

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.34.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 34-0006-05

熊果苷对黄褐斑鼠模型治疗效果及机制研究

何盾¹, 吴芳兰², 徐晓芃³, 廖阳英³, 冯浩³

(1. 湖南省常德市第一人民医院 皮肤科, 湖南 常德 415000; 2. 长沙市第一医院 检验科, 湖南 长沙 410005; 3. 湖南省人民医院 皮肤科, 湖南 长沙 410005)

摘要: **目的** 复制黄褐斑鼠模型, 予熊果苷干预, 观察其疗效并探讨可能机制。**方法** 将 50 只 SPF 级雌性豚鼠按体重随机分为空白组、模型组以及熊果苷低、中、高剂量治疗组, 每组 10 只。除空白组外, 其他组采用肌内注射黄体酮法复制黄褐斑鼠模型, 并在其皮肤局部分别外涂熊果苷软膏与氢醌霜, 连续治疗 30 d。末次给药 1 天后处死豚鼠并迅速提取涂药部位皮肤, 测定酪氨酸、丙二醛 (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 并对皮肤组织进行 HE 染色以观察病理形态学变化。**结果** 所有熊果苷治疗组用药处皮肤中酪氨酸、MDA 含量降低, SOD 活性升高, 且以中剂量组最为突出; 所有熊果苷治疗组用药处皮肤黑色素沉着面积缩小、着色变浅, 尤以中剂量组最为突出。**结论** 熊果苷对黄褐斑鼠模型鼠有较好的治疗作用, 其机制可能与提高皮肤局部组织中 SOD 酶活性, 降低酪氨酸、MDA 的含量相关。

关键词: 皮肤色素沉着; 熊果苷; 模型, 动物; 治疗结果; 药理作用分子作用机制

中图分类号: R758.42

文献标识码: A

Research of effect of arbutin on chloasma in guinea pigs and mechanism

Dun He¹, Fan-lan Wu², Xiao-peng Xu³, Yang-ying Liao³, Hao Feng³

(1. Department of Dermatology, the First People's Hospital of Changde, Changde, Hunan 415000, China; 2. Clinical Laboratory, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China; 3. Department of Dermatology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of arbutin on chloasma in guinea pig model and explore the possible mechanism. **Methods** Fifty female guinea pigs of SPF grade were randomized into five groups by weight including a blank group, a model group, a low-dose arbutin group, a middle-dose arbutin group, and a high-dose arbutin group with 10 in each group. Except for the blank group, intramuscular injection of progesterone was adopted in all of the guinea pigs to induce chloasma model. The guinea pigs were killed after treated with different doses of arbutin ointment and hydroquinone cream for 30 d. A piece of skin from the lesion was collected for the detection of tyrosine content, SOD activity and MDA content; another piece of the lesion was collected for pathological observation after HE staining and for immunohistochemical detection. **Results** SOD activity obviously increased, MDA and tyrosine content reduced in the skin of chloasma in all the arbutin groups, which were more obvious in the medium-dose arbutin group. In all the arbutin groups the area of melanin in the skin of chloasma reduced and the color became lighter, especially in the medium-dose arbutin group. **Conclusions** Arbutin has a good effect on experimental chloasma guinea pig model, probably through increasing SOD activity and reducing MDA and tyrosine content.

Keywords: skin pigmentation; animal; arbutin; treatment outcome; pharmacologic mechanisms of action

收稿日期: 2018-01-03

[通信作者] 冯浩, E-mail: doctorfenghao@126.com

黄褐斑是一种临床常见的色素沉着性皮肤病,临床疗效欠佳,因好发于面部,临床研究中取材困难,对治疗结果的判断比较主观。熊果苷含有美白成分,目前临床多用于美白。本研究复制熊果苷治疗黄褐斑鼠模型,以探讨其疗效及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雌性纯白豚鼠 50 只,体重(230±30)g,购自并饲养于湖南师范大学第一附属医院动物实验室,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2015-0013。

1.1.2 实验药品 熊果苷软膏购自上海新先锋药业有限公司,黄体酮(20 mg/ml)购自上海通用药业股份有限公司,用灭菌注射用水稀释。

1.1.3 实验试剂及仪器 硫化钠 Na₂S 购自济宁百川化工有限公司,酪氨酸、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,HMB45 即用型试剂盒购自上海 Dako 公司。DY89-II 型电动玻璃匀浆机购自宁波新兰生物科技股份有限公司,Olympus 系统生物显微镜(Image-Pro Plus 6.0)购自美国 Media Cybernetics 公司。

1.2 方法

1.2.1 模型复制 参照文献[1-2],以 7.5 mg/kg(相当于人用临床剂量的 3 倍)肌内注射 20 mg/ml 黄体酮注射液 1 次,于豚鼠后腿根部连续注射 30 d。豚鼠背部模型区域皮肤呈均一稳定、边界清晰的深褐色色斑,HMB45 标记的黑色素阳性细胞明显增多,呈强阳性反应,表皮基底细胞和棘细胞层中可见单个散在黑色素细胞为模型复制成功。

1.2.2 分组及给药^[9] 将 50 只豚鼠按体重随机分为 5 组,分别为空白组、模型组、熊果苷软膏低剂量治疗组(0.125 g/100 g)(低剂量组)、中剂量治疗组(0.250 g/100 g)(中剂量组)和高剂量治疗组(0.500 g/100 g)(高剂量组)。空白组按 5 ml/kg 肌内注射灭菌注射用水,其余 4 组均复制模型。实验前 24 h 将脊柱两侧及靠臀部皮肤用 Na₂S 脱毛 4 cm×4 cm,每周脱毛 1 次。熊果苷软膏治疗组模型复制成功当天分别按比例计算局部涂擦药物,1 次/d,连续用药 30 d。空白组和模型组则予以蒸馏水局部涂抹,1 次/d,时间和疗程同熊果苷软膏治疗组。于末次给药 1 天后处死所有豚鼠,每只豚鼠于脱毛处迅速取皮肤组织 2 块备用。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 酪氨酸、MDA 含量, SOD 活性测定^[4-5] 所有豚鼠取备用皮肤组织 1 块用预冷生理盐水冲洗,除去皮下脂肪及其他结缔组织后拭干,每块皮肤组织各切取 0.5 g,再分别放入盛有 2.0 ml 预冷生理盐水的 5 根小试管内,高速分散机以 10 r/min 的速度匀浆,持续 10 s,重复 1 次,再以 3 500 r/m 速度离心 15 min,取上清液。酪氨酸测定采用高效液相法,MDA 测定用硫代巴比妥酸法,SOD 测定用黄嘌呤氧化酶法,按试剂盒说明书检测酪氨酸、MDA 含量及 SOD 活性。

1.3.2 皮肤黑色素细胞的病理形态学观察 所有豚鼠取备用皮肤组织 1 块,约 2 cm×1 cm,10% 多聚甲醛固定,病理组织检测,免疫组织化学染色,观察黑色素细胞染色和数目,并根据文献[4]判断阳性细胞:无,0 分;<15%,0.5 分;<30%,1 分;>30%,2 分。每张切片分别观察 5 个视野,找到皮肤表皮和附件上皮细胞胞浆中呈现棕色反应的阳性目标后,用 BX50F4 北航病理图像分析系统定量分析,得到每只豚鼠 5 个视野黑色素阳性目标的平均面积、目标与统计场面积之比(面密度)、目标个数与统计场面积之比(数密度)、平均灰度、平均光密度及积分光密度。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件统计,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组豚鼠酪氨酸、MDA 含量及 SOD 活性

各组豚鼠酪氨酸、MDA 含量及 SOD 活性比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);模型组豚鼠皮肤酪氨酸、MDA 含量均高于空白组,SOD 活性低于空白组;与模型组比较,熊果苷软膏治疗组皮肤酪氨酸、MDA 含量较低,中剂量组最低;而 SOD 活性则升高,中剂量组最高。见表 1。

2.2 各组豚鼠黑色素细胞的面积、数量及深浅度比较

各组黑色素细胞面积、数量及深浅度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表 2、3);由图 1、2 可见,与空白组比较,模型组豚鼠皮肤黑色素沉着面积增大、黑色素细胞个数增多,光密度变大,着色变深;与模型组比较,熊果苷软膏治疗组豚鼠皮肤,黑色素沉着

表 1 各组豚鼠酪氨酸、MDA 含量及 SOD 活性比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	酪氨酸/ μg	MDA/(nmol, ml)	SOD/(NU/ml)
空白组	0.43 ± 0.04	10.16 ± 2.06	105.82 ± 15.76
模型组	0.68 ± 0.06	13.30 ± 0.97	89.11 ± 6.71
低剂量组	$0.47 \pm 0.13^{(1)(2)}$	$12.04 \pm 1.79^{(1)(2)}$	$101.06 \pm 13.66^{(1)(2)}$
中剂量组	$0.45 \pm 0.09^{(1)(2)}$	$11.40 \pm 0.97^{(1)(2)}$	$103.29 \pm 11.22^{(1)(2)}$
高剂量组	$0.49 \pm 0.19^{(1)(2)}$	$11.75 \pm 1.79^{(1)(2)}$	$101.63 \pm 13.18^{(1)(2)}$
F 值	7.129	5.449	2.676
P 值	0.000	0.001	0.044

注: 1) 与空白组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

表 2 各组豚鼠黑色素细胞面积、数量比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

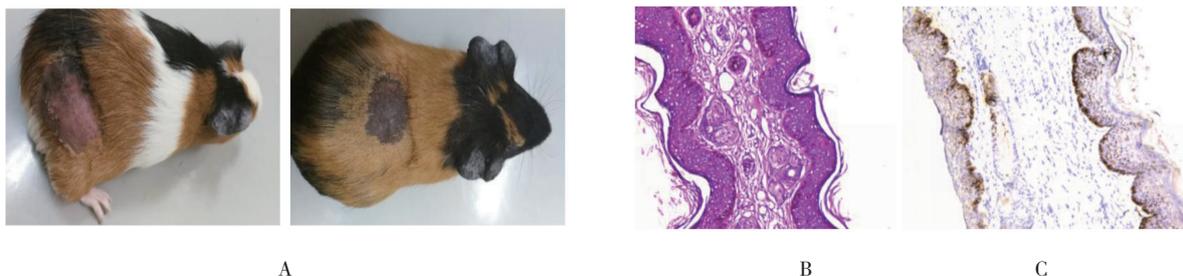
组别	面积/ μm^2	面密度	个数	数密度
空白组	325.27 ± 48.68	0.004 ± 0.001	1.12 ± 0.28	1.69 ± 0.92
模型组	$2\ 364.81 \pm 617.88$	0.011 ± 0.004	3.19 ± 1.64	5.47 ± 1.80
低剂量组	$557.16 \pm 144.54^{(1)(2)}$	$0.005 \pm 0.002^{(1)(2)}$	$2.52 \pm 0.91^{(1)(2)}$	$2.07 \pm 0.87^{(1)(2)}$
中剂量组	$381.65 \pm 55.00^{(1)(2)}$	$0.004 \pm 0.002^{(1)(2)}$	$1.91 \pm 0.68^{(1)(2)}$	$1.91 \pm 1.04^{(1)(2)}$
高剂量组	$541.52 \pm 124.82^{(1)(2)}$	$0.005 \pm 0.001^{(1)(2)}$	$2.31 \pm 0.50^{(1)(2)}$	$1.98 \pm 1.81^{(1)(2)}$
F 值	87.601	15.623	6.805	19.323
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与空白组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

表 3 各组豚鼠黑色素细胞深浅度的比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	平均灰度	平均光密度	积分光密度
空白组	111.45 ± 10.79	0.29 ± 0.05	225.19 ± 84.55
模型组	86.29 ± 12.02	0.59 ± 0.16	715.90 ± 257.60
低剂量组	$100.66 \pm 11.94^{(1)(2)}$	$0.34 \pm 0.08^{(1)(2)}$	$395.27 \pm 124.72^{(1)(2)}$
中剂量组	$105.22 \pm 11.66^{(1)(2)}$	$0.31 \pm 0.08^{(1)(2)}$	$300.92 \pm 91.87^{(1)(2)}$
高剂量组	$104.08 \pm 7.53^{(1)(2)}$	$0.33 \pm 0.08^{(1)(2)}$	$370.62 \pm 119.50^{(1)(2)}$
F 值	7.361	16.201	15.772
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与空白组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$



A

B

C

A: 黄褐斑鼠模型; B: HE $\times 100$; C: HMB45 免疫组织化学 $\times 100$

图 1 黄褐斑鼠模型及治疗前免疫组织化学染色结果

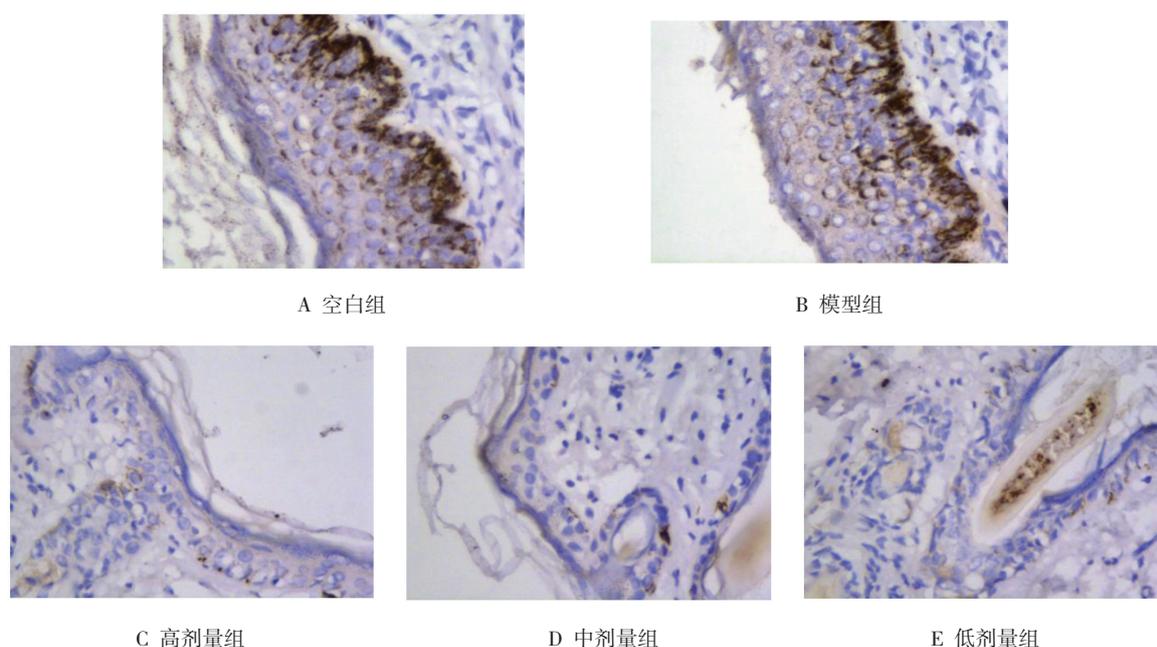


图 2 各组豚鼠治疗后 HMB45 免疫组织化学染色结果 (×400)

面积缩小、黑色素细胞个数减少, 光密度变小, 着色变浅, 以中剂量组为最明显。

3 讨论

黄褐斑是一种好发于中、青年女性的获得性色素障碍性疾病, 其发病机制极为复杂, 影响因素众多, 可能与饮食、内分泌失调、妊娠、化妆品使用、日光照射、精神因素及避孕药等诸多因素相关^[6]。

各种原因所致的皮肤黑色素的沉积, 是黄褐斑表现的直接原因。黑色素是酪氨酸酶一系列氧化反应后生成。酪氨酸在酪氨酸酶的氧化作用下, 在黑素小体内被氧化成多巴, 多巴进一步被多巴氧化酶氧化成多巴醌, 多巴醌最终在酪氨酸酶的氧化下形成黑色素。由此可见, 该过程中一系列的氧化与抗氧化反应紊乱, 都可能造成黄褐斑的发生、发展, 而酪氨酸的增多则是黄褐斑发病的主要物质基础。当这一系列氧化反应平衡紊乱时, 体内将过量生成氧自由基, 并且造成 SOD 等抗氧化酶活性降低, 造成膜脂质过氧化, 形成过氧化脂质 (LPO), LPO 不稳定, 迅速分解, 产生醛类, 其终产物——MDA 相应随之增多, 并迅速攻击磷脂及蛋白质, 导致色素细胞的氧化性损伤, 因而也促进了酪氨酸酶的氧化反应, 使得黑色素增多, 并于皮肤基层显著堆积, 此即为黄褐斑等色素性皮肤病的发病机制之一。故而, 降低皮肤组织 MDA 含量, 提高抗氧化酶 SOD 活性, 对黄褐斑的预防及治疗有着重要意

义。熊果苷提取于熊果叶, 其抑制酪氨酸酶活性而达到美白效果, 现几乎垄断美白市场。它主要通过阻断多巴及多巴醌的合成, 从而有效抑制黑色素的生长, 以达到去除色斑的效果。有研究证实^[7], 熊果苷是一种理想的脱色素药物, 虽然抑制酪氨酸酶活性, 但不影响酪氨酸酶的表达和合成。其脱色机制主要是在转录后阶段抑制酪氨酸酶的活性, 对黑素细胞酪氨酸酶家族的 3 种酶的含量及分子大小均无改变^[8]。熊果苷包括 α -熊果苷和 β -熊果苷。有文献报道^[9-11], α -熊果苷比 β -熊果苷美白作用强 10 倍, 无毒副作用, 高浓度对人体细胞生长无抑制作用, 对紫外线灼伤导致瘢痕效果明显。氢醌是最早并最广泛应用的美白剂, 但因皮肤色素分布不均及刺激性较强, 甚至可能致癌等原因, 在美白甚至黄褐斑的治疗中已被限制应用。相比而言, 熊果苷美白效果佳, 毒副作用小, 是目前临床应用最为广泛的美白剂之一, 能有效抑制黑色素地生长^[12]。

本研究发现, 模型组皮肤酪氨酸、MDA 含量升高, SOD 含量降低。而模型组皮肤病理形态学观察显示黑色素沉着面积增大且色深。光密度反映物质对光吸收的多少, 颜色越深, 目标面积越大, 则光密度值越高。熊果苷软膏治疗组皮肤酪氨酸、MDA 含量降低, SOD 含量升高, 而低、中、高 3 种剂量治疗组中, 豚鼠模型皮肤病理形态学观察显示黑色素沉着面积缩小、着色变浅, 尤以中剂量组最为突出, 说明熊果苷能有效

抑制黑色素的生成,从而达到治疗黄褐斑的效果,而不同浓度的熊果苷治疗效果间有差异,本实验证明中等剂量(0.250 g/100 g)治疗效果相对明显,有研究^[13]将熊果苷配制为 10、50、100、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 并与黑素细胞同时培养,结果发现 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的熊果苷对酪氨酸酶活性和黑色素抑制作用最为明显,与本研究结果一致,可能是因为熊果苷通过抑制酪氨酸酶活性起作用,浓度低时未完全抑制所有酶的活性,浓度高时因活性抑制已达到饱和状态,因而无明显变化,而中等剂量比较合适。

综上所述,熊果苷软膏主要成分是熊果苷,经实验证明它有效的增白作用,可能通过提高局部皮肤组织中 SOD 酶活性,明显降低酪氨酸、MDA 的含量,而抑制黑色素细胞和黑色素瘤细胞的酪氨酸酶活性,从而促使皮肤细胞的氧化还原反应,减少自由基产生,抑制黑色素的形成,进而有效治疗黄褐斑,熊果苷是一种安全、有效、毒副作用小的美白剂。

参 考 文 献:

- [1] 蒲春霞,何海蓉.大鼠黄褐斑动物模型的建立[J].河北科技师范学院学报,2013,27(2):66-69.
- [2] 杨鹏,杨慧兰,麦跃,等.慢性应激抑郁型黄褐斑动物模型建立与现有模型比较研究[J].中国美容医学,2013,22(3):349-354.
- [3] 王萍.本草养颜膏治疗黄褐斑的实验研究[J].中医研究,2008,21(7):9-11.
- [4] 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):27-29.
- [5] 李雪琳,邹勇莉.中西医结合治疗女性面部黄褐斑疗效观察[J].皮肤病与性病,2016,38(2):140-142.
- [6] CHAN W L, HAN S K, HAN K K, et al. Inhibitory effect of panduratin A isolated from *kaempferia pandurata* Roxb. on melanin biosynthesis[J]. *Phytotherapy Research*, 2010, 24(11): 1600-1604.
- [7] 王慧琛,王丽琴.熊果苷的应用及检测研究进展[J].天津药学,2012,24(4):71-74.
- [8] 郭静,张伟,丁黎,等.熊果苷制剂对豚鼠皮肤安全性及脱色作用的研究[J].宁夏医科大学学报,2012,34(6):592-595.
- [9] BROSKOVÁ Z, DRÁBIKOVÁ K, SOTNÍKOVÁ R, et al. Effect of plant polyphenols on ischemia-reperfusion injury of the isolated rat heart and vessels[J]. *Phytotherapy Research*, 2013, 27(7): 1018-1022.
- [10] YAMASHITA-HIGUCHI Y, SUGIMOTO S, MATSUNAMI K, et al. Grevillosides J-Q, arbutin derivatives from the leaves of *grevillea robusta* and their melanogenesis inhibitory activity[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2015, 45(38): 364-372.
- [11] LEE H J, KIM K W. Anti-inflammatory effects of arbutin in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells[J]. *Inflammation Research*, 2012, 61(8): 817-825.
- [12] 唐婕妤,彭菲.熊果苷的药理作用与资源获取途径研究进展[J].今日药学,2015(9):673-677.
- [13] 雷铁池,朱文元,夏明玉,等.甘草酸,熊果苷及氢醌对小鼠黑色素瘤细胞黑素生成影响的比较研究[J].临床皮肤科杂志,2000,29(2):69-72.

(张蕾 编辑)