

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.18.008

308 nm 激光联合胡椒碱促进毛囊外根鞘无色素黑色素细胞黑色素合成

吴栋杰

(广西柳州市人民医院皮肤性病科 545001)

[摘要] **目的** 研究 308 nm 激光联合胡椒碱对毛囊外根鞘无色素黑色素细胞(AMMC)黑色素合成及 TRP-1、TRP-2 蛋白表达的影响。**方法** 体外培养的 AMMC 分为联合疗法组、308 nm 准分子激光组、胡椒碱组、阳性对照组及空白对照组,作用 24、72、120 h,测定黑色素水平,激光共聚焦显微镜观察并定量分析细胞内酪氨酸酶相关蛋白酶 TRP-1、TRP-2 的表达情况。**结果** 联合治疗组、308 nm 准分子激光组、胡椒碱组、阳性对照组均不同程度地促进黑色素合成,其中以联合治疗组促进作用最强。联合治疗组和胡椒碱组的 0.5 mmol/L 胡椒碱在 72 h 内对黑色素水平促进作用最明显。对于 TRP-1 的表达,浓度为 0.5 mmol/L 的胡椒碱即可以对其产生促进作用,但对 TRP-2 生成无促进作用。308 nm 准分子激光对 TRP-1、TRP-2 生成均有促进作用。**结论** 308 nm 准分子激光联合胡椒碱能促进 AMMC 细胞的黑色素合成。

[关键词] 308 nm 激光;胡椒碱;黑素细胞,无色素;毛囊外根鞘;黑色素合成
[中图分类号] R739.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)18-2471-03

308 nm excimer laser combined with piperine activated the production of melanin in amelanotic melanocytes in outer root sheath of hair

Wu Dongjie

(Department of Skin Venereal, People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou, Guangxi 545001, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of 308 nm excimer laser combined with piperine activated the production of melanin in amelanotic melanocytes in outer root sheath of hair(AMMC),and promote the expression of TRP-1、TRP-2 protein.
Methods AMMC were in incubated for 24、72、120 h in different groups(combination therapy group,the 308 nm excimer laser group,the piperine group,the positive control group and the control group). Then the melanin content was measured. The expression change of TRP-1 and TRP-2 in cells were observed by laser scanning confocal microscopy.
Results Four groups increased the AMMC cellular melanin content, Four different groups could promote melanin content at different degrees. The combination therapy group played the strongest role in promoting function. And the function was the most obviously in 24 h,it also was concentration dependent. 0.5 mmol/L piperine in combination group and piperine group could produce promoting effect of within 72 h on the expression of TRP-1,but its role was not evident in the expression of TRP-2. 308 nm excimer laser had effects both on TRP 1 and TRP 2.
Conclusion 308 nm excimer laser combination with piperine can increase the activation of amelanotic melanocytes in outer root sheath of hair.

[Key words] 308 nm laser;piperine;melanocyte,amelanotic;outer root sheath of hair;melanogenesis

本研究前期实验对小鼠 B16 黑色素瘤细胞黑色素合成研究中,应用 308 nm 激光结合胡椒碱对其作用进行分析,发现两者结果具有较强的促黑色素合成作用。本文继续深入研究联合治疗对毛囊外根鞘无色素黑色素细胞(AMMC)黑色素合成及 TRP-1、TRP-2 蛋白表达的影响,并对其中可能的作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 美国 Gibco 公司生产的 RPMI 1640 培养基、美国 Sigma 公司生产的胰蛋白酶和二甲基亚砷(DMSO)、杭州四季青生物材料有限公司生产的新小牛血清以及美国 Amersco 公司生产的脱氧胆酸钠,剩余试剂则全部都是分析纯。美国 Sigma 公司的左旋多巴(DL-Dopa)以及蘑菇酪氨酸酶;美国 Corning 公司生产的 96 孔培养板、澳大利亚 Clinibio 公司生产的 Clinibio 128C 酶联免疫检测仪以及上海精密分析仪器有限公司生产的 722 分光光度计。DL-Dopa 采用三蒸水将其进行配置成溶液 2.5 mL,蘑菇酪氨酸酶则被制成 25

IU/mL。在患者治疗中,所选用的则为美国 Photomedex 公司生产的 Xtrac 巅峰准分子激光系统,其波长为 305 nm,借助于氯化氙气体进行工作。

1.1.2 药品 将中国药品生物检验提供的胡椒碱配成原液,其浓度为 20 mg/mL,并将其放置在一 20 ℃ 保存。在临时使用中,可以采用培养液调整浓度,根据既往研究将胡椒碱的最终浓度分别确定为 1.0、0.5、0.1 mmol/L^[1]。江苏溧阳制药厂生产的 8-甲氧补骨脂素作为阳性对照药,将其采用 DMSO 溶解。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 AMMC 放置在 RPMI 1640 培养基中进行常规培养,其中培养基中含有 10% 小牛血清、100 μg/mL 链霉素以及 100 U/mL 青霉素,其培养条件为 37 ℃、5% CO₂,细胞生长达到 95% 融合时,0.25% 胰蛋白酶进行消化,采用锥虫蓝染色法进行活细胞计数,并在 250 mL 玻璃培养瓶中进行接种,接种密度 1×10⁴/cm²。接种 24 h 后,即可以采用含有药物的新鲜培养基,对其再次进行 72 h 孵育,收获、计数细胞,将其

均分成两份,进行黑色素水平测定和激光共聚焦荧光定量分析。为了降低培养基中其他成分对结果的影响,采用不含小牛血清的 DMEM 基础培养基在实施实验之前,将进行一次换液。

1.2.2 实验分组 将其分成 5 组,第 1 组为联合疗法组,照射能量为 300 mJ/cm² 的 308 nm 激光,根据作者此前的研究结果设定照射时间为 7 s,并结合胡椒碱,其浓度分别为 1.0、0.5、0.1 mmol/L;第 2 组为 308 nm 准分子激光组,单纯能量照射,方法同联合疗法组;第 3 组则为胡椒碱组,单纯使用胡椒碱,方法同联合疗法组;第 4 组为阳性对照组,采用 308 nm 准分子激光结合 8-甲氧补骨脂素(0.1 mmol/L);第 5 组则为空白对照组,单纯加入溶媒介质。

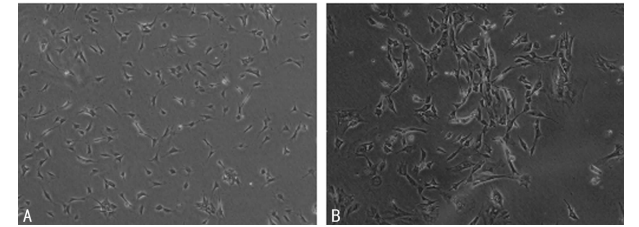
1.2.3 黑色素水平测定 依照 Ando 等^[2]方法对黑色素水平进行测定实施改良,在细胞收获之后,细胞计术采用血细胞计数器对其进行 4 次测量取平均数,PBS 清洗 2 次,加入双蒸水 200 μL 悬浮细胞,再加入 1∶1 的乙醇和乙醚 1 mL 混合液,室温下放置 15 min,采用 3 000 r/min 转速进行 5 min 离心,经过沉淀之后,在其中加入 1 mL 的 1 mol/L NaOH(其中含有 10% DMSO),再将其在 80 ℃ 条件下放置 30 min,进行黑色素溶解,在 NaOH 中添加 4 mL 双蒸水进行稀释(浓度为 0.2 mol/L)。采用分光光度计进行测量,黑色素水平的计算方法:(药物处理组 A475/细胞数)/(空白对照组 A475/细胞数)×100。各个实验重复 4 次。

1.2.4 激光共聚焦荧光定量分析 按照文献^[3]的方法,对其实施荧光定量分析以及激光共聚焦显微镜观察。将各组细胞种植于盖玻片上 3、5、7 d,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,在室温中 4%多聚甲醛液固定,养血清封闭细胞 10 min,随后吸掉。加入一抗溶液:兔抗人 TRP2 抗体(1∶150)、兔抗人 TRP1 抗体(1∶150)以及兔抗人酪氨酸酶抗体(1∶150),37 ℃ 下孵育 60 min。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 二抗溶液(1∶100),37 ℃ 孵育 30 min。PBS 缓冲液冲洗盖玻片 3 次,滤纸吸掉 PBS 缓冲液,在待测样品中分别加入 0.2 mL PBS,激光共聚焦显微镜进行观察和分析,激发光波长选择 488 nm。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 308 nm 准分子激光及胡椒碱的影响作用 传代培养的 AMMC 形状是纺锤形。在通过胡椒碱和 308 nm 准分子激光照射之后,其细胞出现细胞体增大,树状突起增加和延长,见图 1。



A:传代培养的 AMMC;B:308 nm 准分子激光联合胡椒碱处理的 AMMC。

图 1 308 nm EL 联合胡椒碱对 AMMC 细胞形态的影响(激光共聚焦显微镜×100)

2.2 不同组对 AMMC 活性和黑素合成的影响 胡椒碱能够

对黑素水平的增加产生促进作用,作用最明显的是在 72 h,使用 0.5 mmol/L 胡椒碱的联合治疗组、胡椒碱组与空白对照组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。对比分析 0.1 mmol/L 8-甲氧补骨脂素作用 120 h 和 0.5 mmol/L 胡椒碱作用 72 h,其黑素量的增加显著(*t* = 3.50, *P* < 0.05)。见表 1。

表 1 各组 AMMC 黑色素水平($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	胡椒碱浓度 (mmol/L)	作用时间(h)	黑色素水平
联合治疗组	0.1	24	336.30±15.27
		72	410.05±30.22
		120	395.26±37.15
	0.5	24	310.13±52.41 ^a
		72	510.25±12.55 ^{bc}
		120	487.20±56.33 ^{bc}
	1.0	24	200.91±66.83 ^a
		72	400.11±14.23
		120	350.13±49.23 ^b
胡椒碱组	0.1	24	110.11±18.24
		72	146.75±15.36
		120	178.26±36.14 ^a
	0.5	24	140.56±67.88
		72	300.72±11.85 ^b
		120	270.10±82.17 ^b
	1.0	24	130.91±67.83
		72	250.44±79.63 ^b
		120	200.50±49.14 ^b
308 nm 准分子激光组	—	24	287.55±89.32
	—	72	330.33±20.88 ^b
	—	120	368.32±15.87 ^b
阳性对照组	—	24	274.18±31.65 ^a
	—	72	375.70±78.25 ^b
	—	120	408.44±15.33 ^b
空白对照组	—	24	100
	—	72	100
	—	120	100

^a:*P* < 0.05, ^b:*P* < 0.01,与空白对照组同时间点比较; ^c:*P* < 0.05,与阳性对照组同时间点比较;—:此项无数据。

表 2 0.5 mmol/L 胡椒碱作用 72 h 后对 AMMC 黑素合成相关酶的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(h)	TRP-1	TRP-2
联合治疗组	72	341±15	220±17
胡椒碱组	72	158±10	46±5
308 nm 准分子激光组	72	242±21	224±14
阳性对照组	72	270±20	290±15
空白对照组	72	50±4	50±8

2.3 不同观察组对 AMMC TRP-1、TRP-2 蛋白表达的影响

和空白对照组比较,胡椒碱组黑色素细胞 TRP-1 的表达量明显增高($t=6.34, P<0.01$);TRP-2 的表达量与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。308 nm 准分子激光组对 TRP-1、TRP-2 均有促进作用,较空白对照组高($t=10.64, P<0.01$; $t=9.32, P<0.01$)。见表 2。

3 讨 论

在临床上,白癜风是一种非常常见的皮肤色素脱失性疾病,对患者的容貌具有严重影响。虽然临床中不断出现新的治疗方法,但是其治疗效果依然不尽如人意,因此需要进一步对其临床治疗方法和理论进行完善。其中白癜风的发病重点是黑色素细胞(MC)的缺失。MC 发育学研究已证实:位于毛囊外根鞘的 AMMC 是表皮 MC 的主要来源-储库,在多种因素作用下,休眠状态 AMMC 被活化,经过黏附等一系列环节迁移到表皮并进一步增殖、活化,完成表皮着色过程^[4]。这一过程也同样存在于白癜风复色中。临床现象也支持上述观点。白癜风白斑的复色开始是从毛囊口,在其周围一开始有色素性皮岛的形成,继而逐渐扩大。因此促进 AMMC 的活化、黏附对增加白癜风皮损区 MC 的数量和功能极为关键。在白癜风临床治疗中,308 nm 准分子激光是新出现的一种治疗手段,其光源的组成则主要是氯原子和氩原子形成的二聚体,之后将中波紫外线波长范围^[5]的脉冲气体激光连续发出。目前 308 nm 准分子激光在临床治疗中的良好效果已经得到国内外临床的统一公认^[6-7]。但是关于其治疗作用机制,临床研究还集中在其对 T 细胞凋亡的促进作用以及其对角质形成细胞产生的 MC 抑制的干预作用方面,另外对于其能够对 AMMC 产生直接影响也具有研究,但是关于黑色素生成的促进作用研究不广泛。

MC 合成黑色素过程复杂,在其合成过程中酪氨酸酶占有重要地位,在上调生物合成过程中,很多药物可通对这种限速酶的分子结构实施翻译后的重修饰,以加强其生物学活性,促进其作用的发挥^[8-10]。在酪氨酸酶基因中 TRP-1 以及 TRP-2 共同属于是其超家族成员,其对于黑色素化合过程的后续步骤具有催化作用,其和酪氨酸酶在黑色素细胞中的存在形式则为多酶复合体,并且其复合体具有一定的稳定作用。其中 TRP-1 的催化作用比较弱,经过研究只有在含有黑色素的细胞中,才会有 TRP-1 mRNA 的存在,因此也就能够说明在优黑色素生成过程中,TRP-1 具有重要作用^[11]。TRP-2 则是在多巴色素转变为 5,6-二羟基吡啶-2-羧酸(DHICA)起催化作用,控制着 DHICA/DHI 的比例,具有加速黑色素生成作用。激光共聚焦定量分析荧光染色后的 AMMC 细胞 TRP-1 和 TRP-2 的表达发现胡椒碱作用后 TRP-1 的表达量较空白对照高($P<0.01$),而 TRP-2 的表达量与空白对照组无差异($P>0.05$),这与马慧军等^[12]、方俊杰等^[13]的结论一致。提示胡椒碱的促表皮 MC 黑色素合成的作用可能通过上调 TRP-1 的表达发挥作用而与 TRP-2 无明显关系。因为 TRP-1 和优黑色素生成关系较为密切,因此我们也就能够预测胡椒碱对于 MC 中的优黑色素合成具有促进作用^[14]。另外,观察结果显示,308 nm 准分子激光对 TRP-1、TRP-2 均有促进作用,对黑色素合成有明显促进作用。

研究结果表明,308 nm 准分子激光联合胡椒碱对 AMMC 黑色素合成及 TRP-1、TRP-2 蛋白表达的促进作用较空白对照组有明显增加。本次研究为白癜风的临床治疗提供新的方

法,同时还确定了联合胡椒碱促进 308 nm 准分子激光黑色素的生成作用以及其对 AMMC 的直接活化作用,为以后的研究提供了条件。

参考文献

- [1] 马慧军,朱文元,王大光. 胡椒碱等 6 种中药单体促进黑色素瘤 Cloudman S91 细胞株黑素合成的研究[J]. 临床皮肤科杂志,2004,33(3):145-147.
- [2] Ando H, Kondoh H, Ichihashi M, et al. Approaches to identify inhibitor of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase [J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(4):751-761.
- [3] 马慧军,朱文元,王大光. 甲氧沙林对体外培养的人毛囊外根鞘无色黑素细胞的激活作用[J]. 临床皮肤科杂志,2004,33(8):471-473.
- [4] Rafael F. Vitiligo and the melanocyte reservoir[J]. Indian J Dermatol, 2009, 54(4):313-318.
- [5] Al-Shobaili HA. Treatment of vitiligo patients by excimer laser improves patients' quality of Life[J]. J Cutan Med Surg, 2014, 18(5):1-7.
- [6] Faria AR, Tarle RG, Dellatorre G, et al. Vitiligo-part 2-classification, histopathology and treatment[J]. An Bras Dermatol, 2014, 89(5):784-790.
- [7] 汪亚华,袁锋,倪娜. 表皮细胞移植术联合 308nm 准分子激光治疗白癜风的临床观察[J]. 安徽医学,2012,33(9):1147-1149.
- [8] Iga N, Otsuka A, Tanioka M, et al. Improvement of Anti-TNF- α Antibody-Induced palmoplantar pustular psoriasis using a 308-nm excimer light [J]. Case Rep Dermatol, 2012, 4(3):261-264.
- [9] Alhowaish AK, Dietrich N, Onder MA. Effectiveness of a 308-nm excimer laser in treatment of vitiligo; a review [J]. Lasers Med Sci, 2013, 28(3):1035-1041.
- [10] Wang F, Cao Y, Zhao W, et al. Taxol inhibits melanoma metastases through apoptosis induction, angiogenesis inhibition, and restoration of E-cadherin and nm23 expression[J]. J Pharmacol Sci, 2003, 93(2):197-203.
- [11] Shirasugi I, Kamada M, Matsui T, et al. Sulforaphane inhibited melanin synthesis by regulating tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 74(3):579-582.
- [12] 马慧军,朱文元,王大光,等. 中药单体胡椒碱促进表皮黑素细胞黑素合成的实验研究[J]. 临床皮肤科杂志,2005, 34(1):14-16.
- [13] 方俊杰,杨卫忠. 抗氧化剂治疗动脉瘤性蛛网膜下腔出血研究进展[J]. 中外健康文摘,2010,07(35):30-31.
- [14] 吴一菲,曹萍,王晓川,等. 308 nm 激光联合胡椒碱在白癜风动物模型中的应用研究[J]. 中国现代医生,2013,51(28):13-15.