鱼酪氨酸酶相关蛋白 1(*tyrosinase-related protein 1a*, *tyrp1a*) 基因启动子驱动绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP),构建出 *tyrp1a* 转基因斑马鱼,使绿色荧光能够特异性表达在斑马鱼黑色素细胞部位。分别给予斑马鱼促进黑色素合成的药物 *N*-苯基硫脲(*N*-phenylthiourea, PTU) 和抑制黑色素合成的药物黑色素细胞刺激素(alpha-melanocyte stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH),检测药物对斑马鱼黑色素合成和绿色荧光蛋白表达影响。结果显示,PTU 可以抑制斑马鱼黑色素细胞黑色素合成作用,并且降低转基因斑马鱼绿色荧光蛋白表达。 $\alpha$ -MSH 可以促进斑马鱼黑色素细胞黑色素合成作用,并促进转基因斑马鱼绿色荧光蛋白表达。本研究成功地建立了一种新的可以用于色素性障碍性疾病药物筛选的转基因斑马鱼模型。

**关键词** 斑马鱼; *tyrp1a*; 色素障碍性疾病; 药物筛选模型

中图分类号 Q78 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)06-0740-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160618

引用本文 刘力,裴思然,吴华丽,等. 基于 *tyrp1a* 转基因斑马鱼构建色素障碍性疾病药物筛选模型[J]. 中国药科大学学报,2016,47(6):740-743.

Cite this article as: LIU Li, PEI Siran, WU Huali, et al. Drug screening model of treating pigmentation disorders in *tyrp1a* transgenic zebrafish[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(6): 740-743.

Drug screening model of treating pigmentation disorders in *tyrp1a* transgenic zebrafishLIU Li<sup>1</sup>, PEI Siran<sup>1</sup>, WU Huali<sup>1</sup>, ZHAO Qingshun<sup>3</sup>, PENG Jixian<sup>2\*</sup>, SHANG Jing<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup> Jiangsu Key Laboratory of TCM Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;<sup>2</sup> Nanjing Ruiying Runze Biopharmaceutical Technology Company Incorporated, Nanjing 211111;<sup>3</sup> Model Animal Research Center, Nanjing University, Nanjing 210061, China

**Abstract** To effectively screen treating pigmentation disorders drug, a new transgenic zebrafish drug screening model was constructed. Green fluorescent protein (GFP) were driven by *tyrosinase-related protein 1a* (*tyrp1a*) promoter specific expression in melanocyte. Effect of *N*-Phenylthiourea (PTU) and alpha-melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) on the GFP expression and melanogenic of *tyrp1a:eGFP* zebrafish were photographed under the stereomicroscope. Results showed that PTU could significantly inhibit the melanogenic and expression of GFP of zebrafish. As compared with control group,  $\alpha$ -MSH treatment resulted in marked stimulation of body pigmentation and expression of GFP. In conclusion, a new transgenic zebrafish drug screening model was successfully established, which can be used for treating pigmentation disorders.

**Key words** zebrafish; *tyrp1a*; pigmentation disorders; drug screening model

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2011ZX09401-007) and the National Science & Technology Pillar Program during the Twelfth Five-Year Plan Period (No. 2012BA130B01)

收稿日期 2016-04-08 \*通信作者 \*Tel:025-51190760 E-mail:pjx@rychem.com

\*\*Tel:025-83271516 E-mail:shangjing21cn@163.com

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2011ZX09401-007);“十二五”国家科技支撑计划资助项目(No. 2012BA130B01)

色素障碍性疾病是常见的皮肤病之一,可以分为色素减退和色素增多两种类型,严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。对于色素障碍性疾病治疗药物的研究,目前缺乏理想的药物筛选模型。细胞模型和小鼠模型虽然早已用于色素障碍性药物筛选<sup>[2-4]</sup>,但是细胞模型不能够整体评价药物作用;小鼠模型存在用量大、实验周期长、耗费大量人力和财力等缺点,并且,小鼠模型会受到毛囊周期对色素合成的影响<sup>[5-6]</sup>。斑马鱼作为一种模式动物,因为其可以整体评价药物作用,适合于高通量筛选<sup>[7]</sup>,同时又可以避免毛囊周期的影响,逐渐成为新兴的研究色素类疾病的动物模型。

*N*-苯基硫脲(*N*-phenylthiourea, PTU)可以通过抑制酪氨酸酶活性来抑制黑素细胞的黑素合成,在发育学研究领域常用于抑制斑马鱼黑素生成以避免色素对观察造成干扰。在色素药物研究中,PTU 经常作为抑制色素合成的阳性药物<sup>[8]</sup>。黑素细胞刺激素( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH)是由 13 个氨基酸组成的神经内分泌激素,它能促进黑素细胞增殖、分化以及促进黑素合成,在色素代谢研究中经常作为促进黑素合成的阳性药物<sup>[9]</sup>。目前,已有报道使用 PTU 和  $\alpha$ -MSH 对野生型斑马鱼造模用于色素障碍性药物筛选。这些研究中主要依据斑马鱼黑素细胞表型变化、测量黑素含量和酪氨酸酶活性来评价筛选药物<sup>[10]</sup>。

绿色荧光转基因斑马鱼可以直接观察特定组织的变化<sup>[11]</sup>。然而,目前没有报道将转基因斑马鱼用于色素障碍药物筛选。因此,为了能直接检测药物对斑马鱼黑素细胞黑素合成影响,本研究通过以斑马鱼酪氨酸酶相关蛋白 1a (tyrosinase-related protein 1a, *tyrp1a*) 基因启动子驱动绿色荧光蛋白表达,构建出绿色荧光蛋白能够特异性表达在黑素细胞部位的转基因斑马鱼,旨在为筛选色素障碍性药物提供一种新的模型。

## 1 材 料

### 1.1 药品与试剂

质粒抽提试剂盒、PCR 液纯化试剂盒(美国 Axygen 公司);*Taq* DNA 聚合酶、DNA 连接酶试剂盒(美国 Promega 公司);Tol2 载体(南京大学模式动物研究所);甲基纤维素、*N*-苯基硫脲(PTU)、三卡因、 $\alpha$ -MSH(美国 Sigma 公司)。

### 1.2 仪 器

Mili-Q 自动纯水机(美国 Millopor 公司);PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司);斑马鱼培养系统(上海海圣公司);高速低温离心机(美国 Sigma 公司);光照恒温培养箱(宁波赛福公司);SZX16 体式荧光显微镜、DP72 数码相机(日本 Olympus 公司)。

### 1.3 动 物

AB 系野生型斑马鱼,鱼龄 3~6 个月,由南京大学模式动物研究所提供,并获得实验动物饲养管理评估和认可协会(AAALAC)国际认证。

## 2 方 法

### 2.1 斑马鱼胚胎收集

斑马鱼饲养方法按照 *The Zebrafish Book* 进行<sup>[12]</sup>。保持循环系统水温为 28.5℃,每天固定光照时间为 14 h、黑暗时间为 10 h,每天早晚各喂食一次。收集胚胎前一天下午将一尾雌鱼和一尾雄鱼放置入产卵缸中,并且以隔板隔开。第 2 日灯光开启后将隔板抽开,20 min 后可收集胚胎。清洗胚胎,并将胚胎培养在 egg water(培养斑马鱼胚胎的溶液)中,放置于 28.5℃ 的光照培养箱里。

### 2.2 Tol2(*tyrp1a*:*eGFP*)载体构建

以斑马鱼基因组为模板,然后进行 PCR 扩增。使用 *tyrp1a* 的正向引物 F 序列:GATCACCTGTCTACAACACAC;反向引物 R 序列:CCCACAGAAAC-TATATAAACC,在 *Taq* DNA 聚合酶进行扩增目的片段。PCR 反应条件:94℃、2 min, (94℃、30 s, 58℃、45 s, 72℃、2 min) 为 38 个循环, 72℃、7 min, 16℃、 $\infty$ 。扩增获得 PCR 产物。经过 PCR 纯化试剂盒纯化,纯化后的 *tyrp1a*:*eGFP* 片段 PCR 产物分别使用 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切,同时使用同样的酶双酶切 Tol2 质粒。之后进行载体连接,4℃ 过夜。

### 2.3 显微注射与转基因斑马鱼筛选

在斑马鱼胚胎单细胞时期,将已经构建好的 Tol2(*tyrp1a*:*eGFP*)质粒和 Tol2 转座酶共同注射后置于光照培养箱中胚胎发育至 24 h 时,在体视镜下挑选出有荧光的胚胎称为初建者(Founder)。待 Founder 发育至性成熟,与野生型斑马鱼交配挑选的的胚胎称为 F1 代即可稳定遗传。

### 2.4 荧光体式显微镜检测 PTU 对斑马鱼绿色荧光蛋白表达的影响

将同一时期的斑马鱼胚胎置于 6 孔板中,胚胎

发育至 6 h 时加入 0.02 和 0.2 mmol/L PTU。分别在不同时间点观察拍照,将斑马鱼置于麻醉剂中待斑马鱼活动力明显减弱后,取出包埋于 3% 甲基纤维素中,置体式显微镜下拍照观察药物对绿色荧光蛋白表达影响。

## 2.5 荧光体式显微镜检测 $\alpha$ -MSH 对斑马鱼绿色荧光蛋白表达的影响

将发育处于相同时期的斑马鱼胚胎置于 6 孔板中,胚胎发育至 6 h 时加入 0.2 mmol/L PTU,显微镜观察待胚胎发育至 35 h 时,洗去 PTU 加入  $\alpha$ -MSH 药物。继续培养 25 h 后,胚胎发育至 60 h 时。将斑马鱼置于麻醉剂中,待斑马鱼活动力明显减弱后,取出包埋于 3% 甲基纤维素中置于体式荧光显微镜下拍照观察对绿色荧光蛋白表达影响。

## 3 结果

### 3.1 Tol2(*tyrp1a*:*eGFP*) 载体构建

PCR 扩增获得 *tyrp1a*:*eGFP* 片段,之后通过酶

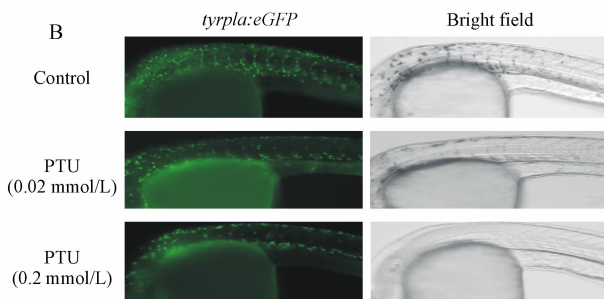
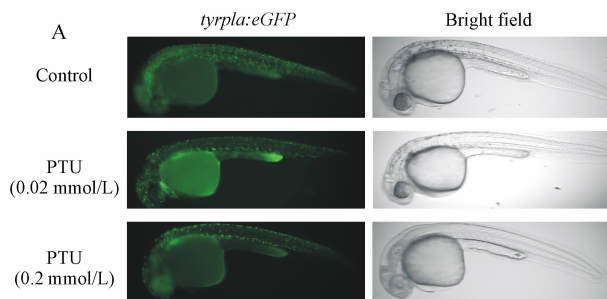
切将目的片段与 Tol2 载体连接,结果所示(图 1),构建获得 Tol2(*tyrp1a*:*eGFP*) 载体。



**Figure 1** A portion of the transgene construct Tol2(*tyrp1a*:*GFP*) is indicated to illustrate the critical features of the transgene: *tyrp1a* pro. for zebrafish *tyrp1a* promoter, GFP for the coding region of the green fluorescent protein, SV40 polyA for SV40 mRNA

### 3.2 PTU 对 *tyrp1a*:*eGFP* 转基因斑马鱼绿色荧光蛋白表达影响

筛选获得可稳定遗传的转基因斑马鱼后收集斑马鱼胚胎,在胚胎发育至 6 h 时,给予 0.02 和 0.2 mmol/L 的 PTU 处理斑马鱼胚胎。结果所示(图 2),与空白对照组相比,PTU 处理组的斑马鱼背侧绿色荧光蛋白表达显著降低,并且随着 PTU 处理剂量增加,绿色荧光蛋白表达降低更加显著。



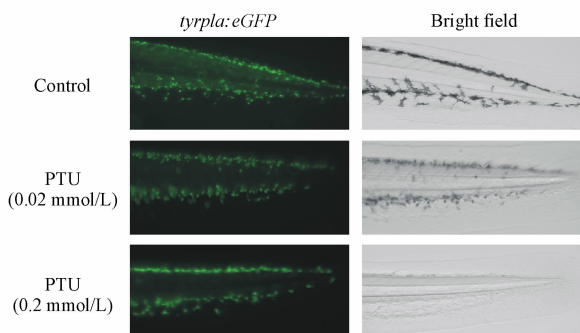
**Figure 2** Effect of *N*-Phenylthiourea (PTU) on GFP expression of *tyrosinase-related protein 1a* (*tyrp1a*):*eGFP* zebrafish. Synchronized embryos were treated with PTU at 6 hpf and incubated for a further 24 h, then photographed under the stereomicroscope at 30 hpf. A: the whole embryo; B: ventral spinal chord

同样,继续处理 PTU 于胚胎发育至 48 h 时,检测转基因斑马鱼尾部绿色荧光蛋白表达变化。结果(图 3)与 30 h 时结果相同,与空白对照组相比 PTU 处理组尾部的绿色荧光蛋白表达降低,且随着 PTU 处理浓度增加尾部绿色荧光蛋白表达降低更显著。

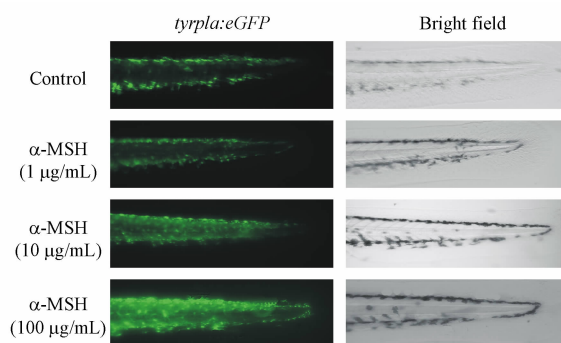
### 3.3 $\alpha$ -MSH 对 *tyrp1a*:*eGFP* 转基因斑马鱼绿色荧光蛋白表达的影响

胚胎发育至 6 h 时,给予 0.2 mmol/L PTU 来抑制色素合成,在 35 h 时洗去 PTU,同时给予不同浓度的  $\alpha$ -MSH 处理斑马鱼胚胎,待胚胎发育至 60 h 时,拍照观察变化。结果所示(图 4),在 60 h 时,与空白对照组相比  $\alpha$ -MSH 处理后可以剂量依赖性促进转基因斑马鱼尾部绿色荧光蛋白表达

和尾部黑素细胞黑素合成。



**Figure 3** Effect of PTU on the GFP expression of *tyrp1a*:*eGFP* zebrafish. Synchronized embryos were treated with PTU at 6 hpf and incubated for a further 42 h, then photographed under the stereomicroscope at 48 hpf



**Figure 4** Effect of  $\alpha$ -MSH on the GFP expression of *tyrp1a:eGFP* zebrafish. Synchronized embryos were pretreated with 0.2 mmol/L PTU at 6 hpf, then washed intensively and bathed immediately in the fresh medium at 35 hpf.  $\alpha$ -MSH was added and incubated for a further 25 h. control: zebrafish treated with PTU from 6 to 35 hpf,  $\alpha$ -MSH: zebrafish treated with  $\alpha$ -MSH at the indicated concentrations at 35 hpf. Embryos were photographed under the stereomicroscope at 60 hpf

## 4 讨论

*tyrp1a:eGFP* 转基因斑马鱼的绿色荧光蛋白表达可以直接反应 *tyrp1a* 的表达情况。*tyrp1a* 在黑素合成过程中起着重要作用,它表达的高低直接影响黑素合成。因此,本研究使用抑制黑素合成的药物 PTU 和促进黑素合成的药物  $\alpha$ -MSH 处理 *tyrp1a:eGFP* 转基因斑马鱼,检测 PTU 和  $\alpha$ -MSH 对转基因斑马鱼绿色荧光蛋白表达的影响,来验证 *tyrp1a:eGFP* 转基因斑马鱼能否用于治疗色素障碍性疾病药物筛选。

酪氨酸酶是黑素合成过程中限速酶,斑马鱼胚胎在发育至 6 h 时酪氨酸出现表达,因此,胚胎发育至 6 h 时使用抑制黑素合成的药物 PTU 处理,分别在 30 h 时和 48 h 时检测 PTU 对 *tyrp1a:eGFP* 转基因斑马鱼绿色荧光蛋白的表达影响。结果显示,在 30 h 时斑马鱼的黑素合成受到抑制,同时斑马鱼绿色荧光蛋白表达也受到抑制,特别是后脑脊髓神经元处的绿色荧光蛋白,这与报道黑素细胞源于神经脊细胞结果相符合<sup>[13]</sup>。同样在胚胎发育至 48 h 时,与空白对照组相比,PTU 处理组斑马鱼的黑素合成受到抑制,同时尾部绿色荧光蛋白表达也受到抑制。因此,*tyrp1a:eGFP* 转基因斑马鱼可以用于色素增多型疾病药物筛选。在胚胎发育至 6 h 时,首先使用 PTU 来抑制黑素合成避免背景干扰,在 35 h 时洗去 PTU 处理不同浓度的  $\alpha$ -MSH,60 h 时结果显示处理组的绿色荧光蛋白表达增强,并且黑素合成增加。因此,*tyrp1a:eGFP* 转基因斑马鱼

也可以用于色素减退型疾病药物筛选。

总之,PTU 可以剂量依赖性地抑制 *tyrp1a:eGFP* 转基因斑马鱼绿色荧光蛋白的表达, $\alpha$ -MSH 可以剂量依耐性地促进斑马鱼绿色荧光蛋白的表达。因此,*tyrp1a:eGFP* 转基因斑马鱼可以用于色素性障碍性疾病药物筛选,为色素障碍性疾病药物筛选提供了一种新模型。

## 参考文献

- [1] Nicolaidou E, Katsambas AD. Pigmentation disorders: hyperpigmentation and hypopigmentation [J]. *Clin Dermatol*, 2014, **32** (1):66–72.
- [2] Zhou J, Song J, Ping F, et al. Enhancement of the p38 MAPK and PKA signaling pathways is associated with the pro-melanogenic activity of interleukin 33 in primary melanocytes [J]. *J Dermatol Sci*, 2014, **73** (2):110–116.
- [3] Wu HL, Pang SL, Liu QZ, et al. 5-HT1A/1B receptors as targets for optimizing pigmentary responses in C57BL/6 mouse skin to stress [J]. *PLoS One*, 2014, **9** (2):e89663.
- [4] Pang S, Wu H, Wang Q, et al. Chronic stress suppresses the expression of cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis elements and melanogenesis [J]. *PLoS One*, 2014, **9** (5):e98283.
- [5] Zhou J, Shang J, Ping F, et al. Alcohol extract from *Vernonia anthelmintica* (L.) wild seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, **143** (2):639–647.
- [6] Wang TJ, An J, Chen XH, et al. Assessment of *Cuscuta chinensis* seeds effect on melanogenesis: comparison of water and ethanol fractions *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, **154** (1):240–248.
- [7] Wang CM, Jing LJ, Wei YJ, et al. Evaluation of antiosteoporotic activity for micro-amount asperosaponins V and VI by on the osteoporosis model using zebrafish [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2014, **45** (1):88–91.
- [8] Choi TY, Kim JH, Ko DH, et al. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds [J]. *Pigment Cell Res*, 2007, **20** (2):120–127.
- [9] Böhm M, Luger TA. Alpha-melanocyte-stimulating hormone. From bench to bedside [J]. *Hautarzt*, 2010, **61** (6):497–504.
- [10] Zon LI, Peterson RT. *In vivo* drug discovery in the zebrafish [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4** (1):35–44.
- [11] Boverhof DR, Chamberlain MP, Elcombe CR, et al. Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook [J]. *Toxicol Sci*, 2011, **121** (2):207–233.
- [12] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [M]. University of Oregon Press, 2000:55.
- [13] Jin EJ, Thibaudeau G. Effects of lithium on pigmentation in the embryonic zebrafish [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1449** (1):93–99.