

刺鼠信号蛋白对自体移植皮片中黑素细胞功能的影响

薛春雨¹, 邢 新¹, 李 鑫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. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433; 3. 长海医院病理科)

[摘要] **目的:**通过检测刺鼠信号蛋白对自体移植皮片中黑素细胞功能的影响,进一步认识自体移植皮片过度色素沉着的原因。**方法:**建立过度色素沉着的自体移植皮片动物模型,皮片下分别注射刺鼠信号蛋白和生理盐水(对照组)。利用 RT-PCR 方法检测刺鼠信号蛋白作用后自体移植皮片($n=12$)黑素细胞中酪氨酸酶 mRNA 的表达,银染-丽春红染色后检测皮片中黑素的含量,并与对照组($n=13$)及正常豚鼠皮肤($n=5$)相比较。**结果:**经刺鼠信号蛋白作用后,皮片中酪氨酸酶 mRNA 表达和黑素含量均明显减少,与对照组皮片和正常豚鼠皮肤相比其差异具有显著性意义($P<0.01$)。**结论:**刺鼠信号蛋白在自体移植皮片中,能竞争性拮抗 α -黑素细胞刺激素的黑素合成作用,使皮片着色能力降低。进一步证明了皮片移植后表皮细胞中 α -黑素细胞刺激素的表达上调是皮片呈过度色素沉着的重要原因。

[关键词] 刺鼠信号蛋白; α -黑素细胞刺激素; 酪氨酸酶; 皮肤移植; 色素沉着过多

[中图分类号] R 622.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0969-04

Influence of agouti signal protein on melanocyte function in skin autograft

XUE Chun-yu¹, XING Xin¹, LI Li¹, 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, Changhai Hospital, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of agouti signal protein (ASIP) on melanocyte function in skin autograft, so as to understand the cause of hyperpigmentation in skin autograft. **Methods:** Guinea pigs were used to establish a skin autograft hyperpigmentation model. The skin autografts in model animals were injected with ASIP or normal saline (control). RT-PCR technique was used to detect the tyrosinase mRNA expression in melanocytes of skin autografts and Masson-Fontana staining technique was used to detect the melanin contents in skin autografts in ASIP treatment group; and the results were compared with those of control group ($n=13$) and normal guinea pigs ($n=5$). **Results:** The expression of tyrosinase mRNA and the melanin content in skin autografts in ASIP treatment group were both lower than those of control group and normal guinea pigs ($P<0.01$). **Conclusion:** The results indicate that ASIP can antagonize the melanogenic effect of α -MSH, resulting in reduced pigmentation in skin autografts. It is also indicated that overexpression of α -MSH in epidermal cells after skin grafting is an important cause of hyperpigmentation in skin autografts.

[KEY WORDS] agouti signal protein; α -melanocyte-stimulating hormone; tyrosinase; skin transplantation; hyperpigmentation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9): 969-972]

获得性色素沉着,如自体皮片移植后出现的过度色素沉着,是困扰整形外科医生的一大难题,许多学者对此问题作了研究,但都未能找到有效的预防 and 治疗方法。我们在研究中发现,自体皮片移植后 α -黑素细胞刺激素 (α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH) 及其受体黑皮素 1 受体 (melanocortin-1 receptor, MC-1R) 的表达增高,刺激表皮黑素细胞中酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR) 活性增加、合成黑素的功能增强,在皮片过度色素沉着过程中起重要调控作用^[1-3]。本组实验使用 α -MSH 的内源性拮抗蛋白——刺鼠信号蛋白 (agouti signal protein, ASIP) 直接作用于自体移植皮片,检测皮片中

TYR mRNA 的表达变化与皮片中黑素含量的变化,观测 ASIP 对皮片中黑素细胞功能的影响,进一步认识自体移植皮片过度色素沉着的原因,并为其治疗寻找一种新的途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物 黑色雄性豚鼠 60 只,体质量 250~300 g,由第二军医大学实验动物中心提供。

[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

密闭式阳光不能直射的动物房饲养,室温(20±1)℃,湿度40%~50%,自动控制光照12h,普通饲料喂养,饮水器午前午后给水。

1.2 主要试剂与与仪器 TRIzol RNA 抽提试剂(TRIzol Reagent)、逆转录酶(Superscript™ II RNaseH+Reverse Transcriptase)为Gibco BRL公司产品。PCR扩增试剂盒购自TaKaRa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 引物序列 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。TYR引物序列为,上游:5'-TTG GCA GAT TGT CTG TAG CC-3',下游:5'-AGG CAT TGT GCA TGC TGC TT-3',PCR产物长度为284 bp。用作RT-PCR内参照的 β_2 微管球蛋白(β_2 -MG)引物序列为:上游:5'-TAG ATT GCT ATG TGT CTG GGT-3',下游:5'-CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT-3',PCR产物为247 bp。

1.4 ASIP对豚鼠自体移植皮片的作用 豚鼠术前禁食水6~8h,氯胺酮20 mg/kg、地西洋2 mg/kg腹腔注射麻醉后,俯卧位固定豚鼠四肢,背部机械脱毛,术区常规安尔碘消毒,铺无菌巾单。在豚鼠背部用亚甲蓝标记一约3.5 cm×2.0 cm大小范围,沿标记线切取此区域全厚皮片,皮片原位移植,5-0丝线缝合固定并加压包扎。术后7d去除加压包并拆除缝线。

为避免皮片在移植及存活过程中因组织的损伤、修复而引起的炎性反应产生的多种炎症介质和细胞因子对色素沉着过程的影响,故在皮片移植成活1个月后再施加干预因素,此时因组织的损伤、修复而引起的炎性反应相对减退。动物因不能耐受手术或其他原因在饲养过程死亡的,以及移植皮片未能完全愈合的动物予以剔除,不进入后续实验阶段。

豚鼠皮片移植术后1个月,符合条件的42例,随机分为2组,每组21例,将ASIP稀释成 10^{-9} mol/L浓度,用1 ml注射器均匀注射1 ml于ASIP作用后自体移植皮片组豚鼠皮皮下,注射后局部轻度按摩,每2d注射1次,共4次。另一组注射生理盐水。注射后2周分别切取两组豚鼠皮片,对于动物因不能耐受手术或其他原因在饲养过程中死亡的标本不取,皮片局部因药物注射或其他原因发生感染或破溃的亦剔除不取。标本液氮移存后置-80℃冰箱中保存。

经上述实验得到ASIP作用后自体移植皮片标本共12例,对照自体移植皮片标本13例,另取未经实验过程的正常雄性豚鼠皮肤5例作对照。

1.5 TYR mRNA的RT-PCR半定量 按RNA试剂盒提取各组标本表皮中RNA,并取10 μ g RNA进行逆转录。取逆转录产物cDNA用上述合成的上下游引物分别进行PCR扩增,对比分析TYR和 β_2 -MG mRNA表达水平。扩增条件均为:94℃变性3 min;94℃45 s,56℃45 s,72℃1 min,循环30次,72℃延伸5 min。取PCR产物5 μ l,2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,UV-200紫外透射分析仪观察,用NIH Scion Image软件,分析PCR产物,计算TYR/ β_2 -MG的比值。

1.6 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15h;蒸馏水及时浸洗2次,氯化金处理2 min;蒸馏水浸洗2次,Ponceanu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闭;镜检,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。

1.7 统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件包进行统计学处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR半定量结果 见图1。电泳条带经EB染色后计算机灰度扫描求积定量,计算各组TYR/ β_2 -MG比值,ASIP作用后自体移植皮片组为 0.42 ± 0.07 ,对照自体移植皮片组为 0.75 ± 0.04 ,正常豚鼠皮肤组为 0.46 ± 0.06 。结果经统计学处理,可知,自体移植皮片表皮组织及正常皮肤表皮组织之间TYR mRNA表达差异有显著性意义($P<0.01$);TYR mRNA在经ASIP作用后自体移植皮片组织中表达与在对照组自体移植皮片组织中的表达相比有显著差异($P<0.01$);而经ASIP作用后自体移植皮片表皮组织及正常皮肤表皮组织之间TYR mRNA表达差异无显著性意义($P>0.05$)。

2.2 银染-丽春红染色 各组标本经Masson Fontana-Ponceanu染色,黑色素呈黑色,主要定位于表皮黑素细胞、角朊细胞胞质,胶原纤维呈红色,背景呈淡黄色。在自体移植皮片表皮基底细胞中黑素含量较正常皮肤中明显增多;自体移植皮片经ASIP作用后表皮基底细胞中黑素含量明显减少(图2)。图片经计算机扫描计算,正常豚鼠皮肤组灰度值为

0.44±0.06, 对照自体移植皮片组为 0.83±0.04, ASIP 作用后自体移植皮片组为 0.43±0.07。ASIP 作用后自体移植皮片组皮片表皮中黑素含量与对照自体移植皮片组皮片表皮中黑素含量相比, 其差异

具有显著性意义($P < 0.01$); ASIP 作用后自体移植皮片组皮片中黑素含量与正常豚鼠皮肤中黑素含量的差异无显著性意义($P > 0.05$)。

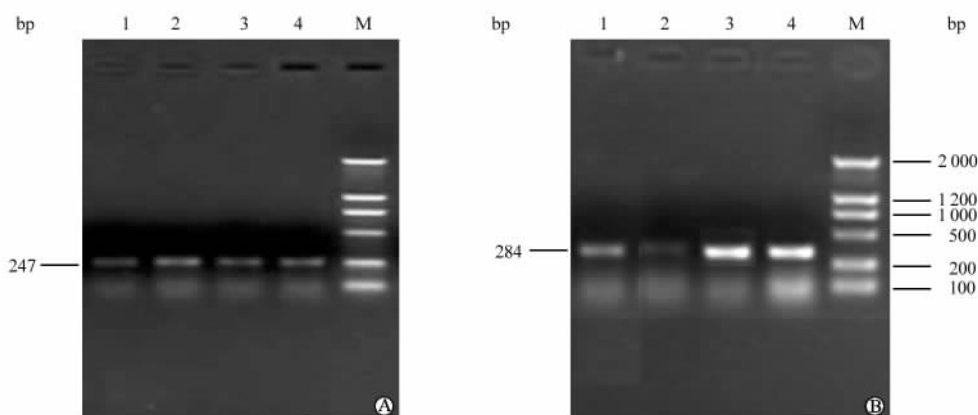


图 1 TYR mRNA 在各组标本中的表达

Fig 1 Expression of tyrosinase mRNA in different samples

A: β_2 -MG; B: TYR mRNA; 1: Normal guinea pig skin; 2: Skin autografts after ASIP treatment; 3, 4: Control skin autografts; M: Marker

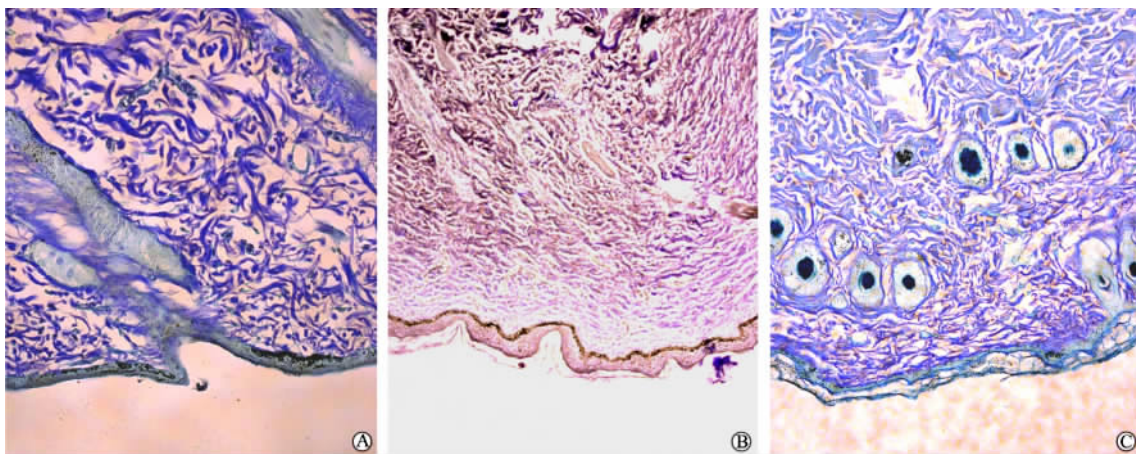


图 2 黑色素在各组标本中的分布

Fig 2 Expression of melanin in different samples (Masson Fontana-Ponceau, $\times 200$)

A: Normal guinea pig skin; B: Skin autografts after ASIP treatment; C: Control skin autografts

3 讨论

目前研究表明哺乳动物中皮肤及毛发可视颜色主要取决于黑素小体内黑色素的含量和化学组成成分, 而黑色素主要有两种存在形式: 棕-黑色的优黑素和黄-红色的暗黑素, 这两种黑素在黑素小体内有着不同的生物化学结构和超微结构, 优黑素的含量和比率增加则皮肤色素沉着加深, 暗黑素的含量和比率增加则皮肤着色能力降低^[3]。正常皮肤黑素细胞内优黑素、暗黑素的合成比例是由编码 MC-1R 扩展基因适当表达及编码 ASIP 的刺鼠基因正常表达

来调控。皮肤中黑色素主要在表皮黑素细胞中由 TYR 及酪氨酸酶相关蛋白 (tyrosinase-related protein, TRP) 合成, 表皮黑素细胞经不同刺激因素作用后 TYR 及 TRP 的表达不同, 致表皮黑素细胞中合成黑色素的形式及量不同, 从而引起皮肤色素沉着程度不同^[4,5]。

ASIP 是由邻近黑素细胞的乳头状细胞分泌的旁分泌信号蛋白, 含 137 个氨基酸, 由刺鼠基因位点 (agouti gene locus) 编码, ASIP 的表达是导致暗黑素的合成^[6]。因表皮黑素细胞表达的 MC-1R 同时也是 ASIP 的受体, 与对 α -MSH 有相似的亲和力;

在体外培养的黑素细胞培养液中加入人的重组纯化 ASIP, ASIP 与表皮黑素细胞表达的 MC-1R 结合后,可明显观察到黑素细胞内 cAMP 水平下降, TYR 的活性下调,且与 ASIP 的剂量呈明显相关,而 TRP-1、2 活性抑制,优黑素合成明显下降,而暗黑素的合成明显增多,可占黑素总量的 91%,说明 ASIP 与 MC-1R 结合主要是刺激暗黑素的合成。同时观察到 ASIP 能抑制 α -MSH 与 MC-1R 的结合,而 α -MSH 亦能抑制 ASIP 与 MC-1R 的结合,即 ASIP、 α -MSH 与 MC-1R 的结合是互斥的,可能是一种配基与受体结合后可使受体的立体异构发生改变,使另一配基不能与受体结合,从而使其不能发挥生物学作用^[7]。通过转染使黑素细胞或黑瘤细胞表达 ASIP 亦明显可见 TYR 的活性下调,TRP-1、2 活性抑制,优黑素合成明显下降,而暗黑素的合成比率增多。虽然 ASIP 作用黑素细胞后 TYR 的活性降低,但 TYR 的表达也是暗黑素合成时必需^[8,9]。故 ASIP 与 MC-1R 结合后能抑制 α -MSH 对 MC-1R 的激动作用,同时使黑素细胞从合成优黑素向合成暗黑素转变,使皮肤着色能力降低。本组 RT-PCR 方法检测 ASIP 作用后自体移植皮片表皮组织中 TYR 的 mRNA 表达,并与正常豚鼠皮肤及对照自体移植皮片比较,结果显示 ASIP 作用后皮片中 TYR 的表达较正常豚鼠皮肤及对照自体移植皮片组明显下调,而对照自体移植皮片组 TYR 的表达与正常豚鼠皮肤相比无明显差异;同时亦检测到 ASIP 作用后皮片中黑素含量较对照自体移植皮片组亦明显下降。

综上可说明 ASIP 作用于皮片后,ASIP 与 α -MSH 竞争结合黑素细胞表面 MC-1R,使黑素细胞内 TYR 的表达下调、活性抑制,从而拮抗 α -MSH 合成优黑素等作用,使皮片着色能力降低;这进一步说明了皮片移植后表皮细胞中 α -MSH 的表达上调

使表皮黑素细胞合成黑素增多是皮片呈过度色素沉着的重要原因,这为临床自体皮片过度色素沉着的基因调控、基因治疗和化学治疗的机制及效果提供了实验依据,为提高自体皮片移植术后的美容效果,扩大自体皮片移植的适用范围及解决自体皮片移植供区受限的问题提供了一个重要选择途径,并为其他获得性皮肤色素沉着或色素脱失性疾病的治疗提供有益的借鉴。

[参考文献]

- [1] 薛春雨,邢新,李鑫,等.黑皮素受体-1在自体中厚移植皮片中的表达[J].中国实用美容整形外科杂志,2004,15:64-68.
- [2] 薛春雨,邢新,李鑫,等. α -黑素细胞刺激素在自体中厚移植皮片中的表达[J].中华整形外科杂志,2004,20:468-471.
- [3] 薛春雨,邢新,李鑫,等.酪氨酸酶在自体中厚移植皮片中的表达[J].医学研究生学报,2005,18:421-424.
- [4] Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides[J]. J Histochem Cytochem, 2002, 50: 125-134.
- [5] 薛春雨,邢新,李鑫. α -黑素细胞刺激素对皮肤色素的调控作用[J].医学研究生学报,2004,17:97-99.
- [6] McNulty JC, Jackson PJ, Thompson DA, et al. Structures of the agouti signaling protein[J]. J Mol Biol, 2005, 346:1059-1070.
- [7] Barsh GS, Ollmann MM, Wilson BD, et al. Molecular pharmacology of agouti protein *in vitro* and *in vivo* [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 885:143-152.
- [8] Bonilla C, Boxill LA, Donald SA, et al. The 8818G allele of the agouti signaling protein (ASIP) gene is ancestral and is associated with darker skin color in African Americans[J]. Hum Genet, 2005, 116:402-406.
- [9] Voisey J, Kelly G, Van Daal A. Agouti signal protein regulation in human melanoma cells[J]. Pigment Cell Res, 2003, 16: 65-71.

[收稿日期] 2006-01-06

[修回日期] 2006-05-23

[本文编辑] 曹静

《脊柱微创外科技术》已出版

由侯铁胜教授和贺石生博士主编的《脊柱微创外科技术》一书已由人民军医出版社于2006年7月出版,国内多位著名脊柱外科专家参与了该书的撰写。该书内容丰富、详实,系统而全面地介绍了目前临床上常用的脊柱微创外科技术。

全书共分28章,详细介绍了显微镜、脊柱内窥镜、计算机导航技术、经皮穿刺术、小切口、射频技术在椎间盘切除术、椎管减压术、脊柱内固定术、脊柱畸形松解术、椎体成形术、后凸成形术及腰椎融合术应用的适应证、禁忌证、具体操作方法和步骤,并结合专家们丰富临床经验对这些技术进行了客观评价和展望,内容新颖、科学、严谨,有助于低年资骨科医师全面提高有关脊柱微创外科治疗的理论知识和临床技能,也可作为开展脊柱微创外科工作的指导用书,以及供中、高级骨科医师阅读参考。

全国各大新华书店、医药卫生书店有售。人民军医出版社购书请与邮购部王兰联系。

电话:010-51927252或010-51927300转8705, E-mail: wanglan@pmpm.com.cn