DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.054
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1245-03

论著

bFGF对人毛囊黑素细胞增殖、活化和黑素合成作用的研究

周春丽,叶庆俏,郝 飞,刁庆春 (第三军医大学附属西南医院皮肤科,重庆 400038)

提 要:目的 研究碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对人毛囊黑素细胞(Hair follocle melanocyte, HFM)增殖活化和黑素合成的影响。方法 体外培养正常人HFM,观察不同浓度bFGF(0.3~1.2 ng/ml)对HFM形态、增殖、酪氨酸酶活性和黑素含量的影响。结果 bFGF处理HFM 7 d后,HFM树突增多延长,酪氨酸酶活性和黑素含量增加显著高于对照组($P<0.01$),以0.6 ng/ml组为著。结论 bFGF能诱导HFM增殖、酪氨酸酶活性和黑素合成增加。

关键词:人毛囊黑素细胞;bFGF;黑素合成
中图法分类号:R322.995;R329.28;R392.11 文献标识码:A

Effect of bFGF on proliferation, activation and melanin synthesis of human hair follicle melanocytes *in vitro*

ZHOU Chun-li, YE Qing-yi, HAO Fei, DIAO Qing-chun (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the activation, proliferation and melanin synthesis of cultured human hair-follicle melanocytes(HFM). **Methods** Normal human hair follicle melanocytes were isolated and cultured till logarithmic period of second passage, and then different concentrations of bFGF (0.3~1.2 ng/ml) were added to study the effects on cellular morphologic changes, proliferation, tyrosinase activity and melanin contents of cultured HFM. **Results** In the cells after 7 days' bFGF treatment, the dendrites were elongated and enriched, and tyrosinase activity and melanin contents were increased compared with those of untreated cells ($P<0.01$), especially when the concentration is 0.6 ng/ml. **Conclusion** bFGF can induce HFM proliferation, tyrosinase activity and melanin synthesis.

Key words: human hair-follicle melanocytes; basic fibroblast growth factor; melanin synthesis

近年来研究发现白癜风白斑区表皮内的黑素细胞(Melanocyte, MC)确是消失而非功能失活[1],所以治疗恢复期的MC只能由外源提供,现多认为来源于毛囊外根鞘[2,3]。毛囊中休眠的MC在白癜风时并不受累,可在治疗作用下重新活化,由无功能状态转变为功能状态,成为白癜风治疗恢复时MC的来源[2]。目前对它的调控因素和机制知之尚少。本实验用正常人头皮,建立体外毛囊黑素细胞(Hair follicle melanocyte, HFM)培养,观察不同浓度碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)对其形态、增殖活化和黑素合成的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

EMEM培养基(Gibco公司),角朊细胞无血清培养基(Keratinocyte serum-free medium, KSFM, Gibco公司),胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, Hyclone公司),0.25%~0.50%分离酶(Sigma公司),霍乱毒素(Cholera toxin, CT, Sigma公司),12-氧-十四酰佛波醇-13-乙酸酯(12-o-tetradecanoylphobol-13-acetate, TPA, Sigma公司),新霉素类似物(geneticin, G418, Sigma公司),异丁甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX, Sigma公司),bFGF(Sigma公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,上海华美生物工程公司),MGM[4](EMEM内添加10% FBS, 0.2 μg/ml CT, 50 nmol/L TPA, KSFM),0.1%左旋多巴(L-dopa, Sigma公司)

1.2 细胞培养

正常人头皮提供者年龄14~40岁(交通意外死亡者,家属同意提供)。去除表皮和真皮上部1 mm,剪成宽约0.5 cm,长约3~4 cm的皮条,浸没在0.25%~0.50%分离酶液中,4 ℃ 12~16 h。游离毛囊再用0.25%胰酶37 ℃消化10~15 min,制成单细胞悬液,加适量黑素细胞生长培养基(Melanocyte growth medium, MGM)将细胞吹匀后滴入35 mm塑料培养皿或培养瓶中,接种密度为3~5×10^4/cm^2。在37 ℃含5%CO_2,湿度为95%的孵箱中培养4~5周,传代1~2次即获得约5×10^6~10×10^6的纯HFM。差别胰酶处理[5]去除污染的角质形成细胞,使用G418去除污染的成纤维细胞。

1.3 bFGF对HFM增殖活化和黑素合成的影响

取传2代后的对数生长期HFM,0.25%胰酶消化后,调细胞浓度为5×10^4/ml,加入96孔板中,每孔100 μl。实验设定bFGF在MGM中的终浓度分别为0.3、0.6和1.2 ng/ml。在37 ℃,5%CO_2饱和湿度条件下培养,观察3、5、7 d时的指标变化,每一处理因素重复测定3次。由于不活化的HFM无酪氨酸酶活性和几乎不含黑素,难以进行酪氨酸酶活性和黑素含量测定,所以采用的HFM在含10^{-4} mol/L IBMX的MGM中培养3 d,而后换MGM培养2 d,再用于上述两指标的测定。

1.3.1 HFM增殖测定 MTT法[8]。测每个处理组A_{490}值,设置培养液空白对照调零,按下列公式计算促增殖率。

作者简介:周春丽(1971—),女,河南省郑州市人,硕士,主治医师,主要从事黑素细胞方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68755126
收稿日期:2001-11-20;修回日期:2001-12-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$促增殖率=\frac{加\ bFGF\ A_{490}值-不加\ bFGF\ A_{490}值}{不加\ bFGF\ A_{490}值-培养液\ A_{490}值}\times 100\%$$

1.3.2 HFM 形态观察 培养 1 周后，高倍镜下观察 HFM 的形态，同时做多巴染色。

1.3.3 酪氨酸酶活性测定 参照 Ando 等[6,7] 报道的方法。酪氨酸酶活性用每个处理组 A_{475} 值占培养液空白对照组 A_{475} 值的百分率来表示。

1.3.4 黑素含量测定 参照 Ando 等[6] 报道的方法。黑素含量用每个处理组 A_{400} 值占培养液空白对照组 A_{400} 值的百分率来表示。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPMR 数理统计程序包在计算机上进行单因素方差分析(PDA-2 程序)。

2 结果

2.1 HFM 增殖的测定

与对照组相比，bFGF 在 0.3 ng/ml 时即出现明显的促增殖作用($P<0.01$)，在 0.6 ng/ml 时达最大效果($P<0.01$)，在 1.2 ng/ml 时反而较 0.3 ng/ml 时降低。3 个浓度组均随时间的延长而促增殖率增加，见表 1。

表 1 bFGF 对 HFM 增殖作用的结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Results of HFM proliferation induced by bFGF($\bar{x}\pm s$)

Concentration of bFGF(ng/ml)	Rate of proliferation (%)		
	3d	5d	7d
Control	0.2±0.4	0.4±0.3	0.5±0.4
0.3	14.5±2.2 *	28.9±6.1 *	40.1±11.3 *
0.6	25.3±2.8 *△	43.5±7.9 △	59.7±11.1 △
1.2	10.1±0.9	22.0±1.2	36.8±9.8

*: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.05$ *vs* 0.3 and 1.2 ng/ml group

2.2 酪氨酸酶活性的测定

与对照组相比，bFGF 在 0.3 ng/ml 作用 5 d 时即出现酪氨酸酶活性明显增加($P<0.05$)，在 0.6 ng/ml 时达最大效果($P<0.01$)，在 1.2 ng/ml 时较 0.3 ng/ml 时降低。3 个浓度组均随时间的延长而促酶活性增加，见表 2。

表 2 不同浓度 bFGF 对 HFM 酪氨酸酶活性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Results of tyrosinase activity of HFM induced by different concentrations of bFGF($\bar{x}\pm s$)

Concentration of bFGF (ng/ml)	Tyrosinase activity(%)		
	3d	5d	7d
Control	100.04±1.35	106.96±3.85	110.62±4.28
0.3	121.49±10.23	167.56±20.36 *	181.43±21.72 *
0.6	143.26±19.07	226.32±45.95 *	270.87±39.65 *△
1.2	110.03±16.21	131.33±14.76	147.02±21.05

*: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.01$ *vs* 0.3 and 1.2 ng/ml group

2.3 黑素含量的测定

与对照组相比，bFGF 在 0.3 ng/ml 作用 5 d 时即出现黑素合成明显增加($P<0.01$)，在 0.6 ng/ml 时达最大效果($P<0.01$)，在 1.2 ng/ml 时较 0.3 ng/ml 时降低，但仍较对照组高($P<0.01$)。3 个浓度组均随时间的延长而促黑素合成作用增加，见表 3。

表 3 不同浓度 bFGF 对 HFM 黑素合成的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Melanin synthesis of HFM induced by different concentrations of bFGF($\bar{x}\pm s$)

Concentration of bFGF (ng/ml)	Melanin synthesis(%)		
	3d	5d	7d
Control	101.48±2.07	108.32±5.27	114.83±6.03
0.3	141.71±23.85	208.78±40.27 *	229.01±36.26 *
0.6	171.11±27.41 *	302.93±49.72 *△	331.20±53.93 *△
1.2	130.09±17.37	167.03±31.63 *	173.56±27.51 *

*: $P<0.01$ *vs* Control; △: $P<0.01$ *vs* 0.3 and 1.2 ng/ml group

2.4 HFM 形态的观察

培养 1 周后，各浓度组 HFM 突起明显增多达 3~5 支，胞体增大，高倍镜下胞浆内可见色素颗粒。多巴阳性，以 0.6 ng/ml 为著，见图 1，2。

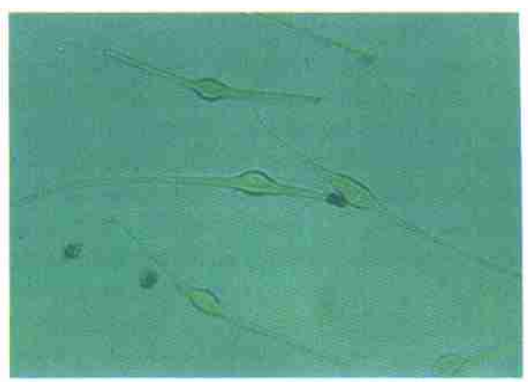


图 1 人 HFM 纯培养 14 d (×400)

Fig 1 Human hair follicle melanocyte cultured for 14 d (×400)



图 2 人 HFM，bFGF(0.6 ng/ml)处理 7 d (多巴染色×400)

Fig 2 Human hair follicle melanocyte, 7 d after treatment with bFGF(0.6 ng/ml) (L-dopa staining×400)

3 讨论

正常人皮肤中的 MC 主要存在于表皮基底层和毛囊中[9]。近年的研究发现，由于 HFM 在形态分布、抗

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

原表达、功能特性及其在白癜风发病和治疗中的作用与表皮黑素细胞不同[4-9], 使其可能成为白癜风治疗恢复时 MC 的来源, 但对其调控因素尚不清楚。bFGF 是一种碱性多肽细胞生长因子, 既往的研究发现它是 MC 的重要促分裂剂, 而且角质形成细胞(Keratinocyte, KC)产生的 bFGF 在体内可能是 MC 的自然生长因子。现已证实在毛囊和隆突区存在多种生长因子和细胞因子以及它们的受体[10]。bFGF 对 HFM 增殖活化是否有促进作用有待研究。

我们研究发现 bFGF 对体外培养的 HFM 有促进其增殖活化和黑素合成作用, 这种作用以 0.6 ng/ml 浓度时最强, 浓度过高(1.2 ng/ml)反而促进作用降低。促进酪氨酸酶活性和黑素合成的作用在第 5 天时显著, 随时间的延长而增加。经以上作用, HFM 树突延长、增多, 胞浆内出现肉眼可见的色素颗粒, 多巴染色由阴性转为阳性, 胞体和树突均着色, 提示 HFM 被激活。

在实验中还发现当 HFM 与 KC 混合存在培养时, HFM 的形态多为多树突状, 类似加入 bFGF 培养后的形态, 细胞多围绕在 KC 细胞团周围, 1~2 周后多巴染色呈阳性。由于众多研究显示表皮 KC 能通过分泌 bFGF 和/或直接与 MC 作用促 MC 增殖[11], 我们推测毛囊 KC 也能通过分泌 bFGF 刺激 HFM 活化、增殖和合成黑素; 由于两者是直接接触混合培养, 也不排除两者间的细胞相互作用和信号转导等复杂机制。这种现象提示我们应进一步研究毛囊 KC 与 HFM 之间的作用, 如用抗 bFGF 中和抗体阻断实验证实毛囊 KC 是否分泌 bFGF 等。

参考文献:

[1] Le Poole I C, Van dan Wijngaard R M J G J, Westerhof W, *et al*. Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation[J]. J Invest Dermatol, 1993, 100(5): 816-822.

[2] Cui J, Shen L Y, Wang G C. Role of hair follicles in the repigmentation of vitiligo[J]. J Invest Dermatol, 1991, 97(3): 410-416.

[3] 崔　建, 沈丽玉, 王光超, 等. 毛囊在白癜风恢复中的作用[J]. 中华皮肤科杂志, 1989, 22(5): 304-305.

[4] Tobin D J, Colen S R, Bystryn J C. Isolation and long-term culture of human hair-follicle melanocytes[J]. J Invest Dermatol, 1995, 104(1): 86-89.

[5] 夏隆庆, Zouboulis C H, Karasagkis K, 等. 人体黑素细胞培养技术[J]. 中华皮肤科杂志, 1991, 24(4): 120-121.

[6] Ando H, Itoh A, Mishima Y, *et al*. Correlation between the number of melanosomes, tyrosinase mRNA levels, and tyrosinase activity in cultured murine melanoma cells in response to various melanogenesis regulatory agents[J]. J Cell Physiol, 1995, 163(5): 608-614.

[7] 雷铁池, 朱文元, 夏明玉, 等. 8-甲氧补骨脂素对小鼠黑素瘤细胞黑素生成的调节及相关信号转导研究[J]. 中华皮肤科杂志, 1999, 32(2): 115-118.

[8] Suite M, Quamina D B E. Treatment of vitiligo with topical melagenine—a human placental extract[J]. J Am Acad Dermatol, 1991, 24(9): 1 019-1 021.

[9] Tobin D J, Bystryn J C. Different populations of melanocytes are present in human hair follicle and epidermis[J]. Pigment Cell Res, 1996, 9(6): 304-310.

[10] Akiyama M, Smith L T, Holbrook K A. Growth factor and growth factor receptor localization in the hair follicle bulge and associated tissue in human fetus[J]. J Invest Dermatol, 1996, 106(3): 391-396.

[11] Kovacs S O. Vitiligo[J]. J Am Acad Dertol, 1998, 38(5): 647-667.

(编辑　张大春)

(上接 1244 页)

平滑肌肉瘤最常发生于下肢长骨的干骺端, 尤其是膝关节附近, 其次为颌骨, X 线检查有 3 种不同的改变[1]: ①为溶骨性的; ②混合性的除斑片状溶骨性破坏外, 在髓腔或软组织内尚掺杂有钙化或肿瘤阴影。骨膜反应(Codman 三角或放射骨针)常见; ③囊肿性。

关于组织学起源, 目前尚无定论。Fornasier 认为, 骨原发性骨平滑肌肉瘤的组织来源是来自骨髓腔内中等营养血管壁中层的平滑肌细胞或发生于脉管周围的多功能性间叶细胞。而 Roij 和 Hochstetter 则认为, 平滑肌细胞是由多潜能的间充质细胞或中间细胞型(例如肌纤维母细胞)转变而来。

骨原发性平滑肌肉瘤和软组织平滑肌肉瘤在光镜、免疫组化及电镜上有相似的特征, 组织学上最多见为经典型, 其次为上皮样、多形性及粘液样[2]。所不同的是软组织平滑肌肉瘤很少见到破骨巨细胞。骨内原发性平滑肌肉瘤要与恶纤组、纤维肉瘤、骨肉瘤相鉴别, 鉴别诊断主要依赖于免疫组化及电镜观察。免疫组化 Vimentin、SMA 全部表达为阳性, S-100、Desmin 有少量表达, 并呈局灶性分布。电镜观察[3] 可见有与细胞长轴平行排列的肌微丝, 肌微丝束之间有许多致密小体, 质膜内层有附着板及吞饮空泡。上皮样平滑肌肉瘤, 需要和转移癌相鉴别, 二者低分子量角蛋白都可表达, 而上皮样平滑肌肉瘤有时不表达 SMA 及 Desmin 故电镜则显得尤为重要[1,2]。

关键词: 骨肿瘤; 平滑肌肉瘤
中图法分类号: R738.7　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Sundaram M, Akduman I, White L M, *et al*. Primary leiomyosarcoma of bone[J]. AJR Am J Roentgenol, 1999, 172(3): 771-776.

[2] Shen S H, Steinbach L S, Wang S F, *et al*. Primary leiomyosarcoma of bone[J]. Skeletal Radiol, 2001, 30(10): 600-603.

[3] Jeanrot C, Ouaknine M, Anract P, *et al*. Primary leiomyosarcoma of bone: report of 5 anatomo-clinical cases and review of the literature[J]. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot, 2000, 86(1): 63-73.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net