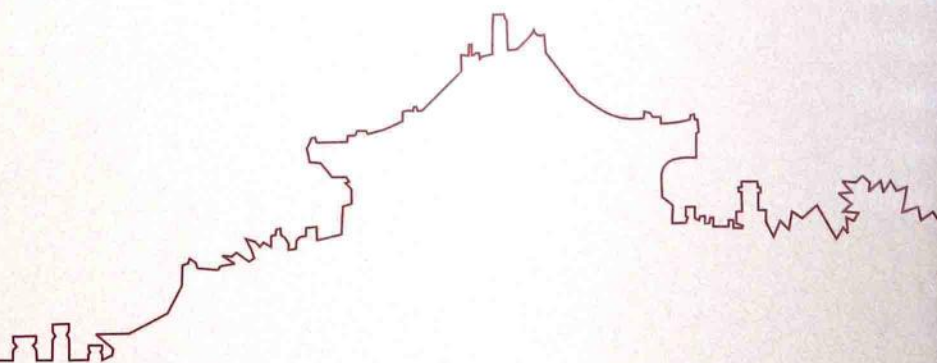


武汉大学优秀博士学位论文文库



# 氧化应激状态下 维持黑素小体蛋白低免疫原性的 分子机制研究

刘小明 著



WUHAN UNIVERSITY PRESS  
武汉大学出版社

武汉大学优秀博士学位论文文库



# 氧化应激状态下 维持黑素小体蛋白低免疫原性的 分子机制研究

刘小明 著

---



WUHAN UNIVERSITY PRESS

武汉大学出版社

## 图书在版编目(CIP)数据

氧化应激状态下维持黑素小体蛋白低免疫原性的分子机制研究/刘小明著. —武汉: 武汉大学出版社, 2014. 1

武汉大学优秀博士学位论文文库

ISBN 978-7-307-12330-4

I. 氧… II. 刘… III. 蛋白质—免疫原性—分子机制—研究 IV. Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 312627 号

责任编辑:任翔 责任校对:汪欣怡 版式设计:马佳

---

出版发行: 武汉大学出版社 (430072 武昌 珞珈山)

(电子邮件: cbs22@whu.edu.cn 网址: www.wdp.com.cn)

印刷:湖北恒泰印务有限公司

开本: 720 × 1000 1/16 印张: 6.75 字数: 91 千字 插页: 2

版次: 2014 年 1 月第 1 版 2014 年 1 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-307-12330-4 定价: 18.00 元

---

版权所有, 不得翻印; 凡购我社的图书, 如有质量问题, 请与当地图书销售部门联系调换。



## 武汉大学优秀博士学位论文文库

已出版：

- 基于双耳线索的移动音频编码研究 / 陈水仙 著
- 多帧影像超分辨率复原重建关键技术研究 / 谢伟 著
- Copula函数理论在多变量水文分析计算中的应用研究 / 陈璐 著
- 大型地下洞室群地震响应与结构面控制型围岩稳定研究 / 张雨霏 著
- 迷走神经诱发心房颤动的电生理和离子通道基础研究 / 赵庆彦 著
- 心房颤动的自主神经机制研究 / 鲁志兵 著
- 氧化应激状态下维持黑素小体蛋白低免疫原性的分子机制研究 / 刘小明 著
- 实流形在复流形中的全纯不变量 / 尹万科 著
- MITA介导的细胞抗病毒反应信号转导及其调节机制 / 钟波 著
- 图书馆数字资源选择标准研究 / 唐琼 著
- 年龄结构变动与经济增长：理论模型与政策建议 / 李魁 著
- 积极一般预防理论研究 / 陈金林 著
- 海洋石油开发环境污染法律救济机制研究 / 高翔 著  
——以美国墨西哥湾漏油事故和我国渤海湾漏油事故为视角
- 中国共产党人政治忠诚观研究 / 徐霞 著
- 现代汉语属性名词语义特征研究 / 许艳平 著
- 论马克思的时间概念 / 熊进 著
- 晚明江南诗学研究 / 张清河 著

# 总 序

创新是一个民族进步的灵魂，也是中国未来发展的核心驱动力。研究生教育作为教育的最高层次，在培养创新人才中具有决定意义，是国家核心竞争力的重要支撑，是提升国家软实力的重要依托，也是国家综合国力和科学文化水平的重要标志。

武汉大学是一所崇尚学术、自由探索、追求卓越的大学。美丽的珞珈山水不仅可以诗意栖居，更可以陶冶性情、激发灵感。更为重要的是，这里名师荟萃、英才云集，一批又一批优秀学人在这里砥砺学术、传播真理、探索新知。一流的教育资源，先进的教育制度，为优秀博士学位论文的产生提供了肥沃的土壤和适宜的气候条件。

致力于建设高水平的研究型大学，武汉大学素来重视研究生培养，是我国首批成立有研究生院的大学之一，不仅为国家培育了一大批高层次拔尖创新人才，而且产出了一大批高水平科研成果。近年来，学校明确将“质量是生命线”和“创新是主旋律”作为指导研究生教育工作的基本方针，在稳定研究生教育规模的同时，不断推进和深化研究生教育教学改革，使学校的研究生教育质量和知名度不断提升。

博士研究生教育位于研究生教育的最顶端，博士研究生也是学校科学研究的重要力量。一大批优秀博士研究生，在他们学术创作最激情的时期，来到珞珈山下、东湖之滨。珞珈山的浑厚，奠定了他们学术研究的坚实基础；东湖水的灵动，激发了他们学术创新的无限灵感。在每一篇优秀博士学位论文的背后，都有博士研究生们刻苦钻研的身影，更有他们的导师的辛勤汗水。年轻的学者们，犹如在海边拾贝，面对知识与真理的浩瀚海洋，他们在导师的循循善

诱下，细心找寻着、收集着一片片靓丽的贝壳，最终把它们连成一串串闪闪夺目的项链。阳光下的汗水，是他们砥砺创新的注脚；面向太阳的远方，是他们奔跑的方向；导师们的悉心指点，则是他们最值得依赖的臂膀！

博士学位论文是博士生学习活动和研究工作的主要成果，也是学校研究生教育质量的凝结，具有很强的学术性、创造性、规范性和专业性。博士学位论文是一个学者特别是年轻学者踏进学术之门的标志，很多博士学位论文开辟了学术领域的新思想、新观念、新视阈和新境界。

据统计，近几年我校博士研究生所发表的高质量论文占全校高水平论文的一半以上。至今，武汉大学已经培育出 18 篇“全国百篇优秀博士学位论文”，还有数十篇论文获“全国百篇优秀博士学位论文提名奖”，数百篇论文被评为“湖北省优秀博士学位论文”。优秀博士结出的累累硕果，无疑应该为我们好好珍藏，装入思想的宝库，供后学者慢慢汲取其养分，吸收其精华。编辑出版优秀博士学位论文文库，即是这一工作的具体表现。这项工作既是一种文化积累，又能助推这批青年学者更快地成长，更可以为后来者提供一种可资借鉴的范式亦或努力的方向，以鼓励他们勤于学习，善于思考，勇于创新，争取产生数量更多、创新性更强的博士学位论文。

武汉大学即将迎来双甲华诞，学校编辑出版该文库，不仅仅是为百廿武大增光添彩，更重要的是，当岁月无声地滑过 120 个春秋，当我们正大踏步地迈向前方时，我们有必要回首来时的路，我们有必要清晰地审视我们走过的每一个脚印。因为，铭记过去，才能开拓未来。武汉大学深厚的历史底蕴，不仅仅在于珞珈山的一草一木，也不仅仅在于屋檐上那一片片琉璃瓦，更在于珞珈山下的每一位学者和学生。而本文库收录的每一篇优秀博士学位论文，无疑又给珞珈山注入了新鲜的活力。不知不觉地，你看那珞珈山上的树木，仿佛又茂盛了许多！

李晓红

2013 年 10 月于武昌珞珈山

## 论文创新点

酪氨酸酶 (tyrosinase, Tyr)、酪氨酸酶相关蛋白-1 (tyrosinase-related protein1, Tyrp1) 和多巴色素异构酶 (dopachrome tautomerase, Dct) 三种黑素生成蛋白在黑素小体内组成一多酶复合体结构, 共同参与对黑素生成代谢途径的调控, 影响着生成黑素的质和量。除位于黑素生成代谢起始步骤的限速酶 Tyr 外, Dct 被认为是位于 Tyr 下游的一个关键调节靶点, 它能催化多巴色素异构重排生成 5, 6-二羟基吲哚羧酸 (DHICA), 瞬时清除中间产物所诱生的活性氧基, 在 Dct 酶缺乏时多巴色素快速则自发脱羧生成 5, 6-二羟基吲哚 (DHI) 和大量活性氧基 (reactive oxygen species, ROS)。

最近研究显示, 经 Dct 基因转染的 WM35 黑素瘤细胞能显著提高细胞自身对氧化应激 (oxidative stress) 的抵抗, 减少 ROS 诱导的 DNA 损伤。高水平 Dct 基因表达的黑素瘤细胞克隆较低水平表达的细胞克隆表现更明显对 UVB 照射和离子辐射的抵抗。Dct 在心肌细胞部位的异位表达, 甚至可能有助于增加房性心律失常的易感性。稳定和可溶性的 DHICA 单体吲哚分子可作为化学信使在皮肤炎症与免疫反应中介导黑素细胞与巨噬细胞之间的相互作用。显然, Dct 的生物学功能除了调节 DHICA 介导的抗氧化外, 还可能与黑素细胞对环境氧化应激的抵抗及免疫损伤密切相关。

小鼠 Dct 基因编码区第 194 位精氨酸被谷氨酰胺置换 (R194Q) 发生 slaty 突变 (Dct<sup>slat</sup>), 突变 Dct 酶蛋白的金属结合区域 (metal-binding domain A) 丧失与二价锌离子的结合能力, 其酶活性仅为野生型的 36%, slaty 小鼠表型出现明显的被膜颜色稀释。在本研究中, 我们从 Dct 突变 slaty 小鼠背部皮肤培养黑素细胞, 利用蔗糖梯度离心分离黑素小体蛋白, 并以此为模型对 Dct 介导的抗氧化在

维持黑素小体蛋白低免疫原性中的作用进行了研究。因此，本文的创新点在于：

1. 运用蔗糖梯度离心分离不同时期 Dct 突变 slaty MC 和野生型 melan-a MC 黑素小体蛋白，并对这两种黑素细胞衍生的早期和晚期黑素小体蛋白的免疫原性进行了比较分析，发现自 slaty MC 蔗糖梯度离心分离的晚期黑素小体蛋白表现为明显的免疫原性增强。

2. 通过给予 slaty MC 晚期黑素小体蛋白以过氧化氢 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ) 处理后，观察其免疫原性的改变，发现 slaty MC 晚期黑素小体蛋白对氧化应激更为敏感，证实了黑素小体蛋白发生氧化修饰可能为其免疫耐受破坏的先决条件之一。

3. 通过体外合成 DHI-优黑素和 DHI/DHICA(1:1)-优黑素，分别与晚期黑素小体蛋白孵育，并观察其在氧化应激状态下所诱导的体液和细胞免疫反应能力，证实了 DHICA 介导的抗氧化作用在维持黑素小体蛋白低免疫原性中发挥着重要作用。

## 摘 要

### 研究背景及目的:

黑素为一组单体吲哚分子(DHI-优黑素和 DHICA-优黑素), 通过共价键连接, 并与醌和蛋白质高度聚合而形成的一种异质性聚合物(heterogeneous copolymers)。这两种吲哚分子能以不同比例相互交联(cross-linked), 在共聚合过程中形成  $\pi$ -堆叠( $\pi$ -stacked)层状的大分子网络系统。在黑素生成过程中, 多个黑素生成蛋白参与对黑素生成代谢的调控, 共同影响着黑素生成的质与量。其中, Tyr 可催化 L-酪氨酸羟化生成 L-多巴和 L-多巴氧化生成 L-多巴醌, 为黑素生成的限速酶。另一个重要的调节靶点是 Dct 催化多巴色素异构重排生成 5, 6-二羟基吲哚羧酸(DHICA), 然而 DHICA 自身并不能发生聚合, 只有在 DHI 和 Tyr 存在时, DHICA 才被掺入到黑素聚合物中, 否则多巴色素快速自发脱羧生成 5, 6-二羟基吲哚(DHI) 和大量 ROS。已有研究证实, 三种黑素生成蛋白(Tyr、Tyrp1 和 Dct)在黑素小体内组成一多酶复合体结构, 目的是提高黑素生化合成效率, 维持酶蛋白自身的稳定和最大限度减少中间产物的细胞毒性。

在多酶复合体中, Dct 被认为是一种原位实时氧化应激清除剂(realtime scavenger), 它能瞬时清除中间产物所诱生的活性氧基, 通过调节 DHI/DHICA 比例, 动态影响着黑素生成和吲哚分子的生物聚合速率, 从而调整黑素细胞对 UVR 的防护能力, 最终使皮肤黑素生成增加。此外在黑素生化反应过程中, 黑素小体内部近似于封闭的结构被认为是黑素细胞最大程度地减少黑素前体物质细胞毒性的一种防护策略。黑素小体蛋白极有可能被包被于黑素小体的各个球形实体的内核中, 形成“盾样”屏障结构, 以保护蛋白免遭氧

化攻击。与此同时,黑素细胞还拥有强大的酶和非酶抗氧化防护机制(如谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、Fenton 反应等),以瞬时清除中间产物诱生的活性氧基,使黑素细胞和黑素小体蛋白免遭损伤。然而,对黑素小体蛋白与黑素聚合物之间的相互作用及其在高和或持续的氧化应激状态下,是如何免遭氧化应激损伤,以维持其低免疫原性的机制仍知之甚少。

体内外研究已证实过氧化氢( $H_2O_2$ )在白癜风患者表皮内大量堆积,甚至高达毫摩尔浓度。且在白癜风患者进展期皮损和/或血清中,已检测到的多种抗黑素小体蛋白的自身抗体和T淋巴细胞表达异常。功能性的黑素细胞障碍或缺失被认为是黑素小体蛋白自身反应T细胞或自身抗体介导的一种免疫反应。然而,白癜风黑素细胞 Dct 基因的功能调节失调和分子损伤机制是如何发生的,免疫系统是如何识别这些黑素小体内膜上隐蔽的抗原表位肽,黑素小体蛋白免疫耐受的状态又是如何遭到破坏的,至今仍未清楚。新近研究发现,在一定浓度  $H_2O_2$  作用下,甲状腺球蛋白可发生断裂,生成具有免疫反应性的多肽,这些多肽还能被桥本氏甲状腺炎病人血清中抗甲状腺球蛋白自身抗体所识别。因此我们推测,激发对黑素细胞的免疫破坏的始动因素可能为:(1)白癜风黑素细胞很可能在清除黑素生成中间产物及活性氧基方面存在一定缺陷,大量生成的活性氧基分子(尤其是  $H_2O_2$ )可对已发生聚合的黑素进行高强度的攻击,导致黑素聚合物中吡咯单位发生氧化断裂,使内部隐蔽的抗原表位肽暴露;(2)与吡咯单位相连的黑素小体蛋白发生断裂,生成具有免疫反应性的多肽如未能即使清除,则氧化修饰后的蛋白片段可能成为半抗原,具有强的免疫原性;(3)多巴色素异构酶(Dct)灭活使 DHICA/DHI 吡咯单位遭到破坏,丧失其抗氧化能力,甚至可能会表现为促氧化作用。

体内直接研究 Dct 调控的氧化应激改变对黑素小体蛋白免疫原性影响的早期上游事件十分困难,部分原因是由于 Dct 在黑素小体内与其他黑素生成蛋白密切结合形成多酶复合物结构。因此在本研究中,我们应用蔗糖梯度离心法从 Dct 突变 slaty MC(第194位精氨酸被谷氨酰胺置换, R194Q)和野生型 melan-a MC 分离不同时期的

黑素小体蛋白,并将这些蛋白免疫小鼠的后脚垫,体内测定这两种黑素细胞衍生的黑素小体蛋白的免疫原性以及不同氧化应激状态对其免疫原性的影响,以期揭示白癜风黑素细胞黑素小体膜上的这些自身蛋白抗原免疫耐受状态破坏的分子机制和激发抗黑素细胞自身免疫反应的始动事件。

### 研究方法 with 结果:

1) Dct 突变 slaty MC 和野生型 melan-a MC 内黑素生成相关蛋白酶活性及 ROS 水平测定:分光光度计法测定 Dct 突变 slaty MC 和野生型 melan-a MC 内 Tyr(主要是多巴氧化酶)、Dct 和过氧化氢酶活力。二氯荧光素( $H_2DCF-DA$ )标记法测定两种 MC 在经  $100\mu mol/L H_2O_2$  处理前后胞内 ROS 水平的变化。结果显示,与 melan-a MC 相比,slaty MC Dct 酶活力明显减低,而 Tyr、过氧化氢酶活性在两组 MC 之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。细胞内 ROS 水平测定结果显示, $H_2O_2$  处理前,slaty MC 和 melan-a MC 胞内的 ROS 相对荧光强度分别为  $6.33 \pm 0.17$  和  $5.42 \pm 0.14$ ,但处理后,slaty MC 胞内的 ROS 相对荧光强度( $18.29 \pm 0.54$ )急剧增加,与 melan-a MC( $9.14 \pm 0.28$ )相比,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

2) 蔗糖梯度离心分离 Dct 突变 slaty MC 和野生型 melan-a MC 黑素小体超微结构及其蛋白表达水平测定:将 Dct 突变 slaty MC 和野生型 melan-a MC 分别用 0.25% 胰酶/0.02% EDTA 消化,收获细胞后将细胞团块匀浆,蔗糖梯度离心分离黑素小体。蔗糖浓度梯度分别为 1.0、1.2、1.4、1.5、1.6、1.8 和 2.0mol/L,取 1.0 ~ 1.2mol/L 和 1.6 ~ 1.8mol/L 梯度界面行透射电子显微镜(TEM)观察黑素小体发育与成熟。分光光度计法和 Western Blot 蛋白印迹技术测定蔗糖梯度离心片段三种酪氨酸酶家族蛋白酶活性和蛋白表达水平。结果发现,两种 MC 匀浆团块颜色分别为棕褐色和奶黄色。蔗糖梯度离心后,可见离心条带分别位于 1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 和 2.0mol/L 蔗糖界面上层。透射电子显微镜观察发现,1.2 ~ 1.4mol/L 层蔗糖片段主要富含呈球形或卵圆形的 I-II 期黑素小体(早期黑素小体),1.6 ~ 1.8mol/L 层蔗糖片段主要富含以黑素沉积在纤维状横嵴上为主的 III-IV 期黑素小体(晚期黑素小体),与离心

分离的 melan-a MC 1.6 ~ 1.8mol/L 蔗糖片段相比, slaty MC 1.6 ~ 1.8mol/L 蔗糖片段则主要为 III 期黑素小体。Western Blot 蛋白印迹结果显示, slaty MC 晚期, 黑素小体蛋白 Det 活性明显减低, 与 melan-a MC 晚期黑素小体蛋白相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而酪氨酸酶活性则在两组黑素小体蛋白之间变化不明显。

3) 实验小鼠分组及免疫: 将 CB6F1 (BABL/C  $\times$  C57BL/6 杂交 F1 代, HLA 单倍型为  $H^{2d \times 2b}$ ) 小鼠分笼饲养, 分别给予 3 种因素处理黑素小体蛋白后免疫小鼠, 比较其免疫原性的改变: (1) 将两种 MC 分别用 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  处理 1h, 蔗糖梯度离心分离早期和晚期黑素小体蛋白, 测定黑素在维持黑素小体蛋白低免疫原性中所发挥的作用; (2) 将合成的 DHI-优黑素和 DHICA-优黑素分别与蔗糖梯度离心分离的两种 MC 晚期黑素小体蛋白进行孵育, 经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后来测定其抗氧化保护能力; (3) 将蔗糖梯度离心分离的两种 MC 晚期黑素小体蛋白分别经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理, 验证是否为 Det 突变 slaty MC 晚期黑素小体蛋白对氧化应激更为敏感。另以 OVA 作为阳性对照。结果发现, 黑素小体蛋白 (50  $\mu\text{g}$ ) 与等体积的弗氏完全佐剂 (CFA) 乳化皮下注射小鼠脚垫与鼠尾根部一周后, 肉眼可见小鼠免疫侧后肢沿脚垫向上逐渐肿胀。3 周后, 动物处死分离区域引流淋巴结时也发现, 小鼠腹股沟、肋肋引流淋巴结及脾脏明显肿大。

4) 氧化应激及合成的 DHI/DHICA (1:1)-优黑素对黑素小体蛋白免疫原性的影响: 将 T 淋巴细胞分离后盼蓝染色计数, 接种相同数目的 T 淋巴细胞至 96 孔板 ( $1 \times 10^5$ /孔), 加入终浓度分别为 0.3、1、3、10、30  $\mu\text{g/mL}$  的同等黑素小体蛋白, 于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  共同孵育 2 天。每孔加入 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -TdR 继续培养 14 ~ 16h, 多头样品细胞收集器收集细胞, 用  $^3\text{H}$ -TdR 掺入法测定黑素小体蛋白对 T 细胞的回忆增殖反应。用相同黑素小体蛋白包被酶标板, ELISA 法测定抗黑素小体蛋白抗体的终点稀释滴度。显微镜下观察发现, 自  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理的 slaty MC 分离获得的晚期黑素小体蛋白较早期黑素小体蛋白 T 淋巴细胞克隆体积增大, 胞浆增多而深染, 多呈圆形或椭圆形; 与 DHI/DHICA (1:1)-优黑素孵育的 slaty MC 晚期黑素小

体蛋白较 DHI-优黑素孵育组 T 淋巴细胞克隆数目明显减少, 单个克隆体积变小; 而与 melan-a MC 晚期黑素小体蛋白相比, slaty MC 晚期黑素小体蛋白经  $H_2O_2$  处理后较同等蛋白对照组 T 淋巴细胞克隆数目增多, 单个克隆体积增大。 $^3H$ -TdR 掺入法和 ELISA 法测定结果也显示, 晚期黑素小体蛋白尤其是 slaty MC 晚期黑素小体蛋白表现为明显的免疫原性增强; 与 DHI-优黑素孵育的晚期黑素小体蛋白可明显诱导 T 细胞增殖反应增强和特异性抗晚期黑素小体蛋白血清 IgG 滴度增高; 而且与 melan-a MC 相比, 从 slaty MC 分离的晚期黑素小体蛋白对氧化应激更为敏感, 表现为 T 淋巴细胞回忆增殖反应增强和特异性抗晚期黑素小体蛋白血清 IgG 滴度增高。

#### 研究结论:

Det 通过促进一定比例的 DHICA 单体掺入到 DHI 聚合骨架中, 影响着黑素的抗氧化能力, 从而在维持黑素小体蛋白低免疫原性中发挥着重要的作用。而 Det 突变则严重影响晚期黑素小体的发育成熟, 同时致 DHICA-优黑素合成减少, ROS 清除能力减低, 尤其是细胞在氧化应激状态下更为明显。slaty 突变(Det 基因编码区第 194 位精氨酸被谷氨酰胺置换(R194Q))严重影响 Det 蛋白立体结构和黑素生成蛋白复合体的稳定性, 在持续或高氧化应激状态下, 黑素小体蛋白可发生氧化修饰, 使部分的隐蔽抗原表位暴露, 增强黑素小体蛋白免疫原性。

**关键词:** 黑素小体; 多巴色素异构酶; 突变; 氧化应激; 免疫原性; 白癜风

# Abstract

## Backgrounds and Objectives

Eumelanin consists of one group of monomer indoles ( DHI-Eumelanin and DHICA-Eumelanin ) connecting through covalent bonds and highly polymerized with quinones and proteins while formed a kind of heterogeneous copolymers. Two key indole precursors, DHI and DHICA, cross-linked in various proportion, copolymerize to build a  $\pi$ -stacked layered macromolecular network system. Multiple proteins participate in melanogenesis to regulate the quality and quantity of melanin. Among them, tyrosinase is the key enzyme required for melanin production, which catalyzes the hydroxylation of L-tyrosine to L-Dopa and the oxidation of L-Dopa to L-Dopaquinone. Dct is another critical enzyme in the melanogenesis pathway that isomerizes dopachrome to dihydroxy indole carboxylic acid ( DHICA ). However, DHICA could not auto-polymerize, only in the presence of DHI and Tyr can it incorporate into melanin polymer, otherwise dopachrome will be rapidly decarboxylated to DHI accompanied with mass ROS. It has been revealed that the three melanogenic proteins ( Tyr, Tyrp1 and Dct ) compose a multi-enzyme complex in melanosomes in order to raise the efficiency of melanogenesis, maintain the proteins stability and reduce the cytotoxicity of intermediate products maximatily.

In the multienzyme complex, Dct is deemed to be a kind of in-situ real-time scavenger, which can immediately scavenge ROS induced by intermediate products, and dynamically change the rate of melanogenesis

and biopolymerization of indole molecules by modulating the proportion of DHI/DHICA to improve the protection capability of melanocytes against UVR, and finally increase melanogenesis of skin. Furthermore, in the process of melanin biochemical reaction, the nearly-closed structures inside the melanosomes are considered as a protection strategy of melanocyte to minimize the cytotoxicity of precursors. Melanosomal proteins are very likely to be embedded in the core of each entity in melanosomes, and eumelanin then functions as a shield to protect the entrapped proteins from potential oxidative insults. Meanwhile, melanocytes also provide with powerful enzyme and non-enzyme anti-oxidative defense mechanisms (such as glutathione peroxidase, catalase and Fenton reaction and so on) to immediately scavenge ROS induced by intermediate products and therein protect themselves. However, we still know little about how melanosomal proteins interact with melanin polymers and how melanosomal proteins are protected from oxidative stress damage even under the conditions of high and/or continuously oxidative stress for maintaining mechanism of immune hyporesponsiveness.

It is well documented that unusual accumulation of  $H_2O_2$  is present in the epidermis of active vitiligo, even up to micromolar level. In the skin lesions and/or serum of progressive vitiligo patients, multiple auto-antibodies to melanosomal proteins and expression abnormalities of T lymphocyte are both detected. The functional disorder or missing of melanocytes is regarded as a consequence of an immune response mediated by self-responsive T cells or auto-antibodies against melanosomal proteins. Up to now, how functional dysregulation and molecular injury for Dct gene of melanocytes in vitiligo occur, how the cryptic epitopes of entrapped melanosomal proteins are recognized by immune system and how immune tolerance of melanosomal proteins is broken remain unclear. Lately, researches discovered that, under certain concentration of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), thyroglobulin may crack and generate polypeptide with immunoreactivity, which may be identified by antithyroglobulin an-

antibodies in serum of Hashimoto's thyroiditis. Therefore, we assume that the initial causes inducing immune destruction of melanocyte are (1) There are some defects vitiligo melanocytes for eliminating intermediate products of melanogenesis and reactive oxygen species, the latter of which (especially  $H_2O_2$ ) may intensively attack melanin polymer, resulting in oxidative fissure of the indole unit within to expose cryptic epitopes to the immune system; (2) Melanosomal protein fragments bound to indole molecules cleave to polypeptides, which are oxidative modified, if not eliminated instantly, to haptens with high immunogenicity; (3) The disruption of DHICA/DHI indole units due to Dopachrome tautomerase (Dct) inactivation diminishes their anti-oxidation, even showing a pro-oxidant behavior.

However, *in vivo* researches on early upstream events that Dct mediating oxidative stress changes influenced the immunogenicity of melanosomal proteins were hampered, partially due to the multienzyme complex structure inside melanosome constituted by Dct close combining with other melanogenesis proteins. In this study, melanosomal proteins at different stages from Dct-mutant salty MCs (amino acid substitution (R194Q( Arg194→Gln))) that occurred spontaneously in the first metal-binding domain of the Dct protein) and wild-type melan-a MCs were purified with a sucrose gradient centrifugation, and immunized the hind footpad and the base of the tail of each mouse. To further elucidate the molecular mechanism of loss of immune tolerance toward autoantigens in the melanosome membranes and explore the early upstream initiating event involved in the autoimmune response to melanosomal proteins, *in vivo* assay was performed to determine the immunogenicity of melanosomal proteins derived from these two kinds of melanocyte under different oxidative stress.

## Methods and Results

### 1) Measurement of melanogenic proteases activities and ROS levels

in Det mutant slaty MCs and wildtype melan-a MCs Tyrosinase, mainly as dopa oxidase, Det and catalase activities in Det mutant slaty MCs and wildtype melan-a MCs were measured with a spectrophotometry. The melanocytes were incubated with  $100\text{ }\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  and the level of intracellular ROS was monitored by 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA) labeling. The results showed that the Det activity of slaty MCs was significantly lower than that of melan-a MCs, but there was no statistically significant difference in the activity of tyrosinase and catalase in these two groups of MCs ( $P > 0.05$ ). The analysis results of intracellular ROS level showed that the relative fluorescence intensity of slaty MCs and melan-a MCs before being treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  was  $6.33 \pm 0.17$  and  $5.42 \pm 0.14$ , respectively. However, the relative fluorescence intensity of slaty MCs being treated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  increased abruptly to  $18.29 \pm 0.54$  and there was a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) comparing to that of melan-a MCs ( $9.14 \pm 0.28$ ).

2) Observation of ultrastructure and protein expression of sucrose density gradient ultracentrifugation purified melanosomes in Det mutant slaty MCs and wildtype melan-a MCs The cells were harvested with 0.25% trypsin/0.02% EDTA and then homogenized on ice using 20 stokes of a Dounce glass-glass homogenizer. Melanosomes in the cellular homogenate were isolated with a sucrose density-gradient ultracentrifugation, the density gradients of sucrose were: 1.0, 1.2, 1.4, 1.5, 1.6, 1.8 and 2.0 mol/L, respectively. Sucrose interfaces between the 1.0 mol/L to 1.2 mol/L and the 1.6 mol/L to 1.8 mol/L were collected for a transmission electron microscopy (TEM) observation to examine the development and maturation of melanosomes. The protease activity of this family of three tyrosinases and their protein expression levels were assayed by spectrometry and Western Blot. The results showed that the color of homogenated cell aggregates of these two MCs was brown and milk yellow, respectively. Isolated by sucrose gradient ultracentrifugation, melanosomes were localized at various layers of the gradient. The