

自体移植皮片中 α -黑素细胞刺激素的表达与黑色素含量的相关性薛春雨¹, 邢新^{1*}, 李鑫¹, 李军辉¹, 张敬德¹, 蒋平², 龚志锦³

(1. 第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433; 2. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 3. 第二军医大学病理学教研室)

[摘要] **目的:**检测 α -黑素细胞刺激素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)及黑色素在不同类型自体移植皮片中的表达,并与自身正常皮肤作对照,初步认识 α -MSH 在自体移植皮片过度色素沉着中的作用。**方法:**利用免疫组织化学方法和银染-丽春红法检测自体移植皮片(包括全厚皮片、中厚皮片及刃厚皮片)与原供区及受区周围自体正常对照皮肤中 α -MSH 的蛋白表达及表皮中黑色素的含量。**结果:** α -MSH 的表达定位于表皮基底部黑素细胞、角质形成细胞胞质,在大部分自体移植皮片中呈阳性表达,皮片愈薄 α -MSH 的表达愈明显($P < 0.01$); α -MSH 在各类型皮片中的表达显著高于在自体正常对照皮肤中的表达($P < 0.01$); α -MSH 在受区周围与原供区正常对照皮肤中的表达无显著性差异。不同类型皮片表皮中黑色素的含量较自体正常对照皮肤中黑色素含量明显增加($P < 0.01$);不同类型皮片间表皮中黑色素的含量亦均有显著性差异($P < 0.01$),皮片愈薄黑色素的含量愈多,且皮片中黑色素的含量与 α -MSH 的表达量呈正相关。**结论:**自体移植皮片中黑色素的含量与 α -MSH 的表达量呈正相关,表明 α -MSH 在自体移植皮片中的高表达能使皮片中黑色素含量增加,在自体移植皮片过度色素沉着中起重要调控作用。

[关键词] α 促黑素; 皮肤移植; 移植,自体; 色素沉着过多; 黑素类**[中图分类号]** R 622.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0302-04**Correlation between expression of α -melanocyte-stimulating hormone and melanin level in human skin autografts**XUE Chun-yu¹, XING Xin^{1*}, LI Li¹, LI Jun-hui¹, ZHANG Jing-de¹, JIANG Ping², GONG Zhi-jin³ (1. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Department of Pathology, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To examine the expression of α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) and the melanin in different kinds of human skin autografts and in the normal skins, so as to elucidate the role of α -MSH in hyperpigmentation in the skin autografts. **Methods:** Immunohistochemical technique was employed to detect the expression and distribution of α -MSH in skin autografts (including the full thickness skin autografts, medium thickness skin autografts, razor-thin skin autografts, and normal skins adjacent to the donor site and the recipient site). Masson-Fontana staining technique was used to detect the melanin contents in all the above skin specimens. **Results:** The location of α -MSH expression was at the cytoplasm of melanocytes and keratinocytes in epiderm; α -MSH was positive in most skin autografts and its expression was higher in the thinner skin autografts. The expression of α -MSH in all types of skin autografts was significantly different from that in normal skin ($P < 0.01$); α -MS expression was also significantly different between all the skin autografts ($P < 0.01$); α -MSH expression in normal skin around donor site and recipient site had no statistical difference. The contents of melanin in skin autografts was obvious increased compared with that in normal skin ($P < 0.01$); the contents of melanin between all the skin autografts were also significantly different ($P < 0.01$). The melanin contents increased with the decrease of skin autografts thickness. The expression of α -MSH was positively correlated with the contents of melanin in epidermis. **Conclusion:** The expression of α -MSH in skin autografts is positively correlated with the contents of melanin in skin autografts. Overexpression of α -MSH may play an important role in hyperpigmentation process of skin autografts.

[KEY WORDS] alpha-MSH; skin transplantation; transplantation, autologous; hyperpigmentation; melanins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 302-305]

自体皮片移植是临床上常用的手术方法之一,在治疗多种原因引起的组织缺损、矫治外形及改善功能等方面发挥了重要作用。但自体皮片移植后常伴有不同程度的过度色素沉着,且常随皮片的类型

[基金项目] 国家自然科学基金(30371473)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30371473)。**[作者简介]** 薛春雨,博士,讲师、主治医师, E-mail: xcyfun@sina.com

* Corresponding author. E-mail: xingxin56@yahoo.com.cn

不同而程度不同,皮片愈薄(如刃厚皮片)色素沉着愈明显。本组实验使用免疫组织化学方法、银染-丽春红法检测自体移植皮片(包括全厚皮片、中厚皮片及刃厚皮片)中 α -黑素细胞刺激素(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)的蛋白表达及表皮中黑色素的含量,进一步认识 α -MSH在自体移植皮片过度色素沉着中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验标本 本组实验所需标本均取自颈部自体移植皮片术后1年,局部需再次矫正而在我科手术的患者。共取自体全厚移植皮片16例、自体中厚移植皮片18例及自体刃厚移植皮片23例,同时在每例移植皮片受区周围及原供区腹部分别取正常皮肤作对照。患者年龄7~32岁,中位年龄19岁,男36例,女21例,所取标本患者均无垂体疾病、肾上腺疾病、传染病、皮肤病及免疫性疾病,局部无感染、溃疡,术前未应用激素及免疫抑制剂治疗,局部亦未行放射治疗。标本切取后在半小时内放入液氮瓶,然后置入-80℃冰箱中保存。20倍体积的4%中性甲醛固定,按常规石蜡包埋。

1.2 主要试剂 α -MSH抗体为美国Pharmaceuticals公司产品。SABC免疫组化染色试剂盒(美国Vector公司),DAB(美国Sigma公司)。Fontana银液、氯化金、丽春红(上海天平化学试剂厂)。JVC彩色摄像头(TK-C1381,JVC公司,日本),彩色病理图像分析系统(四川大学图像图形研究所)。

1.3 免疫组化步骤 (1)切片脱蜡至水;(2)加过氧化物酶阻断剂(3% H_2O_2)以阻断内源性过氧化物酶活性,每张切片50 μ l,10 min;(3)切片浸入0.01 mol/L PBS缓冲液中,微波处理10 min;(4)加鼠抗人 α -MSH单克隆抗体,每张切片50 μ l,37℃,60 min;(5)加生物素化山羊抗小鼠IgG,每张切片50 μ l,37℃,20 min;(6)加SABC溶液,每张切片50 μ l,37℃,20 min。以上各步均经0.01 mol/L PBS(pH 7.4)冲洗,5 min 3次;(7)置新鲜配制的0.01% DAB/0.03% H_2O_2 显色液中显色,蒸馏水冲洗,苏木精复染1 min;(8)脱水,透明,中性树胶封片。同时用PBS代替 α -MSH单克隆抗体作阴性对照。

1.4 银染-丽春红染色 各组标本石蜡包埋后,切片脱蜡至蒸馏水浸洗,再浸入Fontana银液15 h;蒸馏水及时浸洗2次,氯化金处理2 min;蒸馏水浸洗2次,Ponceau处理3 min;无水乙醇脱水,过滤纸吸干;二甲苯透明和中性树胶封片。

1.5 结果观察与判定 α -MSH阳性产物定位于细胞胞质内,显微镜下细胞质内出现黄或棕黄色颗粒或团块者为阳性表达。采用二级计分法判定结果:阳性细胞计数<5% 0分;阳性细胞计数5%~25% 1分;阳性细胞计数25%~50% 2分;阳性细胞计数50%~75% 3分;阳性细胞计数>75% 4分。染色强度得分:淡黄1分,黄或深黄2分,褐或棕黄色3分。两者相加<2分阴性(-);2~3分阳性(+);4~5分中等阳性(++);6~7分强阳性(+++)。

黑色素呈黑色定位于表皮黑素细胞、角朊细胞胞质。胶原纤维呈红色,背景淡黄色;拍照,扫描成像分析仪处理系统进行光密度扫描,计算灰度值。

1.6 统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件包进行统计学处理, α -MSH在各组标本之间阳性率的比较均采用Wilcoxon秩和检验;黑色素在各组标本中的含量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。

2 结果

α -MSH在各类型皮片中的表达显著高于在自体正常对照皮肤中的表达($P<0.01$); α -MSH在不同类型皮片中的表达差异亦均有显著性($P<0.01$),皮片愈薄 α -MSH的表达愈明显; α -MSH在受区周围与原供区正常对照皮肤中的表达差异无显著性。见表1。 α -MSH的表达定位于表皮基底部黑素细胞、角质形成细胞胞质,为黄或棕黄色颗粒,呈局灶性或弥漫性分布。在大部分自体移植皮片中呈阳性表达,在表皮基底层处形成棕褐色条带(图1)。

表1 自体移植皮片与正常对照组
免疫组化染色结果

Tab 1 Immunohistochemical staining
results of skin autografts and normal skin

Group	n	Expression of α -MSH			
		-	+	++	+++
Razor-thin skin autografts	23	0	1	7	15
Medium thickness skin autografts	18	0	2	5	11
Full thickness skin autografts	16	0	4	5	7
Normal skin around donor site	57	6	39	8	4
Normal skin around recipient site	57	4	37	10	6

The expression of α -MSH in razor-thin skin autografts, medium thickness skin autografts, and full thickness skin autografts was significantly stronger than that in normal skin around donor site and normal skin around recipient site($P<0.01$). The expression of α -MSH in razor-thin skin autografts was significantly stronger than that in medium thickness skin autografts($P<0.01$), and that in medium thickness skin autografts was significantly stronger than that in full thickness skin autografts($P<0.01$).

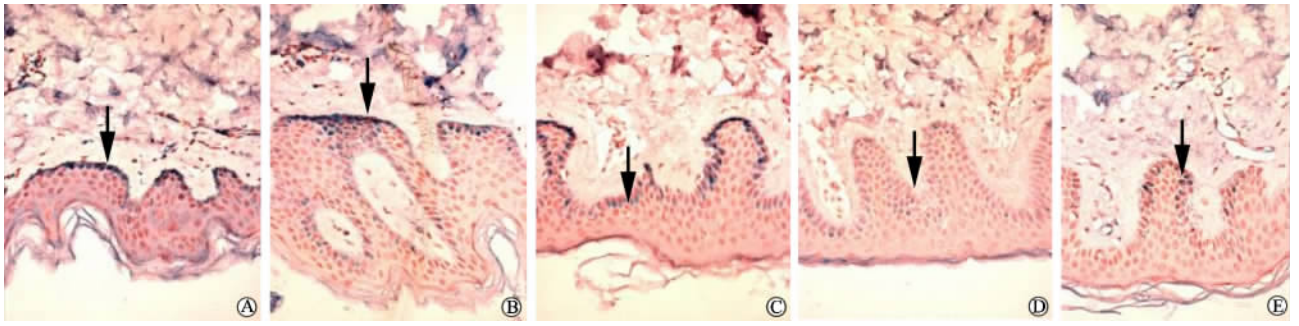


图1 α -MSH在自体移植皮片与正常皮肤中的表达

Fig 1 Expression of α -MSH in human skin autografts and normal skin (IH, $\times 400$)

A: Razor-thin skin autografts; B: Medium thickness skin autografts; C: Full thickness skin autografts; D: Normal skin around recipient site; E: Normal skin of donor site

在自体移植皮片表皮基底细胞中黑色素含量较皮片原供区和受区周围正常皮肤中明显增多;表皮基底层黑色素细胞中黑色素小体明显增多,在突起末端亦见黑色素小体增多,与黑色素细胞相邻近的角朊细胞中黑色素颗粒明显增多且位于角朊细胞细胞核的上方,在棘层和颗粒层细胞中可见少许黑色素颗粒(图2),经计算机扫描计算各组灰度值,自体全厚移植皮片组为 0.54 ± 0.04 ;自体中厚移植皮片组为 $0.73 \pm$

0.07 ;自体刃厚移植皮片组为 0.91 ± 0.08 ;皮片原供区正常皮肤组为 0.24 ± 0.03 ;皮片受区周围正常皮肤组为 0.29 ± 0.06 。不同类型皮片表皮中黑色素的含量较自体正常对照皮肤中黑色素含量明显增加($P < 0.01$);不同类型皮片表皮中黑色素的含量差异亦均有显著性($P < 0.01$),皮片愈薄黑色素的含量愈多,且皮片中黑色素的含量与 α -MSH 的表达量呈正相关。

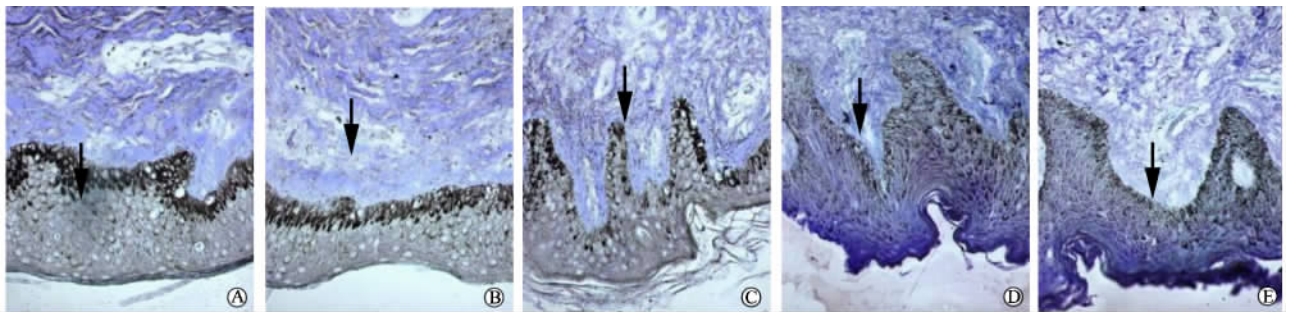


图2 黑色素在自体移植皮片与正常皮肤中的分布表达

Fig 2 Expression of melanin in human skin autografts and normal skin (Masson Fontana-Ponceau, $\times 400$)

A: Razor-thin skin autografts; B: Medium thickness skin autografts; C: Full thickness skin autografts; D: Normal skin around recipient site; E: Normal skin of donor site

3 讨论

α -MSH 来源于其前体前阿黑皮素 (pro-opiomelanocortin, POMC),可在脑垂体及胃肠道、皮肤、性腺等外周部位产生^[1]。目前研究表明^[2-3],外周皮肤中存在的 α -MSH 在调控正常皮肤色素沉着过程中起重要作用。自体皮片移植后常伴有不同程度的过度色素沉着现象,且常随皮片的类型不同而程度不同,皮片愈薄(如刃厚皮片)色素沉着愈明显,故 α -MSH 在自体移植皮片过度色素沉着过程中是

否同样存在调控作用,值得进一步研究观察。

本组实验研究通过免疫组化方法观察到所有自体移植皮片及大部分正常皮肤黑色素细胞、角质形成细胞均有 α -MSH 颗粒沉积,呈局灶性或弥漫性分布。而且自体移植皮片与正常对照皮肤相比 α -MSH 表达量明显增加,皮片愈薄 α -MSH 表达愈为明显。同时利用银染-丽春红染色方法观察到不同类型皮片表皮中黑色素的含量较自体正常对照皮肤中黑色素含量明显增加,皮片愈薄黑色素的含量愈多,且皮片中黑色素的含量与 α -MSH 的表达量呈正相关。

从临床亦可观察到大部分自体移植皮片呈过度色素沉着表现,且常随皮片的类型不同而程度不同,皮片愈薄(如刃厚皮片)色素沉着愈明显;同时我们观察到部分自体移植皮片颜色与正常对照皮肤相近,皮片中 α -MSH的表达与正常对照皮肤亦无显著差异,这从另一侧面说明了皮片中 α -MSH表达的量与皮片色素沉着程度的相关性。

目前研究表明,表皮黑素细胞、角质形成细胞可因多种因素刺激通过自分泌和旁分泌机制产生 α -MSH^[4], α -MSH通过与黑素细胞表面黑皮素1受体(melanocortin-1 receptor, MC-1R)结合而激活环磷酸腺苷/蛋白激酶A(cAMP/PKA)途径,使黑素细胞黑素合成、分泌增加^[5]。 α -MSH在刺激黑素合成增加的同时,优先刺激优黑素合成,并促进黑素体扩散,在黑素细胞、角质形成细胞内呈“核上帽”形成分布。

α -MSH还可促进黑素细胞树突的形成,而黑素细胞是通过树突与角质形成细胞相连,这样使黑素小体更易转运到角质形成细胞中^[6];黑素转运的加速,通过反馈机制又进一步加速了黑素的合成,且树突状的黑素细胞更能抵抗凋亡^[7]。

α -MSH同时也是一种内源性神经免疫调节肽,具有抗炎性细胞因子效应,能保护黑素细胞免受细胞介导的细胞毒性作用,同时亦能抑制肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)在黑素细胞上诱导细胞间粘连分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达,同时能保护黑素细胞免受超氧化物损害^[8-9]。故 α -MSH在自体移植皮片中的过度表达可增加表皮黑素细胞在应激状态下的生存率,刺激大量优黑素的合成、分泌,并促进优黑素小体的转运扩散,使皮片呈过度色素沉着表现。

目前已知紫外线是一种重要的皮肤色素沉着刺激因素, α -MSH可以调节紫外线对黑素细胞树突的影响,并且可以作为紫外线诱导黑素合成的旁分泌介导体,同时紫外线能上调黑素细胞、角质形成细胞上MC-1R的功能和表达,并使 α -MSH和MC-1R协同性增加^[10],故紫外线和 α -MSH可协同作用增强黑素细胞合成黑素的作用,使皮片色素沉着更趋明显。本组实验所取标本均处于颈部,为相对暴露部位,易受日光紫外线的刺激,这既可增强皮片中 α -MSH表达,又可与皮片中 α -MSH协同作用加速黑素合成,使自体移植皮片呈过度色素沉着表现。处

于非暴露部位皮片,较少受日光紫外线刺激,其皮片中 α -MSH的表达与皮片色素沉着程度是否具有相关性目前还不清楚,有待于进一步研究观察。

自体皮片移植后过度色素沉着的机制比较复杂,可能是多种原因相互作用的结果。本组研究结果显示 α -MSH在自体移植皮片中呈过度表达,皮片中黑色素的含量与 α -MSH的表达量呈正相关,与临床上观察到大部分自体移植皮片呈过度色素沉着表现相一致,表明 α -MSH在自体移植皮片中的高表达能使皮片中黑色素含量增加,在自体移植皮片过度色素沉着中起重要调控作用,但其确切机制仍有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Millington G W. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors[J]. Clin Exp Dermatol, 2006, 31:407-412.
- [2] Thody A J, Ridley K, Penny R J, et al. MSH are present in mammalian skin[J]. Peptides, 1983, 4:813-816.
- [3] Barnetson R S, Ooi T K, Zhuang L, et al. [Nle4-D-Phe7]- α -melanocyte-stimulating hormone significantly increased pigmentation and decreased UV damage in fair-skinned Caucasian volunteers[J]. J Invest Dermatol, 2006, 126:1869-1878.
- [4] Kauser S, Thody A J, Schallreuter K U, et al. A fully functional proopiomelanocortin/melanocortin-1 receptor system regulates the differentiation of human scalp hair follicle melanocytes[J]. Endocrinology, 2005, 146:532-543.
- [5] Tsatmali M, Ancans J, Thody A J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides[J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50: 125-134.
- [6] Cardinali G, Ceccarelli S, Kovacs D, et al. Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2005, 125:1190-1199.
- [7] Lei T C, Virador V M, Vieira W D, et al. A melanocyte-keratinocyte coculture model to assess regulators of pigmentation in vitro[J]. Anal Biochem, 2002, 305:260-268.
- [8] Kadekaro A L, Kavanagh R, Kanto H, et al. α -Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes[J]. Cancer Res, 2005, 65:4292-4299.
- [9] Hedley S J, Gawkrödger D J, Weetman A P, et al. α -Melanocyte stimulating hormone inhibits tumour necrosis factor α -stimulated intercellular adhesion molecule-1 expression in normal cutaneous human melanocytes and in melanoma cell lines[J]. Brit J Dermatol, 1998, 138: 536-543.
- [10] Scott M C, Suzuki I, Abdel-Malek Z A. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation[J]. Pigment Cell Res, 2002, 15:433-439.

[收稿日期] 2006-12-20

[修回日期] 2007-02-01

[本文编辑] 曹静