

## 新型涂布法黑素细胞移植系统治疗白癜风临床观察

鲁 严\*,李 雪,周梅华,孙 杰,吴 迪,王大光,朱文元

(南京医科大学第一附属医院皮肤科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:观察新型涂布黑素细胞移植系统治疗白癜风的临床疗效。方法:配制以人重组粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, rhG-CSF)为主要生长因子的培养基,混合卡波姆凝胶构成一种涂布载体系统用于黑素细胞移植治疗白癜风,按拟定标准进行疗效评估。结果:所有患者均有>20%以上复色,其中6例复色面积超90%,11例复色70%~80%,15例复色30%~50%,有效率100%。84.4%的患者呈均匀复色,无明显斑驳现象。所有患者未出现不良反应。结论:新型涂布法黑素细胞移植系统治疗白癜风是一种安全、有效的方法。

**[关键词]** 黑素细胞;移植;白癜风;卡波姆胶

**[中图分类号]** R758.41

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)03-360-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130315

## The clinical effect observation on the new system of coating in the treatment of vitiligo with melanocytes transplantation

Lu Yan\*, Li Xue, Zhou Meihua, Sun Jie, Wu Di, Wang Daguang, Zhu Wenyuan

(Department of Dermatology and Venereology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the clinical effect of melanocytes transplantation on vitiligo with coating method in 32 patients. **Methods:** The medium was prepared with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) as the major growth factor, mixed with carbomer gel to constitute the system of coating on the treatment of vitiligo with melanocytes transplantation. Therapeutic evaluation was assessed with certain standard. **Results:** All patients had repigmentation for more than 20%, in which the repigmentation of six cases was more than 90%, 11 cases for 70% to 80% and 15 cases for 30% to 50%. The total effective rate was 100%. The 84.4% of the patients showed evenly repigmentation. No obvious mottling was observed. **Conclusion:** Melanocytes transplantation on vitiligo with coating method is safe and effective.

**[Key words]** melanocyte; transplantation; vitiligo; carbomer gel

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 360-363]

自体培养黑素细胞移植是治疗稳定期白癜风的有效手段,近年来国内外已有大量的文献报道,体外纯化并扩增培养黑素细胞能够为移植提供更多的细胞来源。该技术成功与否的关键,是黑素细胞能否在移植床部位顺利黏附,进而生长、增殖。目前,黑素细胞移植是以细胞悬液的形式进行的。细胞悬液具有流动性,会造成黑素细胞在移植床部位附着存

在一定困难。多年来,人们一直试图将组织工程学引入黑素细胞移植中,2008年有报告使用羊膜作为移植载体<sup>[1]</sup>,可用于黑素细胞移植。将培养扩增后的细胞转移到该膜上,培养后应用到色素脱失部位,取得95%以上的复色率。

本研究中采用的移植细胞载体不同于以往组织的概念,将卡波姆胶(carbomer)作为黑素细胞的载体<sup>[2]</sup>,该化合物本身是优良、安全的高分子材料和药用辅料,可作为凝胶基质、生物黏附材料、缓控释骨架材料等,在药学领域已经广泛应用,且具有廉价、容易获得的特点。由于目前移植用黑素细胞培养基含有碱性成纤维细胞生长因子(basicity fibroblast

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81171517);江苏省社会发展计划(BS2007072)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: luyan1971@yahoo.com.cn

growth factor, bFGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等多种细胞因子,该类培养基实施成本极高,本课题组在前期研究的基础上,研制出一种以人重组粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating, factor rhG-CSF)<sup>[3]</sup>为主要生长因子的黑素细胞的培养基,结合以上卡波姆胶,组成独特的黑素细胞载体系统,对 32 例稳定期白癜风行涂布法移植,取得较好的近期疗效,现报告如下。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

32 例白癜风患者为 2010 年 5 月~2012 年 10 月南京医科大学第一附属医院皮肤科门诊患者,均符合中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组制定的标准<sup>[4]</sup>。年龄 16~52 岁,男 11 例,女 21 例,平均病程 5.27 年,均为稳定期 1 年以上的寻常型白癜风,均无手术禁忌证。试验方案经医院伦理委员会批准,手术前患者均签署知情同意书。

卡波姆 940(Noveon 公司,美国);Ham, F12 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、Dispase 酶(Gibco 公司,美国);rhG-CSF、geneticin、胎牛血清(FCS)(Sigma 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表皮黑素细胞悬液制备

常规消毒患者供皮区,2%利多卡因局部浸润麻醉,用吉利双面刀片与皮肤呈 10°锐角采取表皮,取下后置入含 1 g/L 的肝素生理盐水中漂洗数次,表面无血块血丝后,加入含 Dispase 酶的 D-Hanks 液中 37℃ 3 h,挑弃部分真皮,用虹膜剪将组织剪成约 0.2 cm 的小片,用 0.25%胰蛋白酶 37℃吹打消化 20 min,再用 10%FCS 终止消化。用 D-Hanks 液洗涤细胞后 1 500 r/min 离心 10 min,收集沉淀细胞重悬浮于黑素细胞培养基中。

#### 1.2.2 黑素细胞培养基配置及卡波姆胶载体制备

在前期的工作基础上研制出以 rhG-CSF 为主要促细胞增殖因子的培养基<sup>[3]</sup>,其中含 Ham' F12 培养基,2 mmol/L 谷氨酰胺,10%的胎牛血清, $\alpha$ -黑素细胞刺激素( $\alpha$ -MSH)100 ng/ml,肾上腺素 1.5  $\mu$ g/ml,抗坏血酸钠 5  $\mu$ g/ml,青霉素 100 U/ml,链霉素 100  $\mu$ g/ml,基因素(geneticin)100  $\mu$ g/ml, rhG-CSF 600  $\mu$ g/L。以上细胞以  $5 \times 10^5$  个/ml 密度接种于含黑素细胞培养基的培养瓶中,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃孵育。6 h 后换液 1 次去除未贴壁细胞,

48 h 后改用不含 geneticin 的培养基,3 d 换液,当细胞长满 70%~80%时,用 2.5 g/L 胰酶消化传代。黑素细胞鉴定采用 HMB45 染色和 Masson-Fontana 染色。另外,卡波姆胶半固体培养基的配置:称取卡波姆 940 5 g,与 500 ml 以上不含 geneticin 培养基混合均匀,即得质量分数为 1%卡波姆 940 黑素细胞载体胶液,注意配制时将卡波姆 940 干细粉分次撒于培养基液面上,使其充分溶胀,避免结块。测定 pH,10 mol/L NaOH 调 pH 至 6.5 呈凝胶状。收集纯化培养的黑素细胞,加入适量上述配置的卡波姆胶半固体培养基中轻轻混匀,黑素细胞终浓度为  $5 \times 10^6$  个/ml。

#### 1.2.3 黑素细胞移植

常规利多卡因局部浸润麻醉后,采用绍兴市卫星医疗器械设备有限公司生产的 BFY-iA 型表皮皮肤分离仪表皮磨削机磨削白斑区,以点状出血为宜,后表面覆盖生理盐水湿纱布备用。将预先制备好的黑素细胞-卡波姆胶混合物轻轻涂抹于受植区,约 0.5 cm,再覆盖凡士林油纱布,并加压包扎固定(图 1)。一般 7 d 去除纱布,2 个月后观察疗效。

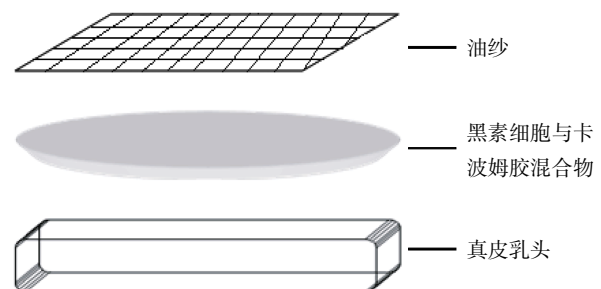


图 1 新型涂布法黑素细胞移植系统示意图

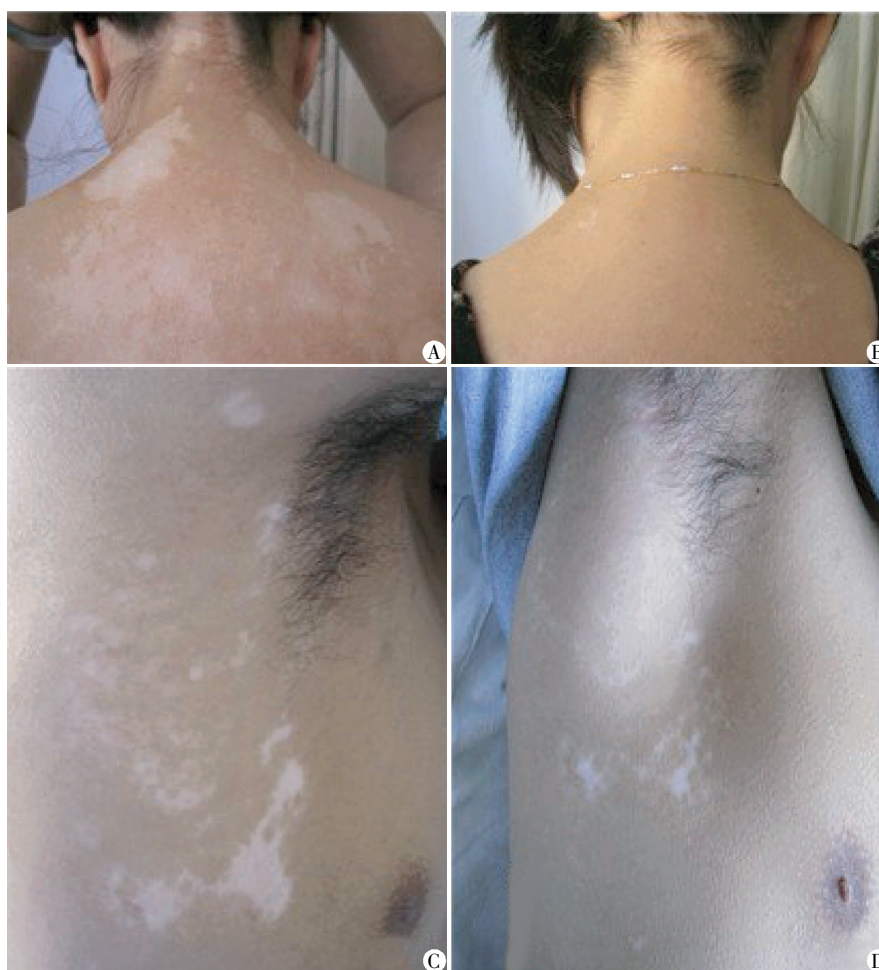
Figure 1 The new coating system of melanocytes trans plantation

#### 1.2.4 疗效判断

采用 Adobe Photoshop 7.0 图像软件系统评估复色面积,疗效判断参照参考文献<sup>[5]</sup>:治疗效果分为有效,包括复色优秀  $\geq 90\%$ ;良好 50%~89%;一般 20%~49% 以及无效  $< 20\%$ 。

## 2 结果

2 个月后,所有患者均有  $> 20\%$  以上复色,其中 6 例复色面积  $> 90\%$ ,11 例复色 70%~80%,15 例复色 30%~50%,有效率 100%。除 5 例患者为点状复色,其余为均匀复色形式,无明显斑驳现象。所有患者未出现瘢痕、过敏和其他不良反应。典型病例见图 2。



A、B: 病例一治疗前与治疗后6个月; C、D: 病例二治疗前与治疗后3个月。

图2 新型涂布法黑素细胞移植系统治疗白癜风前后疗效对比图

Figure 2 The comparison on of new system of coating in treatment of vitiligo with melanocytes transplantation

### 3 讨论

自体表皮移植术治疗白癜风最早由 Falabella<sup>[6]</sup> 开展,我国自 20 世纪 90 年代前后开始采用。近年来随着黑素细胞培养研究的深入,黑素细胞培养移植逐渐用于治疗白癜风。两种移植方法治疗白癜风主要是根据自体表皮或黑素细胞移植不发生排斥反应的原理,通过局部皮肤发疱法使表皮在基膜的透明带处分离,分离后的表皮基底细胞无损伤,且疱壁含有活的黑素细胞,将自体正常表皮直接移植或将经分离培养后的黑素细胞移植到白癜风色素脱失部位,移植成活后黑素细胞逐渐发挥功能。

自体表皮移植术治疗白癜风具有操作简单,实验条件要求不高的优点,其主要不足是一次移植面积相对较小,移植成活区出现的肤色呈“鹅卵石”样,且有的与周边正常皮肤不易融合。1987 年

Lerner 等首先应用培养自体黑素细胞移植治疗白癜风获得成功。黑素细胞经体外培养扩增后数量明显增多,适用于大面积的白斑区域移植,且复色均匀。但传统的黑素细胞移植术中由于细胞悬液具有流动性,使黑素细胞在移植床部位附着存在一定困难。本研究不同于以往组织工程的概念,引入卡波姆胶作为黑素细胞的载体系统,可以起到很好的固定作用,从而解决现有的黑素细胞移植过程中细胞悬液易流失的问题,减少黑素细胞的流失量,提高植入率并且不会对黑素细胞造成损伤,在临床应用中,操作简单安全。另外,由于该化合物本身是优良、安全的高分子材料和药用辅料,型号多样,可适应多种剂型的特点,如作为凝胶基质、生物黏附材料、缓控释骨架材料等,在药学领域已经广泛应用<sup>[7]</sup>,加之具有廉价、容易获得的特点,经以上前期实验研究结果证实,用于黑素细胞涂布法移植的临床实施具

有十分广阔的应用前景。

值得一提的是,本研究首次在培养基中引入 rhG-CSF 作为黑素细胞促增殖因子;这是基于本课题在前期已经证实黑素细胞表面表达 G-CSF 受体<sup>[8]</sup>,rhG-CSF 可以有效促进黑素细胞生长增殖。传统黑素细胞培养基主要应用 12-O-14 酰佛波醇 13-2 酸酯(TPA)及霍乱毒素(CT)促进黑素细胞增殖,但 TPA 具有致癌性,CT 是一种神经毒素,所培养的黑素细胞安全性受到质疑,因此临床应用受到限制。Hu 等<sup>[9]</sup>培养基使用 bFGF、HGF 代替 TPA、CT,解决了细胞安全性的问题,但是价格昂贵,细胞培养成本非常高。人体在正常情况下,单核巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞、间皮细胞等可诱导产生粒细胞集落刺激因子(G-CSF)<sup>[10]</sup>,G-CSF<sup>[11]</sup>是一种生理性细胞因子,对人体无毒害作用,基因重组技术生产的 rhG-CSF 广泛用于临床上各种白细胞减少症<sup>[12-13]</sup>、心肌梗死<sup>[14]</sup>、神经保护<sup>[15]</sup>、抗休克等,安全性高,价格便宜,容易获得。因此,用 rhG-CSF 作为主要促黑素细胞增殖因子配制的培养基进行白癜风患者黑素细胞的体外培养,不但能在短期内得到大量纯化的黑素细胞,而且大大降低了手术成本。

另外,卡波姆又名聚羧乙烯(carboxy polymeth-  
leme,CP),是一种由丙烯酸与烯丙基蔗糖交联而成的高分子聚合物,是一种多用途的高分子材料和药用辅料,在国内外被广泛应用于药品和化妆品的研制生产,最早由美国 Goodrich 公司生产,现已收入美、英等国药典,我国 2000 年版药典就已收载<sup>[16]</sup>。卡波姆胶作为黑素细胞涂布法移植的载体国内外未有报告。

本研究结果提示,该培养基及卡波姆胶系统可以用于新型涂布法黑素细胞移植,具有安全、有效的特点,具有潜在开发价值。

#### [参考文献]

- [1] Hopkinson A,Shanmuganathan VA,Gray T,et al. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part C Methods*,2008,14 (4):371-381
- [2] 鲁 严,周梅华,李 雪,等.新型黑素细胞涂布法移植的卡波姆胶载体的制备研究[J].*中国中西医结合皮肤性病学期刊*,2012,11(4):208-310
- [3] 周梅华,李 雪,吴 迪,等.粒细胞集落刺激因子及其受体对人黑素细胞增殖及酪氨酸酶活性的影响 [J].*中*

- 华皮肤科杂志,2012,45(8):28-32
- [4] 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组.白癜风治疗共识(2009 版)[J].*中华皮肤科杂志*,2009,42(9):591-592
- [5] 罗显雁,许爱娥,李金超.外用 1%吡美莫司乳膏治疗白癜风临床疗效观察[J].*中华皮肤科杂志*,2009,42(1):16-18
- [6] Falabella R,Barona MI. Update on skin repigmentation therapies in vitiligo[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*,2009,22 (1):42-65
- [7] 卢 毅,张 彤,陶建生.卡波姆在药剂学中的应用[J].*中国医药工业杂志*,2007,38(6):457-460
- [8] Hirobe T,Furuya R,Hara E,et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) controls the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes from pigmented spots induced by ultraviolet radiation B [J]. *Pigment Cell Res*,2004,17 (3):230-240
- [9] Hu DN,McCormick SA,Seedor JA,et al. Isolation,purification and cultivation of conjunctival melanocytes[J]. *Exp Eye Res*,2007,84 (4):655-662
- [10] Hirobe T,Shinpo T,Higuchi K,et al. Life cycle of human melanocytes is regulated by endothelin-1 and stem cell factor in synergy with cyclic AMP and basic fibroblast growth factor[J]. *J Dermatol Sci*,2010,57 (2):123-131
- [11] Basu S,Dunn A,Ward A. G-CSF: function and modes of action[J]. *Int J Mol Med*,2002,10 (1):3-10
- [12] Khan TH,Shahidullah M,Mannan MA,et al. Effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) for the treatment of neonates in presumed sepsis with neutropenia[J]. *Mymensingh Med J*,2012,21 (3):469-474
- [13] 方拥军.用重组人粒细胞集落刺激因子治疗化疗所致骨髓抑制 40 例观察[J].*南京医科大学学报:自然科学版*,2000,20(4):277
- [14] Shim W,Mehta A,Lim SY,et al. G-CSF for stem cell therapy in acute myocardial infarction: friend or foe? [J]. *Cardiovasc Res*,2011,89 (1):20-30
- [15] Jiang H,Liu CX,Feng JB,et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates chronic neuroinflammation in the brain of amyloid precursor protein transgenic mice: an Alzheimer's disease mouse model[J]. *J Int Med Res*,2010,38 (4):1305-1312
- [16] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典[M].2 版.北京:化学工业出版社,2000:133

[收稿日期] 2012-12-23