

黑色素形成分子调控及美白剂功效评价方法

步 犁,程树军,马来记

【关键词】 黑色素;分子调控;美白;功效评价

【中图分类号】 R 364. 23 【文献标识码】 A

皮肤中的正常黑色素颗粒对于抗紫外线、抗氧化起到积极的防护作用,而未经紫外线防护的皮肤或在一些病理情况(如过敏性皮炎、日光性皮炎、炎症、黑斑病等)下出现的黑色素过度表达,可能导致皮肤发黑或色素沉着。因而,具有美白功效产品的开发成为化妆品公司和研究机构的重要领域。肤色的深浅主要受黑色素含量和分布的影响,黑色素的形成是受多基因控制的极其复杂的生物学过程,涉及黑色素细胞的发生、树突形成,黑色素小体成熟、转运等机制,并与角质细胞和细胞外基质有关^[1-3]。近年来,随着对人体黑色素形成的基因调控、信号通路等生物学机制了解的不断深入,以及黑色素细胞分离培养、体外重建皮肤模型、细胞标记与识别技术、组学技术的发展,以黑色素生物学过程中起关键作用的步骤为依据建立体外检测方法,成为发现新型美白剂的趋势。整合运用上述方法和临床评估系统,有望建立科学和高效的美白化妆品安全和功效评估体系。

1 黑色素形成的分子调控

黑色素细胞位于皮肤基底层,一个黑色素细胞由大约 36 个角化细胞包围,它们构成一个表皮黑色素单元。黑色素在表皮基底部的黑素细胞中形成,其过程为黑素细胞中的酪氨酸在酪氨酸酶的作用下羟化生成多巴,再氧化为多巴醌,后者经多次聚合反应及与无机离子、还原剂、硫醇、氨基化合物、生物大分子发生一系列反应生成无色多巴色素,最终形成黑色素,黑色素转移至基底细胞中,随着表皮细胞的移行被带到表皮全层,最后随角化细胞的脱落而消失。

1.1 黑色素小体的产生和成熟

紫外线(ultra-violet ray, UV)照射可以诱导脑垂体分泌的 α -促黑素细胞激素(alpha-melanocyte-stimulating hormone, α -MSH)与黑色素细胞表面黑皮质素受体 1(Melanocortin-1 receptor, MC1R)结合,增强第二信使 cAMP 水平,随即活化酪氨酸酶,启动黑色素小体的形成。经过黑色素细胞内一系列反应最终导致小眼球相关转录因子(Microphthalmia associated transcription factor, MITF)生成,后者是诱导黑色素蛋白表达增加的控制因子。除了直接作用于黑色素细胞外,UV 照射及其它外界刺激还可以通过诱导角质细胞释放促炎症介质影响黑色素的形成,这些介质包括白细胞介素 1(interleukin 1, IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 和内皮素 1(endothelin 1, ET-1)。IL-1、IL-6 和 TNF- α 均能抑制黑色素的生成和黑色素细胞的增殖,并且能诱导黑素细胞表面细胞间粘附分子 1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)的表达,后者触发白细胞与黑素细胞的粘附,使黑素细胞成为细胞毒性 T 细胞、NK 细胞的靶细胞而易受损伤,导致炎症后色素减退,影响肤色均一性。ET-1 通过作用于黑色素细胞受体介导的信号转导通路,以旁分泌的方式刺激黑色素细胞增殖,促进突触生成,研究表明抑制 ET-1 表达或拮抗 ET-1 受体的活化均可以早期抑制黑色素生成。

外界因素通过影响 MITF 水平的变化,进而控制多种黑色素蛋白的表达,例如前黑色素体蛋白 1(Pmel-1),其作用是形成纤维骨架,为后续黑色素合成和处理提供场所。Passeron 认为 MITF 受 SOX9 转录因子的调控^[4],后者通过 cAMP-PKA 通路进行信号传导,但是此通路同样会激活 PKC 导致酪氨酸酶的活化。有实验证明用特异性的 PKC 酶抑制剂抑制 PKC 活性,则可以减少豚鼠的皮肤色素沉着。

MC1R 是一种 G 蛋白偶联受体,是控制黑色素产生的质量和数量最重要的蛋白^[5]。MC1R 受 α -MSH

【基金项目】 广东省科技计划项目(2009B060300013)

【作者单位】 510623 广东广州,广东出入境检验检疫技术中心[步 犁(广东药学院在读硕士研究生)、程树军];上海家化联合股份有限公司(马来记)

【通讯作者】 程树军, E-mail: chengciq@sohu. com

和促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)调控,ACTH与MC1R结合触发一系列黑色素生成反应,导致cAMP的激活,最终生成真黑素;而ACTH的拮抗剂可阻碍MC1R的激活,使真黑素的生成过程转化为生成褐黑素的过程。黑色素小体生成后期,3个重要蛋白起到关键作用,即酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)、酪氨酸酶相关蛋白1(tyrosinase related protein 1, TRP-1)和酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2),这3种酶产生褐黑素和真黑素两种不同的色素。两种色素的转换也部分受MC1R受体的控制^[6]。

目前普遍认为酪氨酸酶是黑色素形成过程中主要的限速酶,其活性大小决定着黑色素形成的数量,其催化的酶促反应受多巴、巯基化合物、微量元素、激素(α -MSH、ACTH、性激素、甲状腺素)等多种因素的影响。TRP-1和TRP-2是黑色素细胞和恶性黑色素瘤细胞中含量最丰富的一种糖蛋白^[6],TRP-1在黑色素合成的下游途径中起重要作用。TRP-1突变可引起肤色变浅,TRP-1能与磷酸化的酪氨酸酶形成复合体,从而可能对酪氨酸酶的激活和稳定起作用,抑制TRP-1的表达会引起黑色素体的结构异常。TRP-2可与酪氨酸酶和TRP-1形成复合物,在黑色素合成过程中,TRP-2将多巴色素催化为羧化物衍生物5,6-二羟吲哚-2-羧酸(DHICA)。

黑色素细胞内的受体也与黑色素的生成有关,如作用于过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)的十八碳烯二酸可以使黑色素生成减少,酪氨酸表达降低。PPAR受体的激动剂罗格列酮发现具有同样的美白效应^[7]。此外,减少黑色素细胞内活性氧自由基水平也可以阻止黑色素生成。在使用DPPH自由基清除法测试植物或水果提取物抗氧化能力或氧基吸收能力的试验中发现,每日口服维生素C、E和半胱氨酸的棕色豚鼠由UV诱导的色素沉着明显减少。

1.2 黑色素生成的细胞外基质因素

多种信号通路参与了黑色素的形成过程,许多内外因素通过干扰信号通路影响黑色素细胞的增殖和黑色素形成。其中最重要的是细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)通路,这个通路可被多种刺激因素激发,如碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)。c2-神经酰胺是一种细胞活素,它通过激活ERK抑制黑色素的生成,在抑制ERK通路和AKT/PKB通路的试验中已证明c2-神

经酰胺可促进人黑色素细胞生成黑色素^[8]。近来, Kim^[8]发现一种新的美白剂土曲霉酮可以激活ERK,降低MITF,与酪氨酸酶抑制剂KI-063共同作用,可导致小鼠黑色素细胞的脱色作用。

SCF是细胞活素类因子,它与c-kit受体结合。活化c-kit可以导致多条信号通路的活化,包括RAS/ERK, PI3-Kinase, Src kinase和JAK/STAT通路^[9]。有研究者利用SCF/c-kit通路评价美白物质的功效,用人黑色素细胞筛选了10 000种合成化合物后发现,苯基咪唑硫胺类的衍生物能抑制干细胞因子诱导c-kit磷酸化^[10]。栀子苷是治疗一般性白癜风的常用中药,这种化合物可通过SCF/c-kit通路促进黑色素生成,抵抗因去甲肾上腺素抑制而导致下降的黑色素合成功能。

黑色素成熟过程还与Wnt/ β 蛋白通路有关^[11],成纤维细胞分泌的因子Dkkopf(DKK1)可以抑制Wnt蛋白和其受体的结合,抑制黑色素细胞成熟和抑制黑色素产生。

1.3 黑色素细胞树突的形成

黑色素小体内部填满黑色素,黑色素细胞特有的指状突触为成熟黑色素小体的转运打开了一条高速通路。在人体内,仅有少数细胞有此功能。黑色素突触的形成受多种信号通路调控,例如微量前列腺素PGE2可以刺激黑色素细胞生成突触,目前已确认有2种前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)受体的表达(EP1和EP3)^[12]。

黑色素突触的形成受角质细胞释放的旁分泌因子等多种信号通路刺激^[13]。在人黑色素细胞中,Rac蛋白和Rho蛋白之间的活化平衡对黑色素突触的形成起决定性作用。其他影响黑色素细胞骨架构建的还有蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)信号通路,人黑色素细胞表达5种PKC亚型: α 、 β 、 δ 、 ϵ 和 ζ 。有研究发现PKC ζ 亚型是黑色素细胞突触形成的信号调节者。PKC ζ 管理有丝分裂,细胞极性和分化成其他细胞型,并且最近的研究发现PKC ζ 活化刺激有自主生成能力的细胞生成丝状伪足。因此,PKC ζ 的活化可以同时增加突触的形成和向角质细胞转移黑色素小体的数量。

在突触形成过程中,MITF也发挥了重要作用,研究发现,在黑色素细胞培养中MITF衰竭的黑色素细胞更为圆润,突触的生成明显减少^[14]。

1.4 黑色素的转运

在黑色素生成后期,黑色素被黑色素小体包裹,沿着突触移动。这个过程由黑色素细胞内的特殊的“微

管”结构完成,它由驱动蛋白和动力蛋白提供能量。黑色素小体沿突触移动,在突触的顶端形成包囊,将黑色素转运至角质细胞。蛋白酶活性受体2(protease activated receptors-2, PAR-2)在黑色素小体的转运过程中起着重要作用,此受体亦可作为目标受体用于皮肤美白剂的开发^[15]。在黑色素细胞中还发现一种氨基外端的β-可溶性淀粉样前体蛋白(soluble amyloid precursor protein, sAPP)的高表达,推测可能与突触的形成有关,锁定sAPP信号可以影响黑色素小体的转运。抑制黑色素细胞突触的形成同样可以抑制黑色素小体向角质细胞的转运。在黑色素生成和成熟过程中起关键作用的MITF在黑色素转运过程中也扮演重要角色,它控制突触顶端包裹黑色素小体的蛋白的表达。抑制黑色素的转运是近年来美白剂研究的重要方向,如发现调控钙离子流可以干扰黑色素的转运^[16],维生素B3的衍生物维生素pp可以抑制黑色素小体的转运等,但对于确切作用机制还有待进一步证明。

1.5 角质细胞的摄取

黑色素小体是如何从黑色素细胞的突触转移至角质细胞的,至今仍存在争论。有4种学说对此作出解释^[17]:胞吞假说,认为由突触释放出小体,并被周围的角质细胞吞噬;胞吐假说,黑色素小体的膜和黑色素细胞膜发生融合,在细胞外释放黑色素颗粒,由角质细胞吞噬;膜融合模型假说,突触在角质细胞上打开一条通路,为黑色素转运提供通道;囊泡转运模型假说认为在角质细胞吞噬前包含黑色素的囊泡从黑色素细胞上脱落,并释放入细胞外。据推测,角质细胞摄取黑色素小体的通道可能不只一个。因此,体外重建含两种细胞的共培养模型不仅可用于角质细胞摄取黑色素机制的研究,还有助于检测方法和美白剂的开发。

1.6 角质细胞的成熟和皮肤更替

在角质细胞摄取后,黑色素小体由溶酶体结构水解,并转运至细胞核附近。在此,黑色素进行重排,形成一个帽子结构,以保护角质细胞的DNA不受UV辐射的负面影响^[18]。此时,带有色素的角质细胞会向皮肤角质层上移,并形成最终肤色。

2 基于黑色素调控机制的美白物质评价方法

根据黑色素形成的分子调控机制,美白物质的评价可以通过多种途径实现:在黑色素小体形成期,降低MITF水平或抑制MC1R受体达到美白的目的;黑色素生成期可以通过对酪氨酸受体的竞争性结合,抑制酪氨酸活性,或通过前文所述的通路和受体达到美白

的目的;在形成突触和黑色素转运期间,可以通过抑制突触生成,降低树突蛋白的表达方法抑制黑色素的沉着。按照实验方法的不同,美白物质的体外评价方法可分为无需细胞培养的酶生化试验,黑色素细胞培养实验,人工皮肤模型试验,黑色素细胞和角质细胞共培养实验等。

2.1 非细胞培养的酶类试验

酶生化系统常用蘑菇酪氨酸酶为材料,通过测定化妆品有效成分对酪氨酸酶活性的影响来评价美白功能。检测方法有同位素法、免疫学法或生化法。酶体系含有蘑菇酪氨酸酶、酪氨酸、L-多巴等成分,加入受试物经反应后,使用紫外分光光度计分别在305 nm和475 nm测定吸光度,计算酪氨酸酶和多巴的活性。酶法测试的优点是无需细胞培养、简单快速。缺点是体系过于简单。因为黑色素的形成机制极为复杂,单凭化合物对酪氨酸酶活性的抑制程度判定其美白效果必然是片面的,并且有时因酶材料来源不同,结果会出现差异,因此需要其它体外实验或体内实验确认。

2.2 黑色素细胞培养实验

黑色素细胞体外培养是研究美白活性物质的最常用方法,可利用其测定酪氨酸酶活性、酪氨酸表达量,以及测定细胞中黑素含量,细胞本身的增殖、形态和结构也是常用的分析指标。黑色素细胞的效果评价中一般采用分光光度法、图像分析技术法或四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法观察美白活性物质对黑色素细胞生长情况的抑制作用^[19],还可以基于黑色素生物学过程对待评物质的美白机制进行研究。研究发现,土曲霉酮可以激活ERK、降低MITF,使黑色素细胞的合成降低,而与新的酪氨酸酶抑制剂KI-063一起可以导致Mel-ab黑色素细胞的脱色作用^[8]。干扰黑色素细胞外基质条件是影响黑色素生成的分子机制之一,因此在黑色素细胞培养体系中改变培养条件有可能发现新的美白作用,如ET-1和α-MSH是影响黑色素形成的重要蛋白,通过测试物质对这两种细胞因子的抑制作用,有望发现美白的新途径。

黑色素细胞培养实验常用小鼠B16黑色素瘤细胞。其优点是获得容易、易于培养。但缺点是与人体黑色素细胞存在差异,而且经过几代反复培养后,其黑素产生能力会降低,需要在裸鼠体内重新成瘤后再次培养以获得高表达细胞。因此建立稳定的人体黑色素细胞体外筛选系统非常必要^[2]。

2.3 人工皮肤模型试验

与单层细胞相比,多种皮肤细胞共培养系统或三

维皮肤模型模拟了正常皮肤的结构,可用于评估黑色素形成过程中多种细胞相互作用的研究,也便于控制培养条件,探索美白剂的作用机制。近年来,皮肤共培养系统和人工皮肤模型已成功用于皮肤刺激、光毒性和皮肤致敏的评价中,也用于皮肤吸收和功效的检测。含黑色素细胞的多种皮肤共培养系统可采用松散式培养(如采用嵌入式培养模型),也可使用夹心培养(如RFTM模型或Epiderm模型)。应用皮肤模型的测试可将待测物直接涂布于具有屏障功能的表皮表面。作用一段时间后,检测深层的黑色素细胞的变化,检测指标包括黑色素颗粒的定量、酪氨酸酶活性测定,黑色素特异性MART-1免疫荧光的图像分析。还可定量检测角质细胞摄取黑色素的量(利用像素分析软件),以及培养基中的角质细胞释放的细胞因子的变化^[3,16]。

2.4 角质细胞摄取黑色素实验

根据黑色素转移通路,可从抑制黑色素细胞突起形成、阻碍角质细胞对黑色素的摄取、抑制角质细胞吞噬活性、或作用于MITF抑制黑色素转移等关键步骤设计实验研究美白剂的作用。角质细胞黑色素摄取实验,是一种评价美白作用的新方法。先在正常人表皮角质形成细胞NHEK培养中加入测试化合物,孵化24 h后,再加入带有荧光的黑色素颗粒(类似黑色素),孵化4 h后测量培养基中剩余的荧光剂的含量,与未经受试物处理的角质细胞自由摄取的黑色素对照,以半数抑制剂量 IC_{50} 表示,结果越大,表示抑制效果越好。辅助角质细胞中荧光颗粒的图像分析,可提高实验数据的说服力。角质细胞黑色素摄取实验也可采用松散式(loose-fit)的角质细胞-黑色素细胞共培养系统,通过流式细胞仪测定共培养体系中角质形成细胞内黑色素的量,评价美白剂抑制黑色素转移的效果。

参 考 文 献

[1] Passeron T, Valencia JC, Bertolotto C, *et al.* SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation[J]. Proc Natl Acad Sci, 2007, 104(35): 13984-13989

[2] 程树军. 利用人类皮肤黑色素细胞分析美白剂毒性和功效的方法; 中国, 200810220666[P]. 2009-09-16

[3] Van Gele M, Geusens B, Speeckaert R, *et al.* Development of a 3D

pigmented skin model to evaluate RNAi-induced depigmentation[J]. Exp Dermatol, 2011, 20(9): 773-775

[4] Wasmeier C, Hume AN, Bolasco G, *et al.* Melanosomes at a glance[J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt24): 3995-3999

[5] Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation[J]. Nature, 2007, 445(7130): 843-850

[6] Schiaffino MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(7): 1094-1104

[7] Wiechers JW, Rawlings AV, Garcia C, *et al.* A new mechanism of action for skin whitening agents: Binding to the peroxisome proliferator-activated receptor[J]. Int J Cosmet Sci, 2005, 27(2): 123-132

[8] Kim DS, Lee S, Lee HK, *et al.* The hypopigmentary action of KI-063 (a new tyrosinase inhibitor) combined with terrein[J]. J Pharm Pharmacol, 2008, 60(3): 343-348

[9] Rnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(19-20): 2535-2548

[10] Na J, Baek HS, Ahn SM, *et al.* [4-t-Butylphenyl]-N-(4-imidazol-1-yl phenyl)sulfonamide (ISCK03) inhibits SCF/c-kit signaling in 501mel human melanoma cells and abolishes melanin production in mice and brownish guinea pigs[J]. Biochem Pharmacol, 2007, 74(5): 780-786

[11] Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(38): 27557-27561

[12] Scott G, Fricke A, Fender A, *et al.* Prostaglandin E2 regulates melanocyte dendrite formation through activation of PKCzeta[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(18): 3840-3850

[13] Scott G, Jacobs S, Leopardi S, *et al.* Effects of PGF 2alpha on human melanocytes and regulation of the FP receptor by ultraviolet radiation[J]. Exp Cell Res, 2005, 304(2): 407-416

[14] Kawasaki A, Kumasaka M, Satoh A, *et al.* Mitf contributes to melanosome distribution and melanophore dendricity[J]. Pigment Cell Melanoma Res, 2008, 21(1): 56-62

[15] Sharlow ER, Paine CS, Babiarz L, *et al.* The protease activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis[J]. J Cell Sci, 2000, 113(pt17): 3093-3101

[16] Joshi PG, Nair N, Begum G, *et al.* Melanocyte-keratinocyte interaction induces calcium signalling and melanin transfer to keratinocytes[J]. Pigment Cell Res, 2007, 20(5): 380-384

[17] Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J. The quest for the mechanism of melanin transfer[J]. Traffic, 2006, 7(7): 769-778

[18] Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, *et al.* Cellular mechanisms regulating human melanogenesis[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(9): 1493-1506

[19] Lee KT, Lee KS, Jeong JH, *et al.* Inhibitory effects of Ramulusmori extracts on melanogenesis[J]. J Cosmet Sci, 2003, 54(2): 133-142

(2012-05-21 收稿)