

雌二醇及中波紫外线在豚鼠皮肤色素沉着形成中的作用及其机制

周颖丽 宋秀祖 洪为松 相文忠

摘要 目的 研究雌二醇和中波紫外线(UVB)辐射对豚鼠背部棕色皮肤中黑素代谢的影响,探讨雌激素及UVB在皮肤色素沉着中的作用。方法 选取健康花色豚鼠,设立溶媒对照组、UVB照射组、雌二醇处理组和雌二醇预处理后UVB照射组(雌二醇+UVB组);雌二醇浓度设为 3.67×10^{-5} 、 3.67×10^{-4} 、 3.67×10^{-3} mol/L;UVB照射剂量统一为500 mJ/cm²。采用皮肤在体共聚焦激光扫描显微镜(简称皮肤CT)以及透射电子显微镜等观察雌二醇和UVB对黑素小体合成及降解的影响。结果 ①一定浓度雌二醇可加深豚鼠皮肤色素沉着,且随着雌二醇浓度的递增,沉着程度逐渐加深($P < 0.05$)。②UVB照射组豚鼠皮肤色素沉着较未照射组明显增加($P < 0.05$)。③UVB照射后豚鼠表皮角质形成

细胞中自噬体增加,而雌二醇处理后自噬体减少。结论 雌二醇及UVB照射均可促进豚鼠皮肤色素沉着,其机制可能与促进黑素小体合成有关,黑素小体的降解异常也参与了豚鼠皮肤色素沉着的形成。

关键词 雌二醇;色素沉着;黑素小体;中波紫外线

中图分类号 R 364.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0049-05

2014-09-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81000697);杭州市医学重点专科专病项目(编号:20130733Q24)

作者单位:安徽医科大学杭州临床学院(杭州市第三人民医院)皮肤性病科 杭州 310009

作者简介:周颖丽,女,硕士研究生;

宋秀祖,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: songxiuzu@yahoo.com

黄褐斑等色素沉着性皮肤病是临床上常见的皮肤病,引起皮肤色素沉着的原因有很多,且相当复杂。其中紫外线照射(ultraviolet radiation,UV)、体内性激素失调等与皮肤色素沉着密切相关。UV是造成皮肤色素沉着最为重要的外源性因素^[1]。此外,雌激素也与色素沉着性疾病有着重要关系,是引起皮肤表面色素沉着的重要内源性因素之一^[2]。由于造成光损伤的UV波段主要包括长波紫外线(ultraviolet radiation A,UVA)和中波紫外线(ultraviolet radiation B,UVB),而UVB导致色素沉着的作用较UVA强,雌激素中雌二醇的生物学效应最强,因

The experimental study of anti-inflammatory cytokine TSG-6 inhibits hypertrophic scar formation in rabbit ears model

Wang Hui, Li Xiaojing, Chen Zhao

(Dept of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effect of tumor necrosis factor α stimulated gene-6 (TSG-6) on hypertrophic scarring by using a rabbit ear model. **Methods** TSG-6 and PBS were injected intradermally in the right and left ear wounds, respectively. Collagen I and III expression detected by immunohistochemistry and scar elevation index (SEI) was used to evaluate the extent of scarring. The expression of inflammatory factors interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction. Transmission electron microscope (TEM) and TUNEL analyses were used to detect fibroblast apoptosis. **Results** Compared with control scars, TSG-6-treated wounds exhibited decreased inflammation significantly as evidenced by the lower levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α . The apoptosis rate was higher and the SEI and the synthesis of collagens I and III were significantly decreased in the TSG-6-treated scars ($P < 0.05$). **Conclusion** Immediate topical injection of TSG-6 during the wound healing process can reduce the severity of hypertrophic scarring in a rabbit model. The anti-cicatrix effect of TSG-6 may result from controlling inflammation, inducing fibroblast apoptosis and promoting collagen degradation.

Key words animal model; hypertrophic scar; rabbit; inflammation; TSG-6

此该研究 UVB 辐射和雌二醇对豚鼠背部棕色皮肤中黑色素合成及降解的影响,探讨雌激素及 UV 对皮肤色素代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 8 只健康花色雌性豚鼠(背部皮肤棕色)购于浙江中医药大学动物研究中心,体重为 (343 ± 76) g。雌二醇购于美国 Sigma 公司,薇婷脱毛膏(敏感肌型)购于屈臣氏,紫外线光疗仪 SS-04B、UVB 辐照度监视器购自上海西格玛公司,RT 300 表面色度色差仪购于英国 Lovibond 公司,微维三维皮肤 CT-Vivascope 1500 购于美国 Lucid Inc 公司。透射电子显微镜来自浙江大学电镜室。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理及分组 选择豚鼠背部棕色毛发区,电动剃刀剃毛,取 8 个相离区域,分别设为溶媒对照组、雌二醇处理组(3.67×10^{-5} 、 3.67×10^{-4} 、 3.67×10^{-3} mol/L),UVB 对照组、雌二醇(浓度同雌二醇处理组)联合 UVB 照射组。豚鼠背部每隔 2~3 d 剃毛 1 次。

1.2.2 雌二醇及 UVB 照射处理 雌二醇用花生油配成 3.67×10^{-5} 、 3.67×10^{-4} 、 3.67×10^{-3} mol/L 浓度,4℃ 冰箱储存,溶媒对照组采用纯花生油。经皮肤剃毛区,用棉签棒混悬药液后均匀涂抹于相应部位,每天 1 次,连续涂抹。外涂雌二醇 1 周后,再次剃毛,必要时用脱毛膏处理,自制固定盒固定豚鼠,暴露需照光部位,用 SS-04B 型紫外线光疗仪进行 UVB 照射,调整光源与豚鼠皮肤的距离为 15 cm,照射总量为 500 mJ/cm²。照射前测定辐照度,UVB 辐照剂量 = UVB 辐照度 × 时间。照光后继续外用雌二醇 1 周。

1.2.3 皮肤颜色的测定 分别在处理前后用 RT 300 表面色度色差仪测量豚鼠背部皮肤各区域的颜色。以 L* a* b* 值来衡量皮肤颜色的变化。本实验主要观察处理前后皮肤色素沉着的变化,故仅记录 L* 值。L* 值代表亮度,值为 0~100,0 表示黑色,100 表示白色。

1.2.4 皮肤 CT 检查 采用 Vivascope 1500 成像系统对经过不同处理后的豚鼠皮肤进行共聚焦扫描成像。皮肤 CT 光源为 830 nm 的激光,输出功率介于 0~16 mW,横向分辨率 2 μm,轴向分辨率 1.6 μm,镜头与粘合窗之间介质为超声耦合剂,粘合窗与皮肤之间介质为蒸馏水,扫描深度达 350 μm。4% 戊

巴比妥钠腹腔注射麻醉豚鼠后,在欲行检查区域,棉签蘸水湿润皮肤,调整镜头位置,对准检查部位皮肤,逐层向下扫描,拍照留存。

1.2.5 透射电子显微镜观察 取皮肤 CT 检查后同一处皮肤,常规取皮,在预冷 2.5% 戊二醛固定液中快速切分为大小约 1 mm³ 的小皮块,转移至含固定液的 EP 管中,置 4℃ 冰箱保存。弃去戊二醛废液,磷酸缓冲液冲洗,1% 锇酸溶液再固定 1~2 h,弃去锇酸废液,磷酸缓冲液冲洗后,常规梯度浓度酒精脱水,丙酮浸透,包埋剂包埋,聚合,超薄切片并染色。切片置入透射电子显微镜中,观察表皮角质形成细胞中黑色素小体及自噬体的超微结构,拍照留存。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。豚鼠各组皮肤颜色亮度值结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,处理前后比较采用配对 *t* 检验,组内及组间的两两比较采用两独立样本 *t* 检验,处理前及处理后各组的皮肤颜色 L* 值比较采用方差分析,且 $P < 0.05$ 时行 SNK 检验,检验水准取 $P = 0.05$ 。

2 结果

2.1 豚鼠皮肤色素大体改变 豚鼠背部皮肤外涂雌二醇混悬液,约 5 d 左右逐渐出现轻微色素沉着,以 3.67×10^{-3} mol/L 的浓度为著。实行 500 mJ/cm² 的 UVB 照射后,约 1 d 左右照射部位出现肉眼可见的红斑,第 3 天红斑消退,表面皮肤干燥脱屑,5 d 后脱屑减轻,开始出现色素沉着,7 d 左右色素沉着逐渐稳定。溶媒对照组及雌二醇 3.67×10^{-5} mol/L 组肤色较前无明显改变, 3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇组可见较明显色素沉着,随着雌二醇浓度的增加,色素沉着程度逐渐增加,UVB 照射组较未照射组色素沉着程度明显增加,结合不同浓度雌二醇处理后,色素沉着有不同程度的增加。见图 1。

2.2 皮肤颜色测定结果 处理前各组间 L* 值无明显差异,处理后 3.67×10^{-4} mol/L 及 3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇组豚鼠皮肤色素沉着加深,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇处理组色素沉着程度高于 3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇处理组,差异有统计学意义($P < 0.05$);处理后溶媒对照组及 3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇组处理前后豚鼠皮肤颜色测定结果差异无统计学意义。UVB 照射组比未照射组豚鼠皮肤色素加深明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 2。



图1 豚鼠雌二醇及 UVB 处理 2 周后各组皮损表现

1: 溶媒对照组; 2: 雌二醇 3.67×10^{-5} mol/L 组; 3: 雌二醇 3.67×10^{-4} mol/L 组; 4: 雌二醇 3.67×10^{-3} mol/L 组; 5: UVB 照射组; 6: 3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组; 7: 3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组; 8: 3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组

表1 处理前后豚鼠皮肤颜色 L^* 值的测量结果

分组	处理前*	处理后**	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
溶媒对照	54.73 ± 5.12	55.33 ± 5.12	-0.823	0.407
3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇	53.53 ± 4.83	58.88 ± 5.90	-2.107	0.052
3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇	53.87 ± 5.04	67.42 ± 6.18	-2.812	0.008
3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇	52.97 ± 5.10	76.64 ± 6.96	-3.368	0.002
UVB 照射	54.35 ± 4.92	65.69 ± 6.10	-2.784	0.011
3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇 + UVB 照射	54.02 ± 4.89	72.24 ± 6.48	-3.133	0.003
3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇 + UVB 照射	53.82 ± 4.78	81.43 ± 7.84	-3.710	<0.001
3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇 + UVB 照射	53.66 ± 4.82	88.60 ± 8.06	-4.186	<0.001

* 表示处理前各组间 L^* 值无明显差异 $F = 1.329$ $P > 0.05$; ** 表示处理后各组间

* 值除溶媒对照组与 3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇组两组无差异外其余均存在差异 $F = 252.936$ $P < 0.01$ ($P < 0.05$ 时行 SNK 检验)

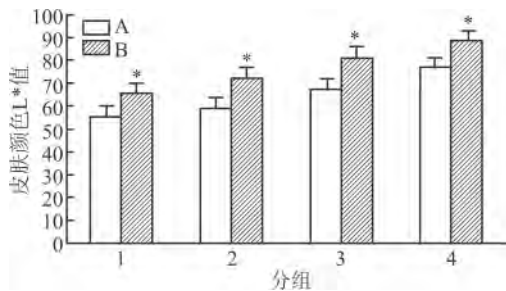


图2 雌二醇处理组与雌二醇 + UVB 照射组豚鼠皮肤颜色 L^* 值比较

A: 雌二醇处理组; B: 雌二醇 + UVB 照射组; 1: 雌二醇浓度为 0 组; 2: 3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇组; 3: 3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇组; 4: 3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇组; 与雌二醇处理组比较: * $P < 0.05$

2.3 豚鼠皮肤 CT 扫描后的影像特征 一定浓度雌二醇及 UVB 照射处理后的区域与溶媒处理组相比, 主要改变发生在表皮, 表现为皮层色素含量的增加, 黑素细胞数量的增多以及活跃程度的增强; 而真皮的变化不如表皮明显, 主要表现为血管扩张, 而色素呈有或无增加。UVB 照射处理后, 表皮的变化十分明显, 表现为棘细胞层下部和基底层之间黑素颗

粒的亮度和密度的明显增加, 圆形或椭圆形的明亮的黑素细胞及基底层呈树枝状结构的黑素细胞(处于活跃增生状态)的明显增多, 见图 3E。而一定浓度的雌二醇处理后, 黑素颗粒和黑素细胞也有一定程度的增多, 且随着浓度的增加, 该效应增强, 但较 UVB 的作用弱, 见图 3B ~ 3D。与此同时, 雌二醇和 UVB 在致色素增多方面有一定的协同作用, 见图 3F ~ 3H。

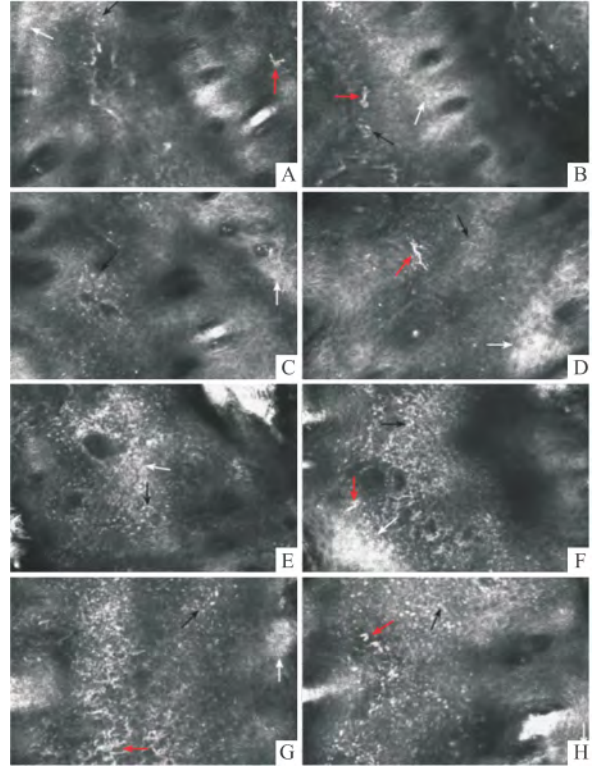


图3 豚鼠处理后各组皮肤的实时皮肤 CT 影像

A: 溶媒对照组; B: 3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇组; C: 3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇组; D: 3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇组; E: UVB 照射组; F: 3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组; G: 3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组; H: 3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组; 图中棘细胞层下部和基底层之间可见明亮的黑素颗粒(白色箭头处)及排列成“帽状”或“花环状”结构的明亮的圆形或椭圆形的黑素细胞(黑色箭头处), 部分区域亦可见树枝状的黑素细胞(红色箭头处)。

2.4 透射电子显微镜下皮肤超微结构特点 透射电子显微镜下观察豚鼠表皮角质形成细胞, 可清晰地见到细胞内的线粒体、黑素小体、自噬泡等细胞器结构。其中黑素小体呈致密深黑色的圆形或椭圆形颗粒样结构, 大小不一, 着色程度深浅不一, 散在或成簇分布在细胞质中。自噬泡呈双层膜的空泡样结构, 其内可包含各种细胞器碎片, 部分可能为黑素小体。见图 4。镜下未能见到形态十分完整的黑素细

胞,但可见充满黑素小体的细胞突穿插于角质形成细胞间。一定浓度雌二醇处理后,电镜下角质形成细胞内的黑素小体增多,而自噬泡减少,且随着雌二醇浓度的增加,这种现象更明显。UVB 照射处理后,角质形成细胞内的黑素小体和自噬泡均增加,黑素小体增加更明显;与不同浓度雌二醇结合处理后,表现为黑素小体明显增多,自噬泡在低浓度雌二醇组表现为增加,而高浓度雌二醇组表现为减少。说明 UVB 和雌二醇在致表皮色素沉着过程中有协同作用,可以导致黑素小体合成增加。雌二醇对角质形成细胞的自噬有抑制作用。

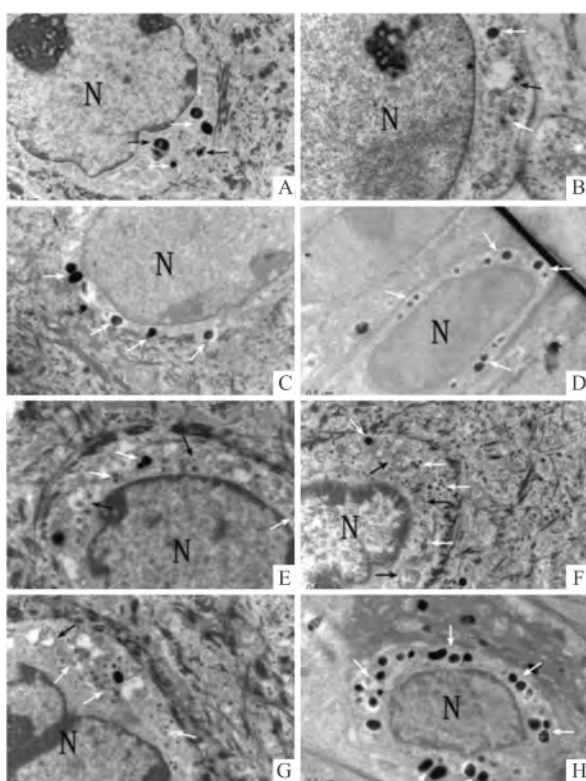


图4 豚鼠处理后各组皮肤的电镜影像

A: 溶媒对照组 ($\times 20\,000$); B: 3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇组 ($\times 25\,000$); C: 3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇组 ($\times 20\,000$); D: 3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇组 ($\times 20\,000$); E: UVB 照射组 ($\times 20\,000$); F: 3.67×10^{-5} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组 ($\times 20\,000$); G: 3.67×10^{-4} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组 ($\times 20\,000$); H: 3.67×10^{-3} mol/L 雌二醇 + UVB 照射组 ($\times 20\,000$); 角质形成细胞胞核大有切迹(标 N 处),部分可见核仁。胞质中可见黑素小体(白色箭头处),部分尚可见自噬泡,其内包含或不包含各种细胞器的碎片结构(黑色箭头处)。

3 讨论

黄褐斑等皮肤色素沉着性疾病在临床中较为常见,轻者影响美观,重者甚至毁容,给患者身心带来了巨大负担。导致皮肤色素沉着的原因涉及黑素代

谢的全过程,包含表皮中黑素细胞内黑素的产生、黑素向周围角质形成细胞的转运以及在角质形成细胞内的降解^[3]。研究^[4]发现黑素细胞的过度增殖以及黑素合成的不断增多是皮肤色素沉着性疾病发生发展的重要原因,这在 CT 结果中也得到证实。

UVB 波长为 280 ~ 320 nm,穿透深度达 0.01 ~ 10 mm,是紫外线中造成皮肤损伤的主要元凶。UVB 辐射引起皮肤色素沉着实际是一个生理性的防御过程,黑素小体从黑素细胞转移到角质形成细胞,减少紫外线诱导的 DNA 损伤。临床上,高强度的紫外线和窄波 UVB 照射治疗在白癜风中的应用目前也较为成熟。研究^[5]表明皮肤在长时间 UVB 照射下会出现红斑,继之出现色素沉着,这在实验中也得到了证实。在 UVB 照射所导致的色素沉着中,表皮角质形成细胞膜部结合的干细胞因子表达上调,通过受体激活黑素细胞,从而导致色素沉着^[6]。紫外线可促进皮肤中 α -黑素细胞刺激素的表达,引起色素沉着^[7]。Hiramoto et al^[8]研究发现,通过抑制小鼠 α -黑素细胞刺激素的表达,从而抑制小鼠表皮的色素沉着。本研究电镜结果显示,UVB 照射使黑素小体向角质形成细胞的转运明显增多,并且促进角质形成细胞的自噬活性,使黑素小体的降解增强,但黑素小体的转运远远强于其降解,故总体的效应还是色素沉着加深。

雌激素作为一种甾体激素,不仅在皮肤损伤修复、毛发生长及皮肤老化等过程中发挥关键性作用,同时也参与了皮肤的色素沉着过程。免疫组织化学研究^[9]证实黄褐斑患者色素沉着部位皮肤中雌激素受体表达较正常皮肤增加。Kim et al^[10]研究发现,雌激素通过上调 PDZK1 蛋白的表达,从而增加酪氨酸酶的表达,促进黑素小体向角质形成细胞转运,促使黄褐斑的形成。此外,研究^[11]发现乙烯雌酚能通过激活 cAMP-PKA 信号通路,上调黑素生成相关酶表达和增强酶活性,促进黑素瘤细胞中黑素的生成。Hirobe et al^[12]通过研究证实,雌激素对雌性黄色小鼠毛发中黑色素的含量起着决定性的作用。本研究显示,一定浓度的雌二醇处理一定时间后能导致皮肤出现色素沉着,而结合 UVB 照射后,还可表现出协同的致色素沉着作用。在电镜结果中,一定浓度的雌激素不仅能增强黑素小体的合成与转运,同时可能抑制角质形成细胞内的黑素小体降解过程,导致皮肤色素沉着加深,且难以消除,推测其可能在黄褐斑的发病中发挥作用。

此研究尚处于初步阶段,结果表明色素沉着的发生发展与紫外线照射、体内雌激素水平异常有着密切的关系。色素沉着不仅与黑素小体合成增加和转运增强有关,也可能与黑素小体的降解受到抑制有关。

参考文献

- [1] Esser C, Krutmann J. UV radiation and skin pigmentation. Aryl hydrocarbon receptor- α "new kid on the block" [J]. *Hautarzt*, 2010, 61(7): 561-6.
- [2] Biliatis I, Thomakos N, Fafila C P, et al. Isosexual pseudoprecocious puberty in a 2(1/2)-year-old girl presenting with intense skin pigmentation [J]. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2010, 23(5): e145-8.
- [3] Kosmadaki M G, Naif A, Hee-Young P. Recent progresses in understanding pigmentation [J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2010, 145(1): 47-55.
- [4] Jeon S, Kim N H, Koo B S, et al. Bee venom stimulates human melanocyte proliferation, melanogenesis, dendricity and migration [J]. *Exp Mol Med*, 2007, 39(5): 603-13.
- [5] Sklar L R, Almutawa F, Lim H W, et al. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2013, 12(1): 54-64.
- [6] Kasamatsu S, Hachiya A, Shimotoyodome Y. The inhibitory effect of a Platycodon root extract on ultraviolet B-induced pigmentation due to a decrease in Kit expression [J]. *J Nat Med*, 2014, 68(3): 643-6.
- [7] 张敏, 李春阳, 王克玉, 等. 不同中波紫外线对豚鼠皮肤色素沉着及 α -黑素细胞刺激素表达的影响 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2011, 49(3): 59-63.
- [8] Hiramoto K, Kobayashi H, Yamate Y, et al. UVB-induced epidermal pigmentation in mice eyes with no contact lens wear and non-UVB blocking and UVB blocking contact lens wear [J]. *Cont Lens Anterior Eye*, 2013, 36(1): 28-31.
- [9] Jang Y H, Lee J Y, Kang H Y, et al. Oestrogen and progesterone receptor expression in melasma: an immunohistochemical analysis [J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2010, 24(11): 1312-6.
- [10] Kim N H, Cheong K A, Lee T R, et al. PDZK1 upregulation in estrogen-related hyperpigmentation in melasma [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(11): 2622-31.
- [11] Jian D, Jiang D, Su J, et al. Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediating up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells [J]. *Steroids*, 2011, 76(12): 1297-304.
- [12] Hirobe T, Kiuchi M, Wakamatsu K, et al. Estrogen increases hair pigmentation in female recessive yellow mice [J]. *Zoolog Sci*, 2010, 27(6): 470-6.

The effect and mechanism of estradiol and UVB radiation on pigmentation of guinea-pig skin

Zhou Yingli, Song Xiuzu, Hong Weisong, et al

(Dept of Dermatology, Hangzhou Clinical College of Anhui Medical University, Third People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310009)

Abstract Objective To investigate the influence of estradiol and ultraviolet B (UVB) radiation on melanin metabolism of guinea-pig's brown dorsal skin, and explore the relationship between the estrogen and ultraviolet in skin pigmentary disorder. **Methods** Healthy suit guinea-pigs were selected in this study. The guinea-pigs skin was divided into solvent control group, UVB irradiation group, estradiol treatment group and UVB irradiation after estradiol pretreatment group (estradiol + UVB group). The concentrations of estradiol were set to 3.67×10^{-5} , 3.67×10^{-4} , 3.67×10^{-3} mol/L. The UVB exposure dose was unified as 500 mJ/cm^2 . *In vivo* confocal laser scanning microscopy (referred to as skin CT) and transmission electron microscopy were used to observe the effects of estradiol and UVB on melanin metabolism and degradation. **Results** ① The pigmentation of guinea-pig skin was deepened after a certain concentration of estradiol treatment, increased gradually with the increasing of estradiol concentration ($P < 0.05$). ② The pigmentation of guinea-pig skin was also deepened significantly in UVB irradiation group, compared with non-UVB irradiation group ($P < 0.05$). ③ The autophagy of epidermal keratinocytes of Guinea pigs increased with UVB irradiation, but decreased with estradiol treatment. **Conclusion** Estradiol and UVB irradiation can promote pigmentation of guinea-pig skin and the mechanism may be related to the promotion of melanosomes synthesis. The degradation of abnormal melanosomes may also be involved in the formation of pigmentation.

Key words estradiol; pigmentation; melanosome; ultraviolet B