

杜晓霜,刘萍,邓映,等. 基于 Nrf-2/HO-1 探究甘草锌对黄褐斑小鼠的治疗作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(1): 80-87.

Du XS, Liu P, Deng Y, et al. Exploring the therapeutic effect of licorice zinc on chloasma mice via the Nrf-2/HO-1 pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(1): 80-87.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.01.009

基于 Nrf-2/HO-1 探究甘草锌对黄褐斑小鼠的治疗作用

杜晓霜,刘萍,邓映,杨洪秋,杜宇*

(西南医科大学附属中医医院医学美容中心,四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 探讨甘草锌对黄褐斑的治疗作用。方法 将 36 只 BALB/c 小鼠平均分为空白组、模型组、甘草锌低剂量组、甘草锌中剂量组、甘草锌高剂量组和氨甲环酸组,用 100 mJ/cm² UVB 照射联合 15 mg/kg 黄体酮注射进行黄褐斑造模,后对小鼠进行氨甲环酸(0.065 g/kg)与甘草锌低(0.65 g/kg)/中(1.3 g/kg)/高(2.6 g/kg)剂量连续治疗 14 d。取皮肤进行 HE、Masson-Fontana 染色;并检测皮肤和外周血中 SOD、MDA、GSP-Px、TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 含量;皮肤组织中浆蛋白 Nrf-2、核蛋白 Nrf-2、HO-1 表达水平。结果 与模型组相比较,高剂量甘草锌组黑色素细胞形成、胶原细胞坏死与炎症浸润减少($P<0.01$),MDA、IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 表达和浆蛋白 Nrf-2 表达降低($P<0.01$),GSP-Px、SOD 表达和核蛋白 Nrf-2、HO-1 表达增加($P<0.01$)。结论 甘草锌激活 Nrf-2/HO-1 通路启动 HO-1、SOD 和 GSP-Px 高表达抗氧化应激,从而减少黑色素形成。

【关键词】 甘草锌;Nrf-2/HO-1 通路;黄褐斑;氧化应激;炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 01-0080-08

Exploring the therapeutic effect of licorice zinc on chloasma mice via the Nrf-2/HO-1 pathway

DU Xiaoshuang, LIU Ping, DENG Ying, YANG Hongqiu, DU Yu*

(Medical Cosmetic Center, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the therapeutic effect of licorice zinc on melasma. **Methods** Thirty-six BALB/c mice were equally divided into blank group, model group, licorzinc low-dose group, licorzinc medium-dose group, licorzinc high-dose group and tranexamic acid group. Melasma was induced by 100 mJ/cm² UVB irradiation combined with 15 mg/kg progesterone injection. Mice were treated with tranexamic acid (0.065 g/kg) and low (0.65 g/kg), medium (1.3 g/kg), or high (2.6 g/kg) doses of zinc licorice for 14 days. Skin was taken for HE and Masson-Fontana staining and measurement of SOD, MDA, GSP-Px, TNF- α , IL-1 β , IL-6, plasma protein Nrf-2, nuclear protein Nrf-2 and HO-1 expression levels. **Results** Compared with model group, high-dose licorice zinc group showed decreased melanocyte formation, collagen cell necrosis, and inflammatory infiltration ($P<0.01$); decreased MDA, IL-6, IL-1 β , TNF- α and plasma protein Nrf-2 expression ($P<0.01$); and increased GSP-Px, SOD and nuclear protein Nrf-2 and HO-1 expression ($P<0.01$). **Conclusions** Zinc licorice activates the Nrf-2/HO-1 pathway to initiate high expression of HO-1, SOD and GSP-Px and fight oxidative stress, thereby reducing melanogenesis.

【Keywords】 licorice zinc; Nrf-2/HO-1 pathway; chloasma; oxidative stress; inflammation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 泸州市科技局(2019-SYF-42)。

[作者简介] 杜晓霜(1989—),女,硕士,研究方向:中医美容。E-mail: ymzx2516303@163.com

[通信作者] 杜宇(1970—),女,硕士,主任医师,研究方向:皮肤美容。E-mail: Duyu5035@126.com

黄褐斑是女性颜面常发的获得性色素增多性皮肤病,其病因及发病机制复杂,与光老化和激素相关。目前其治疗仍是皮肤科的难题之一。黄褐斑可引起表皮角质层变薄,皮肤屏障受损,继发炎症致使黑色素细胞含量增加。而黑色素合成涉及一系列的氧化反应。研究表明,Nrf-2/HO-1 通路与炎症和氧化应激有着千丝万缕的关系,因此该通路于黄褐斑研究是一个合适的靶点^[1]。甘草锌是甘草酸与锌结合的有机制剂,同时具备抗炎、抗氧化、促进愈合、调节免疫等作用。广泛应用于痤疮、糙皮病等皮肤病。因此,本研究将基于 Nrf-2/HO-1 通路研究甘草锌对黄褐斑小鼠的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 36 只,体重(20±2)g,6~8 周龄。购于成都达硕生物科技有限公司[SCXK(川)2020-0030],饲养于西南医科大学实验动物中心[SYXK(川)2023-0065]。本动物实验研究经过西南医科大学实验动物福利伦理委员会的批准(20220112-001),实验动物饲养和实验过程中严格遵守 3R 原则,给予动物人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

氨甲环酸(sigma 公司,货号:2207452);甘草锌颗粒(南京瑞年百思特制药有限公司,国药准字 H20153318);苏木精染液(武汉塞维尔生物科技有限公司,CR22002071);伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司,YE2080);IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、GSH-Px、MDA、SOD 等 ELISA KIT(上海茁彩生物科技有限公司,货号依次为 ZC-37974、ZC-37988、ZC-39024、ZC-38196、ZC-38015、ZC-38036);Nrf2 兔抗(Abcam 公司,Ab62352);HO-1 兔抗、生物素化山羊抗兔 IgG(H+L)(affinity 公司,货号:AF5393、s0001);Lamin B1 和 β -actin 抗体(abclonal 公司,货号:A1910、AC026);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(beyotime 公司,P0027);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(beyotime 公司,P0009)。透射电子显微镜(日本电子(JEOL),型号:JEM-1400FLASH);组织处理机、玻璃制刀机和超薄切片机(徠卡,型号依次为:EM TP、EM KMR3 和 EM UC7);酶标仪(美谷分子仪器有限公司,型号:SpectraMAX Plus384);FLUKO 超细匀浆器(弗鲁克(上海)流体机械制造有限公司,型号:F6/10-10G)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立

将 36 只雌性 BALB/c 小鼠随机均分为 6 组,每组 6 只。每只小鼠背部除毛约 3 cm×3 cm 区域,每周除毛 1 次,共 4 次。一组空白小鼠正常饲养,其余 5 组小鼠建立黄褐斑模型^[2],在小鼠后肢肌肉内注射 15 mg/kg 黄体酮,每天 1 次,连续 30 d,期间每隔 1 d 以 100 mJ/cm² 波长(波长 312 nm)的 UVB 照射 1 h。以此诱导小鼠皮肤色素沉着,造模小鼠黄褐斑。

1.3.2 分组及给药

甘草锌成人剂量为 5 g/70 kg(每天 2 次),根据成人到小鼠的换算系数 9.1,算得小鼠的等效剂量为 0.65 g/kg,作为甘草锌低剂量组,将等效剂量的 2 倍(1.3 g/kg)和 4 倍(2.6 g/kg)剂量作为甘草锌中、高剂量组。氨甲环酸颗粒成人剂量为 500 mg/70 kg,换算成小鼠等效剂量为 0.065 g/kg。BALB/c 小鼠黄褐斑造模完成后,氨甲环酸组小鼠灌服氨甲环酸 0.065 g/kg,每天 1 次;甘草锌低剂量组小鼠灌服甘草锌 0.65 g/kg,每天 2 次;甘草锌中剂量组小鼠灌服甘草锌 1.3 g/kg,每天 2 次;甘草锌高剂量组小鼠灌服甘草锌 2.6 g/kg,每天 2 次;模型组与空白组不予给药,灌服等量生理盐水。连续进行 14 d。

1.3.3 采集标本

小鼠眼眶后静脉丛采血,4℃放置 1 h 后于 3000 r/min 离心 15 min,分离血清并于 -20℃保存。小鼠背部除毛,采用断颈处死小鼠,用 75%乙醇消毒除毛区域。无菌剪刀采集 1 cm×1 cm 小鼠除毛区域色素沉着处皮肤,一部分用甲醛固定用于组织染色切片,另一部分剪碎并研磨至匀浆状态,后按照 1:9 的比例加入生理盐水制备成 10%的皮肤组织匀浆,充分混匀,4000 r/min 离心 10 min,取上清置于 4℃备用。

1.3.4 Masson-Fontana 染色检测黄褐斑小鼠皮肤黑色素细胞形成

肉眼观察鼠背部裸露皮肤红斑、色素沉着、毛发光泽度等状态,各组小鼠皮肤组织取下后用 40%甲醛水溶液固定,脱水处理后用石蜡包埋切片,脱蜡后进行 Masson-Fontana 染色,显微镜下观察并保存图片,并利用 Imagine 6.0 图像处理软件对黑色素颗粒进行计数。

1.3.5 HE 染色观察小鼠皮肤病理改变

各组小鼠皮肤组织取下后用 40%甲醛水溶液固定,脱水处理后用石蜡包埋切片,脱蜡后进行 HE

染色,通过 HE 染色切片观察甘草锌处理后对小鼠黄褐斑皮肤病理的影响。

1.3.6 ELISA 检测小鼠皮肤匀浆氧化应激指标和炎症指标含量

采用 ELISA 检测皮肤匀浆和外周血中氧化应激指标(SOD、MDA 及 GSP-Px)及炎症指标(TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6)含量。将目标抗体包被于 96 孔微孔板中,制成固相载体,向微孔中分别加入标准品或者样本,其中的目标连接于固相载体上的抗体结合,然后加入过氧化物酶标记的抗体,将未结合的抗体洗净后再次加入 TMB 底物显色。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),并计算样品浓度。

1.3.7 Western blot 检测小鼠皮肤 Nrf-2/HO-1 通路相关蛋白的表达

采用 Western blot 测定小鼠皮肤组织中 Nrf-2、HO-1 等 Nrf-2/HO-1 通路相关蛋白的表达水平。按照蛋白提取试剂盒说明书分别提取组织细胞中的核蛋白和浆蛋白,后用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度;蛋白经过变性、上样、电泳、转膜、封闭后,依次加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,加入二抗,室温孵育 2~3 h;ECL 显色,用天能 GIS 机箱控制软件 V2.0 对条带进行曝光扫描,结果以目的蛋白相对表达量表示。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 9.0.1 软件进行作图与统计,两组比较采用 *t*-test 方法进行,多组之间比较用 One-way ANOVA。以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 甘草锌颗粒对黄褐斑小鼠皮肤外观的影响

通过小鼠皮肤外观图片结果可知(图 1),与空白组相比,模型组小鼠背部出现大片褐色色素沉着斑。与模型组相比,甘草锌治疗组治疗 14 d 后,小鼠背部色斑随着甘草锌剂量的增高而减淡;氨甲环酸干预后小鼠背部色斑减淡较显著。

2.2 甘草锌颗粒对黄褐斑小鼠皮肤黑色素细胞形成的影响

UVB 照射后小鼠皮肤开始出现红斑,而后变为褐色,着色较深,手感较硬。Masson-Fontana 染色结果显示(图 2),模型组对比空白组黑素细胞明显生成,UVB 照射小鼠诱导皮肤黑素细胞产生的模型成立。通过对小鼠皮肤组织中黑色素颗粒计数,结果显示空白组小鼠皮肤组织中黑色素细胞无显著变化,模型组小鼠皮肤组织中黑色素细胞显著增加(14.00 ± 1.00);与模型组相比,甘草锌低剂量(10.00 ± 1.00)、甘草锌中剂量(6.67 ± 0.58)、甘草锌高剂量(5.33 ± 0.58)和氨甲环酸组(2.67 ± 0.58)中黑色素细胞显著降低。可知黑色素细胞数目随甘草锌浓度增加而减少,且氨甲环酸抑制黑色素细胞形成的能力高于甘草锌。

2.3 甘草锌颗粒对小鼠皮肤病理的影响

相比于空白组,模型组表皮有所增厚,棘细胞层数增加;真皮层较多胶原纤维坏死,坏死区见少量炎性细胞浸润及纤维组织增生。低剂量和中剂

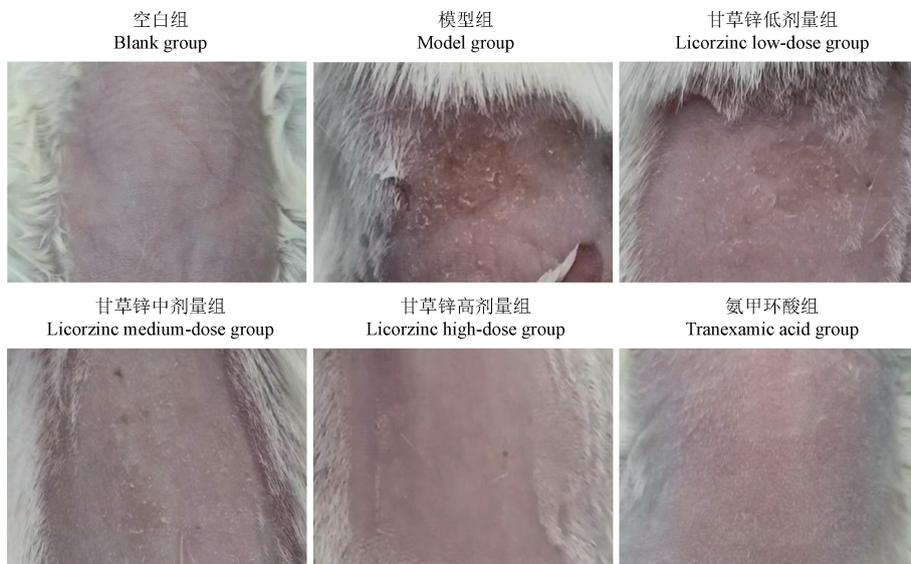


图 1 各组小鼠背部皮肤外观图

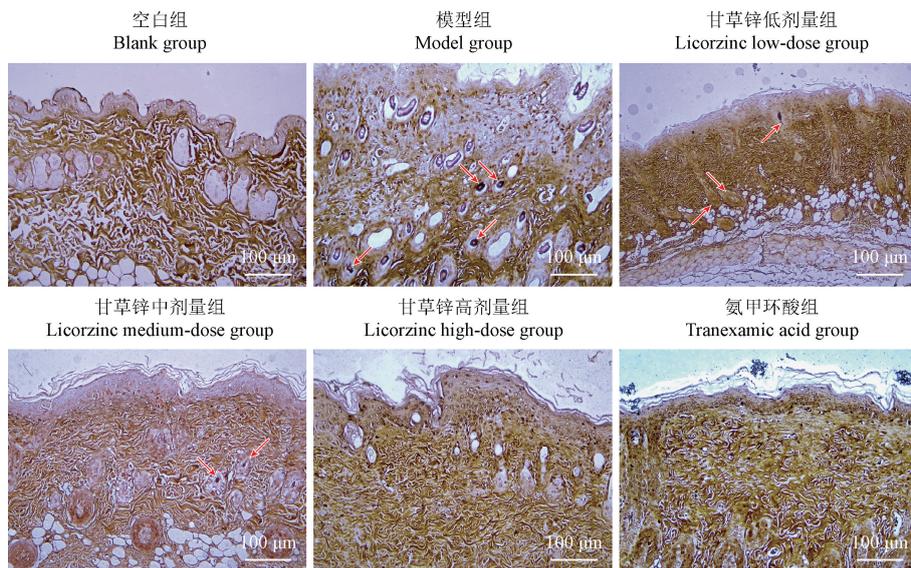
Figure 1 Appearance diagram of back skin of mice in each group

量甘草锌治疗后,无明显炎性细胞浸润,真皮层胶原纤维坏死及纤维组织增生减少,但表皮增厚现象无明显改善。高剂量甘草锌与氨甲环酸治疗后,炎性细胞浸润、表皮增厚现象及真皮层胶原纤维组织增生减少,各治疗组组织病理情况相同,损伤程度不同(图 3)。

2.4 甘草锌颗粒对小鼠皮肤匀浆及外周血中氧化应激指标的影响

氧化应激指标含量测定结果如表 1、表 2 所示,

黄褐斑造模后,GSP-Px 在小鼠皮肤组织和外周血中含量下降($P<0.05$),MDA 含量增加($P<0.001$);与模型组相比,高剂量甘草锌明显升高小鼠皮肤组织和外周血中 GSP-Px、SOD 含量($P<0.05$),降低 MDA 含量($P<0.05$),并表现明显的剂量依赖;此外,氨甲环酸干预后,MDA 含量显著降低($P<0.01$)。与空白组相比,模型组小鼠皮肤 SOD 含量显著下降($P<0.01$);而几组药物干预组中,只有高剂量甘草锌治疗后 SOD 含量明显增加($P<0.05$)。

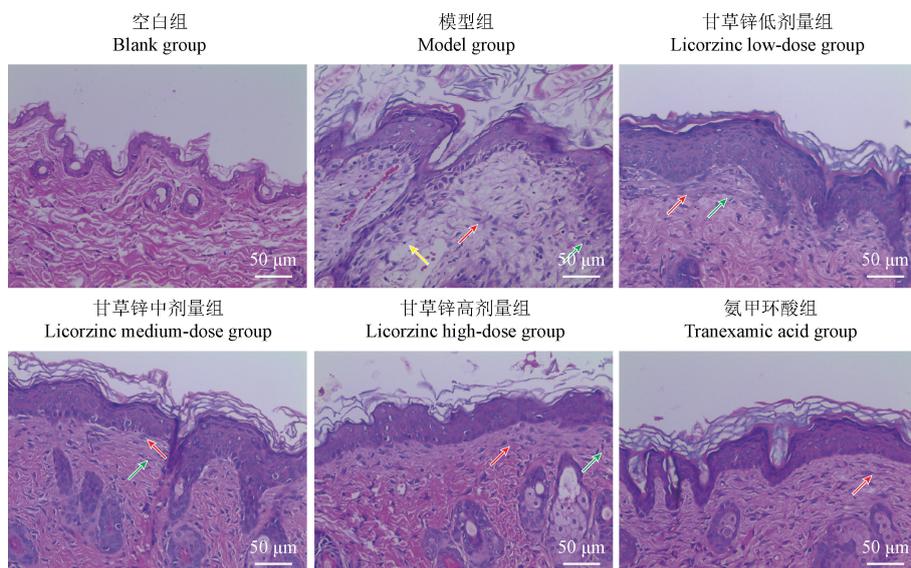


注:红色箭头表示黑色素颗粒。

图 2 各组对黑色素细胞形成的影响

Note. Red arrows indicate melanin granules.

Figure 2 Effect of each group on melanocyte formation



注:红色箭头表示成纤维细胞;绿色箭头表示纤维细胞;黄色箭头表示淋巴细胞。

图 3 各组小鼠皮肤组织病理 HE 染色

Note. Red arrows indicate fibroblasts. Green arrows indicate fibrocytes. Yellow arrows indicate lymphocytes.

Figure 3 HE staining of skin histopathology of mice in each group

2.5 甘草锌颗粒对小鼠皮肤匀浆及外周血中炎症指标的影响

小鼠皮肤组织及外周血中炎症指标含量测定结果如表 3、表 4 所示,研究发现,与空白组相比,模型组 IL-1 β 、IL-6 与 TNF- α 含量均显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组相比,甘草锌低剂量组小鼠皮肤

中 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 含量变化不具有统计学意义,血液中 IL-6、IL-1 β 含量降低 ($P < 0.05$);甘草锌中剂量组小鼠皮肤和外周血中 IL-6 与 IL-1 β 含量均有所下降 ($P < 0.05$);而甘草锌高剂量组小鼠皮肤和外周血中 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 均下降 ($P < 0.01$);氨甲环酸组 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 均下降 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠皮肤氧化应激指标含量 ($n=6$)

Table 1 Contents of oxidative stress indicators in skin of mice in each group

组别 Groups	GSP-Px (U/mL)	MDA (nmol/mL)	SOD (ng/mL)
空白组 Blank group	51.70 \pm 5.94	0.59 \pm 0.20	2.222 \pm 0.08
模型组 Model group	35.07 \pm 4.89*	1.66 \pm 0.07***	1.53 \pm 0.15**
甘草锌低剂量组 Licorzinc low-dose group	39.32 \pm 5.21	1.21 \pm 0.24 [#]	1.71 \pm 0.16
甘草锌中剂量组 Licorzinc medium-dose group	42.66 \pm 2.98	1.12 \pm 0.24 [#]	1.83 \pm 0.12
甘草锌高剂量组 Licorzinc high-dose group	46.20 \pm 3.93 [#]	0.70 \pm 0.09 ^{###}	1.94 \pm 0.16 [#]
氨甲环酸组 Tranexamic acid group	43.80 \pm 4.52	0.95 \pm 0.21 ^{##}	1.85 \pm 0.16

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

表 2 各组小鼠外周血中氧化应激指标含量 ($n=6$)

Table 2 Content of oxidative stress indicators in peripheral blood of mice in each group

组别 Groups	GSP-Px (U/mL)	MDA (nmol/mL)	SOD (ng/mL)
空白组 Blank group	53.32 \pm 3.09	0.79 \pm 0.057	0.92 \pm 0.05
模型组 Model group	22.20 \pm 1.99***	1.84 \pm 0.10***	0.52 \pm 0.06**
甘草锌低剂量组 Licorzinc low-dose group	33.78 \pm 1.57 [#]	1.54 \pm 0.10 [#]	0.66 \pm 0.05 [#]
甘草锌中剂量组 Licorzinc medium-dose group	43.43 \pm 3.57 ^{###}	1.33 \pm 0.16 ^{##}	0.76 \pm 0.10 ^{##}
甘草锌高剂量组 Licorzinc high-dose group	50.86 \pm 4.66 ^{###}	1.06 \pm 0.15 ^{###}	0.88 \pm 0.04 ^{###}
氨甲环酸组 Tranexamic acid group	48.00 \pm 5.38 ^{###}	1.17 \pm 0.13 ^{##}	0.84 \pm 0.03 ^{##}

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the blank group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.

表 3 各组小鼠皮肤炎症指标含量 ($n=6$)

Table 3 Contents of skin inflammatory indicators in mice of each group

组别 Groups	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
空白组 Blank group	18.36 \pm 1.89	11.99 \pm 0.99	82.71 \pm 3.25
模型组 Model group	26.50 \pm 1.03***	17.30 \pm 1.27**	114.8 \pm 9.76***
甘草锌低剂量组 Licorzinc low-dose group	24.11 \pm 2.51	16.46 \pm 0.99	111.1 \pm 2.38
甘草锌中剂量组 Licorzinc medium-dose group	22.49 \pm 1.07 [#]	15.10 \pm 0.58 [#]	102.2 \pm 8.89
甘草锌高剂量组 Licorzinc high-dose group	21.22 \pm 1.19 [#]	13.59 \pm 0.98 ^{##}	95.88 \pm 7.01 ^{##}
氨甲环酸组 Tranexamic acid group	22.22 \pm 2.23 [#]	14.59 \pm 0.82 [#]	98.67 \pm 5.85 [#]

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the blank group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$.

2.6 甘草锌颗粒对小鼠皮肤 Nrf-2/HO-1 通路的影响

浆蛋白中以 β -actin 为内参, Western blot 方法测定 Nrf2 蛋白含量;核蛋白中以 Lamin B 为内参,测定 Nrf2 与 HO-1 含量(图 4)。结果显示相比于空白组,模型组浆蛋白中 Nrf2 蛋白的含量显著增加($P < 0.0001$);而核蛋白中 Nrf2 蛋白的含量显著降低($P < 0.01$)。相比于模型组,各治疗组中浆蛋白的

Nrf2 含量显著降低($P < 0.0001$),其中以甘草锌高剂量组下调浆蛋白中 Nrf2 表达最为明显,氨甲环酸次之,中、低剂量甘草锌再次之;各治疗组相比于模型组,各治疗组中核蛋白的 Nrf2 与 HO-1 含量明显升高,具有统计学意义($P < 0.05$)。甘草锌高剂量治疗组上调核蛋白中 Nrf2 与 HO-1 表达最为明显,氨甲环酸次之,中、低剂量甘草锌再次之。

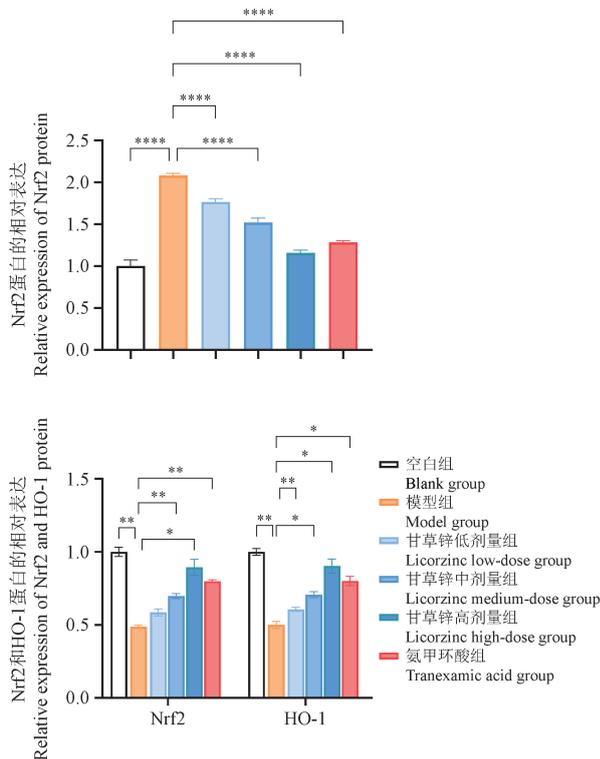
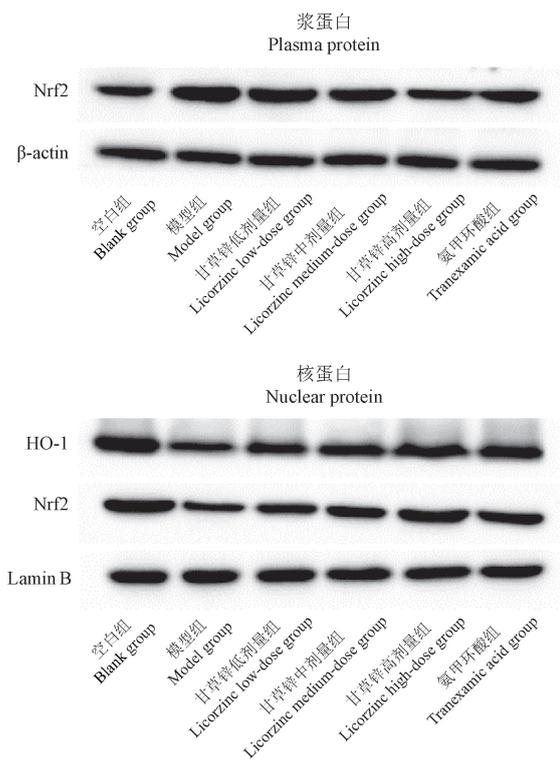
表 4 各组小鼠外周血炎症指标含量($n=6$)

Table 4 Contents of inflammatory indicators in peripheral blood of mice in each group

组别 Groups	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
空白组 Blank group	11.70 \pm 0.51	8.70 \pm 0.545	57.94 \pm 7.94
模型组 Model group	22.08 \pm 0.65 ^{***}	15.51 \pm 0.80 ^{***}	92.62 \pm 3.94 ^{***}
甘草锌低剂量组 Licorzinc low-dose group	19.60 \pm 1.02 [#]	13.27 \pm 0.69 [#]	85.72 \pm 5.65
甘草锌中剂量组 Licorzinc medium-dose group	17.99 \pm 0.38 ^{##}	11.85 \pm 0.65 ^{##}	76.39 \pm 4.51 [#]
甘草锌高剂量组 Licorzinc high-dose group	15.00 \pm 0.92 ^{###}	10.46 \pm 0.95 ^{###}	65.88 \pm 2.12 ^{###}
氨甲环酸组 Tranexamic acid group	15.71 \pm 0.79 ^{###}	10.65 \pm 1.06 ^{###}	68.58 \pm 4.31 ^{##}

注:与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,^{###} $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the blank group, *** $P < 0.001$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$.



注:两组间相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,**** $P < 0.0001$ 。

图 4 各组小鼠皮肤检测浆蛋白 Nrf2 和核蛋白 Nrf2 和 HO-1 的表达水平

Note. Compared between two groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

Figure 4 Expression levels of plasma protein Nrf2 and nuclear proteins Nrf2 and HO-1 were detected in the skin of mice in each group

3 讨论

黄褐斑的发病涉及多种因素和多个环节。研究发现黄褐斑的发生与多种因素相关,包含遗传、紫外线照射、氧自由基与氧化应激、情绪变化、内分泌失调、机体系统性病变等因素。常采用肌内注射黄体酮、紫外线照射和紫外联合肌内注射黄体酮 3 种方法建立黄褐斑小鼠模型^[3]。紫外线作为一种具有提高酪氨酸酶活性而刺激黑色素细胞分裂的外源性刺激因素,还能促进黑色素细胞中黑素小体的分泌导致皮肤色素沉着^[4]。而黄体酮具有促进黑色素细胞的增殖和合成黑色素的重要作用,最终导致色素沉着而加剧黄褐斑^[5]。众多研究证实黄体酮联合紫外线作用小鼠能够兼顾黄褐斑形成的内外因素,是稳定建立黄褐斑小鼠模型的重要方法之一。研究表明,参与黄褐斑的发生及发展的重要环节包含酪氨酸酶活性增高、血管反应性增强、微循环障碍、炎症反应及氧化和抗氧化失衡等过程^[6-7]。针对不同黄褐斑形成及发病环节,国内外多采用系统或局部应用氨甲环酸、维生素 C 等药物^[8-10];辅以激光、强脉冲光、微针、中医疗法等方式综合治疗,以抑制酪氨酸酶活性、阻碍黑素的生成和转运、促进已生成的黑色素代谢,从而改善黄褐斑^[11-13]。

目前,甘草锌在治疗黄褐斑尚无研究,但因为甘草锌的抗炎、抗氧化效果与黄褐斑的治疗原则相符,本研究便通过小鼠黄褐斑造模,以阳性药物氨甲环酸和不同剂量甘草锌进行治疗,研究甘草锌的治疗效果及可能的作用靶点。研究表明,甘草锌也具备抑制黑素细胞形成的能力,但其能力明显弱于氨甲环酸;病理结果显示,甘草锌和氨甲环酸均显著缓解皮肤角质层增厚,减少炎性细胞浸润,对黄褐斑形成区的淋巴细胞具有清除作用。但对坏死区已形成的成纤维细胞核纤维细胞无明显改善。

从分子生物学角度来看,ELISA 结果显示,高剂量甘草锌显著增强氧化应激指标中 GSP-Px 和 SOD 的表达,显著降低 MDA 的表达。GSP-Px 是动物体内的一种过氧化物分解酶,胞浆 GSP-Px 能清除在细胞呼吸代谢过程中产生的过氧化物和羟自由基,从而减轻细胞膜多不饱和脂肪酸的过氧化作用;SOD 是一种能够通过清楚 ROS 保护细胞免受损伤的抗氧化剂;而 MDA 是一种能引起细胞代谢及功能障碍的脂质过氧化产物,能够加速机体衰

老^[14-15]。因此 GSP-Px 和 SOD 的表达上调和 MDA 的下调反映了甘草锌强大的抗氧化作用,且高剂量的甘草锌抗氧化能力强于氨甲环酸。与此同时,炎症指标中 IL-6、IL-1 β 与 TNF- α 均有明显下降,中剂量的甘草锌就能达到较好的抗炎效果,但高剂量的甘草锌抗炎效果仍不如氨甲环酸。因此笔者认为甘草锌的抗氧化能力应作为甘草锌药物的主要开发靶点,而非抗炎作用。

Nrf2/HO-1 通路是动物机体内抗氧化应激通路,研究表明当细胞产生氧化应激或暴露在外源性有毒物质时,细胞浆中的 Nrf2 进入细胞核内与抗氧化反应元件 ARE 结合,诱导下游多种保护性基因表达,如 GSH-Px、SOD 与 HO-1 等,这些基因表达的蛋白最终通过抗氧化应激来保护细胞^[16-17]。本研究发现造模后浆蛋白中 Nrf2 的表达水平明显升高,而核蛋白中的 Nrf2 和 HO-1 表达显著降低;在甘草锌与氨甲环酸处理后的模型中,浆蛋白中 Nrf2 的表达水平明显降低,而核蛋白中的 Nrf2 和 HO-1 表达显著升高。Nrf2 在核内才能激活 Nrf2/ARE 通路,HO-1 是 Nrf2/ARE 通路下游抗氧化系统的重要组成部分,同时也是核内表达的抗氧化酶^[18]。本研究结果提示甘草锌能促进 Nrf2 侵入核内激活 Nrf2/ARE 通路,最终靶向 GSH-Px、SOD 与 HO-1,大大提高细胞的抗氧化能力。高剂量甘草锌提高 GSH-Px、SOD 与核内 Nrf2、HO-1 表达的能力强于阳性药物氨甲环酸,因此甘草锌在抑制黑色素生成、细胞抗氧化方面的药物开发大有可为。本研究评估了甘草锌治疗黄褐斑的可行性,为黄褐斑的治疗提供参考,具有十分重要的临床意义。

参考文献:

- [1] Li Y, Zhu Z, Zhang T, et al. Ligustrazine attenuates inflammation and oxidative stress in a rat model of arthritis via the Sirt1/NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathways [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(9): 824-831.
- [2] 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.
Miao MS, Fu ZN, Cao LH. Standard specification for animal models of chloasma (draft) [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2017, 28(5): 649-653
- [3] 武晏屹,田硕,苗明三. 基于数据挖掘的黄褐斑动物模型应用分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 70-75.
Wu YY, Tian S, Miao MS. Analysis of the use of animal models of chloasma based on data mining [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 70-75.
- [4] Yang J, Zeng J, Lu J. Mechanisms of ultraviolet - induced

- melasma formation; a review [J]. *J Dermatol*, 2022, 49: 1201–1210.
- [5] Im S, Lee ES, Kim W, et al. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocytes [J]. *J Korean Med Sci*, 2002, 17(1): 58–64.
- [6] Sheth VM, Pandya AG. Melasma: a comprehensive update: part I [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2011, 65(4): 689–697.
- [7] Arrowitz C, Schoelermann AM, Mann T, et al. Effective tyrosinase inhibition by thiamidol results in significant improvement of mild to moderate *Melasma* [J]. *J Invest Dermatol*, 2019, 139(8): 1691–1698, e6.
- [8] Akl EM. Liposomal azelaic acid 20% cream vs hydroquinone 4% cream as adjuvant to oral tranexamic acid in melasma: a comparative study [J]. *J Dermatolog Treat*, 2022, 33(4): 2008–2013.
- [9] Badran Aya Y, Ali Ahmed U, Goma Ahmed S. Efficacy of topical versus intradermal injection of Tranexamic Acid in Egyptian melasma Patients; a randomised clinical trial [J]. *Australas J Dermatol*, 2021, 62(3): e373–e379.
- [10] Menon A, Eram H, Kamath PR, et al. A split face comparative study of safety and efficacy of microneedling with tranexamic acid versus microneedling with vitamin C in the treatment of melasma [J]. *Indian Dermatol Online J*, 2019, 11(1): 41–45.
- [11] Elmorsy E, Aboukhadr N, Tayyeb M, et al. Low-power fractional carbon dioxide laser followed by jessner's peel versus jessner's peel alone for the treatment of *Melasma* [J]. *J Clin Aesthet Dermatol*, 2021, 14(2): 61–67.
- [12] Adel S, Serri A, Abd EL-Raheem T. Study of autologous platelet-rich-plasma versus its combination with intense pulsed light in treatment of melasma [J]. *Dermatol Ther*, 2021, 34(4): e15008.
- [13] Ustuner P, Balevi A, Ozdemir M. A split-face, investigator-blinded comparative study on the efficacy and safety of Q-switched Nd:YAG laser plus microneedling with vitamin C versus Q-switched Nd:YAG laser for the treatment of recalcitrant melasma [J]. *J Cosmet Laser Ther*, 2017, 19(7): 383–390.
- [14] 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.
- Wang CX. Effects of meifu powder on SOD, MDA, TYR, LF and melanocytes in chloasma model mice [J]. *Chin J Gerontol*, 2021, 41(23): 5394–5396.
- [15] 王花, 七国雁, 张萍, 等. 高原药食两用植物芫菁醚提取物对衰老小鼠免疫器官和 SOD、MDA、GSH-Px 水平的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(1): 58–60.
- Wang H, Nie GY, Zhang P, et al. Effects of plateau region plant *Brassica rapa* ether extracts to immune organ and SOD, MDA and GSH-Px of the aging-model mice [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2014, 25(1): 58–60.
- [16] 刘薇, 王红霞, 王立魁, 等. COX-2/Nrf2/ARE 信号通路 with 体内外的抗炎、抗氧化作用机理 [J]. *生命科学*, 2011, 23(10): 1027–1033.
- Liu W, Wang HX, Wang LK, et al. COX-2 and Nrf2/ARE signaling pathways in anti-inflammation and antioxidation in vivo and in vitro [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2011, 23(10): 1027–1033.
- [17] Luo C, Urgard E, Vooder T, et al. The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress; aging and anti-aging [J]. *Med Hypotheses*, 2011, 77(2): 174–178.
- [18] Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat; role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes [J]. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*, 2010, 696(1): 69–80.

[收稿日期] 2023-03-26