

消癥丸对小鼠黄褐斑模型的作用及机制

吕高虹, 许惠琴*, 沈培亮, 王静, 周凯艺
(南京中医药大学药学院, 南京 210032)

[摘要] 目的:观察消癥丸对肌肉注射黄体酮复合紫外照射致小鼠黄褐斑模型的抗氧化与抗黄褐斑形成作用。方法:雌性 ICR 小鼠随机分为正常组、模型组、百消丹组(3 g·kg⁻¹, ig)、消癥丸低、中、高剂量组(1, 2, 4 g·kg⁻¹, ig), 采用黄体酮(20 mg·kg⁻¹, im), 同时配合 320 nm 的中波紫外线照射, 每天 1 h, 连续 36 d, 造成小鼠黄褐斑模型。实验结束后, 测定各组肝脏和皮肤中的酪氨酸酶(TYR)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量, 另取照射部位皮肤进行病理学检查及免疫组化方法测定皮肤黑色细胞数。结果:与正常组比较, 模型组肝脏和皮肤中 TYR 含量明显升高, 具有显著性差异($P < 0.01$); 给予百消丹、消癥丸后肝脏和皮肤中的 TYR 含量均明显降低, 与模型组相比, 具有显著性差异($P < 0.01$); 同时, 皮肤中 MDA 含量降低, 与模型组相比, 具有显著性差异($P < 0.01$); 而皮肤和肝脏中的 SOD 以及肝脏中的 MDA 则没有显著差异。结论:消癥丸有一定的防治黄褐斑形成的功效, 其作用与抑制 TYR 活性, 减少黑色素细胞的生成有关。

[关键词] 消癥丸; 黄褐斑; 酪氨酸酶; 黑色素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)22-0157-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220157

Effect and Mechanism of Xiaozheng Wan for Mouse Melasma Model

LV Gao-hong, XU Hui-qin*, SHEN Pei-liang, WANG Jing, ZHOU Kai-yi
(College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect and mechanism of Xiaozheng wan for mouse melasma model of progesterone composed of UV radiation induced. **Method:** Female ICR mice were randomly divided into normal group, model group, Baixiao dan group (3 g·kg⁻¹), Xiaozheng Wan low-dose group (1 g·kg⁻¹), middle dose group (2 g·kg⁻¹), high-dose group (4 g·kg⁻¹), except the normal group and the model group was given normal saline, the rest of the group at the suggest doses administered by gavage for 36 days. And at the beginning of the administration except the normal group, the other groups were using progesterone intramuscular injection (20 mg·kg⁻¹), while 320 nm ultraviolet irradiation of one hour, once a day for 36 days, to cause chloasma mouse model. After the end of the experiment, measuring liver and skin tyrosinase (TYR), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) content, the other to take part irradiated skin pathological and immunohistochemical determination of skin black cells. **Result:** The treatment group significantly reduced liver and skin TYR content, compared with model group with a significant difference ($P < 0.01$); skin can reduce the content of MDA, but no significant difference; effect on the skin and liver SOD is low. **Conclusion:** Xiaozheng wan chloasma composite model in mice can inhibit melanin production role.

[Key words] Xiaozheng wan; melasma; tyrosinase; melanin

黄褐斑也称肝斑, 是一种临床上较为常见的面部皮肤黑色素沉着疾病, 多发于中青年女性, 其主要

[收稿日期] 20140529(006)

[基金项目] 江苏省科技成果转化专项资金项目(BA2012078);江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目(201310315028Z)

[第一作者] 吕高虹, 硕士, 实验师, 从事内分泌药理研究, Tel:13851756021, E-mail:lg1900@163.com

[通讯作者] * 许惠琴, 博士, 教授, 从事内分泌药理研究, Tel:13951800763, E-mail:hqxu309@sina.com

致病因素为日晒、内分泌失调、遗传、情绪及化妆品等,其他危险因素包括甲状腺疾病、抗癫痫药物、光毒性药物和遗传因素等,而在男性该病通常是特发性的^[1]。该疾病对患者的生活质量有较大影响,尤其是面部有病变的患者。由于本病属于内分泌系统失调所引发,其具体病因尚不明,因此目前仍然没有单一特效的治疗方法,其治疗越来越趋于联合治疗,如外用药物联合系统用药,中西医结合治疗等。消癥丸以疏肝行气、活血化瘀、软坚散结立法组方,其主要成分包括柴胡、香附、大黄(酒炙)、青皮、川芎、莪术等。“消癥丸”是治疗肿瘤的主药,目前已在乳腺癌的治疗中得到广泛应用且取得较好疗效,同时该药对子宫疾病以及卵巢疾病也具有明显的改善作用。由于长期使用消癥丸可有效的调节患者内分泌的功能,纠正患者的内分泌失调,考虑到黄褐斑也是由于内分泌失调所引起,因此该药被逐渐的用于黄褐斑的治疗。本实验通过肌肉注射黄体酮联合紫外照射建立小鼠黄褐斑模型,然后基于构建的模型考察消癥丸治疗黄褐斑的作用,并基于酪氨酸酶对其作用机制进行探讨,为消癥丸后续研究及临床推广应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,体重 18~20 g,均为雌性,动物由扬州大学比较医学中心提供,合格证号 SCXK(苏)2012-0004。

1.2 试剂与药品 丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20130517)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20140319)、总蛋白(TP)定量试剂盒(批号 20140319),均购自南京建成生物工程有限公司;酪氨酸酶(TYR)ELIS 试剂盒(上海沪鼎生物科技有限公司,批号 201402),黄体酮注射液(上海通用药业股份有限公司,批号 130404,使用前用橄榄油稀释至所需浓度),百消丹(洛阳市盖氏百消丹有限责任公司,批号 20120101),消癥丸(雷允上药业有限公司,批号 MB38001)。

1.3 仪器 Direct-Q 型超纯水仪(美国 Milipore 公司),IKA T18B 型组织匀浆机(德国 IKA 公司),Covter 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),Synergy HT 型酶标仪(美国 BioTelk 公司)。

2 方法

2.1 模型建立 采用 *im* 黄体酮配合紫外照射进行造模^[2-4]。取雌性 ICR 小鼠 60 只,体重 18~22 g。模型组予以每日 *im* 黄体酮 20 mg·kg⁻¹,1 次/d,同时以脱毛器配合 8% Na₂S 水溶液脱去背部毛发,裸

露皮肤面积约 3 cm×2 cm,每 2 天脱毛 1 次,以波长为 320 nm 的中波紫外线(UVB)照射小鼠裸露皮肤,1 次/d,每次 60 min,连续 36 d。每天观察其脱毛部位皮肤变化情况。

2.2 分组及给药 将小鼠随机分为正常组、模型组、百消丹组(3 g·kg⁻¹)、消癥丸低、中、高剂量组(1,2,4 g·kg⁻¹),正常组和模型组给予生理盐水,各给药组在造模的同时按上述剂量灌胃给药,每天 1 次,连续给药 36 d。

2.3 取材及指标测定

2.3.1 取材 小鼠于取材前进行最后脱毛,并于取材当日将所有小鼠断颈处死,迅速取其受试肝脏及脱毛后皮肤 0.5 g 用于生化指标检测。另分别取小鼠去毛皮肤 1 块(1.0 cm×1.0 cm)用于皮肤黑色素细胞的病理形态学检测。

2.3.2 小鼠皮肤和肝脏匀浆的制备 称取皮肤和肝脏各约 0.2 g,分别放入装有 9 倍于组织块重的预冷生理盐水中,剪碎后用高速分散器粉碎、匀浆(肝脏 2 次、皮肤 4 次),每次 5 s。匀浆液以 3 500 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液进行相关指标的测定。

2.3.3 小鼠肝脏和皮肤指标的测定^[4-5] 小鼠肝脏和皮肤匀浆上清液总蛋白的含量测定按照蛋白定量测试盒(考马斯亮蓝法)的操作要求和步骤进行。用紫外分光光度计于 595 nm 处,1 cm 光径,双蒸水调零,测定各样品吸光度(*A*),最后计算样品总蛋白含量。

SOD 活力的测定 按试剂盒操作要求先配制底物应用液和酶工作液,接着按照操作表要求加样,混匀好后,在 37℃ 恒温箱中孵育 20 min,然后在 450 nm 处酶标仪读 *A*,最后计算 SOD 的抑制率及 SOD 的活力。

MDA 含量的测定 按试剂盒要求进行,在 532 nm 处酶标仪读数测各管 *A*,最后按公式计算 MDA 含量。

酪氨酸酶的测定 按照 ELIS 试剂盒的操作要求和步骤进行,在 450 nm 处测定 *A*,最后计算酪氨酸含量。

2.3.4 形态学指标检测 取小鼠皮肤组织标本 1.0 cm×1.0 cm,HE 染色,光学显微镜下观察皮肤病理学变化。

黑色素细胞和黑色素颗粒的观察采用免疫组化的方法:①常规脱蜡切片,脱蜡至水化;②3% H₂O₂ 去离子水孵育 5 min;③根据 I 抗对组织切片进行预处理;④滴加 I 抗,37℃ 孵育 1 h 或 4℃ 过夜,PBS

洗3次各2 min;⑤滴加免疫组化二步法检测试剂,37 ℃孵育30 min,PBS洗3次各2 min;⑥DAB显色5~10 min;⑦蒸馏水洗10~15 min;⑧苏木素复染10 s;⑨常规脱水、透明、封片;⑩染色结果:阳性黑色素细胞呈棕色主要分布在细胞浆与细胞膜上,细胞核被苏木素复染呈蓝色^[7]。免疫组化图片采用Image-Pro Plus 图像分析软件进行分析。

2.3.5 统计学处理 所有数据经统计软件 SPSS 19.0 进行统计学处理,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠黄褐斑模型肝脏及皮肤酪氨酸酶的影响 模型组肝脏和皮肤中酪氨酸酶含量明显升高,与正常组相比,具有显著性差异($P < 0.01$);给予百消丹、消癥丸后肝脏和皮肤中的酪氨酸酶含量均明显降低,与模型组相比,具有显著性差异($P < 0.01$),见表1。

表1 消癥丸对小鼠黄褐斑模型肝脏及皮肤酪氨酸酶的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	酪氨酸酶/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	
		肝脏	皮肤
正常	—	4.97 ± 0.78	16.26 ± 1.14
模型	—	$6.29 \pm 0.79^{2)}$	$18.18 \pm 2.42^{1)}$
百消丹	3	$4.64 \pm 0.81^{3)}$	$9.44 \pm 2.72^{3)}$
消癥丸	1	$4.20 \pm 0.53^{3)}$	$8.62 \pm 1.62^{3)}$
	2	$3.60 \pm 0.23^{3)}$	$5.86 \pm 0.66^{3)}$
	4	$3.59 \pm 0.44^{3)}$	$6.85 \pm 1.69^{3)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对小鼠黄褐斑模型肝脏及皮肤氧化指标的影响 给予百消丹和消癥丸后,皮肤中的MDA明显降低,与模型组相比,具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);皮肤和肝脏中的SOD以及肝脏中的MDA没有明显的变化。见表2。

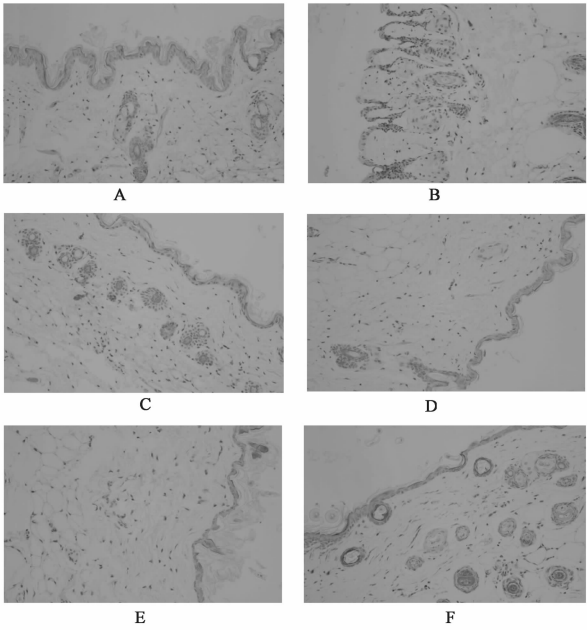
表2 消癥丸对小鼠黄褐斑模型肝脏及皮肤氧化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$		MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	
		肝脏	皮肤	肝脏	皮肤
正常	—	10.45 ± 1.37	22.42 ± 2.81	0.64 ± 0.16	6.87 ± 0.62
模型	—	13.27 ± 2.10	23.77 ± 2.45	0.67 ± 0.14	6.92 ± 1.09
百消丹	3	10.62 ± 2.83	19.79 ± 6.03	0.66 ± 0.13	$5.50 \pm 1.36^{1)}$
消癥丸	1	9.50 ± 1.34	19.09 ± 1.50	0.60 ± 0.12	$5.21 \pm 0.98^{2)}$
	2	9.31 ± 1.08	18.28 ± 1.26	0.54 ± 0.10	$3.89 \pm 0.59^{2)}$
	4	8.34 ± 2.26	23.30 ± 3.92	0.58 ± 0.11	$5.34 \pm 1.15^{2)}$

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对小鼠黄褐斑模型皮肤病变的影响

3.3.1 皮肤病理形态学观察 正常组小鼠皮肤无充血、水肿或炎细胞浸润。模型组小鼠皮肤可见表皮鳞状上皮细胞中度变性、坏死、脱落,真皮层见中度炎细胞浸润,真皮纤维结缔组织增生,皮肤附件明显减少。百消丹组皮肤真皮层见散在炎细胞浸润。消癥丸组中皮肤均可见局部表皮上皮细胞轻度变性,真皮层见少量炎细胞浸润,真皮纤维结缔组织增生,皮肤附件轻度减少。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 百消丹 $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;
D. 消癥丸 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; E. 消癥丸 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; F. 消癥丸 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

图1 消癥丸对小鼠黄褐斑模型皮肤病变影响(HE, $\times 200$)

3.3.2 对黑色素细胞面积和IA的影响 模型组皮肤中黑色素细胞面积明显增加,与正常组相比,具有显著性差异($P < 0.01$);给予百消丹和消癥丸后皮肤中黑色素细胞面积均明显降低,与模型组相比,具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组皮肤中黑色素细胞IA明显增加,与正常组相比,具有显著性差异($P < 0.01$);给予百消丹和消癥丸后皮肤中黑色素细胞均明显降低,与模型组相比,具有显著性差异($P < 0.01$)。结果见表3。

4 讨论

现代研究表明黄褐斑主要是由于黑色素在皮肤内增多而引起,同时黑色素细胞增多和黑色素生成增多是引起黑色素增多的两个主要因素。所以凡是能够引起上述两种结果的原因都能够产生或者促进黄褐斑的生成^[8]。紫外线^[2]、内分泌因素^[9]、口服避孕药、遗传因素^[10]、化妆品等也是引起黑色素增

表 3 消癥丸对小鼠黄褐斑模型皮肤黑色素的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	阳性面积 /μm ²	IA
正常	—	158 ± 63	37 043 ± 44 248
模型	—	434 ± 134 ¹⁾	295 034 ± 68 494 ¹⁾
百消丹	3	222 ± 108 ²⁾	147 719 ± 26 637 ³⁾
消癥丸	1	163 ± 14 ³⁾	64 363 ± 15 432 ³⁾
	2	123 ± 46 ³⁾	67 632 ± 70 673 ³⁾
	4	166 ± 10 ²⁾	87 124 ± 14 632 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

多的因素,这些因素之中,紫外线、内分泌因素和遗传因素是主要因素。

消癥丸其主要功效为疏肝行气、活血化瘀、软坚散结。消癥丸以柴胡、香附为君药,柴胡性轻清,主升散行滞,主入肝胆经,功专疏肝解郁,调畅气机,以使肝主疏泄,恢复条达之性,为疏解肝经瘀滞的要药;香附味辛、微苦、甘平,主入肝经。味辛能散,微苦能降,微甘能和,香而能窜,药性平和,亦为疏肝解郁,调经止痛之良药,既入气分,又行血分,总以治疗气血失和,妇科诸症为功。柴胡与香附合用,相须为伍,相得益彰;利用莪术疏肝行气,柴胡,青皮疏肝解郁,香附理气解郁,调经止痛的作用,当归具有活血化瘀的功效,能很好的破坏黄褐斑产生的环境。消癥丸从改善内分泌、抗氧化以及抑制酪氨酸酶等多个途径预防和治疗黄褐斑。

黑色素生成过多是黄褐斑形成的根本原因。酪氨酸酶是黑素细胞合成和分泌黑色素过程中的关键酶、限速酶^[11]。黄体酮配合紫外照射后,小鼠酪氨酸酶含量升高,黑色素生成增加。因此,酪氨酸酶含量的变化对于黑色素生成更凸显出药物预防和治疗黑色素生成和沉着的意义。实验结果显示,消癥丸低、中和高剂量组均能够显著降低黄褐斑模型小鼠皮肤和肝脏的酪氨酸酶的含量,显示出消癥丸可以通过降低小鼠酪氨酸酶的含量来减少黑色素的生成和沉着。

有文献报道,黑色素的生成与体内的氧化和抗氧化机制有密切关系,通常包含 SOD 活性的下降和 MDA 含量的升高^[12]。本实验结果表明,消癥丸确有一定的抗氧化作用,但并非主要通过 SOD 和 MDA 这条氧化通路来对黄褐斑产生作用还可能通

过其他氧化途径。实验中消癥丸低、中、高剂量组均能降低皮肤中的 MDA 的含量,显示消癥丸能够降低小鼠皮肤中脂质过氧化物的含量,对小鼠皮肤有保护作用。综上所述,消癥丸确能够明显降低黄褐斑模型小鼠体内肝脏和皮肤中的酪氨酸酶的含量,具有抑制黑色素形成和沉着的作用,进而起到防治黄褐斑的作用。而实验结果并未显著增强黄褐斑小鼠模型的抗氧化能力,提示对黄褐斑的作用还有可能通过其他机制来实现。

[参考文献]

[1] 张明,李丽琼,吴志明,等. 黄褐斑患者一般社会特征与抑郁、焦虑水平的关系研究[J]. 现代中医药, 2010,30(6):83.

[2] 潘扬,曹亮,刘世聪,等. 建立黄褐斑实验动物模型的初步研究[J]. 成都中医药大学学报, 2003, 26(4):27.

[3] 过伟峰,徐立,项晓人,等. 建立小鼠黄褐斑实验动物模型的初步研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(2):49.

[4] 汪南,陈家旭,吴晓丹. 肝郁型黄褐斑小鼠模型的建立及其与现有模型的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(5):325.

[5] 应军,倪庆纯,杨威,等. 杭白菊、当归、丹参提取液抑制黄褐斑形成及机制研究[J]. 中草药, 2011, 42(5):958.

[6] 田凤艳. 中医药内外合治黄褐斑的疗效观察及抗氧化机理研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2013.

[7] 康金森,王雪飞,刘发,等. 红玉祛斑胶囊对黄褐斑模型小鼠的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4):134.

[8] 崔正军. 黄褐斑的研究现状[J]. 四川医学, 2004, 25(1):116.

[9] 蔡宏为,纪青,向耘,等. 氨甲环酸片联合 Q 开关 YAG 激光治疗黄褐斑疗效观察[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2012, 11(2):94.

[10] 刘冬梅,高进,朱林学,等. 400 例黄褐斑患者发病因素分析[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(4):303.

[11] 宋康康. 抑制剂对酪氨酸酶的效应及其对黑色素生成调控的研究[D]. 厦门:厦门大学, 2007.

[12] 黄恺飞,张国栋,王梅兰,等. 清斑胶囊治疗黄褐斑的实验研究[J]. 海峡药学, 2011, 23(10):33.

[责任编辑 聂淑琴]