

Sự khác biệt ở mức độ hình thái và mức độ phân tử giữa chân tóc đen và chân tóc bạc

Nguyễn Đình Thắng^{1,2*}, Lê Minh Hiền¹, Lê Thị Liên¹

¹Khoa Sinh, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ enzyme và protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 5.10.2015, ngày chuyển phản biện 13.10.2015, ngày nhận phản biện 20.11.2015, ngày chấp nhận đăng 27.11.2015

Khác với bạc tóc do lão hóa, bạc tóc sớm là hiện tượng bất thường xảy ra ở các bệnh nhân dưới 30 tuổi. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu đánh giá chuyên sâu về hiện tượng trên. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã tiến hành tiêu bản mô để tìm hiểu các giai đoạn: anagen (giai đoạn phát triển), catagen (giai đoạn suy thoái), telogen (giai đoạn nghỉ) trong chu trình phát triển của tóc. Quan trọng hơn, các kết quả mô học còn cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về hình thái giữa chân tóc bạc và chân tóc đen ở giai đoạn anagen (là giai đoạn quan trọng nhất cho sự hình thành sắc tố của tóc). Đồng thời, các tác giả cũng tiến hành kiểm tra và đánh giá sự biểu hiện của các phân tử đóng vai trò quan trọng tham gia vào con đường điều hòa quá trình sinh tổng hợp melanin (sắc tố tạo màu tóc) của tế bào melanocyte như: MC1R, MITF và Tyrosinase ở trong cả mô chân tóc bạc và mô chân tóc đen. Kết quả cho thấy, sự biểu hiện ở mức độ phiên mã của 3 gen MC1R, MITF, Tyrosinase trong mẫu mô chân tóc bạc thấp hơn rõ rệt so với mức độ biểu hiện của chúng ở trong mẫu mô chân tóc đen. Các kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, hiện tượng bạc tóc sớm có nhiều khả năng liên quan tới sự thoái hóa của nang chân tóc, dẫn tới làm suy giảm hoạt động của con đường tín hiệu MC1R/MITF/Tyrosinase và kết quả là làm giảm quá trình sinh tổng hợp melanin.

Từ khóa: chân tóc, melanin, melanocyte, tóc bạc sớm.

Chỉ số phân loại I.6

Đặt vấn đề

Bạc tóc là hiện tượng sợi tóc tạo ra không mang hoặc mang rất ít sắc tố melanin (một trong 3 nhóm sắc tố chính của cơ thể) gây ra bởi nhiều nguyên nhân khác nhau bao gồm cả nội sinh và ngoại sinh. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra nồng độ cao của các gốc tự do là một trong những nguyên nhân chính gây ra bạc tóc. Dựa vào thời gian bắt đầu quá trình bạc tóc, người ta chia làm 2 loại là bạc tóc do lão hóa và bạc tóc sớm. Bạc tóc do lão hóa bắt đầu xảy ra ở khoảng 35 tuổi với người châu Âu, 40 tuổi với người châu Á và 45 tuổi với người châu Phi. Quá trình này diễn ra một cách tự nhiên và mang tính tất yếu [1]. Bạc tóc sớm là hiện tượng bạc tóc bắt đầu trước 20 tuổi với người châu Âu, 25 tuổi với người châu Á và 30 tuổi với người châu Phi [2]. Trên thế giới hiện nay, chưa tìm ra được phương pháp thực sự hiệu quả và an toàn để làm tăng sắc tố, giảm tình trạng bạc tóc sớm. Việc đánh giá được sự khác biệt của tóc bạc và tóc đen sẽ góp phần tìm ra phương pháp tác động làm tăng hàm lượng melanin, cải thiện tình trạng bạc tóc, đặc biệt là bạc tóc sớm. Do vậy, chúng tôi thực hiện đề tài: “Nghiên cứu sự khác biệt ở mức độ hình thái và mức độ phân tử của chân tóc đen

và chân tóc bạc” với mục các tiêu: (1) Đánh giá được sự khác biệt về hình thái của chân tóc bạc và chân tóc đen; (2) Đánh giá sự khác biệt về biểu hiện ở mức độ phiên mã của 3 phân tử MC1R, MITF và Tyrosinase (3 phân tử tham gia vào con đường sinh tổng hợp melanin thông qua thụ thể MC1R). Con đường MC1R/MITF/Tyrosinase có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp melanin của tế bào melanocyte. Sự giảm hoạt động phiên mã của gen MC1R sẽ kéo theo dạng “mất xích” của MITF và Tyrosinase giảm, và kết quả sẽ làm suy giảm lượng melanin sinh ra [1, 3-5].

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu mô chân tóc được lấy từ các sinh viên Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, độ tuổi 19-22, có hiện tượng bạc tóc sớm. Mẫu mô da chuột đột biến gen RET (RET-transgenic mice) thu ở 2 giai đoạn: trưởng thành và lão hóa.

Phương pháp

Phương pháp mô học: quy trình tạo tiêu bản mô

*Tác giả liên hệ: Email: ndthang@hus.edu.vn

Morphological and molecular differences between black hair follicles and gray hair follicles

Summary

Immature hair graying is defined as an abnormal phenomenon occurring in patients younger than 30 years of age. However, study on this phenomenon is still limited. The authors studied on tissue specimens for the understanding of 3 stages of hair growth cycle: Anagen, Catagen and Telogen, as well as analysed the differences in follicle morphologies of black and gray hairs. In addition, the expression of important molecules contributing to melanine synthesis of melanocyte such as MC1R, MITF and Tyrosinase were then implemented through molecular techniques. Results showed that the mophology of gray hair follicle differed from that of black hair follicle in three important aspects, including dermal papillae structure, melanocyte cell shape and sebaseous structure. The expressions of MC1R, MITF and Tyrosinase at the transcription levels of follicles of gray hairs were lower than those of black hair follicles. The research results indicated that immature hair graying directly related to the reduction of MC1R expression followed by the reduction of MITF and Tyrosinase expression at the transcriptional levels.

Keywords: gray hair, hair follicle, melanin, melanocyte.

Classification number 1.6

được thực hiện theo phương pháp mô học, được mô tả trong nghiên cứu trước đây [6]. Mẫu mô da chuột (0,5 x 0,5 cm) ngâm trong dung dịch Bouin (5 ngày). Sau đó, cố định vào khối parafin đúc. Tiến hành cắt mẫu thành lát mỏng có độ dày 7 μ m và cố định lên lam kính. Tiêu bản được nhuộm bằng dung dịch Hematoxylin và Eosin. Cuối cùng, quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi.

Phương pháp tách RNA tổng số: tách chiết RNA tổng số từ da chuột theo quy trình tách của kit tách *Thermo scientific GeneJET RNA Purification Kit*. Phương pháp được tiến hành như sau: cho vào ống chứa mẫu 300

μ l Lysis buffer (đã bổ sung β -mercaptoethanol), vortex đều trong 10s. Thêm 600 μ l protease K, vortex đều, ủ 10 phút ở 15-25°C. Ly tâm 5 phút (12.000 vòng/phút). Thu dịch nổi sang ống eppendorf mới. Thêm 450 μ l ethanol 100%, mix đều bằng pipet. Chuyển dịch nổi sang cột tinh sạch, ly tâm 1 phút (12.000 vòng/phút). Thêm 700 μ l dung dịch đệm rửa 1 (đã bổ sung ethanol) vào cột, ly tâm 1 phút (12.000 vòng/phút). Bỏ dịch chảy qua. Lặp lại 2 lần: thêm 600 μ l dung dịch đệm rửa 2, ly tâm 2 phút (12.000 vòng/phút). Chuyển cột sang ống eppendorf mới. Thêm 30 μ l water, nuclease free, ly tâm 1 phút (12.000 vòng/phút). Bỏ cột, thu RNA tổng số, bảo quản ở -20°C.

Phương pháp tổng hợp cDNA: RNA tổng số sau thu được tiến hành tổng hợp cDNA: với 11 μ l RNA bổ sung 1 μ l random hexamer. Sau đó bổ sung lần lượt: 4 μ l Reaction buffer 5x, 1 μ l RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l dNTP Mix 10 mM, 1 μ l RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ l). Mix đều, ly tâm nhẹ và ủ với chu trình nhiệt 25°C trong 10 phút, 42°C trong 60 phút, 70°C trong 5 phút. Bảo quản cDNA thu được ở -20°C.

Phương pháp PCR: đoạn DNA được khuếch đại sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho các gen cần nhân lên (GADPH - 496 bp, MC1R - 133 bp, MITF - 121 bp, Tyrosinase - 111 bp). Phản ứng PCR được thực hiện với V=25 μ l bao gồm các thành phần: 2,5 μ l dNTP 2 mM, 2,5 μ l Taq buffer, 0,3 μ l Hot Taq polymerase, 1 μ l mồi xuôi, 1 μ l mồi ngược và H₂O. Chu trình nhiệt tương ứng với từng cặp mồi đặc hiệu cho gen cần khuếch đại với cặp mồi:

Gen MC1R:

Mồi xuôi 5'-ACTCCGTCTGCTCCAATG-3', Tm = 57°C,

Mồi ngược 5'-GCTGTGGGAGTAGCTCTTGG-3', Tm = 57,6°C.

Gen MITF:

Mồi xuôi 5'-CCGTCTCTCACTGGATTGGT-3', Tm = 56,5°C,

Mồi ngược 5'-TGGGCTTGCTGTATGTGGTA-3', Tm = 56,3°C.

Gen Tyrosinase:

Mồi xuôi 5'-TTGCCTGAGTTTGACCCAAT-3', Tm = 54,8°C,

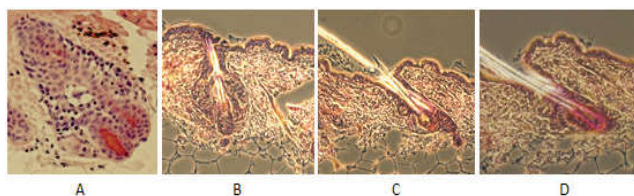
Mồi ngược 5'-GCATCCGCTATCCCAGTAAG-3', Tm = 56,2°C.

Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 1,5%.

Kết quả và thảo luận

Hình thái của chân tóc ở các giai đoạn phát triển của tóc

Theo các nghiên cứu, một chu kỳ phát triển của tóc gồm 3 giai đoạn: anagen - giai đoạn phát triển (anagen sớm và anagen muộn), catagen - giai đoạn suy thoái, telogen - giai đoạn nghỉ [7-10]. Quan sát đặc điểm vị trí, hình dạng nhú bì, kích thước hành tóc, độ dài nang tóc của tiêu bản mô (hình 1), chúng tôi có thể phân biệt được các giai đoạn trong chu kỳ phát triển của tóc với các tiêu chí đánh giá được trình bày ở bảng 1.



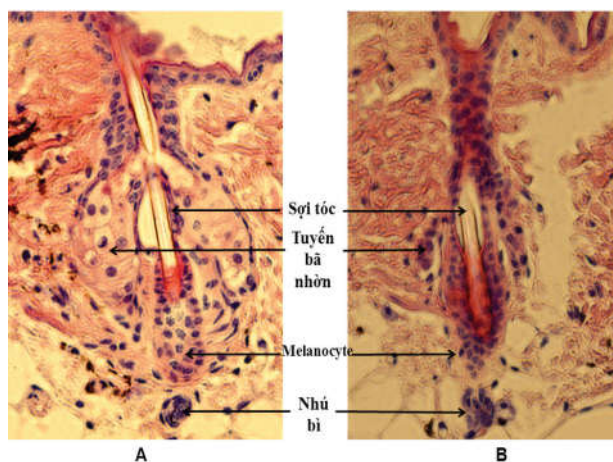
Hình 1: tiêu bản mô học nang tóc giai đoạn anagen rất sớm (A), giai đoạn anagen phát triển mạnh (B), giai đoạn catagen (C), giai đoạn telogen (D)

Bảng 1: đặc điểm hình thái quan sát được từ tiêu bản mô chân tóc ở các giai đoạn

Hình 1A	Hình 1B	Hình 1C	Hình 1D
- Kích thước của nang tóc lớn, phần hành tóc phát triển, phình rộng. - Nhú bì co cụm, tiến dần lên trên được bao bọc xung quanh bởi các tế bào khác. - Chưa hình thành cấu trúc sợi tóc. - Không quan sát được cấu trúc vô trong của sợi tóc (IRS).	- Nang tóc đã phát triển xuống tới đáy hạ bì. - Cấu trúc sợi tóc hình thành. - Hành tóc phát triển phồng to. - Nhú bì có độ co cụm tập trung cao nhưng không còn được bao phủ hoàn toàn xung quanh bởi các tế bào của hành tóc.	- Chiều dài nang tóc ngắn (nhú bì ở đáy hạ bì). - Nhú bì không còn co cụm, tập trung chặt chẽ, đồng thời cách xa hành tóc hơn. - Hành tóc không còn cấu trúc phình to nữa mà teo nhỏ lại.	- Không còn thấy hình dạng cấu trúc của hành tóc. - Không quan sát thấy nhú bì.

Sự khác biệt ở mức độ hình thái của nang tóc bạc và nang tóc đen ở giai đoạn anagen

Chúng tôi so sánh và đánh giá sự khác biệt hình thái của nang tóc bạc và nang tóc đen ở cùng một giai đoạn phát triển - giai đoạn anagen, là giai đoạn quan trọng nhất, quyết định sự hình thành sắc tố cũng như sự khác nhau về màu tóc [7-10]. Kết quả hình thái của chân tóc bạc và chân tóc đen ở giai đoạn anagen được trình bày ở hình 2.



Hình 2: mô nang tóc giai đoạn anagen của chân tóc đen (A), chân tóc bạc (B)

Quan sát hình thái, chúng ta nhận thấy có sự khác biệt rõ về cấu trúc sợi tóc, tuyến bã nhờn, sự phân bố và hình thái tế bào melanocyte và nhú bì giữa nang tóc đen và nang tóc bạc. Các điểm khác biệt này được trình bày và so sánh ở bảng 2.

Bảng 2: đặc điểm khác biệt giữa chân tóc đen và chân tóc bạc

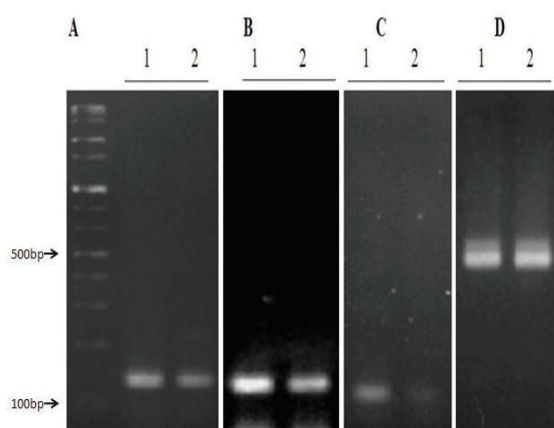
Đặc điểm	Chân tóc đen	Chân tóc bạc
Nhú bì	Hình thái tròn	Không giữ được hình thái tròn
	Các tế bào co cụm lại với nhau, mức độ tập trung cao	Các tế bào bị phân tán, không còn liên kết chặt chẽ với nhau
Melanocyte	Melanocyte có số lượng nhiều hơn	Melanocyte có số lượng ít hơn
	Melanocyte có hình thái nhánh	Melanocyte có hình thái tròn, rất ít phân nhánh
Tuyến bã nhờn	Phình to	Teo nhỏ

Những khác biệt trên có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong việc giải thích lý do mất sắc tố của tóc. Nhú bì thể hiện khả năng tái sinh một chu kỳ mới của tóc. Nhú bì co cụm với mức độ tập trung cao của tế bào ở nang chân tóc đen thể hiện sự khỏe mạnh và khả năng tái sinh cao và ngược lại, sự phân tán của tế bào ở nhú bì của nang chân tóc bạc cho thấy sự suy giảm khả năng tái sinh của tóc. Melanocyte có khả năng hình thành melanin trong các bào quan là melanosome, đồng thời tương tác với keratinocyte để vận chuyển melanosome vào trong tế bào chất của keratinocyte. Để thực hiện chức năng vận chuyển melanocyte phải có hình thái nhánh [6, 11]. Vì vậy, số lượng melanocyte giảm, lượng sắc tố melanin sinh ra sẽ giảm và khả năng vận chuyển melanin giảm khi hình thái nhánh không xuất hiện ở chân tóc bạc. Tuyến bã nhờn đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra chất lượng (độ bền, mượt) của sợi tóc. Vì vậy, với sự teo nhỏ của tuyến bã nhờn ở nang chân tóc

bạc có thể lý giải cho sự suy giảm chất lượng của sợi tóc.

Sự khác biệt ở mức độ phân tử giữa chân tóc bạc và chân tóc đen

Tiếp theo, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nhằm kiểm tra sự khác biệt của các phân tử đóng vai trò quan trọng trong con đường tín hiệu tham gia điều hòa quá trình sinh tổng hợp melanin là MC1R/MITF/Tyrosinase; đồng thời, gen giữ nhà GAPDH được sử dụng làm phân tử đối chứng. Hình ảnh kết quả điện di sau khi chạy PCR được trình bày ở hình 3. Các băng xuất hiện đúng với kích thước mong muốn với 133 bp của MC1R (hình 3A), 121 bp của MITF (hình 3B), 111 bp của Tyrosinase (hình 3C) và 496 bp của GAPDH (hình 3D).



Hình 3: ảnh điện di trên gel agarose với các gen nghiên cứu MC1R (A), MITF (B), Tyrosinase (C) và gen giữ nhà GAPDH (D) trong mẫu mô chân tóc đen (đường chạy 1) và chân tóc bạc (đường chạy 2)

Kết quả thí nghiệm cho thấy, trong khi mức độ biểu hiện của gen giữ nhà GAPDH là khá tương đồng ở trong mẫu chân tóc bạc và chân tóc đen (hình 3D) thì có sự giảm rõ rệt về mức độ biểu hiện của gen MC1R (hình 3A), MITF (hình 3B) và Tyrosinase (hình 3C) ở trong mẫu mô chân tóc bạc (đường chạy 2) so với sự biểu hiện của các phân tử này ở trong mẫu mô của chân tóc đen (đường chạy 1).

Các kết quả trên chứng minh rằng: hiện tượng bạc tóc sớm có liên quan tới sự suy giảm biểu hiện của thụ thể MC1R trong con đường điều hòa sinh tổng hợp melanin. Sự giảm biểu hiện MC1R dẫn đến sự giảm biểu hiện của MITF và đặc biệt là Tyrosinase.

Kết luận

Từ những kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi đưa ra các kết luận sau: 1) Xác định được nang tóc ở các giai đoạn: anagen sớm, anagen, catagen, telogen

dựa vào các đặc điểm hình thái; 2) Đánh giá được sự khác biệt hình thái của nang tóc bạc và nang tóc đen giai đoạn anagen với 3 đặc điểm quan trọng trong vai trò tái sinh và chất lượng của sợi tóc (bao gồm: núm nang tóc bạc mất cấu trúc co cụm đặc trưng; tế bào melanocyte của nang tóc bạc có số lượng ít, mất hình thái nhánh; tuyến bã nhờn nang tóc bạc bị teo nhỏ); 3) Chứng minh được sự biểu hiện ở mức độ phiên mã của 3 gen MC1R, MITF, Tyrosinase ở trong mẫu nang chân tóc bạc sớm thấp hơn so với mức độ biểu hiện của chúng ở trong mẫu nang chân tóc đen.

Các kết quả thu được đã gợi mở ra hướng phát triển trong cải thiện tình trạng tóc bạc sớm dựa trên cơ sở tác động làm tăng cường mức độ biểu hiện của phân tử MC1R để từ đó khôi phục lại hoạt động của con đường điều hòa MC1R/MITF/Tyrosinase.

Cho tới nay, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về cơ chế và thuốc điều trị chứng bạc tóc sớm ở người. Tuy nhiên, trong đông y và dân gian thì có khá nhiều bài thuốc sử dụng riêng rẽ hoặc phối hợp các dược chất chiết xuất từ nhiều loài thực vật khác nhau, chẳng hạn hà thủ ô đỏ, nhân sâm, linh chi, hồng hoa, hạn liên thảo, ngũ bội tử, kỷ tử, tô mộc... để điều trị các chứng bệnh về tóc như rụng tóc, tóc bạc sớm. Trong số này, hà thủ ô đỏ được biết đến nhiều nhất và thực tế cho thấy có những hiệu quả tích cực trong quá trình chống lão hóa tóc. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có minh chứng khoa học rõ ràng do thiếu những nghiên cứu có tính chất cơ bản cũng như chuyên sâu. Chính vì vậy, chúng tôi hy vọng mô hình nghiên cứu này có thể được sử dụng để đánh giá và sàng lọc các dịch chiết xuất từ các loại thực vật có khả năng ứng dụng trong điều trị chứng tóc bạc sớm, từ đó đưa ra chiến lược phát triển các loại thực vật này để ứng dụng trong thực tế.

Lời cảm ơn

Tập thể tác giả xin trân trọng cảm ơn Đại học Quốc gia Hà Nội đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này thông qua đề tài mã số KLEPT-14-02.

Tài liệu tham khảo

- [1] Tobin D.J (2008), "Human hair pigmentation - biological aspects", *International Journal of Cosmetic Science*, **30**, pp.233-257.
- [2] Pandhi D, Khanna D (2013), "Premature graying of hair", *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, **79**, pp.641-653.
- [3] Amsen E.M (2009), "Studies of Proteins that Regulate Melanin Synthesis and Distribution", *Doctoral Thesis*, University of

Toronto, Canada.

[4] Borron J.C.G, Malek Z.A, Cervantes C.J (2014), “MC1R, the cAMP pathway, and the response to solar UV: extending the horizon beyond pigmentation”, *Pigment Cell Melanoma Res*, **27(5)**, pp.699-720.

[5] Schiaffino M.V (2010), “Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology”, *Int J Biochem Cell Biol*, **42(7)**, pp.1094-1104.

[6] Costin G.E, Hearing V.J (2007), “Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress”, *The FASEB Journal*, **21(4)**, pp.976-994.

[7] Alonso L, Fuchs E (2009), “The hair cycle”, *Journal of Cell Science*, **119**, pp.391-393.

[8] Millar S.E (2002), “Molecular Mechanisms Regulating Hair Follicle Development”, *J Invest Dermatol*, **118**, pp.216-225.

[9] RoÈver S.M, Handjiski B, Veen C.V.D, Eichmüller, Foitzik K, McKay A, et al (2001), “A Comprehensive Guide for the Accurate Classification of Murine Hair Follicles in Distinct Hair Cycle Stages”, *J Invest Dermatol*, **117(1)**, pp.3-15.

[10] Stein K.S, Paus R (2001), “Controls of Hair Follicle Cycling”, *Physiological Reviews*, **81(1)**, pp.449-494.

[11] Slominski A, Wortsman J, Plonka P.M, Schallreuter K.U, Paus R, Tobin D.J (2005), “Hair Follicle Pigmentation”, *J Invest Dermatol*, **124(1)**, pp.13-21.