

· 论 著 ·

NB-UVB 对角质形成细胞和黑素细胞 SCF、Kit、MITF 表达的调控作用*

王 鹰¹, 李海东², 刘树雷¹

(解放军第三二四医院:1. 皮肤科;2. 呼吸科, 重庆 400020)

摘要:目的 探讨 NB-UVB 对黑素细胞和角质形成细胞干细胞因子(SCF)、Kit、MITF 表达的调控作用。方法 建立黑素细胞和角质形成细胞共培养体系,用 NB-UVB 照射共培养细胞 3 d,RT-PCR 法检测对照组和照射组酪氨酸酶、SCF、c-Kit、MITF mRNA 的表达。NB-UVB 照射角质形成细胞 3 d 后免疫组织化学法检测对照组和照射组 SCF 蛋白的表达。黑素细胞爬片培养,加入经 UVB 照射 3 d 后的角质形成细胞上清液,免疫组织化学法检测对照组和照射组 MITF 蛋白的表达。结果 对照组和照射组提取细胞总 RNA 经 RT-PCR 检测,结果发现照射组 SCF、c-Kit、MITF、酪氨酸酶 mRNA 表达较对照组明显增高。NB-UVB 照射后的角质形成细胞 SCF 免疫组织化学结果与对照组比较差异有统计学意义($P=0.000$),加入经 NB-UVB 照射后的角质形成细胞培养上清液后的黑素细胞 MITF 免疫组织化学结果与正常培养黑素细胞比较差异有统计学意义($P=0.024$)。结论 NB-UVB 照射能促进角质形成细胞分泌 SCF,进而上调 MITF 的表达,促进酪氨酸酶表达增加。

关键词:黑素细胞;角质形成细胞;干细胞因子;黑素细胞特异性小眼畸形相关转录因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.02.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)02-0110-03

Regulation roles of NB-UVB on SCF/Kit/MITF expression in melanocytes and keratinocytes*

Wang Ying¹, Li Haidong², Liu Shulei¹

(1. Dermatology Department; 2. Respiratory Department, 324th Military Hospital, Chongqing 400020, China)

Abstract: Objective To study the regulated roles of NB-UVB on SCF/Kit/MITF expression in melanocytes and keratinocytes.

Methods Direct contact co-culture of melanocytes and keratinocytes were constructed. The co-culture cells were exposed to 311 nm UVB every day for 3 d. Then the expression of SCF, c-Kit, tyrosinase and MITF mRNA were detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in UVB irradiated group and normal control group. The expression of SCF protein was detected by immunohistochemical method in UVB irradiated group and normal control group. After joining with keratinocytes supernatant irradiated by NB-UVB, the expression of MITF protein was detected by immunohistochemical method in UVB irradiated group and normal control group. **Results** The results of cell total RNA RT-PCR showed that the expression of SCF, c-kit, MITF and tyrosinase mRNA of UVB irradiated group were increased obviously, which had significant difference with normal control group. The SCF immunohistochemical results showed that the UVB irradiated keratinocytes group had significant more expression than normal control group ($P=0.000$). The MITF immunohistochemical results showed that the melanocyte group joined with keratinocytes supernatant irradiated by NB-UVB increased expression, which had significant difference with the normal melanocyte group ($P=0.024$). **Conclusion**

The NB-UVB irradiation could promote keratinocytes to express SCF, then promote expression of MITF, increase secrete of tyrosinase.

Key words: melanocytes; keratinocytes; stem cell factor; Kit; melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor; narrow bound ultra violet B light

黑素细胞生存在一个由未分化的基底层角质形成细胞(keratinocytes, KC)衍生细胞因子、基底层成分、细胞黏附分子、细胞基质等多种因素构成的特定复杂的微环境中,其增殖分裂、黑素形成、移行和存活等行为受环境因素、信号传导通路以及转录因子的调控,特别是 KC 来源的干细胞因子(stem cell factor, SCF)与 Kit 受体及下游的黑素细胞特异性小眼畸形相关转录因子(melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor, MITF)组成的信号通路可能对黑素细胞的功能起着重要的调控作用^[1-2]。近年来临床采用 311 nm 窄谱中波紫外线(NB-UVB)及 308 nm 单频准分子光(MEL)治疗白癜风均能取得满意的复色效果,但其治疗机制尚不清楚。本文拟研究 NB-UVB 对 SCF、Kit、MITF 信号通路的调控作用。

1 材料与与方法

1.1 细胞株来源 人表皮黑素细胞株 HEMP-M 购自 Cas-

cade Biological 公司;人 KC 株 HaCaT 为西南医院皮肤科实验室惠赠。

1.2 主要试剂 Medium254 黑素细胞培养基、HMGS-2 添加剂(Cascade Biological 公司)、胎牛血清、RPMI-1640 培养基(Hyclone 公司)、胰蛋白酶(Sigma 公司)、即用型 SP 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)、SCF 抗体、MITF 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)、一步法 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)、Tripure Reagent、DEPC(Roche 公司)等。

1.3 黑素细胞与 KC 共培养体系的建立 将 HaCaT 细胞用含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基重悬,以 5×10^4 /mL 的浓度接种于 6 孔板中,5% CO₂、37 °C 培养 1 d,使细胞充分贴壁,将 HEMP 细胞用完全黑素细胞培养基(Medium254 加 HMGS-2)重悬,以 5×10^3 /mL 的浓度接种于已有 HaCaT 细胞贴壁生长

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2009BB5313)。

的 6 孔板中,使黑素细胞与 KC 的接种比例为 1 : 10(最接近生理状态下黑素细胞与 KC 的比例^[3]),共培养所用培养基为完全黑素细胞培养基、10%FCS 的 RPMI-1640 培养基(1 : 2),5% CO₂、37 °C 培养,2 d 换液 1 次。

1.4 NB-UVB 照射 将培养细胞分为对照组和照射组,每组 5 个复孔。照射组使用 311 nm UVB (窄频 311 nm UVB 家用型光疗仪,德国 Waldmann 公司)照射,照射剂量为 200 mJ/cm²,照射时光源离培养板 15 cm,垂直照射,照射前换用 0.01 M 的 PBS,照射后立即更换为新鲜培养基,连续照射 3 d 后收获细胞。

1.5 RT-PCR 检测 SCF、c-Kit 和 MITF mRNA 的表达 按照 Tripure 总 RNA 提取试剂盒说明书抽提细胞总 RNA。分别设计 SCF、c-Kit 和 MITF 的特异性引物,RT-PCR 检测 NB-UVB 照射前后 SCF、c-Kit 和 MITF mRNA 的表达情况。引物序列(TaKaRa 生物工程技术服务有限公司合成)为内参照 GAPDH 上游引物:5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC ACC-3',下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3',扩增产物 332 bp。SCF 上游引物:5'-GAT GTT TTG CCA AGT CAT TGT TGG-3',下游引物:5'-ACT GAC TCT GGA ATC TTT CTC AGG-3',扩增产物 351 bp。反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 1 min,58 °C 1 min,72 °C 1 min,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。c-Kit 上游引物:5'-GGA AAG AAG ACA ACG ACA CG-3',下游引物:5'-ACA GAC ACA ACA GGC ACA GC-3',扩增产物 271 bp。反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 60 s,56 °C 60 s,72 °C 60 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。MITF 上游引物:5'-TTA TAG TAC CTT CTC TTT GC-3',下游引物:5'-GCT TGC TGT AGT GGT ACT TG-3',扩增产物 188 bp。反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 45 s,50.7 °C 30 s,72 °C 30 s,共 40 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。不加引物或模板的扩增体系作为阴性对照。取 5 μL PCR 产物以 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。凝胶成像扫描系统分析 DNA 荧光强度值,与 GAPDH 进行对照。

1.6 酪氨酸酶表达测定 内参照 GAPDH 引物序列同上。人酪氨酸酶上游引物:5'-AAC CCA AGG TCC CGT TCA T-3',下游引物 5'-CCA GTC GTC CAG CAC CAG-3',扩增产物 399 bp。反应条件:95 °C 预变性 3 min;95 °C 20 s,57 °C 20 s,72 °C 30 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。不加引物或模板的扩增体系作为阴性对照。取 5 μL PCR 产物以 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。凝胶成像扫描系统分析 DNA 荧光强度值,与 GAPDH 进行对照。

1.7 免疫组织化学染色检测 SCF 和 MITF 蛋白的表达 将 HaCaT 细胞接种于盖玻片上,分为对照组和照射组,每组 3 个复孔,置于培养皿中,按前述方法经 NB-UVB 照射,37 °C、5% CO₂ 培养 3 d,终止生长,采用即用型 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒进行免疫组织化学染色检测 SCF 蛋白表达。以细胞浆出现棕黄色颗粒为阳性,根据下列标准分级:阳性细胞百分比数小于或等于 10、>10~25、>25~50、>50 分别对应-、+、++、+++。按阳性染色细胞占总细胞数的百分比评估,采用四川大学的医学图文分析系统计算。将 HEMP 细胞接种于盖玻片上,分为对照组和照射组,每组 3 个复孔,培养基中加入按上述方法培养的正常对照和经 NB-UVB 照射的 HaCaT 细胞培养上清液,37 °C、5% CO₂ 培养 2 d,按上述方法进行免疫组织化学染色检测 MITF 蛋白表达。以细胞核/浆出现棕黄色颗粒为阳性,结果判定及统计方法同上。

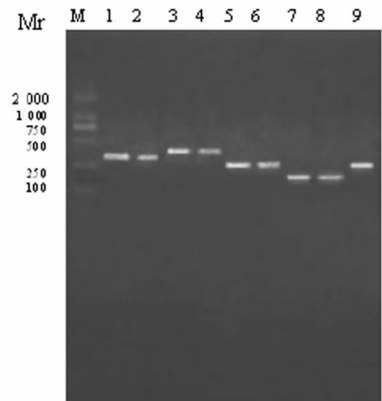
1.8 统计学处理 数据采用 SPSS17.0 统计软件进行统计处理,应用独立样本 *t* 检验进行统计分析。

2 结 果

2.1 黑素细胞与 KC 共培养 单独培养时,黑素细胞呈树突状,KC 呈圆形、簇集状铺路石样生长。黑素细胞和 KC 以 1 : 10 比例混合培养,2 种细胞均迅速增殖,黑素细胞树突多为 3~5 个,与数十个 KC 呈团块状生长,黑素细胞树突与 KC 直接接触,形成类似黑素单元的结构(封 2 图 1)。共培养体系经 NB-UVB 照射后,KC 和黑素细胞生长增殖较对照组迅速,凋亡与对照组无明显差异。

2.2 SCF、c-Kit、MITF 表达 KC 与黑素细胞共培养体系经 NB-UVB 照射 3 d 后,提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测结果发现 SCF、c-Kit、MITF mRNA 表达均较对照组明显增高(*P* = 0.000),见图 2 和表 1。表明经 NB-UVB 照射可以明显促进 KC SCF 分泌增加,黑素细胞表面 c-Kit 受体和下游分子 MITF 表达明显增加。

2.3 酪氨酸酶表达 KC 与黑素细胞共培养体系经 NB-UVB 照射 3 d 后,提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测结果发现酪氨酸酶 mRNA 表达较对照组明显增高(*P* = 0.000),见图 2 和表 1。表明经 NB-UVB 照射可以明显促进黑素细胞酪氨酸酶表达,促进黑素生成。



M:ML 2000;1,2 道:正常和 NB-UVB 组 SCF,扩增产物 351 bp;3,4 道:正常和 NB-UVB 组酪氨酸酶,扩增产物 399 bp;5,6 道:正常和 NB-UVB 组 MITF,扩增产物 188 bp;7,8 道:正常和 NB-UVB 组 c-kit 扩增产物 271 bp;9 道:内参 GAPDH,扩增产物 332 bp。

图 2 RT-PCR 电泳图

表 1 RT-PCR 检测 SCF、c-Kit、MITF、酪氨酸酶 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	SCF	c-Kit	MITF	酪氨酸酶
对照组	1.52±0.06	1.47±0.03	1.13±0.04	1.04±0.02
照射组	1.78±0.03	1.73±0.04	1.56±0.08	1.76±0.04
<i>t</i>	8.619	11.746	10.368	38.486
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 免疫组织化学检测 SCF、MITF 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	SCF	MITF
对照组	22.90±3.16	17.88±2.05
照射组	33.47±1.19	22.45±3.04
<i>t</i>	7.008	2.788
<i>P</i>	0.000	0.024

2.4 免疫组织化学 正常培养 KC SCF 免疫组织化学结果显示细胞浆呈棕黄色着色,经 NB-UVB 照射后的 KC SCF 免疫组织化学结果显示细胞浆呈深棕黄色着色,两组比较差异有统计学意义($P=0.000$),表明 NB-UVB 照射可以明显促进 KC SCF 分泌增加。正常培养黑素细胞 MITF 免疫组织化学结果显示细胞核/浆呈棕黄色着色,加入经 NB-UVB 照射后的 KC 培养上清液后的黑素细胞 MITF 免疫组织化学结果显示细胞核/浆呈深棕褐色着色,两组比较差异有统计学意义($P=0.024$),表明 NB-UVB 照射可以明显促进 SCF 分泌从而增加 MITF 表达(封 3 图 3,表 2)。

3 讨论

白癜风是一种获得性色素脱失性皮肤病,其黑素细胞破坏缺失的机制可能与神经、精神、免疫等多种因素导致细胞周围微环境失衡、黑素细胞黏附迁移功能下降有关。白癜风患者存在表皮微环境失衡,KC 可以释放一些细胞因子,以旁分泌方式调节黑素细胞的形态和功能,其中 KC 分泌的 SCF 对黑素细胞具有重要调节作用,其受体 c-Kit 蛋白表达在黑素细胞膜表面,MITF 是 SCF/KIT 信号传导途径的下游分子,其 M 亚型仅在神经嵴来源的黑素细胞中表达,MITF-M 在黑素细胞的发育和生存中起枢纽作用,是黑素细胞分化的重要调节因子^[4-8]。既往研究某种因素对黑素细胞的调控作用时一般常采用单纯培养黑素细胞进行研究,然而黑素细胞的生物学行为依赖于一系列细胞因子的作用,研究发现黑色素细胞(MC)和 KC 的直接接触能使 MC 产生的褐黑素和优黑素的比值从单培养时的 1 043 下降到 25,更接近生理值^[9-10],可以更好地研究各种干预因素对黑素细胞的调控作用。因此,本研究建立黑素细胞与 KC 共培养体系,可以模拟黑素细胞体内生存环境,使研究结果具有更好的参考价值。

临床采用 311 nm NB-UVB 及 308 nm MEL 治疗白癜风,均取得较好的复色疗效^[11-12]。国外学者研究提示 UVB 照射引起皮肤色素沉着是通过 SCF/KIT 途径完成的,文献^[13-14]报道接受紫外线照射后,表皮中主要是 Kit(+)的黑素细胞增生,先分化成 Mitf(+)和 TRP-2(+)的黑素细胞,然后才变成成熟的 TRP-1(+)的黑素细胞。Hachiya 等^[15]发现经紫外线照射后,体外培养的 KC SCF 表达明显增加,黑素细胞 c-Kit 受体表达明显上升。本研究采用 200 mJ/cm² 的剂量照射 KC 和黑素细胞混合培养模型,发现此照射剂量可以促进黑素细胞和 KC 生长增殖,而对细胞凋亡没有显著影响。连续照射 3 d 后检测 SCF、MITF、c-Kit 和酪氨酸酶在转录水平和蛋白水平表达均显著增加。研究结果提示经 311 nm NB-UVB 照射后,可以明显促进 KC 分泌 SCF,进而促进黑素细胞表面的 c-Kit 受体表达增加,上调其下游的转录因子 MITF 表达,明显增加了黑素细胞酪氨酸酶的分泌,促进黑素生成。提示 NB-UVB 照射能促进 KC 分泌 SCF,进而促进 MITF 的表达,促进酪氨酸酶表达增加,提示 NB-UVB 临床治疗的机制可能是通过对 SCF/KIT/MITF 信号通路的调控作用实现的。

参考文献:

[1] Lionel L, Mayuko K, Colin RG. β -Catenin in the melanocyte lineage[J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16(4): 312-317.
[2] Imokaw A, Gen J. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders

[J]. *Pigment Cell Res*, 2004, 17(2): 96-110.

- [3] 张汝芝,朱文元,马佳.表皮黑素细胞与毛囊角质形成细胞接触性共培养方法的建立[J].*中华皮肤科杂志*, 2006, 39(10): 596-599.
[4] Kitamura, Tsukamoto K, Harada K, et al. Mechanisms underlying the dysfunction of melanocytes in vitiligo epidermis; role of SCF/KIT protein interactions and the downstream effector, MITF-M[J]. *Journal of pathology*, 2004, 202(4): 463-475.
[5] Saito H, Yasumoto K, Takeda K, et al. Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway[J]. *Pigment Cell Res*, 2003, 16(3): 261-265.
[6] Bear J, Hong Y, Schartl M. MITF expression is sufficient to direct differentiation of medaka blastula derived stem cells to melanocytes [J]. *Development*, 2003, 130 (26): 6545-6553.
[7] Hasegawa J, Goto Y, Murata H, et al. Downregulated melanogenic paracrine cytokine linkages in hypopigmented palmoplantar skin[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 21 (6): 687-699.
[8] Levy C, Khaled M, Robinson KC, et al. Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes[J]. *Cell*, 2010, 141(6): 994-1005.
[9] Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation[J]. *Biofactors*, 2009, 35(2): 193-199.
[10] Duval C, Smit NP, Kolb AM, et al. Keratinocytes control the pheomelanin ratio in cultured normal human melanocytes[J]. *Pigment Cell Res*, 2002, 15(6): 440-446.
[11] 薛梅,刁庆春. 308 nm 准分子激光治疗头颈部白癜风[J]. *重庆医学*, 2008, 37(12): 1282-1301.
[12] Lu S, Slominski A, Yang SE, et al. The correlation of TR-PM1 (Melastatin) mRNA expression with microphthalmia-associated transcription factor(MITF) and other melanogenesis-related proteins in normal and pathological skin, hair follicles and melanocytic nevi [J]. *J Cutan Pathol*, 2010, 37(11): 26-40.
[13] Hofer A, Hassan AS, Legat FJ, et al. Optimal weekly frequency of 308 nm excimer laser treatment in vitiligo patients[J]. *Br J Dermatol*, 2005, 152(5): 981-985.
[14] Hong SB, Park HH, Lee MH. Short-term effects of 308 nm xenon-chloride excimer laser and narrow-band ultraviolet B in the treatment of vitiligo: a comparative study [J]. *J Korean Med Sci*, 2005, 20(2): 273-278.
[15] Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, et al. Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis[J]. *Am J of Patho*, 2004, 165 (6): 2099-2109.