实用中医内科杂志
JOURNAL OF PRACTICAL TRADITIONAL CHINESE INTERNAL MEDICINE
Sep. 2024
Vol. 38 No. 9

DOI:10.13729/j.issn.1671-7813.Z20232078

自拟祛黄褐斑胶囊及其功效成分对黄褐斑模型小鼠的祛黄褐斑作用研究

凡丽,张雨曦,曾丹
(西北大学,陕西 西安 710127)

摘要:目的 研究红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄体酮注射+紫外线照射黄褐斑模型小鼠的祛黄褐斑作用。方法 通过黄体酮注射+紫外线照射连续30 d,建立小鼠黄褐斑模型。不同剂量给药结束后,检测小鼠血清、肝脏匀浆液及皮肤组织中相关指标;同时观察皮肤黑色素细胞的数量。结果 与模型组比较,除当归提取物两个剂量组外,其余各给药剂量组均能升高黄褐斑模型小鼠血清、肝脏及皮肤组织中超氧化物歧化酶活性,降低丙二醛、酪氨酸酶含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),同时降低肝脏和皮肤组织中的脂褐素的含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组相比,当归提取物高剂量组均能升高黄褐斑模型小鼠血清、肝脏及皮肤组织中超氧化物歧化酶活性,降低酪氨酸酶含量($P<0.05$),当归提取物低剂量组仅肝脏中的超氧化物歧化酶活性、酪氨酸酶含量以及皮肤组织中的脂褐素含量与模型组具有统计学差异($P<0.05$);与模型组比较,自拟祛黄褐斑胶囊高、低剂量组能够显著减少照射处皮肤组织中黑色素细胞的数目($P<0.05$ 或 $P<0.01$),红花提取物高剂量组也能够显著减少照射处皮肤组织的黑色素细胞数目($P<0.05$),其他各组与模型组皮肤组织中的黑色素细胞数有所减少,但差异无统计学意义。结论 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠具有一定保护作用,能够发挥祛黄褐斑功能,且三种提取物联合具有协同增效的作用。

关键词:红花;当归;桃仁;黄体酮;紫外线;黄褐斑
中图分类号:R28 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7813(2024)09-0034-06

基金项目:科技部国家重点研发计划项目(2019YFA0905200);国家自然科学基金青年项目(22108226);陕西省自然科学基础研究计划青年项目(2021JQ-439)

作者简介:凡丽(2002-),女,陕西安康人,学士,研究方向:生物医用材料、预防医学和营养医学。
通讯作者:曾丹(1989-),女,陕西汉中人,副教授,硕士研究生导师,博士,研究方向:生物医用材料、预防医学和营养医学。E-mail:zengdan0301@nwu.edu.cn。

[10] 陈佳慧,张立山,弓雪峰,等.从五运六气学说浅探麦门冬汤治疗慢性咳嗽的临证思维[J].中华中医药杂志,2020,35(3):1251-1253.
[11] 杨威,陈希成,王霜,等.《黄帝内经》"五郁"本义考释[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(5):705-710.
[12] 刘燕,张庆祥,刘明.中医脾肺关系及"培土生金"理论的现代研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(6):1146-1149.
[13] 李磊,阎玥,史琦,等.以肺脾为核心的脏腑整体观辨治慢性阻塞性肺疾病经验撷菁[J].辽宁中医杂志,2022,49(6):51-54.
[14] 吴慧,刘城鑫,王婷,等.刘小虹从"肺脾相关"论治慢性阻塞性肺疾病的证治经验[J].中国中医急症,2021,30(8):1473-1476.
[15] 魏玉凤,陈世团,余尚贞.余尚贞论治木火刑金肝咳经验介绍[J].新中医,2020,52(22):198-199.
[16] 蔡淑君,王丽清.从肝论治小儿慢性咳嗽[J].中医学报,2018,33(9):1623-1626.
[17] 姜振君,朱佳.朱佳教授疏肝理肺法治疗慢性咳嗽经验[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(9):110-112.
[18] 王赢平,王小平.《黄帝内经》肝咳发挥[J].山东中医杂志,2022,41(4):366-369.
[19] 贺晋芳,张沂,晏军.从肺肾同治辨治肺间质纤维化[J].现代中医临床,2022,29(3):39-42,47.
[20] 吴刚.韩树人从肾治咳经验[J].中医临床研究,2013,20(5):62-63.
[21] 魏朝阳,乔世举.从肺肾相关论治慢性阻塞性肺疾病[J].中医临床研究,2021,13(28):58-60.
[22] 毛雅玮.中医辨治心咳[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(59):262,264.
[23] 李宗林,张茂平,敖素华,等.咳嗽从心论治[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(12):60-61.
[24] 刘玉金,孙永辉.张仲景心肺相关思想初探[J].湖北中医杂志,2021,43(10):35-38.
[25] 徐东川,刘瑾,王爱洁,等.桑白皮不同炮制品对泻白散祛痰平喘作用比较研究[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(5):46-49.
[26] 马文华,郑敏霞.黄芩-桑白皮药对配伍机制研究[J].中国药师,2019,22(8):1520-1522.
[27] 张曦,徐小婷,MOHAMMED Ismail,等.青黛及其有效成分抗溃疡性结肠炎药理作用及机制的研究进展[J].药物评价研究,2022,45(5):997-1002.
[28] 商烨,齐丽娜,金华,等.地龙化学成分及药理活性研究进展[J].药物评价研究,2022,45(5):989-996.

(本文编辑:张丽)

Study on the Effect of Self – Designed Chloasma Dispelling Capsule and its Functional Components on Melasma Model Mice

FAN Li, ZHANG Yuxi, ZENG Dan
(Northwest University, Xi'an 710127, Shaanxi, China)

Abstract: *Objective* To study the effects of Carthami Flos, Angelicae Sinensis Radix, Persicae Semen extract and self – designed chloasma dispelling capsule on mice with melasma induced by progesterone injection and ultraviolet irradiation. *Methods* Mouse melasma model was established by injection of progesterone and UV irradiation for 30 days. At the end of different doses, the relevant indexes in serum, liver homogenate and skin tissue of mice were detected. At the same time, the number of skin melanocytes was observed. *Results* Compared with model group, except Angelicae Sinensis Radix extract two dose groups, the other dose groups could increase the activity of superoxide dismutase in serum, liver and skin tissue of melasma model mice, reduce the contents of malondialdehyde and tyrosinase ($P<0.05$ or $P<0.01$), and reduce the content of lipofuscin in liver and skin tissue ($P<0.05$ or $P<0.01$); Compared with the model group, the high dose group of Angelicae Sinensis Radix could increase the activity of superoxide dismutase and reduce the content of tyrosinase in serum, liver and skin tissue of melasma model mice ($P<0.05$). The activity of superoxide dismutase and tyrosinase content in liver and lipofuscin in skin tissue of the Angelicae Sinensis Radix low – dose group were significantly different from those of the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the self – designed chloasma dispelling capsule high – dose and low – dose groups could significantly reduce the number of melanocytes in the skin tissue at the irradiated site ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the Carthami Flos extract high – dose group could also significantly reduce the number of melanocytes in the skin tissue at the irradiated site ($P<0.05$). The number of melanocytes in the skin tissue of the other groups and the model group decreased, but there was no statistical difference. *Conclusion* The extracts of Carthami Flos, Angelicae Sinensis Radix, Persicae Semen and self – designed chloasma dispelling capsule have certain protective effects on melasma model mice and can play the function of removing melasma, and the combination of three extracts has synergistic effect.

Keywords: carthami flos; angelicae sinensis radix; persicae semen; progesterone; ultraviolet; melasma

黄褐斑是一种由黑色素沉着过多引发的获得性病变，黄褐斑的产生也会引发患者一系列的心理障碍[1-3]。黄褐斑更易发生于深色皮肤的女性，在普通人群的发病率约1.5%～33%，一般分布在前额和颧骨两侧，呈浅棕色至深棕色[4-6]。黄褐斑的发病原因尚未明确，其中机体的氧自由基清除能力减弱，皮肤氧化损伤逐渐累积，黑色素的代谢能力变弱，进而导致皮肤下黑色素的沉着增多是黄褐斑的重要发病机制[7]。目前西医治疗黄褐斑多为外用法，但通常用药时间长、不良反应大、且复发率较高，中医治疗本症的方法众多，但治疗机理还需进一步研究。红花、当归、桃仁为传统中药祛斑组方中常用的成分，红花、桃仁具有活血祛瘀的功效，当归具有补血活血的功效。目前关于几种中药具体的祛斑机理以及单独作用的效果无详细报道，因此本研究对红花、当归、桃仁的几种单一组份对黄褐斑模型小鼠治疗的可能机制进行探索，同时对三种中药成分的联合祛斑作用进行研究，为中药组方在黄褐斑治疗方面的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品

自拟祛黄褐斑胶囊，由本实验室自制（批号20220101），由红花提取物、当归提取物和桃仁提取物加工而成，人体推荐剂量为每日4粒，每粒0.3 g。其中红花提取物（批号CHH－C－A212508）和桃仁提取物（批号CTR－C－A007295）从陕西嘉禾生物科技股份有限公司采购，当归提取物（批号C0282107145）从陕西开普勒生物科技有限公司采购。3种提取物采用水提提取，红花提取物人体每日推荐服用量为0.3 g/d，折合生药量为2 g/d；当归提取物人体每日推荐服用量为0.2 g/d，折合生药量为2 g/d；桃仁提取物人体每日推荐服用量为0.6 g/d，折合生药量为6 g/d。

1.2 实验动物

实验用无特定病原体（specific pathogen free，SPF）级昆明种雌性小鼠100只，由西安交通大学医学部实验动物〔许可证号SCXK（陕）2019－001〕中心提供，6～8周龄雌性小鼠，体质量18～22 g，背部剃毛。SPF级小鼠饲养管理条件规定为屏障级动物房（温度20～25 ℃，日温差≤4 ℃，相对湿度50%～60%），屏障系统区域范围内的空气洁净度规定为10 000级净化标准，12 h照明和12 h黑暗交替进行以模拟模型小鼠的正常生活环境，无较强烈的外界噪音或刺激，自由进食、饮水活动。本项目所开展的动物实验严格遵守中华人民共和国《实验动物管理条例》的规定，并严格根据实验动物伦理各项要求进行，项目开展经过西北大学动物伦理委员会批准。

1.3 仪器设备

紫外线光疗仪（德国Waldmann公司）；半自动生化分析仪（长春塞诺迈得医学技术有限公司）；722分光光度计（日本岛津公司）。超氧化物歧化酶（SOD）和丙二醛（MDA）试剂盒、酪氨酸酶（Tyr）试剂盒以及脂褐素（LF）试剂盒（上海酶联生物科技有限公司）、抗黑色素瘤特异性单克隆抗体（HMB45）（福建迈新生物）。

1.4 实验分组及给药方法

将100只昆明小鼠随机分为10组，分别为空白对照组（Control组）、模型组（Model组）、红花提取物低剂量组〔CF－L组，30 mg/（kg·BW），生药量折合人体剂量1 g/d〕、红花提取物高剂量组〔CF－H组，60 mg/（kg·BW），生药量折合人体剂

量2 g/d〕、当归提取物低剂量组〔ASR－L组,20 mg/(kg·BW),生药量折合人体剂量1 g/d〕、当归提取物高剂量组〔ASR－H组,40 mg/(kg·BW),生药量折合人体剂量2 g/d〕、桃仁提取物低剂量组〔PS－L组,60 mg/(kg·BW),生药量折合人体剂量3 g/d〕、桃仁提取物高剂量组〔PS－H组,120 mg/(kg·BW),生药量折合人体剂量6 g/d〕、自拟祛黄褐斑胶囊低剂量组〔CF－ASR－PS－L组,120 mg/(kg·BW),提取物折合人体剂量0.6 g/d。其中红花提取物0.15 g/d,生药量折合人体剂量1 g/d;当归提取物0.1 g/d,生药量折合人体剂量1 g/d;桃仁提取物0.3 g/d,生药量折合人体剂量3 g/d〕、自拟祛黄褐斑胶囊高剂量组〔CF－ASR－PS－H组,240 mg/(kg·BW),提取物折合人体剂量1.2 g/d。其中红花提取物0.3 g/d,生药量折合人体剂量2 g/d;当归提取物0.2 g/d,生药量折合人体剂量2 g/d;桃仁提取物0.6 g/d,生药量折合人体剂量6 g/d〕,每组各10只,分别对各组模型小鼠称重记录并标记区分各组小鼠,分笼饲养。空白对照组和模型组给予等量生理盐水,其余各组按照实验计划给药剂量每天灌胃给药1次,各组小鼠均正常休息进食,连续灌胃30 d,给药同时进行黄褐斑造模处理。

1.5 造模方法

参照文献[8]报道的方法,用剃毛器同时配合8% Na_2S 水溶液剃除小鼠背部的毛发,显现出面积约3 cm×3 cm的背部皮肤,背部裸露皮肤要求干净无毛无伤口,间隔3 d剃毛处理1次。空白对照组注射等量生理盐水,其余各组小鼠注射20 mg/kg剂量黄体酮(注射部位均在小鼠后肢根部肌肉,两侧轮替注射),同时用中波紫外线(320 nm)照射其余各组小鼠背部脱毛处皮肤,光源的距离为20 cm,30 min/次,1次/d,连续30 d。

1.6 生化指标检测

末次灌胃给药1 h后,剪取小鼠背部照射部位的皮肤及肝脏,低温保存,称取一定质量样品,分别于冰浴中研磨制成10%匀浆,匀浆离心后,根据各指标试剂盒说明书操作检测各组小鼠皮肤、血清及肝脏SOD活性、MDA和Tyr的含量,以及皮肤和肝脏中LF的含量。

1.7 皮肤黑色素细胞的病理形态学观察

分别取小鼠背部紫外线照射部位皮肤组织1块(1 cm×1 cm),用10%甲醛溶液浸泡固定,石蜡包埋组织后切均匀薄片,再依次经过脱蜡至水、抗原修复,严格控制温度与时间,以单克隆抗体HMB45(黑素瘤)为一抗,采用免疫组化技术显现表皮中的黑色素颗粒,观察并记录被标记黑色素细胞在表皮中的数量及分布情况。

1.8 自拟黄褐斑胶囊的小鼠急性毒性试验

参照《食品安全国家标准急性经口毒性试验》方法进行小鼠对自拟祛黄褐斑胶囊的毒性实验。选购KM小鼠40只(雄性20只,雌性20只),体质量18~22 g。适宜条件下正常饲养5 d,无异常行为活动后,根据小鼠体质量随机分为2组,每组各20只(雄性10只,雌性10只)。采用最大耐受剂量法(test of maximum tolerated dose,MTD),将自拟祛黄褐斑胶囊按最大耐受剂量15.0 g/(kg·BW)给予小鼠灌胃,于24 h内灌胃2次,间隔时间为5 h。每天灌胃给药时间相同,连续灌胃14 d,观察小鼠的饮食、活动、粪便等情况,以及小鼠眼部、鼻孔、皮肤等器官有无中毒症状,密切追踪并记录小鼠有无异常以及死亡情况,解剖小鼠观察各内脏器官生长发育情况。根据小鼠毒性实验期间记录情况及临床症状,按急性毒性分级标准评价自拟祛黄褐斑胶囊的毒性强弱。

1.9 统计学方法

使用SPSS 21.0软件进行统计学分析。首先,进行方差齐性检验。若数据满足方差齐性的要求,则采用单因素方差分析进行总体比较。若存在差异,则使用Dunnett法进行多剂量组与对照组均数之间的两两比较。若方差齐性不成立,则需要对原始数据进行满足方差齐性检验要求的变量转换,然后使用转换后的数据进行统计分析。如果转换后的数据仍未满足方差齐性的要求,则采用秩和检验进行统计分析。若总体比较存在差异,则使用Tamhane's T2检验进行两两比较,对方差齐性不作要求。

2 结果

2.1 各组小鼠皮肤状态

本研究开始前各组小鼠的饮食摄水等基本状态均良好,各组小鼠的体质量增长情况与空白对照组无明显差异。见插页Ⅶ图1①。黄体酮注射和紫外线照射造模2周后,模型组10只小鼠的背部皮肤均呈现出不同程度的发红,各给药剂量组的小鼠背部皮肤照射处发红程度比模型组有所减轻;黄体酮注射和紫外线照射造模4周后,模型组10只小鼠的背部皮肤出现了明显的红斑,皮肤增厚明显且有严重的脱屑症状,即为黄褐斑出现的表征,但皮肤整体没有更严重的糜烂甚至水泡等现象的出现。见插页Ⅶ图1②。各剂量组小鼠的照射处皮肤仅出现轻微红斑,没有皮肤增厚、脱屑、水泡和糜烂现象出现,自拟祛黄褐斑胶囊低剂量组的小鼠的照射处皮肤红斑现象比模型组明显减轻。见插页Ⅶ图1③。自拟祛黄褐斑胶囊高剂量组的部分小鼠照射处皮肤一直维持在造模2周时的发红程度。见插页Ⅶ图1④。说明自拟祛黄褐斑胶囊高剂量组的祛黄褐斑效果最好。

2.2 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠血清Tyr、MDA含量和SOD活性的影响

各组小鼠经黄体酮注射和紫外线照射造模30 d后,模型组与空白对照组相比,小鼠血清中SOD活性指标显著下降($P<0.01$),同时小鼠血清中Tyr和MDA含量显著上升($P<0.01$),这些指标的变化表明本研究中的黄褐斑模型造模成功;各给药组与模型组动物的相关指标比较,自拟祛黄褐斑胶囊、红花提取物、桃仁提取物的各剂量组均能够显著提升黄褐斑模型小鼠血清中的SOD活性水平,同时降低各组动物血清中的Tyr、MDA含量水平,以上指标与模型组动物血清中的指标对比均有统计学意义($P<0.05$或$P<0.01$),说明本研究的自拟祛黄褐斑胶囊、红花提取物、桃仁提取物均能够减轻黄褐斑模型小鼠体内的氧化应激反应,即提升SOD水平,降低MDA含量水平,并通过抑制Tyr的活性进而减少色素的沉积,实现祛黄褐斑的目的。当归提取物的各给药组中仅高剂量组的SOD活性、Tyr含量2个指标与模型组动物的对应指标比较,差异有统计学意义($P<0.05$),提示当归提取物具有减缓黄褐斑模型小鼠体内氧化应激反应的作用,最低起效剂量为20 mg/(kg·BW)。将各提取物单药高剂量组与自拟祛黄褐斑胶囊高剂量组对应指标进行对比分析可知,当归提取物高剂量组各项指标、红花提取物高剂量组的Tyr和MDA含量指标、桃仁提取物高剂量组的SOD活性和Tyr含量指标与自拟祛黄褐斑胶囊组小鼠的血清对应指标比较,差异均有统计学意义($P<$

0.05),说明红花提取物主要调节小鼠血清中的SOD活性,而桃仁提取物主要调节小鼠血清中的MDA含量指标,而当归提取物虽然各项指标与自拟祛黄褐斑胶囊组无统计学差异,但也能改善黄褐斑模型小鼠的各项指标,因此三者之间具有协同增效的作用,复配使用具有更优的祛黄褐斑效果。见表1。

表1 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠血清Tyr、MDA含量和SOD活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD/(U/mL)	Tyr/(μg/mL)	MDA/(nmol/mL)
Control组	10	87.21±10.12	39.57±4.86	3.87±0.43
Model组	10	57.22±7.24##	65.81±7.44##	8.24±0.91##
CF-L组	10	65.75±6.84*	55.87±5.96*	5.98±0.64*
CF-H组	10	74.88±8.47**	51.21±5.14*△	5.51±0.59*△
ASR-L组	10	60.49±8.35	59.87±6.03	7.41±0.79
ASR-H组	10	64.49±9.46*△	57.63±6.92*△	6.84±0.72△
PS-L组	10	67.25±7.29*	56.68±5.15*	6.16±0.67*
PS-H组	10	72.57±8.94*△	53.79±4.9*△	5.34±0.63*
CF-ASR-PS-L组	10	77.83±9.08**	46.77±4.97**	4.92±0.54**
CF-ASR-PS-H组	10	83.57±9.72**	41.22±4.39**	4.58±0.52**

注:##与Control组比较,$P<0.01$;*与Model比较,$P<0.05$;**与Model比较,$P<0.01$;△与CF-ASR-PS-H组比较,$P<0.05$,△△与CF-ASR-PS-H组比较,$P<0.01$。

2.3 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠肝脏中Tyr、MDA、LF含量和SOD活性的影响

各组小鼠经黄体酮注射和紫外线照射造模30 d后,模型组与空白对照组相比,小鼠肝脏中SOD活性水平显著降低($P<0.01$),同时小鼠肝脏中的Tyr、MDA和LF含量显著升高($P<0.01$),进一步说明本研究中的黄褐斑模型造模成功;与模型组相比,本研究中的自拟祛黄褐斑胶囊、红花提取物以及桃仁提取物的各剂量组均能对小鼠肝脏中的SOD活性具有上调作用,且对肝脏中的Tyr、MDA和LF含量具有下调作用,这些指标与模型组小鼠肝脏对应指标比较均有统计学差异($P<0.05$或$P<0.01$),进一步证明自拟祛黄褐斑胶囊、红花提取物、桃仁提取物祛黄褐斑的效果。当归提取物各剂量组仅在SOD活性和Tyr含量两个指标中与模型组对比具有统计学差异($P<0.05$),对于MDA、LF含量虽有下调作用,但未出现统计学差异。各提取物单药高剂量组与自拟祛黄褐斑胶囊高剂量组对应指标的统计学差异分析可知,当归提取物高剂量组的各项指标、红花提取物高剂量组的MDA和LF含量2个指标、桃仁提取物高剂量组的Tyr和LF含量2个指标与自拟祛黄褐斑胶囊组小鼠的肝脏对应指标比较均具有显著性差异($P<0.05$),说明红花提取物主要调节小鼠肝脏中的SOD活性和Tyr含量水平,而桃仁提取物主要调节小鼠肝脏中的SOD活性和MDA含量指标,同时当归提取物虽然各项指标与自拟祛黄褐斑胶囊组比较,差异无统计学意义,但也能改善黄褐斑模型小鼠的各项指标,进一步证明了三者之间的协同增效祛黄褐斑作用。见表2。

2.4 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠皮肤中Tyr、MDA、LF含量和SOD活性的影响

各组小鼠经黄体酮注射和紫外线照射造模30 d后,模型组与空白对照组相比,小鼠皮肤组织中SOD活性显著降低($P<0.01$),同时小鼠皮肤组织中Tyr、MDA和LF含量显著升高($P<0.01$),进一步证明黄体酮注射和紫外照射联合作用的黄褐斑模型造模成功;与模型组的小鼠皮肤组织中的各项指标进行比较,自拟祛黄褐斑胶囊、红花提取物、桃仁提取物各剂量组

表2 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠肝脏中Tyr、MDA、LF含量和SOD活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD/(U/mL)	Tyr/(μg/mL)	MDA/(nmol/mL)	LF/(μg/g)
Control组	10	164.22±18.52	42.11±5.65	8.24±0.93	3.21±0.52
Model组	10	88.45±9.85##	126.35±13.36##	16.11±1.76##	10.27±1.16##
CF-L组	10	121.33±18.36*	91.57±9.89*	14.15±1.47*	8.24±0.93*
CF-H组	10	134.25±12.48**	73.14±8.77**	12.69±1.38*△	6.52±0.72*△
ASR-L组	10	107.5±12.66*	107.51±11.47*	15.28±1.65	9.25±1.05
ASR-H组	10	116.25±11.87*△	98.3±10.57*△	14.39±1.59△	8.45±0.94△
PS-L组	10	123.43±14.24*	98.85±10.94*	14.63±1.69*	7.68±0.84*
PS-H组	10	135.11±15.78**	86.76±9.63*△	12.36±1.34*	6.71±0.74*△
CF-ASR-PS-L组	10	139.93±13.02**	64.34±7.82**	11.05±1.28**	5.37±0.64**
CF-ASR-PS-H组	10	150.24±16.97**	52.05±5.73**	9.25±1.07**	4.19±0.47**

注:##与Control组比较,$P<0.01$;*与Model比较,$P<0.05$;**与Model比较,$P<0.01$;△与CF-ASR-PS-H组比较,$P<0.05$,△△与CF-ASR-PS-H组比较,$P<0.01$。

能够显著升高黄褐斑模型小鼠皮肤组织中的SOD活性水平,同时降低小鼠皮肤组织中的Tyr、MDA和LF的含量,这些指标与模型组对应指标对比均具有统计学差异($P<0.05$或$P<0.01$),从皮肤组织中相关指标的评价方面进一步说明自拟祛黄褐斑胶囊、红花提取物、桃仁提取物均祛黄褐斑的作用。当归提取物仅高剂量组在SOD活性和Tyr、LF含量三个指标中与模型组对比具有统计学差异($P<0.05$),说明当归提取物能在一定程度上减缓黄褐斑模型小鼠机体皮肤组织中的氧化应激反应,抑制酪氨酸酶的生成,减少脂褐素产生。各提取物单药高剂量组与自拟祛黄褐斑胶囊高剂量组对应指标的统计学差异分析可知,当归提取物高剂量组的各项指标、红花提取物高剂量组的MDA含量、桃仁提取物高剂量组的SOD活性和Tyr含量2个指标与自拟祛黄褐斑胶囊组小鼠的皮肤组织对应指标比较具有显著性差异($P<0.05$),说明红花提取物主要调节小鼠皮肤组织中的SOD活性和Tyr、MDA含量水平,而桃仁提取物主要调节小鼠皮肤组织中的MDA、LF含量指标,而当归提取物虽然各项指标与自拟祛黄褐斑胶囊组无统计学差异,但在一定程度上改善了黄褐斑模型小鼠的各项指标。见表3。

表3 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠皮肤组织中Tyr、MDA、LF含量和SOD活性的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD/(U/mL)	Tyr/(μg/mL)	MDA/(nmol/mL)	LF/(μg/g)
Control组	10	143.88±15.21	68.52±7.42	6.45±0.87	4.08±0.62
Model组	10	80.57±9.36##	151.47±16.1##	12.54±1.37##	21.22±2.27##
CF-L组	10	99.39±11.54*	133.06±15.58*	10.33±1.18*	14.54±1.58*
CF-H组	10	104.48±12.43*	118.32±12.63*	9.95±0.99*△	11.41±1.2**
ASR-L组	10	87.44±11.04	139.04±14.59	11.39±1.27	15.3±1.68*
ASR-H组	10	91.9±10.98*△	135.24±14.4*△	10.97±1.24△	16.18±1.73*△
PS-L组	10	92.86±10.09*	130.44±12.97*	10.69±1.15*	14.02±1.56*
PS-H组	10	102.85±12.16*△	121.05±13.45*△	9.28±1.06*	12.55±1.39**
CF-ASR-PS-L组	10	110.27±11.87**	107.52±11.45**	8.32±0.87**	9.64±1.22**
CF-ASR-PS-H组	10	122.98±12.54**	82.88±9.59**	7.85±0.74**	7.52±1.17**

注:##与Control组比较,$P<0.01$;*与Model比较,$P<0.05$;**与Model比较,$P<0.01$;△与CF-ASR-PS-H组比较,$P<0.05$,△△与CF-ASR-PS-H组比较,$P<0.01$。

2.5 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠皮肤中黑色素细胞数的影响

与空白组比较,造模后黄褐斑模型组小鼠皮肤组织中的黑色素细胞数目显著增加($P<0.01$),这在病理方面进一步证明黄褐斑模型造模成功;与模型组比较,自拟祛黄褐斑胶囊高、低剂量组及红花提取物高剂量组能够显著减少照射处皮肤组织

中黑色素细胞的数目($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其他各组与模型组皮肤组织中的黑色素细胞数有所减少,但差异无统计学意义,说明红花、当归、桃仁三种提取物联合使用在祛黄褐斑方面具有协同增效的作用。见插页Ⅶ图2。

2.6 小鼠的急性毒性试验

自拟黄褐斑胶囊给药前后各时间段,不同组小鼠的体质量与空白对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。各剂量组小鼠在急性毒性试验期间,未出现惊厥、不安、便秘、腹泻或者是竖毛等不良反应,整个实验期间无小鼠死亡。实验结束后,解剖小鼠各脏器并未发现肉眼可见异常,说明本研究中的自拟黄褐斑胶囊的食用安全性良好。小鼠的急性毒性试验经口耐受剂量(MTD)>15 g/(kg·BW)。根据《食品安全国家标准急性经口毒性试验》中急性毒性分级标准,自拟黄褐斑胶囊的急性毒性属实际无毒级。见表4。

表4 自拟黄褐斑胶囊对小鼠急性毒性试验前后体质量的影响

组别	性别	n	初始体质量/(g)	7 d体质量/(g)	14 d体质量/(g)	动物死亡数/(只)	MTD/(g/kg)
对照组	雌性	10	18.62±0.83	23.54±0.48	30.22±0.52	0	-
	雄性	10	18.87±0.92	23.85±0.62	30.45±0.71	0	-
给药组	雌性	10	18.75±0.48	24.11±0.42	31.22±0.88	0	>15
	雄性	10	19.02±0.63	24.52±0.62	31.49±0.75	0	>15

3 讨论

皮肤的颜色取决于产生黑色素的黑色素细胞数量、大小和类型,黑色素细胞是树突状细胞,与附近的表皮角化细胞密切接触,黑色素的作用之一是保护皮肤和皮下组织免受紫外线引起的皮肤损伤,然而,黑色素过多的形成和黑色素在皮肤中的积累会导致色素沉着引发皮肤疾病,如黄褐斑、雀斑和老年性色素斑[9-11]。Tyr是黑色素形成的主要限速酶,而Tyr的活性受自由基的调节,因此,增强抗氧化作用可以阻止黑色素的合成[12-14]。黄体酮和紫外线照射结合的黄褐斑模型,其原理是注射黄体酮导致动物机体内分泌紊乱从而刺激黑色素细胞产生黑色素而致色素沉着,同时进行紫外线照射促进黑色素生成,最终形成黄褐斑,是目前认为最接近人体黄褐斑的模型[5]。SOD活性、MDA和LF含量则是评价黄褐斑模型是否构建成功的重要指标,模型构建成功的小鼠机体中SOD活性下降,氧化损伤加重,进而脂质过氧化产物MDA和LF的含量增加。

黄褐斑的病因复杂,中医学上认为其病因主要包括气血瘀滞、肝气郁滞、脾胃虚弱、肝肾不足等[15],治疗上以疏肝健脾理气、活血化瘀为主。现代药理[16-20]研究表明,红花、当归、桃仁具有抑制皮肤黑色素合成,改善局部皮肤的血液循环进而达到美白祛斑的功效。本研究通过肌注黄体酮和紫外线照射的方法建立黄褐斑模型,并对模型动物血清、皮肤及肝脏组织中的相关指标进行评价,研究表明,红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊能提高黄褐斑模型动物肝脏、皮肤组织及血清中SOD的活性,降低MDA、Tyr的含量,减少肝脏和皮肤组织中LF的含量,提高模型小鼠的抗氧化能力,减少黑色素细胞的生成,减轻皮肤色素沉着,具有祛黄褐斑的功效,且3种提取物联合开发的自拟祛黄褐斑胶囊效果更好。

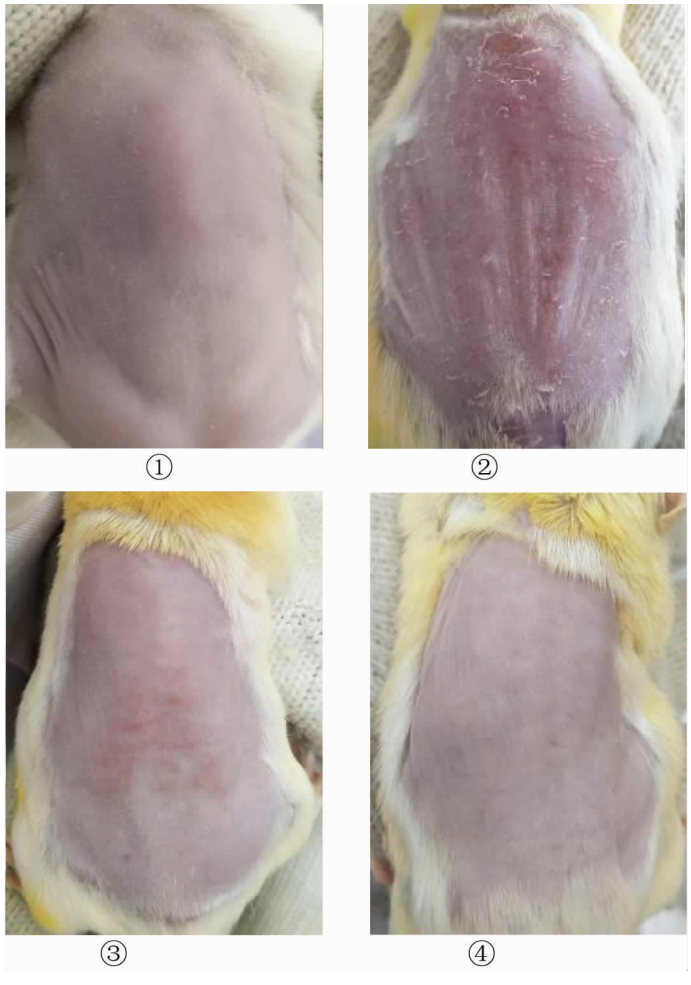
参考文献

[1] MCKESEY J, TOVAR-GARZA A, PANDYA AG. Melasma treatment: an evidence-based review[J]. Am J Clin Dermatol, 2020, 21(2): 173-225.
[2] BOTSALI AYSENUR, ESME PELIN, ERBIL HAKAN, et al. Comparison of fractional erbium: YAG laser-assisted tranexamic acid delivery alone and in combination with oral tranexamic acid in melasma[J]. Lasers Med Sci, 2022, 37(7): 2823-2830.
[3] RATHEE PRITY, KUMAR SUNIL, KUMAR DINESH, et al. Skin hyperpigmentation and its treatment with herbs: an alternative method[J]. Future J Pharm, 2021, 7(1): 132.
[4] SHETH VM, PANDYA AG. Melasma: a comprehensive update: part I[J]. J Am Acad Dermatol, 2011, 65(4): 689-697.
[5] WERLINGER KD, GUEVARA IL, GONZALEZ CM, et al. Prevalence of self-diagnosed melasma among premenopausal Latino women in Dallas and Fort Worth, Tex[J]. Arch Dermatol, 2007, 143(3): 424-425.
[6] TANG L H, XIAN J, ZHANG Y, et al. Efficacy of acupuncture for melasma: A protocol of systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2021, 100(50): 28298.
[7] 吴嘉惠,刘志超. 黄褐斑发病机制最新研究进展[J]. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报,2021,42(6):471-475.
[8] 苗明三,付珍娜,曹利华. 黄褐斑动物模型制备规范(草案)[J]. 中药新药与临床药理,2017,28(5):649-653.
[9] DAI C Y, LIAO P R, ZHAO M Z. Optimization of Ultrasonic Flavonoid Extraction from Saussurea involucrate, and the Ability of Flavonoids to Block Melanin Deposition in Human Melanocytes[J]. Molecules, 2020, 25(2): 313.
[10] 王彩霞. 美肤散对黄褐斑模型小鼠SOD、MDA、TYR、LF和黑色素细胞的影响[J]. 中国老年学杂志,2021,41(23):5394-5396.
[11] 刘逍遥,王停,朱佩轩,等. 黄褐斑动物模型的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(23):200-208.
[12] TSOI B, YI RN, CAO LF, et al. Comparing antioxidant capacity of purine alkaloids: A new, efficient trio for screening and discovering potential antioxidants in vitro and in vivo[J]. Food Chem, 2015, 176: 411-419.
[13] DEL BINO S, DUVAL C, BERNERD F. Clinical and biological characterization of skin pigmentation diversity and its consequences on UV impact[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): 2668.
[14] WANG J Y, XIE X Y, DENG Y, et al. Licorice zinc suppresses melanogenesis via inhibiting the activation of P38MAPK and JNK signaling pathway in C57BL/6J mice skin[J]. Acta Chir Bras, 2022, 37(10): 371002.
[15] 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组,中华医学会皮肤性病学分会白癜风研究中心,中国医师协会皮肤科医师分会色素病工作组. 中国黄褐斑诊疗专家共识(2021版)[J]. 中华皮肤科杂志,2021,54(2):110-115.
[16] 李红艳,刘艳杰,王倩,等. 红花中酪氨酸酶抑制成分的快速筛选和分析[J]. 现代药物与临床,2013,28(2):170-174.
[17] 李娜,鲁晓翔. 红花黄酮对酪氨酸酶的抑制及其机理研究[J]. 食品科技,2010,35(12):176-179,190.
[18] 付红. 当归提取物抗皮肤衰老及美白功效体外实验研究[J]. 医药论坛杂志,2017,38(12):142-143.
[19] 高瑞英,党志,邹颖楠,等. 当归提取物抗皮肤衰老及美白功效体外实验研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):874-875.
[20] 许筱凰,李婷,王一涛,等. 桃仁的研究进展[J]. 中草药,2015,46(17):2649-2655.

(本文编辑:张丽)

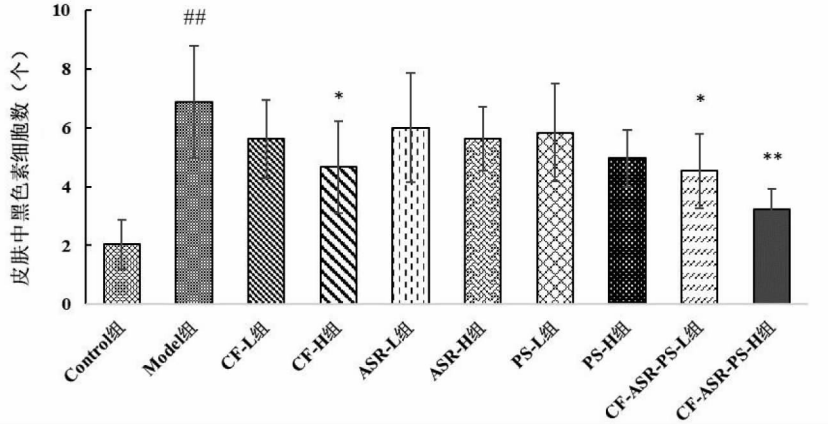
自拟祛黄褐斑胶囊及其功效成分对黄褐斑模型小鼠的祛黄褐斑作用研究

(正文见 34－38 页)



注:①空白对照组;③模型组;③自拟祛黄褐斑胶囊低剂量组;④自拟祛黄褐斑胶囊高剂量组

图 1 模型组和自拟祛黄褐斑胶囊高剂量组小鼠背部皮肤状态



注:与##Control 组比较,$P<0.01$;＊与 Model 比较,$P<0.05$;＊＊与 Model 比较,$P<0.01$。

图 2 红花、当归、桃仁提取物及自拟祛黄褐斑胶囊对黄褐斑模型小鼠皮肤中黑色素细胞数的影响