

◆实验研究◆

枸杞复方颗粒制剂对紫外线诱导的黄褐斑小鼠皮肤损伤的防治效果研究

陆敏¹, 魏伟², 常晓婕^{2,3}, 刘宁², 苏为科¹, 余建强²

1. 浙江工业大学绿色制药协同创新中心, 浙江 杭州 310005

2. 宁夏医科大学药学院, 宁夏回族自治区 银川 750001

3. 山西省第二人民医院药剂科, 山西 太原 030012

[摘要] 目的: 观察枸杞复方颗粒制剂防治紫外线 (UVB) 诱导的黄褐斑小鼠皮肤损伤的效果。方法: 40 只 ICR 雌性小鼠随机分为正常组、模型组、阳性组及中药组, 每组 10 只。造模前 1 d 开始药物干预, 阳性组灌胃 100 mg/kg 维生素 C 水溶液; 中药组灌胃 9.3 g/kg 枸杞复方颗粒制剂水溶液; 正常组和模型组灌胃等体积 0.9% 氯化钠溶液; 连续干预 15 d。药物干预第 2 天除正常组外, 其余各组小鼠连续 14 d 照射 UVB (每天 2 次, 每次 1 h) 诱导小鼠形成黄褐斑。采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察小鼠皮肤组织病理变化; 免疫组织化学法观察小鼠皮肤黑色素表达; 分光光度法检测小鼠皮肤组织酪氨酸酶、总抗氧化能力 (T-AOC)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和丙二醛 (MDA) 表达。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠皮肤表现出皱纹和暗沉, 表皮上皮细胞、炎症细胞及皮脂腺出现增生, 皮肤组织中黑色素、酪氨酸酶和 MDA 水平增加 ($P < 0.05$); T-AOC、CAT 和 T-SOD 有降低趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 阳性组和中药组小鼠皮肤损伤有所缓解; 皮肤组织中黑色素、酪氨酸酶水平降低 ($P < 0.05$); 阳性组、中药组小鼠皮肤组织 T-AOC、T-SOD 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 中药组小鼠皮肤组织 MDA 水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 枸杞复方颗粒制剂能够有效缓解 UVB 诱导的黄褐斑小鼠皮肤损伤, 其机制与降低皮肤组织酪氨酸酶和 MDA 水平有关。

[关键词] 黄褐斑; 枸杞复方颗粒制剂; 酪氨酸酶; 黑色素; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2023) 03-0001-06

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2023.03.001

Effect of Compound Lycii Fructus Granules on Preventing and Treating Skin Damage in Mice with Ultraviolet-induced Melasma

LU Min, WEI Wei, CHANG Xiaojie, LIU Ning, SU Weike, YU Jianqiang

Abstract: **Objective:** To observe the effect of Compound Lycii Fructus Granules on the prevention and treatment of skin injury induced by ultraviolet B (UVB) in mice with melasma. **Methods:** A total of 40 female ICR mice were randomly divided into the normal group, the model group, the positive group and the Chinese medicine group, with 10 mice in each group. On the day before modeling, the positive group was given 100 mg/kg aqueous solution of vitamin C by gastric irrigation; the Chinese medicine group was given 9.3 g/kg aqueous solution of Compound Lycii Fructus Granules by gastric irrigation; the normal group and

[收稿日期] 2022-02-28

[修回日期] 2022-11-21

[基金项目] 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2017BY079); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2021BEF02011); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2021BEF02013)

[作者简介] 陆敏 (1994-), 女, 博士研究生, E-mail: yaolilumin@163.com。

[通信作者] 余建强 (1965-), 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: YujqLab@163.com。

the model group were given an equivalent volume of 0.9% sodium chloride solution by gastric irrigation. The intervention lasted for 15 consecutive days. On the second day of drug intervention, except for the normal group, the other groups were irradiated with UVB for 14 consecutive days (twice a day, with one hour for each time) to induce melasma. The pathological changes in skin of mice were observed by HE staining; the expression of melanin in skin of mice was observed by immunohistochemistry; the expressions of tyrosinase, total antioxidant capacity (T-AOC), total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) in skin tissue of mice were detected by spectrophotometry. **Results:** Compared with the normal group, the skin of mice in the model group showed wrinkles and dullness; the epidermal epithelial cells, inflammatory cells and sebaceous glands appeared hyperplasia; and the levels of melanin, tyrosinase and MDA in skin tissue were increased ($P < 0.05$); T-AOC, CAT and T-SOD showed a trend of decrease, but the difference showed no significant difference ($P > 0.05$). Compared with that in the model group, skin injury of mice in the positive group and the Chinese medicine group was relieved; the levels of melanin and tyrosinase in skin tissue were decreased ($P < 0.05$); the levels of T-AOC and T-SOD in skin tissue of mice in the positive group and the Chinese medicine group were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the MDA level in skin tissue of mice in the Chinese medicine group was decreased, the difference being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compound Lycii Fructus Granules can effectively relieve skin injury induced by UVB in mice with melasma, and its mechanism is related to reducing the levels of tyrosinase and MDA in skin tissue.

Keywords: Melasma; Compound Lycii Fructus Granules; Tyrosinase; Melanin; Oxidative stress

黄褐斑是以面部见形状不规则的黄褐色或深褐色色素沉着为临床表现的皮肤疾病, 不仅影响患者面部美观, 还会阻碍患者身心健康发展。维生素 C 具有强还原性, 可清除机体自由基, 有效对抗衰老, 减少皱纹, 抑制黑色素的生成, 对治疗黄褐斑有一定疗效^[1]。但已有研究表明, 大量使用维生素 C 可能在停药后引起坏血病, 形成血栓, 造成肾脏损伤等一系列不良影响^[2]。枸杞复方颗粒制剂是由宁夏医科大学中医教授经科学组方而成, 其质量可控, 具有较强的体外抗氧化能力, 有预防心血管疾病、防辐射、抗衰老、美容养颜等功效^[3]。枸杞复方颗粒制剂主要由八宝茶组成, 具有补肝肾、益精血的作用, 对肝肾不足形成的黄褐斑具有一定治疗作用^[4-5]。本研究采用紫外线(UVB)照射法建立黄褐斑小鼠模型, 观察枸杞复方颗粒制剂防治黄褐斑小鼠皮肤组织损伤的效果。

1 材料与方法

1.1 动物 40 只健康 SPF 级 ICR 雌性小鼠, 体质量为 18~22 g, 实验动物均购自宁夏医科大学实验动物

中心, 动物许可证号: SCXK(宁)2015-0001。该实验经宁夏医科大学实验动物中心动物伦理委员会(批号: 宁医大伦理第 2022-004 号)审查通过。

1.2 药物与试剂 宁夏医科大学药学院提供的枸杞复方颗粒制剂(枸杞子、芝麻、核桃、碧螺春、红枣、龙眼、陈皮和玫瑰花配伍而成); 丙二醛(MDA)试剂盒(批号: 20180721)、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒(批号: 20181228)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒(批号: 20181226)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(批号: 20181222)均由南京建成生物工程研究所提供; 维生素 C 片(华中药业股份有限公司, 国药准字 H42020614); 酪氨酸酶 ELISA 试剂盒(上海沪鼎生物科技有限公司, 批号: H19D01); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号: 20181114); 黑色素抗体(北京奥博森生物技术有限公司, 批号: AD06115689)。

1.3 仪器 Olympus BX53 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Z323K 低温高速离心机(德国赫默公司); JXFSTPRP-CL 低温冷冻研磨仪(上海净信实业发展有

限公司); RM2235 组织切片机(德国 Leica 公司)。

1.4 分组、给药与造模 取标准体质量 ICR 雌性小鼠 40 只, 随机分为正常组、模型组、阳性组和中药组, 每组 10 只。在小鼠造模前 24 h, 小鼠开始给予药物干预, 维生素 C 依据预实验剂量筛选结果, 阳性组小鼠灌胃 100 mg/kg 维生素 C 溶液, 中药组小鼠灌胃 9.3 g/kg 枸杞复方颗粒制剂溶液, 正常组和模型组给予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 每天灌胃 1 次, 连续给药 15 d。造模方法参考文献[6]及结合前期预实验制定, 具体操作如下: ICR 雌性小鼠在实验环境下适应 2 d 后, 小鼠用脱毛器去除部分背部毛发, 用脱毛膏除去多余毛发, 除正常组外, 将其他小鼠置于紫外灯(320 nm)下照射 1 h, 小鼠与紫外灯相距 25 cm, 小鼠背部皮肤一旦长出新毛, 必须立即剔除, 每天 2 次, 连续紫外灯照射 14 d, 观察其脱毛部位颜色和皮肤状态, 并于实验结束后拍照记录各组小鼠皮肤状况。

1.5 苏木素-伊红染色 给药结束后, 将小鼠处死, 取背部无毛皮肤组织。使用 0.9% 氯化钠溶液将一部分组织制备成 10% 组织匀浆后, 取组织上清, 随后冷冻, 待测; 另一部分组织置于包埋盒中存放在多聚甲醛固定液里, 将固定液中的组织置于梯度乙醇和二甲苯溶液中进行脱水, 随后置于石蜡中进行包埋, 切片。将组织切片进行脱蜡、梯度乙醇水化、苏木素染色、盐酸乙醇分化、伊红染色操作, 最后乙醇梯度脱水, 并用二甲苯透明后, 中性树胶封片。使用显微镜观察各组小鼠皮肤组织病理变化。

1.6 免疫组织化学法检测 将组织切片置于载玻片中, 于 70 ℃ 烘箱中烤 2 h; 将烤好的片子用二甲苯和梯度乙醇进行脱蜡水化; 随后置于柠檬酸盐缓冲液煮沸 10 min, 自然冷却至室温; 用 3% 过氧化氢在 37 ℃ 孵育 10 min; PBS 溶液冲洗, 滴加山羊血清, 滴加一抗并孵育 2 h, PBS 溶液冲洗, 滴加 PV-9001 试剂 2、试剂 3; DAB 工作液避光染色 6~8 min, 水洗后, 用苏木素复染 10 s, 水洗 2 min; 最后乙醇梯度脱水, 中性树胶封片, 显微镜下观察皮肤中黑色素变化情况, 每张片子随机 5 个视野拍照, 采用 Image-pro Plus 6.0 对其进行积分光密度(IOD)分析。

1.7 酪氨酸酶检测 将组织上清解冻后, 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的操作要求和步骤进行操作, 采用酶标仪在 562 nm 处测定吸光度值, 样品根据蛋

白标准曲线计算皮肤组织中蛋白浓度。随后按照 ELISA 试剂盒的操作要求和步骤进行, 在 450 nm 处测定各孔吸光度值, 最后根据酪氨酸酶标准曲线和蛋白浓度计算酪氨酸酶含量。

1.8 抗氧化检测 取组织上清, 按照试剂盒操作要求和步骤, 检测皮肤组织中 MDA、T-AOC、T-SOD 和 CAT 水平。

1.9 统计学方法 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析。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, 事后两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

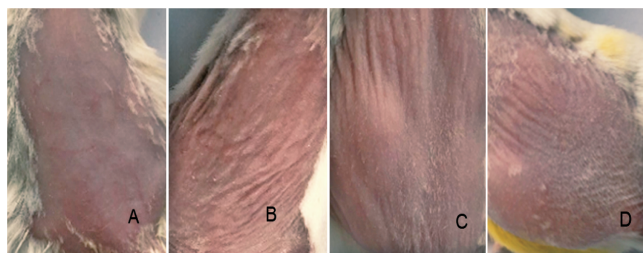
2.1 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠皮肤病理损伤的影响 见图 1、图 2。与正常组比较, ICR 小鼠经过 UVB 照射 2 周后, 模型组小鼠背部皮肤出现暗沉、缺水、皱纹, 并变黑现象; 小鼠皮肤表皮的上皮细胞明显增生, 表皮细胞数增多, 局部出现乳头状、疣状增生, 局部炎性细胞增多, 毛囊和皮脂腺等附属器明显增多。药物干预后, 阳性组和中药组小鼠皮肤皱纹和暗沉有所缓解; 小鼠皮肤上皮层数接近正常组, 部分上皮增生轻微, 排列紊乱减轻, 局部见有少量炎症细胞和组织增生; 毛囊、皮脂腺分泌较模型组明显减少, 基本无增生, 接近正常组。

2.2 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠皮肤组织黑色素表达的影响 见图 3。正常组小鼠皮肤毛囊皮脂腺基底细胞中见有少量黑色素, 胞浆着色棕褐色, 黑色素细胞排列整齐, 棘细胞层中见少量阳性细胞, 上皮层正常未见增生; 模型组小鼠表皮基底细胞和棘细胞中可见成簇分布的黑色素细胞, 上皮层数可见显著增厚且黑色素细胞变多, 成簇分布于毛囊基底细胞团中, 表皮基底细胞和棘细胞层中见单个散在分布的黑色素细胞, 细胞浆着色为褐色。阳性组、中药组可见表皮基底细胞排列整齐, 在基底层细胞和棘细胞层内, 多分布稀疏的黑色素细胞的细胞质染色深棕褐色的黑色素细胞, 黑色素细胞的深度, 细胞数量和深度均比模型组在基底层少。与正常组比较, 模型组呈强阳性反应, 模型组 IOD 值高于正常组($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性组和中药组 IOD 值降低, 黑色素表达降低($P < 0.05$)。

2.3 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠酪氨酸酶水平的影响 见图 4。与正常组比较, 模型组小鼠皮肤酪

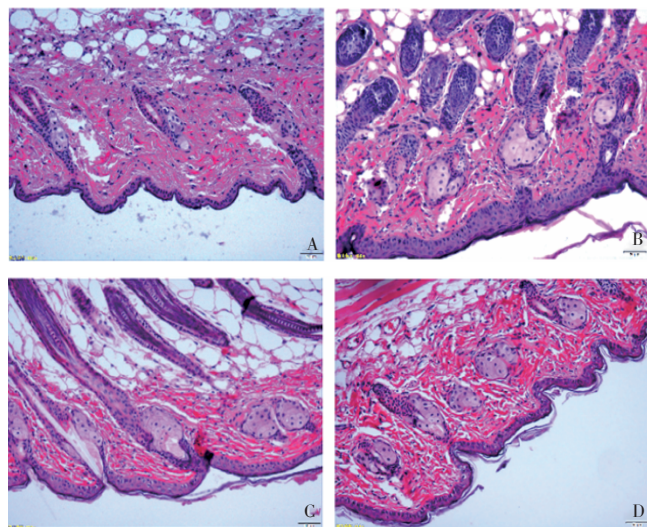
氨酸酶含量显著高于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组和阳性组小鼠酪氨酸酶含量低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.4 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠皮肤组织氧化指标的影响 见图 5。与正常组比较, 模型组小鼠皮肤组织中 MDA 表达显著增加($P < 0.05$), T-AOC、CAT 和 T-SOD 水平有降低趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较, 阳性组小鼠 T-AOC 和 T-SOD 水平显著升高($P < 0.01$, $P < 0.05$); 中药组小鼠皮肤组织中 T-AOC、T-SOD 和 CAT 水平均显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$), MDA 水平显著下降($P < 0.05$)。



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 阳性组; D. 中药组

图 1 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠皮肤状态的影响

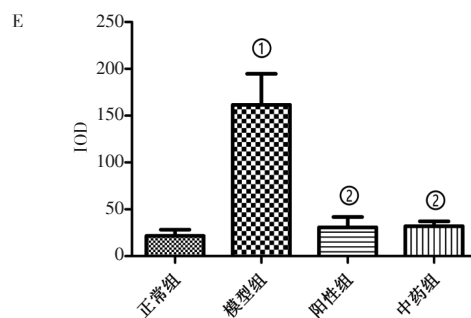
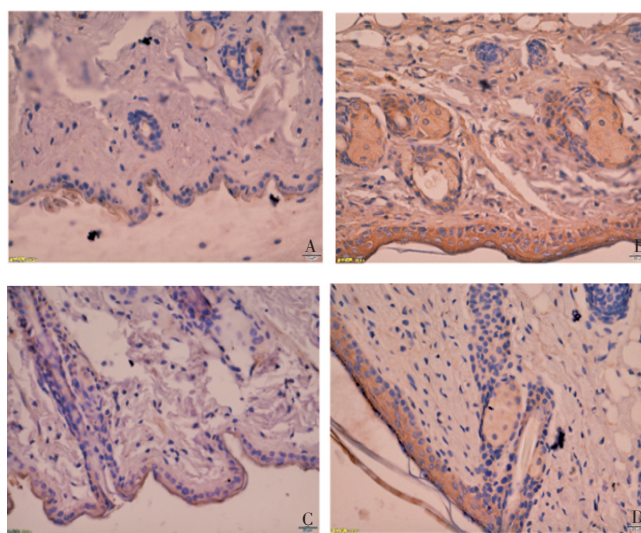


注: A. 正常组; B. 模型组; C. 阳性组; D. 中药组

图 2 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠皮肤组织病理学的影响 ($\times 200$)

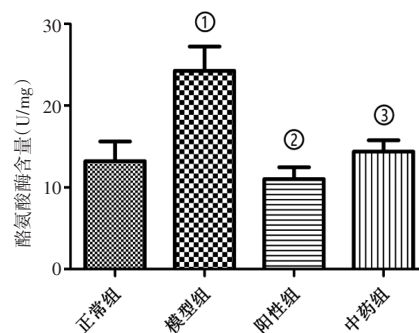
3 讨论

黄褐斑是皮肤黑色素异常堆积的表现, 多发于女性^[6-7]。黄褐斑一直困扰着爱美人士, 尽管存在多种疗法, 但仍然需要寻找更为安全的治疗办法。枸



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 阳性组; D. 中药组; E. IOD 统计图。①与正常组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$

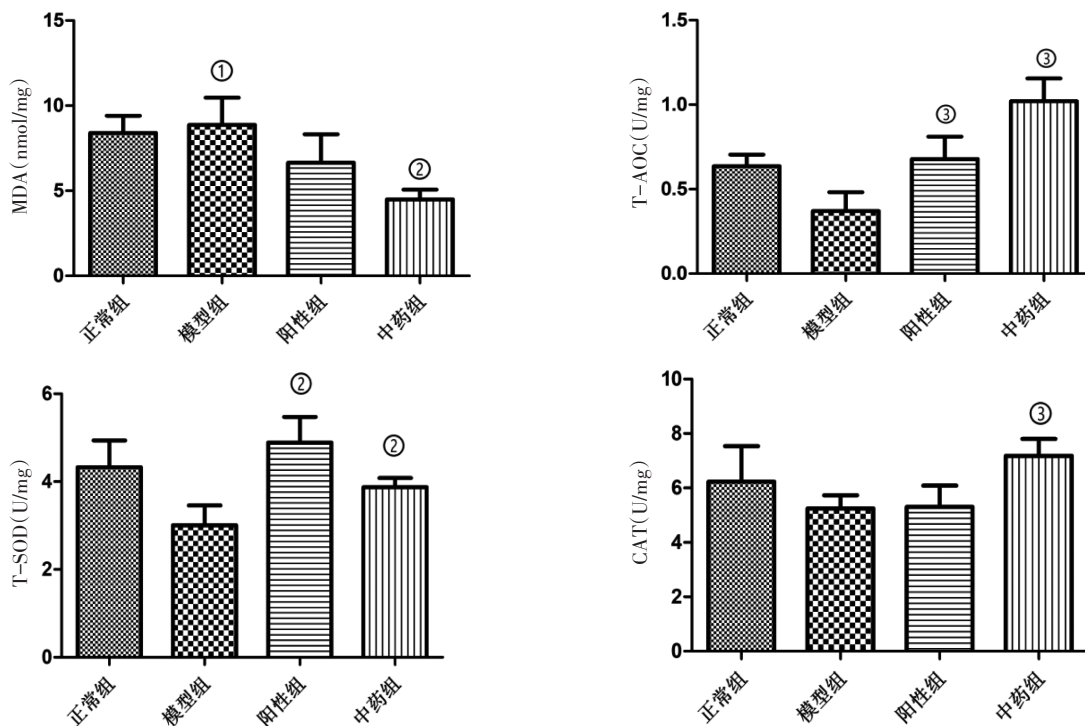
图 3 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠皮肤组织黑色素表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$) ($\times 400$)



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

图 4 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠酪氨酸酶水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

杞复方颗粒制剂是由西北地区的特色饮品八宝茶进行创新的制剂, 该制剂以中医理论为指导, 将枸杞子、芝麻、核桃、绿茶(碧螺春)、红枣、龙眼、陈皮和玫瑰花 8 种材料进行配伍而成, 具有安神醒



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

图5 枸杞复方颗粒制剂对黄褐斑小鼠皮肤组织氧化指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

脑、补益心脾、滋补肝肾、美容养颜等作用。

黄褐斑的形成因素之一是长时间的日晒，但具体机理尚不明确。目前，已有多种模型用于黄褐斑造模，包含UVB造模法、黄体酮造模法以及黄体酮联合UVB造模法等。由于UVB造模法相对其他模型成熟，因此本研究采用UVB照射建立黄褐斑小鼠模型。维生素C又称抗坏血酸，属于高效抗氧化剂，能够将多巴醌还原为多巴，阻止其氧化而抑制色素形成^[8-9]，也是目前用于治疗黄褐斑的药物之一，因此本实验采用维生素C作为阳性对照药物。本研究中，模型组小鼠使用UVB照射后，小鼠皮肤有了直观的变化，皮肤病变程度增加，免疫组化显示黑色素增加，证明成功建立UVB黄褐斑小鼠模型。此外，模型组小鼠皮肤组织的MDA含量显著增多，可能是因为脂质过氧化反应的异常。研究发现MDA会引起蛋白质、核酸等交联聚合，具有细胞毒性，因此测定MDA的量可间接反映机体的脂质过氧化和细胞损伤的程度^[10]。酪氨酸酶是生成黑色素的关键酶，抑制该酶活性是评价抗黑色素生成活性的重要指标。黑色素形成的关键原因之一是过度的UVB照射，当过度暴露于UVB下会损伤表皮细胞，激活酪

氨酸酶，加速黑色素合成，破坏皮肤的保湿功能，使皮肤干燥，破坏真皮层的弹性纤维，产生皱纹^[11-12]。此外，体内氧化平衡的破坏可能导致酪氨酸酶异常表达，进一步生成黑色素，形成黄褐斑^[13-14]。

通过枸杞复方颗粒制剂的干预，发现该组方可显著改善UVB照射后ICR小鼠的皮肤损伤，同时降低小鼠皮肤组织中酪氨酸酶水平和MDA含量，显著减少体内黑色素的生成，缓解氧化应激，使小鼠皮肤色素沉着减轻。中药组中MDA含量低于正常组，可能是随着时间的增加，正常组小鼠自然衰老，导致自由基增多，进而加速MDA的表达^[15]。但其他氧化指标如T-AOC、T-SOD和CAT虽有下降，但差异无统计学意义，推测可能模型对这些氧化酶的影响较小。现代药理研究发现枸杞子富含的枸杞多糖和甜菜碱具有抗氧化、抗衰老、抗癌等作用，还能抑制黑色素的产生^[16]。绿茶富含的表没食子儿茶素没食子酸酯为其活性成分，能够预防UVB诱导的免疫抑制，具有抗炎活性和强抗氧化作用，对自然衰老具有一定抵御作用^[17]。另外红枣跟玫瑰花也具有抗氧化能力^[18-19]，多种中药协调应用，使小鼠T-AOC、T-SOD和CAT改善优于模型组。

综上所述,枸杞复方颗粒制剂能够改善 UVB 诱导的黄褐斑小鼠皮肤损伤,其机制与调节 MDA 水平、抑制酪氨酸酶和黑色素的表达有关。

[参考文献]

- [1] 刘英琦,任志鑫,田妍,等.左旋维生素C在皮肤美容领域的临床应用进展[J].中国医疗美容,2020,10(9):148-151.
- [2] 马建春,赖莎,杨泽民,等.大剂量维生素C辅助抗病毒作用研究进展[J].广东药科大学学报,2020,36(2):174-177.
- [3] 陆敏,魏炜,常晓婕,等.八宝茶固体饮料的制备工艺[J].食品研究与开发,2022,43(18):85-92.
- [4] 孙亚如,李芳梅,祁希希,等.中医治疗黄褐斑的研究进展[J].光明中医,2022,37(14):2646-2649.
- [5] 寇译丹,张月明,韩璐,等.中药保健茶的制备工艺及功效研究进展[J].亚太传统医药,2018,14(7):80-84.
- [6] SHIM E, SONG E, CHOI K S, et al. Inhibitory effect of *Gastrodia elata* Blume extract on alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in murine B16F10 melanoma [J]. *Nutr Res Pract*, 2017, 11(3): 173-179.
- [7] BRENNER M, HEARING V J. The protective role of melanin against UV damage in human skin[J]. *Photochem Photobiol*, 2008, 84(3): 539-549.
- [8] SANADI R M, DESHMUKH R S. The effect of Vitamin C on melanin pigmentation—A systematic review[J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2020, 24(2): 374-382.
- [9] MIAO F, SU M Y, JIANG S, et al. Intramelanocytic Acidification Plays a Role in the Antimelanogenic and Antioxidative Properties of Vitamin C and Its Derivatives[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2084805.
- [10] 杜晓燕.活血祛斑汤联合中药倒膜治疗肝郁血瘀型黄褐斑临床疗效观察[D].南昌:江西中医药大学,2021.
- [11] YUAN Y, JIN W, NAZIR Y, et al. Tyrosinase inhibitors as potential antibacterial agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 187: 111892.
- [12] HALABAN R, PATTON R S, CHENG E, et al. Abnormal Acidification of Melanoma Cells Induces Tyrosinase Retention in the Early Secretory Pathway[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(17): 14821-14828.
- [13] GUNASEKARAN N, ARUMUGAM A, PERUMAL S. A comparative study on antioxidant potentials, inhibitory activities against key enzymes related to metabolic syndrome, and anti-inflammatory activity of leaf extract from different *Momordica* species[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2014, 3: 36-46.
- [14] CUI H, DUAN F, JIA S, et al. Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seed Oils from *Torreya grandis* Fort. ex Lindl[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 5314320.
- [15] 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.
- [16] HUANG H, HUANG W, TSAI T, et al. Supercritical fluid extract of *Lycium chinense* Miller root inhibition of melanin production and its potential mechanisms of action[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 208.
- [17] KATTIYAR S K, ELMETS C A. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection (review) [J]. *International Journal of Oncology*, 2001, 18(6): 1307-1313.
- [18] ZHU X R, WANG H, SUN J, et al. Pericarp and seed of litchi and longan fruits: constituent, extraction, bioactive activity, and potential utilization[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019, 20(6): 503-512.
- [19] GAO Q H, WU C S, WANG M. The jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(14): 3351-3363.

(责任编辑:冯天保,沈崇坤)