

论著·中药研究

骨碎补外用对实验性豚鼠白癜风的影响*

沈丽 张德芹 黄云英 王雪妮 杜娟 王元元

摘要 [目的] 探讨骨碎补外用对实验性白癜风豚鼠模型的治疗作用,为中国药典增补其“外用消风祛斑”的功能提供药效学参考依据。[方法] 采用过氧化氢化学脱色法制备实验性白癜风豚鼠模型,观察受试药物对豚鼠皮肤黑色素形成及血液中酪氨酸酶(TYR)、胆碱酯酶(CHE)和单胺氧化酶(MAO)的影响。[结果] 骨碎补外用能够使实验性白癜风模型有良好的治疗作用,与模型组相比,皮肤黑色素分布含量增加,血液中TYR活力增加、CHE活力增加、MAO活力降低。[结论] 骨碎补外用对白癜风豚鼠模型有治疗作用。

关键词 骨碎补;白癜风;豚鼠模型

中图分类号 R758.4

文献标识码 A

文章编号 1673-9043(2012)02-0092-03

骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 [*Drynaria fortunei* (Kunze) J.Sm.]的干燥根茎,其味苦,性温。归肝、肾经,是一味既可内服又可外用的常用中药。历版《中国药典》对骨碎补内服功能及主治均有详细的记载,但在骨碎补外用功能及主治方面,缺少能指导其临床“外治斑秃,白癜风”的外用功能。2010年版《中国药典》将骨碎补的功能主治规范为“疗伤止痛,补肾强骨;外用消风祛斑。用于跌扑闪挫,筋骨折伤,肾虚腰痛,筋骨痿软,耳鸣耳聋,牙齿松动;外治斑秃,白癜风”^[1]。本实验采用传统方法用黄酒调和骨碎补粉末,外用治疗实验性白癜风模型,观察骨碎补对机体黑色素合成的影响,进一步证实了骨碎补外用具有治疗白癜风的功效,为2010年版《中国药典》完善骨碎补外用功能,增补“外用消风祛斑”提供药效学参考依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Infinite M200 微量多功能读板机 Tecan; Olympus 照相显微镜;酪氨酸酶(Sigma chemical Co.批号 120M7001);L-多巴(Sigma chemical Co.批号 080M1712V);胆碱酯酶(CHE)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20110624);单胺氧化酶(MAO)测定试剂盒(Cusabio 公司,批号

C04200783);过氧化氢(天津市赢达稀贵化学试剂厂,批号 20110217);其余试剂均为分析纯。

1.2 药物 骨碎补药材(购于安徽亳州药材市场,产地:江西,批号 201103-2)。由天津中医药大学药教研室李天祥老师鉴定为水龙骨科植物槲蕨 [*Drynaria fortunei* (Kunze) J.Sm.]的干燥根茎;甲氧沙林(重庆华邦制药股份有限公司产品,批号 2010005)。

1.3 动物 健康黑花色豚鼠,体质量(300±20)g,雄性,由北京沙河通利实验动物养殖场提供,动物许可证号为 SCXK(京)2010-0004。

2 方法

2.1 药液的制备 将骨碎补药材打成粉末,过100目筛。取骨碎补粉末15g,用黄酒配成生药0.25g/g的药液。

2.2 模型的制备 黑花色豚鼠按随机数字表法随机分成6组,每组8只,即正常对照组、模型对照组、甲氧沙林对照组、骨碎补高、中、低剂量组。用电动剃毛刀剃去背部长毛,用刀片剃去背部短毛,面积约4cm×4cm。除正常组涂等量纯化水外,其余各组在脱毛区涂5%过氧化氢1mL,每日2次,连续40d,建立实验性白癜风动物模型。在此期间每日脱毛1次^[2-3]。

2.3 给药方案 从造模第11天开始各组分别在涂过氧化氢后1h给药。正常对照组:不做任何处理;模型对照组:涂抹等体积黄酒;甲氧沙林对照组:涂抹甲氧沙林1mL;骨碎补高、中、低剂量组涂抹骨碎补药液,每日用药剂量分别为1.40、0.70、0.35g/kg。每日涂药1次,给药1h后,照日光15min,连续30d。

* 基金项目:国家科技支撑计划基金项目(2008BA153B09)。

作者单位:300193 天津中医药大学中医药研究院

作者简介:沈丽(1988-),女,硕士研究生,主要研究方向为中药基本理论及临床应用。

通讯作者:张德芹。

2.4 指标检测

2.4.1 表皮观察 实验结束后,肉眼观察豚鼠背部皮肤色素分布。疗效判定标准^[4](以豚鼠用药部位中心3 cm²为一观察单位):优为受试区(3 cm²)色素基本恢复正常;良为受试区出现色素面积>50%;中为受试区色素面积<50%;差为受试区皮肤仍呈苍白或白斑状;总有效率以优加良计。

2.4.2 指标测定 末次给药后2 h,豚鼠用3.5%的水合氯醛麻醉后,经腹主动脉取血,3 500 r/min离心20 min分离血清和血浆,进行血浆酪氨酸酶(TYR)和血清CHE、MAO的测定。

2.4.3 病理观察 实验结束后于用药部位的中心取1 cm×1 cm皮肤,10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,切片,苏木-伊红(HE)染色,观察标本组织学的变化。用硫酸亚铁Lillie法进行黑色素染色,观察50个毛囊,计算其中有黑色素毛囊数及皮肤黑色素分布情况。判定标准^[5]：“-”表示表皮基底细胞及棘层无黑色素;“±”表示表皮基底细胞及棘层偶见黑色素;“+”表示表皮基底细胞及棘层1/3~1/2有黑色素;“++”表示表皮基底细胞及棘层1/2以上有黑色素;“+++”表示表皮基底细胞及棘层均有黑色素。

2.5 统计方法 采用SPSS 18.0软件包进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 表皮观察 模型组皮肤颜色明显变浅,肤色苍白,甚至原有黑毛处长出白毛。治疗组肉眼观察肤色变浅程度弱于模型组。甲氧沙林组的干燥、脱屑现象较骨碎补组明显,洒浸的骨碎补在一定程度上防止了皮肤干燥并减轻了皮肤脂质过氧化对皮肤造成的损害。结果见表1。

表1 骨碎补对白癫风模型豚鼠影响的疗效观察
(3 cm²/观察单位 $n=8$) 例

组别	剂量 (g/kg)	疗效			
		优	良	中	差
正常对照组	-	8	0	0	0
模型对照组	-	0	2	6	0
甲氧沙林对照组	1 mL/只	4	3	1	0
骨碎补高剂量组	1.40	3	5	0	0
骨碎补中剂量组	0.70	2	4	2	0
骨碎补低剂量组	0.35	3	3	2	0

3.2 生化测定 结果见表2。

3.2.1 TYR活性 和正常组相比,模型组下降差异

有统计学意义($P < 0.05$)和模型组相比,甲氧沙林组TYR活性明显升高($P < 0.01$),骨碎补给药组随浓度的增加有逐渐升高的趋势。

3.2.2 CHE活性 和正常组相比,模型组下降差异有统计学意义($P < 0.01$)和模型组相比,甲氧沙林组和骨碎补高剂量组活性升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3.2.3 MAO活性 和正常组相比,模型组升高差异有统计学意义,和模型组相比,甲氧沙林组和骨碎补高剂量组活性降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),骨碎补中剂量组活性降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 骨碎补对白癫风豚鼠模型TYR、CHE、MAO的影响
($\bar{x} \pm s$ $n=8$) U/mL

组别	剂量(g/kg)	TYR	CHE	MAO
正常对照组	-	6.64±0.63*	83.37± 5.76**	13.77±1.42
模型对照组	-	6.07±0.24	52.53± 6.93	14.29±0.58
甲氧沙林对照组	1 mL/只	7.11±0.59**	75.81± 7.98**	12.65±1.28**
骨碎补高剂量组	1.4	6.39±0.58	64.40± 6.19**	12.32±0.96**
骨碎补中剂量组	0.7	6.33±0.70	57.88±12.76	13.01±0.70*
骨碎补低剂量组	0.35	5.91±0.19	57.38± 9.77	13.88±1.02

注:与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3 病理观察 光镜检查发现模型组和用药组棘层明显增厚,角质增厚明显,模型组基底层和棘层黑色素明显缺失,用药各组的黑色素分布基本恢复至正常水平,棘层增厚程度较模型组减弱,说明骨碎补对白癫风模型具有治疗作用。结果见表3,正常组与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),骨碎补高剂量组与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 骨碎补对白癫风模型豚鼠皮肤黑色素的影响
($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

组别	剂量 (g/kg)	皮肤色素分布					有黑色素毛囊数 (个)
		-	±	+	++	+++	
正常对照组	-	0	0	1	3	4	46.63±2.92**
模型对照组	-	0	4	3	1	0	41.25±3.20
甲氧沙林对照组	1 mL/只	0	0	2	4	2	43.38±2.67
骨碎补高剂量组	1.40	0	1	2	2	3	45.38±2.83*
骨碎补中剂量组	0.70	0	0	1	3	4	44.38±2.45
骨碎补低剂量组	0.35	0	0	4	1	3	40.50±4.50

注:与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

4 讨论

白癫风是由多种原因引起的色素代谢障碍性疾病,临床上以皮肤色素脱失斑为特征。由于酪氨

酪氨酸酶(TYR)是各种生物体内色素形成的关键酶,所以能够激活酪氨酸酶、增强其活性的药物,可促进色素的合成,有助于白癜风病损区色素的恢复。

临床检测发现白癜风患者皮损区CHE活性降低,胆碱能活性增加,交感神经兴奋性增高,以及MAO值升高。近年来许多学者在探讨MAO、CHE等和黑色素合成的关系^[6],提出交感神经兴奋性增加,一方面可能会导致MAO活性增加;另一方面可能导致褪黑激素等介质的释放增加,使黑色素合成减少,进而出现过氧化氢聚集导致黑色素合成减少。

本实验通过采用5%的过氧化氢造模后,白癜风模型组豚鼠血液中TYR含量降低,CHE活力降低,MAO活力增加,与正常组豚鼠相比差异有统计学意义,与临床白癜风患者病理状况类似,采用5%的过氧化氢可复制实验性白癜风模型动物。用骨碎补后TYR含量升高,MAO活力降低,CHE活性增加,提示骨碎补对白癜风有治疗作用,从而为2010版《中国药典》增补外用“消风祛斑”功能提供药效学

依据^[7]。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2010:290.
- [2] 龙子江,白玫,樊彦,等.化学脱色法制备白癜风动物模型[J].安徽中医学院学报,1997,16(6):60-62.
- [3] Imokama G, Kawai M, Mishima Y, et al. Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVB,PUVA, and allergic contact dermatitis using a brownish guinea pig model[J]. Arch Dermatol Res, 1986,278(5):352.
- [4] 全国中西医结合皮肤性病学会色素病理学组.白癜风临床分型及疗效标准(草案)[J].中华皮肤科杂志,1995,28(3):212.
- [5] 盛国荣.祛白酊对实验性白癜风的治疗作用[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(2):57-59.
- [6] 张汝芝,朱文元.过氧化氢与白癜风的发病机制[J].国外医学·皮肤性病学分册,2002,28(6):356-359.
- [7] 郝存江,赵晓峰.纳米中药研究进展[J].天津中医药,2006,23(6):515.

(收稿日期 2011-12-24)

Influence of external use of rhizoma drynariae on experimental vitiligo

SHEN Li, ZHANG De-qin, HUANG Yun-ying, WANG Xue-ni, DU Juan, WANG Yuan-yuan
(The Research Institute of TCM, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, china)

Abstract: [Objective] To study the therapeutic effect of external use of rhizoma drynariae on experimental vitiligo guinea pig model, and provide some pharmacodynamics references basis for its function of resolving wind and expelling macula in Chinese Pharmacopeia (ChP). [Methods] Vitiligo was produced by chemical decoloration method. The influence of the tested drug on the guinea pig skin melanin distribution and the blood tyrosinase (TYR), cholinesterase (CHE) and single amine (MAO) were measured. [Results] The external use of rhizoma drynariae showed good effects on the animal models. It could highly improve the skin melanin generation compared with that in model group, and can also increase the activity of TYR, CHE and MAO. [Conclusion] The external use of rhizoma drynariae shows good effects on the guinea pig model model.

Key words: rhizoma drynariae; vitiligo; guinea pig model